

Vergleichende Analyse corona- und bafiniviraler Exoribonuklease-Aktivitäten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
angefertigt am Institut für Medizinische Virologie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Marc Sauerwald



Gießen, 2025

Erstgutachter:

Prof. Dr. Albrecht Bindereif
Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. John Ziebuhr
Institut für Medizinische Virologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	5
2	Einleitung.....	7
2.1	<i>Nidovirales</i>	7
2.1.1	Taxonomische Einordnung der Nidoviren	8
2.1.1.1	<i>Coronaviren</i>	9
2.1.1.2	<i>Bafiniviren</i>	9
2.1.2	Infektionszyklus der Nidoviren	10
2.1.3	Genomorganisation	12
2.2	Nichtstrukturproteine des nidoviralen Replikasegens	14
2.2.1	Der Polymerase-Kernkomplex.....	15
2.2.2	ExoN und Guanin-N7-Methyltransferase	17
2.2.3	Kofaktor nsp10	22
2.2.4	Nsp14 und der Capping-Prozess.....	23
2.2.5	Nsp13 Helikase/RTPase/NTPase.....	26
2.3	Zielsetzung der Arbeit	26
3	Materialien	28
3.1	Chemikalien und Reagenzien	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	<i>E. coli</i> Genotypen	28
3.1.3	Antibiotika.....	28
3.1.4	Nährmedien.....	28
3.1.5	Vektoren/Plasmide.....	28
3.1.6	Oligonukleotide.....	29
3.1.6.1	<i>PCR-Primer für die Klonierung</i>	29
3.1.6.2	<i>RNA-Substrate für die Bestimmung der ExoN-Aktivität</i>	30
3.1.6.3	<i>RNA-Oligonukleotide für Größenstandards</i>	31
3.1.7	Radioaktive Nukleotide	31
3.1.8	Größenstandards und Marker	31
3.1.9	Puffer und Lösungen.....	31
4	Methoden.....	32
4.1	Mikrobiologische Methoden.....	32
4.1.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	32
4.1.1.1	<i>Herstellung kompetenter E.-coli-Zellen</i>	32
4.1.1.2	<i>Transformation von chemisch kompetenten E. coli</i>	32
4.1.1.3	<i>Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli</i>	33
4.1.2	Lyse von <i>E. coli</i>	33
4.2	Biochemische Methoden	34
4.2.1	Gel-Elektrophoresen	34
4.2.1.1	<i>Agarose-Gele zur Auftrennung von DNA</i>	34
4.2.1.2	<i>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoreses von RNA</i>	34
4.2.1.3	<i>Tris-Trizin-Polyacrylamidgel (PAGE) zur Auftrennung von Proteinen</i>	35
4.2.2	Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Gelen	36
4.2.2.1	<i>Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen</i>	36
4.2.2.2	<i>Phosphorimaging</i>	36
4.2.3	<i>In-vitro-3'-5'-Exoribonuklease-Aktivitätstests</i>	37

4.3	Molekularbiologische Methoden	38
4.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Proteinen.....	38
4.3.1.1	Affinitätschromatographie.....	38
4.3.1.2	Größenausschlusschromatographie.....	39
4.3.1.3	Dialyse.....	40
4.3.1.4	Konzentration von Proteinen durch Zentrifugationsfilter.....	40
4.3.2	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford.....	40
4.3.3	Klonierung.....	41
4.3.3.1	TOPO-Klonierung.....	41
4.3.3.2	Restriktions- und ligationsfreies-Klonieren.....	41
4.3.4	Mutagenese der ExoN-Domäne.....	41
4.3.5	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	42
4.3.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Minipräparation).....	42
4.3.5.2	Fällung von Nukleinsäuren.....	43
4.3.5.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	44
4.3.5.4	Aufreinigung von PCR-Produkten (GeneJet®).....	44
4.3.6	Enzymatische Behandlung und Modifikation von Nukleinsäuren.....	44
4.3.6.1	Restriktion von DNA.....	44
4.3.6.2	Ligation von DNA.....	44
4.3.6.3	T4 Polynukleotidkinase (PNK), [³² P]-5'-Markierung von RNA.....	45
4.3.6.4	RNA-RNA-Hybridisierung.....	46
4.3.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Heterologe Expression von coronaviralen und bafinviralen ExoN-Proteinen	47
5.1.1	Klonierung von ExoN.....	47
5.1.1.1	WBV-ExoN.....	47
5.1.1.2	HCoV-229E-nsp14.....	47
5.1.1.3	SARS-CoV-nsp14.....	48
5.1.2	Klonierung der ExoN-Mutanten.....	48
5.1.2.1	ExoN-Motiv-I-III-Mutanten.....	48
5.1.2.2	WBV-ExoN-Mutanten.....	49
5.1.2.3	HCoV-229E-ExoN-Mutanten.....	49
5.1.2.4	SARS-CoV-ExoN-Mutanten.....	49
5.1.3	Expression und Aufreinigung der nsp14/ExoN-Proteine.....	50
5.1.4	Herstellung rekombinanter coronaviraler nsp10-Proteine und eines möglichen orthologen Proteins von WBV (pp1aC).....	56
5.1.4.1	Klonierung der Sequenzen des C-terminalen WBV-pp1a-Spaltprodukts (pp1aC) sowie der Proteine HCoV-229E-nsp10 und SARS-CoV-nsp10.....	56
5.1.4.2	Expression und Aufreinigung von nsp10 (pp1aC).....	57
5.2	Charakterisierung der Substratanforderungen von ExoN	62
5.2.1	Funktionalität der ExoN-Aktivität.....	62
5.2.2	Nachweis der 3'-5'-gerichteten ExoN-Aktivität auf ssRNA.....	64
5.2.3	Untersuchung der ExoN-Aktivität gegenüber einem ssRNA-Substrat mit 3'-terminalem 2'-Desoxynukleotid.....	68
5.2.4	Charakterisierung der ExoN-Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA.....	70
5.2.5	Charakterisierung der ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA.....	72
5.2.5.1	WBV-ExoN auf partieller dsRNA mit 1-3 3'-nichtgepaarten nt.....	74
5.2.5.2	HCoV-229E-ExoN auf partieller dsRNA mit 1-3 3'-nichtgepaarten nt.....	74
5.2.5.3	SARS-CoV-ExoN auf partieller dsRNA mit 1-3 3'-nichtgepaarten nt.....	75
5.2.6	Bestätigung der 3'-5'-gerichteten ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA.....	76

5.2.6.1	3'-5'-gerichtete WBV-ExoN-Aktivität bei partiellen dsRNA	78
5.2.6.2	3'-5'-gerichtete HCoV-229E-ExoN Aktivität bei partieller dsRNA.....	78
5.2.6.3	3'-5'-gerichtete SARS-CoV-ExoN Aktivität bei partieller dsRNA.....	79
5.2.7	Vergleich der ExoN-Degradierungseffizienz bei verschiedenen ss/dsRNA-Substraten	80
5.2.7.1	WBV-ExoN-Degradierungseffizienz bei ss/dsRNA-Substraten	81
5.2.7.2	HCoV-229E-ExoN-Degradierungseffizienz bei ss/dsRNA-Substraten.....	83
5.2.7.3	SARS-CoV-ExoN-Degradierungseffizienz bei ss/dsRNA-Substraten.....	85
5.2.8	Einfluss unterschiedlicher dsRNA-Gesamtlängen auf die ExoN-Aktivität.....	86
5.2.8.1	WBV-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge	87
5.2.8.2	HCoV-229E-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge.....	88
5.2.8.3	SARS-CoV-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge.....	89
5.2.9	Nachweis der ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit 1-3 intern nichtgepaarten Nukleotiden.....	89
5.2.9.1	WBV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit 1-3 intern nichtgepaarten nt	90
5.2.9.2	HCoV-229E-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit 1-3 intern nichtgepaarten nt.....	91
5.2.9.3	SARS-CoV-ExoN-Aktivität auf partieller ds RNA mit 1-3 intern nichtgepaarten nt.....	92
5.2.10	Einfluss der Anzahl und Positionierung interner Fehlpaarungen	93
5.2.10.1	WBV-ExoN Aktivität auf dsRNA mit intern nichtgepaarten nt.....	94
5.2.10.2	HCoV-229E-ExoN Aktivität auf dsRNA mit intern nichtgepaarten nt	95
5.2.10.3	SARS-CoV-ExoN Aktivität auf dsRNA mit intern nichtgepaarten nt.....	96
5.2.11	3'-5'-gerichtete ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit intern nichtgepaartem nt.....	97
5.2.11.1	3'-5'-gerichtete WBV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung.....	99
5.2.11.2	3'-5'-gerichtete HCoV-229E-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung	99
5.2.11.3	3'-5'-gerichtete SARS-CoV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung.....	100
5.3	Mutagenese konservierter Reste der ExoN-Motive I-III.....	101
5.3.1	Abhängigkeit der WBV-ExoN Aktivität von DEDDh-Resten innerhalb der ExoN-Motive I-III.....	103
5.3.2	Abhängigkeit der HCoV-229E-ExoN Aktivität von DEEDh-Resten innerhalb der ExoN-Motive I-III	104
6	Diskussion.....	105
6.1	Identifizierung der WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN assoziierten Hydrolyseaktivität.....	108
6.2	ExoN-Aktivität auf einzelsträngigen RNA-Substraten	111
6.3	ExoN-Aktivität auf doppelsträngigen RNA-Substraten	115
6.4	Einfluss des Kofaktors nsp10 auf die ExoN-Aktivität.....	127
6.5	Mutagenese der Mg ²⁺ -koordinierenden Reste innerhalb der DEDDh-ExoN Motive I-III.....	129
7	Zusammenfassung	135
8	Abkürzungsverzeichnis.....	138
9	Literaturverzeichnis	140
10	Anhang	150
10.1	Tabellen.....	150
10.1.1	Nichtstrukturproteine nsp's.....	150
10.1.2	Liste der verwendeten Chemikalien.....	151
10.1.3	Liste klonierter Expressionsvektoren	152
10.2	Alignment der konservierten ExoN-Domänen.....	153

1 Abstract

The order *Nidovirales* comprises virus families that harbor the largest RNA genomes known to date. Nidoviruses encode an unusually extensive repertoire of nonstructural proteins (nsp), many of which have confirmed or predicted roles in viral RNA synthesis and modification. Several of these activities are considered to be directly associated with the evolutionary expansion of nidovirus genome size. A key example is a 3'–5' exoribonuclease (ExoN), which is thought to provide a proofreading function that enhances replication fidelity in nidoviruses with large genomes (≥ 20 kb), including coronaviruses (CoVs). CoV ExoNs belong to the DEDDh superfamily of exoribonucleases (as DEEDh outlier) and operate in a 3'-to-5' direction. Alanine substitutions of highly conserved ExoN active site DE-E-D(h) residues profoundly impair or abolish this activity and resulted in viable mutants in MHV and SARS-CoV, however 15 to 20-fold increases in mutation rate were reported, suggesting a pivotal role of ExoN activity in replicative mismatch repair. Our current knowledge of ExoN substrate specificity in nidoviruses is mainly based on bacterially expressed SARS-CoV-ExoN.

The major goal of the present study was to gain further insight into the enzymatic properties of nidovirus ExoN domains. To this end, a comparative biochemical analysis was performed using bacterially produced ExoNs of two coronaviruses representing different genera as well as white bream virus (WBV), a poorly characterized virus representing the genus *Bafinivirus* (subfamily *Piscanivirinae*, family *Tobaniviridae*). Activities of recombinant WBV-ExoN were characterized and compared to those of HCoV-229E-ExoN and SARS-CoV-ExoN. Additionally, mutant forms of ExoN containing alanine substitutions of predicted active-site residues DE-E-D(h) for CoV and DE-D-D(h) for WBV were characterized.

All nidovirus ExoN wildtype enzymes included in this study were found to hydrolyze single-stranded substrate RNAs in a 3'-to-5' direction. In contrast, completely double-stranded (ds) substrate RNAs were much less efficiently cleaved by all three ExoNs. Highest ExoN activities were observed for WBV-, HCoV-229E- and SARS-CoV-ExoN ExoNs if dsRNA substrates containing a single 3'-terminal and/or internal single-nucleotide mismatch were used, suggesting that dsRNAs containing single unpaired nucleotides represent the biologically relevant substrates. In addition, no exonucleolytic activity was observed if substrate RNAs

with a biotinylated 3' terminus or a single 2'-deoxynucleotide residue at the 3' terminus were used. These data consistently demonstrate 3'-to-5' exonucleolytic activities for genetically diverse nidovirus ExoN domains and suggest that unmodified 3'-RNA-Ends or 2'-hydroxyl groups on the 3'-terminal ribose are required for ExoN activity. The combined data are compatible with the previously proposed role for nidovirus ExoN domains in RNA mismatch repair mechanisms during RNA synthesis. In addition, the mutagenesis data obtained for conserved residues in ExoN-motifs I-III of DEDD(h) and DEED(h) ExoNs revealed that alanine substitutions of those highly conserved residues profoundly reduced or abolished the nucleolytic activities of WBV and HCoV-229E ExoNs, supporting the presumed role of the conserved Asp and Glu residues in metal ion coordination during catalysis. Also, the study shows that recombinant nsp10/pp1aC can enhance WBV- and HCoV-229E-ExoN activity *in vitro* which is compatible with the previously proposed role for SARS-CoV-nsp10 as a possible ExoN cofactor.

2 Einleitung

2.1 *Nidovirales*

Nidoviren sind eine große Gruppe von einzelsträngigen RNA-Viren mit breitem Wirtsspektrum. Sie bilden umhüllte Virionen, deren Nukleokapsid von einer Lipidhülle umgeben wird, die mit viruseigenen Strukturproteinen durchsetzt ist und Viruspartikeln mit einem Durchmesser von etwa 80–120 nm entspricht. (Abbildung 1). Das innerhalb des Viruspartikel (Virion) enthaltene einzelsträngige RNA-Genom ist von positiver Polarität, nicht segmentiert und mit einer 5'-Cap-Struktur sowie einem 3'-poly(A)-Ende versehen. Einige nidovirale Genome zeigen außergewöhnliche Größen und eine enorme Komplexität von bis zu 61.000 Nukleotiden (nt). Somit gehören die ausgeprägtesten nidoviralen Genome zu den größten bisher bekannten RNA-Genomen (Neuman *et al.*, 2025; Saberi *et al.*, 2018). Angesichts der vergleichsweise hohen Fehlerraten viraler RNA-abhängiger RNA-Polymerasen wird die erfolgreiche Replikation derart großer RNA-Genome wahrscheinlich durch einen Fehlerkorrekturmechanismus (Proofreading) unterstützt. Teil dieses Mechanismus für Coronaviren (CoV) ist, so wird angenommen, das Nichtstrukturprotein 14 (nsp14), welches fehlerhaft integrierte Nukleotide der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) entfernt (Liu *et al.*, 2021; Moeller *et al.*, 2022). Charakteristisch für Nidoviren sind neben den teilweise markanten Genomgrößen auch die Anzahl involvierter viraler Proteine innerhalb der RNA-Synthese und Prozessierung. Beispielsweise kodiert das SARS-CoV-2 Genom 16 Nichtstrukturproteine, 9 akzessorische Proteine und 4 Strukturproteine (Kim *et al.*, 2020).

Abgesehen der strukturellen und replikativen Besonderheiten haben sich Vertreter der Nidoviren als bedeutende Humanpathogene herausgestellt. In den letzten Jahren sorgte vor allem das Auftreten von zoonotischen Coronaviren als neue Infektionserreger des Menschen und deren Auswirkungen auf unsere Gesellschaft für ein stark gestiegenes Interesse an Coronaviren und anderen Nidoviren. Zu den auftretenden hochpathogenen oder besonders infektiösen CoVs beim Menschen innerhalb der letzten 20 Jahre zählt das *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) (Rota *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2003), das *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) (Azhar *et al.*, 2014) und zuletzt das *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (Wu *et al.*,

2020; Zhu *et al.*, 2020). Diese führen insbesondere bei fehlender Immunität zu schweren oder sogar lebensbedrohlichen Verläufen, einschließlich Pneumonie und Multiorganversagen (Huang *et al.*, 2020).

Neben ihrer Bedeutung als Humanpathogene sind Coronaviren und einige andere Nidoviren prominente Tierpathogene, welche ebenfalls primär respiratorische und intestinale Gewebe infizieren und Erkrankungen in einer Vielzahl unterschiedlicher Tierarten auslösen können (Weiss & Navas-Martin, 2005). Im Laufe der Geschichte zeigten Vertreter der Nidoviren vermehrt ausgeprägte Fähigkeiten Artengrenzen zu überschreiten; oft mit verheerenden Folgen für Mensch und Ökonomie (Kenney *et al.*, 2021).

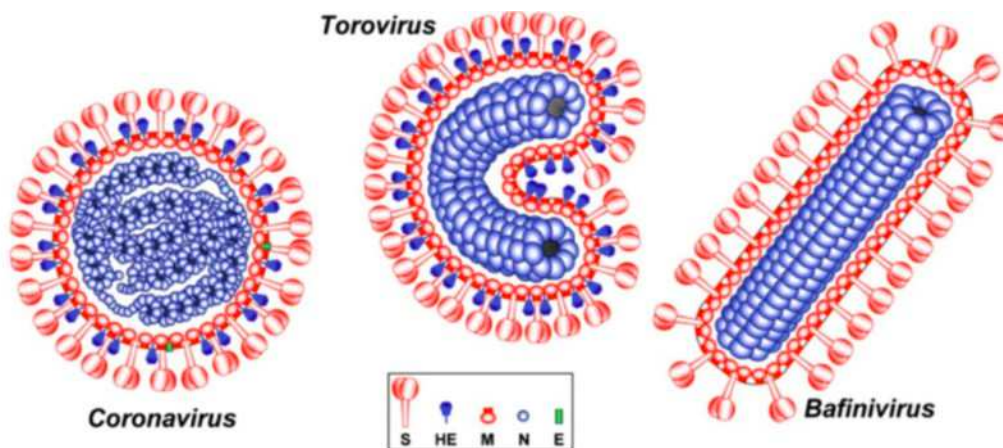


Abbildung 1: Schematische Darstellung nidoviraler Viruspartikel. Abgebildet sind die charakteristischen Morphologien unterschiedlicher Vertreter der Familien *Coronaviridae* und *Tobamiviridae*. Die Viruspartikel enthalten in ihrer Lipidhülle unterschiedliche virale Strukturproteine. Dazu gehören das Spike-Protein (S), das Membran-Protein (M), das Hämagglutinin-Esterase-Protein (HE) sowie das Envelope-Protein (E) im Fall der Coronaviren. Innerhalb der Virushülle befindet sich das Nukleokapsid, welches das virale Genom beherbergt und aus Nukleokapsid-Proteinen (N) und der Genom-RNA besteht (Rottier *et al.*, 2012).

2.1.1 Taxonomische Einordnung der Nidoviren

Die Ordnung *Nidovirales* setzt sich derzeit aus 109 Spezies zusammen, die 14 Virusfamilien in acht verschiedenen Unterordnungen zugeordnet sind (Siddell *et al.*, 2019). Zu den acht, teilweise neu eingefügten Unterordnungen zählen (I) *Abnidovirineae*; (II) *Arnidovirineae*; (III) *Cornidovirineae*; (IV) *Mesnidovirineae*; (V) *Monidovirineae*; (VI) *Nanidovirineae*; (VII) *Ronidovirineae* und (VIII) *Tornidovirineae* (ICTV EC52). Aufgrund der zunehmenden Komplexität der

Ordnung *Nidovirales* im Zuge der neuen Virusklassifikation wird in den folgenden Absätzen nur auf die studienrelevanten Familien eingegangen.

2.1.1.1 Coronaviren

Die Nidovirus-Familie der *Coronaviridae* wird in drei Unterfamilien, *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* und *Pitovirinae*, unterteilt (Simmonds *et al.*, 2024). Die bedeutende Unterfamilie der *Orthocoronavirinae* besteht aus vier Gattungen: den Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren. Zur Gattung der Alphacoronaviren zählen beispielsweise humane Coronaviren (HCoV) wie HCoV-229E und HCoV-NL63. Andere bekannte HCoV wie SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-HKU1, HCoV-OC43 und das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 werden der Gattung Betacoronaviren zugeordnet (Snijder *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2005; Gorbalenya *et al.*, 2020). Im Gegensatz zur Mehrheit heutiger Alpha- und Betacoronaviren, deren Vorläufer sich vermutlich in Fledermäusen entwickelt haben, wird für die Vorläufer der meisten Gamma- und Deltacoronaviren vermutet, dass sie sich in Vögeln entwickelt haben (Woo *et al.*, 2012). Vertreter der Gattung Gammacoronavirus infizieren ebenfalls hauptsächlich Vögel wie beispielsweise das Virus der infektiösen Bronchitis (*infectious bronchitis virus*, IBV) (Smith *et al.*, 2015).

2.1.1.2 Bafiniviren

Bafiniviren gehören zur Nidovirus-Familie der *Tobaniviridae*, sind bazilliforme (stäbchenförmige), ebenfalls umhüllte Plusstrang-RNA-Viren (Abbildung 1) und besitzen eine Genomgröße von etwa 27 kb (Schütze *et al.*, 2006). Der Namensbestandteil „*Bafini*“ ist ein Akronym, das auf dieses bazilliforme Fisch-Nidovirus Bezug nimmt. Das repräsentative Modellvirus dieser Gattung ist das White Bream Virus (WBV), ein aus einem Süßwasserfisch (*Blicca bjoerkna* L.) isoliertes Bafinivirus (Rottier *et al.*, 2012). Trotz ihrer Fähigkeit, ein breiteres Spektrum an Fischen zu infizieren und Erkrankungen auszulösen, wurden Bafiniviren als Vertreter der Familie der *Tobaniviridae* in der Vergangenheit nicht eingehend charakterisiert (Rottier *et al.*, 2012; Siddell *et al.*, 2005).

2.1.2 Infektionszyklus der Nidoviren

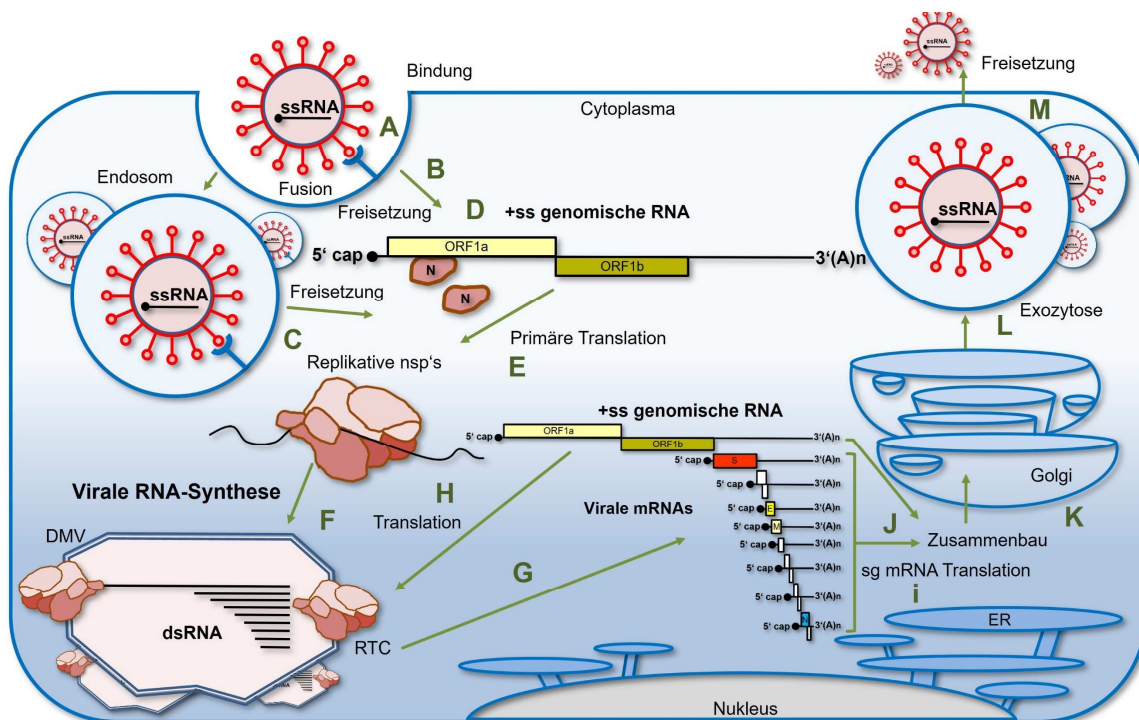


Abbildung 2: Illustration des Infektionszyklus von Coronaviren. Die Abbildung zeigt den Infektions- und Replikationsverlauf am Beispiel von SARS-CoV. (A) Der Zyklus beginnt mit der Bindung des Virions an spezifische Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche. (B) Die Fusion der viralen mit der zellulären oder (C) endosomalen Membran sorgt anschließend für die (D) Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma der Zelle. Das Genom dient nun als mRNA für die (E) primäre Translation der Replikase-Polypeptide, aus denen zahlreiche replikative Nichtstrukturproteine (nsp) durch proteolytische Prozessierung freigesetzt werden. (F) Die Zusammenlagerung dieser nsp's führt zur Bildung von Replikations-Transkriptionskomplexen (RTC), die an speziellen virusinduzierten Doppelmembranvesikeln (DMV) verankert sind. (G) Der RTC repliziert die Genom-RNA (gRNA) für (H) die Translation weiterer Replikase-Proteine und als Genom für neu gebildete Virionen. (I) Gleichzeitig produziert der RTC einen Satz von sg-mRNAs, die für die „sekundäre“ Translation der Strukturproteine und anderer akzessorischer Proteine benötigt werden. (J) Die gRNA interagiert mit dem Nukleokapsidprotein, und die resultierenden Nukleokapside werden, zusammen mit den Strukturproteinen, (K) durch Ausknospung als neue Virionen in das ERGIC oder den Golgi-Komplex entlassen. (L) Der Austritt der Virionen aus dem Golgi-Apparat erfolgt durch Exozytose, (M) wobei Vesikel mit den darin enthaltenen Virionen mit der Zellmembran fusionieren und dabei aus der Zelle freigesetzt werden (modifiziert nach Thiel & Weber, 2008; Weiss & Navas-Martin, 2005).

Zu Beginn des Infektionszyklus von SARS-CoV, der repräsentativ für die meisten replikativen Abläufe der *Nidovirales* steht, erfolgt die S-Protein-initiierte Bindung an Rezeptoren der Wirtszelloberfläche wie ACE2 (Luan *et al.*, 2020) und die eigentliche Membranfusion (Abbildung 2). Die Translokation und Verschmelzung der viralen Hüllmembran führen zur Freisetzung des Nukleokapsids und schließlich zur Freisetzung der Genom-RNA (Genomstruktur siehe Abschnitt 2.1.3) in das Zytoplasma der Wirtszelle (Thiel & Weber, 2008; Weiss & Navas-Martin, 2005). Die Translation der genomischen RNA (gRNA) erfolgt an den

Ribosomen der Wirtszelle, wobei die Translation des 5'-lokalisierten Leserahmens ORF1a zur Synthese des etwa 450 kDa großen Polyproteins pp1a führt. Die Translation des zweiten Leserahmens ORF1b hingegen erfordert einen -1-nt-Leserahmensprung (programmed ribosomal frameshift, PRF) des Ribosoms und führt in 40 % aller Fälle zur Synthese des etwa 750 kDa großen Polyproteins pp1ab. Die beiden Polyproteine pp1a und 1ab werden nach ihrer Expression von viruseigenen Proteasen autokatalytisch in bis zu 16 nsp gespalten (Abbildung 4). Zusammen mit dem Nukleokapsid-Protein (N) und einigen wirtseigenen Proteinen bildet eine Vielzahl dieser 16 nsps den Replikations- und Transkriptionskomplex (RTC) (Sola *et al.*, 2011; Malone *et al.*, 2021). Der aus wahrscheinlich vielen Untereinheiten bestehende RTC-Komplex wird mithilfe von Membranankerdomänen (TM) der Proteine nsp3, nsp4 und nsp6 auf den virusinduzierten Doppelmembranvesikeln (DMV) verankert (Gosert *et al.*, 2002; Oostra *et al.*, 2007; Knoops *et al.*, 2008). Wie auch für andere Plusstrang-RNA-Viren üblich, kolokalisiert die nidovirale RNA-Synthese mit viral induzierten, restrukturierten, intrazellulären Membranen der Wirtszelle, die sich zu zahlreichen DMV zusammenlagern.

Zu den viruskodierten RTC-Proteinen zählen neben den für viele Plusstrang-RNA-Viren typischen Enzymen wie z. B. RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), Helikase/NTPase, Proteasen und Cap-Methylasen auch einige besondere Enzyme (Seybert *et al.*, 2000; Minskaia *et al.*, 2006; Decroly *et al.*, 2008, 2011; Chen *et al.*, 2009; te Velthuis *et al.*, 2009; Ulferts & Ziebuhr, 2011). Zu diesen (in einigen Fällen einzigartigen) enzymatischen Funktionen zählt unter anderem die in dieser Arbeit charakterisierte 3'-5'-ExoN-Domäne. Im weiteren Verlauf des Infektionszyklus synthetisiert der RTC-Multiproteinkomplex entweder in einer kontinuierlichen Minusstrangsynthese eine Kopie des viralen Genoms, die als Matrize für die Synthese neuer gRNA zur späteren Integration in neue Virionen dient, oder in einem diskontinuierlichen (unterbrochenen) Ablauf einen Satz von Minusstrang-RNAs subgenomischer Länge. Diese dienen als Matrize eines für viele Nidoviren typischen 5'/3'-koterminalen Satzes an sg-mRNAs (*nested set*). Jede dieser sg-mRNAs besitzt identische 5'- und 3'-Enden (mit einem common leader am 5'-Ende). Die Leader-Sequenz aller dieser RNAs entspricht dem 5'-Bereich der gRNA und hat eine Länge von etwa 60–94 nt (Sola *et al.*, 2015). Die so entstandenen sg-mRNAs mit identischen 5'/3'-Enden dienen nun ihrerseits als

Matrize für die Translation der strukturellen Proteine (S, E, M und N), die später in das Virion integriert werden, sowie einiger akzessorischer Proteine (Sawicki *et al.*, 2005; Sawicki *et al.*, 2001).

2.1.3 Genomorganisation

Viele Nidoviren zeichnen sich durch außergewöhnlich große und komplex organisierte RNA-Genome aus, die dennoch eine weitgehend konservierte Genomstruktur aufweisen. (Abbildung 3). Das Plusstrang-RNA-Genom der Nidoviren ist, wie bereits angedeutet wurde, polycistronisch und trägt am 5'-Ende eine Cap-Struktur (Masters, 2006; Fehr & Perlman, 2015). Gefolgt wird das 5'-Cap von einer 5'-untranslatierten Region (5'-UTR), der sich die zwei überlappenden offenen Leserahmen ORF1a und ORF1b des Replikasegens anschließen. Die zwei großen Leserahmen ORF1a und ORF1b nehmen in allen Nidoviren etwa zwei Drittel des gesamten Genoms ein und kodieren die nsps. 3'-abwärts des Replikasegens folgt eine variierende Anzahl an ORFs, die für die strukturellen und akzessorischen Virusproteine kodieren. Diese werden von einer weiteren nichttranslatierten Region (3'-UTR) und dem terminalen 3'-Poly(A)-Schwanz gefolgt.

Coronavirale Genome unterscheiden sich in der Anzahl und Funktion einzelner akzessorischer Proteine und auch hinsichtlich einiger Proteine oder Proteindomänen im 5'-proximalen Bereich des Replikasegens (Abbildung 3 und 4) (Ziebuhr, 2005; de Groot *et al.*, 2012; Snijder *et al.*, 2016). Aufgrund der im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisierten mRNA-Synthese von Nidoviren ist das Vorhandensein der 5'-Cap-Struktur von besonderer Bedeutung. Neben der Stabilisierung von mRNA sind 5'-Cap-Strukturen nötig, um wirtseigene antivirale Abwehrmechanismen zu umgehen (Hyde *et al.*, 2014; Schuberth-Wagner *et al.*, 2015; Devarkar *et al.*, 2016). Ebenfalls sichern Cap-Strukturen die Translation der gRNA und der sg mRNA (Cencic *et al.*, 2010; Firth & Brierley, 2012).

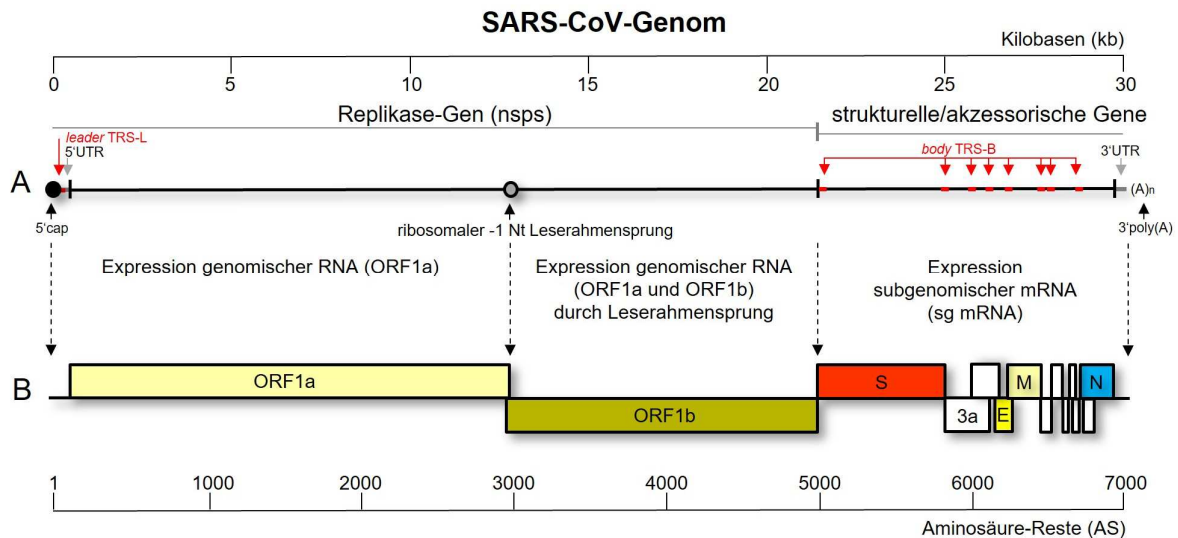


Abbildung 3: Charakteristische Genomorganisation der Nidoviren am Beispiel von SARS-CoV. Die Abbildung veranschaulicht das (A) nidovirale Genom in 5'-3'-Orientierung und dessen (B) 14 Leseraster (ORF), die die viralen Proteine und Polyproteine kodieren. Das Genom beginnt 5'-terminal mit dem 5'-Cap (schwarzer Kreis), gefolgt von der 5'-UTR (grau), zu der die Leader-Sequenz und die darauffolgende Leader-assoziierte transkriptionsregulierende Sequenz (TRS-L) gehört (rot). Auf die 5'-UTR folgt das Replikase-Gen, welches zwei Drittel des gesamten Genoms einnimmt und in zwei große, offene Leseraster (ORF1a/1b) eingeteilt wird (hell-, dunkelgelb). Translatiert werden diese in zwei große Polyproteine, welche durch virale Proteasen in 16 nsp gespalten werden. Voneinander getrennt sind beide ORFs durch einen kurzen überlappenden Bereich, der (kurz vor Erreichen des ORF1a-Stoppkodons) eine ribosomale Leserasterverschiebung (um 1 Nukleotid in 5'-Richtung) vermittelt (grauer Kreis). Das 3'-lokalierte letzte Drittel des Genoms besteht aus mehreren ORFs der akzessorischen Proteine (weiße Rechtecke) und Strukturproteine, welche durch rote (S), gelbe (E), hellgelbe (M) und blaue (N) Rechtecke repräsentiert werden. Am 5'-Ende jedes dieser ORFs befinden sich die homologen Body-TRS-Sequenzen (TRS-B in Rot), deren Negativstrang-Komplement am 3'-Ende neuer Minusstränge für die Basenpaarung mit der TRS-L im 5'-terminalen Bereich des Genoms benötigt wird. Das 3'-terminale Ende des CoV-Genoms besteht ebenfalls aus einer nicht translatierten 3'-UTR-Region (grau) und ist polyadenyliert (A_n) (modifiziert nach Snijder *et al.*, 2003).

Ähnlich der zellulären mRNA besitzt auch das nidovirale Genom nicht nur eine 5'-Cap-Struktur, sondern auch ein 3'-polyadenyliertes Ende (mRNA-A_n). Der sogenannte Poly(A)-Schwanz erhöht ebenfalls die Stabilität der mRNA durch den Schutz vor zelleigenen Abbaumechanismen und beeinflusst die Translation der viralen gRNA und sg-mRNA (Nicholson & Pasquinelli, 2019). Die 5'-Cap- und 3'-Poly(A)-Enden werden durch die erwähnten UTR-Regionen flankiert. Die Länge der UTR-Regionen variiert innerhalb der Nidoviren zwischen 70 und 800 nt. Wie sich in Untersuchungen herausstellte, beinhalten die 5'- und 3'-UTRs *cis*-aktive RNA-Strukturen, die für die virale RNA-Synthese benötigt werden. Ebenfalls enthält die 5'-UTR-Region das Motiv der bereits erwähnten transkriptionsregulierenden Sequenz (TRS), die hier als TRS-L bezeichnet wird (Parker *et al.*, 2021).

2.2 Nichtstrukturproteine des nidoviralen Replikasegens

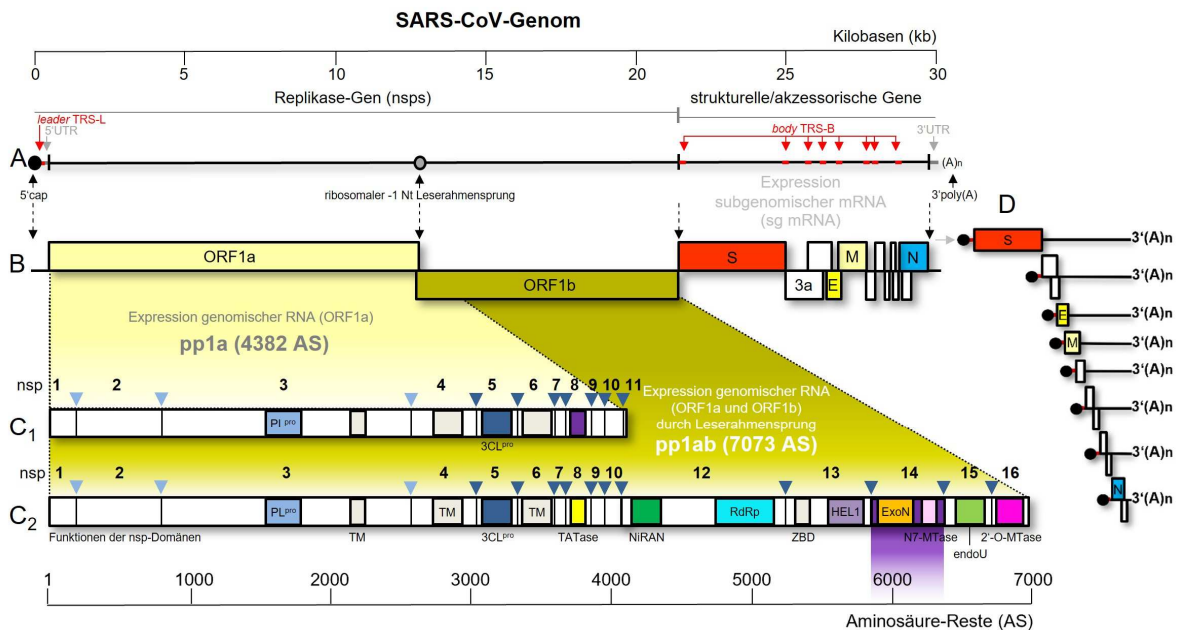


Abbildung 4: Expression der ORFs 1a und 1b und proteolytische Prozessierung von pp1a/1ab am Beispiel von SARS-CoV. Dargestellt wird (A) die Genomorganisation von SARS-CoV und die (B) 14 ORFs, die die viralen Proteine und Polyproteine (pp) kodieren. Die untere Hälfte der Abbildung (C) veranschaulicht die proteolytische Prozessierung der pp und die Domänen der (C1) pp1a sowie (C2) pp1ab. Die Schnittstellen der beteiligten Proteasen (PL^{pro}, hellblau) und nsp5 (3CL^{pro}, dunkelblau) sind durch kleine Dreiecke in den jeweiligen Farben gekennzeichnet. Ausgewählte funktionelle Domänen in den verschiedenen nsp sind wie folgt dargestellt: PL^{pro} = *papain-like protease* (nsp3, hellblau); 3CL^{pro} = *3C-like protease* (nsp5, dunkelblau); TM = Transmembrandomäne (nsp3/4/6, weiß); TATase = *terminal adenylyltransferase* (nsp8, gelb); NiRAN = *nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase* (nsp12, grün); RdRp = *RNA-dependent RNA polymerase* (nsp12, türkis); ZBD = *zinc-binding domain* (nsp13, hellgrau); HEL1 = Superfamilie-1-Helikase (nsp13, violett); besonders hervorgehoben ist nsp14 (lila) mit ExoN = *Exoribonuklease* (orange) und N7-MTase = *Guanin-N7-Methyltransferase* (rosa); EndoU = *Uridylat-spezifische Endoribonuklease* (nsp15, hellgrün); 2'-O-MTase = *Ribose-2'-O-Methyltransferase* (nsp16, pink). D zeigt die sg mRNAs für die Translation der S-E-M-N Strukturproteine (S = rot, E = gelb, M = hellgelb, N = blau) und der akzessorischen Proteine (weiße Rechtecke) (modifiziert nach Snijder *et al.*, 2003).

Die beiden offenen Leserahmen (ORF1a und ORF1b) des Replikasegens werden in zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab) translatiert. Während pp1a durch klassische Initiation und Termination translatiert wird, ist die Expression des ORF1b von dem -1-nt-Leserahmensprung abhängig. Während der Translation springt dabei das Ribosom in etwa 40 % aller Fälle vom ORF1a-Leserahmen direkt auf den ORF1b-Leserahmen ohne das ORF1a-Stopkodon zu erreichen (Herold & Siddell, 1993). Dies führt dazu, dass in Nidovirus-infizierten Zellen die ORF1a-kodierten Replikaseuntereinheiten in größeren Mengen als die ORF1b-kodierten Proteine produziert werden (Plant *et al.*, 2008). Die Steuerung des Leserahmensprungs für die Expression von pp1ab wird durch spezielle Signalstrukturen und Sequenzen vermittelt. Zu den bisher bekannten Signalen der

Überlappungsregion, die die Expression von pp1ab steuern, gehören (i) eine Heptanukleotidsequenz, die als *slippery sequence* bezeichnet wird (5'-UUUAAAC-3'), und (ii) eine komplexe Pseudoknoten-Struktur (Brierley *et al.*, 1987; Dos Ramos *et al.*, 2004; Plant *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass bereits während der Synthese von pp1a und pp1ab ORF1a-kodierte Proteasen die beiden Polyproteine proteolytisch in bis zu 16 nsps spalten (Anhang 10.1.1, Tabelle 1). Zu den Proteasen gehören eine Cystein-Protease mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Struktur (nsp5) sowie ein oder zwei Papain-ähnliche Proteasen (Bestandteil von nsp3) (Abbildung 4). Die nsp5-Protease wird allgemein als 3CL^{pro} (3C-like protease) oder als M^{pro} (main protease) bezeichnet (Anand *et al.*, 2002; Gorbalenya *et al.*, 1989; Ziebuhr *et al.*, 1995). Die beiden überlappenden Papain-ähnlichen Proteasen sind in nsp3 lokalisiert und werden als PL1^{pro} und PL2^{pro} bezeichnet (Herold *et al.*, 1998; Ziebuhr *et al.*, 2001). Nach ihrer Abspaltung von den Polyproteinen wird die Mehrzahl der bisher untersuchten 16 nsps in den membrangebundenen Replikations- und Transkriptionskomplex integriert, der die verschiedenen viralen RNAs (gRNA und sgRNA als Plus- und Minusstrang) in der infizierten Zelle synthetisiert (Gosert *et al.*, 2002; Knoops *et al.*, 2008). In der Vergangenheit, insbesondere seit dem Auftreten von SARS-CoV im Jahr 2002, wurden erhebliche Fortschritte bei der biochemischen Charakterisierung der 16 Replikasegen-kodierten nsps erzielt (Snijder *et al.*, 2016) (Anhang 10.1.1, Tabelle 1/2). Die Erkenntnisse bilden nicht nur die Grundlage für die in dieser Studie untersuchten nukleolytischen Aktivitäten der WBV-ExoN sowie der vergleichend untersuchten ExoN-Domänen des nsp14 von HCoV-229E und SARS-CoV, sondern stellen auch die Basis für das heutige Gesamtverständnis des Zusammenspiels vieler nsp bei der viralen RNA-Synthese und RNA-Modifikation im Rahmen der Genomreplikation.

2.2.1 Der Polymerase-Kernkomplex

Zentraler Bestandteil des Polymerase-Kernkomplexes ist das etwa 100 kDa große nsp12 (RdRp). Neben nsp12 gehören zum RTC-Kernkomplex (Holoenzym) zwei nsp8 Untereinheiten und eine nsp7 Untereinheit, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Replikation mit anderen nsp wie beispielsweise nsp9 und nsp13 interagieren (Malone *et al.*, 2021). Strukturell besteht nsp12 aus zwei Domänen, zu denen die erst vor kurzem charakterisierte N-terminale Nukleotidyltransferase,

genannt NiRAN (*Nidovirus* RdRp-associated nucleotidyl transferase), und die seit langem bekannte C-terminale RdRp-Domäne gehören (Gorbalenya *et al.*, 1989; Lehmann *et al.*, 2015). Trotz großer Unterschiede in der Sequenz zeigen Strukturanalysen, dass die nidovirale RdRp typische strukturelle Merkmale anderer viraler RdRps besitzt (McDonald, 2013). Die räumliche Struktur ähnelt dabei einer hohlen Hand („cupped right hand“), wobei Finger, Daumen und Handfläche unterschiedliche Funktionen bei der Substratbindung und der Ausbildung des aktiven Zentrums übernehmen (te Velthuis, 2014). Biochemische Analysen mit SARS-CoV-nsp12 zeigten eine schwache intrinsische RdRp-Aktivität, die erst durch die Kofaktoren nsp7 und nsp8 erheblich stimuliert werden konnte (Subissi *et al.*, 2014).

Nsp7 und nsp8 gehören zu einer Gruppe von vier kleinen ORF1a-kodierten Untereinheiten (nsp7–nsp10), die wichtige Interaktionspartner für die ORF1b-kodierten replikativen Enzyme darstellen. Im Unterschied zu seinem primären Interaktionspartner nsp7 besitzt nsp8 eine eigene enzymatische Funktion. Biochemische Analysen zeigen, dass HCoV-229E nsp8 eine RNA-spezifische 3'-terminale Adenylyltransferase-Funktion (TATase) aufweist (Tvarogová *et al.*, 2019).

Trotz fortbestehender Kontroversen, ob es sich bei nsp12 um eine Primer-abhängige RdRp handelt oder um eine RdRp, die die RNA-Synthese primerunabhängig de novo initiieren kann, gilt die nidovirale RdRp vor allem aufgrund bestehender Sequenzverwandtschaften zu primerabhängigen picornaviralen RdRps überwiegend als Primer-abhängige Polymerase (Beerens *et al.*, 2007).

Die andere, N-terminal lokalisierte Domäne von nsp12 wird Nidovirus-assoziierte Nukleotidyltransferase (NiRAN) genannt und enthält bei den bisher bekannten Nidoviren drei Motive (A, B und C) (Lehmann *et al.*, 2015). Die NiRAN-Domäne benötigt für ihre Aktivität Mn^{2+} -Ionen, und UTP hat sich zumindest in vitro als das bevorzugte Substrat für eine spezifische Nukleotidylierung von nsp9 erwiesen (Slanina *et al.*, 2021). Die Bedeutung der NiRAN-vermittelten N-terminalen Nukleotidylierung von nsp9 ist Gegenstand intensiver Forschung, wobei überzeugende Hinweise auf eine Beteiligung an der Ausbildung der GpppN-Cap-Grundstruktur bestehen (Park *et al.*, 2022). Auch eine mögliche Rolle bei der Initiation der viralen RNA-Synthese wird diskutiert (Slanina *et al.*, 2021).

2.2.2 ExoN und Guanin-N7-Methyltransferase

Das in der vorliegenden Studie für WBV (White Bream Virus) und HCoV-229E charakterisierte, etwa 60 kDa große ExoN-Protein (nsp14-Homolog) ist innerhalb der Nidoviren mit Genomgrößen von mehr als 20 kb hoch konserviert (Minskaia *et al.*, 2006; Nga *et al.*, 2011).

Aufgrund der geringen Kopiergenauigkeit (fidelity) von RdRps im Vergleich zu DNA-abhängigen Polymerasen ist die RNA-Replikation von RNA-Viren durch eine hohe Mutationsfrequenz gekennzeichnet. Das Fehlen von Fehlerkorrekturmechanismen ermöglicht somit eine effiziente virale Adaptation unter entsprechendem Selektionsdruck, bedingt aber andererseits eine Limitierung der Genomgrößen von RNA-Viren auf etwa 15 kb (Eigen, 2002; Drake & Holland, 1999). Generell gilt dies auch für Nidoviren, dennoch konnten Genomgrößen von bis zu 61 kb dokumentiert werden (Neuman *et al.*, 2025). Eine nur innerhalb von Nidoviren mit großen Genomen konservierte 3'-5'-ExoN-Funktion (konserviert in CoV-nsp14) führte schließlich zur Annahme, dass ExoN ein Bestandteil oder gar der zentrale Schlüsselfaktor eines möglichen Korrekturmechanismus darstellt und maßgeblich zur Entwicklung der ungewöhnlich großen Nidovirus-Genome beigetragen hat (Snijder *et al.*, 2003; Minskaia *et al.*, 2006). Bei einem Knock-out von ExoN (Ogando *et al.*, 2020) in gentechnisch veränderten Coronaviren (SARS-CoV- und MHV-ExoN) spricht insbesondere der beobachtete bis zu 21-fache Anstieg der Mutationsrate für die Hypothese einer Fehlerkorrektur während der viralen RNA-Synthese durch eine Beteiligung der ExoN (Eckerle *et al.*, 2010). Hinzuzufügen ist zudem die hohe Konservierung der katalytischen ExoN-Reste (DED(E)Dh) sowie der grundlegend nukleolytischen Funktionsweise im Vergleich zu nachgewiesenen Reparaturmechanismen zellulärer ExoN-Homologe (Snijder *et al.*, 2003; Zuo, 2001). Dazu zählen beispielsweise die ExoN-Domäne des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I sowie die ϵ -Untereinheit (DnaQ) der DNA-Polymerase III von *E. coli* (Echols *et al.*, 1983; Scheuermann *et al.*, 1983; Beese, Derbyshire & Steitz, 1993). Die Nomenklatur DEDDh bezieht sich dabei auf vier konservierte Asp/Glu-Reste, die sich über drei charakteristische Sequenzmotive (Motiv I–III) erstrecken (Anhang 10.2, Alignment) (Zuo, 2001). Eine weitere, fünfte konservierte Aminosäure (His), unmittelbar C-proximal benachbart zum Asp von Motiv III, macht

ExoN prinzipiell zu einem Mitglied der DEDDh-Familie (Steitz, T. & Steitz, J., 1993). Funktional sind die fünf DEDDh-Reste der Motive I–III nötig, um zwei Metallbinderegionen für den nukleophilen Angriff und die Stabilisierung des aktiven Zentrums von ExoN auszubilden (Derbyshire *et al.*, 1991). Bisher konnten die Reste des katalytischen Zentrums Asp 90, Glu 92, Glu 191, His 268 und Asp 273 identifiziert werden, wobei Asp 90 aus dem Motiv I und Glu 191 aus dem Motiv III eines der beiden Metallionen koordinieren. Das zweite Mg^{2+} -Ion, das vermutlich für den katalytischen Prozess der ExoN selbst verantwortlich ist, wurde bislang noch nicht identifiziert (Ulferts & Ziebuhr, 2011). Eine Strukturanalyse von ExoN zeigte, dass im Gegensatz zu früheren Vorhersagen Asp 243 nicht an der Katalyse beteiligt ist, sondern das bereits erwähnte Glu 191 diese Funktion übernimmt (Ma *et al.*, 2015). Dies macht CoV-ExoN jedoch zu einem „DEEDh“-Verwandten der DEDDh-ExoN-Familie (Snijder *et al.*, 2003).

Strukturell prägen das aktive Zentrum von SARS-CoV-ExoN sechs α -Helices und zehn β -Stränge, die sich in drei β -Faltblätter organisieren. Das zentrale β -Faltblatt besteht seinerseits aus fünf antiparallel verlaufenden β -Strängen (β_{10} , β_7 , β_2 , β_3 und β_4), die von fünf α -Helices (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 und α_6) umgeben sind. Bis auf die Verdrehung des zentralen β -Faltblatts ähnelt diese Struktur der humanen 3′–5′-ExoN und der Ribonuklease T von *Pseudomonas aeruginosa* (Cheng & Patel, 2004; Zuo *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2017).

Eine weitere Besonderheit der CoV-ExoN-Domäne, neben der DEEDh-ähnlichen Struktur, stellen zwei Zinkfinger-Motive (ZBD) zwischen den ExoN-Motiven I und II dar (Ma *et al.*, 2015; Ferron *et al.*, 2017). Die Ronivirus-ExoN hingegen präsentiert eine zweite, zusätzliche ZBD zwischen den Motiven II und III (Snijder *et al.*, 2003).

Neben der potenziellen Rolle als Bestandteil der Fehlerkorrektur während der RNA-Synthese gibt es Anzeichen für zusätzliche Funktionen der nidoviralen ExoN-Domäne. Dazu zählt unter anderem eine mögliche Funktion bei der Unterdrückung antiviraler Immunantworten des Wirtes, insbesondere durch die Degradierung viraler dsRNA, die im Zytoplasma des Wirtes als pathogenassoziiertes Marker einer viralen Infektion für die Aktivierung wirtseigener antiviraler Mechanismen dient (Totura & Baric, 2012). Ebenfalls konnte eine Beeinflussung der Transkription und Translation IFN-stimulierter Gene des Wirtes durch katalytisch aktives TGEV-nsp14 dokumentiert werden (Becares *et al.*, 2016).

Des Weiteren vermittelt ExoN nachweisbar eine Form kontrollierter Rekombination innerhalb der nidoviralen Replikation. Diese führt zur Produktion nichtfunktionaler viraler Genome (engl.: defective viral genome, DVG). DVGs beinhalten Deletionen einzelner oder mehrerer viraler Genombereiche, besitzen aber die korrekten 5'/3'-terminalen UTRs. Die Funktion rekombinanter (fehlerhafter) viraler RNA-Moleküle ist bis heute nicht vollständig verstanden, jedoch konnte grundlegend bestätigt werden, dass ExoN Einfluss auf das Verhältnis zwischen korrekten und fehlerhaften Genomen ausübt (Gribble *et al.*, 2021).

Innerhalb der CoV besteht der Träger der ExoN-Domäne, das nsp14-Protein, aus mehreren Domänen (Abbildung 5). Dabei handelt es sich um (i) einen flexiblen N-terminalen Bereich (Abbildung 5 B), der für die strukturelle Interaktion mit nsp10 verantwortlich ist; (ii) die beschriebene Exoribonuklease-Domäne (ExoN), an die sich (iii) eine weitere strukturelle Gelenk-Domäne anschließt. Diese besitzt eine Drehgelenkfunktion zwischen der ExoN-Domäne und dem Bereich der (iv) C-terminalen S-Adenosyl-Methionin-(SAM)-abhängigen Methyltransferase-Funktion (Guanin-N7-MTase) (Ferron *et al.*, 2017). Die Drehgelenkfunktion sorgt vermutlich für eine gewisse Flexibilität und den nötigen Bewegungsspielraum ($\sim 13\text{\AA}$) zwischen der ExoN- und der N7-MTase-Domäne. Strukturell besteht das Gelenk aus einer Schleifenstruktur (loop, F-286–G-300), die sich um drei antiparallel verlaufende β -Faltblätter ($\beta 18$, $\beta 17$, $\beta 16$) der N7-MTase-Region windet (Ferron *et al.*, 2017).

Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass die N7-MTase-Domäne in Viren der Familie *Tobamiviridae* nicht konserviert ist. Dies stellt einen fundamentalen strukturellen Unterschied zwischen dem WBV-nsp14-Homolog und den hier verglichenen nsp14-Proteinen von HCoV-229E und SARS-CoV dar (Nga *et al.*, 2011; Lauber *et al.*, 2013). Die N7-MTase-Domäne katalysiert eine der beiden Methylierungen für die Ausbildung einer reifen Cap1-Struktur an coronaviralen (und vermutlich vielen anderen nidoviralen) RNAs und ist von besonderer Bedeutung für die Virusreplikation in zahlreichen Zelltypen (Chen, Y. *et al.*, 2009). In erster Linie steht dabei der Schutz der viralen RNA vor Degradation beziehungsweise die Umgehung wirtseigener Abwehrmechanismen zur Erkennung von Fremd-RNA sowie die Nutzung zelleigener Transport- und Replikationsmechanismen im Vordergrund (näheres zum Capping-Prozess siehe Abschnitt 2.2.4). Strukturanalysen der im SARS-CoV-nsp14-Protein lokalisierten

N7-MTase-Domäne zeigten, dass sich diese Struktur deutlich von denen bereits bekannter RNA-Cap-MTasen unterscheidet (Byszewska *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015). Die in SARS-CoV-nsp14 lokalisierte N7-MTase besitzt eine nichtkanonische Faltung und begründet damit theoretisch eine neue Familie von MTasen (Ferron *et al.*, 2017).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass nsp14 und nsp10 miteinander interagieren (Pan *et al.*, 2008; Bouvet *et al.*, 2014). Studien mit rekombinantem nsp10 und nsp14 zeigten, dass nsp10 die gerichtete 3'-5'-ExoN-Aktivität von nsp14 *in vitro* um den Faktor 35 steigerte (Bouvet *et al.*, 2010). Die N7-MTase-Funktion hingegen zeigt keine Beeinflussung ihrer Aktivität durch nsp10 (Bouvet *et al.*, 2012; Bouvet *et al.*, 2014). Nach heutigem Wissensstand wird davon ausgegangen, dass nsp10 eine strukturell stabilisierende Kofaktor-Funktion ausübt und zur Stabilität der katalytischen Bereiche von ExoN sorgt. Röntgenstrukturanalysen des nsp10/14-Komplexes deuten darauf hin, dass sich die Interaktion von nsp10 mit nsp14 allein auf Bereiche der ExoN-Domäne beschränkt. Die räumliche Ausprägung ähnelt dabei stark einer „Hand-über-Faust-Struktur“ (nsp10 über nsp14). Ohne die Stabilisierung durch nsp10 neigt das katalytische Zentrum der benachbarten ExoN-Domäne zum Kollabieren. Die daraus resultierende eingeschränkte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für RNA-Substrate könnte die in einigen Fällen beobachtete schwächere Aktivität von ExoN in Abwesenheit von nsp10 erklären (Bouvet *et al.*, 2012; Ferron *et al.*, 2017). Die Studien verdeutlichten zudem, dass die Binderegionen von nsp10, die zum großen Teil mit nsp14 interagieren, ebenfalls mit nsp16 in Kontakt treten. Dennoch besitzt nsp10 eine dreifach höhere Bindeaffinität zu nsp14, und in der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass nsp14 und nsp16 um eine Komplexbildung mit nsp10 konkurrieren. Da nsp10 jedoch in 3- bis 6-fach höherer Konzentration als nsp14 und nsp16 vorliegt, wird nun angenommen, dass beide Komplexe gleichzeitig existieren können (Chen *et al.*, 2011; Decroly *et al.*, 2011; Bouvet *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015)

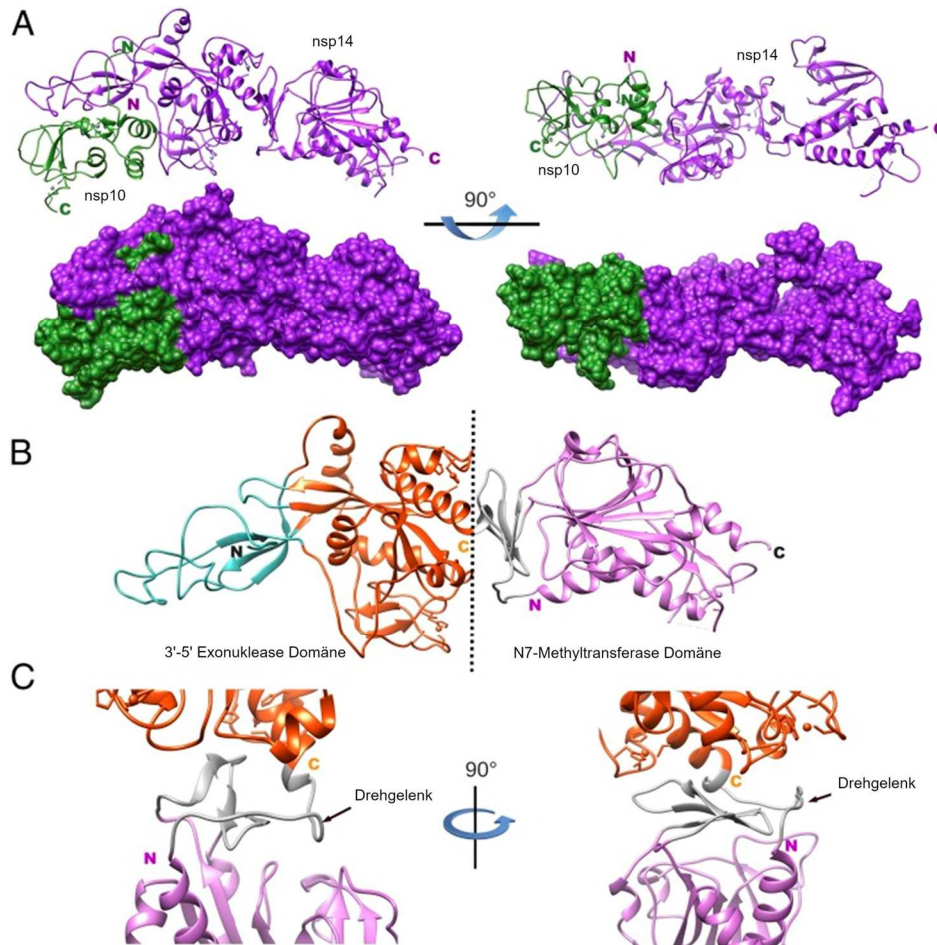


Abbildung 5: Strukturmodell von SARS-CoV-nsp14 und nsp10 im Komplex. (A) Im oberen Abschnitt sind die Seitenansichten der Bänderstrukturen (engl.: ribbon structures) von SARS-CoV-nsp14 (lila) und von SARS-CoV-nsp10 (grün) dargestellt. Im unteren Abschnitt A sind die Oberflächen der beiden Proteine im Komplex in identischer Orientierung wie im oberen Abschnitt abgebildet. Die amino- und carboxyterminalen Enden der beiden Proteine sind in den jeweiligen Farben mit N (N-term.) und C (C-term.) gekennzeichnet. Im mittleren Abschnitt B zeigt die Darstellung die Anordnung der einzelnen Domänen im nsp14. Dazu gehört: die N-terminale nsp10-Binderegion (türkis), die Exoribonuklease-Domäne ExoN (orange), die flexible Drehgelenkregion (grau) und die N7-Methyltransferase-Domäne N7-MTase (pink). Die N- und C-terminalen Enden von nsp14 sind dabei in schwarz angegeben und die Enden der einzelnen Domänen in den jeweils zugehörigen Farben. Abbildung C zeigt vergrößert den Bereich der flexiblen Drehgelenkregion zwischen der ExoN und N7-MTase Domäne (modifiziert nach Ferron *et al.*, 2017).

Während der ersten Charakterisierung von rekombinantem SARS-CoV-nsp14 im Jahr 2006 zeigte sich, dass ExoN in Abhängigkeit von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen einzel- und doppelsträngige RNA in 3'–5'-Richtung degradieren kann. Im Gegensatz dazu widersteht Ribose-2'-O-methylierte ssRNA einer Degradation durch SARS-CoV-ExoN (Minskaia *et al.*, 2006). Spätere Untersuchungen bestätigten, dass SARS-CoV-ExoN in der Lage ist, dsRNA-Substrate zu degradieren, jedoch Substrate mit 3'-nichtgepaarten Enden bevorzugt (Bouvet *et al.*, 2012).

2.2.3 Kofaktor nsp10

Die etwa 15 kDa große nsp10-Untereinheit gehört zu einer Gruppe von hochkonservierten Nichtstrukturproteinen innerhalb der Coronaviren und ist ein wichtiger Bestandteil des RTC. Da für WBV bzw. Bafiniviren bislang kein experimentell bestimmtes nsp10-Strukturmodell (Röntgenkristallographie/Cryo-EM) vorliegt, beruhen Vergleiche mit SARS-CoV-nsp10 auf der Analyse homologer Domain-Strukturen innerhalb der Replikasepolyproteine pp1a/pp1ab, sodass das C-terminale Spaltungsprodukt von WBV-pp1a (pp1aC) und SARS-CoV-nsp10 als homologe Produkte angesehen werden können. Dementsprechend wurde das WBV-nsp10-Homolog hier als pp1aC bezeichnet und (noch) nicht als nsp10 deklariert.

Im Jahr 2005 konnten erstmals Hinweise auf die Bedeutung von nsp10 während der Virusreplikation dokumentiert werden. Die Charakterisierung temperatursensitiver MHV-Varianten zeigte, dass eine Mutation in der kodierenden Region von nsp10 die RNA-Minusstrang-Synthese blockieren kann (Sawicki *et al.*, 2005). In weiteren Versuchen mit MHV-nsp10-Mutanten konnte zusätzlich der Einfluss von nsp10 auf die Prozessierung der beiden Polyproteine pp1a und pp1ab nachgewiesen werden. Dabei kam es zu einer teilweise gestörten Prozessierung der nsp4-nsp11 Region (Donaldson *et al.*, 2007). Dennoch besitzt nsp10 keine eigene enzymatische Funktion. Die Annahme eines multifunktionalen Einflusses von nsp10 auf die Virusreplikation und Proteinprozessierung beruht somit allein auf Protein- und RNA/DNA-Interaktionen.

Im Fall von SARS-CoV zeigte nsp10 Hinweise auf eine unterstützende Rolle für die ribonukleolytische Aktivität von ExoN (Bouvet *et al.*, 2012). Erste strukturelle Analysen des nsp14/nsp10-Komplexes bestätigen diese Interaktion und deuteten auf ein Zusammenspiel der beteiligten Proteinoberflächen hin (Ma *et al.*, 2015). Jüngste Studien zum möglichen nsp14/nsp10-Fehlerkorrekturkomplex von SARS-CoV-2 und MERS-CoV bekräftigten ebenfalls den aktivitätsfördernden Einfluss von nsp10 auf die ExoN-Funktion des nsp14-Proteins (Ma *et al.*, 2021).

Im Fall von nsp16 konnte bereits im Jahr 2010 die Bedeutung der Interaktion mit nsp10 für die virale Replikation gezeigt werden (Lugari *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigten Röntgenstrukturanalysen, dass nsp10 und nsp16 in einem heterodimeren Komplex vorliegen sowie nsp10 als Aktivator von nsp16 dient und damit dessen

2'-O-MTase-Funktion aktiviert (Decroly *et al.*, 2011). Dabei wird vermutet, dass nsp10 durch seine Wechselwirkung die RNA-Bindedomäne von nsp16 strukturell zugänglich macht und die involvierte SAM-Bindedomäne stabilisiert. Strukturell zeigte sich bei weiteren Studien, dass nsp10 aus einer einzelnen Domäne besteht und zwei Zink-Finger-Motive präsentiert, die möglicherweise an RNA-Interaktionen beteiligt sind sowie zur Stabilisierung der Proteinstruktur dienen (Matthes *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2021).

2.2.4 Nsp14 und der Capping-Prozess

Der bereits erwähnte Prozess des Capping ist eine für Eukaryoten in mehreren Schritten erfolgende, kotranskriptionelle 5'-Modifikation neu synthetisierter mRNAs und findet im Nukleus während der Pol-II-vermittelten Transkription statt (Shatkin, 1976). Bei der angehängten Cap-Struktur handelt es sich um ein 5'-5'-Triphosphat-gekoppeltes Guanodin, das an der N7-Position des Guanins methyliert ist. Außerdem ist die Ribose des nachfolgenden Nukleotids an der 2'-Position methyliert ($7^m\text{GpppN}_{2'Om}$) (Cougot *et al.*, 2004; Bouvet *et al.*, 2010). Generell spielen Cap-Strukturen eine wichtige Rolle innerhalb des RNA-Metabolismus eukaryotischer Zellen. Sie schützen hierbei die RNA vor der Degradation durch zelleigene ExoNs (Huang *et al.*, 2011; Gaglia *et al.*, 2012; Geerlings *et al.*, 2000). Dabei können zelleigene Pathogen-Rezeptoren wie RIG-I und MDA5 5'-Triphosphat-RNA ohne Cap-Struktur erkennen, wodurch antivirale Abwehrmechanismen einschließlich der Interferon-Signaltransduktion aktiviert werden (Züst *et al.*, 2011; Hyde & Diamond, 2015; Devarkar *et al.*, 2016). Viele RNA-Viren, deren Replikationsprozesse im Zytoplasma des Wirtes erfolgen, entgehen diesen Abwehrmechanismen durch viruskodierte Enzyme, die die viralen RNAs mit einer methylierten Cap-Struktur versehen, da sie nicht auf den im Zellkern stattfindenden wirtseigenen Capping-Prozess zurückgreifen können. Auch für die Translation viraler mRNAs als zentraler Schritt des viralen Replikationszyklus ist das Vorhandensein von 5'-gecappten mRNAs von grundlegender Bedeutung, da diese für die effiziente Rekrutierung der zellulären Translationsmaschinerie erforderlich sind (eIF4G/Ribosom) (Ferron *et al.*, 2012; Filipowicz *et al.*, 1976; Ohlmann *et al.*, 1996).

Für die Methylierung der GpppN-Cap-Grundstruktur durch die viruseigene N7-MTase-Aktivität, wie bisher im Fall von SARS-CoV-nsp14 nachgewiesen

werden konnte, sind einige vorausgehende Schritte notwendig (Abbildung 6). An erster Stelle steht dabei die durch eine RNA-Triphosphatase (RTPase, nsp13) induzierte hydrolytische Spaltung des 5'-Phosphats der neu synthetisierten viralen RNA (Ivanov & Ziebuhr, 2004; Ivanov *et al.*, 2004). Die so entstandenen 5'-Diphosphat-Enden könnten anschließend als Substrat für eine Guanylyltransferase dienen, die ein GMP überträgt, das aus der Hydrolyse von GTP stammt. Diese Reaktion führt bei zellulären mRNAs zur Bildung der Cap-Grundstruktur am 5'-Ende der RNA (GpppN-RNA). Neuere Arbeiten legen nahe, dass dieser Prozess bei Coronaviren anders abläuft. Die Guanylylierung erfolgt nämlich hier in zwei Schritten über ein RNAyliertes nsp9-Zwischenprodukt, das durch die NiRAN-Domäne von nsp12 gebildet wird (Park *et al.*, 2022). Anschließend wird die dabei entstehende Phosphoramidatbindung zwischen dem N-Terminus von nsp9 und der RNA durch ein in der NiRAN-Domäne gebundenes GDP angegriffen. Im Ergebnis dieser Reaktion entsteht ein unmodifiziertes nsp9-Molekül und eine GpppN-RNA, die also die Cap-Grundstruktur trägt. Im Anschluss methyliert dann die nsp14-assoziierte N7-MTase das 5'-Guanin der Cap-Grundstruktur (GpppN-RNA) an der Guanin-N7-Position. SAM dient dabei als Donor der Methylgruppe, wodurch eine Cap-0-Struktur (^{7m}GpppN-RNA) gebildet wird, während S-Adenosyl-Homocystein (SAH) als Nebenprodukt freigesetzt wird (Chen, Y. *et al.*, 2009). Im letzten Schritt methyliert nsp16 (2'-O-MTase) im Komplex mit nsp10 die 2'-OH-Gruppe der Ribose des ersten Nukleotids (N₁ des RNA-Substrats) und überführt damit die Cap-0-Struktur in eine Cap-1-Struktur (^{7m}GpppN_{2'Om}-RNA) (Bouvet *et al.*, 2010; Lugari *et al.*, 2010).

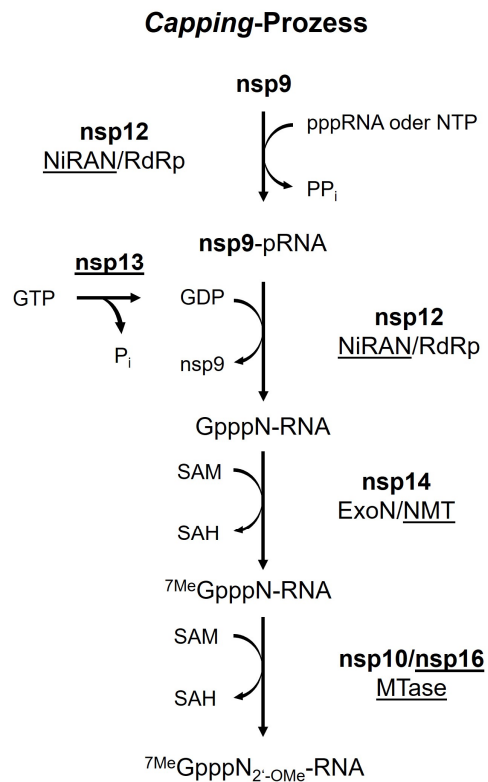


Abbildung 6: Modell der coronaviralen Cap-Modifikation von plusstrang RNAs. Hierbei wird angenommen, dass die NiRAN Domäne die N-terminalen Reste von nsp9, durch die Ausbildung von kovalenten Phosphoramidatbindungen, entweder initiativ NMPyliert oder RNAyliert (Slanina *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Walker *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2022). Ein Komplex aus GDP-Molekül und G-pocket der NiRAN-*active site* attackiert anschließend die Verbindung zwischen nsp9 und pRNA, wobei nsp9 freigesetzt und die Cap-Vorstufe GpppRNA gebildet wird (Park *et al.*, 2022; Malone *et al.*, 2023; Shannon *et al.*, 2022). Darauf folgend wird die GpppRNA durch die Guanin-N7-Methyltransferase von nsp14 Methyliert (Chen, Y. *et al.*, 2009). Im letzten Schritt konvertiert nsp16 im Komplex mit nsp10 die Cap0 Struktur durch Ribose 2'-O-Methylierung des ersten Nukleotids der RNA, in eine Cap1 Struktur (Decroly *et al.*, 2008; Bouvet *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Der hier dargestellte Ablauf verbleibt aufgrund der geringen molekularen Informationen hypothetisch und muss in zukünftigen Studien weiter bestätigt werden.

2.2.5 Nsp13 Helikase/RTPase/NTPase

Ein weiterer Interaktionsfaktor des RTC im Kontext des nsp12-nsp7-nsp8-Holoenzym ist nsp13 (Chen, J. *et al.*, 2020). Nsp13 ist multifunktional und weist mehrere enzymatische Aktivitäten auf. Dazu zählt eine Helikasefunktion (HEL), eine Nukleotidtriphosphatasefunktion (NTPase) und eine RNA 5'-Triphosphatasefunktion (RTPase) (Ivanov *et al.*, 2004). Trotz einiger Kontroversen über die genaue Integration der Funktionen von nsp13 in den Ablauf der RTC assoziierten RNA-Synthese gelten folgende nsp13-Aktivitäten als allgemein anerkannt: (I) die Nutzung der Energie aus einer ATP-Hydrolyse zur Entwindung von RNA (Helikase) und (II) die Hydrolyse von GTP zu GDP als Akzeptor für die 5' pRNA (Abbildung 6) innerhalb der CoV Cappingreaktion (Park *et al.*, 2022). Neuere Studien deuten zusätzlich auf eine weitere Funktion von nsp13 bei der Umgehung der wirtseigenen Immunabwehr durch Unterdrückung der Interferonaktivierung hin (Vazquez *et al.*, 2021; Rashid *et al.*, 2022).

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Seit der ersten umfassenden Sequenzanalyse des coronaviralen Replikase-Gens im Jahr 1989 (Gorbalenya *et al.*, 1989) konnten zahlreiche Funktionen der 16 coronaviralen nsps sowie deren Strukturen bestimmt werden. Dazu gehört beispielsweise die bei Nidoviren mit großen Genomen (>20 kb) konservierte ExoN-Funktion einschließlich ihrer Interaktion mit anderen Untereinheiten des RTC während der RNA-Synthese. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Parallelen zwischen coronaviralen ExoN und ExoN auf DNA-Ebene wurde bereits im Vorfeld eine Korrekturlesefunktion impliziert, die eine für RNA-Viren einzigartige geringe Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) sicherstellt und maßgeblich zur Entwicklung und Stabilisierung der ungewöhnlich großen Nidovirus-Genome beigetragen hat. Während zu Beginn des Projekts nur wenige Informationen vorlagen, hauptsächlich zur SARS-CoV-ExoN, gab es kaum Untersuchungen zu Exonukleasen anderer Vertreter der großen Virusordnung Nidovirales.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand somit die erstmalige biochemische Charakterisierung und die Ermittlung von RNA-Substratspezifitäten weiterer nidoviraler Exoribonuklease-Funktionen, wie die der nsp14-Homologe von WBV und HCoV-229E. Die Einbeziehung der bereits charakterisierten ExoN-Funktion

von SARS-CoV-nsp14 ermöglicht neben einer Erweiterung der untersuchten ExoN-Substratpalette für SARS auch einen Vergleich mit den neu ermittelten ExoN-Aktivitäten, um potenzielle Unterschiede im Aktivitätsmuster herauszuarbeiten. Basierend auf der zu diesem Zeitpunkt kürzlich identifizierten Interaktion zwischen nsp14 und nsp10 bot sich die zusätzliche Einbeziehung von nsp10 in die Studie an, um dessen Einfluss auf die ExoN-Aktivität zu untersuchen.

Im letzten Teil der Studie sollte die Bedeutung der konservierten DEDDh- bzw. DEEDh-Reste innerhalb der ExoN-Motive I–III für die nukleolytische Aktivität der WBV-ExoN und der HCoV-229E-nsp14-ExoN untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine ortsspezifische Mutagenese (Alanin-Substitution) der fünf potenziell Mg²⁺-koordinierenden Aminosäuren (DEE/DDh) des aktiven Zentrums durchgeführt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht im Wesentlichen darin, gemeinsame biochemische Charakteristika der untersuchten ExoNs zu identifizieren, deren Vereinbarkeit mit der postulierten Korrekturlesefunktion des corona-/nidoviralen RTC zu prüfen und so ein besseres Verständnis möglicher Funktionen im nidoviralen Replikationszyklus zu erlangen, insbesondere im Hinblick auf den vermuteten Beitrag dieser Enzyme zur Sicherung einer reduzierten Fehlerrate der nidoviralen RdRp während der Genomreplikation.

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Reagenzien

3.1.1 Chemikalien

Eine vollständige Liste verwendeter Chemikalien befindet sich im Anhang 10.1.2.

3.1.2 *E. coli* Genotypen

Name:	Genotyp:
BL21 (DE3) TOP10F'	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB mB) λ</i> (DE3 [<i>lacI</i> lacUV5-T7 gene 1 <i>ind1 sam7 nin5</i>])
TB1+pCGI Rosetta	F ⁻ [<i>lacI^r Tn10(tet^r) mcrA Δ(mrr-hsdRMSmcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^r) endA1 λ-</i>
TB1+pCGI Rosetta	F ⁻ <i>ara Δ(lac-proAB) [Φ80dlac Δ(lacZ)M15] rpsL(Str^r) thi hsdR</i> F ⁻ <i>ompT hsdS_B (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Novagen)

3.1.3 Antibiotika

Name:	Stammlösung:	Arbeitskonzentration:
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml	200 ng/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml	34 µg/ml

3.1.4 Nährmedien

Für die Kultivierung von *E. coli* in flüssigem Nährmedium wurde LB-Medium (engl.: lysogeny broth, Luria-Bertani-Medium) verwendet. Die Kultivierung zur gezielten Selektion einzelner Klone mittels verschiedener Antibiotika erfolgte auf festen Nährmedien wie LB-Agarplatten. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium gelöst, das Medium autoklaviert und anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Für die Kultivierung unter selektiven Bedingungen wurde das LB-Medium beziehungsweise die LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Abschnitt 3.1.3).

LB- Medium:

Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Bacto-Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

LB- Agar:

Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
LB-Medium	

3.1.5 Vektoren/Plasmide

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Promotor
pASK-IBA3plus	Ampicillin	<i>tet</i>
pCGI (TB1- <i>E. coli</i>)	Chloramphenicol	<i>GAL10</i>
pET-11d	Ampicillin	<i>T7/lac O</i>
pDEST 14	Ampicillin	<i>T7/bla</i>

Eine detaillierte Liste der klonierten und verwendeten Expressionskonstrukte befindet sich im Anhang 10.1.3.

3.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

3.1.6.1 PCR-Primer für die Klonierung

WBV-ExoN (18758-19858 nt)

TOPO/pET11d-Fw: 5'-CTCACCCATGGCTACATGAATACTCAGTA-3'

TOPO/pET11d-Rw: 5'-CTGTGTGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTGTGTGTATGCTTGTTG-3'

WBV-nsp10-Homolog pp1AaC(13358-13623 nt)

TOPO/pET11d-Fw: 5'-CTCACCCATGGCAGTTGTACGAATTGGTG-3'

TOPO/pET11d-Rw: 5'-CTGTGTGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTGTTGTTGCAATGGTTG-3'

HCoV-229E-nsp14 (17069-18622 nt)

pASK-Ub-Ins-Fw1: 5'-CTCCGCGGTGGATCTGAAAGTAGTTGTGGTTTTG-3'

pASK-Ub-Ins-Rw1: 5'-agtgcggcctcaTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTGTAAATTGACCTCTGTGAATG-3'

pASK-Ub-Vek-Fw2: 5'-GTCAATTTACAACATCACCATCACCATCACTAAAgaggccgcactcgaggtcgac-3'

pASK-Ub-Vek-Rw2: 5'-CAACTACTTTCAGATCCACC GCGGAGACGCAGGAC-3'

HCoV-229E-nsp10 (12092-12496 nt)

pASK-Ub-Ins-Fw1: 5'-ATATACCATGGCTGGCAAACAGACTGAGTT-3'

pASK-Ub-Ins-Rw1: 5'-CCGGATCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTT-3'

pASK-Ub-Vek-Fw2: 5'-TCACCATCACTAAGATCCGGCTGCTAACAA-3'

pASK-Ub-Vek-Rw2: 5'-TAAGAAGGAGATATACCATGGCTGGCAAAC-3'

SARS-CoV-nsp14 (17970-19550 nt)

pDEST14-Fw: 5'-GGGATCCATGCAGAAAATGTAAGTGGACTTTT-3'

pDEST14-Rw: 5'-ATCTCGAGCTGTAACCTGGTAAATGTATT-3'

SARS-CoV-nsp10 (12955-13371 nt)

pET11d-Ins-Fw1: 5'-ATATACCATGGCTGGAAATGCTACAGAAAGT-3'

pET11d-Ins-Rw1:

5'-CAAGGGGTTATGCTATTAGTGATGGTGATGGTGATGCTGCATCAAGGGTTCGCGGAG-3'

pET11d-Vek-Fw2:

5'-GAACCCTTGATGCAGCATCACCATCACCATCACTAATAGCATAACCCCTTGGGGCTCC-3'

pET11d-Vek-Rw2: 5'-GTAGCATTCCAGCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG-3'

Mutagenese WBV-ExoN (18758-19858 nt)

pET11d-WBV_M1-D-A_FW: 5'-AGTAGTTTGC GCCTTGG AATTCTTCCACGTCCG-3'

pET11d-WBV_M1-D-A_RV: 5'-TTGGAAGTCTAGTAGTTTGC GCCTTGG AATTCT-3'

pET11d-WBV_M2-E-A_FW: 5'-TTGCGATTTGGCCTTCTTCCACGTCCGACATGA-3'

pET11d-WBV_M2-E-A_RV: 5'-GTCTAGTAGTTTGC GCATTTGGCCTTCTTCCACG-3'

pET11d-WBV_M3-D-A_FW: 5'-TGCAGGCAATGCCCTCCGTGCTCTAACCAACCT-3'

pET11d-WBV_M3-D-A_RV: 5'-TTCTCTACGGTGCAGGCAATGCCCTCCGTGCTC-3'

pET11d-WBV_M4-D-A_FW: 5'-TGCAGGCAATGAGCTCCGTGCTCTAACCAACCT-3'

pET11d-WBV_M4-D-A_RV: 5'-TTCTCTACGGTGCAGGCAATGAGCTCCGTGCTC-3'

pET11d-WBV_M5-H-A_FW: 5'-TGGGGATGCTGCCACAGCATCTGCAGATACAAT-3'

pET11d-WBV_M5-H-A_RV: 5'-ATCAACAACATGGGGATGCTGCCACAGCATCTG-3'

Mutagenese HCoV-229E-nsp14 (17069-18622 nt)

pASK-Ub-229E_M1-D-A_FW: 5'-GTTGGTTAGGAATGGccGTGGAAGGTGCACATGTACAGGTG-3'

pASK-Ub-229E_M1-D-A_RV: 5'-GTGCACCTTCCACggCCATTCTAACCAACCTCTGACATG-3'

pASK-Ub-229E_M2-E-A_FW: 5'-GCTGGCGGTTTAGctTTGACCACTATGCGTTATTTTGTAAAG-3'

pASK-Ub-229E_M2-E-A_RV: 5'-GCATAGTGGTCAAagCTAAACCGCCAGCCCAAAGTACAAAAC-3'

pASK-Ub-229E_M3-E-A_FW: 5'-GGAATGGATGTGGctGGTGACATGTACAGGTGACAATG-3'

pASK-Ub-229E_M3-E-A_RV: 5'-GACATGTGCACCagCCACATCCATTCTAACCAACCTCTGAC-3'

pASK-Ub-229E_M4-D-A_FW: 5'-CATGTTGCTTCTGGTGcaGCTATTATGACTAGATGTTTGG-3'

pASK-Ub-229E_M4-D-A_RV: 5'-GTCATAATAGCtgCACCAGAAGCAACATGCTCATTCTATG-3'

pASK-Ub-229E_M5-H-A_FW: 5'-GTTTCATAGAAATGAGgcTGTGCTTCTGGTGATGCTATTATGAC-3'

pASK-Ub-229E_M5-H-A_RV: 5'-CCAGAAGCAACAgcCTCATTCTATGAACATTACAAAATTGCATGG-3'

3.1.6.2 RNA-Substrate für die Bestimmung der ExoN-Aktivität

Die Färbung der abgebildeten Oligonukleotide steht repräsentativ für: rot = radioaktiv 5'-[³²P]-markiert, schwarz = nicht 5'-[³²P]-markierte komplementäre Stränge, grau = nichtgepaarte Nukleotide, blau = 3' (2')-Desoxy-Ribose-Nukleotid.

R1:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCA	-3'
R2:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCA	Biotin -3'
R3:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCA (2' desoxy)	-3'
R4:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCC	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R4 ₂ :	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCC	Biotin -3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R5:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCA	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R5 ₂ :	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCCA	Biotin -3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R6:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGCAA	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R7:	5' -	CGCAGUUAGCUCUCCUAAUCGAAA	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R11:	5' -	CGCAGUUA	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAG	-5'
R12:	5' -	CGCAGUUAGA	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUCG	-5'
R13:	5' -	CGCAGUUAGCUACUAAUCGCCC	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R13 ₂ :	5' -	CGCAGUUAGCUACUAAUCGCCC	Biotin -3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R14:	5' -	CGCAGUUAGCUAAUAAUCGCCC	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG	-5'
R15:	5' -	CGCAGUUAGCUAAAAUCGCCC	-3'
	3' -Biotin	 GCGUCAAUUCGAGGGUUAGCGGG	-5'

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Arbeiten mit *E. coli*

4.1.1.1 Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde in dieser Arbeit die Rubidiumchlorid-Methode angewandt (Green *et al.*, 2013). Hierzu wurde eine einzelne Kolonie von einer LB-Agar-Platte in eine 2 ml Starterkultur mit LB-Medium überführt und bei 37 °C schüttelnd (~180 U/min) über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die gesamte Starterkultur verwendet, um 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ anzupflanzen, und bei 37 °C (180 U/min) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,375 inkubiert. Anschließend wurden die 250 ml Bakterienkultur bei 6.000 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 ml kaltem TFB1-Puffer (siehe unten) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde die Zellsuspension erneut bei 6.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, und das Pellet wurde in 10 ml TFB2-Puffer (siehe unten) resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die TFB2-Zellsuspension in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

TFB1-Puffer:

CH ₃ COOK	30 mM
CaCl ₂	10 mM
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerol	15 % (v/v)

TFB2-Puffer:

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerol	15 % (v/v)

(Der pH-Wert von TFB1 wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und der pH-Wert von TFB2 mit KOH auf 6,5. Anschließend wurden beide Puffer sterilfiltriert (0,2 µm).

4.1.1.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Hierbei wurden 100 ng Plasmid-DNA mit 100 µl chemisch kompetenter Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellen-Plasmid-Gemisch für 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Zur

anschließenden Regeneration der Bakterien wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Schließlich wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.1.3 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden in dieser Studie drei Vektoren (pET-11d, pDEST, pASK-IBA3) verwendet. Die jeweiligen Plasmide wurde in die entsprechenden Bakterien transformiert (Abschnitt 4.1.1.2), für die Selektion auf Agarplatten mit Antibiotika (siehe Tabelle) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde unter sterilen Bedingungen eine einzelne Bakterienkolonie entnommen, um damit eine Starterkultur (5 ml LB-Medium mit Antibiotikum) anzupflanzen. Die Starterkulturen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Für die Überexpression der Proteine im großen Maßstab (500 ml), wurden die Starterkulturen in einem Verhältnis von etwa 1:100 in neues LB-Medium (+AB) überführt und bei 37 °C (180 U/min) bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,6 OD₆₀₀ erneut inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen vor der Induktion der Proteinexpression für etwa eine Stunde bei 4 °C heruntergekühlt. Die heterologe Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG oder – abhängig vom verwendeten Expressionsvektor – von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Nach einer Inkubation von 17 h bei 17 °C und 180 U/min wurden die Zellen bei 6.000 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend entweder zur direkten Aufreinigung in 10 ml eiskaltem Lysepuffer (Abschnitt 4.1.2) resuspendiert oder für die Lagerung bei –80 °C in Waschpuffer (Lysepuffer ohne Lysozym) aufgenommen.

Vektor	<i>E. coli</i>	Antibiotika	Induktion
pDest	Rosetta	Amp100, Cam34	1 mM IPTG
pASK	TB1+pCGI	Amp100, Cam34	200 ng/ml AHT
pET-11d	BL21	Amp100	1 mM IPTG

4.1.2 Lyse von *E. coli*

Zur Aufreinigung der rekombinanten Zielproteine aus 500 ml *E. coli*-Kulturen wurde das in Waschpuffer (Lysepuffer ohne Lysozym) resuspendierte Zellpellet mit 1,5 mg/ml Lysozym und 1 µg/ml Proteaseinhibitor (siehe Tabelle) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer mechanischer Aufschluss durch

Sonifizierung des Zelllysates. Dabei wurde die Zellsuspension unter ständiger Kühlung auf Eis einer 20-fachen Sonifizierung von jeweils 10 s bei etwa 30 % Intensität ausgesetzt. Anschließend wurden vor der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation für 30 min mit 40.000 x g bei 4 °C pelletiert und der lösliche Überstand wurde für die nachfolgende Proteinreinigung verwendet.

Lysepuffer (Waschpuffer mit Lysozym und Protease-Inhibitor):

Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
MgSO ₄	20 mM
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)
Lysozym	1,5 mg/ml
Protease-Inhibitor (EDTA-frei)	1 µg/ml

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Gel-Elektrophoresen

4.2.1.1 Agarose-Gele zur Auftrennung von DNA

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und Restriktionsfragmenten wurden Agarosegele eingesetzt. Die zu trennende DNA (3-5 µl) wurde auf 1 % (w/v) Agarosegele mit 0,1 µg/ml Ethidium Bromid aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1x Ladepuffer (10 mM Tris-Cl, 0,03 % Bromphenol Blau, 40 % Saccharose, 75 mM EDTA, pH 7,5) versetzt und anschließend bei 5 mA/cm (~125V) in 1x TAE-Puffer (siehe 3.1.9.) elektrophoretisch getrennt.

4.2.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen von RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von radioaktiv markierten RNAs erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Angesetzt wurden dafür Polyacrylamidgele (PAA-Gel) mit 12 % Polyacrylamid (v/v) und 7 M Harnstoff aus standardisierten Komponenten des Sequenziergel-Systems Rotiphorese® (Roth), die nach Angaben des Herstellers verwendet wurden. Vor dem Beladen des polymerisierten Gels wurden die präzipitierten und getrockneten RNA-Proben der ExoN-Aktivitätstests in 8 µl FU-Ladepuffer (siehe Tabelle) resuspendiert. Nach einer Vorlaufzeit von 30–60 min bis zum Erreichen der benötigten Lauftemperatur des Gelsystems (Bio-Rad Sequenziereinheit 60x50 cm) von ~50 °C, wurden die in Ladepuffer resuspendierten Proben auf das Gel aufgetragen. Um in diesen Fällen

eine saubere Signalqualität zu gewährleisten, wurden die RNA-Proben vor dem Beladen des Gels nicht wärmebehandelt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE bei 50 Watt (und 150V) für 1,5–2 h. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe eines Vakuum-Geltrockners (VWR, MGD 4534) für zwei Stunden getrocknet, über Nacht in einer Foto-Kassette (Fujifilm) entwickelt und autoradiographisch mittels phosphorimaging (GE, Typhoon FLA) dargestellt (siehe 4.2.2.2).

Ansatz für 12 % PAA/7M Harnstoffgel (Rotiphorese® System):	Gesamtvolumen 70 ml
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	33,6 ml
Acrylamid-Verdünner	28,58 ml
Acrylamid-Puffer	7,0 ml
10 % (w/v) APS	500 µl
TEMED	50 µl

FU-Ladepuffer:	
deionisiertes Formamid	80 % (v/v)
Urea	7 M
10 x TBE	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol	0,1 % (w/v)

4.2.1.3 Tris-Trizin-Polyacrylamidgel (PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

Im Gegensatz zum traditionellen Tris-Glyzin-Gelsystem zur Auftrennung von Proteinen ist im hier verwendeten Tris-Trizin-System (*N*-[1,3-Dihydroxy-2-(Hydroxymethyl)propan-2-yl]Glycin) die Auflösung kleiner Proteine weniger durch eine Akkumulation freier Dodecyl-Sulfat-Ionen aus dem Proben- und Laufpuffer gestört. Dies führt zu einer schärferen Bandenauflösung. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels in einem Verhältnis von 4:1 mit Ladepuffer (siehe unten) versetzt und für die Denaturierung 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte nach dem Probenauftrag die Elektrophorese bei einer Spannung von 35 mA (~150V) für etwa eine Stunde in 1x Laufpuffer (siehe Tabelle). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine für 30 min in 0,05 % (w/v) G-250 Coomassie-Brilliantblau-Lösung (10 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und die Gelmatrix anschließend in 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

Laufpuffer:	Gesamtvolumen 1 L
Tris	0,1 M
Trizin	0,1 M
SDS	0,1 % (w/v)
ddH ₂ O	auf 1L

2x Trizin-Ladepuffer:	Gesamtvolumen 10 ml
Glycerol	2,4 ml (3 g)
SDS	0,8 g
DTT	0,31 g
1M Tris-Cl (pH 6.8)	1 ml
Coomassie-blau G-250	2 mg
ddH ₂ O	auf 10 ml
Sammelgel:	Gesamtvolumen 3 ml
Polyacrylamid 30 % (w/v)	0,348 ml
3 M Tris-Trizin (pH 8,9)	0,744 ml
10 % (w/v) APS	14 µl
TEMED	4,66 µl
ddH ₂ O	auf 3 ml
Trenngel:	Gesamtvolumen 5 ml
Polyacrylamid 30 % (w/v)	1,6-2,5 ml
3 M Tris-Trizin (pH 8,9)	2,16 ml
10 % (w/v) APS	14 µl
TEMED	4,66 µl
ddH ₂ O	auf 5 ml

4.2.2 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Gelen

4.2.2.1 Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen

Durch die Färbung von Polyacrylamidgelen mit kolloidalem Coomassie-Farbstoff können die darin aufgetrennten Proteine visualisiert werden. Dafür wurden die verwendeten PAA-Gele für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständiger, leichter Bewegung (ca. 60 rpm) in einer Färbelösung (siehe Tabelle) gebadet. Zum darauffolgenden Entfärben der Matrix wurde das Gel ebenfalls unter ständiger Bewegung mit 10 % (v/v) Essigsäure gewaschen.

Coomassie-Färbelösung:	
Methanol	10 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Coomassie-Brillantblau G-250	0,5 % (w/v)

4.2.2.2 Phosphorimaging

Das Phosphorimaging-Verfahren ist im Gegensatz zu älteren autoradiographischen Systemen mit Röntgenfilmen wesentlich sensitiver (240×) und ermöglicht den Nachweis sehr kleiner radioaktiver Probenmengen. Um radioaktiv markierte Proben (5'-[³²P]-markierte RNA-Spaltungsprodukte von ExoN) nach der Elektrophorese innerhalb der PAA/Harnstoff-Gele zu visualisieren, wurden hier Phosphorimaging-Platten (Phosphorimaging-screens, FujiFilm) für etwa 12 h in einer Fotokassette (FujiFilm) mit den getrockneten Gelen exponiert. Die proportional zur radioaktiven Strahlung gemessene Lumineszenz der Gel-

exponierten Screens wurde anschließend mittels Phosphorimaging (Typhoon FLA, GE) erfasst und mit einer speziellen Software (Quantity One, Bio-Rad) visualisiert.

4.2.3 *In-vitro*-3'–5'-Exoribonuklease-Aktivitätstests

Hierbei wurde die ribonukleolytische Aktivität rekombinanter ExoN-Proteine untersucht. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit, Phosphodiesterbindungen in RNA hydrolytisch zu spalten. Zu ihrer Charakterisierung wurden die aufgereinigten Proteine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit 5'-[³²P]-markierten RNA-Substraten inkubiert, und die Reaktionsprodukte wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen separiert (Abschnitt 4.2.1.2). Bei den RNA-Substraten handelte es sich um verschiedene Oligonukleotide, die entweder einzelsträngig, in hybridisierter Form als Duplex-RNA oder in teilweise hybridisierter Form als partielle Duplex-RNA eingesetzt wurden (Abschnitt 3.1.6.2). Der Reaktionsansatz eines ExoN-Aktivitätstests besaß in den durchgeführten Experimenten ein Volumen von 20 µl und enthielt 50 nM 5'-[³²P]-markiertes RNA-Substrat, 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Zum Start der Reaktion wurde zuletzt rekombinantes ExoN (50 nM Endkonzentration) auf Eis zugegeben, und der Reaktionsansatz anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Eine Ausnahme stellt die Untersuchung der ExoN-Spaltungseffizienz in Abschnitt 5.2.7 dar. Hierbei wurden die Reaktionen für jeweils 5, 10 und 20 min inkubiert, und es wurden lediglich 15 nM ExoN/nsp10 (pp1aC) eingesetzt. Um die Reaktionen zu stoppen und die RNA-Produkte zu präzipitieren, wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit 2 µl 3 M kaltes Natriumazetat (pH 5,2) sowie 200 µl kaltes Ethanol (200 µl) zugegeben, und die RNA-Produkte wurden über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Am darauffolgenden Tag wurden die gefällten Produkte für 30 min bei 21.000 × g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets wurden anschließend in einer Vakuum-Zentrifuge (Savant SVC 200) getrocknet. Die so getrockneten Präzipitate wurden anschließend in 8 µl FU-Ladepuffer (80 % (v/v) deionisiertes Formamid; 6 M Urea; 10 % (v/v) 10 × TBE; 0,1 % (v/v) Bromphenolblau und 0,1 % (v/v) Xylencyanol) resuspendiert, für die Auswertung auf ein 12 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetragen (Abschnitt 4.2.1.2) und im Phosphorimaging-Verfahren visualisiert (Abschnitt 4.2.2.2).

ExoN-Aktivitätspuffer:	
HEPES-KOH (pH 8,0)	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	2 mM
ExoN-Reaktionsansatz:	
Gesamtvolumen 20 µl	
5'-[³² P]-RNA-Substrat	1 µl (50 nM)
10x ExoN-Aktivitätspuffer	2 µl
ExoN	1 µl (50 nM)
nsp10 *	1 µl (50 nM)
H ₂ O (RNase/DNase-frei)	16 µl (15 µl *)

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung und Aufreinigung von Proteinen

4.3.1.1 Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung rekombinanter, mit Hexa-Histidin-*tag* (His₆) versehener Proteine wurde eine Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallionen (IMAC; Talon® Superflow (Co²⁺)-Matrix, Sigma) verwendet. Um die nukleolytische Aktivität der aus *E. coli* gewonnenen rekombinanten Proteine zu bewahren, erfolgte die Aufreinigung unter nativen (nichtdenaturierenden) Bedingungen. Die Zellextrakte der Proteinexpression in *E. coli* (Abschnitt 4.1.1.3) wurden wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben lysiert und die Co²⁺-Matrix in dem verwendeten Lysepuffer äquilibriert. Das abzentrifugierte *E.-coli*-Lysat wurde anschließend mit der in Lysepuffer äquilibrierten Co²⁺-Matrix gemischt und für 3–4 h bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach der Inkubation und Bindung der rekombinanten Proteine an die Matrix wurde die Lysat/Matrix-Suspension in eine Chromatographiesäule (MoBiTec) mit Filter überführt. Anschließend wurde die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Waschpuffer gespült (siehe Tabelle), wobei unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden. Im Anschluss wurden die in der Säule verbleibenden, an die Matrix gebundenen His-Proteine mit einem Elutionspuffer (+ 200 mM Imidazol) von der Talon-Agarose gelöst und fraktioniert in zehn Mikroreaktionsgefäßen (je 1 ml) eluiert. Zur Überprüfung des Proteingehaltes und des Reinheitsgrades wurden anschließend 10 µl der einzelnen Fraktionen in einer 12 % Tris-Trizin-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 4.2.1.3). Anschließend wurden die bestätigten Proteinfractionen vereinigt und in den für die anschließende Größenausschlusschromatographie vorgesehenen Puffer dialysiert (Abschnitt 4.3.1.3).

Inhalt:	Lysepuffer:	Waschpuffer	Elutionspuffer:
HEPES-NaOH (pH 7,4)	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	500 mM	500 mM	150 mM
Imidazol	5 mM	10, 20 bzw. 50 mM	200 mM
Tween-20	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	5 mM	5 mM	5 mM

4.3.1.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Biomoleküle (Proteine) in wässriger Phase ausschließlich nach ihrem effektiven hydrodynamischen Verhalten, wobei der zeitliche Elutionsverlauf durch die Porenvolumina des verwendeten Säulenmaterials bestimmt wird, und keine (Matrix-) bindenden Wechselwirkungen stattfinden. Bei den in dieser Arbeit genutzten Gelfiltrationssäulen für die Bestimmung der Molekülgrößen und Reinigung von affinitätschromatisch angereicherten Proteinen sowie zur Überprüfung der *In-vitro*-Komplexbildung von nsp14 (ExoN) und nsp10/pp1aC handelte es sich um Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (für ExoN) und Superdex™ 75 Increase 10/300 GL (für nsp10/pp1aC) SEC-Säulen (Amersham). Die Aufreinigung über Gelfiltrationssäulen wurde durch eine FPLC-Anlage (ÄKTA Purifier, GE-Healthcare) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. In Vorbereitung für die Filtration wurden die Säulen zuerst mit ddH₂O gespült und anschließend mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert (siehe Tabelle). Anschließend wurden auf die Säule Proben mit einem Maximalvolumen von 1 ml geladen und deren Filtration mit einer Flussrate von 1 ml/Minute durchgeführt. Der Durchfluss wurde zur Analyse in 1-ml-Fractionen aufgenommen und, wie bereits in Abschnitt 4.2.1.3 und 4.2.2.1 erwähnt, via 12 % Tris-Trizin-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Für eine Bestimmung der Proteingrößen wurden vorab verschiedene Markerproteine definierter Größe auf die Säule geladen und deren Elutionsprofil für die Kalibrierung verwendet.

Probenpuffer:

HEPES/KOH (pH 7,4)	25 mM
KCl	300 mM
Glycerol	5 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 mM

Gelfiltrationspuffer:

HEPES/KOH (pH 7,4)	20 mM
KCl	150 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM

4.3.1.3 Dialyse

Bei der hier angewandten Form der Dialyse handelte es sich um einen Austausch des Elutions- oder Gelfiltrationspuffers, in dem die Proteine nach der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie sowie des Größenausschlusses vorlagen, gegen einen Dialysepuffer (siehe Tabelle). Der Austausch erfolgte dabei durch Diffusion über einen Dialyseschlauch (Membran) der Firma Thermo Scientific (*SnakeSkin*TM, MWCO 3 kDa oder 10 kDa). Die 1-ml-Fractionen der Aufreinigung mit dem höchsten Proteingehalt wurden zuvor vereinigt und in den Dialyseschlauch überführt. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde zweimal jeweils für drei Stunden mit mindestens dem hundertfachen Volumen an Dialysepuffer unter ständiger Bewegung bei 4 °C inkubiert. Der dritte und letzte Dialyseschritt erfolgte über Nacht bei 4 °C, ebenfalls mit dem Hundertfachen Verhältnis zwischen frischem Dialysepuffer und Probenvolumen im Schlauch. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteine bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Dialysepuffer:

HEPES-KOH (pH 7,4)	50 mM
KCl	150 mM
Glyzerin	40 % (v/v)
DTT	1 mM
Triton-X 100	0,1 % (w/v)

4.3.1.4 Konzentration von Proteinen durch Zentrifugationsfilter

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration von Fraktionen der Größenausschlusschromatographie wurden in dieser Arbeit Zentrifugationsfilter der Firma Millipore (Amicon® Ultra-10k) gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.3.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung der rekombinanten Proteine (nsp14/ExoN und nsp10/pp1aC) nach der Aufreinigung und Gelfiltration wurde der Bradford-Test verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 5 mg/ml hergestellt (BSA-Standardreihe). Anschließend wurden 5 µl der jeweiligen BSA-Eichlösungen, 5 µl des Probenpuffers oder 5 µl der zu untersuchenden Proteinprobe mit 595 µl ddH₂O gemischt und mit 150 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) versetzt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Assays bestimmt, indem BSA-

Standardlösungen und Proteinproben mit Bradford-Reagenz versetzt und nach definierter Inkubation (etwa 5 min) die Absorption bei 595 nm photometrisch (Bio-Rad) erfasst wurde. Nach Subtraktion des Blindwerts (Probenpuffer ohne Protein) erfolgte die Quantifizierung der Proteinmengen anhand einer BSA-Eichgeraden.

4.3.3 Klonierung

4.3.3.1 TOPO-Klonierung

Die topoisomerasebasierte Klonierung (TOPO cloning) ist eine Technik, mit der DNA-Fragmente ohne die Verwendung von Ligase in spezifische Zielvektoren kloniert werden können. Diese Methode wurde gemäß den Angaben des Herstellers für die Klonierung der WBV-ExoN-, WBV-pp1aC- und SARS-nsp14-Expressionsvektoren (pET-11d für WBV, pDEST14 für SARS-CoV) verwendet (TOPO-XL Cloning Kit, Invitrogen).

4.3.3.2 Restriktions- und ligationsfreies-Klonieren

Für die Klonierung der Expressionsvektoren von HCoV-229E-nsp14 und -nsp10 sowie SARS-nsp10 wurde die restriktions- und ligationsfreie Klonierungsmethode (engl.: PCR cloning) nach (Yao *et al.*, 1992; Li & Breaker, 2001; van den Ent & Löwe, 2006) angewandt. Hierzu wurde zunächst die Insert-DNA und die Vektor-DNA mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 4.3.7). Dabei wurden vier spezifische Primer eingesetzt, die überlappende Regionen zwischen Insert- und Vektor-Amplikon erzeugen (20-50 bp) und somit eine homologe *In-vivo*-Rekombination der komplementären Enden nach der Transformation innerhalb von *E. coli* ermöglichen. Im Anschluss an die PCR wurden die parentalen Plasmid-DNA-Matrizen, die im Gegensatz zum PCR-Produkt methyliert vorliegen, durch eine Behandlung mit 10U/μl DpnI verdaut (Abschnitt 4.3.6.1). Der finale Schritt bestand in der Transformation der Insert- und Vektor-Amplikons in chemisch kompetente *E.-coli*-Top10F'-Zellen (Abschnitt 4.1.1.2).

4.3.4 Mutagenese der ExoN-Domäne

Um Mutationen in einem Plasmid einzufügen beziehungsweise einzelne Nukleotide einer bestimmten DNA-Sequenz auszutauschen und somit die genetische Information gezielt zu verändern, wurde das Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese (engl.: site-directed mutagenesis) angewendet (Yao *et al.*, 1992; Jones & Howard, 1991). Dafür wurden zwei spezifische Primer

verwendet, welche das veränderte Zielnukleotid sowie dessen flankierende Insert-Sequenzen der hergestellten nsp14/ExoN-Konstrukte (Abschnitt 4.3.3.1/2) in definierter Länge (20–50 nt) enthalten. Für die anschließende PCR wurde Phusion® high-fidelity DNA-Polymerase (Thermo Scientific) verwendet (Abschnitt 4.3.7). Vor der Transformation wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des PCR-purification-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt (Abschnitt 4.3.5.4). Im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Produkten wurde die als Matrize verwendete methylierte Plasmid-DNA mit Hilfe von DpnI (10U/µl) über Nacht verdaut (Abschnitt 4.3.6.1), die Produkte anschließend in *E. coli* Top10F' transformiert (Abschnitt 4.1.1.2) und zur Selektion auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach der Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem PCR-Produkt erfolgte die Rekonstitution des zirkulären Plasmides durch die Rekombination der homologen Enden. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA ausgewählter Klone mit einem Mini-Preparation-Kit (Qiagen) isoliert (Abschnitt 4.3.5.1) und deren korrekte Sequenz sowie eingefügte Substitutionen mittels Sequenzierung (Sanger) verifiziert.

4.3.5 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

4.3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräparation)

Bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt (Bimboim & Doly, 1979). Einzelne *E.-coli*-Kolonien einer Transformation wurden in 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum aufgenommen und bei 37 °C mit konstanter Rotation (180 U/min) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die 5-ml-*E.-coli*-Flüssigkulturen für 1 min bei 21.000 × g pelletiert. Darauffolgend wurde das Pellet in 300 µl Lösung I (siehe Tabelle) gelöst und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 300 µl Lösung II versetzt. Nach einer weiteren Inkubation des Gemisches für 5 min bei Raumtemperatur wurden 300 µl Lösung III zugegeben, erneut vorsichtig vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Zellbruchstücke sowie denaturierte Proteine und chromosomale DNA wurden für 30 min bei 21.000 × g und 4 °C abzentrifugiert. Die Fällung der im Überstand enthaltenen Plasmid-DNA erfolgte anschließend durch die Zugabe von 450 µl Isopropanol und Zentrifugation für 30 min bei 21.000 × g und 4 °C (Abschnitt 4.3.5.2). Anschließend wurde der Überstand

verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl eiskaltem Ethanol (70 %, in H₂O) überschichtet. Nach Entfernung des Ethanols wurde die Plasmid-DNA für etwa 30 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Anschließend konnte das trockene DNA-Pellet in 100 µl DNase/RNase-freiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden. Neben der klassischen Minipräparation wurde auch das Mini-Preparation-Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss dieses vereinfachten Verfahrens konnte die isolierte DNA von der Qiagen-Säule mit 20–30 µl DNase/RNase-freiem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration mit dem PicoDrop-Instrument (Biozym) bestimmt werden (Abschnitt 4.3.5.3). Zur Identitätsbestimmung der Plasmide im Anschluss an beide Isolierungsmethoden wurde die Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau unterzogen (Abschnitt 4.3.6.1). Nach etwa zwei Stunden Inkubation der Restriktionsspaltung wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die DNA-Fragmente getrennt und ihre Größen mithilfe eines mitgeführten DNA-Markers abgeschätzt (Abschnitt 4.2.1.1). Die anhand der Schnittmuster korrekt identifizierte Plasmid-DNA wurde anschließend zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt und für die Produktion der rekombinanten Proteine in *E. coli* verwendet.

Lösung I:

EDTA	10 mM
Tris/HCl (pH 8,0)	25 mM
RNase A	100 µg/µl

Lösung II:

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Lösung III:

Natriumazetat (pH 5,6, 0,3 M Endkonzentration)	3 M
--	-----

4.3.5.2 Fällung von Nukleinsäuren

In dieser Arbeit wurde für die Fällung von Nukleinsäuren hauptsächlich Ethanol verwendet. Vor der eigentlichen Fällung wurde eine Nukleinsäure-haltige Lösung mit 10 % ihres Volumens an 0,3 M Natriumazetat (pH 5,2) versetzt. Die Fällung erfolgte anschließend durch Zugabe des zehnfachen Volumens an eiskaltem Ethanol. Die Lösung wurde nach gründlichem Vermischen für 30 min bei 21.000 × g und 4 °C zentrifugiert, und das Präzipitat wurde mit eiskaltem Ethanol (75 % (v/v)) erneut gespült. Anschließend wurde das Präzipitat bei Raumtemperatur getrocknet und in einem adäquaten, konzentrationsabhängigen Volumen von 20–

30 µl DNase/RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die so in Wasser gelösten Proben wurden im Anschluss bei -20 °C gelagert.

4.3.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Um die genaue Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen zu ermitteln, wurde die Absorption der Proben bei 260 nm mit einem Photometer (PicoDrop, Biozym) gemessen. Dabei gilt für doppelsträngige DNA ein A₂₆₀-Wert von 1 = 50 µg/ml und für einzelsträngige RNA sowie Oligonukleotide ein A₂₆₀-Wert von 1 = 40 µg/ml. Aussagen über den Reinheitsgrad konnten anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm zu 280 nm getroffen werden. Hierbei sollte der Wert für DNA bei 1.8, für RNA bei 2.0 und für Oligonukleotide bei 1.5 liegen.

4.3.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten (GeneJet®)

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit einem DNA-Purification-Kit gemäß den Angaben des Herstellers (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde dabei im letzten Schritt mit 40 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend konnte die so gelöste DNA bei -20°C gelagert oder direkt weiteren Klonierungsschritten (Restriktionsverdau) zugeführt werden.

4.3.6 Enzymatische Behandlung und Modifikation von Nukleinsäuren

4.3.6.1 Restriktion von DNA

In dieser Arbeit wurden die für die verwendeten Restriktionsendonukleasen (REN) erforderlichen Reaktionsbedingungen für Restriktionsanalysen und DNA-Spaltungsreaktionen im Zuge der Klonierung von nsp14/ExoN und nsp10/pp1aC gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (NEB). Ebenfalls wurden REN wie DpnI (Fermentas) zur Entfernung von PCR-Matrizen (parentale DNA-Stränge) innerhalb eines PCR-Ansatzes eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen eines DpnI-Verdau wurden dabei ebenfalls gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl PCR-Produkt mit 3 µl DpnI (10U/µl) bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert.

4.3.6.2 Ligation von DNA

Bei der durchgeführten Ligation, einer Zusammenführung zweier DNA-Fragmente durch eine Ligase, wurde der zuvor mit Restriktionsendonukleasen (NcoI und BamHI) geschnittene Vektor mit dem ebenfalls mit identischen

Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Fragment verbunden (ligiert). In dieser Arbeit wurden die erforderlichen Reaktionsbedingungen der Ligation gemäß den Herstellerangaben (Thermo Fischer) der Ligase angesetzt (siehe unten). Die Ligationsreaktionen besaßen ein Volumen von 20 µl und wurden entweder über Nacht bei 15 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Erstellung von Expressionsvektoren wurden nsp14/10-Insert-Fragmente im Überschuss in einem Verhältnis von 3:1 zur Vektor-DNA eingesetzt und ligiert. Anschließend konnte das Expressionskonstrukt in *E.-coli*-TOP10F'-Zellen transformiert werden (Abschnitt 4.1.1.2).

1x Ligation-Ansatz:	Gesamtvolumen 20 µl
H ₂ O (DNase/RNase-frei)	11 µl
5x Ligase Reaktionspuffer	4 µl
Insert/Vektor (3:1)	4 µl (3 µl Insert / 1 µl Vektor)
T4 DNA-Ligase	1 U

4.3.6.3 T4 Polynukleotidkinase (PNK), [³²P]-5'-Markierung von RNA.

Für die Herstellung 5'-radioaktiv markierter Oligonukleotide, die als Substrate zur Charakterisierung der Exoribonukleaseaktivität von nsp14 (ExoN) dienen, wurde zunächst mithilfe der Polynukleotidkinase (PNK) ein ssRNA-Substrat mit [³²P]-ATP 5'-terminal (mono-)phosphoryliert. Die Phosphorylierungsreaktion mit [³²P]-ATP wurde unter den vom PNK-Hersteller (NEB) empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Der Reaktionsansatz beinhaltetete 10 pmol/µl RNA-Oligonukleotide, 10 µCi/µl [³²P]-ATP (Hartmann) und 1 µl PNK (10U/µl, NEB). Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit dem vierfachen Reaktionsvolumen an 1 × STE-Puffer (siehe Tabelle) abgestoppt, und anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide mittels einer Sephadex-Säule (G25, GE-Healthcare) entfernt. Im Anschluss wurden Aliquots der 5'-markierten RNA-Oligonukleotide (≈ 1 µl des Reaktionsansatzes) mittels denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Abschnitt 4.2.1.2) und die erfolgreiche Markierung wurde mittels Phosphorimaging-Verfahren überprüft (Abschnitt 4.2.2.2).

PNK-Reaktionsansatz:	Gesamtvolumen 10 µl
10x Puffer A für Vorwärtsreaktion	1 µl
10 pmol/µl Oligonukleotid (RNA)	3 µl
10 µCi/µl [³² P]-ATP	3 µl
10 U/µl PNK-Enzym	1 µl
H ₂ O (RNase/DNase-frei)	2 µl

1x STE-Puffer:	
NaCl	150 mM
HEPES-KOH (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

4.3.6.4 RNA-RNA-Hybridisierung

Die Bildung doppelsträngiger RNA durch die Hybridisierung komplementärer oder teilweise komplementärer RNA-Einzelstränge diente in dieser Arbeit der Herstellung doppelsträngiger und partiell doppelsträngiger RNA-Konstrukte (ExoN-Substrat) zur Charakterisierung der ExoN-Aktivitäten. Im verwendeten Hybridisierungsgemisch lag das Verhältnis zwischen den 5'-radioaktiv markierten Oligonukleotiden und den nicht markierten Komplementärsträngen bei 1:1,3 (mol/mol). Für die Hybridisierung wurden daher 3 µl (30 pmol/µl) der nicht 5'-markierten Oligonukleotide in 47 µl STE-Puffer vorverdünnt, und davon wurden 13 µl mit 10 µl des PNK 5'-markierten Ansatzes (Abschnitt 4.3.6.3) zusammengeführt. Das Gemisch wurde anschließend bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Quantifizierung der Hybridisierungsreaktion wurde etwa 1 µl der jeweiligen Ansätze im Anschluss in einem denaturierenden 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abschnitt 4.2.1.2).

4.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die durchgeführten PCR-Reaktionen zur Vorbereitung der Klonierung von nsp14/ExoN- und nsp10/pp1aC-Konstrukten wurde die Phusion® DNA-Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers verwendet (Thermo Fischer). Für die Auswertung der amplifizierten PCR-Produkte und der Ermittlung der DNA-Konzentration wurde etwa 1 µl der PCR-Reaktion anschließend auf Agarosegelen aufgetrennt und mithilfe einer Ethidiumbromid-Färbung visualisiert (Abschnitt 4.2.1.1). Die Ansätze erfolgreich durchgeführter PCR-Reaktionen wurden anschließend einem DpnI-Verdau (Abschnitt 4.3.6.1) sowie einer Aufreinigung (Abschnitt 4.3.5.4) unterzogen.

PCR-Reaktionsansatz:

1 µg/µl Template-DNA (cDNA-ORF1a/1b)	2 µl
5x Phusion® HF-Puffer (high fidelity)	10 µl
4 mM dNTP-Mix	2 µl
10 pmol/µl Vorwärts (sense)-Primer	2,5 µl
10 pmol/µl Rückwärts (antisense)-Primer	2,5 µl
Phusion® DNA-Polymerase	0,5 µl
ddH ₂ O (RNase-/DNase-frei)	30,5 µl

Gesamtvolumen 50 µl

5 Ergebnisse

5.1 Heterologe Expression von coronaviralen und bafiniviralen ExoN-Proteinen

5.1.1 Klonierung von ExoN

5.1.1.1 WBV-ExoN

Für die für die vorrausgehende Amplifizierung der kodierenden Sequenz der WBV-ExoN wurde cDNA aus RNA WBV-infizierter EPC-Zellen verwendet. Informationen über die N- und C-terminalen Enden von WBV-ExoN basierten auf vorausgehenden Analysen der WBV-3CL^{pro}-Protease-Schnittstellen sowie auf Sequenzvergleichen der Bafinivirus-pp1ab-Proteine (Schütze *et al.*, 2006; Ulferts *et al.*, 2011). Somit wurden für WBV die nt 18.758–19.858 (pp1ab AS 5.952–6.318, GenBank NC_008516) mithilfe der PCR amplifiziert (sowie modifiziert), und das erhaltene Produkt wurde anschließend aufgereinigt (Abschnitt 4.3.3, 4.3.5.4). Die WBV-ExoN-kodierende Sequenz wurde durch Verwendung geeigneter PCR-Primer (Abschnitt 3.1.6.1) mit einem 3'-Hexa-Histidin-Tag (His₆) versehen und mithilfe der Restriktionsenzyme NcoI- und BamHI (Schnittstellen) in den Expressionsvektor pET-11d ligiert (TOPO-Klonierung, Abschnitt 4.3.3.1). Die Ligation erfolgte durch T4-DNA-Ligase (Abschnitt 4.3.6.2) und die ExoN-Konstrukte wurden anschließend in *E.-coli*-Top10F'-Zellen transformiert (Abschnitt 4.1.1.2). Die Inkubation der rekombinanten Top10F'-Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin. Nach der finalen DNA-Präparation (Abschnitt 4.3.5.1) wurde die erfolgreiche Insertion durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung (Sanger) verifiziert.

5.1.1.2 HCoV-229E-nsp14

Für die Klonierung der kodierenden Sequenz von HCoV-229E-nsp14 (HCoV-229E nt 17.069–18.622, pp1ab AS 5.593–6.110, GenBank NC_002645.1) in den pASK-IBA3 Vektor wurde ein restriktions- und ligationsfreies System verwendet (Abschnitt 4.3.3.2). Hierfür wurde die HCoV-229E-ExoN-Sequenz flankierend mit einem N-terminalen Ub-Tag und einem C-terminalen Hexahistidin-Tag modifiziert. Die Amplifikation und Ligation zur Rekonstitution des pASK-Ub-nsp14-Expressionskonstruktes erfolgte durch homologe Rekombination innerhalb der *E. coli*-Top10F'-Zellen statt. Die Inkubation der transformierten Top10F'-Zellen

erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin. Nach der finalen DNA-Präparation (Abschnitt 4.3.5.1) wurde die erfolgreiche Insertion ebenfalls durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung (Sanger) verifiziert

5.1.1.3 SARS-CoV-nsp14

Die SARS-CoV-nsp14-kodierende Sequenz (SARS-pp1ab nt 17970–19550, Frankfurt-1, AY_291315, GenBank NC_004718) wurde, wie bereits in der Arbeit von E. Minskaia beschrieben (Minskaia *et al.*, 2006), mit einem 3'-Hexahistidin-Tag in den Expressionsvektor pDEST14 kloniert. Die anschließende Aufreinigung, Transformation und Amplifikation wurden wie von Minskaia dokumentiert durchgeführt und anschließend durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft.

5.1.2 Klonierung der ExoN-Mutanten

5.1.2.1 ExoN-Motiv-I–III-Mutanten

Neben der vergleichenden Analyse der exoribonukleolytischen Aktivitäten und Substratspezifitäten von WBV-ExoN, SARS-CoV-ExoN und HCoV-229E-ExoN wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss verschiedener Alanin-Substitutionen konservierter Reste innerhalb der ExoN-Motive I–III untersucht. Dazu zählen fünf Mg²⁺-koordinierende Reste (DEDDh) der WBV-ExoN Motive I–III sowie fünf weitere Alanin-Substitutionen in den HCoV-229E-ExoN Motiven I–III (DEEDh) (Anhang 10.2, Alignment, M1–M5). Die Positionen der vermutlich am aktiven Zentrum von ExoN beteiligten Aminosäurereste wurden auf der Grundlage der für die SARS-CoV-ExoN gemachten Beobachtungen von Minskaia im Jahr 2006 (Minskaia *et al.*, 2006) sowie grundlegender Modelle für die Katalysemechanismen zellulärer Exonukleasen bestimmt (Beese & Steitz, 1991; Steitz & Steitz, 1993). In den Untersuchungen von Minskaia konnte bereits gezeigt werden, dass Substitutionen in den homologen SARS-CoV-ExoN-Motiven I–III die ExoN-Funktion beträchtlich beeinflussen und deren ribonukleolytische Aktivität nahezu vollständig zum Erliegen bringen.

Amplifikation, Aufreinigung und Verifizierung der hier substituierten Expressionskonstrukte wurden, wie bereits für die Herstellung der Expressionsvektoren beschrieben, mit identischen Methoden durchgeführt.

5.1.2.2 WBV-ExoN-Mutanten

Bei den in der WBV-ExoN-Sequenz (im pET-11d-WBV-ExoN-His6 Expressionsvektor) gegen Alanin substituierten konservierten DEDDh-Resten handelte es sich um die Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Reste D5980 und E5982 des Motivs I, D6082 des Motivs II sowie D6174 und den Histidinrest H6169 des Motivs III innerhalb der ExoN-Domäne (Anhang 10.2, Alignment, M1–M5). Die Substitutionen wurden durch PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese (Abschnitt 4.3.4) mithilfe der in Abschnitt 3.1.6.1 aufgeführten Primer integriert.

Alle Plasmidkonstrukte und deren substituierte ExoN-Sequenzen wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert.

5.1.2.3 HCoV-229E-ExoN-Mutanten

Bei den in die HCoV-229E ExoN Sequenz eingefügten Mutationen handelte es sich um die Positionen der charakteristischen DEEDh-Reste innerhalb der ExoN-Motive I–III (Snijder *et al.*, 2003). Folgende Substitutionen wurden dabei integriert: D5682A und E5684A des ExoN-Motivs I, E5783A des ExoN-Motivs II sowie D5864A und H5859A des ExoN-Motivs III (Anhang 10.2, Alignment, M1–M5).

5.1.2.4 SARS-CoV-ExoN-Mutanten

Mutationsstudien zu SARS-CoV-ExoN mit verschiedenen Substitutionen innerhalb der drei charakteristischen ExoN Motive (I–III) des aktiven Zentrums sowie der beiden Zinkbinderegionen (ZBD) wurden bereits in der Vergangenheit durchgeführt (Minskaia *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Bouvet *et al.*, 2012). Dabei zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen, dass konservierte Asp- und Glu-Reste der ExoN-Motive I–III von grundlegender Bedeutung für die Aktivität der DEDDh-Exonukleasen im Allgemeinen und der DEEDh-ExoN von CoV sind. Innerhalb dieser Arbeit wurde daher ausschließlich die inaktive SARS-CoV Mutante D6175A des ExoN-Motives III (Anhang 10.2, Alignment, M4) als Negativkontrolle für die ermittelte SARS ExoN-Aktivität im Vergleich mit WBV- und HCoV-229E-ExoN verwendet.

5.1.3 Expression und Aufreinigung der nsp14/ExoN-Proteine

Für die Proteinexpression im großen Maßstab (Abschnitt 4.1.1.3) wurden die klonierten und verifizierten Expressionskonstrukte in die entsprechenden *E. coli*-Zellen transformiert. Die pET-11d-WBV-ExoN-His₆- sowie pDest-SARS-CoV-nsp14-His₆-Vektoren wurden in *E. coli*-Rosetta(DE3)-pLysS-Zellen exprimiert, während pASK-HCoV-229E-Ub-nsp14-His₆ in *E. coli*-TB1 (+pCGI)-Zellen exprimiert wurde. Für die Verwendung entsprechender Expressionsstrategien wurde auf Grundlage der Erkenntnisse aus den Studien von Minskaia *et al.*, 2006 und Durzynska *et al.*, 2018 entschieden.

Das HCoV-229E-nsp14-Protein stellt hingegen eine Ausnahme dar, da es im Vorfeld keiner anderen Studie gelungen war, funktionales HCoV-229E-nsp14 zu exprimieren. Nach einer Reihe ebenfalls erfolgloser Klonierungs- und Expressionsstrategien entschieden wir uns dazu, HCoV-229E-nsp14 mit einem authentischen, natürlichen N-Terminus zu exprimieren. In der Vergangenheit konnte bereits am Beispiel der Poliovirus-RdRp gezeigt werden, dass deren Funktionalität durch die Präsenz artifizieller Reste (Met) an den terminalen Enden stark beeinflusst wird und ein natürlicher N-Terminus für die korrekte Faltung des rekombinanten Proteins erforderlich ist (Gohara *et al.*, 1999). Das HCoV-229E-nsp14-Protein wurde dabei als Ubiquitin-Fusionsprotein mit N-terminalem Ub-Tag und einem C-terminalen Hexahistidin-Tag innerhalb des pASK-IBA3-Vektors exprimiert. Zur Erhaltung des natürlichen N-Terminus (durch Abstand zum Met-Startkodon) wurde eine Ub-spezifische Protease (Ubp1) koexprimiert (in *E. coli* TB1 + pCGI). Während der Expression ist die Protease Ubp1 in der Lage, das Ub an der Schnittstelle LRGG↓XXX am N-Terminus des Zielproteins zu entfernen und somit einen natürlichen, nicht modifizierten nsp14-N-Terminus zu erzeugen. Der Vektor pASK-IBA3 und dessen Verwendung zur Herstellung von Ub-Fusionsproteinen wurde bereits ausführlich beschrieben (Gohara *et al.*, 1999; te Velthuis *et al.*, 2009) und ermöglichte innerhalb der vorliegenden Studie die Produktion von funktionalem HCoV-229E-nsp14 (ExoN) mit einem natürlichen N-Terminus (Abbildung 7).

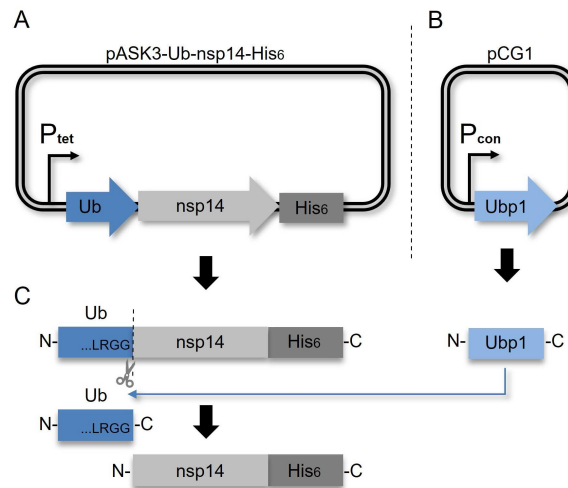


Abbildung 7: Schematische Darstellung der HCoV-229E-Ub-nsp14-His₆ Expression in *E. coli* TB1 (+pCGI). Abschnitt A zeigt vereinfacht das HCoV-229E-nsp14-Konstrukt mit eingefügter nsp14-Sequenz, Ubiquitin-Sequenz (Ub) und His₆-Sequenz, die in den pASK IBA3-Vektor kloniert und in *E. coli* TB1 (+pCGI) transformiert wurde. Abschnitt B zeigt den bereits in *E. coli* TB1 Zellen enthaltenen pCGI-Vektor, der die Ubiquitin-spezifische Protease Ubp1 kodiert. Abschnitt C illustriert die Expression des rekombinanten Ub-nsp14-His₆-Proteins unter der Kontrolle eines *tet*-Promotor und die gleichzeitige Expression der *Ubp1* unter einem *con*-Promotor. Noch während der Expression spaltet die *Ubp1* Protease die N-terminale Ub-Markierung vom rekombinanten nsp14-Protein ab und hinterlässt einen natürlichen N-Terminus.

Die für die Expression ausgewählten (transformierten) *E. coli*-Kulturen wurden auf LB-Agarplatten mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert (100 µg/ml Ampicillin für Rosetta, 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol für TB1) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 5-ml-LB-Starterkultur (+ AB) wurde anschließend mit einer Kolonie von der Transformationsplatte beimpft und nach 12 h bei 37°C (am darauffolgenden Tag) in 500 ml LB-Medium (+ AB) überführt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und dem anschließenden Herunterkühlen wurde die heterologe Proteinexpression innerhalb der 500-ml-Kultur induziert. Für WBV-ExoN-His₆ und SARS-CoV-nsp14-His₆ erfolgte dies durch die Zugabe von 1 mM IPTG und für HCoV-229E-nsp14-His₆ durch Zugabe von 0,2 mM Anhydrotetracyclin. Nach einer Inkubation von 17 h bei 17 °C (180 rpm) erfolgte die Lyse (Abschnitt 4.1.2) und Aufreinigung der rekombinanten ExoN-Proteine unter nativen Bedingungen mittels Talon-Affinitätschromatographie (Abschnitt 4.3.1). Die durch Talon-Affinität aufgereinigten und anschließend in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol dialysierten ExoN-His₆ Proteine wurden zur Bestätigung mittels Tris-Trizin-PAGE (Abschnitt 4.2.1.3) und nachfolgender Coomassie-Brillantblau-Färbung (Abschnitt 4.2.2.1) im Folgenden Abschnitt analysiert (Abbildung 8).

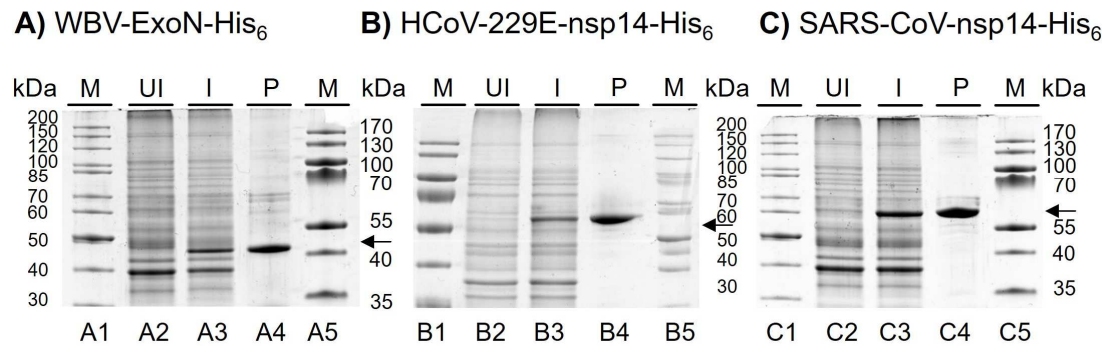


Abbildung 8: 12 % Tris-Trizin-PAGE-Gel der Expression und Aufreinigung von nsp14/ExoN-His₆. Die C-terminal Histidin-markierten nsp14-His₆-Proteine (ExoN) wurden in *E. coli* für 17 h bei 17 °C exprimiert, durch Talon-Affinitätschromatographie aufgereinigt und hier mit einem 12 % Tris-Trizin-PAGE-Gel aufgetrennt. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes (kDa) wurden zwei Marker (M, Spur 1 und 5) aufgetragen. Deren kDa ist jeweils zur linken und rechten Seite angegeben. In Spur 2 (UI) wurde das Lysat der nichtinduzierten Bakterienkultur als Kontrolle aufgetragen, in Spur 3 (I) das Bakterienlysat der induzierten Expressionsfraktion und in Spur 4 (P) die aufgereinigte, mit 200 mM Imidazol eluierte Proteinfraction. Die Position der ExoN-Proteine ist jeweils mit einem Pfeil indiziert.

In Abbildung 8 wurde auf Spur 2 (UI) das Protein-Lysat einer nicht induzierten Kultur geladen und in Spur 3 (I) das Lysat der induzierten Expression. In Spur 3 (I) ist im Gegensatz zur Spur 2 (UI) bei allen Expressionen eine zusätzliche, prominente Proteinbande zu erkennen (Höhe durch Pfeil markiert). Die Laufhöhen dieser Banden entsprechen dabei gut den für diese Proteine errechneten Molekulargewichten. Für die nsp14-Homologe liegt dieses für (A) WBV bei 41,1 kDa, für (B) HCoV-229E bei 58,7 kDa und für (C) SARS-CoV bei 61 kDa. Die Spur 4 (P) zeigt die Proteinsignale nach der Aufreinigung durch Talon-Affinitätschromatographie. Zur Verbesserung der Reinheit wurden die rekombinanten nsp14/ExoN-Proteine in einem zweiten Schritt durch Größenausschlusschromatographie (SEC) über Gelfiltrationssäulen (SuperdexTM 200 Increase 10/300 GL von Amersham) aufgereinigt (Abschnitt 4.3.1.2). Die Elutionsprofile sowie die im Anschluss durch Tris-Trizin-PAGE (Abschnitt 4.2.1.3) aufgetrennten Fraktionen des Größenausschlusses sind in Abbildung 9 dargestellt.

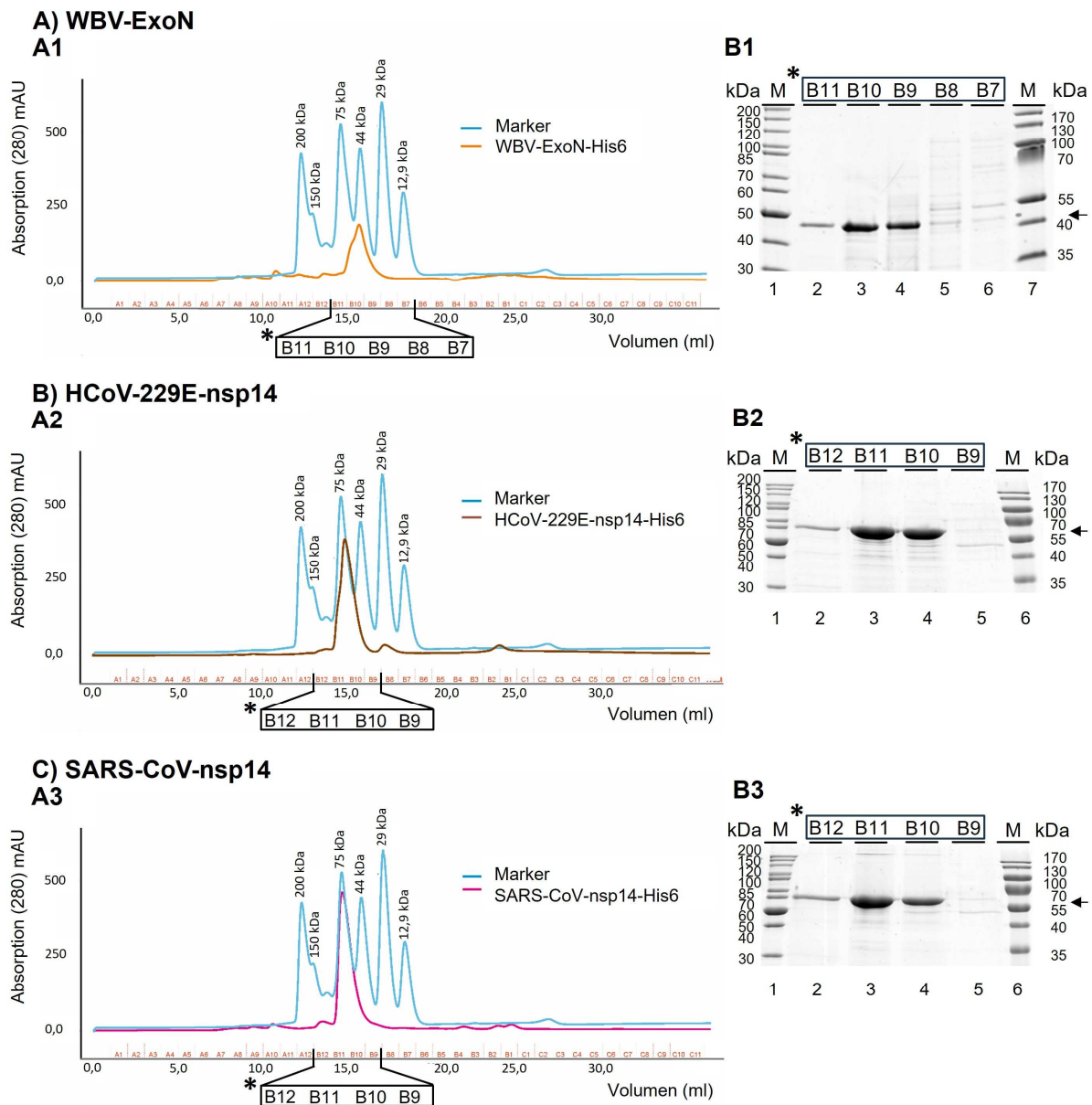


Abbildung 9: Größenausschlußchromatographie und 12 % Tris-Trizine-PAGE der rekombinanten nsp14/ExoN-His₆-Proteine. Die durch Talon-Affinitätschromatographie aufgereinigten und in 25 mM HEPES, 300 mM KCl (pH 7,4), 5 % (v/v) Glycerol und 10 mM Beta-Mercaptoethanol dialysierten ExoN-His₆-Proteine (~2 mg/ml) wurden durch Größenausschluß-Chromatographie (Superdex™ 200 Increase 10/300 GL) aufgetrennt und einzelne Eluatfraktionen mittels Tris-Trizine-PAGE analysiert. Gezeigt werden in Abbildung 9 die analytischen Elutionsprofile (A1–A3) der Absorption bei 280 nm (Y-Achse) pro Volumenfraktion (X-Achse), und in B1–B3 wurden 10 µl der entsprechenden Fraktionen (Spur 2–5) zur Analyse auf eine 12 % Tris-Trizine-PAGE geladen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden zwei flankierende Marker (M, Spuren 1 sowie 6/7) aufgetragen. Die korrespondierenden Molekulargewichte (kDa) der Marker sind jeweils zur linken und rechten Seite angegeben. Die Positionen der nsp14-Proteine mit errechneten Molekulargewichten von (A) 41,1 kDa für WBV, (B) 58,7 kDa für HCoV229E und (C) 61 kDa für SARS-CoV sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Im Elutionsprofil von Abbildung 9A (Bild A1) ist ein deutlicher Gipfel bei einer Absorption von 280 nm (orangefarbener Graph) auf Höhe des 44-kDa-Markerproteins (blauer Graph) zu erkennen. WBV-ExoN-His₆ eluiert bei einem

Volumen von etwa 16 ml (Abbildung 9A, Bild A1, X-Achse) und bestätigt zusammen mit dem Vergleich des Markerproteins die errechnete Molekülgröße von 41,1 kDa. Die aufgetragenen Fraktionen 7–11 der Elektrophorese im Tris-Trizin-PAGE-Gel in Abbildung 9B1 migrieren auf Höhe von etwa 41–42 kDa des prestained-Markers (Spur 7) und zwischen 40–50 kDa des unstained-Markers (Spur 1). Dies bestätigt erneut die erfolgreiche Überexpression des 41 kDa großen WBV-nsp14-Homologs in den induzierten Zellen.

Abbildung 9B (Bild A2) zeigt, dass HCoV-229E-ExoN-His₆ (brauner Graph) nach etwa 15 ml zwischen den 75-kDa und 44-kDa-Markerproteinen (blauer Graph) eluiert. Das Elutionsprofil ist somit kompatibel mit dem errechneten Molekulargewicht von 58,7 kDa für dieses Protein. Mithilfe der Tris-Trizin-PAGE (Abbildung 9B, Bild B2) wurden jeweils 10 µl der Fraktionen B9–B12 aufgetrennt, was das theoretische Molekulargewicht bestätigt. Die Peakfraktionen der Größenausschlusschromatographie enthalten demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit das HCoV-229E-ExoN-His₆-Protein (Spur B10–B12, Pfeil).

Abbildung 9C (Bild A3) zeigt das Elutionsprofil für SARS-CoV-nsp14-His₆ (rosa Graph). Der Gipfel liegt leicht unterhalb (hinter) dem des 75-kDa-Markerproteins (blauer Graph). Das beobachtete Molekulargewicht liegt somit im Bereich des errechneten Molekulargewichts von 61 kDa. Abbildung 9C (Bild B3) bestätigt, dass die elektrophoretisch aufgetrennten Peakfraktionen B9–B12 mit hoher Wahrscheinlichkeit das rekombinante Protein enthalten. Das Laufverhalten, während der Tris-Trizin-PAGE (Pfeil) zeigt dabei eine gute Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht.

Bei keinem der aufgereinigten ExoNs ergaben sich aus dem Elutionsprofil Hinweise auf die Bildung von Proteinkomplexen, wie etwa Dimeren.

Für die anschließenden Aktivitätsanalysen wurde im Fall von WBV-ExoN die Fraktion B10 ausgewählt. Für HCoV-229E und für SARS-CoV wurden jeweils die Fraktionen B11 verwendet. Die in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol umgepufferten Proteinfractionen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Die substituierten ExoN-Varianten wurden, wie zuvor für den ExoN-WT beschrieben, unter identischen Bedingungen exprimiert und mithilfe der

Talon-Affinitätschromatographie sowie der Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Nach der Affinitätschromatographie wurden jeweils etwa 1 µg der dialysierten Proteine auf ein 12 % Tris-Trizin-PAGE-Gel geladen und mittels Coomassie-Brillantblau-Färbung hinsichtlich ihrer Reinheit und ihres Molekulargewichts untersucht (Abbildung 10).

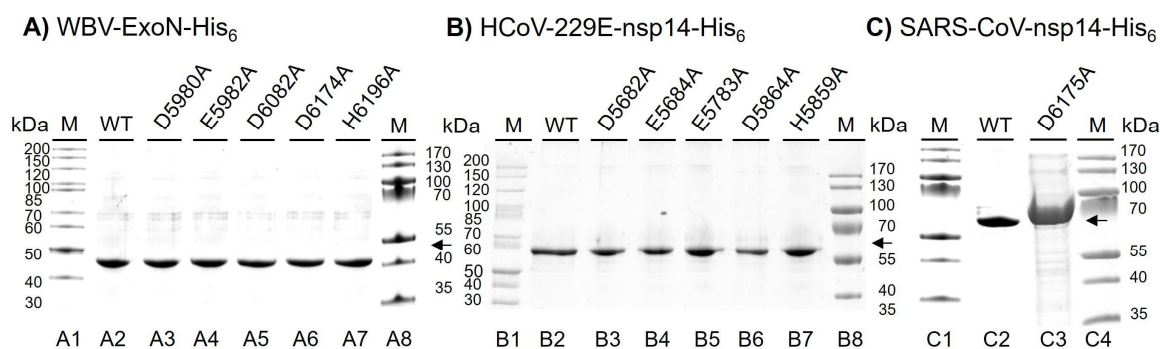


Abbildung 10: 12 % Tris-Trizin-PAGE-Gel der aufgereinigten nsp14 (ExoN)-Varianten. Die mit Talon-Affinitätschromatographie sowie durch Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigten und in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol dialysierten (A) WBV-ExoN-Mutanten, (B) HCoV-229E-ExoN und (C) SARS-CoV-ExoN, wurden hier auf einem 12 % Tris-Trizin-PAGE-Gel analysiert. Die Position der ExoN/nsp14-Proteine mit ihren erwarteten Größen von 41,1 kDa für WBV (A2–A7), 58,7 kDa für HCoV-229E (B2–B7) und 61 kDa SARS-CoV (C1/C4) sind jeweils durch einen Pfeil (rechts) gekennzeichnet. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurden zwei Marker aufgetragen (Spur A1/B1/C1 sowie A8/B8/C4), deren Molekulargewichte (kDa) jeweils zu linken und rechten Seite angegeben sind.

In Abbildung 10 (A–C) sind auf den Spuren 1 und 8 (für SARS-CoV in den Spuren 1 und 4) zwei molekulare Marker geladen, deren Molekulargewichte jeweils auf der linken und rechten Seite angegeben sind. Zum Abgleich der Laufhöhen wurden in den Spuren A2–C2 jeweils 1 µg des aufgereinigten nsp14-His₆ Wildtyp und in den Spuren 3–7 (SARS-CoV Spur 3) jeweils 1 µg der aufgereinigten nsp14-ExoN-Mutanten geladen. Die Laufhöhen der durch einen Pfeil gekennzeichneten Mutanten- und WT-Proteine entsprechen in guter Übereinstimmung den errechneten Molekulargewichten und bestätigen die erfolgreiche Überexpression der ExoN-WT- und mutierten Proteine. Aus Platzgründen wurden die Elutionsprofile der Größenausschluss-chromatographie einzelner Mutanten nicht aufgeführt, sind aber dennoch durchgeführt worden. Neben der Identitätsbestätigung rekombinanter Proteine über ihr Molekulargewicht wurden alle aufgereinigten Mutanten zusätzlich mittels Hexahistidin-spezifischer Antikörper in Westernblot-Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt).

5.1.4 Herstellung rekombinanter coronaviraler nsp10-Proteine und eines möglichen orthologen Proteins von WBV (pp1aC)

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war die Bestimmung der Bedeutung des ExoN-Kofaktor nsp10 für die ermittelte *in vitro* ExoN-Aktivität. Erste Studien mit coronaviralen (SARS-CoV) und bafiniviralen (WBV) ExoN-Proteinen hatten ergeben, dass diese Proteine keine weiteren Kofaktoren für ihre ribonukleolytische Aktivität benötigen (Minskaia *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Durzynska *et al.*, 2018). Röntgenstrukturanalysen hingegen zeigten, dass SARS-CoV-nsp10 und nsp14 einen stabilen Komplex mit einer großen Interaktionsfläche bilden (Ferron *et al.*, 2017). Weitere biochemische Analysen der SARS-CoV-ExoN bestätigten ebenfalls, dass nsp10 die ribonukleolytische Aktivität von nsp14 stimulieren kann (Bouvet *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob auch andere nidovirale ExoN-Proteine durch nsp10 stimuliert werden können und ob das C-terminale pp1a-Spaltprodukt von WBV eine vergleichbare stimulierende Wirkung auf die nukleolytische ExoN-Aktivität besitzt.

5.1.4.1 Klonierung der Sequenzen des C-terminalen WBV-pp1a-Spaltprodukts (pp1aC) sowie der Proteine HCoV-229E-nsp10 und SARS-CoV-nsp10

Die Klonierung der kodierenden Sequenz des möglichen Coronavirus-nsp10-Orthologs (pp1aC) von WBV (nt 13.358–13.623; WBV-pp1ab AS 4453–4541, GenBank NC_008516) wurde im selben System (TOPO-Klonierung), wie bereits für den WBV-ExoN-WT beschrieben, durchgeführt (Abschnitt 5.1.1.1).

HCoV-229E-nsp10 wurde ebenfalls, wie zuvor für das HCoV-229E-ExoN beschrieben, mithilfe einer restriktions- und ligationsfreien, PCR-basierten Methode initial als Fusionsprotein mit Ubiquitin in pASK-IBA3 kloniert (Abschnitt 5.1.1.2). Im Fall der nsp10-kodierenden Sequenz im HCoV-229E-Genom des ORF1a (Genbank NC_002645), handelt es sich um die Nukleotidpositionen 12.092–12.496 (HCoV-229E-pp1ab-AS 3934–4068).

Die SARS-CoV-nsp10-kodierende Sequenz (nt 12.955–13.371, Genbank NC_004718) wurde mithilfe der restriktions- und ligationsfreien Methode aus Abschnitt 4.3.3.2 in den Expressionsvektor pET-11d kloniert.

5.1.4.2 Expression und Aufreinigung von nsp10 (pp1aC)

Für die Expression der rekombinanten nsp10-Proteine wurden die entsprechenden Expressionsvektoren zuvor in *E.-coli*-Zellen transformiert, auf LB-Agarplatten mit den notwendigen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Produktion von HCoV-229E-nsp10-His₆ wurden *E.-coli*-TB1 (+ pCGI)-Zellen (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) transformiert, während für WBV-pp1aC-His₆ und SARS-CoV-nsp10-His₆ *E.-coli*-Rosetta(DE3)-pLysS-Zellen (100 µg/ml Ampicillin) verwendet wurden.

Für die Proteinexpression im großen Maßstab wurden die mit einer Agar-Vorkultur beimpften 500-ml-Flüssigkulturen (LB-Medium + AB) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C unter ständiger Bewegung (180 U/Min) inkubiert. Anschließend wurden die beimpften Flüssigkulturen auf Eis heruntergekühlt, die Expression induziert und für 17 h bei 17°C erneut inkubiert. Für die Induktion der Expression von HCoV-229E-nsp10-His₆ wurden 0,2 mM Anhydrotetracyclin verwendet, während die Expression von WBV-pp1aC-His₆ und SARS-CoV-nsp10-His₆ durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) erfolgte.

Nach der Isolierung (Lyse, Abschnitt 4.1.2) erfolgte die Aufreinigung der drei rekombinanten nsp10-Homologe (pp1aC-Ortholog für WBV) ebenfalls durch Talon-Affinitätschromatographie, wie bereits in Abschnitt 5.1.1 für die ExoN-Aufreinigung (nsp14) beschrieben. Die aufgereinigten und anschließend in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol dialysierten Proteine (Abschnitt 4.3.1.3) wurden mittels Tris-Trizin-PAGE (Abschnitt 4.2.1.3) aufgetrennt und der Erfolg von Expression und Aufreinigung durch Coomassie-Brillantblau-Färbung (Abschnitt 4.2.2.1) überprüft (Abbildung 11).

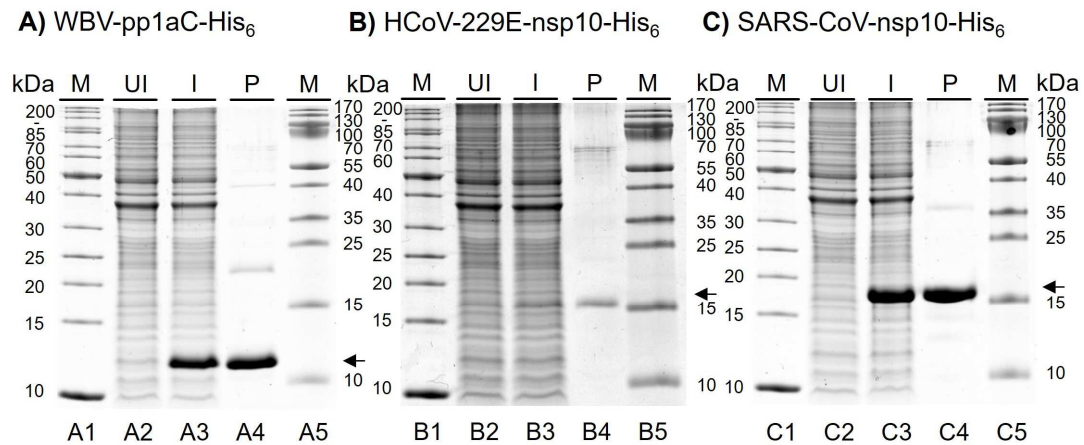


Abbildung 11: 15 % Tris-Trizin-PAGE-Gel der Aufreinigung und Expression von Coronavirus-nsp10-His₆ und WBV-pp1aC-His₆. Die jeweiligen Expressionskonstrukte wurden in *E. coli* Rosetta (TB1 für HCoV-229E-nsp10) transformiert und die nsp10-Proteine für 17 h bei 17 °C exprimiert. Nach der Lyse und Aufreinigung durch Talon-Affinitätschromatographie wurden die Proteine hier in einem 15 % Tris-Trizin-PAGE-Gel analysiert. Markerproteine (M) wurden in den Spuren 1 und 5 aufgetragen. Spur 2 (UI) zeigt das Bakterienlysat der nicht induzierten Kontrollfraktion und Spur 3 (I) das Bakterienlysat der induzierten Expressionsfraktion. In Spur 4 (P) wurden die mit 200 mM Imidazol eluierten und dialysierten Proteine aufgetragen. Die Positionen der nsp10-His₆-Proteine sowie des WBV-pp1aC-His₆-Orthologs sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Spuren 1 und 5 (A–C) der Abbildung 11 zeigen die unterschiedlichen Markerproteine zur Einschätzung des Molekulargewichtes. In Spur 2 (UI) wurde das *E. coli*-Lysat der nicht induzierten Testkultur aufgetragen, in Spur 3 (I) das Lysat der induzierten Überexpression der nsp10-Proteine. In Spur 3 (I) ist im Gegensatz zur Spur 2 (UI) eine durch einen Pfeil markierte, prominente Proteinbande bei knapp über (A) 10 kDa für WBV sowie bei etwa (B) 15 kDa für HCoV-229E und (C) SARS-CoV zu erkennen. Die Laufhöhen der Proteinbanden in Spur 3 (I) entsprechen somit den theoretisch erwarteten Größen von WBV-pp1aC-His₆ (A; 10,7 kDa), HCoV-229E-nsp10-His₆ (B; 15,2 kDa) und SARS-CoV-nsp10-His₆ (C; 15,6 kDa).

In den Spuren 4 (P) der Abbildung 11 wurden die IMAC-gereinigten nsp10-Proteine aufgetragen. In allen drei Fällen (A–C) stimmte die elektrophoretische Mobilität der überexprimierten Proteine aus den Spuren 3 mit dem Laufverhalten der gereinigten Proteine aus den Spuren 4 überein. Die Beobachtungen deuten somit auf eine erfolgreiche Überexpression und Aufreinigung der rekombinanten nsp10 Proteine hin. Neben der visuellen Bestätigung durch die Proteingrößen wurden die rekombinanten nsp10-Proteine sowie entnommenen Fraktionen der

Aufreinigung zusätzlich mittels His₆-spezifischer Antikörper in Westernblot-Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Auch die nsp10-Proteine wurden in einem zweiten Schritt durch Größenausschlusschromatographie über Gelfiltrationssäulen (Superdex™ 75 Increase 10/300 GL) aufgereinigt (Abschnitt 4.3.1.2). Die Elutionsprofile der gereinigten Proteine und die Tris-Trizin-PAGE-Analyse (Abschnitt 4.2.1.3) einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie sind in der folgenden Abbildung 12 dargestellt.

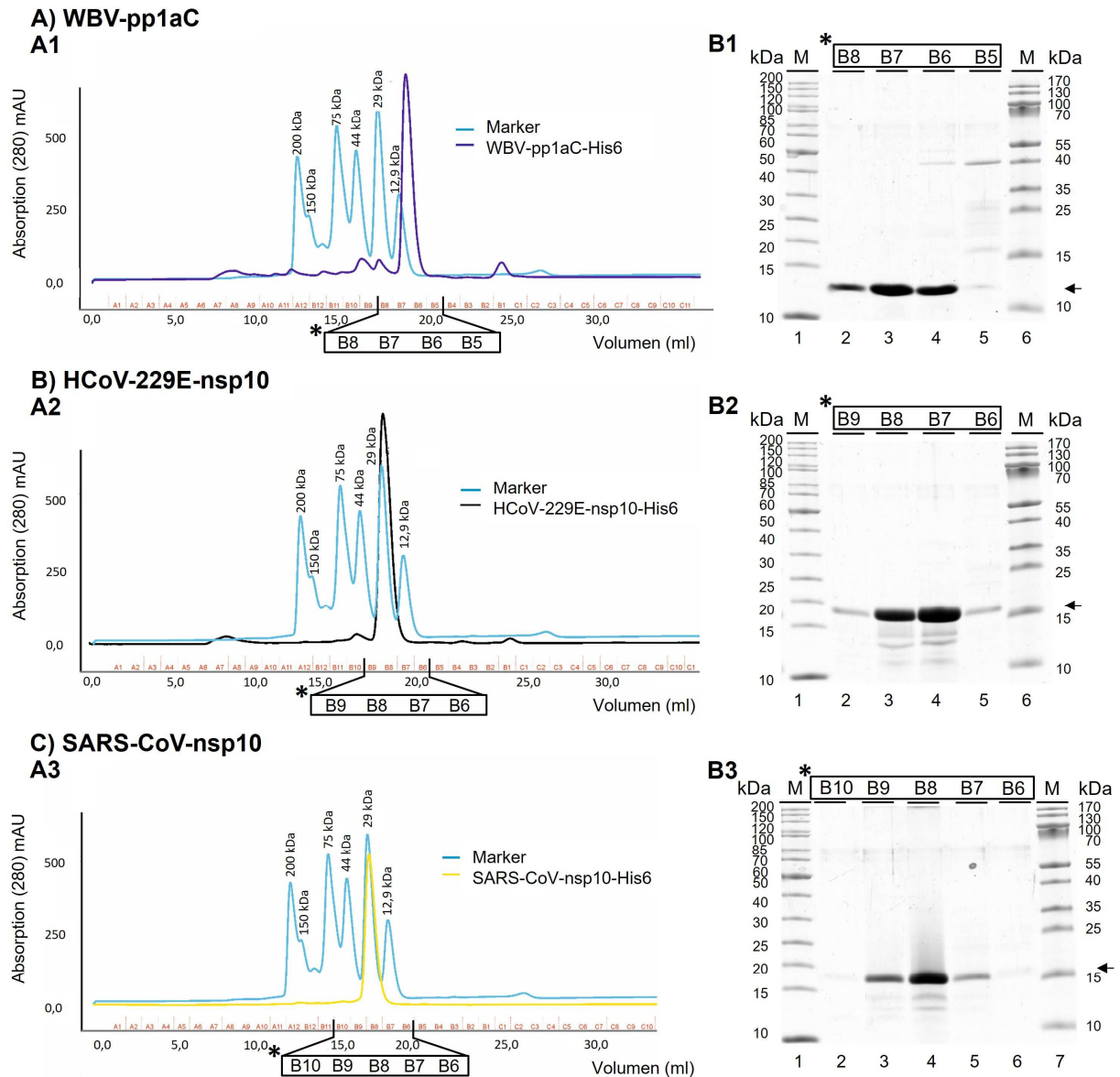


Abbildung 12: Größenausschlußchromatographie und 15 % Tris-Trizin-PAGE von WBV-pp1aC-His₆ sowie HCoV-229E- und SARS-CoV-nsp10-His₆. Die aufgereinigten und für die Größenausschlusschromatographie in 25 mM HEPES; 300 mM KCl (pH 7,4); 5 % (v/v) Glycerol und 10 mM Beta-Mercaptoethanol dialysierten nsp10-Proteine wurden mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex™ 75 Increase 10/300 GL) aufgetrennt. A1–A3, Chromatogramme der dargestellten Proteine: der blaue Graph zeigt das Elutionsverhalten der Markerproteine auf der verwendeten Säule. (A) WBV-pp1aC (lila Graph); (B) HCoV-229E-nsp10 (schwarzer Graph); (C) SARS-CoV-nsp10 (gelber Graph). B1–B3, 15 % Tris-Trizin-PAGE-Analyse ausgewählter Eluatfraktionen (wie angegeben). M, Markerproteine mit den außen angegebenen Molekulargewichten. Die Positionen der eluierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet und stimmen gut mit den berechneten Molekulargewichten von 10,7 kDa für WBV-pp1aC-His₆, 15,2 kDa für HCoV-229E-nsp10-His₆ und 15,6 kDa für SARS-CoV-nsp10-His₆ überein. Für die Aktivitätsanalyse ausgewählte Fraktionen wurden in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol umgepuffert.

Wie in Abbildung 12A (A1) gezeigt, eluiert das WBV-pp1aC-His₆-Protein bei etwa 19 ml (Absorptionsgipfel des lila Graphen). Im Vergleich dazu wurde für das 12.9-kDa-Markerprotein ein geringfügig kleineres Elutionsvolumen für die

verwendeten Säule bestimmt (blauer Graph). Das Elutionsverhalten des rekombinanten Proteins stimmt somit gut mit dem errechneten Molekulargewicht für WBV-pp1aC-His₆ überein. Die Banden der aufgetragenen Fraktionen B5–B8 in Abbildung 12A (B1) migrieren dabei etwa auf der Höhe des 10-kDa-Signals des prestained-Markers in Spur 6 und zwischen 10–15 kDa des unstained-Markers in Spur 1. Die zusätzlich durch einen Pfeil markierte Migrationshöhe der Signale bestätigt somit ebenfalls das theoretische Molekulargewicht von WBV-pp1aC-His₆ von 10,7 kDa. Zur weiteren Verwendung wurde Fraktion B6 und B7 zusammengefasst und in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol dialysiert.

Im Elutionsprofil der Abbildung 12 (A2) für HCoV-229E-nsp10-His₆ (schwarzer Graph) ist ein A₂₈₀-Gipfel zwischen den 29-kDa- und 12,9-kDa-Markerproteinen (blauer Graph) zu erkennen. HCoV-229E-nsp10-His₆ eluiert dabei bei etwa 17 ml. Das Elutionsvolumen liegt damit nur geringfügig höher als das des 29-kDa-Markerproteins in diesem Chromatographieverfahren, was auf eine mögliche Dimerisation des gereinigten Proteins hindeuten könnte. Andere Studien bestätigen ebenfalls eine Tendenz von nsp10 zur Bildung von Dimeren in Lösung (Joseph *et al.*, 2006). Die errechnete Molekülgröße von 15,2 kDa für dieses Protein stimmt hingegen gut mit dem Laufverhalten in der Tris-Trizin-PAGE-Analyse (Abbildung 12B, B2) überein. Die Hauptbande der Fraktionen B8 und B7 migrieren geringfügig oberhalb der 15-kDa-Proteine des verwendeten Markers, woraus sich eine gute Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht für das HCoV-229E-nsp10-His₆-Protein von 15,2 kDa ergibt. Zur weiteren Verwendung wurden die Fraktionen B7 und B8 ebenfalls in 50 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % Triton X-100 und 5 mM Beta-Mercaptoethanol dialysiert.

Auch das SARS-CoV-nsp10-His₆-Protein wurde durch Größenausschlusschromatographie (Superdex™ 75 Increase 10/300 GL) aufgereinigt. Im Elutionsprofil (Abbildung 12C, A3) zeigt sich dabei ein Absorptionsgipfel (gelber Graph) bei etwa 17 ml. Dieser ist nahezu identisch mit dem Elutionsverhalten des auf der Säule verwendeten 29-kDa-Markerproteins (blauer Graph), was – wie zuvor für das HCoV-nsp14-His₆-Protein beschrieben – auf eine mögliche Dimerisation des gereinigten Proteins hinweist. Im Tris-Trizin-PAGE-Gel

(Abbildung 12C, B3) migrieren die prominenten, durch einen Pfeil markierten Proteinsignale der aufgetragenen Fraktionen B6–B10 hingegen auf Höhe von etwa 15 kDa des prestained-Markers in Spur 7 sowie zwischen 15–20 kDa des unstained-Markers in Spur 1. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem für das SARS-CoV-nsp10-His₆-Protein errechneten Molekulargewicht von 15,6 kDa.

Alle verwendeten Proteine entsprachen dem zuvor ermittelten theoretischen Molekulargewicht und konnten nach dem Größenausschluss in ausreichender Menge in löslicher Form sowie in ausreichender Reinheit für die geplanten biochemischen Studien gewonnen werden.

5.2 Charakterisierung der Substratanforderungen von ExoN

Die Charakterisierung der ExoN-assoziierten, substratspezifischen RNA-Hydrolyseaktivität erfolgte durch eine Inkubation der rekombinanten nsp14-Homologe mit einer Auswahl an ss-/ds- und partiellen dsRNA-Substraten mit einem oder mehreren ungepaarten Nukleotiden.

5.2.1 Funktionalität der ExoN-Aktivität

Zu Beginn der folgenden Charakterisierung verschiedener ExoN-Aktivitäten wurden die gegebenen Reaktionsbedingungen und die allgemeine Funktionalität von ExoN überprüft. Hierzu wurde die ribonukleolytische Aktivität unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen (20–100 nM) aufgereinigter ExoN-Proteine und eines dsRNA-Substrats mit einer singulären, 3'-terminalen Fehlpaarung (R5) ermittelt (Abbildung 13). Das verwendete dsRNA-Substrat R5 wurde durch Hybridisierung zweier 22-nt-Oligonukleotide hergestellt (Abschnitt 4.3.6.4). SARS-CoV-ExoN deutete bereits in seiner ersten Charakterisierung auf eine Präferenz für identische RNA-Substrate hin (Minskaia *et al.*, 2006). Der Primärstrang des dsRNA-Substrats R5 wurde, wie in Abschnitt 4.3.6.3 beschrieben, durch T4-Polynukleotidkinase (PNK) mit 5'-[³²P]-ATP markiert. Der komplementäre Gegenstrang wurde hingegen nicht radioaktiv markiert, war jedoch durch ein 3'-Biotin vor einer Degradation durch ExoN geschützt. Für die Auswertung der ExoN-Aktivität wurden die in FU-Auftragspuffer resuspendierten Reaktionsprodukte auf einem 12 % PAA/7 M Urea Gel (4.2.1.2) aufgetrennt (Abbildung 13).

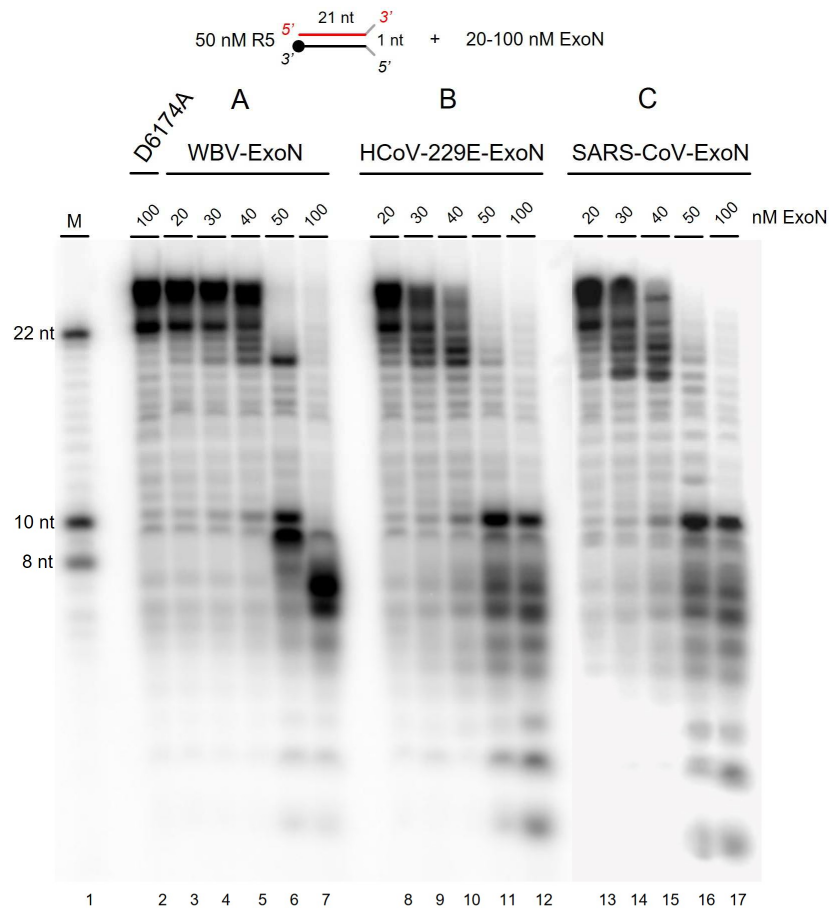


Abbildung 13: Ribonukleolytische Aktivitäten unterschiedlicher ExoN-Konzentrationen bei Verwendung eines dsRNA-Substrats mit terminaler Fehlpaarung. Für den Vergleich der Aktivität verschiedener ExoN-Mengen wurde 50 nM RNA R5 und 20-100 nM ExoN in die Reaktionen eingesetzt. Bei R5 handelt es sich um ein 22-nt-langes dsRNA-Oligo mit einem 3'-nichtgepaarten Adenin-nt. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 20 μ l und bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0); 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden auf Eis durch die Zugabe von ExoN gestartet und anschließend für 60 min bei 37 °C inkubiert. Beendet wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,3 M NaOAc und 200 μ l eiskaltem Ethanol. Nach der anschließenden Präzipitation wurden die Reaktionsprodukte in 8 μ l FU-Auftragspuffer aufgenommen, auf ein 12 % PAA/7 M Urea Gel überführt und bei 150V für 2 h aufgetrennt. 5'-[³²P]-markierte Reaktionsprodukte wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Für die Analyse der Produktgrößen wurden in Spur 1 Größenstandards von 22 nt, 10 nt und 8 nt Länge aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde in Spur 2 ein Reaktionsansatz mit der unter identischen Reaktionsbedingungen eingesetzten WBV-ExoN-Motiv-III-Mutante (D6174A) analysiert (100 nM). (A) In den Spuren 3–7, die Verdünnungsstufen von 20-100 nM WBV-ExoN; (B) in den Spuren 8–12, die 20-100-nM-Verdünnungsstufen von HCoV-229E-ExoN und (C) in den Spuren 13–17, die 20-100-nM-Verdünnungen von SARS-CoV-ExoN.

Abbildung 13 zeigt drei Teilbereiche eines Gels mit Nukleaseaktivitäten der rekombinanten ExoN-Proteine (WBV, HCoV-229E, SARS-CoV) sowie deren Verdünnungen nach 60 min Inkubation bei 37 °C. Als Substrat diente das partielle dsRNA-Substrat R5. Zur Ermittlung der Laufhöhen verschiedener Reaktionsprodukte wurden in Spur 1 die 5'-[³²P]-markierten Größenstandards (8 nt, 10 nt, 22 nt; ssRNA) geladen. Um zu gewährleisten, dass die hier gezeigte

Degradierung der RNA-Substrate ausschließlich auf die Aktivität der nidoviralen ExoN-Proteine zurückzuführen ist, wurde als Negativkontrolle in Spur 2 ein Reaktionsansatz mit 100 nM einer unter identischen Bedingungen aufgereinigten WBV-ExoN-Motiv-III-Mutante (D6174A) geladen (Durzynska *et al.*, 2018).

Im ersten Block (A, Spuren 3–7) wurden die Verdünnungen von WBV-ExoN aufgetragen (20–100 nM) und zeigen eine stufenartig zunehmende Degradation des partiellen dsRNA-Substrats R5. Dabei weist die höchste WBV-ExoN-Konzentration (Spur 7, 100 nM) die effektivste Spaltung des RNA-Substrats in kleinere Reaktionsprodukte auf.

Im zweiten Block (B, Spuren 8–12) wurden die Verdünnungen von HCoV-229E-ExoN aufgetragen, deren nukleolytische Aktivität ebenfalls zu einem stufenartigen Erscheinungsbild der Reaktionsprodukte führte. In diesem Fall ist jedoch bereits bei der niedrigsten Konzentration von HCoV-229E-ExoN (20 nM, Spur 8) eine leichte Degradation des RNA-Substrats R5 zu erkennen (verglichen zu WBV). Auch hier zeigt die höchste Konzentration von HCoV-229E-ExoN (100 nM, Spur 12) die höchste Spaltungseffizienz.

Im dritten Block (C, Spuren 13-17) der aufgetragenen Reaktionsansätze mit unterschiedlichen SARS-CoV-ExoN-Konzentrationen ist die nukleolytische Aktivität vergleichbar mit der von HCoV-229E-ExoN. Auch hier beginnt die stufenartige Bildung kleinerer Reaktionsprodukte bereits bei 20 nM ExoN (Spur 13), der niedrigsten Konzentration von SARS-CoV-ExoN. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten ExoN-Domänen enzymatisch aktiv sind und ihre Aktivität mit steigender Proteinkonzentrationen zunimmt.

5.2.2 Nachweis der 3'–5'-gerichteten ExoN-Aktivität auf ssRNA

Die bislang wenigen Aussagen zur Substratpräferenz nidoviraler ExoN-Domänen wurden hauptsächlich für SARS-CoV-nsp14 getroffen. Dazu gehört die Inaktivität von SARS-CoV-ExoN gegenüber ssDNA- und homopolymeren ssRNA-Substraten. Heteropolymere ssRNA-Substrate mit einem frei zugänglichen 3'-Ende hingegen wurden ab einer Gesamtlänge von >8 nt effektiv hydrolysiert. Bei einer ExoN-vermittelten Spaltung längerer heteropolymerer ssRNA-Substrate entstehen Spaltungsprodukte mit einer Gesamtlänge von etwa 8-12 nt (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012). Auch die gerichtete 3'–5'-Polarität der in SARS-CoV-nsp14 lokalisierten ExoN-Aktivität konnte in vorausgegangenen Studien

direkt nachgewiesen werden. In allen Experimenten der beiden genannten Studien zeigte sich eine Degradation der eingesetzten ss- und dsRNA-Substrate sowie eine zunehmende Akkumulation kleinerer Endprodukte.

Mit Hilfe des folgenden Experiments (Abbildung 14) sollte die zuvor für SARS-CoV-ExoN gemachte Beobachtung, die für eine 3'–5'-gerichtete ribonukleolytische Aktivität auf einzelsträngigen RNA-Substraten spricht, auch im Fall der hier verglichenen WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoNs untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden. Bei den hier verwendeten Substraten handelte es sich um die 22-nt-langen ssRNA-Oligonukleotide R1 und R2 (Abschnitt 3.1.6.2). Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Substraten besteht darin, dass R2 durch eine Blockierung des 3'-terminalen Adenin-Nukleotids mit Biotin an der C3-Position der Ribose modifiziert wurde. Frühere Experimente im Labor hatten gezeigt, dass eine 3'-Biotinylierung die 3'–5'-Exonukleaseaktivität der SARS-CoV-ExoN blockiert. Bei dieser Modifizierung des RNA 3'-Endes handelt es sich um einen Austausch der natürlichen OH-Gruppe an der C3-Position einer 3'-endständigen Ribose gegen ein linkergebundenes Biotin (C₁₀ H₁₆ N₂ O₃ S). Biotin-modifizierte 3'-Enden einzelner RNA-Oligonukleotide deuteten bereits in der Vergangenheit darauf hin, dass frei zugängliche 3'-Enden (C3-OH-Gruppe) eine Voraussetzung für die Aktivität von SARS-CoV-ExoN sind (Durzynska *et al.*, 2018). R1 hingegen besitzt ein frei zugängliches 3'-Ende.

Um sicherzustellen, dass die hier gezeigte ribonukleolytische Aktivität ausschließlich auf die rekombinanten ExoN-Proteine zurückzuführen ist, wurde bei allen Experimenten durchgehend eine koexprimierte, inaktive ExoN-Mutante (Motiv III) mitgeführt und aufgetragen. Zusätzlich zur Darstellung der ExoN-Aktivität auf zwei unterschiedlich 3'-modifizierten ssRNA-Substraten sowie dem Kontrollvergleich zwischen aktiven ExoN-nsp14-Proteinen und inaktiven ExoN-Mutanten wurde auch der mögliche Einfluss von nsp10 (pp1aC) untersucht. Hierzu wurden die aufgereinigten nsp10-Orthologe allein (zum Ausschluss einer potentiell eigenen ribonukleolytischen Inaktivität) sowie zusammen mit ExoN im Verhältnis 1:1 (50 nM ExoN zu 50 nM nsp10) inkubiert. In allen Aktivitätsexperimenten wurden somit 50 nM ExoN oder 50 nM ExoN-Mutante, 50 nM nsp10 sowie 50 nM RNA-Substrat in den jeweiligen Reaktionen eingesetzt.

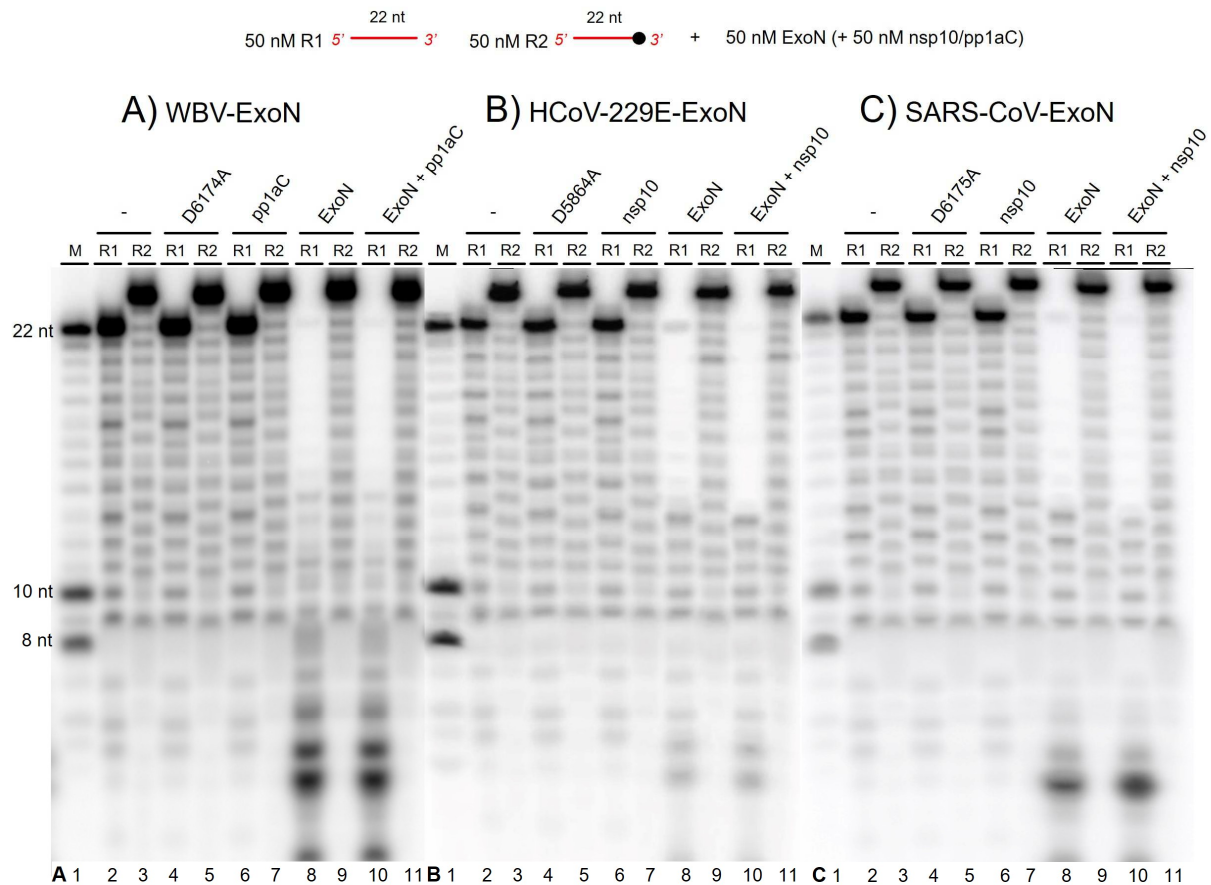


Abbildung 14: ExoN-Aktivitäten gegenüber einzelsträngigen RNA-Substraten mit und ohne Biotinylierung der 3'-Enden. Für den ExoN-Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) mit ssRNA wurden 50 nM RNA (R1 und R2), 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. Bei R1 und R2 handelt es sich um 22-nt-lange ssRNA-Oligos mit (R2) und ohne Blockierung des 3'-OH-Ende durch ein Biotin (R1). Das Reaktionsvolumen betrug 20 μ l und bestand aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM DTT. Der Start der Reaktion wurde durch die Zugabe von ExoN induziert und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsabbruch wurde durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol für die darauffolgende RNA-Präzipitation eingeleitet. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer aufgenommen, mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Urea Gel aufgetrennt und die 5'- ^{32}P -markierten Produkt-RNAs wurden durch Phosphorimaging visualisiert. Aufgetragen wurden in Spur 1, die Marker-RNA (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge. Spuren 2 und 3, Negativkontrolle (-) des Reaktionsansatzes ohne ExoN oder nsp10/pp1aC; Spuren 4 und 5, 50 nM ExoN-Motiv-III-Mutante; Spuren 6 und 7, 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren 8 und 9, 50 nM ExoN; Spuren 10 und 11, Reaktionsansatz mit einer Kombination von 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

Abbildung 14 zeigt die durch ExoN vermittelte Degradation des heteropolymeren ssRNA-Substrats R1. Zur Ermittlung der Laufhöhen wurden in den Spuren A1, B1 und C1 Größenstandards von 8-, 10- und 22 nt Länge aufgetragen. Um zu gewährleisten, dass die hier gezeigten ExoN-Aktivitäten nicht auf externe Nukleaseverunreinigungen zurückzuführen sind, wurden in den Spuren A2/A3, B2/B3 und C2/C3 jeweils Negativkontrollen der Reaktionsansätze ohne ExoN geladen. Als weitere Kontrolle dienen die in den Spuren A4/A5, B4/B5 sowie C4/C5 aufgetragenen Reaktionsansätze, in denen 50 nM einer inaktiven, unter

identischen Bedingungen koexprimierten ExoN-Motiv-III-Mutante eingesetzt wurde.

Bei allen Negativkontrollen, sowohl ohne Protein (Spuren 2 und 3) als auch mit inaktiver Motiv-III-Mutante (Spuren 4 und 5), war für beide Substrate (R1 und R2) keine ribonukleolytische Aktivität nachweisbar. Ebenfalls zeigen die Kontrollen der einzeln aufgetragenen nsp10- beziehungsweise pp1aC-Proteine (Spuren 6 und 7) keine Degradierung beider Substrate (R1 und R2). Von einer Kontamination der Reaktionsansätze oder Probenpuffer mit anderen Nukleasen ist somit nicht auszugehen.

Alle aufgereinigten funktionalen ExoNs wiesen hingegen sowohl allein (Spur 8) als auch in Kombination mit 50 nM nsp10/pp1aC (Spur 10) eine deutlich detektierbare 3'–5'-ExoN-Aktivität bei Verwendung des Substrats R1 auf (ohne 3'-Blockierung des Substrats). Durch die nachgewiesene ExoN-Aktivität ohne Zugabe von nsp10 beziehungsweise pp1aC (Spur 8) wird deutlich, dass die Anwesenheit weiterer Kofaktoren oder Untereinheiten für die nukleolytische Aktivität von ExoN *in vitro* nicht essentiell ist. Eine leichte Tendenz zur Bildung kleinerer Spaltprodukte bei einer Kombination von ExoN und nsp10 konnte beispielsweise bei den Ansätzen mit SARS-CoV- und HCoV-229E-ExoN beobachtet werden (vgl. Spur 8 mit Spur 10). Die Nukleaseaktivität des WBV-ExoN-Proteins in Kombination mit pp1aC (nsp10) hingegen wurde hier kaum erkennbar stimuliert.

Nach 60 min Inkubation mit den ExoN-Proteinen wurde der größte Anteil des Substrats R1 zu Produkten zwischen etwa 1 und 14 nt für WBV-ExoN sowie zwischen etwa 1–10 nt für HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN hydrolysiert. Das prominenteste Reaktionsprodukt lag hierbei zwischen etwa 5 und 6 nt und war bei allen drei verwendeten ExoN-Proteinen zu beobachten.

Keine Aktivität hingegen zeigten die Reaktionsansätze mit dem Substrat R2 (Spuren 9 und 11), das eine Biotin-Modifikation des RNA 3'-Endes trägt. Die ausbleibende Degradation von R2 bestätigt, dass alle untersuchten ExoNs – wie bereits zuvor für SARS-CoV gezeigt (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012) – ein frei zugängliches 3'-Ende für die ribonukleolytische Aktivität (Initiation) benötigen und in 3'–5'-Richtung operieren.

Die Daten veranschaulichen, dass die drei untersuchten ExoN-Aktivitäten ungeachtet ihrer strukturellen Unterschiede hinsichtlich der Anwesenheit einer

C-terminalen N7-MTase-Domäne im selben Protein in der Lage sind, einzelsträngige RNA-Substrate sowohl mit als auch ohne nsp10 beziehungsweise pp1aC zu hydrolysieren.

5.2.3 Untersuchung der ExoN-Aktivität gegenüber einem ssRNA-Substrat mit 3'-terminalem 2'-Desoxynukleotid

Wie bereits in der Versuchsanordnung zuvor gezeigt werden konnte, verhindert die Biotin-Modifizierung des 3'-Endes eines einzelsträngigen RNA-Substrats die durch WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN induzierte Degradation. Eine frühere Studie zeigte darüber hinaus, dass auch eine Modifizierung der 3'-Enden mit Puromycin vor einer Degradation durch SARS-CoV-ExoN schützt (Bouvet *et al.*, 2012). Bereits bei der Erstbeschreibung einer coronaviralen ExoN-Aktivität konnte demonstriert werden, dass ein Ribose-2'-*O*-methyliertes ssRNA-Substrat sowie ein nicht modifiziertes ssDNA-Substrat von der SARS-CoV-ExoN nicht gespalten werden (Minskaia *et al.*, 2006). Die beobachteten Unterschiede zwischen DNA und RNA legen nahe, dass nicht nur die freie C3-OH-Gruppe der 3'-endständigen Ribose für die ExoN-Aktivität relevant ist, sondern auch das Vorhandensein der C2-OH-Gruppe. Um die im Versuch zuvor gezeigte 3'-5'-Polarität zu bestätigen und die Abhängigkeit von der C2-OH-Gruppe der 3'-terminalen Ribose erstmals direkt aufzuzeigen, wurde in einem dritten Versuchsansatz die ExoN-Aktivität von WBV, HCoV-229E und SARS-CoV an einzelsträngigen RNA-Substraten mit unterschiedlich modifizierten Ribosen der 3'-terminalen Adenin-Nukleotide untersucht (Abbildung 15). Bei der 3'-Modifikation des ansonsten identischen RNA-Substrats R3 wurde die im Ausgangssubstrat R1 vorhandene 3'-Ribose durch eine 3'-terminale 2'-Desoxyribose ersetzt. Der Versuchsaufbau und die Auswertung wurden, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen, unter identischen Bedingungen durchgeführt.

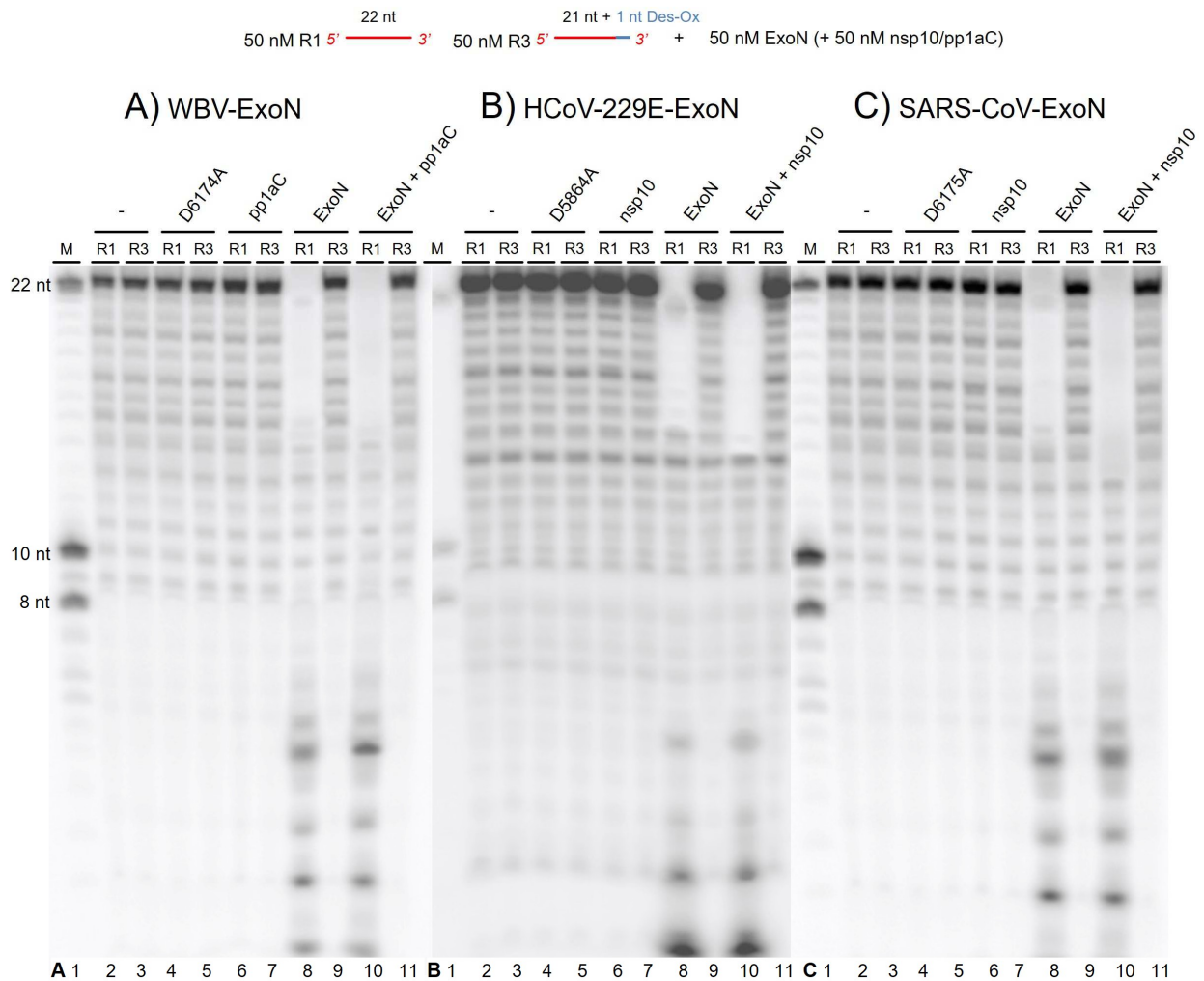


Abbildung 15: ExoN-Aktivität auf ssRNA-Substrat mit einem 3'-terminalen desoxy-NMP. Für den Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) auf ssRNA wurden 50 nM RNA R1 und R3, 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. R1 und R3 sind 22-nt-lange ssRNA-Oligos mit einem 3'-terminalen Ribonukleotid (R1) oder 2'-Desoxyribonukleotid (R3). Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und bestand aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Der Start der Reaktion wurde durch die Zugabe von ExoN induziert und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion wurde für die darauffolgende RNA-Präzipitation durch 0,3 M Natriumazetat und 200 µl eiskaltem Ethanol eingeleitet. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 µl FU-Auftragspuffer aufgenommen, mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der 5'-³²P]-Markierungen durch Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNAs (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2 und 3, die Negativkontrollen (-) des Reaktionsansatzes ohne Proteinzugabe; Spuren 4 und 5, Reaktionen mit inaktiver ExoN-Mutante; Spuren 6 und 7, Reaktionen mit 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren 8 und 9, Reaktionen mit 50 nM ExoN; Spuren 10 und 11, Reaktionsansätze mit 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

Wie bereits beobachtet, waren alle ExoNs in der Lage, das nicht modifizierte RNA-Substrat R1 zu degradieren. In den Spuren 8 und 10 ist jeweils eine deutliche Aktivität der eingesetzten ExoNs allein (Spur 8) beziehungsweise in Kombination mit nsp10 oder pp1aC (Spur 10) zu erkennen. Die durchschnittlichen Längen der Reaktionsprodukte lagen bei allen ExoNs zwischen etwa 1 und 14 nt. Ein Einfluss der Zugabe von nsp10 (Spuren 10/11) auf die Länge der Reaktionsprodukte ist

erneut kaum erkennbar, was die eigenständige Aktivität von ExoN unterstreicht. Bei der SARS-CoV- und HCoV-229E-ExoN zeigte sich lediglich ein geringfügig stimulierender Einfluss von nsp10 auf die ExoN-Aktivität. Dabei waren geringere Mengen des verbliebenen Ausgangssubstrats (22 nt) sowie eine Tendenz zu etwa 1 nt kürzeren Spaltprodukten zu beobachten (vgl. Spur 8 und 10). Das Substrat R3 mit einem 3'-terminalen 2'-Desoxy-NMP wurde von keiner der drei ExoNs gespalten (Spuren 9 und 11). Somit ist davon auszugehen, dass die Ribose-2'-OH-Gruppe des 3'-terminalen Nukleotids an der spezifischen Bindung zwischen RNA-Substrat und coronaviralen sowie bafiniviralen ExoNs beteiligt ist. Die in den Spuren 4 und 5 aufgetragene ExoN-Motiv-III-Mutanten zeigt auch hier keinerlei Aktivität gegenüber beiden Substraten.

5.2.4 Charakterisierung der ExoN-Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA

Wie bereits erwähnt, konnte während der erstmaligen Charakterisierung von rekombinantem SARS-CoV-ExoN gezeigt werden, dass ExoN auch dsRNA in 3'-5'-Richtung degradieren kann (Minskaia *et al.*, 2006). Eine nachfolgende Studie bestätigte die SARS-CoV-ExoN-Aktivität gegenüber dsRNA-Substraten und deutete darüber hinaus auf eine Präferenz für dsRNA-Substrate mit einem 3'-terminal nichtgepaarten Nukleotid hin (Bouvet *et al.*, 2012). Das nachfolgende Experiment dient somit der Ermittlung zwei weiterer nidoviraler ExoN-Aktivitäten (von WBV und HCoV-229E) gegenüber vollständig gepaarter dsRNA (Abbildung 16). Bei den hier untersuchten Substraten handelte es sich um die dsRNA R4 und R4₂. Beide Substrate bestehen aus 22-nt-langen, komplementär gepaarten RNA-Oligonukleotiden und unterscheiden sich ausschließlich durch eine zusätzliche 3'-Biotinylierung des 5'-[³²P]-markierten Einzelstrangs (Plusstrang von R4₂). Der jeweils nicht 5'-[³²P]-markierte Komplementärstrang (Minusstrang) aller untersuchten Duplex-RNAs war hier und in allen nachfolgenden Experimenten grundsätzlich 3'-biotinyliert. Die Versuchsdurchführung des folgenden Experimentes entsprach den bereits in zuvor beschriebenen Versuchen verwendeten Reaktionsbedingungen.

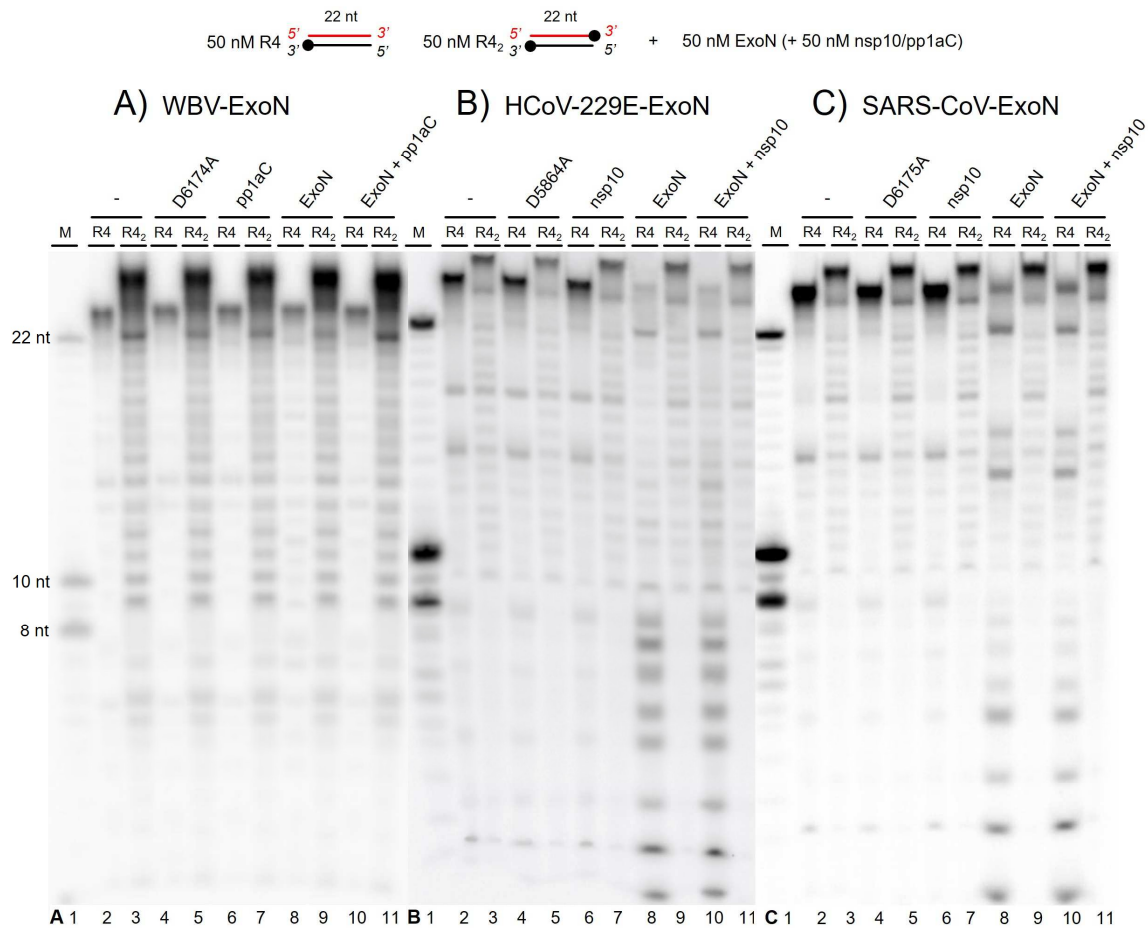


Abbildung 16: ExoN-Aktivität auf vollständig gepaarten dsRNA-Substraten. Für den ExoN-Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) auf dsRNA wurde 50 nM RNA (R4 und R4₂), 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. R4 und R4₂ sind dsRNA-Substrate von 22 nt Länge, bei denen beide (R4₂) oder nur einer der beiden ssRNA-Stränge 3'-biotinyliert war (R4). R4 ist im Gegensatz zu R4₂ lediglich am 3'-Ende des nicht 5'-[³²P]-markierten RNA-Stranges durch ein Biotin blockiert. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und bestand aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch 0,3 M Natriumazetat und 200 µl eiskaltem Ethanol. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 µl FU-Auftragspuffer aufgenommen, in einem 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt und die 5'-[³²P]-markierten RNAs durch Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNAs (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2 und 3, Negativkontrollen (-) ohne Proteinzugabe; Spuren 4 und 5, Reaktionsansätze mit den angegebenen inaktiven ExoN-Mutanten; Spuren 6 und 7, Reaktionsansätze mit 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren 8 und 9, Reaktionsansätze mit 50 nM ExoN; Spuren 10 und 11, Reaktionsansätze mit 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

Abbildung 16 zeigt die Untersuchung der ExoN-Aktivität gegenüber vollständig gepaarten dsRNA-Substraten. Entgegen den vorliegenden Erkenntnissen zur Aktivität von SARS-CoV-ExoN auf vollständig gepaarter dsRNA (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012), besaß die WBV-ExoN hier keine erkennbare Degradierungsaktivität bei Verwendung eines vollständig gepaarten dsRNA-Substrats (R4, Spur A8/A10). Die beiden coronaviralen ExoNs zeigten im Gegensatz zur bafiniviralen (WBV-)ExoN eine moderate Aktivität gegenüber dem

dsRNA-Substrat R4 (B und C, Spur 8), die in Gegenwart von nsp10 nicht weiter gesteigert wurde (B und C, Spur 10). Die Effektivität, mit der HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN das Substrat R4 degradierten, war im Vergleich mit dem zuvor verwendeten ssRNA-Substrat R1 (Abschnitt 5.2.2, Abb. 15) deutlich geringer. Im Gegensatz zur Degradation von ssRNA mit kleineren Spaltungsprodukten lag die Größe der Reaktionsprodukte hier im Bereich von etwa 1–22 nt (Spur B8/B10 und C8/C10). Keine der ExoNs zeigte – weder allein noch in Kombination mit nsp10/pp1aC – eine Aktivität gegenüber dem an beiden 3'-Enden biotinylierten Substrat R4₂ (Spuren 9 und 11), was die Bedeutung eines freien 3'-Ende für die 3'-5'-Nukleaseaktivität dieser Enzyme erneut bestätigt. Ein Einfluss von HCoV-229E- und SARS-CoV-nsp10 auf die beobachtete Länge der Reaktionsprodukte in ExoN-Reaktionen (Spur 10 und 11) war nicht zu erkennen. Nach Zugabe von nsp10 zeigte sich kein Unterschied in der ohnehin niedrigen Spaltungsrate des dsRNA-Substrats R4

5.2.5 Charakterisierung der ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA

Die folgenden Experimente der Unterkapitel 5.2.5.1–5.2.5.3 dienen der weiteren Charakterisierung der Exoribonukleaseaktivitäten auf dsRNA-Substraten. Dabei wurden die Aktivitäten von WBV- und HCoV-229E-ExoN auf partiell gepaarter dsRNA untersucht und mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen verglichen, die eine Präferenz der SARS-CoV-ExoN für dsRNA-Substrate mit 3'-terminal ungepaarten Nukleotiden gezeigt hatten (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012). In diesen Studien konnte angedeutet werden, dass SARS-CoV-ExoN dsRNA-Substrate mit einem 3'-nichtgepaarten Nukleotid bevorzugt hydrolysiert (Bouvet *et al.*, 2012). Bei den hier mit verschiedenen coronaviralen und bafiniviralen ExoNs inkubierten dsRNA-Substraten R5, R6 und R7 handelte es sich um 22-nt-lange, partiell gepaarte dsRNA-Oligonukleotide mit einer variierenden Anzahl 3'-nichtgepaarter Nukleotide (Liste in Abschnitt 3.1.6.2). Das Substrat R5 besaß dabei ein 3'-nichtgepaartes Adenin-Nukleotid und sollte dazu dienen, die Frage zu beantworten, ob die für die SARS-CoV-ExoN beobachtete Bevorzugung von dsRNA mit einem 3'-terminalen ungepaarten Nukleotid auch für die ExoNs von WBV und HCoV-229E gilt. Eine Variation der nichtgepaarten Nukleotidarten (A, U, G, C) wurde dabei nicht untersucht, da bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Degradierungseffizienz nicht von der Art des Nukleotids beeinflusst wird

5.2.5.1 WBV-ExoN auf partieller dsRNA mit 1–3 3'-nichtgepaarten nt

Abbildung 17A zeigt die Analyse der WBV-ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA. Wie bereits im ersten Versuch zur Bestimmung der allgemeinen Funktionalität verschiedener ExoN-Konzentrationen (Abschnitt 5.2.1) beobachtet und für SARS-CoV-ExoN zuvor gezeigt wurde (Bouvet *et al.*, 2012), degradiert die WBV-ExoN hier das Substrat R5 mit einem einzigen 3'-nichtgepaarten Nukleotid (Spuren A11 und A14) sehr effizient. Kleinere Reaktionsprodukte bei einer Inkubation von WBV-ExoN und pp1aC mit dem Substrat R5 (Spur A14) deuten, verglichen mit dem Ansatz von ExoN allein (ohne pp1aC, Spur A11), auf eine leichte Stimulierung der Spaltungsaktivität durch Zugabe von pp1aC hin. Insgesamt ist die ermittelte Effizienz der Degradierung von R5 deutlich höher als bei vollständig gepaarter dsRNA (Abb. 16A, Abschnitt 5.2.4) sowie dem Testsubstrat R7 mit drei Fehlpaarungen. Ebenfalls zeigt WBV-ExoN sowohl allein und in Kombination mit pp1aC eine nukleolytische Aktivität bei der Inkubation mit dem Substrat R6, das zwei 3'-nichtgepaarte Nukleotide aufweist (Spuren A12 und A15). Jedoch führt bei diesem Substrat die Anwesenheit von pp1aC zu einer wenig deutlicheren Erhöhung der ExoN-Aktivität (vgl. Spuren A12 mit A15). Keine nachweisbare Aktivität zeigte die WBV-ExoN weder allein noch in Kombination mit pp1aC bei Verwendung des Substrats R7 (Spuren A13 und A16), das drei nichtgepaarte Nukleotide am 3'-Ende des Indikatorstrangs aufweist. Die Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die WBV-ExoN präferentiell dsRNA-Substrate mit einem ungepaarten Nukleotid am 3'-Ende am effizientesten spaltet. Diese Substratpräferenz wird in Anwesenheit von pp1aC noch deutlicher.

5.2.5.2 HCoV-229E-ExoN auf partieller dsRNA mit 1–3 3'-nichtgepaarten nt

Abbildung 17B zeigt im zweiten Abschnitt der Untersuchung die HCoV-229E-ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA. HCoV-229E-ExoN ist hier im Gegensatz zur ermittelten WBV-ExoN-Aktivität in der Lage, neben dem Substrat R5 (Spuren B11 und B14) und dem Substrat R6 (Spuren B12 und B15) auch das Substrat R7 (Spuren B13 und B16) mit drei 3'-nichtgepaarten Nukleotiden zu degradieren. Die hierbei ermittelten Längen prominenter Reaktionsprodukte liegen beim Substrat R5 zwischen etwa 1 und 8 nt, bei R6 zwischen etwa 1 und 15 nt und im Fall des weniger effektiv degradierten Substrats

R7 zwischen etwa 1 und 20 nt. Damit zeigt sich HCoV-229E-ExoN weniger selektiv als WBV-ExoN, besitzt jedoch ebenfalls eine Tendenz zur bereits ermittelten ExoN-Präferenz für dsRNA-Substrate mit einem 3'-nichtgepaarten Nukleotid. Ein Einfluss auf die Längen der Reaktionsprodukte bei einer Kombination von 50 nM nsp10 und 50 nM HCoV-229E-ExoN mit R5 (Spur B14) ist trotz der hohen ExoN-Grundaktivität erkennbar. Dabei sind in Spur B14 (ExoN und nsp10) nach 60 min Inkubation etwas weniger lange Spaltungsintermediate (~8–20 nt) zu beobachten als in Spur B11 (ohne nsp10). Auch bei der ExoN-Aktivität gegenüber dem weniger bevorzugten Substrat R6 ist eine Reduzierung der längeren Spaltungsintermediate (~10–15 nt) zu erkennen, was – wie bei der Degradierung von R5 – auf eine Stimulierung durch die Kombination von ExoN und nsp10 hindeutet (vgl. Spur B12 mit B15). Für die Ansätze mit dem deutlich ineffektiver degradierten Substrat R7 ist ein aktivitätssteigernder Effekt von nsp10 hingegen nicht nachweisbar (Spuren B13 und B16).

5.2.5.3 SARS-CoV-ExoN auf partieller dsRNA mit 1–3 3'-nichtgepaarten nt

Abbildung 17C zeigt im dritten Abschnitt der Untersuchung die SARS-CoV-ExoN-Aktivitäten auf verschiedene 3'-nichtgepaarte dsRNA-Substrate. Ähnlich der zuvor ermittelten HCoV-229E-ExoN-Aktivität zeigt SARS-CoV-ExoN eine Degradation aller hier verwendeten dsRNA-Substrate, wobei die Effizienz der Spaltung mit steigender Anzahl nichtgepaarter Nukleotide abnimmt. Insgesamt weisen die Reaktionsprodukte Längen zwischen etwa 1 und 10 Nukleotiden für R5 (Spuren C10 und C13), zwischen etwa 1 und 15 Nukleotiden für R6 (Spuren C11 und C14) sowie im Fall der geringen Spaltungseffizienz von R7 zwischen etwa 8–22 Nukleotiden auf (Spuren C12 und C15). Der Vergleich der durchschnittlichen Längen der bei der Degradation des Substrats R5 ermittelten Reaktionsprodukte mit denen des Substrats R6 weist auf eine effektivere Spaltung von dsRNA mit einem 3'-nichtgepaarten Nukleotid hin. Das Substrat R7 mit drei 3'-nichtgepaarten Nukleotiden (Spuren C12 und C15) wurde ebenfalls durch ExoN degradiert, zeigt jedoch aufgrund längerer Reaktionsprodukte eine erkennbar geringere Umsetzung durch ExoN. Die hier ermittelte Aktivität von SARS-CoV-ExoN deutet somit ebenfalls auf eine gewisse Substratpräferenz für dsRNA mit einem ungepaarten Nukleotid am 3'-Ende des Indikatorstrangs hin. Wie im Fall von HCoV-229E-ExoN ist SARS-CoV-ExoN jedoch weniger deutlich als WBV-ExoN in der Lage, zwischen

dsRNA-Substraten mit einem einzigen, mit zwei oder mit drei 3'-nichtgepaarten Nukleotiden zu unterscheiden. Eine Kombination von 50 nM SARS-CoV-nsp10 und 50 nM SARS-CoV-ExoN führte im Fall der Substrate R5 und R6 zu geringfügig kürzeren Spaltungsprodukten. Der geringste Effekt auf die Produktlängen durch nsp10 ist – wie bereits im Fall von WBV und HCoV-229E – bei dem wenig effizient degradierten Substrat R7 zu beobachten (vgl. Spur C12 mit C15). Für den SARS-CoV-nsp10-Kofaktor konnte somit in dieser Versuchsanordnung die bereits früher publizierte unterstützende Rolle für die ribonukleolytische Aktivität von SARS-CoV-ExoN beobachtet werden (Bouvet *et al.*, 2014).

5.2.6 Bestätigung der 3'–5'-gerichteten ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA

Die folgenden drei Unterkapitel (5.2.6.1–5.2.6.3) sollen die in den vorhergehenden Abschnitten gemachten Beobachtungen, die für eine gerichtete 3'–5'-ExoN-Aktivität auf ssRNA und vollständig gepaarter dsRNA sprechen, auch für den Fall partieller dsRNA bestätigen. Bereits im Abschnitt 5.2.2 konnte für WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN die 3'–5'-gerichtete Aktivität auf ssRNA durch eine Biotin-Blockierung der 3'-Enden verdeutlicht werden. Bei vollständig gepaarter dsRNA zeigte WBV-ExoN keine Aktivität, sodass eine Bestätigung der 3'–5'-Polarität durch die Blockierung der 3'-Enden hier nicht vollständig möglich war. Im Gegensatz dazu zeigten alle drei untersuchten ExoN-Domänen in Abschnitt 5.2.5 eine effektive Degradation von nicht vollständig gepaarter dsRNA mit 1–2 nichtgepaarten Nukleotiden am 3'-Ende des Indikatorstrangs. Um die Polarität der drei ExoN-Aktivitäten direkt an partieller dsRNA nachzuweisen, wurde hier eine Variante des Substrats R5 verwendet. Dabei handelt es sich um das Substrat R5₂, dessen 3'-nichtgepaartes Adenin-Nukleotid zusätzlich biotinyliert wurde. Dieses Substrat wurde unter identischen, zuvor beschriebenen Bedingungen mit ExoN inkubiert (Abbildung 18).

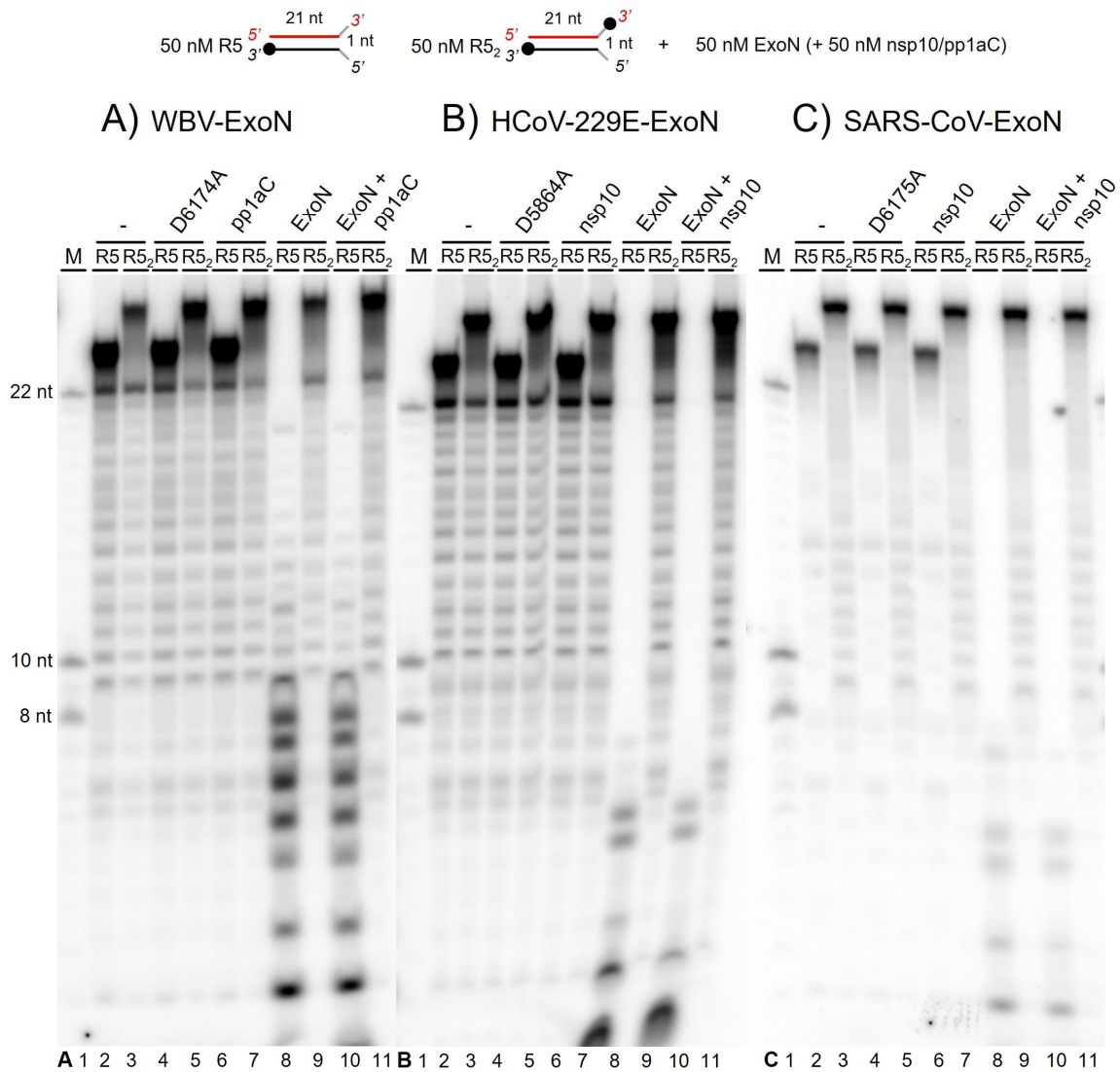


Abbildung 18: ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA, mit und ohne Blockierung beider 3'-Enden. Für den ExoN-Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) auf partieller dsRNA wurde 50 nM RNA, 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. Bei R5 und R5₂ handelt es sich um 22-nt-lange, partielle dsRNA-Oligos mit (R5₂) oder ohne (R5) Blockierung beider 3'-Enden durch ein Biotin. Bei R5 ist lediglich eines der beiden 3'-Enden (des nicht 5'-[³²P]-markierten RNA-Stranges) durch ein Biotin blockiert. Der 20- μ l-Reaktionsansatz enthielt 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ExoN gestartet, für 60 min bei 37 °C inkubiert und durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol beendet. Die Reaktionsprodukte wurden präzipitiert, anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer aufgenommen und mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Urea Gel aufgetrennt. 5'-[³²P]-markierte Reaktionsprodukte wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Aufgetragen wurden in Spur 1, die Marker-RNA (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge; in Spur 2 und 3, die Negativkontrollen (-) des Reaktionsansatzes ohne ExoN und nsp10/pp1aC; in Spur 4 und 5, die inaktive ExoN_D6174A-Variante; in Spur 6 und 7, Reaktion mit 50 nM nsp10/pp1aC; Spur 8 und 9, Reaktion mit 50 nM ExoN; Spur 10 und 11, Reaktion mit einer Kombination aus 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

5.2.6.1 3'–5'-gerichtete WBV-ExoN-Aktivität bei partiellen dsRNA

Abbildung 18A zeigt die WBV-ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA. Wie bereits in Abschnitt 5.2.5 beobachtet, zeigte sich auch hier, dass WBV-ExoN allein (Spur A8) als auch in Kombination mit pp1aC (Spur A10) das Substrat R5 effektiv spaltet. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C mit WBV-ExoN wurde der größte Anteil des Substrats R5 hydrolysiert. Die prominentesten Reaktionsprodukte wiesen dabei Gesamtlängen zwischen etwa 1 und 9 Nukleotiden auf. Keine erkennbare Aktivität der WBV-ExoN zeigte sich bei Verwendung des Substrats R5₂ (Spuren A9 und A11), das mit einer zusätzlichen 3'-Biotin-Modifikation versehen war. Damit konnte auch für partielle dsRNA gezeigt werden, dass eine 3'-Modifizierung des RNA-Substrats mit Biotin vor einer Degradation durch WBV-ExoN schützt. Aufgrund der fehlenden Aktivität von WBV-ExoN gegenüber vollständig gepaarter dsRNA (Abschnitt 5.2.4) war diese Schlussfolgerung zuvor nicht möglich gewesen. Die hier gewonnenen Daten bestätigen die hohe Aktivität der WBV-ExoN gegenüber dsRNA mit einer singulären 3'-Fehlpaarung. Darüber hinaus unterstreichen die Beobachtungen die kritische Rolle der freien 3'-OH-Gruppe des Substrats für die ExoN-Aktivität und unterstützen die Schlussfolgerung, dass WBV-ExoN partielle dsRNA-Substrate ebenfalls in 3'–5'-Richtung spaltet. Ein geringgradig stimulierender Einfluss auf die Spaltungseffektivität war bei einer Kombination von 50 nM WBV-pp1aC und 50 nM WBV-ExoN anhand kürzerer Spaltungsintermediate erkennbar (vgl. Spur A10 mit A8).

5.2.6.2 3'–5'-gerichtete HCoV-229E-ExoN Aktivität bei partieller dsRNA

Abbildung 18B zeigt im zweiten Abschnitt des Nachweises der 3'–5'-Polarität von ExoN die HCoV-229E-ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA. Wie auch im Versuch zuvor war HCoV-229E-ExoN sowohl allein (Spur B8) als auch in Kombination mit HCoV-229E-nsp10 (Spur B10) in der Lage, das Substrat R5 effizient zu hydrolysieren. Die prominentesten Reaktionsprodukte wiesen bei ExoN allein (Spur B8) Größen von etwa 1–7 nt und bei der Kombination mit nsp10 (Spur B10) Größen zwischen etwa 1 und 5 nt auf. Keine Aktivität hingegen zeigte HCoV-229E-ExoN weder allein noch in Kombination mit nsp10 bei einer Inkubation mit dem Substrat R5₂ (Spuren B9 und B11). Dies bestätigt, dass HCoV-229E-ExoN nicht in der Lage ist, das bevorzugte partielle dsRNA-Substrat zu degradieren, wenn der Indikatorstrang 3'-biotinyliert ist. Für HCoV-229E-ExoN

wurde somit eine Abhängigkeit von einer nicht modifizierten 3'-OH-Gruppe bestätigt und es kann von einer 3'-5'-gerichteten Aktivität ausgegangen werden. Ein Vergleich der Reaktionsprodukte des Ansatzes mit ExoN allein (Spur B8) und der Produktlängen bei einer Kombination von ExoN und nsp10 (Spur B10) ergab leichte Unterschiede. Dabei waren in Spur B10 weniger große Spaltungsprodukte (etwa 2–7 nt) nachweisbar, was für eine ExoN-aktivitätsstimulierende Rolle von HCoV-229E-nsp10 spricht.

5.2.6.3 3'-5'-gerichtete SARS-CoV-ExoN Aktivität bei partieller dsRNA

Abbildung 18C zeigt den dritten Abschnitt zur Untersuchung der Polarität von ExoN-Aktivitäten auf partiell gepaarter dsRNA. Bereits für vollständig gepaarte dsRNA konnten Dr. M. Bouvet und Kollegen im Jahr 2012 zeigen, dass eine 3'-Modifikation der dsRNA mit Puromycin vor einer Degradation durch SARS-CoV-ExoN schützt (Bouvet *et al.*, 2012).

Wie bereits zuvor für WBV-ExoN und HCoV-229E-ExoN beobachtet, zeigte SARS-CoV-ExoN sowohl allein (Spur C8) als auch in Kombination mit SARS-CoV-nsp10 (Spur C10) eine deutliche Degradation des Substrats R5. Die nahezu vollständige Umsetzung der eingesetzten Substratmenge unterstreicht im Vergleich zu den zuvor beobachteten ExoN-Aktivitäten bei Verwendung von ssRNA oder vollständig gepaarter dsRNA eine ausgeprägte Präferenz von SARS-CoV-ExoN für partiell gepaarte dsRNA. In Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Bedeutung eines nicht modifizierten 3'-Endes des Indikatorstrangs in partiell doppelsträngigen RNA-Substraten zeigt SARS-CoV-ExoN keine nukleolytische Aktivität gegenüber dem Substrat R5₂ (Spur C9 und C11). Die Daten unterstützen somit die 3'-5'-Polarität von SARS-CoV-ExoN. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zu WBV- und HCoV-229E-ExoN konnte auch für SARS-CoV-ExoN eine aktivitätsstimulierende Wirkung in Kombination mit nsp10 im Verhältnis 1:1 beobachtet werden (vgl. Spur C10 mit C8).

5.2.7 Vergleich der ExoN-Degradierungseffizienz bei verschiedenen ss/dsRNA-Substraten

Wie bereits erläutert, konnte in zurückliegenden Studien gezeigt werden, dass SARS-CoV-ExoN partielle dsRNA-Substrate mit einem 3'-terminalen nichtgepaarten Nukleotid bevorzugt (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde bereits für WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN demonstriert, dass partielle dsRNA mit einem oder zwei 3'-nichtgepaarten Nukleotiden sehr effizient degradiert wird. Der Einfluss von nsp10/pp1aC auf die Spaltungsaktivität der hier charakterisierten ExoN innerhalb der ersten Gruppe an Experimenten mit Inkubationszeiten von einer Stunde zeigte sich als nur geringgradig stimulierend. Angesichts der allgemein starken ExoN-Aktivität konnte die Bedeutung von nsp10, insbesondere für die WBV-ExoN, nicht in überzeugendem Ausmaß dargestellt werden. Deshalb wurde in einer weiteren Gruppe von Experimenten durch die Verwendung niedriger Enzymkonzentrationen und kürzerer Reaktionszeiten der Einfluss von nsp10 auf die Spaltungseffizienz deutlicher herausgearbeitet. Die in den folgenden Abschnitten 5.2.7.1–5.2.7.3 (Abbildungen 19–21) dargestellten Untersuchungen dienten einer genaueren zeitlichen Analyse der Spaltung unterschiedlicher Substrate, wobei die ExoN-Aktivitäten gegenüber ssRNA, dsRNA und partieller dsRNA mit 1–3 3'-nichtgepaarten Nukleotiden in einem direkten Vergleich innerhalb desselben Experiments untersucht wurden. Hierbei wurde die Reaktionszeit reduziert und zeitlich gestaffelt (5 min und 20 min). Des Weiteren wurde die verwendete ExoN-Konzentration von 50 nM auf 15 nM gesenkt, um einen Überschuss an Substrat herzustellen. Für den Erhalt eines molaren Verhältnisses von 1:1 (ExoN zu nsp10/pp1aC) wurde auch die nsp10-Konzentration angepasst und von 50 nM auf 15 nM abgesenkt. Die RNA-Substratkonzentration wurde dabei nicht verändert und betrug, wie in allen anderen Experimenten, 50 nM. Bei den bisher einzeln betrachteten und hier gegenübergestellten RNA-Substraten handelte es sich um die 22-nt-langen RNA-Oligonukleotide R1 (ssRNA), R4 (vollständig gepaarte dsRNA) sowie R5, R6 und R7 (partielle dsRNA mit 1–3, 3'-nichtgepaarten Nukleotiden).

5.2.7.1 WBV-ExoN-Degradierungseffizienz bei ss/dsRNA-Substraten

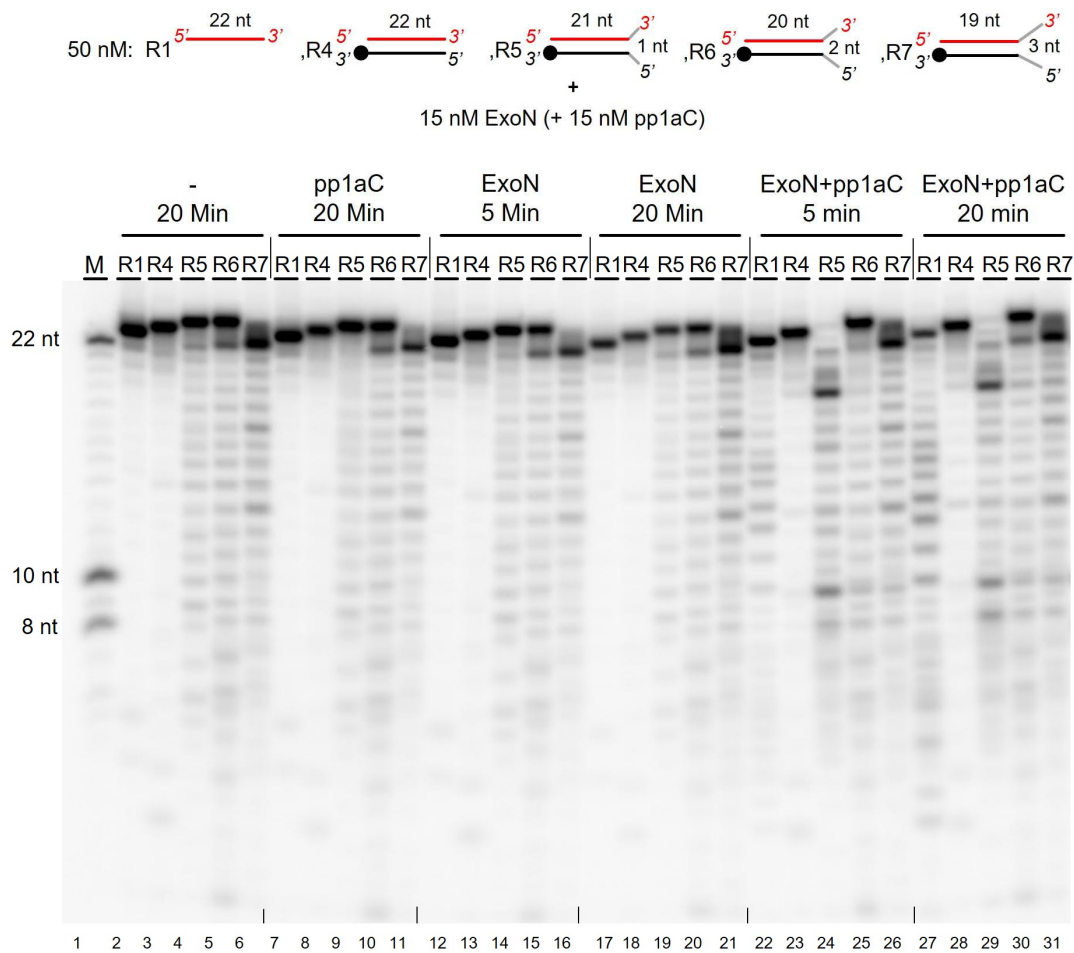


Abbildung 19: Zeitliche Effizienz der Spaltung von ss/ds und partieller dsRNA durch WBV-ExoN. Für den Vergleich der WBV-ExoN-Aktivität gegenüber unterschiedlichen RNA-Substraten wurden 50 nM RNA (R1, R4, R5, R6 oder R7), 15 nM ExoN und (oder) 15 nM pp1aC in die Reaktion eingesetzt. Bei den Substraten handelte es sich um 22-nt-lange ss- (R1), ds- (R4) und partielle dsRNA-Oligos mit einem (R5), zwei (R6) oder drei (R7) 3'-nichtgepaarten Adeninen am 3'-Ende des 5'-[³²P]-markierten Indikatorstrangs. Die 20- μ l-Reaktionsansätze enthielten 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von ExoN gestartet und die Ansätze wurden für 5 min oder 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol beendet. Die präzipitierten Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer gelöst und mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Radioaktiv markierte Reaktionsprodukte wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNA (M) mit 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2–6, 20-Min-Negativkontrollen (-) der Reaktionsansätze ohne ExoN oder pp1aC. Spuren 7–11, 20-Min-Negativkontrolle mit 15 nM pp1aC; Spuren 12–16, Reaktionsansätze der 5-Min-Inkubation von ExoN allein; Spuren 17–21, 20-Min-Ansätze von ExoN allein; Spuren 22–26, 5-Min-Ansätze der Kombination von 15 nM ExoN und 15 nM pp1aC; Spuren 27–31, Ansätze der 20-Min-Inkubation von 15 nM ExoN und 15 nM pp1aC.

Abbildung 19 zeigt die WBV-ExoN-Aktivität mit verschiedenen ss- und dsRNA-Substraten (R1, R4, R5, R6 und R7), die zur Darstellung der substratspezifischen Spaltungseffizienz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (5 min und 20 min) gestoppt wurden. Aufgrund der gesenkten ExoN-Konzentration und der reduzierten Inkubationszeit zeigten sich beim Einsatz von WBV-ExoN allein sowohl nach 5 min (Spuren 12–16) als auch nach 20 min Inkubation (Spuren 17–21) nur sehr wenige Spaltungsprodukte. Der kombinierte Einsatz von ExoN und dem putativen nsp10-Ortholog (pp1aC) im Verhältnis 1:1 führte hingegen bereits nach 5 min Inkubation (Spur 22–26) zu einer signifikanten Degradierung des Substrats R5 (Spur 24), wobei die auffälligsten Spaltprodukte Längen von etwa 10 und 18 Nukleotiden aufwiesen. Die übrigen Substrate (R1, R4, R6 und R7) waren hingegen auch nach 20 min Inkubation bei einer Kombination von ExoN und pp1aC kaum degradiert. Das einzelsträngige Substrat R1 wurde hingegen schwächer, jedoch klar detektierbar gespalten (Spur 27), während vollständig gepaarte dsRNA (Spur 28) sowie partielle dsRNA mit 2–3 Nukleotid langen 3'-Fehlpaarungen nur in sehr geringem Umfang gespalten wurden (Spuren 30 und 31). Die Daten bestätigen erneut die klare Präferenz der WBV-ExoN für dsRNA mit einem einzelnen 3'-nichtgepaarten Nukleotid und liefern erstmals einen signifikanten Hinweis auf eine mögliche unterstützende Rolle des putativen nsp10-Orthologs (pp1aC) von WBV für die ermittelte ExoN-Aktivität.

5.2.7.2 HCoV-229E-ExoN-Degradierungseffizienz bei ss/dsRNA-Substraten

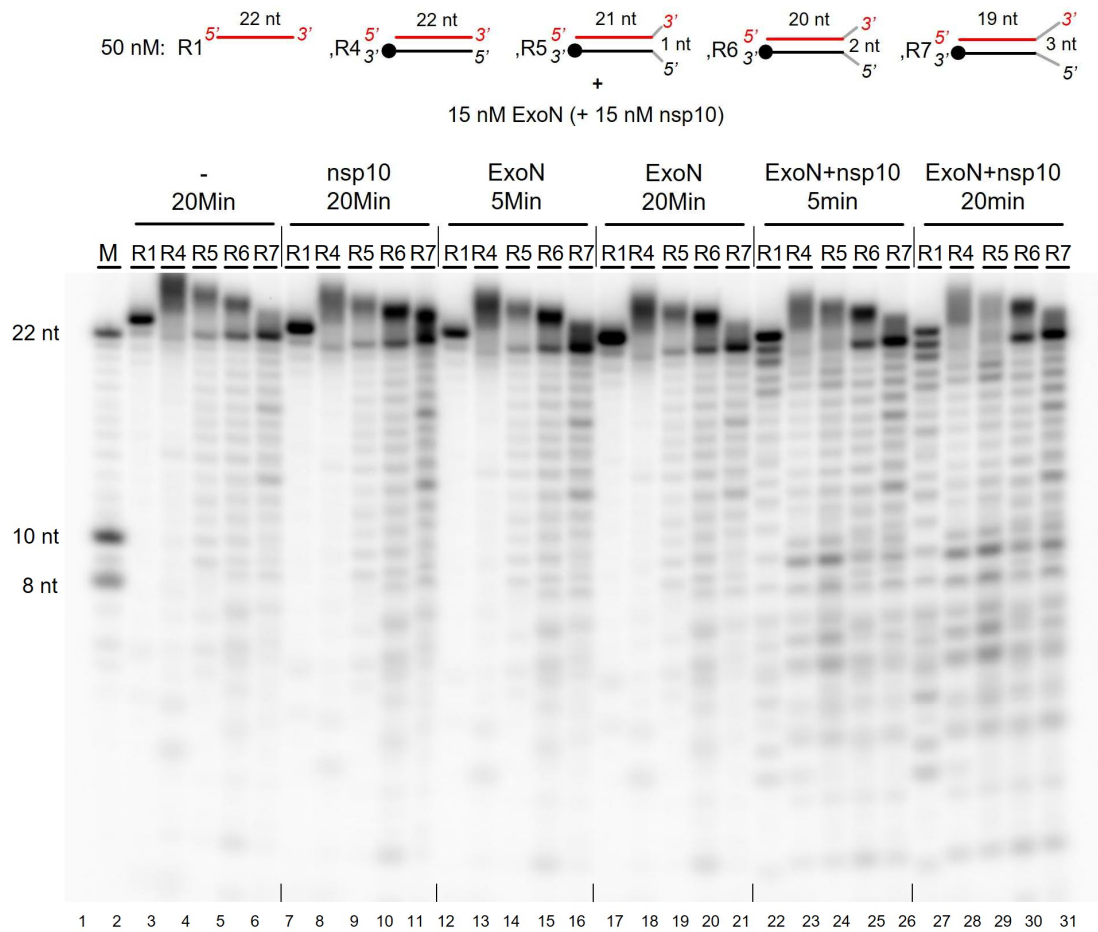


Abbildung 20: Zeitliche Effizienz der Spaltung von ss/ds und partieller dsRNA durch HCoV-229E-ExoN. In den Reaktionen wurden 50 nM RNA (R1, R4, R5, R6 oder R7), 15 nM ExoN und (oder) 15 nM HCoV-229E-nsp10 eingesetzt. Als Substrate wurden 22-nt-lange einzelsträngige (R1), ds (R4) und partielle dsRNA-Oligos mit einem (R5), zwei (R6) oder drei (R7) 3'-nichtgepaarten Adeninen verwendet. Die 20- μ l-Reaktionen enthielten 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von ExoN und/oder nsp10 gestartet und die Ansätze für 5 min oder 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol beendet. Die präzipitierten Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer gelöst und mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Radioaktiv markierte Reaktionsprodukte wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNA (M) mit 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2–6, 20-Min-Negativkontrollen (-) der Reaktionsansätze ohne Zugabe von ExoN oder nsp10; Spuren 7–11, 20 Min, 15 nM nsp10; Spuren 12–16, 5 Min, 15 nM ExoN; Spuren 17–21, 20 Min, 15 nM ExoN; Spuren 22–26, 5 Min, 15 nM ExoN und 15 nM nsp10; Spuren 27–31, 20 Min, 15 nM ExoN und 15 nM nsp10.

Abbildung 20 zeigt im zweiten Teil der Untersuchung die ermittelte HCoV-229E-ExoN-Aktivität gegenüber unterschiedlichen RNA-Substraten (R1, R4, R5, R6 und R7). Die Inkubation der Substrate mit HCoV-229E-ExoN allein (Spuren 12–21) führte im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne ExoN (Spuren 2–11) nur zu sehr wenigen Spaltprodukten. Dies gilt sowohl für die 5-minütige Inkubation (Spuren 12–16) als auch für die 20-minütige Inkubation (Spuren 17–21). Demgegenüber zeigte sich bei einer Kombination von ExoN und nsp10 eine deutlich nachweisbare Aktivität, insbesondere mit dem bevorzugten Substrat R5 (Spuren 24 und 29), einer dsRNA mit einem 3'-terminalen, nichtgepaarten Nukleotid. Ebenfalls konnte für die Substrate R1 (ssRNA) und R4 (vollständig gepaarte dsRNA) eine geringe Degradation beobachtet werden (Spuren 27 und 28), die jedoch schwächer ausfiel als die Spaltung von R5. Die geringste Aktivität zeigte ExoN hingegen auf den Substraten R6 und R7, die auch nach 20 min Inkubation und in Anwesenheit von nsp10 am wenigsten degradiert wurden. Dies wird durch die Mengen des verbliebenen 22-nt-langen Ausgangssubstrats sowie durch das Verhältnis der akkumulierten charakteristischen Reaktionsprodukte (etwa 8 nt) deutlich. Die Daten unterstützen somit die Annahme einer stimulierenden Wirkung von HCoV-229E-nsp10 auf die ExoN-Aktivität und bestätigen die zuvor beschriebene ExoN-Präferenz für partielle dsRNA-Substrate mit einem 3'-terminal ungepaarten Nukleotid.

degradiert (Spur 24) und nach 20 min nahezu vollständig gespalten (Spur 29). Die Substrate R1 und R4 wurden ebenfalls leicht degradiert, jedoch war die Spaltung hier weniger vollständig als bei R5. Für die Substrate R6 (Spur 30) und R7 (Spur 31) wurde auch nach 20 min Inkubation mit ExoN und nsp10 die geringste Degradation aller hier verwendeten Testsubstrate festgestellt. Somit konnte die Präferenz von SARS-CoV-ExoN für dsRNA mit einem 3'-terminal nichtgepaarten Nukleotid bestätigt werden. Dabei zeigen sich deutliche Parallelen zu den erstmals gemachten Beobachtungen für die ExoN-Aktivitäten von WBV und HCoV-229E. Durch das Ausbleiben detektierbarer Spaltungsprodukte ohne die Zugabe des Kofaktors nsp10 (Spuren 12-21) konnte zudem der stimulierende Einfluss von nsp10 auf die SARS-CoV-ExoN-Aktivität (Spur 22–31) erneut demonstriert werden.

5.2.8 Einfluss unterschiedlicher dsRNA-Gesamtlängen auf die ExoN-Aktivität

Frühere Untersuchungen zur SARS-CoV-ExoN hatten ergeben, dass ssRNA-Substrate (18-30 nt) bis zu einer finalen Produktlänge von 8–12 Nukleotiden abgebaut werden können (Minskaia *et al.*, 2006). Die Verwendung kürzerer ssRNA-Oligonukleotide hingegen zeigte, dass ssRNA-Substrate von < 8nt Länge nicht erkennbar degradiert werden (Minskaia *et al.*, 2006). Die vermutete Untergrenze der Substratlänge, die für eine signifikante Spaltung durch die SARS-CoV-ExoN erforderlich ist, wurde deshalb auf einen Bereich von etwa 9–12 Nukleotiden geschätzt. Studien zur Bestimmung der minimal erforderlichen Länge von dsRNA-Substraten mit einem 3'-terminal ungepaarten Nukleotid wurden bisher nicht durchgeführt. Um die von ExoN benötigte Minimallänge eines partiellen dsRNA-Substrats zu ermitteln und erste Hinweise auf die Größe der ExoN-RNA-Bindungsstelle zu erhalten, wurden im folgenden Experiment dsRNA-Substrate von 8, 10 und 22 Nukleotiden Länge (mit jeweils einem 3'-nichtgepaarten Nukleotid) mit ExoN inkubiert (Abbildung 22). Bei den untersuchten Substraten handelte es sich um die partielle dsRNA R5, R11 und R12 (Liste in Abschnitt 3.1.6.2). Die Versuchsdurchführung der folgenden Abschnitte 5.2.8.1–5.2.8.3 entsprach den bereits zu Beginn aufgeführten Reaktionsbedingungen.

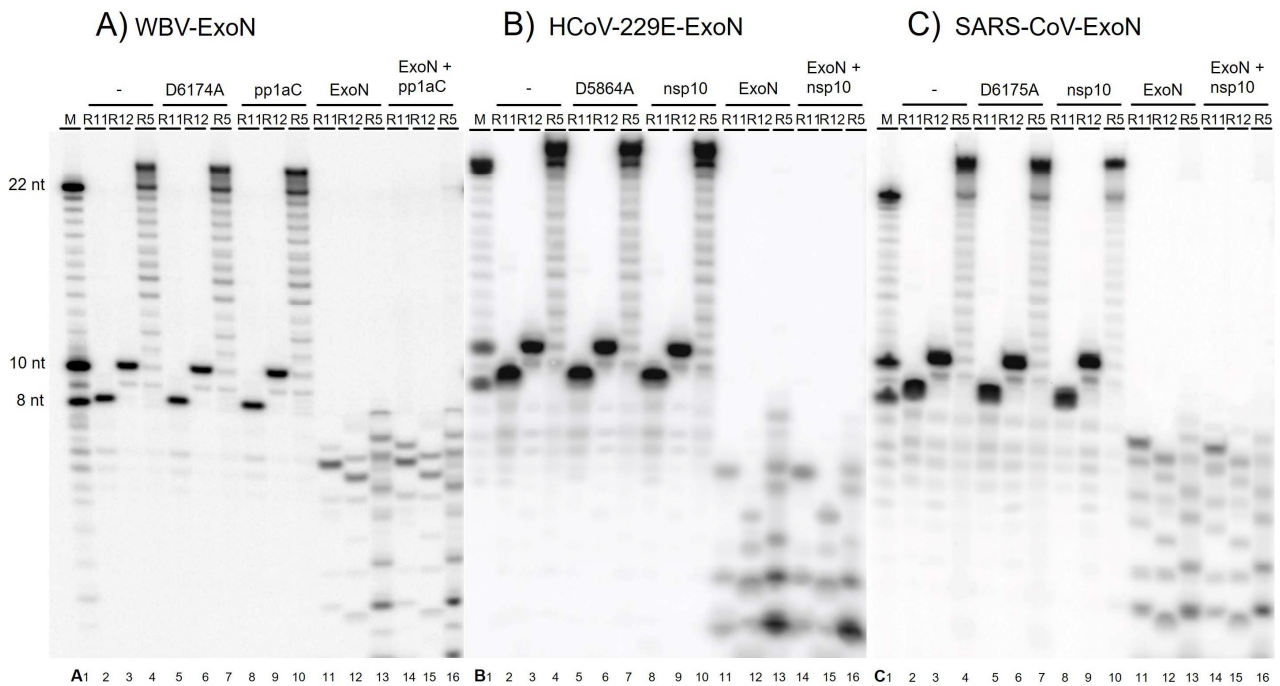
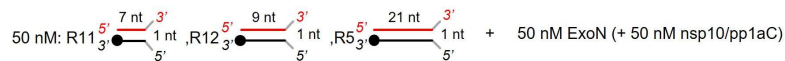


Abbildung 22: Spaltung partiell doppelsträngiger RNA unterschiedlicher Länge durch ExoN-Proteine von WBV, HCoV-229E und SARS-CoV. Für den Vergleich von Aktivitäten der drei viralen ExoNs (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) gegenüber partiell doppelsträngigen RNAs unterschiedlicher Länge wurden Reaktionen mit 50 nM RNA, 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC verwendet. Als RNA-Substrate wurden verschieden lange (R11=8 nt, R12=10 nt, R5=22 nt) partielle dsRNA-Oligos mit einem 3'-nichtgepaarten Adenin im Indikatorstrang eingesetzt. Die 20- μ l-Reaktionsansätze enthielten 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der entsprechenden viralen ExoN gestartet und der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol beendet. Die präzipitierten Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer aufgenommen, mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7M Harnstoff-Gel aufgetrennt und 5'- ^{32}P -markierte RNAs wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNA (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2, 3 und 4, Negativkontrolle (-) des Reaktionsansatzes ohne ExoN oder nsp10/pp1aC; Spuren 5, 6 und 7, Reaktion mit 50 nM inaktiver ExoN_D6174A Mutante; Spuren 8, 9 und 10, Reaktion mit 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren 11, 12 und 13, Reaktion mit 50 nM ExoN; Spuren 14, 15 und 16, Reaktion mit 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

5.2.8.1 WBV-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge

Abbildung 22A zeigt die durch WBV-ExoN induzierte Hydrolyse unterschiedlich langer dsRNA-Substrate mit einem 3'-nichtgepaarten Adenin-Nukleotid im 5'- ^{32}P -markierten Indikatorstrang. Dabei zeigte sich, dass WBV-ExoN sowohl allein (Spur A11–A13) als auch in Kombination mit pp1aC (Spur A14–A16) alle drei Substrate (R11, R12 und R5) spalten kann. Interessanterweise wurde das 8-nt-lange Substrat (R11) degradiert (Spur A11 und A14), während sich in einer früheren Arbeit eine 8 nt lange ssRNA als weitgehend resistent gegenüber einer Spaltung durch die SARS-CoV-ExoN erwiesen hatte (Minskaia *et al.*, 2006). Auf der

Grundlage dieser Unterschiede kann vermutet werden, dass die Hybridisierung des 8-nt-langen RNA-Substrats R11 dazu führt, dass ExoN stabiler an das Substrat gebunden bleibt, sodass auch eine kleinere (<8 nt) RNA weiterhin als funktionelles Substrat dienen kann. Bei einem Vergleich der hier ermittelten Reaktionsprodukte des 8 Nukleotide langen dsRNA-Ausgangssubstrats R11 (Spur A11) mit denen der längeren Substrate R12 und R5 (Spuren A12/A13 und A15/A16) wird deutlich, dass längere Ausgangssubstrate tendenziell zur Bildung erhöhter Mengen kleinerer Spaltprodukte führen. Das Hauptprodukt der Hydrolyse des Substrats R11 (Spur A11) wies eine Länge von etwa 5 Nukleotiden auf, was darauf hindeutet, dass dies möglicherweise die minimale RNA-Länge ist, die für eine ausreichende Bindung durch WBV-ExoN benötigt wird. Der zuvor für kürzere Inkubationszeiten und niedrigeren Proteinkonzentrationen beobachtete stimulierende Effekt von pp1aC auf die WBV-ExoN-Aktivität (Abbildung 19) zeigte sich in diesem Experiment weniger deutlich (Spuren A13–A18).

5.2.8.2 HCoV-229E-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge

Abbildung 22B zeigt im zweiten Teilbereich der Untersuchung die ermittelte HCoV-229E-ExoN-Aktivität gegenüber unterschiedlich langen dsRNA-Oligonukleotiden mit einem 3'-nichtgepaarten Adenin-Nukleotid. HCoV-229E-ExoN allein (Spur B11–B13) sowie in Kombination mit 50 nM nsp10 (Spur B14–B16) spaltete alle verwendeten Substrate (R11, R12 und R5). HCoV-229E-ExoN degradierte auch das kleinste, 8 Nukleotide lange dsRNA-Substrat R11 sehr effizient (Spur B11). Das auffälligste Reaktionsprodukt wies ebenfalls eine Länge von etwa 5 Nukleotiden auf, wie bereits für die WBV-ExoN beschrieben. Auch die Substrate R12 (Spuren B12/B15) und R5 (Spuren B13/B16) wurden effizient degradiert, zeigten jedoch im Vergleich zu R11 (Spuren B11/B14) eine Tendenz zur Bildung kleinerer Spaltungsprodukte (1–5 nt). Somit konnte auch für HCoV-229E-ExoN gezeigt werden, dass kleine dsRNA-Substrate effizient gespalten werden, solange es sich bei dem Ausgangssubstrat um eine dsRNA handelt und vermutlich eine Mindestlänge von etwa 5 Nukleotiden nicht unterschritten wird. Wie bereits für WBV gezeigt und beschrieben, führte die zusätzliche Verwendung von nsp10 im Reaktionsansatz mit ExoN unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur zu

einer geringgradigen Steigerung der Bildung kleiner Reaktionsendprodukte (vgl. Spuren C13 und C16).

5.2.8.3 SARS-CoV-ExoN-Aktivität bei dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge

Abbildung 22C zeigt im dritten Teilabschnitt der Untersuchung die ermittelte SARS-CoV-ExoN-Aktivität gegenüber dsRNA-Substraten unterschiedlicher Länge. Alle Substrate wiesen ein 3'-nichtgepaartes Adenin-Nukleotid im 5'-[³²P]-markierten Indikatorstrang. SARS-CoV-ExoN allein als auch Kombination mit nsp10 degradierte dabei alle drei Substrate (R11, R12 und R5; Spuren C11–C13 sowie C14–C16). Ähnlich wie für WBV- und HCoV-229E-ExoN beobachtet, spaltete SARS-CoV-ExoN das kleinste hier verwendete dsRNA-Substrat R11 (Spuren C11/C14) unter Bildung von <5 nt langen Reaktionsprodukten. Beim Vergleich der Reaktionsprodukte der Degradation von R11, R12 und R5 (Spuren C11 bis C13) fällt erneut auf, dass mit zunehmender Substratlänge die Bildung kleinerer Reaktionsprodukte begünstigt wird. Die aktivitätsstimulierende Wirkung von nsp10 auf die ExoN-Aktivität ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen auch für die SARS-CoV-ExoN nur sehr schwach ausgeprägt (vgl. Spuren C11–13 mit C14–16).

5.2.9 Nachweis der ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit 1–3 intern nichtgepaarten Nukleotiden

Im Rahmen der Untersuchungen zur Funktion des vermuteten ExoN-basierten Fehlerkorrekturmechanismus wäre die Möglichkeit einer ExoN-Aktivierung durch interne Fehlpaarungsereignisse von höchstem Interesse (RdRp-Unabhängigkeit). Vor dem Hintergrund der bereits ermittelten ExoN-Substratspezifität, die auf eine Präferenz für ein 3'-terminal nichtgepaartes RNA-Substrat sowie auf eine verminderte ExoN-Aktivität gegenüber vollständig gepaarter dsRNA hinweist, sollte es möglich sein, eine potentielle Aktivierung von ExoN durch interne Fehlpaarungen festzustellen oder auszuschließen. Um zu ermitteln, ob interne Fehlpaarungsereignisse eine ExoN-Aktivierung ermöglichen, wurden die untersuchten Exon-Funktionen mit den Substraten R13, R14 und R15 unter identischen Bedingungen inkubiert. Die Substrate besitzen jeweils 1–3 intern nichtgepaarte Adenin-Nukleotide des Indikatorstranges sowie 1–3

nichtkomplementäre, nichtgepaarte Guanin-Nukleotide des Komplementärstranges (Liste in Abschnitt 3.1.6.2) und wurden bislang auch für SARS-CoV-ExoN in keiner Studie untersucht (Abbildung 23).

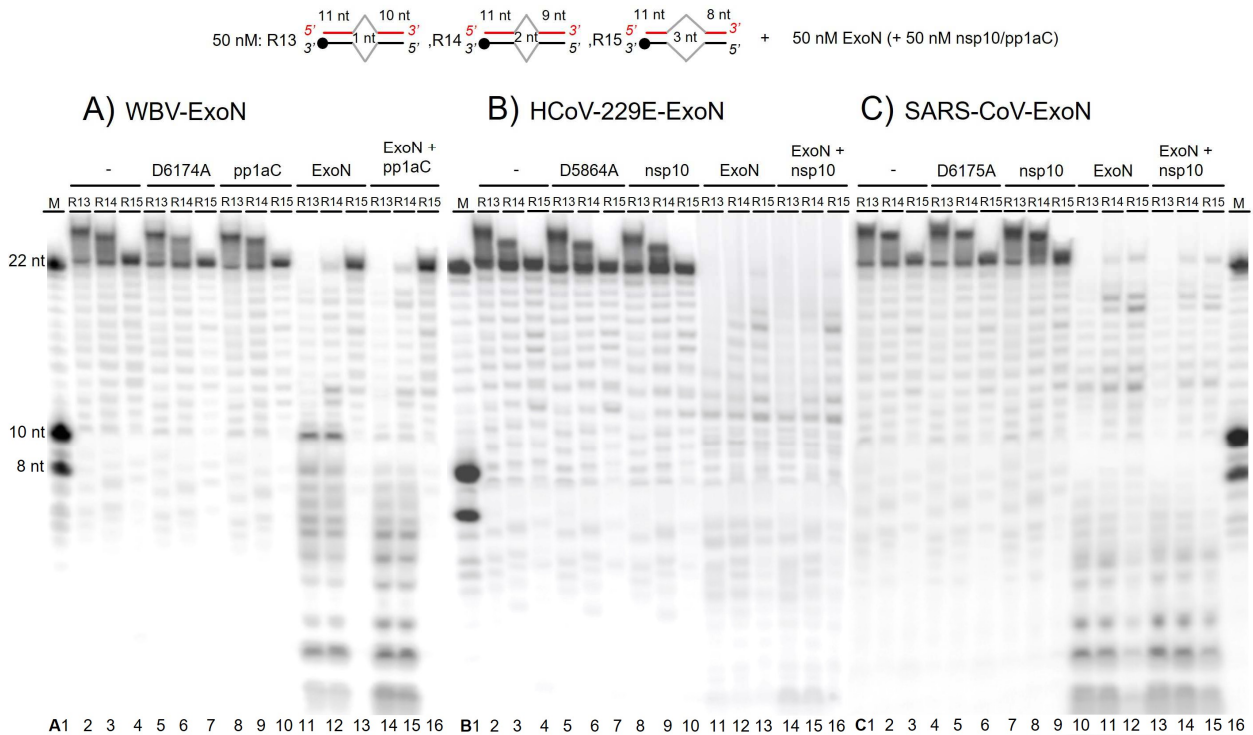


Abbildung 23: ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit 1–3 intern nichtgepaarten Nukleotiden. Für den ExoN-Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) auf partieller dsRNA wurden 50 nM RNA, 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. Die Substrate sind partielle dsRNA-Oligos, mit einem (R13), zwei (R14) oder drei (R15) intern nichtgepaarten Adenin-nt. Die 20- μ l-Reaktionen enthielten 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von ExoN induziert und die Ansätze für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol beendet. Die präzipitierten Reaktionsprodukte wurden anschließend in 8 μ l FU-Auftragspuffer gelöst und mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Radioaktiv markierte Reaktionsprodukte wurden mittels Phosphorimaging visualisiert. Spuren A1, B1 und C16, Marker-RNA (M) von 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren A/B2–4 und C1–3, Negativkontrolle ohne ExoN oder nsp10/pp1aC; Spuren A/B5–7 und C4–6, 50 nM ExoN-D6147A-Mutante; Spuren A/B8–10 und C7–9, 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren A/B11–13 und C10–12, 50 nM ExoN; Spuren A/B14–16 und C13–15 der Reaktionsansatz mit einer Kombination aus 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

5.2.9.1 WBV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit 1–3 intern nichtgepaarten nt

Abbildung 23A zeigt die ermittelte WBV-ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit ein bis drei intern nichtgepaarten Nukleotiden. Dabei zeigte sich, dass WBV-ExoN sowohl allein (Spuren A11–A13) als auch in Kombination mit pp1aC (Spuren A14–A16) die RNA-Substrate R13 und R14 trotz vollständig gepaarten 3'-Enden, erfolgreich degradierte (Spuren A11/12, A14/15). Wie bereits im Abschnitt 5.2.5.1

beobachtet, wurde jedoch auch in dieser Untersuchung das R14-Substrat mit zwei nichtgepaarten Nukleotiden weniger effektiv von WBV-ExoN gespalten als das R13-Substrat mit nur einem nichtgepaarten Nukleotid (vgl. Spur 11 mit 12 und Spur 14 mit 15). Im Gegensatz dazu wurde das in seiner Sequenz identische Substrat R15 mit drei intern ungepaarten Nukleotiden nicht erkennbar degradiert (Spuren A13/A16). Somit zeigt sich auch in diesem Versuchsansatz ein Art Substratselektivität, also eine unterschiedlich starke ExoN-Aktivierung durch verschiedene dsRNA-Substrate. Dabei ist zu beobachten, dass mit steigender Anzahl ungepaarter Nukleotide die ExoN-eigene Nukleaseaktivität deutlich abnimmt (vgl. Spur A11 mit A12 und A13). Besonders interessant ist die gesteigerte ExoN-Aktivität durch interne Fehlpaarungsereignisse, insbesondere im Vergleich zur geringen ExoN-Aktivität bei vollständig gepaarter dsRNA (Abschnitt 5.2.4.). Der ebenfalls untersuchte Einfluss des Coronavirus-nsp10-Orthologs WBV-pp1aC auf die WBV-ExoN-Aktivität zeigt auch in diesem Versuchsansatz bei Zugabe von 50 nM pp1aC (Spuren A14–A16) positive Auswirkungen auf die ExoN-Aktivität, erkennbar an einer stärkeren Akkumulation kürzerer Spaltungsprodukte (vgl. Spuren A11/12 mit A14/15). Die erhöhte Akkumulation kurzer Spaltungsprodukte (etwa 1–10 nt) sowie die geringere Menge verbliebener längerer Spaltungsintermediate (etwa 10–22 nt) bei einer Kombination von ExoN und pp1aC vermitteln somit den Eindruck einer verbesserten Spaltungseffizienz oder einer gesteigerten Substratzugänglichkeit. Dennoch bleibt WBV-ExoN durchaus auch ohne den Einfluss von pp1aC in der Lage, die bevorzugten Substrate effizient zu hydrolysieren (Spuren A11–A13).

5.2.9.2 HCoV-229E-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit 1–3 intern nichtgepaarten nt

Abbildung 23B zeigt im zweiten Abschnitt des Experimentes die HCoV-229E-ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit ein bis drei intern nichtgepaarten Nukleotiden. Im Gegensatz zu WBV-ExoN ist HCoV-229E-ExoN sowohl allein (Spur B11–B13) als auch in Kombination mit HCoV-229E-nsp10 (Spur B14–B16) in der Lage, alle drei Substrate zu degradieren. Dabei zeigten sich die kürzesten Spaltungsprodukte bei einer Inkubation mit dem Substrat R13, das nur eine interne Fehlpaarung aufweist (Spuren B11/B14). Auch das Substrat R14 mit einer zwei Nukleotide langen Fehlpaarung wurde degradiert, jedoch sind hier

im Vergleich mit R13 längere Spaltungsintermediate zu beobachten (Spuren B12/B15). Das Substrat R15 mit drei internen Fehlpaarungen wurde am ineffizientesten hydrolysiert und zeigt die längsten Spaltungsintermediate nach 60 min Inkubation (Spuren B13/B16). Die längeren Spaltungsprodukte der Substrate R14 und R15 bestätigen im Vergleich zu R13, dass auch die HCoV-229E-ExoN-Hydrolyseaktivität mit steigender Anzahl intern nichtgepaarter Nukleotide abnimmt. Im Vergleich zur geringeren Aktivierung von WBV-ExoN bei vollständig gepaarter dsRNA sowie partieller dsRNA mit mehr als einem fehlgepaarten Nukleotid deutet hier die stärkere HCoV-229E-ExoN-Aktivität erneut auf eine geringere Substratelektivität beziehungsweise auf eine höhere Grundaktivität hin. Die insgesamt dennoch stärkere Aktivität bei einer Inkubation mit dem Substrat R13 bestätigt eine bevorzugte Spaltung von dsRNA mit einem ungepaarten Nukleotid. Aufgrund der hohen Grundaktivität von HCoV-229E-ExoN allein (Spuren B11–B13) ist der beobachtete Einfluss des Kofaktors nsp10 auf die Länge der Reaktionsprodukte (Spuren B14–B16) relativ gering. Allerdings stellt die stärkere Akkumulation kleinerer Spaltungsprodukte (etwa 1–5 nt) sowie das geringere Auftreten längerer Spaltungsintermediate (etwa 13–22 nt) erneut ein Anzeichen – zumindest *in vitro* – für eine unterstützende Funktion von HCoV-229E-nsp10 dar (Spuren B14–B16).

5.2.9.3 SARS-CoV-ExoN-Aktivität auf partieller ds RNA mit 1–3 intern nichtgepaarten nt

Abbildung 23C zeigt im dritten Teilabschnitt des Experimentes die durch SARS-CoV-ExoN induzierte Spaltungsaktivität auf partieller dsRNA mit 1–3 intern nichtgepaarten Nukleotiden. Auch SARS-CoV-ExoN allein (Spuren C10–C12) sowie in Kombination mit SARS-CoV-nsp10 (Spuren C13–C15) zeigte die Fähigkeit, alle drei Substrate (R13–15) zu degradieren. Ähnlich wie bei der HCoV-229E-ExoN-Aktivität zeigten sich die kürzesten Spaltungsprodukte bei einer Inkubation mit dem Substrat R13, das nur eine interne Fehlpaarung besitzt (Spuren C10/C13). Bemerkenswert ist, dass SARS-CoV-ExoN trotz gepaartem 3'-Ende des Substrats R13 mit interner Fehlpaarung, eine stärkere Aktivierung zeigte als bei vollständig gepaarter dsRNA im zuvor beschriebenen Experiment 5.4.2. Ebenfalls wurde das Substrat R14 mit zwei Fehlpaarungen degradiert, allerdings sind hier im Vergleich mit R13 längere Spaltungsintermediate zu beobachten

(Spuren C11/C14). Das Substrat R15 mit drei internen Fehlpaarungen hingegen wird am ineffizientesten hydrolysiert und zeigt auch für SARS-CoV-ExoN die längsten Spaltungsintermediate nach 60 min Inkubation (Spuren C12/C15). Folglich ist die zuvor beobachtete Abnahme der Spaltungseffektivität mit steigender Anzahl intern nichtgepaarter Nukleotide auch bei SARS-CoV-ExoN zu beobachten, was die bereits zuvor beschriebene ExoN-Substratpräferenz für dsRNA mit einem ungepaarten Nukleotid bestätigt. Die Einflüsse von SARS-CoV-nsp10 auf die Spaltungseffektivität sind hier im Vergleich zu WBV und HCoV-229E ähnlich moderat, jedoch nachweisbar. Tendenziell sind bei einer Kombination von ExoN und nsp10 weniger lange Reaktionsintermediate im Bereich von etwa 13–22 Nukleotiden sowie eine erhöhte Akkumulation kleinerer Produkte mit einer Länge von etwa 1–7 Nukleotiden zu beobachten (Spuren C13–C15). Dies bestätigt die bereits zuvor festgestellte stimulierende Wirkung von nsp10 auf die nukleolytische Aktivität von ExoN.

5.2.10 Einfluss der Anzahl und Positionierung interner Fehlpaarungen

Nach der erstmaligen Demonstration der ExoN-vermittelten Hydrolyse von dsRNA mit intern nichtgepaarten Nukleotiden sollten mithilfe der nachfolgenden Untersuchungen (Kapitel 5.2.10.1–5.2.10.3) die Auswirkung einer Positionsveränderung der internen Fehlpaarung (d. h. des Abstands zum 3'-Ende) sowie der Einfluss einer zusätzlichen 1-nt-Fehlpaarung auf die ExoN-Aktivität untersucht werden. Um Einblicke in die Auswirkungen einer 5'-Verschiebung eines intern nichtgepaarten Adenin-Nukleotides auf die ExoN-Aktivität zu erhalten, wurden die verschiedenen ExoN-Orthologe mit dem Substrat R16 inkubiert. R16 besitzt einen um 7 Nukleotide verlängerten, vollständig hybridisierten 3'-Bereich mit einer Länge von 17 bp bis zum Fehlpaarungsereignis. Die Vergrößerung des Abstands der Fehlpaarung zum 3'-terminalen Startpunkt der ExoN sollte zeigen, ob weiter 5'-gelegene interne Fehlpaarungen oder längere 3'-ds-Bereiche die ExoN-Aktivität beeinflussen können. Mithilfe der Substrate R17 und R18 hingegen, die entweder zwei aufeinanderfolgende interne (1-nt-lange) Fehlpaarungen oder eine interne Fehlpaarung in Kombination mit einem zusätzlichen 3'-terminalen, nichtgepaarten Adenin-Nukleotid tragen, sollten mögliche Einflüsse multipler und unterschiedlich positionierter Fehlpaarungen auf die ExoN-Aktivität untersucht werden (Abbildung 24).

R18 vorliegen, scheinen keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation zu besitzen, zeigen jedoch ohne pp1aC (Spuren A12/13) eine geringfügig erhöhte Akkumulation längerer Spaltungsintermediate (etwa 20–19 nt). Die durchschnittlichen Längen der prominentesten Reaktionsprodukte aller untersuchten Substrate liegen mit etwa 1–10 nt im gleichen Produktlängenbereich wie in den Versuchen 5.2.5.1 und 5.2.9.1 mit intern beziehungsweise 3'-lokalisierten Fehlpaarungen. Dies spricht insgesamt gegen eine signifikant negative Beeinflussung der WBV-ExoN-Hydrolyseeffizienz durch eine erhöhte Anzahl an (Einzel-)Fehlpaarungen oder durch eine größere Distanz (7 nt) einer einzelnen Fehlpaarung zum 3'-terminalen Startpunkt der Nukleolyse. Für den bereits in mehreren Versuchen beobachteten positiven Einfluss von WBV-pp1aC spricht hierbei die leichte Tendenz zu kürzeren Reaktionsprodukten bei Zugabe von pp1aC in den Spuren A14–A16 sowie die etwas stärkere Akkumulation längerer Spaltungsprodukte (etwa 19–20 nt) ohne Zugabe von pp1aC (Spuren A11–A13).

5.2.10.2 HCoV-229E-ExoN Aktivität auf dsRNA mit intern nichtgepaarten nt

Abbildung 24B zeigt im zweiten Abschnitt des Experimentes die HCoV-229E-ExoN-Aktivität gegenüber partieller dsRNA mit unterschiedlich positionierten Fehlpaarungsereignissen. HCoV-229E-ExoN weist dabei sowohl allein (Spuren B11–B13) als auch in Kombination mit HCoV-229E-nsp10 (Spuren B14–B16) eine effektive Degradation aller drei Substrate (R16, R17, R18) auf. Die durchschnittlichen Längen aller Reaktionsprodukte bewegen sich dabei zwischen etwa 1–8 Nukleotiden. Die HCoV-229E-ExoN-vermittelte Hydrolyse der hier untersuchten Substrate ist ähnlich effizient wie die zuvor beschriebene Hydrolyse von Substraten mit einer zentral lokalisierten Fehlpaarung aus Abschnitt 5.2.9.2. sowie die Hydrolyse von Substraten mit 3'-terminalen Fehlpaarungen aus Abschnitt 5.2.5.2. Die effiziente Degradation des Substrats R16 (Spuren B11 und B14) verdeutlicht, dass eine 7-nt-Verlängerung der vollständig gepaarten Region zwischen dem nichtgepaarten Nukleotid und dem 3'-Ende (Startposition von ExoN) keinen wesentlichen Einfluss auf die Längen der Reaktionsprodukte hat. Zusätzliche Fehlpaarungen der untersuchten Substrate R17 und R18 scheinen – wie im Fall von WBV – ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation zu besitzen, zeigen jedoch sowohl mit als auch ohne pp1aC (Spuren B12/13 und

B15/16) eine geringfügig erhöhte Akkumulation längerer Spaltungsintermediate (etwas 6–8 nt). Der positive Einfluss von nsp10 ist auch hier aufgrund der hohen Grundaktivität von ExoN nur sehr schwach ausgeprägt. Dennoch entsteht der Eindruck einer leichten Tendenz zu kürzeren Reaktionsprodukten bei Zugabe von nsp10 in den Spuren B14–B16 (etwa 5–8 nt).

5.2.10.3 SARS-CoV-ExoN Aktivität auf dsRNA mit intern nichtgepaarten nt

Abbildung 24C zeigt im dritten Abschnitt des Experimentes die durch SARS-CoV-ExoN induzierte Hydrolyse partieller dsRNA mit unterschiedlich lokalisierten internen sowie mehreren 1-nt-Fehlpaarungen. Dabei ist SARS-CoV-ExoN in der Lage, die drei untersuchten Substrate (R16, R17 und R18) sowohl allein (Spuren C11–C13) als auch in Kombination mit SARS-CoV-nsp10 (Spuren C14–C16) zu degradieren. Die durchschnittlichen Längen aller Reaktionsprodukte bewegen sich dabei zwischen etwa 1–9 nt. In Übereinstimmung mit dem zuvor ermittelten Verhalten von HCoV-229E- und WBV-ExoN ist die durch SARS-CoV-ExoN induzierte Hydrolyse der hier untersuchten Substrate ähnlich effizient wie die Hydrolyse der Substrate mit zentral lokalisierter Fehlpaarung (Abschnitt 5.2.9.3.) sowie die Hydrolyse der Substrate mit 3'-terminalen Fehlpaarungen (Abschnitt 5.2.5.3.). Die Spaltung des Substrats R16 (Spuren C11/14) verdeutlicht somit auch für SARS-CoV-ExoN, dass eine Verlängerung der vollständig gepaarten Region zwischen dem nichtgepaarten Nukleotid und dem 3'-Ende (Startposition von ExoN) keinen erkennbar negativen Einfluss auf die Längen der Reaktionsprodukte hat. Die zusätzlich integrierten Fehlpaarungen der Substrate R17 und R18 scheinen in gleicher Weise keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation zu besitzen, zeigen jedoch eine minimal höhere Akkumulation längerer Spaltungsintermediate (etwa 8–20 nt). Der aktivitätsfördernde Einfluss von nsp10 ist auch hier aufgrund der hohen Grundaktivität von ExoN gering ausgeprägt. Gleichwohl ist eine leichte Tendenz zu kürzeren Reaktionsprodukten bei Zugabe von nsp10 in den Spuren C14–C16 zu beobachten (etwa 5–8 nt).

5.2.11 3'-5'-gerichtete ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit intern nichtgepaartem nt

Um die Auswirkungen der Blockierung beider 3'-Enden auch für die partiellen dsRNA-Substrate mit intern nichtgepaartem Nukleotid zu demonstrieren, wurden hier die Exoribonukleasen mit dem Substrat R13 und R13₂ unter den bereits beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Spaltung von R13 wurde bereits im Abschnitt 5.2.9 ermittelt und diente hier als Referenz für die Untersuchung der ExoN-Aktivität auf dem modifizierten Substrat R13₂. Im Gegensatz zum Substrat R13 besitzt R13₂ neben der 3'-Biotinylierung des nicht radioaktiv markierten Komplementärstranges eine zusätzliche 3'-Biotinylierung des radioaktiv markierten Indikatorstranges.

Neben dem Nachweis der 3'-5'-Polarität und der Bestätigung einer essentiellen Rolle des freien RNA 3'-OH-Endes für die Initiation der ExoN-Aktivität könnte zusätzlich durch eine ausbleibende Hydrolyse des Substrats R13₂ ausgeschlossen werden, dass WBV- und HCoV-229E-ExoN durch interne Fehlpaarungen auch endonukleolytisch aktiv werden (Abbildung 25).

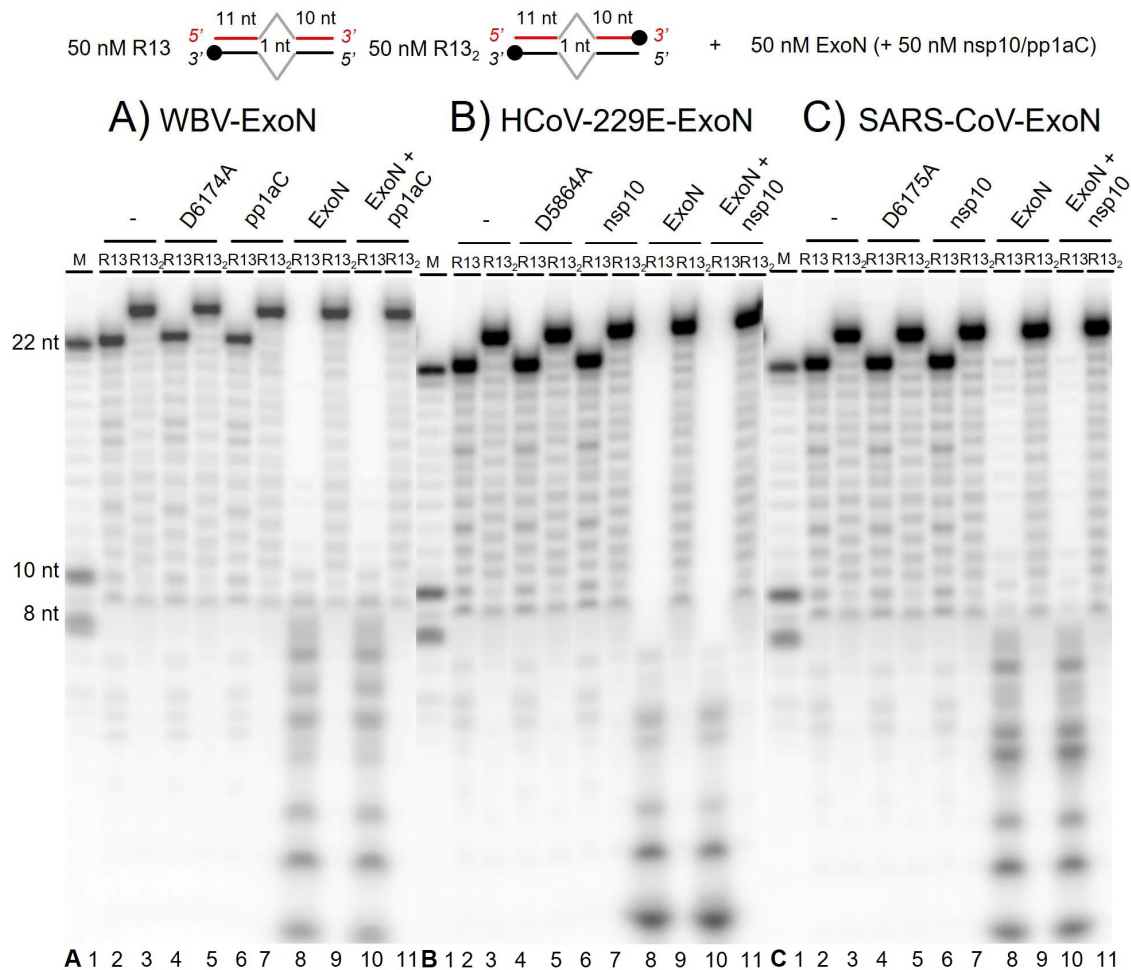


Abbildung 25: ExoN-Aktivität auf partiell gepaarter dsRNA mit und ohne Blockierung beider 3'-Enden. Für den ExoN-Aktivitätsvergleich (A: WBV, B: HCoV-229E, C: SARS-CoV) auf partieller dsRNA wurden 50 nM RNA, 50 nM ExoN und (oder) 50 nM nsp10/pp1aC in die Reaktion eingesetzt. Bei R13 und R13₂ handelt es sich um 22-nt-lange, partielle ds RNA-Oligos, mit (R13₂) und ohne (R13) beidseitige Biotin-Blockierung der 3'-Enden. Beide Substrate besitzen ein intern nichtgepaartes Adenin-nt an Position 12. Ein Reaktionsansatz (20 µl) besteht aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von ExoN gestartet, für 60 min bei 37 °C inkubiert und durch 0,3 M Natriumazetat sowie 200 µl Ethanol gestoppt. Die präzipitierten Spaltungsprodukte wurden in 8 µl FU-Auftragspuffer aufgenommen, mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt und durch die radioaktive Markierung mit Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNA (M) mit 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2 und 3, Negativkontrolle (-) der Reaktion ohne ExoN oder nsp10/pp1aC; Spuren 4 und 5, Reaktionen mit 50 nM der angegebenen ExoN-Mutanten; Spuren 6 und 7, Reaktionen mit 50 nM nsp10/pp1aC; Spuren 8 und 9, Reaktionen mit 50 nM ExoN; Spuren 10 und 11, Reaktionen mit einer Kombination aus 50 nM ExoN und 50 nM nsp10/pp1aC.

5.2.11.1 3'–5'-gerichtete WBV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung

Abbildung 25A zeigt die ermittelte WBV-ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit einem zentral lokalisierten, nichtgepaarten Nukleotid und einem (oder zwei) biotinylierten 3'-Ende(n). Wie bereits im Abschnitt 5.2.9 gezeigt werden konnte, ist WBV-ExoN allein (Spur A8) und in Kombination mit dem Coronavirus-nsp10-Ortholog pp1aC (Spur A10) in der Lage, das Substrat R13 ohne 3'-Biotinylierung des markierten Indikatorstranges signifikant zu degradieren. Die auffälligsten Spaltungsprodukte nach 60-minütiger Inkubation wiesen dabei eine Länge von etwa 1–9 nt auf. Im Gegensatz zum RNA-Substrat R13 konnte in den Spuren A9 und A11 keine WBV-ExoN-Aktivität bei Verwendung des Substrats R13₂ festgestellt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die beobachtete Degradierung des Substrats R13 (mit einem internen ungepaarten nt) nicht durch eine mögliche endonukleolytische Aktivität der ExoN erfolgt sein kann und untermauert zudem die bereits ermittelte essentielle Rolle eines frei zugänglichen 3'-OH-Endes für die 3'–5'-initiierte ExoN-Aktivität. Die Kombination von 50 nM WBV-ExoN und 50 nM pp1aC lässt aufgrund der bereits sehr effektiven Hydrolyse von ExoN allein (Spur A8) kaum auffälligen Unterschiede in den Produktlängen erkennen (vgl. Spuren A8 und A10). Ein leichtes Signal von etwa 15 nt langen Intermediaten in Spur A8 (ohne nsp10), das bei Zugabe von pp1aC in geringerer Intensität vorhanden ist (Spur A10), könnte jedoch auf den aktivitätsstimulierenden Einfluss von pp1aC hinweisen.

5.2.11.2 3'–5'-gerichtete HCoV-229E-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung

Abbildung 25B zeigt im zweiten Abschnitt des Experimentes die ermittelte nukleolytische Aktivität von HCoV-229E-ExoN auf partieller dsRNA mit einer zentral lokalisierten Fehlpaarung und einem (R13) beziehungsweise zwei (R13₂) biotinylierten RNA 3'-Enden. HCoV-229E-ExoN ist dabei allein (Spur B8) sowie in Kombination mit HCoV-229E-nsp10 (Spur B10) in der Lage, das Substrat R13 ohne 3'-Biotinylierung des markierten Stranges signifikant zu degradieren. Die durchschnittlichen Längen der Reaktionsprodukte liegen bei einer Inkubation mit ExoN allein und in Kombination mit nsp10 zwischen etwa 1 und 6 nt (Spuren B8 und B10). In Gegensatz zum Substrat R13 zeigt HCoV-229E-ExoN keine

Aktivierung in Kombination mit dem Substrat R13₂, das eine zusätzliche 3'-Biotin-Modifizierung trägt (Spuren B9 und B11). Somit bestätigt HCoV-229E-ExoN die zuvor ermittelte Aktivierung durch eine interne Fehlpaarung, die 3'-5'-Polarität sowie die Abhängigkeit von einem freien 3'-OH-Ende. Bei einer Kombination von 50 nM HCoV-229E-ExoN und 50 nM HCoV-229E-nsp10 (Spuren B10 und B11) zeigt sich erneut aufgrund der hohen Aktivität von ExoN allein (Spuren B8 und B9), nur ein leicht positiver Einfluss von nsp10 auf die ermittelte Spaltungseffektivität. Dabei ist bei Zugabe von nsp10 eine geringere Akkumulation längerer Spaltungsprodukten (etwa 6–7 nt) zu beobachten (Spur B10).

5.2.11.3 3'-5'-gerichtete SARS-CoV-ExoN Aktivität auf partieller dsRNA mit interner Fehlpaarung

Abbildung 25C zeigt im letzten Abschnitt der Untersuchung die ermittelte SARS-CoV-ExoN-Aktivität auf partieller dsRNA mit einem intern nichtgepaarten Nukleotid und einem (R13) oder zwei (R13₂) blockierten RNA 3'-Enden. Ohne die zusätzliche Blockierung des zweiten 3'-Endes durch ein Biotin zeigt SARS-CoV-ExoN allein (Spur C8) sowie in Kombination mit SARS-CoV-nsp10 (Spur C10) eine signifikante Degradation des Substrats R13. Die durchschnittlichen Längen der Reaktionsprodukte lagen hierbei zwischen etwa 1 und 8 nt. SARS-CoV-ExoN bekräftigt somit die neuen Erkenntnisse einer effektiven Aktivierung durch interne Fehlpaarungsereignisse. Keine Aktivität hingegen zeigt SARS-CoV-ExoN bei einer Modifizierung beider 3'-Enden des Substrats R13₂ (Spuren C9 und C11) und betont die bereits in den Abschnitten 5.2.2 und 5.2.6.3 ermittelte 3'-5'-Polarität sowie die Abhängigkeit von einem freien 3'-OH-Ende des RNA-Substrats. Ein möglicher aktivitätsstimulierender Einfluss von SARS-CoV-nsp10 (vgl. Spuren C8 und C10) zeigte sich nur in geringem Maße durch eine geringere Akkumulation längerer Spaltungsintermediate (etwa 11–22 nt).

5.3 Mutagenese konservierter Reste der ExoN-Motive I–III

Um die bereits erwähnte Bedeutung konservierter Reste innerhalb der ExoN-Motive I–III, die zuvor für SARS-CoV-ExoN beschrieben wurden (Minskaia *et al.*, 2006), auch für die in dieser Arbeit untersuchten WBV-ExoN und HCoV-229E-ExoN-Domänen zu bestätigen, wurden die Auswirkungen einer Alanin-Substitution der fünf konservierten Aminosäuren (DEDDh) des vermuteten aktiven Zentrums untersucht (Anhang 10.2, Alignment). Dabei wurden folgende Substitutionen in WBV-ExoN vorgenommen: M1, D5980A; M2, E5982A; M3, D6082A; M4, H6169A und M5, D6174A. Im HCoV-229E-nsp14 wurde folgende Aminosäuresubstitutionen integriert und verglichen: D5682A, E5684A, E5783A, H5859A und D5864A. Bei den mutierten und hier untersuchten konservierten katalytischen Aminosäuren (DEDDh) handelt es sich um die vermuteten Mg²⁺-koordinierenden Reste innerhalb der drei konservierten ExoN-Sequenzmotive I–III (Anhang 10.2, Alignment). Diese sind charakteristisch für nidovirale ExoN-Domänen sowie für verwandte ExoN-Homologe zellulärer DNA-Reparaturmechanismen (Snijder *et al.*, 2003; Zuo, 2001).

Die Ermittlung der ribonukleolytischen Aktivität von ExoN und dessen Mutanten erfolgte – mit Ausnahme der Inkubationsdauer – entsprechend dem zuvor und im Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Protokoll. Um mögliche Unterschiede in der Spaltungseffizienz besser bestimmen zu können, wurden der WBV- und HCoV-229E-ExoN-Wildtyp (ohne Substitution) sowie deren Motiv I–III Mutanten nach dem Start der Reaktion zu drei verschiedenen Zeitpunkten (5, 10 und 20 min) gestoppt und nebeneinander aufgetragen. Für den Vergleich der ermittelten ExoN-Aktivität einzelner Mutanten mit den bereits durchgeführten Untersuchungen wurde das Substrat R5 mit einem 3'-terminal lokalisierten, nichtgepaarten Nukleotid verwendet (Abbildung 26).

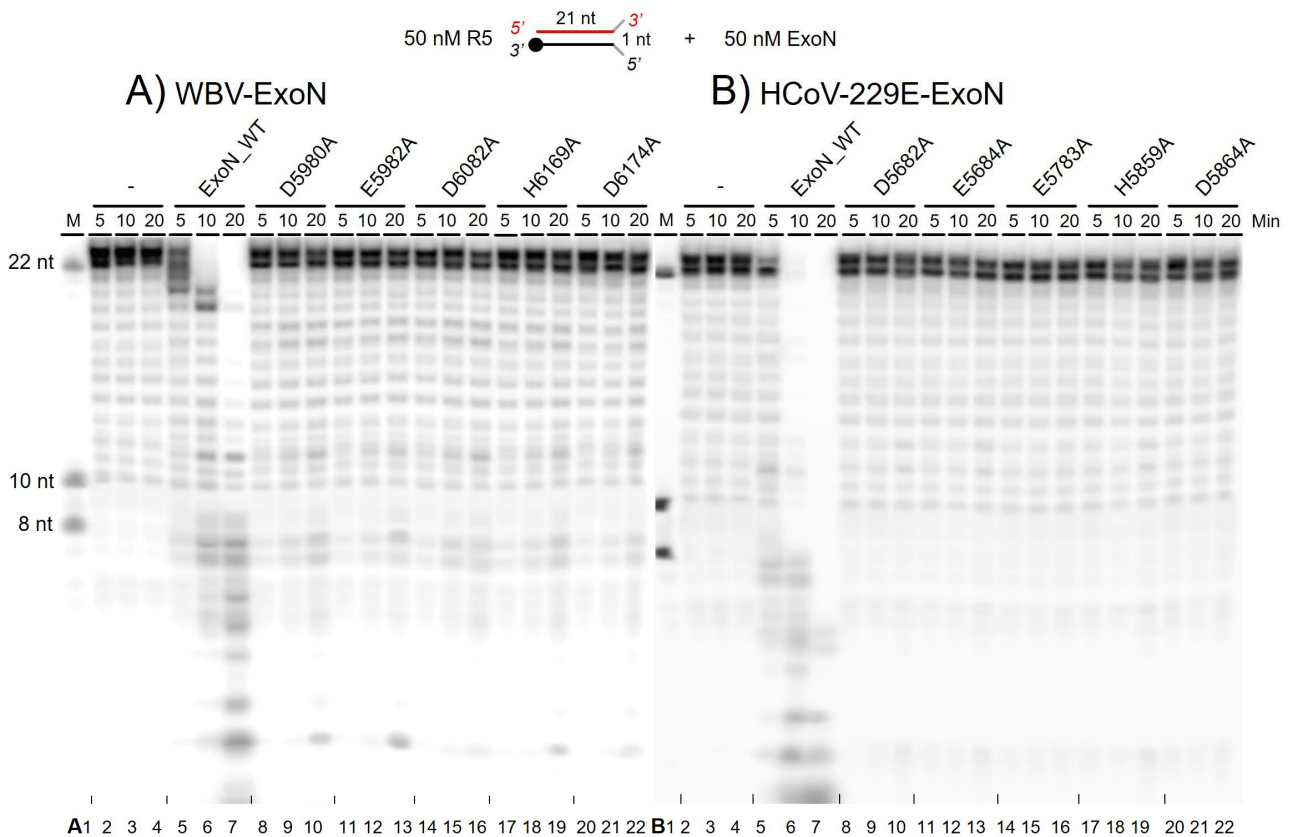


Abbildung 26: Vergleich der ExoN-Aktivität verschiedener Motiv-I-III-Mutanten. Für die Bestimmung der ExoN-Aktivitäten wurde die zeitabhängige Spaltung des dsRNA-Substrats R5 untersucht. R5 ist ein 22-nt-langes, partiell dsRNA-Oligo mit einem 3'-lokalisierten, nichtgepaarten Adenin-nt. Es wurden 50 nM RNA und 50 nM ExoN (und ExoN-Mutanten) in die Reaktion eingesetzt. Der 20 μ l-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet, die Ansätze für 5-, 10- und 20 min bei 37 °C inkubiert und durch 0,3 M Natriumazetat und 200 μ l Ethanol gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden in 8 μ l FU-Auftragspuffer aufgenommen, mit dem hier gezeigten 12 % PAA/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt und mittels Phosphorimaging visualisiert. Spur 1, Marker-RNA (M) mit 22-, 10- und 8 nt Länge; Spuren 2, 3 und 4, Negativkontrollen (-) ohne ExoN; Spuren 5, 6 und 7, Reaktionen mit 50 nM ExoN-WT; Spuren 8, 9 und 10, 50 nM der D5980A- (A), D5682A- (B) ExoN-Motiv-I-Mutanten; Spuren 11, 12 und 13; 50 nM der E5982A- (A), E5684A- (B) ExoN-Motiv-I-Mutanten; Spuren 14, 15 und 16, 50 nM der D6082A- (A), E5783A- (B) ExoN-Motiv-II-Mutanten; Spuren 17, 18 und 19, 50 nM der H6169A- (A), H5859A- (B) ExoN-Motiv-III-Mutanten; Spuren 20, 21 und 22, 50 nM der D6174A- (A), D5864A- (B) ExoN-Motiv-III-Mutanten.

5.3.1 Abhängigkeit der WBV-ExoN Aktivität von DEDDh-Resten innerhalb der ExoN-Motive I–III

Abbildung 26A zeigt die nukleolytische Aktivität von WBV-ExoN im Vergleich mit den Aktivitäten der fünf WBV-ExoN-Mutanten auf dem Substrat R5. Die Mutanten tragen Ala-Substitutionen der vermuteten Mg²⁺-koordinierenden Reste innerhalb der drei konservierten ExoN-Sequenzmotive I–III (Anhang 10.2, Alignment). Bei Verwendung des wildtypischen WBV-ExoN ist eine deutliche Degradierung des Substrats R5 zu beobachten, die im zeitlichen Verlauf (stufenartig) zu einer Akkumulation kleinerer Reaktionsprodukte führte (Spuren A5–A7). Die in den Spuren A5–A7 zu beobachtenden Spaltungsprodukte wiesen bereits nach 20 min Inkubation überwiegend Längen von etwa 1–8 nt auf und bestätigen damit erneut die zuvor beobachtete ExoN-Aktivität auf dem Substrat R5. Im Gegensatz zur Aktivität des ExoN-Wildtyps sind für die Mutanten kaum ExoN-induzierte Spaltungsaktivitäten zu erkennen. Für die WBV-Mutanten ist lediglich eine sehr geringe Akkumulation von 1-nt-langen Reaktionsprodukten in den 20-min-Ansätzen zu beobachten (Spuren A8–A22), die eine gewisse Restaktivität anzeigen. Trotz der wenig detektierbaren Akkumulation kleinerer Spaltungsprodukte zeigte sich anhand der Mengenunterschiede, dass die Mutanten D5985A (Spuren A8–A10) und E5982A (Spuren A11–A13) des Motives I sowie H6169A des Motives III (Spuren A17–A19) etwas stärkere Restaktivitäten als die Mutanten D6082A des Motives II (Spuren A14–A16) und D6174A des Motives III (Spuren A20–A22) aufwiesen. Trotz dieser geringfügigen Unterschiede zeigten die nahezu unveränderten Signalintensitäten der Ausgangssubstratbanden nach einer Inkubation von 20 min sowie die nur in sehr geringer Menge detektierbaren Reaktionsprodukte aller Mutanten, dass Alanin-Substitutionen der konservierten Reste in den ExoN-Motiven I–III zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung der nukleolytischen Aktivität von WBV-ExoN führen. Die untersuchten konservierten Reste sind damit für die ExoN-Aktivität von zentraler Bedeutung.

5.3.2 Abhängigkeit der HCoV-229E-ExoN Aktivität von DEEDh-Resten innerhalb der ExoN-Motive I–III

Abbildung 26B zeigt im zweiten Teil der Untersuchung die Aktivitätsanalyse von HCoV-229E-ExoN sowie der daraus abgeleiteten Mutanten mit Ala-Substitutionen putativer Mg²⁺-koordinierender Aminosäurereste des aktiven Zentrums (Minskaia *et al.*, 2006). Der HCoV-229E-ExoN-Wildtyp degradiert das hier verwendete Substrat R5 im Verlauf einer 20-min-Inkubation vollständig (Spuren B5–B7). Bereits nach 10 min Inkubationszeit ist der überwiegende Anteil des Substrats R5 bis zu einer Länge von etwa 8 nt hydrolysiert (Spur B6). Im Vergleich zur Aktivität des ExoN-Wildtyps zeigten die untersuchten Mutanten keine klar nachweisbare Degradierung des Substrats R5 (Spuren B8–B22), was die essentielle Bedeutung der substituierten Reste für die HCoV-229E-ExoN-Aktivität bestätigt.

6 Diskussion

Die zuverlässige Weitergabe genomischer Information ist essenziell für die Entwicklung und das Fortbestehen allen Lebens. Im Fall der RNA-Viren besteht aufgrund der weitgehend fehlenden post- und ko-replikativen Fehlerkorrektur sowie der gleichzeitig hohen Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) eine erhöhte Mutationsrate, wodurch sich die Größenlimitierung von RNA-Virusgenomen erklären lässt (Drake, 1993). Genomgrößen von RNA-Viren rangieren innerhalb der RNA-Viren zwischen etwa 3 und 61 kb (Kilobasen, 10^3), wohingegen virale DNA-Genome, unter anderem aufgrund der höheren replikativen Genauigkeit, Größen von bis zu 2,5 Mb (Megabasen, 10^6) erreichen können (Sanjuán *et al.*, 2010) und sich damit im Bereich bakterieller Genomgrößen bewegen. Die erhöhte Mutationsrate sowie die mangelhafte oder fehlende Fähigkeit zur Reparatur falsch (nicht komplementär) eingebauter Nukleotide während der viralen RNA-Replikation beschränken jedoch nicht nur die Genomgröße infolge der massiven Akkumulation attenuierender oder sogar letaler Mutationen. Sie führen auch zu einer hohen genetischen Diversität in der Nachkommenschaft, die eine rasche Anpassung viraler Populationen an wechselnde Umweltbedingungen begünstigt (Belshaw *et al.*, 2008). Trotz des allgemein anerkannten Paradigmas der Größenlimitierung von RNA-Genomen zeigen insbesondere Vertreter der Nidoviren, dass Viren unter bestimmten Voraussetzungen auch deutlich größere RNA-Genome mit über 60 kb entwickeln können. Die Evolution derart großer RNA-Genome, die die umfangreichsten innerhalb der RNA-Viruswelt darstellen, erfordert sehr wahrscheinlich zusätzliche viruskodierte Enzymfunktionen, die zur Senkung der intrinsisch hohen Fehlerrate viraler RdRp-Enzyme beitragen können.

Die Genom-Replikation und Transkription von mRNAs wird bei Coronaviren und anderen Nidoviren (sowohl mit „kleinen“ als auch mit „großen“ Genomen) durch einen Multiproteinkomplex gesteuert. Zu diesem Komplex zählt neben den für RNA-Viren typischen Schlüsselenzymen wie der RdRp (nsp12) und der Helikase (nsp13) auch die nicht bei allen Nidoviren konservierte 3′–5′-ExoN-Domäne (nsp14) (Snijder *et al.*, 2003). Hervorzuheben ist, dass innerhalb der Nidoviren die ExoN-Domäne ausschließlich in Vertretern mit besonders großen Genomen (*Coronaviridae* 32 kb, *Tobamiviridae* 28 kb, *Roniviridae* 26 kb, *Mesoniviridae* 20 kb)

konserviert ist. Nidoviren mit kleineren Genomen wie die *Arteriviridae* (13–15 kb) weisen hingegen keine derartige ExoN-Funktion auf (Gorbalenya *et al.*, 2006). Aufgrund des Zusammenhanges zwischen großen Genomen und der Konservierung von ExoN wird davon ausgegangen, dass erst die evolutionäre Aneignung und Etablierung dieser ExoN-Funktion die Ausbildung überdurchschnittlich komplexer RNA-Genome, wie sie für einige Nidoviren charakteristisch sind, ermöglicht hat (Lauber *et al.*, 2013). Bereits vor der Entdeckung von nidoviralen Exon-Domänen ging J. W. Drake davon aus, dass RNA-Viren neben ihrer viralen RdRp zusätzliche wirtszelluläre Faktoren oder Mechanismen nutzen müssten, um die hohe Spontanmutationsrate zu begrenzen und dadurch größere Genome ausbilden zu können (Drake, 1993). Biochemische Analysen der replikaseassoziierten nidoviralen nsps weisen darauf hin, dass die nsp14-lokalisierte ExoN-Domäne genau diese Funktion übernimmt und in der Lage ist, während der RNA-Replikation nicht komplementär eingebaute Nukleotide im neu synthetisierten (naszenten) RNA-Strang zu detektieren und zu entfernen (Bouvet *et al.*, 2012; Ferron *et al.*, 2017). Die Annahme wurde durch revers-genetische Versuche mit SARS-CoV- und MHV-ExoN-defizienten Mutanten bestätigt, die signifikant erhöhte Mutationsraten aufwiesen und damit Mutationsfrequenzen zeigten, die jenen von RNA-Viren ohne konservierte ExoN ähnelten (Drake & Holland, 1999; Eckerle *et al.*, 2007; 2010; Sanjuán *et al.*, 2010). Die vorliegenden Beobachtungen sprechen somit für eine Schlüsselrolle der ExoN bei einer Reduzierung RdRp-induzierter Replikationsfehler innerhalb der Nidoviren mit großen Genomen (Eckerle *et al.*, 2007; 2010).

Ein weiterer Aspekt, der für eine Beteiligung von ExoN an einem Fehlerkorrekturmechanismus spricht, ist die Struktur der ExoN-Domäne selbst. Wie zuvor erwähnt, können nidovirale ExoN-Domänen aufgrund der Strukturierung ihres aktiven Zentrums der Gruppe der DEDD(h)-Exonukleasen zugeordnet werden (Zuo, 2001). Die spezifische Struktur des Zentrums weist dabei eine hohe Ähnlichkeit zu den aktiven Zentren pro- und eukaryotischer Exonukleasen auf, die an DNA-Korrekturlesefunktionen beteiligt sind (z. B. die ϵ -Untereinheit der DNA-Polymerase III) (Snijder *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2015). Die bislang verfügbaren Daten sprechen somit für eine zentrale Rolle der ExoN bei der Sicherstellung einer ausreichend hohen Replikationsgenauigkeit von Nidoviren mit großen Genomen.

Für ein umfassendes Verständnis möglicher Funktionen der ExoN innerhalb der komplexen Replikation nidoviraler RNA-Genome ist die genaue und vergleichende Charakterisierung der Substratspezifitäten dieser Enzyme von zentraler Bedeutung. Im Anschluss an die erstmalige biochemische Charakterisierung der SARS-CoV-ExoN-Domänen wurde frühzeitig damit begonnen, mögliche Kofaktoren von ExoN zu identifizieren, ohne jedoch deren Substratpräferenzen detailliert zu bestimmen oder diese mit denen verwandter Enzyme anderer Nidoviren zu vergleichen. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit sollten daher die bislang wenig oder gar nicht untersuchten Substratspezifitäten verschiedener ExoN-Domänen, die bisher auch in keinem anderen Labor biochemisch charakterisiert wurden, analysiert und mit SARS-CoV-ExoN verglichen werden. In diesem Zusammenhang wurde auch das White bream virus (WBV) aus der Familie *Tobamiviridae* einbezogen, dass – wie auch andere Nidoviren mit Genomgrößen von mehr als 20 kb – im ORF1b seines Genoms eine ExoN-Domäne kodiert (Durzynska *et al.*, 2018). Von besonderem Interesse ist dabei die Struktur des nsp14-Orthologs von WBV im Vergleich zu den bislang untersuchten coronaviralen nsp14-Proteinen. Während die coronaviralen ExoN-Domänen den N-terminalen Teil des nsp14 bilden (wie bei SARS-CoV- und HCoV-229E-nsp14) befindet sich im C-terminalen Bereich dieses Proteins eine weitere Proteindomäne, die eine Cap-spezifische Guanodin-N7-Methyltransferase-Aktivität trägt (N7-MT). Im Gegensatz zu CoV-nsp14 besitzt das WBV-pp1ab-lokalisierte und durch proteolytische Spaltung freigesetzte, ExoN-enthaltende Prozessierungsprodukt (nsp14-Ortholog) keine solche N7-MT-Domäne. Das ExoN-enthaltende Protein von WBV ist somit nicht bifunktional und von besonderer struktureller Bedeutung für das Verständnis der Replikationsmechanismen innerhalb der Nidoviren.

Ebenfalls in den Funktionsvergleich einbezogen wurde das nsp14 von HCoV-229E, einem Virus der Gattung (Genus) *Alphacoronavirus*. HCoV-229E ist im Vergleich zu WBV wesentlich gründlicher untersucht worden, jedoch gibt es bisher keine biochemischen Untersuchungen hinsichtlich des bifunktionalen nsp14, insbesondere der Funktion und Substratspezifität seiner ExoN-Domäne. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vergleiche von ExoN-Substratpräferenzen zwischen dem HCoV-229E-nsp14 (ExoN), dem ebenfalls bifunktionalen SARS-CoV-nsp14 und dem monofunktionalen nsp14-Ortholog von WBV können dazu beitragen, Gemeinsamkeiten und eventuelle Unterschiede dieser bedeutenden

Enzymaktivitäten herauszuarbeiten. Eine genaues Verständnis der Funktion, Regulation und Struktur von nidoviralen ExoN-Domänen sowie deren Kofaktoren (beispielsweise nsp10) könnte unsere Kenntnisse der an der viralen RNA-Synthese beteiligten molekularen Mechanismen verbessern, neue Forschungsansätze eröffnen und mögliche Angriffspunkte für eine Weiterentwicklung antiviraler Therapien aufzeigen.

6.1 Identifizierung der WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN assoziierten Hydrolyseaktivität

Für die in dieser Studie durchgeführte Vertiefung der Charakterisierung verschiedener 3'-5'-ExoN-Aktivitäten wurden alle verwendeten ExoN-Proteine und nsp10-Orthologe als C-terminal mit Histidin markierte Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und mittels Talon-Affinitätschromatographie sowie Größenausschlusschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die Charakterisierung der ExoN-assoziierten, substratspezifischen RNA-Hydrolyseaktivität erfolgte durch eine Inkubation der rekombinanten ExoN-Proteine (und nsp10/pp1aC) mit einer Auswahl an ss/ds- und partiellen dsRNA-Substraten mit einem oder mehreren ungepaarten Nukleotiden.

Die Positionen der natürlichen N- und C-terminalen Enden klonierter nsp14(ExoN)-Sequenzen basieren auf den Voraussagen von 3CL^{pro}-Protease-Schnittstellen innerhalb der ORF1b-kodierten Region des pp1ab (Anand *et al.*, 2003; Durzynska *et al.*, 2018; Minskaia *et al.*, 2006). Des Weiteren wurden für die integrierten Mutagenesestudien substituierte WBV-ExoN- und HCoV-229E-ExoN-His₆ Varianten kloniert und unter identischen Bedingungen exprimiert sowie aufgereinigt. Die hier untersuchten Mutanten von WBV-ExoN und HCoV-229E-nsp14 tragen Ala-Substitutionen putativer metallkoordinierender Reste des aktiven Zentrums innerhalb der konservierten ExoN-Motive I–III (Anhang 10.2, Alignment, M1–M5). Die Positionen der Substitutionen stützen sich dabei auf die für SARS-CoV-ExoN zur Verfügung stehenden Informationen aus zurückliegenden Mutagenesestudien (Minskaia *et al.*, 2006) und bioinformatisch-strukturellen Analysen zellulärer DEDDh-ExoN-Homologe (Beese & Steitz, 1991; Beese, Friedman & Steitz 1993; Cheng & Patel, 2004). Eine inaktive ExoN-Motiv-III-Mutante der drei verwendeten ExoN-Proteine (SARS-CoV-ExoN M4, D6175A, HCoV-229E-ExoN M4, D5864A, WBV-ExoN, M4, D6174A) wurde in allen

aufgeführten Experimenten zur Bestimmung der Substratspezifität als Kontrolle mitgeführt. Im Gegensatz zu den hier untersuchten, rekombinanten ExoN-Wildtyp-Proteinen zeigten diese ExoN-Motiv-III-Mutanten (unter den gewählten Reaktionsbedingungen) keine nachweisbare nukleolytische Aktivität gegenüber ssRNA, dsRNA und partiell dsRNA. Sie eigneten sich daher als Kontrolle zum Ausschluss möglicher Kontaminationen mit bakteriellen Nuklease-Aktivitäten in den Reaktionsansätzen und bestätigten die ExoN-induzierte Degradierung.

Die spezifischen Reaktionsbedingungen für eine Untersuchung der Nuklease-Aktivitäten rekombinanter WBV- und HCoV-229E-ExoNs *in vitro*, orientierten sich im Wesentlichen an den in einer früheren Studie gewonnenen Erkenntnissen im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der SARS-CoV-ExoN (Minskaia *et al.*, 2006). Dabei hatte sich gezeigt, dass für eine maximale ExoN-RNA-Hydrolyseaktivität die Anwesenheit von 1–5 mM DTT im Reaktionspuffer erforderlich ist. In der vorliegenden Studie konnte dies für die WBV- und HCoV-229E-ExoN-Enzyme ebenfalls bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine effiziente und reproduzierbare RNA-Hydrolyseaktivitäten wurde bei einer Konzentration von 2 mM DTT im Reaktionspuffer erzielt. Dies spricht für eine Bevorzugung von reduzierenden Bedingungen der WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN-Funktionen. Letztendlich herrschen im Zytoplasma einer infizierten Wirtszelle, dem Replikationsort der untersuchten Viren, ebenfalls reduzierende Bedingungen.

Darüber hinaus wurde eine geringe Konzentration an monovalenten Ionen (Salzen) für eine optimale ExoN-Aktivität benötigt. Innerhalb der hier durchgeführten Reaktionen zeigten die drei ExoN-Funktionen ein Aktivitätsmaximum bei einer Konzentration von 50 mM KCl (NaCl), welche dementsprechend in allen Experimenten eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Neben Dr. E. Minskaia konnten auch Dr. M. Bouvet und Kollegen im Vorfeld zeigen, dass die ExoN-Aktivität von SARS-CoV-nsp14 im Komplex mit nsp10 von monovalenten Ionen beeinflusst wird und bei steigenden NaCl (KCl)-Konzentrationen über 50 mM dramatisch sinkt (Bouvet *et al.*, 2012). Die hier ermittelten ExoN-Aktivitäten bestätigen somit frühere Beobachtungen zur Aktivität der SARS-CoV-ExoN bei definierten Salzkonzentrationen (50 mM) auch für die neu charakterisierten WBV- und HCoV-229E-ExoN-Orthologe. Aufgrund der allgemeinen Beziehung zwischen Salzkonzentration und dem Bindungsverhalten

von Proteinen mit DNA oder RNA, beeinflussen hohe Konzentrationen monovalenter Ionen die RNA-Struktur und stören vermutlich die ExoN/RNA-Interaktion. Des Weiteren stehen Proteinlöslichkeit und erhöhte Salzkonzentrationen in Zusammenhang miteinander. Ladungsbasierte Wechselwirkungen einzelner Seitenketten können durch hohe Salzkonzentrationen gestört werden und negativen Einfluss auf die Proteinstruktur sowie die Löslichkeit ausüben, bis hin zur Enzyminaktivität.

In weiterer Übereinstimmung zur vorausgehenden biochemischen Untersuchung von SARS-CoV-nsp14, lag der optimale pH-Wert für eine ExoN-Aktivität von WBV- und HCoV-229E-ExoN zwischen pH 7 und pH 8 (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den natürlichen pH-Bedingungen aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation von nsp14/ExoN und anderen an der RNA-Replikation beteiligten viralen Proteinen in infizierten Zellen.

Wie für Metallionen-abhängige Exonukleasen der DEDDh-Familie erwartet werden kann, benötigten auch die hier untersuchten ExoN-Funktionen physiologische Konzentration an zweiwertigen (divalenten) Kationen. DEDDh-Exonukleasen besitzen wie bereits zuvor beschrieben vier konservierte saure Reste (Asp-Glu-Asp/Glu-Asp) für die Koordination von zwei divalenten Kationen (Mg^{2+}). Schließlich wird für ExoN angenommen, dass diese sauren Reste zwei Metallionen-bindende Regionen darstellen, welche letztendlich das aktive Zentrum ausbilden (Yang, 2011; Zuo, 2001). Wobei die Asp- und Glu-Reste des Motives I und der Asp-Rest des Motives III die Binderegion A prägen und der Asp-Rest des Motives II und III die Binderegion B (Derbyshire *et al.*, 1991). Allgemein aktiviert das Metallion der Binderegion A (und ein konservierter His-Rest) ein H_2O -Molekül und das dabei entstehende Hydroxid-Ion unternimmt wahrscheinlich den nukleophilen Angriff auf die Phosphodiesterbindungen des RNA 3'-Endes im Rahmen der ExoN-induzierten Hydrolyse. Das Metallion der Binderegion B hingegen stabilisiert vermutlich die strukturellen Übergangsstadien des aktiven Zentrums von ExoN (Derbyshire *et al.*, 1991). Die in der vorliegenden Studie ebenfalls bestätigte Abhängigkeit der WBV- und HCoV-229E-ExoN-Aktivitäten zu divalenten Kationen (Mg^{2+}), befindet sich im Einklang mit den postulierten Konzentrationen für die SARS-CoV-ExoN-Aktivität (5 mM $MgCl_2$) und des genannten Modells der Metallionen-abhängige Exonukleasen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der hier durchgeführten Mutagenesestudie und der folgenden Verwendung inaktiver ExoN-Motiv-III-Mutanten in den biochemischen Experimenten zur Charakterisierung der nidoviralen ExoN kann bestätigt werden, dass die ermittelten nukleolytischen Aktivitäten der ExoN-Proteine auf ss/ds- und partiell doppelsträngiger RNA tatsächlich auf die eingesetzten wildtypischen ExoN-Proteine zurückgeführt werden konnte. WBV- und HCoV-229E-ExoN bestätigen somit die für SARS-CoV-ExoN zuvor ermittelten Reaktionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Reaktionstemperatur, Ionen- und DTT-Konzentration (Bouvet *et al.*, 2012; Minskaia *et al.*, 2006). Aufgrund der bei allen ExoN-Reaktionen mitgeführten inaktiven Motiv-III-Mutanten kann eine unspezifische Degradierung durch eingetragene *E. coli*-Nukleasen (aus der Proteinexpression in *E. coli*) ausgeschlossen werden. Ebenfalls ausschließen lassen sich aufgrund der integrierten Negativkontrollen aller Reaktionsansätze chemische Prozesse oder Verunreinigungen, welche zu einer Verstärkung der unspezifischen Degradierung von RNA führen könnten. Die innerhalb der ersten Versuchsanordnung (Abschnitt 5.2.1) ermittelten Aktivitäten zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen und ExoN-Konzentration verdeutlichen somit, dass WBV und HCoV-229E eine weitere Exonuklease kodieren.

6.2 ExoN-Aktivität auf einzelsträngigen RNA-Substraten

Die erste, bereits im Jahr 2006 durchgeführte biochemische Analyse von SARS-CoV-nsp14 (ExoN) und dessen Exonukleaseaktivität demonstrierte die Fähigkeit zur Degradierung von mindestens 18-nt-langen ssRNA-Substraten. Dabei war SARS-CoV-ExoN in der Lage, verschieden lange ssRNA-Substrate (18–30 nt) bis zu einer finalen Produktlänge von 8–12 nts zu hydrolysieren. Kürzere ssRNA-Substrate hingegen, mit einer Länge von 4–8 nt, konnten von SARS-CoV-ExoN nicht degradiert werden (Minskaia *et al.*, 2006). In einer anschließenden Studie aus dem Jahr 2007 konnte ergänzend aufgezeigt werden, dass SARS-CoV-ExoN auch 141-nt-lange ssRNA-Substrate hydrolysieren kann, die stabilere Sekundärstrukturen ausbilden als die zuvor untersuchten kurzen RNA-Oligonukleotide (Chen, P. *et al.*, 2007). Im Widerspruch dazu zeigten Dr. M. Bouvet und Kollegen in einer weiteren Studie aus dem Jahr 2012, bei der die SARS-CoV-ExoN-Aktivität von nsp14 im Komplex mit nsp10 auf ssRNA untersucht wurde, dass 25-nt-lange ssRNA mit längeren nichtgepaarten

3'-Bereichen innerhalb einer instabilen Sekundärstruktur, nur wenig effizient degradiert wurde (Bouvet *et al.*, 2012).

Die im Rahmen der vorgelegten Studie ermittelten ExoN-Aktivitäten auf ssRNA veranschaulichen ergänzend, dass sowohl WBV- als auch HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN unter den gegebenen Reaktionsbedingungen durchaus 22-nt-lange, heteropolymere ssRNA-Substrate (R1) degradieren können. Die untersuchten Substrate sind dabei ebenfalls in der Lage (schwache) Sekundärstrukturen auszubilden und wurden im Vergleich zu partiell doppelsträngiger RNA (R5/R6) mit moderater Effizienz hydrolysiert. Im Vergleich zu vollständig gepaarter dsRNA (R4) hingegen, wurden die untersuchten ssRNA Substrate (R1) sogar effizienter degradiert. Eine Liste der möglichen Sekundärstrukturen hier verwendeter RNA-Substrate, wurde bereits in unserer ersten Arbeit veröffentlicht (Durzynska *et al.*, 2018). Die prominentesten Spaltungsprodukte nach Inkubation der ExoN mit dem ssRNA-Substrat R1 wiesen finale Längen zwischen etwa 1 und 6 nt auf. Letztendlich zeigen die Analysen der ExoN-Aktivitäten auf heteropolymeren ssRNA-Substraten, sowohl in dieser Studie als auch in früheren Untersuchungen zur SARS-CoV-ExoN, dass ssRNA, die prinzipiell zur Ausbildung basengepaarter Regionen nahe dem 3'-Ende fähig ist, mehr oder weniger effizient durch die ExoN degradiert werden kann. Eine definitive Aussage zum Verhalten nidoviraler ExoN-Domänen bei unterschiedlich ausgeprägten Sekundärstrukturen von ssRNA ist auf Grund der begrenzten Datenlage derzeit noch nicht möglich. Schlussfolgerungen zu diesem Thema müssten zusätzlich die MFE (*minimum free energy*) der eventuell gebildeten Sekundärstrukturen aller verwendeten ssRNA-Substrate einbeziehen. Mit heutigem Wissenstand bleibt jedoch unklar, inwieweit die gegebenen Reaktionsbedingungen (NaCl-Konz., pH-Wert, DTT-Konz., Temperatur etc.) der einzelnen Experimente (auch anderer Studien) tatsächlich die berechneten ssRNA-Sekundärstrukturen *in vitro* beeinflussen. Hinzuzufügen sind mögliche intermolekulare Basenpaarungsereignisse zwischen mehreren RNAs, die die Interpretation zusätzlich erschweren. Bei einer vergleichenden Gegenüberstellung der Degradierungseffizienzen zwischen dsRNA und ssRNA (Ergebnisse 5.2.7) wird jedoch deutlich, dass partielle dsRNA durchgängig von allen drei hier untersuchten Exoribonukleasen bevorzugt wird und dementsprechend ss- und vollständig gepaarte dsRNA weniger effizient hydrolysiert wurden. Weitere

Ausführungen zur ExoN-Aktivität auf dsRNA finden sich im folgenden Abschnitt 6.3.

Während der ersten biochemischen Charakterisierung von SARS-CoV-ExoN durch Dr. E. Minskaia und Kollegen konnte zusätzlich die 3'–5'-gerichtete Polarität indirekt demonstriert werden. Im Gegensatz zur ExoN-vermittelten Spaltung von ssRNA-Substraten, die ein leiterartiges Muster der Reaktionsprodukte bei einer 5'-[³²P]-Markierung des ssRNA-Ausgangssubstrats aufwies, zeigte hier die Analyse mit 3'-[³²P]-markiertem ssRNA-Substrat nur ein Produktsignal im unteren Bereich des Gels (Minskaia *et al.*, 2006). Dabei handelte es sich um das von SARS-CoV-ExoN initial entfernte, radioaktiv markierte 3'-Nukleotid. Das Fehlen von Zwischenprodukten unterschiedlicher Längen bei Verwendung eines 3'-markierten Substrats bestätigte die 3'-Initiierung und somit 3'–5'-Ausrichtung der SARS-CoV-ExoN-vermittelten Hydrolyse (Minskaia *et al.*, 2006). Auch in einer Folgestudie von Dr. P. Chen und Kollegen konnte die 3'–5'-Polarität von SARS-CoV-ExoN nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich in einem anderen experimentellen Ansatz, dass eine 3'-Modifikation von ssRNA mit Cy3-Fluorescein einen negativen Einfluss auf die nukleolytische Aktivität von SARS-CoV-ExoN hat. Die Notwendigkeit eines freien 3'-OH-Endes sowie die 3'-Initiation und dadurch gerichtete 3'–5'-Polarität der Reaktion wurden somit bekräftigt (Chen *et al.*, 2007). In der hier vorgelegten Studie ist es gelungen, die 3'–5'-Polarität (unter anderem) auf 22-nt-langen ssRNA-Substraten (R1) auch für WBV- und HCoV-229E-ExoN direkt nachzuweisen und die Polarität von SARS-CoV-ExoN erneut zu bestätigen. Dabei verhinderte eine Blockierung des 3'-Endes durch Biotinylierung (R2) die Degradierung des ssRNA-Substrats (Ergebnisse 5.2.2/3). Bereits im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass eine 3'-Modifikation mit Biotin die Zugänglichkeit eines RNA-Substrats für ExoN erfolgreich blockiert (Durzynska *et al.*, 2018). Auch in einer bereits erwähnten Studie konnte die Polarität von SARS-CoV-ExoN (nsp14) im Komplex mit nsp10 demonstriert werden (Bouvet *et al.*, 2012) und steht in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Daten zur 3'–5'-Polarität von WBV- und HCoV-229E-ExoN. Dr. M. Bouvet und Kollegen kamen zu ähnlichen Schlussfolgerungen, indem sie das 3'-Ende des verwendeten RNA-Substrats mit Puromycin oder Phosphat an der C3-Position der Ribose modifizierten (Bouvet *et al.*, 2012). Jedoch beantwortet dieser Versuchsaufbau nicht die von Dr. E. Minskaia durch die Verwendung von ssDNA aufgeworfene Frage, ob die Ribose

2'-Hydroxylgruppe ebenfalls erforderlich für eine 3'-Initiation der ExoN-Aktivität ist. Dabei zeigte sich während der ersten biochemischen Analyse von SARS-CoV-ExoN, dass ssDNA mit seiner 2'-Desoxyribose, aber auch Ribose-2'-O-methylierte ssRNA von ExoN nicht gespalten wurden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen direkt aufzuzeigen, dass nicht nur die Ribose-3'-Hydroxyl-Gruppe am 3'-terminalen Nukleotid wichtig für die 3'-Initiation der ExoN ist, sondern auch die 2'-Hydroxylgruppe maßgeblich an der Interaktion oder der katalytischen Reaktion von ExoN und RNA beteiligt ist. Die drei hier untersuchten ExoN-Domänen von WBV, HCoV-229E und SARS-CoV zeigten keinerlei Aktivität auf einem ssRNA-Substrat (R3), dessen natürliche Ribose mit seiner 2'-Hydroxylgruppe gegen ein 2'-Wasserstoffatom substituiert wurde (Ergebnisse 5.2.3). Die beobachtete hydrolytische Inaktivität bei einem RNA-3'-Ende mit 2'-Desoxyribose konnte so ähnlich auch für ExoN-Homologe auf zellulärer Ebene, wie beispielsweise dem Klenow-Fragment (KF) der DNA-Polymerase I beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass 2'-OH-Gruppen endständiger Substratriosen (sowie 3'-OH-Gruppen) bedeutsam für die KF-Interaktion mit rNTPs sind und für die sterischen Wechselwirkungen des Substrats mit den metallbindenden Regionen des KF eine wichtige Rolle spielen müssen (Astatke *et al.*, 1998).

Zusammengefasst zeigen die aufgeführten Daten (I), dass WBV-ExoN- und HCoV-229E-ExoN (sowie SARS-CoV-ExoN) 22-nt-lange heteropolymere ssRNA-Substrate mit der Fähigkeit zu Ausbildung schwacher Sekundärstrukturen degradieren können. (II) Dabei operieren die drei ExoN-Funktionen gerichtet in 3'-5'-Orientierung durch die Initiierung am 3'-Ende. (III) Die ermittelten ExoN-Aktivitäten sind abhängig von einem frei zugänglichen, nichtmodifizierten 3'-Ende und (IV) dem Vorhandensein der Ribose-2'-Hydroxylgruppe.

Zum Verständnis der ermittelten Fähigkeit von ExoN einzelsträngige Substrate erfolgreich zu degradieren sind eventuell Beispiele auf zellulärer Ebene hilfreich. Deutlich gründlicher in ihrer Funktion untersuchte Exonukleasen wie dem KF der *E. coli* DNA-Polymerase I hydrolysieren ausschließlich einzelsträngige DNA (Joyce & Steitz, 1987). Allerdings ist im Gegensatz zur ExoN-Funktion der CoV die ExoN-Domäne des KF und dessen Polymerase-Domäne auf separaten Strukturdomänen desselben Moleküls lokalisiert (Joyce & Steitz, 1987). Bei der daraus entstehenden strukturellen Kooperation bleibt der dsDNA-Bereich des Pol-I-Transkriptes (zusammen mit der Template-DNA) an der DNA-Binderegion der

Pol-I-Domäne gebunden und lediglich die ~4 terminalen nts des ssDNA 3'-Endes der zuvor aufgeschmolzenen dsDNA dienen als Substrat für die Exonuklease-Funktion (Derbyshire *et al.*, 1988). Die in dieser Studie nachgewiesene Fähigkeit verschiedener nidoviraler ExoN-Enzyme ssRNA mit einer Präferenz für partiell dsRNA zu degradieren, könnte somit (im Vergleich mit zellulären Systemen) auf die vermuteten Interaktionen zwischen den unabhängig voneinander lokalisierten ExoN- und RdRp-Domänen im nidoviralen RTC zurückzuführen sein. Die Fähigkeit von ExoN, sowohl ssRNA- als auch dsRNA-Substrate zu verarbeiten, spricht für zwei mögliche Mechanismen der Fehlpaarungskorrektur *in vivo*: Entweder spaltet ExoN nach Rückwärtsgleiten der RdRp den einzelsträngigen 3'-Endbereich der P-Strang-RNA (parental), oder fehlgepaarte dsRNA dissoziiert von der RdRp und wird anschließend von ExoN zur Exzision der Fehlpaarung erkannt (Liu *et al.*, 2021).

6.3 ExoN-Aktivität auf doppelsträngigen RNA-Substraten

Um die Aussagen zur Substratspezifität von WBV- und HCoV-229E-ExoN zu präzisieren, wurden zusätzlich eine Reihe von dsRNA- und partiellen dsRNA-Substraten in die Untersuchung integriert. In zurückliegenden biochemischen Studien zur Substratspezifität von SARS-CoV-ExoN konnte bereits gezeigt werden, dass neben ssRNA auch dsRNA in 3'-5'-Richtung hydrolysiert wird (Minskaia *et al.*, 2006). Dabei deutete die überaus effiziente Hydrolyse von partieller dsRNA, im Vergleich mit der ineffizienteren Degradierung von ssRNA oder dsRNA, auf eine stärkere biologische Relevanz von partieller dsRNA für die Initiation der ExoN-Aktivität. Aufgrund früherer Studien zur Substratspezifität anderer Exonukleasen (Coward *et al.*, 1989; Derbyshire *et al.*, 1988) lag die Vermutung nahe, dass eventuell einige 3'-nichtgepaarte Nukleotide einer somit partiellen dsRNA, von großer Bedeutung für nidovirale ExoN-Funktionen sein könnten. Entsprechend ist in einer Folgestudie von Dr. M. Bouvet und Kollegen demonstriert worden, dass SARS-CoV-ExoN (zusammen mit nsp10) tatsächlich partielle dsRNA mit einem 3'-nichtgepaarten nt effizient hydrolysiert (Liu *et al.*, 2021; Bouvet *et al.*, 2012). Bei der Beantwortung der sich nun stellenden Frage, ob partielle dsRNA mit einem 3'-nichtgepaarten nt effizienter als vollständig nach Watson-Crick gepaarter dsRNA hydrolysiert wird, verbleibt die Studie jedoch nicht eindeutig. Einerseits deutete die ermittelte Degradationsrate einer partiellen dsRNA auf eine identische Hydrolyseeffizienz im Vergleich zu vollständig

gepaarter dsRNA, andererseits kommen die Autoren zu dem Schluss, dass ssRNA-Substrate die vollständig gepaarte 3'- und 5'-Enden innerhalb der RNA-Sekundärstruktur besitzen, Voraussetzung für eine effiziente Spaltung durch ExoN wären. Jedenfalls wurde letztendlich doch auf Grundlage eines kompetitiven Vergleichs geschlussfolgert, dass dsRNA mit 1-nt-langen 3'-Fehlpaarungen das präferierte Substrat für den SARS-CoV nsp14/nsp10-Komplex darstellt. Ebenfalls erwähnenswert ist die von Dr. M. Bouvet und Kollegen beobachtete Tendenz eines ExoN-Aktivitätsverlustes bei steigender Anzahl 3'-nichtgepaarter nt (Bouvet *et al.*, 2012). Eine Verifizierung oder gar Präzisierung der genannten Beobachtungen zur ExoN-Substratspezifität wäre von großer Bedeutung für die Entschlüsselung der nidoviralen Replikations- und Reparaturabläufe. Eine Präferenz nidoviraler ExoN-Enzyme für dsRNA mit einzelnen 3'-Fehlpaarungen entspräche (bis auf die Anzahl der nts des ss-Bereiches) den Erkenntnissen zur Rolle spezifischer zellulärer Exonukleasen in Fehlerkorrekturmechanismen der zellulären DNA-Replikation und unterstützt somit die Hypothese einer Beteiligung nidoviraler ExoN-Aktivitäten an Korrekturlesefunktionen während der viralen RNA-Replikation. Da alle oben genannten Daten zur Substratspezifität nidoviraler ExoN-Funktionen auf früheren biochemischen Analysen von SARS-CoV-ExoN beruhen, wurde in der vorliegenden Arbeit die erstmalige Charakterisierung von WBV- und HCoV-229E-ExoN dafür genutzt, einen direkten Vergleich zu den Aktivitäten eines rekombinanten SARS-CoV-ExoN-Proteins anzustellen.

Die hier ermittelten Daten machen deutlich, dass vollständig gepaarte dsRNA sowohl durch WBV- und HCoV-229E-ExoN als auch durch SARS-CoV-ExoN weniger effizient degradiert wird. Erstaunlicherweise erwies sich das bafinivirale monofunktionale WBV-ExoN-Protein (ohne N7-MTase) als deutlich selektiver als die nsp14-assoziierten ExoN-Funktionen der beiden Coronaviren (SARS-CoV und HCoV-229E) und zeigte keinerlei 3'–5'-Aktivität auf einem vollständig gepaarten dsRNA-Substrat. Die Inaktivität von WBV-ExoN auf vollständig gepaarter dsRNA steht somit im Gegensatz zu den ExoN-Funktionen der beiden hier gegenübergestellten coronaviralen Enzyme, welche eine schwache, aber dennoch detektierbare Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA aufwiesen. In Kombination mit den Daten zur ExoN-Aktivität auf ssRNA kann somit für die SARS-CoV- und HCoV-229E-ExoN-Funktionen grundlegend geschlussfolgert werden, dass vollständig gepaarte dsRNA und ssRNA von diesen Enzymen gespalten werden

können. Gleichwohl veranschaulicht der zeitliche Verlauf der Spaltungsreaktion verschiedener RNA-Substrate (Ergebnisse 5.2.7.), dass partielle dsRNA mit einem 3'-nichtgepaarten nt tatsächlich effizienter hydrolysiert wird als einzelsträngige und vollständig gepaarte dsRNA. Allerdings führt das Einfügen weiterer nichtgepaarter Nukleotide, welche die Distanz zwischen dem 3'-Ende des Indikatorstrangs und der gepaarten Region einer partiellen dsRNA verlängern, letztendlich zur Absenkung der Hydrolyseeffizienz aller getesteten nidoviralen ExoN-Aktivitäten. Angesichts der von Dr. M. Bouvet und Kollegen bereits angedeuteten ExoN-Tendenz zu kürzeren, nichtgepaarten 3'-Enden von dsRNA war das hier ermittelte Aktivitätsgefälle von SARS-CoV-ExoN bei 1–3 nichtgepaarter 3'-nt nicht völlig überraschend. Jedoch konnte die Substratspezifität zu 1-nt-langen Fehlpaarungen erstmals für die WBV und HCoV-229E ExoN-Orthologe erfolgreich demonstriert werden. Ebenfalls zeigten alle charakterisierten ExoN-Domänen eine Degradierung des partiellen dsRNA-Substrats mit zwei 3'-terminalen, nichtgepaarten nt. Dagegen sind im Vergleich zu Substraten mit nur einem einzigen 3'-nichtgepaarten Nukleotid aber deutlich längere Spaltungsprodukte zu beobachten. Die Verlängerung des 3'-ssRNA-Bereichs auf drei nichtgepaarte Nukleotide führte hingegen zu noch längeren Spaltungsprodukten, was auf eine deutliche Reduktion der ExoN-Aktivität für diesen Substrattyp hinweist. Erstaunlicherweise zeigte das WBV-ExoN-Ortholog keinerlei Aktivität bei drei 3'-nichtgepaarten Nukleotiden und erwies sich erneut wie im Fall der vollständig gepaarten dsRNA-Substrate als deutlich selektiver im Vergleich zu den SARS-CoV- und HCoV-229E-ExoN-Funktionen. Es bleibt zu klären, ob strukturelle Unterschiede zwischen mono- und bifunktionalen nsp14-Proteinen oder Variationen konservierter Reste innerhalb der ExoN-Domäne (DEDD vs. DEED) die Unterschiede in der Substratspezifität bei mehr als zwei Fehlpaarungen und vollständig gepaarter RNA bedingen. Grundsätzlich sind die ermittelten Hydrolyseaktivitäten der bisher weitgehend unbekanntenen ExoN-Funktionen und Substratspezifitäten für WBV und HCoV-229E vereinbar mit der postulierten Rolle von ExoN innerhalb einer Fehlerkorrektur und den Erkenntnissen zu SARS-CoV-ExoN-Funktionen. In Anbetracht der deutlich effektiveren Aktivierung aller ExoN-Funktionen bei partieller dsRNA mit einer 3'-lokalisierten Fehlpaarung kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um das biochemisch relevante Substrat der nidoviralen ExoN handelt. Im Zusammenhang mit den bereits aufgeführten

Erkenntnissen zum SARS-CoV-nsp14/nsp10-Komplex von Dr. M. Bouvet und Kollegen verdeutlicht die hier ermittelte Substratpräferenz, dass neben Coronaviren auch andere Vertreter der Nidoviren mit mittleren und großen Genomen (> 20 kb, wie WBV) eine 3'–5'-ExoN kodieren, die möglicherweise fehlintegrierte Nukleotide im Rahmen von Fehlerkorrekturmechanismen während der viralen RNA-Synthese entfernen kann. (Lauber *et al.*, 2012; Nga *et al.*, 2011; Snijder *et al.*, 2003).

Für eine weitere Präzisierung der ExoN-Substratpräferenz wurde darüber hinaus der Einfluss von dsRNA-Substratlängen auf die grundlegende ExoN-Aktivität untersucht. Die zur Verfügung stehenden Informationen, über die von nidoviralen ExoN-Enzymen tolerierten RNA-Substratlängen, sind bis heute sehr limitiert. Repräsentativ für die dünne Datenlage liegen die Erkenntnisse theoretischer Untergrenzen, bei denen SARS-CoV-ExoN noch deutliche Aktivität aufzeigt, nur für ssRNA-Substrate vor. In ihrer initialen Studie aus dem Jahr 2006 konnten Dr. E. Minskaia aufzeigen, dass rekombinantes SARS-CoV-nsp14 heteropolymere ssRNA zwischen 9 nt und 18 nt effizient degradieren kann. Dies verdeutlichte sich im Vergleich zu ssRNAs mit Substratlängen zwischen 4 nt und 8 nt, welche bei einer Inkubation mit SARS-CoV-ExoN keinerlei Anzeichen von Degradierung aufwiesen (Minskaia *et al.*, 2006). Eine Folgestudie von Dr. P. Chen und Kollegen aus dem Jahr 2007 ergänzte, dass SARS-CoV-ExoN auch heteropolymere ssRNA mit einer Länge von 141 nt effizient hydrolysieren kann (Chen, P. *et al.*, 2007). Infolgedessen konnte davon ausgegangen werden, dass SARS-CoV-ExoN keiner Beschränkung unterliegt, welche eine Maximallänge des RNA-Substrats definieren würde. Die heteropolymere Zusammensetzung des von Dr. P. Chen und Kollegen untersuchten 141-nt-langen ssRNA-Substrats verdeutlicht ebenfalls, dass ExoN trotz steigender Komplexität der RNA-Sekundärstrukturen bei zunehmender Gesamtlänge und Stabilität des RNA-Substrats zur signifikanten Degradierung von ssRNA fähig ist. In Ergänzung konnte innerhalb der hier vorgelegten Studie erstmals demonstriert werden, dass WBV-, HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN ein erwiesenes favorisiertes, partielles dsRNA-Substrat mit einem 3'-nichtgepaarten nt bis zu einer minimalen Gesamtlänge von (einschließlich) 8 nt degradieren kann. Im Unterschied zu der eingangs erwähnten Studie von Dr. E. Minskaia und Kollegen, sind die drei hier untersuchten ExoN-Funktionen in der Lage, ein nur 8-nt-langes, partielles dsRNA-Substrat zu degradieren. Aufgrund der

identischen Sequenz des verwendeten RNA-Substrats – mit Ausnahme der U→G-Modifikation des nicht markierten 5'-Komplementärstrangs, dessen 3'-Ende aufgrund der 3'-Biotin-Modifikation für ExoN ohnehin nicht zugänglich ist – besteht der einzige Unterschied zum von Dr. E. Minskaia verwendeten Substrat (8 nt, ssRNA) in der hier untersuchten RNA-Duplexstruktur. Die überraschenderweise beobachtete Hydrolyse des nur 8 nt kurzen partiellen dsRNA-Substrats wird somit wahrscheinlich durch den nicht radioaktiv markierten Komplementärstrang ermöglicht. Eine doppelsträngige RNA-Struktur steigert also vermutlich die Degradierung kurzer RNA-Substrate durch ExoN. Interaktion (Initiation und Stimulation der ExoN-Aktivität durch einzelsträngige dsRNA-Bereiche) sowie vermutlich auch die Stabilisierung der ExoN-Funktion sind somit auch von der RNA-Struktur abhängig und entsprechen eher dem theoretisch zu erwartenden Verhalten einer RdRp-unabhängigen ExoN-Funktion (Tran *et al.*, 1999; McElhinny *et al.*, 2006). Eine weitere Auffälligkeit der ExoN-Aktivität in Verbindung mit kurzen (8–10-nt-langen), partiellen dsRNA-Substraten ist die Akkumulation eines ~5–6-nt-langen, prominenten Spaltungsproduktes. Dieses Spaltungsprodukt kann offenbar nicht weiter degradiert werden, was auf eine möglicherweise minimal erforderliche Interaktionsfläche (Stranglänge) von ~5–6 nt für eine effektive RNA-Degradierung durch die untersuchten ExoN-Enzyme hindeutet. Im Gegensatz dazu weisen kleinere Spaltungsprodukte unterhalb einer Länge von 5 nt, die vor allem in erhöhten Mengen bei der Spaltung längerer dsRNA-Substrate (22 nt) beobachtet werden, auf die Fähigkeit der ExoN hin, Substrate auch unterhalb der vermuteten minimalen Interaktionsfläche zu degradieren. Für eine mögliche Degradierung unterhalb der vermuteten minimalen Interaktionsfläche könnten theoretisch nicht (noch nicht) degradierte dsRNA-Substrate oder längere Spaltungsintermediate verantwortlich sein. Innerhalb der Reaktion könnten diese längeren RNA-Strukturen für eine Art Transaktivierung und Stabilisierung der Interaktion zwischen nsp14-ExoN und kürzeren RNA-Strukturen (<5 nt) sorgen. Zumindest korreliert die gesteigerte Akkumulation von ~1–5-nt-Spaltungsprodukten (Abbildung 22) mit einer Verlängerung der dsRNA-Bereiche über den vermuteten minimal benötigten ExoN/RNA-Interaktionsbereich hinaus. Die Möglichkeit einer ExoN-Transaktivierung wird dabei durch Erkenntnisse aus der zurückliegenden Charakterisierung von SARS-CoV-ExoN bekräftigt (Minskaia *et al.*, 2006). Dr. E. Minskaia und Kollegen konnten zeigen,

dass die Aktivität der SARS-CoV-ExoN gegenüber einem radioaktiv markierten Testsubstrat durch Zugabe bestimmter nicht markierter RNA-Moleküle stimuliert werden kann. Auch die alternative Möglichkeit einer Art *cis*-Stabilisierung, also einer effizienteren Nukleolyse durch einen verlängerten dsRNA-Bereich desselben Zielsubstrats, ist in Betracht zu ziehen.

Ein möglicher Nutzen der beobachteten Fähigkeit RNA-Substrate vollständig zu degradieren, liegt in der bislang nur unzureichend beschriebenen Rolle coronaviraler Exonukleasen bei der Umgehung angeborener Immunantworten des Wirts (*innate immune response*) (Totura & Baric, 2012). Zu diesen Umgehungsprozessen zählt bei den bifunktionalen CoV-nsp14-Proteinen unter anderem die N7-MTase-Funktion sowie deren Fähigkeit zur Cap-Methylierung, die allgemein als IFN-Antagonist angesehen wird. Überraschenderweise ist das WBV-nsp14-Ortholog und somit ExoN nicht mit einer N7-MT gekoppelt (Durzynska *et al.*, 2018). Mögliche Konsequenzen für die 5'-RNA-Cap-Synthese und -Methylierung sowie die damit verbundenen Virus-Wirt-Interaktionen bei einer WBV-Infektion (und anderen Bafiniviren) wurden bisher nicht untersucht. Grundsätzlich tragen RNA-Cap-Strukturen zur RNA-Stabilität bei und sind entscheidend für die Translationsinitiation. Die coronavirale Konservierung einer N7-MTase-Domäne und die einhergehende Fähigkeit zur Methylierung von RNA-Cap-Strukturen dienen unter anderem zur Überwindung einer MDA5- (oder RIG-I-) induzierten ISG-Expression (e.g. IFIT1) (Züst *et al.*, 2011; Schuberth-Wagner *et al.*, 2015; Devarkar *et al.*, 2016). Ein weiterer Aspekt von nsp14 im Kontext der Umgehung angeborener Immunabwehrmechanismen und ein möglicher Grund für die vollständige Degradierung der untersuchten RNA-Substrate durch ExoN ist der Abbau zytoplasmalokalisierter viraler RNAs, um die IFN-Induktion während der CoV-Infektion zu erschweren (Totura & Baric, 2012). Grundlegend stellt die Produktion viraler dsRNA als zytoplasmatisch lokalisiertes Intermediat der viralen RNA-Replikation ein typisches pathogenassoziiertes molekulares Muster (PAMP) einer viralen Infektion dar (Medzhitov & Janeway, 1997; Kawai & Akira, 2006). PAMPs sind wiederum in der Lage, wirtseigene antivirale Mechanismen zu aktivieren, die die nidovirale Pathogenese im Rahmen der Immunabwehr negativ beeinflussen können (Daffis *et al.*, 2010; Medzhitov & Janeway, 1997; Kawai & Akira, 2006). Dazu zählt unter anderem die Hemmung der zellulären Proteinsynthese und damit auch der Produktion viraler Proteine (Medzhitov &

Janeway, 1997; Kawai & Akira, 2006). Infolgedessen könnte die hier beobachtete vollständige Degradierung der RNA-Substrate mit der Beseitigung viraler RNA-Replikationsintermediate innerhalb der infizierten Zelle in Zusammenhang stehen. Um die ExoN-spezifischen Anforderungen an ein RNA-Substrat weiter zu konkretisieren, wurden zusätzliche dsRNA-Strukturen in die Untersuchung integriert. Dazu zählt ein partielles dsRNA-Substrat, das neben einem vollständig gepaarten 3'-Ende zusätzlich 1–3 nt lange interne Fehlpaarungen präsentiert. Laut unserem Kenntnisstand sind interne Fehlpaarungsereignisse bisher nicht im Zusammenhang mit nidoviralen ExoN-Aktivitäten untersucht worden. Die Daten der vorgelegten Studie demonstrieren somit erstmals für alle der drei charakterisierten ExoN-Funktionen eine selektive Hydrolyseaktivität bei internen Fehlpaarungen eines ansonsten vollständig gepaarten dsRNA-Substrats. Die hierbei im Vergleich zu ssRNA und vollständig gepaarter dsRNA beobachtete stärkere ExoN-Aktivität bestätigt in erster Linie – neben den 3'-terminalen Fehlpaarungen – die ExoN-Präferenz für partielle dsRNA mit einem nichtgepaarten Nukleotid. In Übereinstimmung mit den ExoN-Aktivitäten bei 3'-terminalen Fehlpaarungen kommt es bei partieller dsRNA mit internen Fehlpaarungen ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der ExoN-Spaltungseffektivität mit zunehmender Anzahl ungepaarter Nukleotide. Demzufolge kann die zuvor getroffene Aussage, dass partiell dsRNA mit einer 3'-terminalen Fehlpaarung möglicherweise das biologisch relevante ExoN-Substrat darstellt, auf interne Fehlpaarungen erweitert werden. Die erneute Bestätigung der effektiven ExoN-Aktivierung durch fehlintegrierte Nukleotide bestärkt die Hypothese einer möglichen Fehlerkorrektur unter Beteiligung einer ExoN-Aktivität. Die erstmalig identifizierte ExoN-Fähigkeit zur effizienteren Spaltung interner Fehlpaarungen wirft die Frage nach dem tatsächlichen Ablauf der durch nsp12 (RdRp) katalysierten RNA-Synthese sowie den für die Fehlerkorrektur erforderlichen Wechselwirkungen auf. Eine Mehrzahl replikativer DNA-Polymerasen besitzen intrinsische 3'–5'-Exonukleasefunktionen. Dabei handelt es sich um eine ExoN-Domäne innerhalb desselben Proteins beziehungsweise Peptidstranges, der gleichzeitig auch die Polymerase-Domäne umfasst. Klassische Beispiele für Polymerase-assoziierte (intrinsische) ExoN-Funktionen sind die T4- und T7-DNA-Polymerasen der Bakteriophagen oder die eukaryotischen DNA-Polymerasen Pol- δ und Pol- ϵ (McElhinny *et al.*, 2006).

Nidovirale RdRps hingegen besitzen trotz – oder gerade wegen – ihrer hohen Fehlerrate und der großen zu replizierenden RNA-Genome keine RdRp-assoziierte ExoN-Funktion. Anstelle einer RdRp-assoziierten ExoN-Funktion ist die nidovirale RdRp N-terminal mit der konservierten, für Nidoviren charakteristischen NiRAN-Domäne (nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase) ausgestattet. (Lehmann *et al.*, 2015). Die coronavirale NiRAN transferiert ein Nucleosid-Monophosphat (NMP) an den N-Terminus von nsp9 (Slanina *et al.*, 2021). Das NMPylierte beziehungsweise RNAylierte nsp9 stellt einerseits ein Zwischenprodukt einer ungewöhnlichen Reaktion zur Bildung einer RNA-5'-Cap-Struktur dar (Park *et al.*, 2022), könnte aber auch als Protein-Primer für die Initiation der RNA-Synthese dienen (Slanina *et al.*, 2021; Schmidt *et al.*, 2023). Die Priming-Funktion von nsp9 wird durch erste Studien unterstützt, gilt jedoch nicht als universell bestätigt. Unabhängig davon, wie sich die RdRp/NiRAN-Bifunktionalität von nsp12 auf die Virusreplikation auswirkt, erklären die bisherigen Erkenntnisse zur NiRAN-Funktion nicht die relativ niedrige Fehlerrate der nidoviralen Genomreplikation (Eckerle *et al.*, 2010). Letztlich waren die Entdeckungen der nsp14-assoziierten ExoN-Funktion sowie die fehlende Konservierung dieses Enzyms bei Nidoviren mit kleinen Genomen ausschlaggebend. Auf dieser Grundlage wurde die Hypothese einer ExoN-basierten Fehlerkorrekturfunktion formuliert (Nga *et al.*, 2011; Saberi *et al.*, 2018; Snijder *et al.*, 2003). Modelle für einen möglichen Ablauf der Fehlerkorrektur falsch integrierter Nucleotide – zunächst durch eine Polymerase ohne ExoN-Funktion eingefügt und anschließend mittels einer extrinsischen ExoN-Funktion entfernt – liefern die bakterielle und eukaryotische Replikation. Am Beispiel des *E. coli*-Pol-III-Holoenzym, bei dem Polymerase- und 3'-5'-ExoN-Funktion in den Untereinheiten α bzw. ϵ getrennt vorliegen, zeigt sich, dass die Fehlerkorrekturaktivität von ϵ (dnaQ) die Entfernung von durch die Pol- α -Untereinheit eingeführten Replikationsfehlern ermöglicht (Schaaper, 1993; Johnson & O'Donnell, 2005). Ein weiteres Modell extrinsischer Fehlerkorrektur ergibt sich aus der Rolle der eukaryotischen Pol- δ , deren intrinsische ExoN-Funktion Substitutionen, die während der initialen Synthese der ersten 20–30 nt des Okazaki-Fragments durch die exonukleasefreie Pol- α integriert werden, erfolgreich 3'-terminal entfernen kann (Loeb & Perrino, 1990; McElhinny *et al.*, 2006). Die für SARS-CoV-nsp14 initial ermittelte Präferenz für Substrate mit einer

3'-terminalen Nukleotid-Fehlpaarung, die in der vorliegenden Studie auch für WBV, HCoV-229E und SARS-CoV bestätigt wurde, deutet – neben den aufgeführten Parallelen zu Modellen der zellulären Fehlerkorrektur – auf eine Kooperation von RdRp-Funktion und ExoN-Aktivität hin. Hierfür spricht die terminale Positionierung des Fehlpaarungsereignisses. Um während der Replikation dsRNA-Produkte mit 3'-terminaler Fehlpaarung für die ExoN-Funktion zugänglich zu machen, müsste die RdRp-vermittelte RNA-Synthese unterbrochen und entweder um mindestens eine Nukleotidposition zurückgesetzt oder vollständig vom neu synthetisierten (naszenten) RNA-Strang disloziert werden. Erste strukturelle Anzeichen für eine direkte Interaktion von nsp12 und nsp14 konnten trotz intensiver Bemühungen bis heute nicht eindeutig bestätigt werden (Subissi *et al.*, 2014). Strukturanalysen des nsp14/nsp10-Komplexes identifizierten drei hypothetische nsp14-Bereiche, die für eine eventuelle nsp12-Interaktion sprechen (Ferron *et al.*, 2017). Im Fall des untersuchten SARS-CoV-nsp14 gehören hierzu sowohl Bereiche der ExoN-Domäne als auch der N7-MTase-Domäne, wobei die ersten 71 Aminosäuren von nsp14 nicht essentiell für die Interaktion mit nsp12 sind (Ferron *et al.*, 2017). Neben der Möglichkeit einer direkten nsp12/nsp14-Interaktion deutet die Gesamtdatenlage zu nidoviralen nsps auf die Ausbildung eines komplexen, möglicherweise dynamischen Multiprotein/RNA-Netzwerkes hin. Dabei könnten die ExoN-Funktion und die RdRp-Aktivität direkt oder indirekt (über andere nsps) miteinander in Wechselwirkung stehen. Für die Bildung eines solchen Multiproteinkomplexes sprechen umfassende strukturelle Analysen sowie Koloalisationsstudien, darunter *GST-Pulldown*- und *Yeast-two-hybrid-Assays*, die Protein-Protein-Interaktionen verschiedener nsps belegen (Hillen, 2021). Jüngste Studien liefern darüber hinaus neue Einblicke sowie struktur- und funktionsbasierte Modelle des "Kern"-Replikations-Transkriptions-Komplexes (RTC) (Malone *et al.*, 2021). Zusammengefasst umfassen die Erkenntnisse zur Interaktion verschiedener CoV-nsps: (I) die Interaktion von nsp12 mit nsp7 und nsp8 (Kirchdoerfer & Ward, 2019; Gao *et al.*, 2020; Subissi *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2005; Ogando *et al.*, 2020), (II) die Interaktion von nsp7 mit nsp1, nsp8 und nsp10 (Ziebuhr & Siddell, 1999; Bost *et al.*, 2000; Brockway *et al.*, 2004), (III) die Interaktion von nsp8 mit nsp2, nsp3, nsp5, nsp12 und nsp16 (von Brunn *et al.*, 2007; Decroly *et al.*, 2008, 2011; Imbert *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Subissi *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015), (IV) die Interaktion von nsp10 mit nsp14 und nsp16

(Ferron *et al.*, 2017; Ogando *et al.*, 2020) sowie (V) die Interaktion von nsp3 mit nsp4 und nsp6 (Imbert *et al.*, 2008; Angelini *et al.*, 2013). Die Annahme, dass nidovirale ExoN- und RdRp-Funktionen im Rahmen von Replikation und Transkription gemeinsam mit mehreren nsps (einschließlich wirtseigener Faktoren) in einem Multiproteinkomplex zusammenwirken, scheint daher folgerichtig. In Übereinstimmung damit sprechen jüngste biochemische Analysen der nsp12-assoziierten Synthesefunktion des SARS-CoV-2 und MERS-CoV RTC-"Kern"-Komplexes für eine Zusammenarbeit von nsp12 mit der ExoN-Funktion des nsp14/10-Komplexes (Ma *et al.*, 2021). Dabei konnte erfolgreich demonstriert werden, dass partielle dsRNA mit einer 3'-terminalen, 1-nt-langen Fehlpaarungen nicht durch nsp12/7/8 verlängert wurde und die Syntheseaktivität von nsp12/7/8 erst nach Zugabe des nsp14/10-Komplexes und dem ExoN-vermittelten Verdau der 3'-RNA-Enden wiederhergestellt wurde (Ma *et al.*, 2021). Für das beobachtete Verhalten der SARS-CoV-2- und MERS-CoV-RdRp in Kombination mit der ExoN-assoziierten Hydrolyseaktivität im Rahmen einer möglichen Fehlerkorrektur ergibt sich demnach der Eindruck eines mit zellulären 3'-5'-ExoN-Funktionen vergleichbaren, Holoenzym-ähnlichen Funktionsablaufs. Beispielsweise zeigt die *E. coli*-RNA-Pol-II bei einer 3'-terminalen Fehlpaarung des dsRNA-Substrats eine Pausierung der Transkription, bedingt durch die Kolo-kalisation der aktiven Zentren der Polymerase- und ExoN-Domäne (Sydow & Cramer, 2009). Dennoch handelt es sich im Fall der Nidoviren um eine separate (von RdRp strukturell abgrenzbare) ExoN-Funktion und speziell die hier erhobenen Daten über die hohe ExoN-Aktivität bei internen 1-nt-Fehlpaarungen legen die Vermutung nahe, dass ExoN auch ohne direkte nsp12-Lokalisation einen wichtigen Bestandteil der Replikation/Reparatur darstellen könnte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass ExoN auch ohne nsp12-Orientierung eine RNA-Degradierung ausführt, beispielsweise im Rahmen der Fehlerkorrektur oder bei der Umgehung wirtseigener Immunantworten. In Anbetracht der ExoN-eigenen Fähigkeit zur Aktivierung durch interne 1-nt-lange-Fehlpaarungen besteht die Möglichkeit einer RdRp-unabhängigen postreplikativen Hydrolyseaktivität im Kontext der möglichen Fehlerkorrektur. Für *E. coli* ist die Funktion eines postreplikativen Reparaturmechanismus auf DNA-Ebene (Mismatch Repair, MMR) gut beschrieben. Der Prozess beinhaltet die Fehlererkennung und das Aufspüren von Fehlpaarungen durch die Faktoren MutS und MutL, das Einschneiden des

fehlerhaften DNA-Stranges durch die Endonuklease MutH, die Degradierung des betroffenen DNA-Bereichs durch zelluläre Exonukleasen wie Exo-I, Exo-VII oder RecJ, die Neusynthese des entfernten Abschnitts durch Pol-III sowie die abschließende Ligation des alten und des neu synthetisierten Stranges durch Ligasen (Modrich & Lahue, 1996). Trotz der räumlichen Trennung von RdRp- und ExoN-Funktion bleibt eine Form postreplikativer Fehlerkorrektur – wie sie für *E. coli* beschrieben ist – im Fall der Nidoviren bislang spekulativ. Denn ungeachtet der ermittelten ExoN-Aktivierung durch intern fehlgepaarte Nukleotide zeigt die nsp14-lokalisierte ExoN-Aktivität keine hierfür notwendige Endonuklease-Funktion. Dies konnte in der vorliegenden Studie durch die Blockierung der 3'-Enden des RNA-Substrats erfolgreich demonstriert werden. Weitere virale Funktionen, die homolog zu anderen ExoN-Interaktionspartnern der postreplikativen Fehlerkorrektur in *E. coli* sind, konnten bislang nicht identifiziert werden. In diesem Kontext ist jedoch die innerhalb von vertebrateninfizierenden Nidoviren konservierte Endonuklease-Funktion NendoU erwähnenswert. Wenngleich NendoU (nsp15) zu den hochkonservierten Proteinen innerhalb der CoVs zählt, sind seine Funktion und biologisch relevanten Substrate bis heute nicht eindeutig identifiziert worden. Erste Hinweise auf eine Uridin- und Cytidin-spezifische Spaltungsaktivität von NendoU sprechen jedoch gegen eine MutH-ähnliche Funktion innerhalb des postulierten ExoN-assoziierten Reparaturmechanismus (Nedialkova *et al.*, 2009). Nach dem Prinzip der Parsimonie ist bei einer Spekulation über die Bedeutung interner Fehlpaarungen die einfachste Theorie den alternativen Modellen vorzuziehen. Demnach ist es wahrscheinlicher, dass allein die Anwesenheit einer Fehlpaarung eine Aktivierung von ExoN hervorruft und die exakte Position (ob intern oder 3'-terminal) für ExoN von geringerer Relevanz ist. So belegen beispielsweise frühere Untersuchungen zur ExoN-Aktivierung durch verschiedene Nukleotidarten (G, A, C, U), dass eher die Anwesenheit der Fehlpaarung selbst als die Art des fehlerhaften Nukleotids eine ExoN-Aktivierung bewirkt (Minskaia *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2012). Dies wird auch durch den in der vorliegenden Studie beobachteten fehlenden Einfluss einer 5'-Verschiebung der internen Fehlpaarung auf die ExoN-Hydrolyseaktivität bestätigt. Ebenfalls führte das Einfügen einer zusätzlichen internen oder 3'-terminalen Fehlpaarungen zu keinen deutlichen Einschränkungen der Hydrolyseaktivität hier untersuchter ExoN-Domänen (Ergebnisse 5.2.10).

Wenngleich bislang nur begrenzte Informationen zu möglichen Interaktionen nidoviraler ExoN-Proteine mit den Kernkomponenten der viralen Replikationsmaschinerie vorliegen, erscheint es wahrscheinlich, dass die ExoN-vermittelte Spaltung durch weitere Faktoren des viralen RTC beeinflusst wird. Die genaue Funktionsweise dieser Aktivitäten, ihr Zusammenspiel im Rahmen der viralen RNA-Synthese und der Fehlerkorrektur – insbesondere im Hinblick auf interne Fehlpaarungen – sowie mögliche Interaktionen mit wirtszellulären Faktoren bleiben künftigen weiterführenden Studien vorbehalten.

Noch einmal zusammengeführt zeigen die hier ermittelten auf dsRNA-Substraten basierenden Daten zur ExoN-Aktivität (I), dass nur SARS-CoV-nsp14 und HCoV-229E-nsp14 eine geringe Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA (22 nt) aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigt WBV-ExoN keine Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA. (II) Die effizienteste Degradierung zeigen übereinstimmend alle drei ExoN-Domänen bei Verwendung partieller dsRNA mit einem singulären, ungepaarten (3'-terminal oder intern positionierten) Nukleotid. (III) Für alle drei untersuchten ExoN-Domänen zeigte sich eine Abschwächung der Hydrolyseaktivität bei steigender Anzahl terminaler oder interner Fehlpaarungen. (IV) WBV-ExoN war dabei am stringentesten und zeigte keine erkennbare Aktivität auf Substraten mit drei ungepaarten Nukleotiden. (V) Die Position von 1-nt-Fehlpaarungen, ob 3'-terminal oder intern positioniert, scheint keinen Einfluss auf die hohe ExoN-Aktivität zu besitzen. (VI) Für ds- und partielle dsRNA konnte die 3'-5'-gerichtete Aktivität aller ExoN-Domänen bestätigt werden. Eine am 5'-Ende beginnende Exonukleolyse- sowie eine Endonuklease-Funktion konnte somit für die beobachtete ExoN-Aktivität ausgeschlossen werden. (VII) Für das biochemisch relevante und bevorzugte Substrat mit einer Fehlpaarung ergibt sich eine effektive Hydrolyseaktivität aller untersuchter ExoN-Funktionen ab einer Substratlänge von ~8 nt. (VIII) Prominente Reaktionsprodukte (~5–6 nt) einer ExoN-Hydrolyse von 8–10-nt-langer, partieller dsRNA mit einer 1-nt-Fehlpaarung deuten auf eine minimal benötigte Interaktionsfläche von ~5–6 Nukleotiden Länge. (IX) Alle ExoN-Funktionen weisen eine effektivere Degradierung und wesentlich kürzere Reaktionsprodukte bei längeren Substraten auf (>10 nt).

6.4 Einfluss des Kofaktors nsp10 auf die ExoN-Aktivität

In frühen strukturellen und biochemischen Studien wurde nsp10 als 139 Aminosäuren umfassendes, nicht-strukturelles Protein ohne eigene enzymatische Aktivität beschrieben, jedoch zeigten Strukturanalysen, dass nsp10 zwei konservierte C-terminale Zinkfinger enthält, die Cystein-reiche Motive ausbilden und die Koordination von zwei Zn^{2+} -Ionen ermöglichen (Matthes *et al.*, 2006). Sogenannte Zinkfingerproteine stellen die am häufigsten auftretende Gruppe an Proteinen dar und sind aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Interaktion mit DNA und RNA an einer Vielzahl regulatorischer zellulärer Prozesse beteiligt (Cassandri *et al.*, 2017). Erstaunlicherweise bestätigten die Strukturanalysen von nsp10 nur eine sehr schwache Bindungsaffinität zu DNA und RNA und führten zu der Vermutung, dass die beiden C-terminalen Zinkfinger der Interaktion mit anderen Proteinstrukturen dienen. Allerdings konnte bis dahin keine Sequenzspezifität gegenüber nidoviralen nsps festgestellt werden, sodass angenommen wurde, dass nsp10 Teil eines übergeordneten, größeren RNA-Bindekomplexes im erweiterten Rahmen des RTC ist (Su *et al.*, 2006). In der Tat bestätigten nachfolgende biochemische Studien, dass nsp10 mit den Nichtstrukturproteinen nsp14 und nsp16 interagiert und deren ExoN- bzw. Ribose-2'-*O*-MTase-Funktion moduliert (Bouvet *et al.*, 2010; 2012; 2014). Ebenfalls deuten Interaktions- und Kollokalisationsstudien auf weitere potentielle Interaktionspartner von nsp10 hin, darunter nsp1, nsp7 und nsp10 (von Brunn *et al.*, 2007; Decroly *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008). Im Fall des hier ebenfalls untersuchten SARS-CoV-nsp14 zeigte nsp10 bereits im Vorfeld das Potential, einer unterstützenden Rolle für die ribonukleolytische ExoN-Aktivität zu übernehmen (Bouvet *et al.*, 2012). Obwohl die grundlegende ExoN-Funktion von nsp14, wie auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte, *in vitro* keine Kofaktoren für ihre Aktivität benötigt (Minskaia *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Bouvet *et al.*, 2012). Anschließend strukturelle Analysen des nsp14/nsp10-Komplexes bestätigten jedoch die Interaktion und präzisierten das Zusammenspiel der jeweils beteiligten Proteinoberflächen (Ma *et al.*, 2015). Für die nsp14/10-Interaktion konnte dabei demonstriert werden, dass die ersten zehn Reste des N-Terminus von nsp10 an die ersten 25 Reste des N-Terminus von nsp14 binden und vermutlich eine aktivitätsfördernde Konformationsänderung der ExoN-Struktur induzieren. Die Änderung der ExoN-Struktur führte laut den Autoren zu einer

Stabilisierung und Verringerung der Abstände zwischen den katalytischen Resten des aktiven Zentrums von ExoN (Ferron *et al.*, 2017; Bouvet *et al.*, 2012). Jüngste Studien zum möglichen nsp14/nsp10-Fehlerkorrekturkomplex von SARS-CoV-2 und MERS-CoV bekräftigten den aktivitätsfördernden Einfluss von nsp10 auf die ExoN-Funktion des nsp14-Proteins (Ma *et al.*, 2021). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Substitution der vermuteten nsp10/nsp14-Interaktionsfläche eine deutlich reduzierte ExoN-Aktivität (Bouvet *et al.*, 2012; 2014). Eine bedeutende Rolle von nsp10 als vielseitiger Interaktor zeigt sich auch in seinem Einfluss auf weitere Nichtstrukturproteine wie nsp16 und seiner 2'-O-MTase-Funktion (Bouvet *et al.*, 2010). Grundlegende Mutationsstudien der nsp10-kodierenden Sequenz zeigten Defizite während der Minusstrang-Synthese mit entsprechend negativen Auswirkungen auf die gesamte coronavirale Replikation (Sawicki *et al.*, 2005).

Um die Rolle von nsp10 innerhalb des Fehlerkorrekturkomplexes durch eine aktivitätsfördernde Interaktion mit ExoN *in vitro* auch für andere Vertreter der Nidoviren (neben SARS-CoV) näher zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Studie erstmals der Einfluss von rekombinantem nsp10 sowie des C-terminalen Spaltprodukts von WBV-pp1a (pp1aC) auf HCoV-229E-ExoN und WBV-ExoN untersucht. Überraschenderweise erwies sich der postulierte Einfluss von nsp10 auf die ExoN-Aktivität innerhalb der ersten Gruppe von ExoN-Aktivitätsanalysen (Ergebnisse 5.2.1–5.2.6) bei Inkubationszeiten von einer Stunde als nicht durchgängig konsistent und nur geringgradig stimulierend. Grundlegend verdeutlichen alle Experimente ohne Kombination von ExoN und nsp10, dass die allgemeine ExoN-Aktivität von WBV, HCoV-229E und sogar SARS-CoV unter den gegebenen Bedingungen keine weiteren Kofaktoren benötigt. Die ermittelten Daten bestätigen somit die Beobachtungen zu SARS-CoV-ExoN anderer Studien (Minskaia *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Bouvet *et al.*, 2012). Aufgrund dessen wurde in alternativen Versuchsansätzen durch die Verwendung niedrigerer Enzymkonzentrationen und kürzerer Reaktionszeiten der Einfluss von nsp10 sowie die ExoN-Substratpräferenz mittels eines kompetitiven Vergleichs deutlicher herausgearbeitet (Ergebnisse 5.2.7). Dabei konnte in wesentlich überzeugenderer Weise gezeigt werden, dass die ExoN-induzierte Spaltung durch die Zugabe von nsp10 insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Inkubation stark stimuliert wird, verglichen mit Ansätzen von ExoN allein ohne nsp10. Dabei zeigte sich innerhalb der 20-minütigen Inkubationszeit eine deutlich

schnellere Hydrolyse des bevorzugten Substrats mit einer 1-nt-Fehlpaarung bei einer Kombination von nsp14 und nsp10 in einem molaren Verhältnis von 1:1. . Zusammengefasst vermitteln die Daten somit erstmals für einen Vertreter der Bafiniviren (WBV) und ergänzend für einen Vertreter der Alphacoronaviren (HCoV-229E) den Eindruck einer *in vitro* durch nsp10-Orthologe induzierten verstärkten ExoN-Substratspezifität sowie einer gesteigerten ExoN-vermittelten RNA-Degradation. Die gemachten Beobachtungen einer vermutlichen Zusammenarbeit zweier Nichtstrukturproteine deuten, zumindest im Fall der hier untersuchten nsp14- und nsp10/pp1aC-Orthologe, auf die postulierte Möglichkeit einer übergeordneten nsp-Organisation zu replikationsrelevanten Multiproteinkomplexen hin.

6.5 Mutagenese der Mg²⁺-koordinierenden Reste innerhalb der DEDDh-ExoN Motive I–III

Die Identifizierung der nidoviralen ExoN-Domäne im Jahr 2003 führte aufgrund bioinformatischer Sequenzvergleiche mit zellulären ExoN-Homologen und der dabei ermittelten hohen Konservierung des aktiven Zentrums zur Einordnung in die Gruppe der DEDDh-Exonukleasen (Snijder *et al.*, 2003). Exonukleasen, dieser Gruppe, wie beispielsweise Reparaturdomänen der DNA-Polymerasen, katalysieren im Rahmen einer Fehlerkorrektur die 3'–5'-gerichtete Abspaltung eines Nukleosidmonophosphats von Nukleinsäuren. Die Nukleolyse erfolgt dabei über zwei divalente Metallionen, die ein reaktives Wassermolekül für die eigentliche Spaltung aktivieren (Beese & Steitz 1991). Basierend auf Modellanalysen der katalytischen Abläufe zellulärer Exonukleasen bilden die namensgebenden sauren Reste (D, E, D, D) zwei Metallbinderegionen (A und B) aus. Wobei das Metallion der Binderegion A die nukleophile Attacke auf die Phosphatgruppen der 3'-terminalen Phosphodiesterbindung des Substrats koordiniert und das Metallion der Binderegion B die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums beziehungsweise dessen Übergangszustände stabilisiert (Derbyshire *et al.*, 1991). Biochemische Analysen von SARS-CoV-ExoN-Mutanten bestätigten für Coronaviren die Abhängigkeit der ExoN-Aktivität von den vier genannten sauren Resten sowie von divalenter Kationen wie Mg²⁺ und Mn²⁺ (Minskaia *et al.*, 2006). Dazu zählten die Asp- und Glu-Reste D5992 und E5994 des Motivs I, D6145 des Motivs II und D6175 des Motivs III. Die dabei

durchgeführten Ala-Substitutionen der einzelnen Reste verdeutlichten, dass insbesondere die Reste D6145 und D6175 essenziell für die ExoN-Aktivität sind. Demgegenüber war bei einer Substitution der Reste D5992, E5994 (und H6170 s. u.) eine sehr geringe, aber detektierbare Restaktivität der SARS-CoV-ExoN zu beobachten. Aufgrund der fortschreitenden Charakterisierung von nsp14-Kristallstrukturen, wurde im Jahr 2015 eine Korrektur der vier ursprünglich konservierten Reste des aktiven Zentrums von ExoN vorgenommen. Hierbei bestätigt die Analyse der nsp14-Struktur, dass nicht D6145 (D243), sondern E5783A (E191) innerhalb des Motivs II an der Metallkoordinierung beteiligt ist (Ma *et al.*, 2015). Somit repräsentiert SARS-CoV-ExoN eigentlich eine DEEDh-Untergruppe innerhalb der Vertreter von DEDDh-Exonukleasen. Erstaunlicherweise variiert innerhalb der Nidoviren der Rest an Position 191 zwischen E und D. Beispielsweise ist das WBV-ExoN-Homolog nicht von der Aktualisierung zwischen Position 191 und 243 betroffen und konserviert die klassische DEDDh-Struktur des aktiven Zentrums (Ma *et al.*, 2015; Ferron *et al.*, 2017).

Für eine Einordnung der funktionalen und strukturellen Bedeutung dieser charakteristischen Reste des aktiven Zentrums verschiedener nidoviraler ExoN-Domänen wurden in der vorliegenden Studie die biochemischen Auswirkungen der Substitutionen zwischen den Vertretern der DEEDh-ExoN (HCoV-229E) und DEDDh-ExoN (WBV) miteinander verglichen. Diesbezüglich wurden alle konservierten Glu- und Asp-Reste der drei ExoN-Motive mit Ala substituiert. Für WBV-ExoN, einen Vertreter der DEDDh-Struktur, lagen bis heute keine biochemischen Nachweise für eine Abhängigkeit der ExoN-Aktivität von den beschriebenen konservierten Resten des aktiven Zentrums vor. In Zusammenarbeit mit Dr. I. Durzynska konnte bislang lediglich die bedeutende Rolle des ebenfalls hoch konservierten Zinkfingers ZF1 zwischen den ExoN-Motiven I und III von WBV demonstriert werden (Durzynska *et al.*, 2018). Ala-Substitutionen mutmaßlicher Zink-koordinierender Reste (mit Ausnahme von H6125A) bestätigten dabei einen erheblichen Einfluss auf die ExoN-Aktivität und bekräftigen die Beobachtungen zur Struktur und Funktionalität von ZF1-Domänen in den nsp14-Orthologen von Alpha- und Betacoronaviren (Ma *et al.*, 2015).

In Fortsetzung der biochemischen Charakterisierung von WBV-ExoN konnte mithilfe der durchgeführten Mutagenese gezeigt werden, dass ein ExoN-Protein

ohne assoziierte N7-MT-Domäne im selben Protein in Übereinstimmung mit den Beobachtungen zum bifunktionalen nsp14 von SARS-CoV eine identische Abhängigkeit der ExoN-Funktion von den konservierten Resten der Motive I–III aufweist. Die hier ermittelten Daten verdeutlichen, dass alle Substitutionen zu einer erheblichen Einschränkung der WBV-ExoN-Aktivität führen (Ergebnisse 5.3.1).

Für die ebenfalls untersuchte ExoN-Funktion des bifunktionalen HCoV-229E-nsp14 lagen im Gegensatz zu SARS-CoV bislang keine biochemischen Daten aus vorausgegangenen Mutagenesestudien der konservierten ExoN-Reste vor. Bislang war es keiner Arbeitsgruppe gelungen, rekombinantes HCoV-229E-nsp14 zu produzieren, sodass neben den ebenfalls fehlenden ExoN-Substratcharakteristika keine Erkenntnisse zu den konservierten DEEDh-Resten des aktiven Zentrums von HCoV-229E-ExoN zu Verfügung standen. Innerhalb der vorliegenden Studie gelang es allerdings, rekombinantes HCoV-229E-nsp14 in *E. coli* zu exprimieren und die Effekte von Substitutionen der DEEDh-Reste biochemisch zu charakterisieren. Im Fall des ExoN-Homologs von HCoV-229E betrafen die eingefügten Substitutionen die Reste D5682A und E5684A des Motivs I, E5783A des neu identifizierten Motivs II sowie D5864A und H5859A des Motivs III. Die Analyse der ExoN-Aktivität aller Mutanten zeigte, dass die Ala-Substitutionen erhebliche negative Auswirkungen auf die Degradierung des präferierten partiellen dsRNA-Substrats mit einem terminal 3'-fehlgepaarten Nukleotid haben (Ergebnisse 5.3.2). Die strukturellen Unterschiede der D-E-Variation (DEDDh zu DEEDh) zwischen den aktiven Zentren von HCoV-229E und WBV (einschließlich SARS-CoV) sowie das Fehlen der N7-MTase-Domäne des monofunktionalen WBV-ExoN-Orthologs hatten somit keine erkennbar unterschiedlichen Auswirkungen auf die beobachteten funktionellen Defekte der mutierten ExoN-Varianten. Die übergreifenden Parallelen, insbesondere der grundsätzlich drastische ExoN-Aktivitätsverlust aller Proteine deckten sich mit den Beobachtungen der Mutagenesestudien zu den SARS-CoV-ExoN-Motiven I–III von Dr. E. Minskaia und Kollegen im Jahr 2006. Die in der vorliegenden Studie dokumentierte Bedeutung der konservierten DED(E)DH-Reste für die ExoN-Aktivität *in vitro* bekräftigt somit einerseits die Verwandtschaft der ExoN-Domänen verschiedener Nidovirus-Spezies untereinander (Snijder *et al.*, 2003) und andererseits die strukturelle und funktionale Zugehörigkeit nidoviraler ExoN-Domänen zur Familie der DEDDh-Exonukleasen (Zuo, 2001).

Weiterhin erwähnenswert ist die kontroverse Datenlage zu den Auswirkungen eines ExoN-Knock-outs durch Mutationen innerhalb der charakteristischen DEDDh/DEEDh-Reste in Zellkultur. So zeigte beispielsweise die phänotypische Analyse rekombinanter Alphacoronaviren wie HCoV-229E (Minskaia *et al.*, 2006) und TGEV (Becares *et al.*, 2016), dass eine Doppelmutation in Motiv I (Asp90/Glu92) zu einer Replikationsunfähigkeit *in vitro* führte, sodass in Zellkultur kein lebensfähiges Virus isoliert werden konnte. Im Gegensatz dazu führte eine identische ExoN-Motiv -Doppelmutation bei Betacoronaviren wie SARS-CoV und MHV-A59 zu deutlich weniger drastischen Auswirkungen (Eckerle *et al.*, 2007; 2010). Dabei waren die rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Replikation leicht eingeschränkt, dennoch konnten in Zellkultur lebensfähige Viren isoliert werden. Interessanterweise wurde aufgrund der verbliebenen Replikationsfähigkeit und der Möglichkeit zur Fortführung weiterer Infektionspassagen der rekombinanten Viren in Zellkultur bei Ausschaltung der ExoN-Funktion eine bis zu 20-fach gesteigerte Mutationsrate festgestellt (für SARS-CoV und MHV). Die dabei untersuchten Phänotypen mit gesteigerter Mutationsrate unterstützten maßgeblich die Theorie, dass nsp14-ExoN Teil eines Fehlerkorrekturapparates ist, der die für RNA-Viren ungewöhnlich hohe Replikationsgenauigkeit der Nidoviren mit Genomen über 20 kb ermöglicht. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigen neueste Studien zu anderen Betacoronaviren (MERS-CoV und SARS-CoV-2), dass ExoN-Mutanten in Zellkultur replikationsdefizient sind (Ogando *et al.*, 2020). Eine derartig heterogene Datenlage zu lebensfähigen und nichtlebensfähigen Phänotypen mit identischen ExoN-knock-out-Mutationen innerhalb des Genus der Betacoronaviren deutet neben einer Rolle in der Fehlerkorrektur (abgeleitet aus der deutlich erhöhten Mutationsrate von lebensfähigen ExoN-Mutanten) auf einen differenzierten Einfluss der ExoN-Aktivität oder ExoN-Struktur auf weitergehende Interaktionen mit der Wirtszelle hin, die die grundlegende Überlebensfähigkeit in Zellkultur bestimmen können. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der Studie von Dr. L. Eckerle und Kollegen verwendete D90A/E92A-Doppelmutante von MHV und SARS-CoV über eine gewisse ExoN-Restaktivität in Zellkultur verfügte und in den nachfolgenden Analyseverfahren zu divergenten Interpretationen führte (Eckerle *et al.*, 2007; 2010). Es bleibt daher in weiteren Studien zu klären, ob die gewählte Motiv-I-Doppelmutante nidovirusweit

repräsentativ für einen ExoN-knock-out ist. In eigenen Zellkulturversuchen war die Motiv I-Doppelmutante im Fall von HCoV-229E jedenfalls nicht lebensfähig, und es konnte nach 48-stündiger Inkubation kein Virus isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch deuten der unmittelbare Ausfall der Replikationsfähigkeit (nicht wie erwartet zeitverzögert durch letale Akkumulation zufälliger Mutationen) sowie die damit einhergehende Nichtlebensfähigkeit in Zellkultur für SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-229E und TGEV auf eine weitere essenzielle Rolle von nsp14-ExoN bei der RNA-Synthese beziehungsweise der Replikation hin.

Generell zeigt sich auch in anderen zellulären Modellen, dass Knock-out-Mutationen innerhalb konservierter Reste einer fehlerkorrekturassoziierten 3'–5'-ExoN fatale und teils divergierende Auswirkungen nach sich ziehen können. Ein Ausschalten der ϵ -lokalisierten 3'–5'-ExoN-Funktion der *E. coli*-Pol-III führt beispielsweise zu einer Nichtlebensfähigkeit durch die letale Akkumulation von Mutationen (Fijalkowska & Schaaper, 1996). Für Eukaryoten zeigte sich am Beispiel eines ExoN-Knock-out der *Saccharomyces-cerevisiae*-Pol ϵ und Pol δ zwar eine Lebensfähigkeit, jedoch ein 10–100-facher Anstieg der Mutationsrate (Morrison *et al.*, 1993). Für RNA-Viren sind – mit Ausnahme der untersuchten Nidoviren – keine Beispiele einer Konservierung replikationsrelevanter Korrektur-Exonukleasen bekannt, für die Gruppe der DNA-Viren wurde jedoch gezeigt, dass das Ausschalten der DNA-Pol-assoziierten ExoN-Funktion des *Herpes Simplex Virus* (HSV1) zu einem 10–500-fachen Anstieg der Mutationsrate führt (Hwang & Hwang, 2003). Aufgrund der zusammengeführten Daten und der vergleichbaren funktionellen Effekte wird zunehmend deutlich, dass es sich bei nidoviralen nsp14-Proteinen und der assoziierten ExoN-Funktion um eine wichtige Untereinheit eines möglichen Multienzymkomplexes handelt, der neben der RNA-Genomreplikation und der sgRNA-Synthese sowie als Manipulator der Immunantwort auch an einer möglichen Fehlerkorrektur beteiligt sein könnte (Ogando *et al.*, 2019).

Vor dem Hintergrund der COVID-19-Pandemie und des daraus resultierenden Bedarfs an einem vertieften mechanistischen Verständnis coronavirusspezifischer Replikationsprozesse stellt sich die Frage, welche weiterführenden Schlussfolgerungen und Perspektiven sich aus den zusammengefassten Daten ableiten lassen. Die ermittelten biochemischen und substratspezifischen Charakteristika bislang nicht in einen Vergleich mit SARS-CoV einbezogener nidoviraler ExoN-Funktionen verdeutlichen erstmals Parallelen zwischen

verschiedenen Exonukleasen in Bezug auf Funktion, Struktur und die Interaktion mit einem möglichen Kofaktor. Die ermittelte Substratpräferenz ist dabei sowohl mit der vermuteten Korrekturlesefunktion des corona- beziehungsweise nidoviralen RTC vereinbar als auch ein Hinweis darauf, dass die konservierte ExoN-Funktion eine essenzielle Rolle innerhalb des Replikationszyklus einnimmt. Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten in Verbindung mit neueren Erkenntnissen zu SARS-CoV-2, dass ExoN und damit nsp14 ein vielversprechendes Ziel weiterführender Forschungsansätze sowie potenzieller antiviraler Interventionsstrategien darstellen, die gezielt in die Replikation von Coronaviren eingreifen könnten. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf den vermuteten Beitrag dieser Enzymfunktion zur Sicherung einer im Vergleich zu anderen viralen RNA-Polymerasen verringerten Fehlerrate während der nidoviralen Genomreplikation. Angesichts der reduzierten Wirksamkeit etablierter Nukleosidanaloga gegenüber SARS-CoV und SARS-CoV-2 erscheint eine gezielte Inaktivierung der ExoN-Funktion, etwa durch Blockierung des katalytischen Zentrums oder der Interaktionsfläche mit nsp10, als vielversprechende Strategie, um nukleosidanaloge Wirkstoffe funktionell wieder nutzbar zu machen. Darüber hinaus könnten ExoN-defiziente Coronaviren auch für die Entwicklung attenuierter Lebendimpfstoffe von besonderem Interesse sein.

7 Zusammenfassung

Nidoviren und die zu ihnen gehörenden Coronaviren (CoV) sind Positivstrang-RNA-Viren mit den größten bislang bekannten Genomen innerhalb der RNA-Viruswelt. Die charakteristische Strukturierung ihrer einzigartigen RNA-Genome ist innerhalb der Ordnung *Nidovirales* weithin konserviert. Bezeichnend für die Organisation nidoviraler Genome ist unter anderem die 5'-terminale Kodierung von mehr als zehn Nichtstrukturproteinen (nsp), zu deren Translation im Verlauf der viralen Replikation die eigene genomische RNA dient. Die viralen Strukturproteine werden hingegen in der 3'-Region des Genoms kodiert, wobei ihre Biosynthese durch einen Satz charakteristischer subgenomischer (sg)RNAs ermöglicht wird (*nested set*). Grundlegende Mechanismen der nidoviralen RNA-Synthesestrategie, wie Transkription, Translation und Replikation, wurden vor allem für MHV und SARS-CoV erstmalig untersucht. In den Folgejahren konnten diese Erkenntnisse auf weitere Coronaviren wie SARS-CoV-2 und MERS-CoV sowie auf Vertreter anderer Familien der Ordnung *Nidovirales* ausgedehnt werden. Allerdings sind die molekularen Mechanismen zur Etablierung derart großer RNA-Genome beziehungsweise zur Korrektur der hohen Fehlerraten von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRp) nicht vollständig verstanden. Im Vergleich mit anderen RNA-Viren wird angenommen, dass eine erfolgreiche Replikation derart großer RNA-Genome vermutlich durch eine Form der Fehlerkorrektur (*Proofreading*) unterstützt wird. Teil dieses Mechanismus bei Coronaviren ist die ExoN-Domäne des Nichtstrukturproteins nsp14 und dessen Kofaktor nsp10, die während der Replikation fehlerhaft integrierte Nukleotide der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) entfernen kann (Liu *et al.*, 2021; Moeller *et al.*, 2022). Das bisherige Verständnis der nidoviralen Fehlerkorrektur und der zugrunde liegenden ExoN-Funktion beruht überwiegend auf Untersuchungen an SARS-CoV und SARS-CoV-2, weshalb in der vorliegenden Studie weitere, bislang nicht biochemisch charakterisierte ExoN-Funktionen, darunter die von WBV und HCoV-229E, systematisch analysiert und in einen vergleichenden Kontext eingeordnet wurden. Die hierbei gewonnenen biochemischen und substratspezifischen Daten zeigen erstmals übergreifende Gemeinsamkeiten zwischen unterschiedlichen nidoviralen Exonukleasen hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften, strukturellen Merkmale und potenziellen Interaktion mit dem Kofaktor nsp10.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass die ExoN-Aktivitäten aller drei rekombinanten Proteine einzelsträngige ssRNA- sowie partiell doppelsträngige dsRNA-Substrate mit einer Länge von 22 nt effizient degradieren. Deutlich weniger effizient wurden vollständig gepaarte dsRNA-Substrate von diesen Enzymen gespalten. Lediglich für SARS-CoV-ExoN und HCoV-229E-ExoN konnte eine geringe ExoN-Restaktivität auf vollständig gepaarter dsRNA beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich WBV-ExoN deutlich selektiver, sodass keine Aktivität auf vollständig gepaarter dsRNA nachweisbar war. Die effizienteste Degradierung zeigten alle drei ExoN-Domänen übereinstimmend bei Verwendung einer partiell doppelsträngigen RNA mit einem einzelnen ungepaarten Nukleotid. Dabei wurden sowohl dsRNAs mit internen als auch 3'-terminalen 1-nt-Fehlpaarungen effizient degradiert. Darüber hinaus wurde für alle drei ExoN-Domänen eine deutliche Abschwächung der Hydrolyseaktivität mit steigender Anzahl ungepaarter Nukleotide in den verwendeten dsRNA-Substraten beobachtet. Während sich WBV-ExoN bereits bei vollständig gepaarter dsRNA als selektiver erwies, war auch in diesem Fall keine nachweisbare Aktivität gegenüber RNA-Substraten mit mehr als zwei ungepaarten Nukleotiden festzustellen. Andererseits konnte für HCoV-229E- und SARS-CoV-ExoN erneut eine geringe Restaktivität gegenüber partiell doppelsträngiger RNA mit drei ungepaarten Nukleotiden nachgewiesen werden. Die ermittelten Substratpräferenzen stützen somit die Annahme, dass partiell doppelsträngige RNA mit einer einzigen Fehlpaarung das biologisch relevante Substrat nidoviraler ExoN-Aktivitäten darstellt. Die Positionierung der 1-nt-Fehlpaarung scheint dabei in Bezug auf die ermittelt hohe ExoN-Aktivität keine Rolle zu spielen. Weitere Untersuchungen unter Verwendung von 3'-biotinylierten (blockierten) RNAs bestätigten, dass alle getesteten ExoN-Proteine ssRNA-, dsRNA- sowie partiell doppelsträngige RNA-Substrate in 3'-5'-Richtung degradieren, mit Ausnahme von WBV-ExoN, das keine Aktivität auf dsRNA und partiell doppelsträngiger RNA mit mehr als zwei Fehlpaarungen am 3'-Ende zeigte. Demzufolge ergaben sich keine experimentellen Hinweise auf eine 5'-3'-Exonuklease oder Endonuklease-Funktion innerhalb der untersuchten ExoN-Proteine. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für die Hydrolyse von ssRNA nicht nur ein frei zugängliches 3'-RNA-Ende erforderlich ist, sondern auch die C2'-OH-Gruppe der 3'-terminalen Ribose eine wesentliche Rolle bei der Initiation der ExoN-Aktivität spielt. Einzelsträngige RNA-Substrate mit einem C2'-

Wasserstoff (2'-Desoxyribose-Modifizierung) wurden von den untersuchten ExoN-Aktivitäten nicht degradiert. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen SARS-CoV-ExoN nicht in der Lage war, 8 nt kurze ssRNA-Substrate zu degradieren, konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass alle hier untersuchten ExoN-Domänen partiell doppelsträngige RNA-Substrate mit einer Länge von 8 nt effizient degradieren. Dabei deuten prominente, etwa 5–6 nt lange Reaktionsprodukte der ExoN-Aktivität auf eine möglicherweise minimal erforderliche ExoN/RNA-Interaktionsfläche von etwa 5–6 nt hin. Zusätzlich zeigen die ermittelten Daten erstmals für einen Vertreter der Bafiniviren (WBV) sowie für das Alphacoronavirus HCoV-229E eine durch den viralen Kofaktor nsp10/pp1aC induzierte *In-vitro*-Aktivitätssteigerung der ExoN-vermittelten RNA-Degradation. Der Effekt dieses Zusammenspiels bekräftigt die vermutete ExoN-Kofaktorfunktion von Coronavirus-nsp10 für die untersuchten Nidovirus-Vertreter und liefert Hinweise auf die Möglichkeit einer Koordination weiterer ORF1a-kodierter Nichtstrukturproteine im Rahmen eines Multiproteinkomplexes. Eine in diese Arbeit integrierte Mutagenesestudie konservierter Reste der ExoN-Domäne mittels Ala-Substitutionen in WBV-ExoN (D5980A, E5982A, D6082A, H6169A, D6174A) sowie den korrespondierenden Aminosäureresten in HCoV-229E-nsp14 (D5682A, E5684A, E5783A, H5859A, D5864A) untermauern die zentrale Bedeutung der ExoN-Motive I–III für eine ExoN-Aktivität *in vitro*. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die eingefügten Ala-Substitutionen der genannten Aminosäurereste zu einer erheblichen Einschränkung der WBV- und HCoV-229E-ExoN-Aktivitäten führen. Sämtliche in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit einer angenommenen Korrekturlesefunktion des corona-beziehungsweise nidoviralen Replikations-Transkriptions-Komplexes und weisen zugleich auf eine zentrale Bedeutung der konservierten ExoN-Funktion im viralen Replikationszyklus hin.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3CL ^{pro}	3C-like Protease
A	Adenosin
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basen Paar
Ca	Calcium
cDNA	Complementary DNA
COVID19	Coronavirus Disease 2019
CoV	Coronavirus
CPD	Nukleotid-Phosphodiester-Domäne
D	Asparaginsäure
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat Wasser
ddH ₂ O	Double deionised water
DI RNA	Defective interfering RNA
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMV	Double-membrane vesicle
dNTP	Deoxynukleotid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ds	doppelsträngig
DVG	Defective viral genome
E	Envelope
E	Glutaminsäure
EAV	Equines Arteritis Virus
EC	European Commission
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
endoU	uridylyl-transferase
ER	Endoplasmic reticulum
ERGIC	Endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment
ETOV	Equines Torovirus
ExoN	Exoribonuclease
FU	Formamid/Urea
G	Gravitationskraft
GAV	Gill-associated virus
GMP	Guanosin-Monophosphat
gpt	Guanin Phosphoribosyl-Transferase
gp	Glykoprotein
GTase	Guanylyltransferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HCoV	Human coronavirus
HE	Hemagglutination
HEL	Helikase
His	Histidin
HKU	Hongkong Universität
IBV	Infectious bronchitis virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
lac	Lactose
LB	Luria-Bertani (lysogeny broth)
M	Membrane
MERS	Middle East respiratory syndrome
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesium chloride
MHV	Mouse hepatitis virus
min	Minute
Mn	Mangan
MnCl ₂	Mangan Chlorid
Mpro	Main protease
mRNA	Messenger RNA
MT	Ribose 2'-O-Methyltransferase
MWCO	Molecular weight cut-off
N7-MTase	Guanosin-N7 Methyltransferase

N	Nukleokapsid
NaCl	Natriumchlorid
NendoU	Nidoviral endoribonuclease (uridylylate specific)
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
NiRAN	Nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase
NMP	Nucleoside Monophosphate
NMT	(Guanosine-N7) Methyl Transferase
nsp	Nichtstrukturprotein
Nt	Nukleotid
NTase	Nukleotidyl Transferase
NTP	Nucleotide-5'-triphosphate
OD	Optical density
OH	Hydroxidion
Oligo	Oligonukleotid, oligo = wenige
ORF	Open reading frame
PAA	Poly Acrylamid
PABP	poly(A)-binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PK	Pseudoknot
PL ^{pro}	Papain-like protease
PNK	Polynukleotidkinase
Pol	Polymerase
pp	Polyprotein
PTB	Polypyrimidine-tract binding <i>protein</i>
PRF	Programmed ribosomal frameshifting
Rbv	Ribavarin
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
REN	Restriktionsendonukleasen
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonucleic acid
RNP	Ribonukleoprotein
RP	RNA-polymerase
RTC	Replication Transcription Complex
S	Spike
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SF	Superfamilie
sg	Subgenomic
SL	Stem loop
ss	Single stranded
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TATase	Terminale Adenylyltransferase
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFB	Transformation <i>Buffer</i>
TGEV	Transmissible gastroenteritis virus
TM	Transmembrane
TNTase	Terminale Nukleotidyltransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
TRS	Transcription-regulating sequence
Ub	Ubiquitin
Ubl	Ubiquitin-like domain
Ubp1	Ubiquitin-specific protease 1
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UTR	Untranslated region
v/v	Volume per volume
vgl	Vergleich
WBV	White bream virus
w/v	Weight per volume
WT	Wildtyp
ZBD	Zink-Binde-Domäne
Zn	Zink

9 Literaturverzeichnis

Die bibliographischen Angaben sind im Format Bandnummer (*Volume*), Heftnummer (*Issue*), Seitenanzahlen (*pp.*) angegeben. *Beispiel: 99 (9), 1253–1260 entspricht Volume 99, Issue 9, Seiten 1253–1260.* Artikel ohne offizielle Seitenangaben sind über ihre *e-Location ID* (eXXXX_n) referenziert.

- Almeida, M.S.; Johnson, M.A.; Herrmann, T.; Geralt, M. & Wüthrich, K., (2007), “Novel β -Barrel Fold in the Nuclear Magnetic Resonance Structure of the Replicase Nonstructural Protein 1 from the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus”, *Journal of Virology*, 81 (7), 3151–3161.
- 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 α -helical domain”, *The EMBO Journal*, 21 (13), 3213–3224.
- Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P.; Mesters, J.R. & Hilgenfeld, R., (2003), “Coronavirus main proteinase (3CLpro) Structure: Basis for design of anti-SARS drugs”, *Science*, 300 (5626), 1763–1767.
- Angelini, M.M.; Akhlaghpour, M.; Neuman, B.W. & Buchmeier, M.J., (2013), “Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles”, *mBio*, 4 (4), e00524.
- Astatke, M.; Ng, K.; Grindley, N.D. & Joyce, C.M., (1998), “A single side chain prevents Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment) from incorporating ribonucleotides”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (7), 3402–3407.
- Azhar, E.I.; El-Kafrawy, S.A.; Farraj, S.A.; Hassan, A.M.; Al-Saeed, M.S.; Hashem, A.M. & Madani, T.A., (2014), “Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus”, *The New England Journal of Medicine*, 371, 1359–1360.
- Becares, M.; Pascual-Iglesias, A.; Nogales, A.; Sola, I.; Enjuanes, L. & Zuñiga, S., (2016), “Mutagenesis of Coronavirus nsp14 Reveals Its Potential Role in Modulation of the Innate Immune Response”, *Journal of Virology*, 90 (11), 5399–5414.
- Beerens, N.; Selisko, B.; Ricagno, S.; Imbert, I.; van der Zanden, L.; Snijder, E.J. & Canard, B., (2007), “De Novo Initiation of RNA Synthesis by the Arterivirus RNA-Dependent RNA Polymerase”, *Journal of Virology*, 81 (16), 8384–8395.
- Beese, L.S.; Derbyshire, V. & Steitz, T.A., (1993), “Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA”, *Science*, 260 (5106), 352–355.
- Beese, L.S.; Friedman, J.M. & Steitz, T.A., (1993), “Crystal Structures of the Klenow Fragment of DNA Polymerase I Complexed with Deoxynucleoside Triphosphate and Pyrophosphate”, *Biochemistry*, 32 (51), 14095–14101.
- Beese, L.S. & Steitz, T.A., (1991), “Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism”, *The EMBO Journal*, 10 (1), 25–33.
- Belshaw, R.; Gardner, A.; Rambaut, A. & Pybus, O.G., (2008), “Pacing a small cage: mutation and RNA viruses”, *Trends in Ecology and Evolution*, 23 (4), 188–193.
- Bimboim, H.C. & Doly, J., (1979), “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA”, *Nucleic Acids Research*, 7 (6), 1513–1523.
- Bost, A.G.; Carnahan, R.H.; Lu, X.T. & Denison, M.R., (2000), “Four Proteins Processed from the Replicase Gene Polyprotein of Mouse Hepatitis Virus Colocalize in the Cell Periphery and Adjacent to Sites of Virion Assembly”, *Journal of Virology*, 74 (7), 3379–3387.
- Bouvet, M.; Debarnot, C.; Imbert, I.; Selisko, B.; Snijder, E.J.; Canard, B. & Decroly, E., (2010), “In Vitro Reconstitution of SARS-Coronavirus mRNA Cap Methylation”, *PLoS Pathogens*, 6 (4), e1000863.
- Bouvet, M.; Imbert, I.; Subissi, L.; Gluais, L.; Canard, B. & Decroly, E., (2012), “RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (24), 9372–9377.
- Bouvet, M.; Lugari, A.; Posthuma, C.C.; Zevenhoven, J.C.; Bernard, S.; Betzi, S.; Imbert, I.; Canard, B.; Guillemot, J.C.; Lécine, P. *et al.*, (2014), “Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes”, *Journal of Biological Chemistry*, 289 (37), 25783–25796.

- 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", *The EMBO Journal*, 6 (12), 3779–3785.
- Brockway, S.M.; Lu, X.T.; Peters, T.R.; Dermody, T.S. & Denison, M.R., (2004), "Intracellular Localization and Protein Interactions of the Gene 1 Protein p28 during Mouse Hepatitis Virus Replication", *Journal of Virology*, 78 (21), 11551–11562.
- Von Brunn, A.; Teepe, C.; Simpson, J.C.; Pepperkok, R.; Friedel, C.C.; Zimmer, R.; Roberts, R.; Baric, R. & Haas, J., (2007), "Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome", *PLoS ONE*, 2 (5), e459.
- Byszewska, M.; Śmietański, M.; Purta, E. & Bujnicki, J.M., (2014), "RNA methyltransferases involved in 5' cap biosynthesis", *RNA Biology*, 11 (12), 1597–1607.
- Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G. & Raschellà, G., (2017), "Zinc-finger proteins in health and disease", *Cell Death Discovery*, 3 (1), e17071.
- Cencic, R.; Hall, D.R.; Robert, F.; Du, Y.; Min, J.; Li, L.; Qui, M.; Lewis, I.; Kurtkaya, S.; Dingedine, R. *et al.*, (2010), "Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (3), 1046–1051.
- Chen, J.; Malone, B.; Llewellyn, E.; Grasso, M.; Shelton, P.M.; Olinares, P.D.; Maruthi, K.; Eng, E.T.; Vatandaslar, H.; Chait, B.T. *et al.*, (2020), "Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex", *Cell*, 182 (6), 1560–1573.
- Chen, P.; Jiang, M.; Hu, T.; Liu, Q.; Chen, X.S. & Guo, D., (2007), "Biochemical characterization of exoribonuclease encoded by SARS coronavirus", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (5), 649–655.
- 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", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (9), 3484–3489.
- Chen, Y.; Su, C.; Ke, M.; Jin, X.; Xu, L.; Zhang, Z.; Wu, A.; Sun, Y.; Yang, Z.; Tien, P. *et al.*, (2011), "Biochemical and Structural Insights into the Mechanisms of SARS Coronavirus RNA Ribose 2'-O-Methylation by nsp16/nsp10 Protein Complex", *PLoS Pathogens*, 7 (10), e1002294.
- Cheng, Y. & Patel, D.J., (2004), "Crystallographic structure of the nuclease domain of 3'hExo, a DEDDh family member, bound to rAMP", *Journal of Molecular Biology*, 343 (2), 305–312.
- Cougot, N.; van Dijk, E.; Babajko, S. & Séraphin, B., (2004), "Cap-tabolism", *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (8), 436–444.
- Cowart, M.; Gibson, K.J.; Allen, D.J. & Benkovic, S.J., (1989), "DNA Substrate Structural Requirements for the Exonuclease and Polymerase Activities of Procaryotic and Phage DNA Polymerases", *Biochemistry*, 28 (5), 1975–1983.
- Daffis, S.; Szretter, K.J.; Schriewer, J.; Li, J.; Youn, S.; Errett, J.; Lin, T.Y.; Schneller, S.; Zust, R.; Dong, H. *et al.*, (2010), "2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members", *Nature*, 468 (7322), 452–456.
- Decroly, E.; Debarnot, C.; Ferron, F.; Bouvet, M.; Coutard, B.; Imbert, I.; Gluais, L.; Papageorgiou, N.; Sharff, A.; Bricogne, G. *et al.*, (2011), "Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex", *PLoS Pathogens*, 7 (5), e1002059.
- 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", *Journal of Virology*, 82 (16), 8071–8084.
- Derbyshire, V.; Grindley, N.D. & Joyce, C.M., (1991), "The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction", *The EMBO Journal*, 10 (1), 17–24.
- Derbyshire, V.; Freemont, P.S.; Sanderson, M.R.; Beese, L.; Friedman, J.M.; Joyce, C.M. & Steitz, T.A., (1988), "Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I", *Science*, 240 (4849), 199–201.
- Devarkar, S.C.; Wang, C.; Miller, M.T.; Ramanathan, A.; Jiang, F.; Khan, A.G.; Patel, S.S. & Marcotrigiano, J., (2016), "Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (3), 596–601.

- Donaldson, E.F.; Sims, A.C.; Graham, R.L.; Denison, M.R. & Baric, R.S., (2007), "Murine Hepatitis Virus Replicase Protein nsp10 Is a Critical Regulator of Viral RNA Synthesis", *Journal of Virology*, 81 (12), 6356–6368.
- Drake, J.W., (1993), "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (9), 4171–4175.
- Drake, J.W. & Holland, J.J., (1999), "Mutation rates among RNA viruses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (24), 13910–13913.
- Durzynska, I.; Sauerwald, M.; Karl, N.; Madhugiri, R. & Ziebuhr, J., (2018), "Characterization of a bafinivirus exoribonuclease activity", *Journal of General Virology*, 99 (9), 1253–1260.
- Echols, H.; Lu, C. & Burgers, P.M., (1983), "Mutator strains of Escherichia coli, mutD and dnaQ, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80 (8), 2189–2192.
- Eckerle, L.D.; Becker, M.M.; Halpin, R.A.; Li, K.; Venter, E.; Lu, X.; Scherbakova, S.; Graham, R.L.; Baric, R.S.; Stockwell, T.B. *et al.*, (2010), "Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing", *PLoS Pathogens*, 6 (5), e1000896.
- Eckerle, L.D.; Lu, X.; Sperry, S.M.; Choi, L. & Denison, M.R., (2007), "High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants", *Journal of Virology*, 81 (22), 12135–12144.
- 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", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (11), 3792–3796.
- Eigen, M., (2002), "Error catastrophe and antiviral strategy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (21), 13374–13376.
- Van den Ent, F. & Löwe, J., (2006), "RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67 (1), 67–74.
- Fehr, A.R. & Perlman, S., (2015), "Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis", in: Maier, E.; Brickerton, P.; Britton, H.J. (eds.), *Coronaviruses: Methods and Protocols*, 1282, 1–23, Springer, New York, NY.
- Ferron, F.; Decroly, E.; Selisko, B. & Canard, B., (2012), "The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs", *Antiviral Research*, 96 (1), 21–31.
- Ferron, F.; Subissi, L.; Silveira De Morais, A.T.; Le, N.T.; Sevajol, M.; Gluais, L.; Decroly, E.; Vonrhein, C.; Bricogne, G.; Canard, B. *et al.*, (2017), "Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (2), 162–171.
- Fijalkowska, I.J. & Schaaper, R.M., (1996), "Mutants in the exo I motif of Escherichia coli dnaQ: Defective proofreading and inviability due to error catastrophe", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (7), 2856–2861.
- Filipowicz, W.; Furuichi, Y.; Sierra, J.M.; Muthukrishnan, S.; Shatkin, A.J. & Ochoa, S., (1976), "A protein binding the methylated 5' terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73 (5), 1559–1563.
- Firth, A.E. & Brierley, I., (2012), "Non-canonical translation in RNA viruses", *Journal of General Virology*, 93 (7), 1385–1409.
- Gaglia, M.M.; Covarrubias, S.; Wong, W. & Glaunsinger, B.A., (2012), "A Common Strategy for Host RNA Degradation by Divergent Viruses", *Journal of Virology*, 86 (17), 9527–9530.
- Gao, Y.; Yan, L.; Huang, Y.; Liu, F.; Zhao, Y.; Cao, L.; Wang, T.; Sun, Q.; Ming, Z.; Zhang, L.; *et al.*, (2020), "Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus", *Science*, 368 (6492), 779–782.
- Geerlings, T.H.; Vos, J.C. & Raue, H.A., (2000), "The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5' → 3' exonucleases", *RNA*, 6 (12), 1698–1703.
- Gohara, D.W.; Ha, C.S.; Kumar, S.; Ghosh, B.; Arnold, J.J.; Wisniewski, T.J. & Cameron, C.E., (1999), "Production of 'authentic' poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)) by ubiquitin-protease-mediated cleavage in Escherichia coli", *Protein Expression and Purification*, 17 (1), 128–138.

- Gorbalenya, A.E.; Baker, S.C.; Baric, R.S.; de Groot, R.J.; Drosten, C.; Gulyaeva, A.A.; Haagmans, B.L.; Lauber, C.; Leontovich, A.M.; Neuman, B.W. *et al.*, (2020), "The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2", *Nature Microbiology*, 5 (4), 536–544.
- Gorbalenya, A.E.; Enjuanes, L.; Ziebuhr, J. & Snijder, E.J., (2006), "Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome", *Virus Research*, 117 (1), 17–37.
- Gorbalenya, A.E.; Koonin, E.V.; Donchenko, A.P. & Blinov, V.M., (1989), "Coronavirus genome: Prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis", *Nucleic Acids Research*, 17 (12), 4847–4861.
- Gosert, R.; Kanjanahaluethai, A.; Egger, D.; Bienz, K. & Baker, S.C., (2002), "RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles", *Journal of Virology*, 76 (8), 3697–3708.
- Green, R.; Rogers, E.J., (2013), "Transformation of Chemically Competent *E. coli*", in: Lorsch, J. (ed.), *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* (Methods in Enzymology), 529, 329–336.
- Gribble, J.; Stevens, L.J.; Agostini, M.L.; Anderson-Daniels, J.; Chappell, J.D.; Lu, X.; Pruijssers, A.J.; Routh, A.L. & Denison, M.R., (2021), "The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination", *PLoS Pathogens*, 17 (1), e1009226.
- De Groot, R.J.; Cowley, J.A.; Enjuanes, L.; Faaberg, K.S.; Perlman, S.; Rottier, P.J.; Snijder, E.J.; Ziebuhr, J.; Gorbalenya, A.E.; Baker, S. *et al.*, (2012), "Family Coronaviridae", in: King, A.M.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E. (eds.), *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 806–828, Elsevier Academic Press, London, UK / San Diego, CA.
- 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. *et al.*, (2003), "Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China", *Science*, 302 (5643), 276–278.
- Herold, J.; Gorbalenya, A.E.; Thiel, V.; Schelle, B. & Siddell, S.G., (1998), "Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: identification of a papain-like proteinase and its substrate", *Journal of Virology*, 72 (2), 910–918.
- Herold, J. & Siddell, S.G., (1993), "An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA", *Nucleic Acids Research*, 21 (25), 5838–5842.
- Hillen, H.S., (2021), "Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase", *Current Opinion in Virology*, 48, 82–90.
- Huang, Chaolin; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X. *et al.*, (2020), "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China", *The Lancet*, 395 (10223), 497–506.
- Huang, Cheng; Lokugamage, K.G.; Rozovics, J.M.; Narayanan, K.; Semler, B.L. & Makino, S., (2011), "SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: Viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage", *PLoS Pathogens*, 7 (12), e1002433.
- Hwang, Y.T. & Hwang, C.B., (2003), "Exonuclease-Deficient Polymerase Mutant of Herpes Simplex Virus Type 1 Induces Altered Spectra of Mutations", *Journal of Virology*, 77 (5), 2946–2955.
- Hyde, J.L. & Diamond, M.S., (2015), "Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation", *Virology*, 479/480, 66–74.
- Hyde, J.L.; Gardner, C.L.; Kimura, T.; White, J.P.; Liu, G.; Trobaugh, D.W.; Huang, C.; Tonelli, M.; Paessler, S.; Takeda, K. *et al.*, (2014), "A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA", *Science*, 343 (6172), 783–787.
- Imbert, I.; Snijder, E.J.; Dimitrova, M.; Guillemot, J.C.; Lécine, P. & Canard, B., (2008), "The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein", *Virus Research*, 133 (2), 136–148.
- Ivanov, K.A.; Hertzog, T.; Rozanov, M.; Bayer, S.; Thiel, V.; Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J., (2004), "Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (34), 12694–12699.
- 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", *Journal of Virology*, 78 (11), 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", *Journal of Virology*, 78 (14), 7833–7838.
- Johnson, A. & O'Donnell, M., (2005), "Cellular DNA replicases: Components and dynamics at the replication fork", *Annual Review of Biochemistry*, 74 (1), 283–315.
- Jones, D.H. & Howard, B.H., (1991), "A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction", *BioTechniques*, 10 (1), 62–66.
- Joseph, J.S.; Saikatendu, K.S.; Subramanian, V.; Neuman, B.W.; Brooun, A.; Griffith, M.; Moy, K.; Yadav, M.K.; Velasquez, J.; Buchmeier, M.J. *et al.*, (2006), "Crystal Structure of Nonstructural Protein 10 from the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Reveals a Novel Fold with Two Zinc-Binding Motifs", *Journal of Virology*, 80 (16), 7894–7901.
- Joyce, C.M. & Steitz, T.A., (1987), "DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics", *Trends in Biochemical Sciences*, 12 (4), 288–292.
- Kawai, T. & Akira, S., (2006), "Innate immune recognition of viral infection", *Nature Immunology*, 7 (2), 131–137.
- Kenney, S.P.; Wang, Q.; Vlasova, A.; Jung, K. & Saif, L., (2021), "Naturally Occurring Animal Coronaviruses as Models for Studying Highly Pathogenic Human Coronaviral Disease", *Veterinary Pathology*, 58 (3), 438–452.
- Kim, D.; Lee, J.Y.; Yang, J.S.; Kim, J.W.; Kim, V.N. & Chang, H., (2020), "The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome", *Cell*, 181 (4), 914–921.e10.
- Kirchdoerfer, R.N. & Ward, A.B., (2019), "Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors", *Nature Communications*, 10 (1), e2342.
- Knoops, K.; Kikkert, M.; van den Worm, S.; 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 Biology*, 6 (9), e226.
- Kumar, P.; Gunalan, V.; Liu, B.; Chow, V.T.; Druce, J.; Birch, C.; Catton, M.; Fielding, B.C.; Tan, Y.J. & Lal, S.K., (2007), "The nonstructural protein 8 (nsp8) of the SARS coronavirus interacts with its ORF6 accessory protein", *Virology*, 366 (2), 293–303.
- Lauber, C.; Goeman, J.J.; de Parquet, M.C.; Nga, T.P.; Snijder, E.J.; Morita, K. & Gorbalenya, A.E., (2013), "The Footprint of Genome Architecture in the Largest Genome Expansion in RNA Viruses", *PLoS Pathogens*, 9 (7), e1003500.
- Lauber, C.; Ziebuhr, J.; Junglen, S.; Drosten, C.; Zirkel, F.; Nga, P.T.; Morita, K.; Snijder, E.J. & Gorbalenya, A.E., (2012), "Mesoniviridae: A proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses", *Archives of Virology*, 157 (8), 1623–1628.
- Lehmann, K.C.; Gulyaeva, A.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Janssen, G.M.; Ruben, M.; Overkleeft, H.S.; van Veelen, P.A.; Samborskiy, D.V.; Kravchenko, A.A.; Leontovich, A.M. *et al.*, (2015), "Discovery of an essential nucleotidylating activity associated with a newly delineated conserved domain in the RNA polymerase-containing protein of all nidoviruses", *Nucleic Acids Research*, 43 (17), 8416–8434.
- Li, Y. & Breaker, R.R., (2001), "In vitro selection of kinase and ligase deoxyribozymes", *Methods*, 23 (2), 179–190.
- Lin, S.; Chen, H.; Chen, Z.; Yang, F.; Ye, F.; Zheng, Y.; Yang, J.; Lin, X.; Sun, H.; Wang, L. *et al.*, (2021), "Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10 bound to nsp14-ExoN domain reveals an exoribonuclease with both structural and functional integrity", *Nucleic Acids Research*, 49 (9), 5382–5392.
- Liu, C.; Shi, W.; Becker, S.T.; Schatz, D.G.; Liu, B. & Yang, Y., (2021), "Structural basis of mismatch recognition by a SARS-CoV-2 proofreading enzyme", *Science*, 373 (6559), 1142–1146.
- Loeb, L.A. & Perrino, F.W., (1990), "Hydrolysis of 3'-Terminal Mispairs in Vitro by the 3' → 5' Exonuclease of DNA Polymerase δ Permits Subsequent Extension by DNA Polymerase α ", *Biochemistry*, 29 (22), 5226–5231.
- Luan, J.; Lu, Y.; Jin, X. & Zhang, L., (2020), "Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526 (1), 165–169.
- Lugari, A.; Betzi, S.; Decroly, E.; Bonnaud, E.; Hermant, A.; Guillemot, J.C.; Debarnot, C.; Borg, J.P.; Bouvet, M.; Canard, B. *et al.*, (2010), "Molecular mapping of the RNA cap 2'-O-methyltransferase activation interface between severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp10 and nsp16", *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (43), 33230–33241.

- Ma, Y.; Wu, L.; Shaw, N.; Gao, Y.; Wang, J.; Sun, Y.; Lou, Z.; Yan, L.; Zhang, R. & Rao, Z., (2015), "Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (30), 9436–9441.
- Ma, Z.; Pourfarjam, Y. & Kim, I.K., (2021), "Reconstitution and functional characterization of SARS-CoV-2 proofreading complex", *Protein Expression and Purification*, 185, e105894.
- Malone, B.; Perry, J.K.; Olinares, P.D.; Lee, H.W.; Chen, J.; Appleby, T.C.; Feng, J.Y.; Bilello, J.P.; Ng, H.; Sotiris, J. *et al.*, (2023), "Structural basis for substrate selection by the SARS-CoV-2 replicase", *Nature*, 614 (7949), 781–787.
- Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E.J. & Campbell, E.A., (2021), "Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design", *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23 (1), 21–39.
- Masters, P.S., (2006), "The Molecular Biology of Coronaviruses", *Advances in Virus Research*, 66, 163–173.
- 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 Letters*, 580 (17), 4143–4149.
- McDonald, S.M., (2013), "RNA synthetic mechanisms employed by diverse families of RNA viruses", *WIREs RNA*, 4 (4), 351–367.
- McElhinny, S.A.; Pavlov, Y.I. & Kunkel, T.A., (2006), "Evidence for extrinsic exonucleolytic proofreading", *Cell Cycle*, 5 (9), 958–962.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., (1997), "Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition", *Cell*, 91 (3), 295–298.
- 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", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (13), 5108–5113.
- Modrich, P. & Lahue, R., (1996), "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology", *Annual Review of Biochemistry*, 65, 101–133.
- Moeller, N.H.; Shi, K.; Demir, Ö.; Belica, C.; Banerjee, S.; Yin, L.; Durfee, C.; Amaro, R.E. & Aihara, H., (2022), "Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119 (9), e2106379119.
- Morrison, A.; Johnson, A.L.; Johnston, L.H. & Sugino, A., (1993), "Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*", *The EMBO Journal*, 12 (4), 1467–1473.
- Nedialkova, D.D.; Ulferts, R.; van den Born, E.; Lauber, C.; Gorbalenya, A.E.; Ziebuhr, J. & Snijder, E.J., (2009), "Biochemical Characterization of Arterivirus Nonstructural Protein 11 Reveals the Nidovirus-Wide Conservation of a Replicative Endoribonuclease", *Journal of Virology*, 83 (11), 5671–5682.
- Neuman, B.W.; Smart, A.; Gilmer, O.; Smyth, R.P.; Vaas, J.; Böker, N.; Samborskiy, D.V.; Bartenschlager, R.; Seitz, S.; Gorbalenya, A.E. *et al.*, (2025), "Giant RNA genomes: Roles of host, translation elongation, genome architecture, and proteome in nidoviruses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122 (7), e2413675122.
- Nga, P.T.; de Parquet, M.C.; Lauber, C.; Parida, M.; Nabeshima, T.; Yu, F.; Thuy, N.T.; Inoue, S.; Ito, T.; Okamoto, K. *et al.*, (2011), "Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest rna virus genomes", *PLoS Pathogens*, 7 (9), e1002215.
- Nicholson, A.L. & Pasquinelli, A.E., (2019), "Tales of Detailed Poly(A) Tails", *Trends in Cell Biology*, 29 (3), 191–200.
- Notredame, C.; Higgins, D.G. & Heringa, J., (2000), "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment", *Journal of Molecular Biology*, 302 (1), 205–217.
- Ogando, N.S.; Ferron, F.; Decroly, E.; Canard, B.; Posthuma, C.C. & Snijder, E.J., (2019), "The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity", *Frontiers in Microbiology*, 10, e1813.
- Ogando, N.S.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; van der Meer, Y.; Bredenbeek, P.J.; Posthuma, C.C. & Snijder, E.J., (2020), "The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2", *Journal of Virology*, 94 (23), e01246.
- Ohlmann, T.; Rau, M.; Pain, V.M. & Morley, S.J., (1996), "The C-terminal domain of eukaryotic

- protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E", *The EMBO Journal*, 15 (6), 1371–1382.
- Oostra, M.; te Lintelo, E.G.; Deijis, M.; Verheije, M.H.; Rottier, P.J. & de Haan, C.A., (2007), "Localization and Membrane Topology of Coronavirus Nonstructural Protein 4: Involvement of the Early Secretory Pathway in Replication", *Journal of Virology*, 81 (22), 12323–12336.
- Pan, J.; Peng, X.; Gao, Y.; Li, Z.; Lu, X.; Chen, Y.; Ishaq, M.; Liu, D.; DeDiego, M.L.; Enjuanes, L. *et al.*, (2008), "Genome-Wide Analysis of Protein-Protein Interactions and Involvement of Viral Proteins in SARS-CoV Replication", *PLoS ONE*, 3 (10), e3299.
- Park, G.J.; Osinski, A.; Hernandez, G.; Eitson, J.L.; Majumdar, A.; Tonelli, M.; Henzler-Wildman, K.; Pawłowski, K.; Chen, Z.; Li, Y. *et al.*, (2022), "The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2", *Nature*, 609 (7928), 793–800.
- Parker, M.D.; Lindsey, B.B.; Leary, S.; Gaudieri, S.; Chopra, A.; Wyles, M.; Angyal, A.; Green, L.R.; Parsons, P.; Tucker, R.M. *et al.*, (2021), "Subgenomic RNA identification in SARS-CoV-2 genomic sequencing data", *Genome Research*, 31 (4), 645–658.
- Peti, W.; Johnson, M.A.; Herrmann, T.; Neuman, B.W.; Buchmeier, M.J.; Nelson, M.; Joseph, J.; Page, R.; Stevens, R.C.; Kuhn, P. *et al.*, (2005), "Structural Genomics of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: Nuclear Magnetic Resonance Structure of the Protein nsP7", *Journal of Virology*, 79 (20), 12905–12913.
- Plant, E.P., (2008), "The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation", *Frontiers in Bioscience*, 13, 4873–4881.
- Plant, E.P.; Pérez-Alvarado, G.C.; Jacobs, J.L.; Mukhopadhyay, B.; Hennig, M. & Dinman, J.D., (2005), "A three-stemmed mRNA pseudoknot in the SARS coronavirus frameshift signal", *PLoS Biology*, 3 (6), e172.
- Dos Ramos, F.; Carrasco, M.; Doyle, T. & Brierley, I., (2004), "Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus", *Biochemical Society Transactions*, 32 (6), 1081–1083.
- Rashid, F.; Xie, Z.; Suleman, M.; Shah, A.; Khan, S. & Luo, S., (2022), "Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion", *Frontiers in Immunology*, 13, e940756.
- Ratia, K.; Saikatendu, K.S.; Santarsiero, B.D.; Barreto, N.; Baker, S.C.; Stevens, R.C. & Mesecar, A.D., (2006), "Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease: Structure of a viral deubiquitinating enzyme", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (15), 5717–5722.
- Ricagno, S.; Coutard, B.; Grisel, S.; Brémond, N.; Dalle, K.; Tocque, F.; Campanacci, V.; Lichière, J.; Lantiez, V.; Debarnot, C. *et al.*, (2006), "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Nsp15 from SARS coronavirus", *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62 (4), 409–411.
- Rota, P.A.; Oberste, M.S.; Monroe, S.S.; Nix, W.A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J.P.; Penaranda, S.; Bankamp, B.; Stockwell, T.B.; Erdman, D.D. *et al.*, (2003), "Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome", *Science*, 300 (5624), 1394–1399.
- Rottier, P.J.; Snijder, E.J.; Ziebuhr, J.; Gorbalenya, A.E. (2012). "Order Nidovirales". In: King, A.M.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 785–795.
- Saber, A.; Gulyaeva, A.; Brubacher, J.; Newmark, P. & Gorbalenya, A., (2018), "A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size", *PLoS Pathogens*, 14 (11), 1–41.
- 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. *et al.*, (2005), "Structural Basis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ADP-Ribose-1-Phosphate Dephosphorylation by a Conserved Domain of nsP3", *Structure*, 13 (11), 1665–1675.
- Sanjuán, R.; Nebot, M.R.; Chirico, N.; Louis, M.; Belshaw, R. & Mansky, L.M., (2010), "Viral Mutation Rates", *Journal of Virology*, 84 (19), 9733–9748.
- Sawicki, D.L.; Wang, T. & Sawicki, S.G., (2001), "The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus", *Journal of General Virology*, 82 (2), 385–396.
- Sawicki, S.G.; Sawicki, D.L.; Younker, D.; Meyer, Y.; Thiel, V.; Stokes, H. & Siddell, S.G., (2005), "Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins", *PLoS Pathogens*, 1 (4), 310–322.

- Schaaper, R.M., (1993), "Base Selection, Proofreading, and Mismatch Repair during DNA Replication in *Escherichia coli*", *Journal of Biological Chemistry*, 268 (32), 23762–23765.
- Scheuermann, R.; Tam, S. & Burgers, P.M., (1983), "Identification of the ϵ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: A fidelity subunit for DNA replication", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80 (23), 7085–7089.
- Schmidt, N.; Ganskih, S.; Wei, Y.; Gabel, A.; Zielinski, S.; Keshishian, H.; Lareau, C.A.; Zimmermann, L.; Makroczyova, J.; Pearce, C. *et al.*, (2023), "SND1 binds SARS-CoV-2 negative-sense RNA and promotes viral RNA synthesis through NSP9", *Cell*, 186 (22), 4834–4850.
- Schuberth-Wagner, C.; Ludwig, J.; Bruder, A.K.; Herzner, A.M.; Zillinger, T.; Goldeck, M.; Schmidt, T.; Schmid-Burgk, J.L.; Kerber, R.; Wolter, S. *et al.*, (2015), "A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA", *Immunity*, 43 (1), 41–51.
- Schütze, H.; Ulferts, R.; Schelle, B.; Bayer, S.; Granzow, H.; Hoffmann, B.; Mettenleiter, T.C. & Ziebuhr, J., (2006), "Characterization of White Bream Virus Reveals a Novel Genetic Cluster of Nidoviruses", *Journal of Virology*, 80 (23), 11598–11609.
- Serrano, P.; Johnson, M.A.; Chatterjee, A.; Neuman, B.W.; Joseph, J.S.; Buchmeier, M.J.; Kuhn, P. & Wüthrich, K., (2009), "Nuclear Magnetic Resonance Structure of the Nucleic Acid-Binding Domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein 3", *Journal of Virology*, 83 (24), 12998–13008.
- Serrano, P.; Johnson, M.A.; Chatterjee, A.; Pedrini, B. & Wüthrich, K., (2008), "NMR assignment of the nonstructural protein nsp3(1066–1181) from SARS-CoV", *Biomolecular NMR Assignments*, 2 (2), 135–138.
- Seybert, A.; van Dinten, L.C.; Snijder, E.J. & Ziebuhr, J., (2000), "Biochemical Characterization of the Equine Arteritis Virus Helicase Suggests a Close Functional Relationship between Arterivirus and Coronavirus Helicases", *Journal of Virology*, 74 (20), 9586–9593.
- Shannon, A.; Fattorini, V.; Sama, B.; Selisko, B.; Feracci, M.; Falcou, C.; Gauffre, P.; El Kazzi, P.; Delpal, A.; Decroly, E. *et al.*, (2022), "A dual mechanism of action of AT-527 against SARS-CoV-2 polymerase", *Nature Communications*, 13 (1), e621.
- Shatkin, A.J., (1976), "Capping of eucaryotic mRNAs", *Cell*, 9 (4), 645–653.
- Siddell, S.G.; Walker, P.J.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adams, M.J.; Dutilh, B.E.; Gorbalenya, A.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Junglen, S. *et al.*, (2019), "Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018)", *Archives of Virology*, 164 (3), 943–946.
- Siddell, S.G.; Ziebuhr, J. & Snijder, E.J., (2005), "Coronaviruses, Toroviruses, and Arteriviruses", in: ter Meulen, V.; Mahy, B.W. (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 823–856, Hodder Arnold / John Wiley & Sons, London.
- Simmonds, P.; Adriaenssens, E.M.; Lefkowitz, E.J.; Oksanen, H.M.; Siddell, S.G.; Zerbini, F.M.; Alfenas-Zerbini, P.; Aylward, F.O.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E. *et al.*, (2024), "Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2024)", *Archives of Virology*, 169 (11), 236.
- Slanina, H.; Madhugiri, R.; Bylapudi, G.; Schultheiß, K.; Karl, N.; Gulyaeva, A.; Gorbalenya, A.E.; Linne, U. & Ziebuhr, J., (2021), "Coronavirus replication-transcription complex: Vital and selective NMPylation of a conserved site in nsp9 by the NiRAN-RdRp subunit", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118 (6), e2022310118.
- Smith, J.; Sadeyen, J.R.; Cavanagh, D.; Kaiser, P. & Burt, D.W., (2015), "The early immune response to infection of chickens with Infectious Bronchitis Virus (IBV) in susceptible and resistant birds", *BMC Veterinary Research*, 11 (1), e256.
- Snijder, E.J.; Bredenbeek, P.J.; Dobbe, J.C.; Thiel, V.; Ziebuhr, J.; Poon, L.L.; Guan, Y.; Rozanov, M.; Spaan, W.J. & Gorbalenya, A.E., (2003), "Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage", *Journal of Molecular Biology*, 331 (5), 991–1004.
- Snijder, E.J.; Decroly, E. & Ziebuhr, J., (2016), "The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing", in: Ziebuhr, J. (ed.), *Advances in Virus Research*, 59–126, Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Sola, I.; Almazán, F.; Zúñiga, S. & Enjuanes, L., (2015), "Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses", *Annual Review of Virology*, 2 (1), 265–288.

- Sola, I.; Galan, C.; Mateos-Gomez, P.A.; Palacio, L.; Zuniga, S.; Cruz, J.L.; Almazan, F. & Enjuanes, L., (2011), "The Polypyrimidine Tract-Binding Protein Affects Coronavirus RNA Accumulation Levels and Relocalizes Viral RNAs to Novel Cytoplasmic Domains Different from Replication-Transcription Sites", *Journal of Virology*, 85 (10), 5136–5149.
- Steitz, T.A. & Steitz, J.A., (1993), "A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (14), 6498–6502.
- Su, D.; Lou, Z.; Sun, F.; Zhai, Y.; Yang, H.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Zhang, X.C.; Bartlam, M. & Rao, Z., (2006), "Dodecamer Structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein nsp10", *Journal of Virology*, 80 (16), 7902–7908.
- Su, M.C.; Te Chang, C.; Chu, C.H.; Tsai, C.H. & Chang, K.Y., (2005), "An atypical RNA pseudoknot stimulator and an upstream attenuation signal for -1 ribosomal frameshifting of SARS coronavirus", *Nucleic Acids Research*, 33 (13), 4265–4275.
- Subissi, L.; Posthuma, C.C.; Collet, A.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Gorbalenya, A.E.; Decroly, E.; Snijder, E.J.; Canard, B. & Imbert, I., (2014), "One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (37), e3900.
- Sutton, G.; Fry, E.; Carter, L.; Sainsbury, S.; Walter, T.; Nettleship, J.; Berrow, N.; Owens, R.; Gilbert, R.; Davidson, A. *et al.*, (2004), "The nsp9 Replicase Protein of SARS-Coronavirus, Structure and Functional Insights", *Structure*, 12 (2), 341–353.
- Sydow, J.F. & Cramer, P., (2009), "RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading", *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (6), 732–739.
- Tan, J.; Vonrhein, 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 Macrod domains That Bind G-Quadruplexes", *PLoS Pathogens*, 5 (5), e1000428.
- Thiel, V. & Weber, F., (2008), "Interferon and cytokine responses to SARS-coronavirus infection", *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19 (2), 121–132.
- Totura, A.L. & Baric, R.S., (2012), "SARS coronavirus pathogenesis: Host innate immune responses and viral antagonism of interferon", *Current Opinion in Virology*, 2 (3), 264–275.
- Tran, H.T.; Gordenin, D.A. & Resnick, M.A., (1999), "The 3'→5' Exonucleases of DNA Polymerases δ and ϵ and the 5'→3' Exonuclease Exo1 Have Major Roles in Postreplication Mutation Avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular and Cellular Biology*, 19 (3), 2000–2007.
- Tvarogová, J.; Madhugiri, R.; Bylapudi, G.; Ferguson, L.J.; Karl, N. & Ziebuhr, J., (2019), "Identification and Characterization of a Human Coronavirus 229E Nonstructural Protein 8-Associated RNA 3'-Terminal Adenylyltransferase Activity", *Journal of Virology*, 93 (12), e00291.
- Ulferts, R.; Mettenleiter, T.C. & Ziebuhr, J., (2011), "Characterization of Bafinivirus Main Protease Autoprocessing Activities", *Journal of Virology*, 85 (3), 1348–1359.
- Ulferts, R. & Ziebuhr, J., (2011), "Nidovirus ribonucleases: Structures and functions in viral replication", *RNA Biology*, 8 (2), 295–304.
- Vazquez, C.; Swanson, S.E.; Negatu, S.G.; Dittmar, M.; Miller, J.; Ramage, H.R.; Cherry, S. & Jurado, K.A., (2021), "SARS-CoV-2 viral proteins NSP1 and NSP13 inhibit interferon activation through distinct mechanisms", *PLoS ONE*, 16 (6), e0253089.
- Te Velthuis, A.J., (2014), "Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (22), 4403–4420.
- Te Velthuis, A.J.; Arnold, J.J.; Cameron, C.E.; van den Worm, S. & Snijder, E.J., (2009), "The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent", *Nucleic Acids Research*, 38 (1), 203–214.
- Walker, A.P.; Fan, H.; Keown, J.R.; Knight, M.L.; Grimes, J.M. & Fodor, E., (2021), "The SARS-CoV-2 RNA polymerase is a viral RNA capping enzyme", *Nucleic Acids Research*, 49 (22), 13019–13030.
- Wang, B.; Svetlov, D. & Artsimovitch, I., (2021), "NMPylation and de-NMPylation of SARS-CoV-2 nsp9 by the NiRAN domain", *Nucleic Acids Research*, 49 (15), 8822–8835.
- Weiss, S.R. & Navas-Martin, S., (2005), "Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (4), 635–664.

- Woo, P.C.; Lau, S.K.; Chu, C.; Chan, K.; Tsoi, H.; Huang, Y.; Wong, B.H.; Poon, R.W.; Cai, J.; Luk, W. *et al.*, (2005), "Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia", *Journal of Virology*, 79 (2), 884–895.
- Woo, P.C.; Lau, S.K.; Lam, C.S.; Lau, C.; Tsang, A.K.; Lau, J.H.; Bai, R.; Teng, J.L.; Tsang, C.; Wang, M. *et al.*, (2012), "Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus", *Journal of Virology*, 86 (7), 3995–4008.
- Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.M.; Wang, W.; Song, Z.G.; Hu, Y.; Tao, Z.W.; Holmes, E.C.; Zhang, Y.Z. *et al.*, (2020), "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China", *Nature*, 579 (7798), 265–269.
- Yang, W., (2011), "Nucleases: Diversity of structure, function and mechanism", *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44 (1), 1–93.
- Yao, Z.; Jones, D.H. & Grose, C., (1992), "Site-directed mutagenesis of herpesvirus glycoprotein phosphorylation sites by recombination polymerase chain reaction", *Genome Research*, 1 (3), 205–207.
- Yuan, L.; Chen, Z.; Song, S.; Wang, S.; Tian, C.; Xing, G.; Chen, X.; Xiao, Z.X.; He, F. & Zhang, L., (2015), "P53 degradation by a coronavirus papain-like protease suppresses type I interferon signaling", *Journal of Biological Chemistry*, 290 (5), 3172–3182.
- 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 Structural and Molecular Biology*, 12 (11), 980–986.
- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R. *et al.*, (2020), "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019", *New England Journal of Medicine*, 382 (8), 727–733.
- Ziebuhr, J., (2005), "The Coronavirus Replicase", in: Enjuanes, L. (ed.), *Coronavirus Replication and Reverse Genetics* (Current Topics in Microbiology and Immunology), 287, 57–94, Springer Berlin / Heidelberg.
- Ziebuhr, J., (2008), "Coronavirus replicative proteins", in: Perlman, S.; Gallagher, T.; Snijder, E.J. (eds.), *Nidoviruses*, 65–81, ASM Press, Washington, DC.
- Ziebuhr, J.; Herold, J. & Siddell, S.G., (1995), "Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity", *Journal of Virology*, 69 (7), 4331–4338.
- Ziebuhr, J. & Siddell, S.G., (1999), "Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab", *Journal of virology*, 73 (1), 177–185.
- Ziebuhr, J.; Thiel, V. & Gorbalenya, A.E., (2001), "The Autocatalytic Release of a Putative RNA Virus Transcription Factor from Its Polyprotein Precursor Involves Two Paralogous Papain-like Proteases that Cleave the Same Peptide Bond", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (35), 33220–33232.
- Zuo, Y., (2001), "Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution", *Nucleic Acids Research*, 29 (5), 1017–1026.
- Zuo, Y.; Zheng, H.; Wang, Y.; Chruszcz, M.; Cymborowski, M.; Skarina, T.; Savchenko, A.; Malhotra, A. & Minor, W., (2007), "Crystal Structure of RNase T, an Exoribonuclease Involved in tRNA Maturation and End Turnover", *Structure*, 15 (4), 417–428.
- Züst, R.; Cervantes-Barragan, L.; Habjan, M.; Maier, R.; Neuman, B.W.; Ziebuhr, J.; Szretter, K.J.; Baker, S.C.; Barchet, W.; Diamond, M.S. *et al.*, (2011), "Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5", *Nature Immunology*, 12 (2), 137–143.

10 Anhang

10.1 Tabellen

10.1.1 Nichtstrukturproteine nsp's

Tabelle 1: Liste der Protein Data Bank Codes (PDB) zu SARS-CoV nsp1–16

Protein (nsp)	Virus	PDB-Code	Referenzen
nsp1	SARS-CoV	2HSX	(Almeida <i>et al.</i> , 2007)
nsp3	SARS-CoV	2GRI	(Serrano <i>et al.</i> , 2008)
nsp3 (X-Domäne)	SARS-CoV	2ACF	(Saikatendu <i>et al.</i> , 2005)
nsp3 (SUD)	SARS-CoV	2W2G	(Tan <i>et al.</i> , 2009)
nsp3 (PL2 ^{pro})	SARS-CoV	2FE8	(Ratia <i>et al.</i> , 2006)
nsp3 (NAB)	SARS-CoV	2K87	(Serrano <i>et al.</i> , 2009)
nsp5	SARS-CoV	1UJ1, 2BX3, 2BX4	(Anand <i>et al.</i> , 2002; Anand <i>et al.</i> , 2003)
nsp7	SARS-CoV	1YSY	(Peti <i>et al.</i> , 2005)
nsp8	SARS-CoV	2AHM	(Zhai <i>et al.</i> , 2005)
nsp9	SARS-CoV	1UW7	(Egloff <i>et al.</i> , 2004; Sutton <i>et al.</i> , 2004)
nsp10	SARS-CoV	2FYG	(Joseph <i>et al.</i> , 2006; Su <i>et al.</i> , 2006)
nsp14	SARS-CoV	5C8S, 5C8T, 5C8U	(Ma <i>et al.</i> , 2015)
nsp15	SARS-CoV	3H85	(Ricagno <i>et al.</i> , 2006)
nsp16	SARS-CoV	2XYQ	(Chen, Y. <i>et al.</i> , 2011; Decroly <i>et al.</i> , 2011)

Tabelle 2: Liste der prozessierten, Replikasegen-kodierten Coronavirus nsp's

Protein (nsp)	Proteingrößen (kDa)	Funktionen
nsp1	12–27	Degradierung wirtseigener mRNA, Inhibierung der Translation, Zellzyklusarretierung, Unterbindung der IFN-Signaltransduktion
nsp2	65–87	Unbekannt
nsp3	177–222	PL1 ^{pro} , PL2 ^{pro} (Papain-like Protease), Prozessierung von Polyprotein der N-assoziierte Replikase, Bindung von poly(ADP-Ribose), DMV-Formierung, IFN-Antagonist, RNA-Bindung, Deubiquitinierung
nsp4	54–56	DMV-Formierung (TM2)
nsp5	33–34	M ^{pro} , 3CL ^{pro} , Prozessierung von Polyproteinen
nsp6	32–34	DMV-Formierung (TM3)
nsp7	9–10	Interaktion mit nsp8, Stabilisierung von nsp8, ssRNA-Bindung
nsp8	22–23	Nichtkanonische RNA-Polymerase, Primase-Aktivität, TATase-Aktivität, Komplex mit nsp7 und nsp12
nsp9	~12	ssRNA-Bindung
nsp10	14–15	Kofaktor von nsp14 und nsp16
nsp11	1–2	Unbekannt
nsp12	105–108	Kanonische RNA-abhängige RNA-Polymerase
nsp13	66–67	HEL1 Helikase, Nukleosid-Triphosphatase, RNA 5'-Triphosphatase
nsp14	58–60	ExoN, 3'-5'-Exoribonuklease, RdRp-Fehlerkorrektur, N7-MTase-Aktivität (cap-spezifische Guanin-N7 Methyltransferase), IFN-Antagonist, Replikation
nsp15	38–42	endoU, Hexamere Uridylat-spezifische Endoribonuklease-Aktivität
nsp16	33–34	2'-O-MTase, 2'-O-Methyltransferase-Aktivität (cap1 Formierung)

*Tabelle 1 und 2 Modifiziert nach (Ziebuhr, 2008).

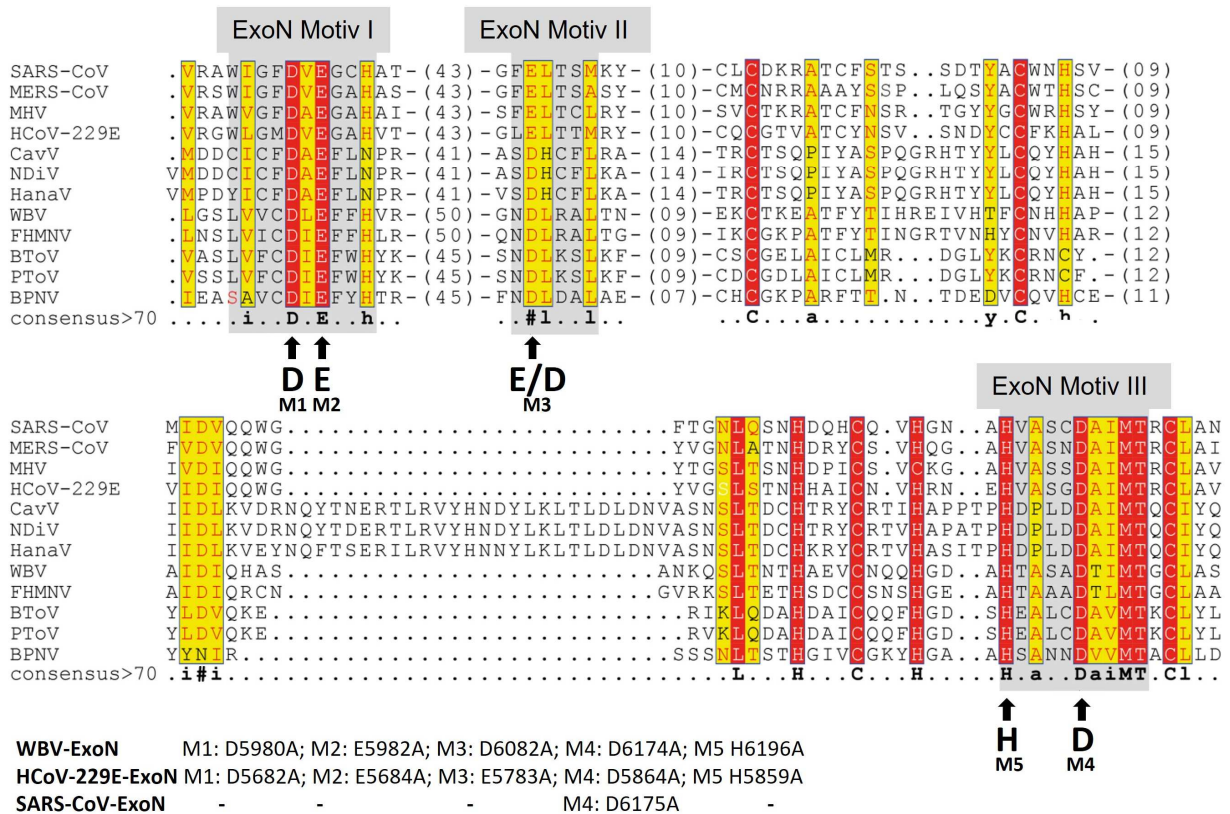
10.1.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β- Mercaptoethanol	Roth
2- Isopropanol	Roth
Adenosin 5'-Triphosphat	Roth
Agar	BD
Agarose	Biozym
APS (Ammoniumpersulfat)	Aldrich
Anhydrotetracyclinchlorid	IBA
Akrylamid (C ₃ H ₅ NO)	ApliChem
Akrylamid-Verdünner	ApliChem
Akrylamid-Puffer	ApliChem
Aminocaprinsäure (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	Roth
Ammoniumacetat (NH ₄ OAc)	Roth
Bacto-Agar	BD
Bacto-Pepton	BD
Bacto-Trypton	BD
Bromphenolblau	Roth
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Coomassie-Brilliantblau G-250	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
Ethanol (EtOH)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth
Essigsäure (<i>glacial acetic acid</i>)	Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Formamid	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Guanosin 5'-Triphosphat	Roth
Hefeextrakt	Difco
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	Sigma
Hydrogenchlorid (HCl)	Sigma
Imidazol (1,3-Diaza-2,4-Cyclopentadien)	Sigma
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Sigma
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Lysozym	Roth
Manganchlorid (MnCl ₂)	Merck
Magnesiumacetat (C ₄ H ₆ MgO ₄)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol (CH ₃ OH)	Sigma
Natriumazetat (NaOAc)	Merck
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
NP-40 (nonyl Phenoxypropylpolyethoxyethanol)	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth
Thioglycerin (3-Mercaptopropane-1,2-diol)	Roth
Urea	ApliChem
Uridin 5'-Triphosphat	Roth
Xylencyanol	Serva
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Roth

10.1.3 Liste klonierter Expressionsvektoren

Expressionsvektoren/Konstrukte	Beschreibung	Referenz
pASK-IBA 3	Tet; ApR; MCS; tet Repr.; Strep-tag (C-term.);	IBA Biotec.
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-17069-18622-His ₆ -TAA (NC_002645.1)	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp10-His ₆	tet Ub- HCoV-229E-nsp10-12092-12496-His ₆ -TAA (NC_002645.1)	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14_D5682A-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-D5682A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14_E5684A-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-E5684A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14_E5783A-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-E5783A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14_D5864A-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-D5864A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pASK-IBA 3-HCoV-229E-nsp14_H5859A-His ₆	tet Ub-HCoV-229E-nsp14-H5859A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pDEST-14	T7; attR1; Cm ^R ; ccdB, attR2, T7 Repr. (C-term.)	Invitrogen
pDEST14-SARS-CoV-nsp14-His ₆	T7 Met-SARS-CoV-nsp14-17970-19550-His ₆ -TAA (NC_004718.3)	Minskaia <i>et al.</i> , 2006 und diese Arbeit
pDEST14-SARS-CoV-nsp14-D6175A-His ₆	T7 Met-SARS-CoV-nsp14_D6175A-His ₆ -TAA	Minskaia <i>et al.</i> , 2006 und diese Arbeit
pET-11d	T7; lacI; bla; T7 Repr. (C-term.)	Novagen
pET-11d-WBV-ExoN-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-18758-19858-His ₆ -TAA (NC_008516.1)	diese Arbeit
pET-11d-WBV-pp1aC-His ₆	T7 Met-WBV-nsp10-13358-13623-His ₆ -TAA (NC_008516.1)	diese Arbeit
pET-11d-SARS-CoV-nsp10-His ₆	T7 Met-SARS-CoV-nsp14-12955-13371-His ₆ -TAA (NC_004718.3)	diese Arbeit
pET-11d-WBV-ExoN-D5980A-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-D5980A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pET-11d-WBV-ExoN-E5982A-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-E5982A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pET-11d-WBV-ExoN-D6082A-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-D6082A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pET-11d-WBV-ExoN-D6174A-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-D6174A-His ₆ -TAA	diese Arbeit
pET-11d-WBV-ExoN-H6196A-His ₆	T7 Met-WBV-nsp14-H6196A-His ₆ -TAA	diese Arbeit

10.2 Alignment der konservierten ExoN-Domänen



Konservierung der katalytisch und strukturell bedeutsamen Motive I–III in nidoviralen ExoN-Domänen. Abgebildet ist der Sequenzvergleich (engl.: alignment) von ExoN-Domänen verschiedener Vertreter der *Nidovirales*. Die Darstellung wurde mittels Tcoffee erstellt und mit Hilfe von ESPript bearbeitet (Notredame *et al.*, 2000). Dabei wurden hochkonservierte Aminosäuren mit rot und partiell konservierte Aminosäuren mit gelb hinterlegt. Die Positionen der in der vorliegenden Mutagenese eingefügten Alanin-Substitutionen charakteristischer DEE/DDH-Reste sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Graue Bereiche repräsentieren die konservierten Motive I–III der Exonukleasen. Abkürzungen: SARS-CoV: SARS-Coronavirus (GenBank NC_004718); MERS-CoV: MERS-Coronavirus (GenBank NC_019843); MHV: Murines Hepatitis-Virus (GenBank NC_001846); HCoV-229E: Humanes Coronavirus 229E (GenBank NC_002645); CavV: Cavallyvirus (GenBank NC_015668); NDiV: Nam Dinh Virus (GenBank NC_015874); HanaV: Hana Virus (GenBank NC_020899); WBV: White bream virus (GenBank DQ898157.1); FHMNV, fathead minnow nidovirus (GenBank GU002364.2); BPNV, ball python nidovirus (GenBank KJ541759.1).