

Biochemische Charakterisierung einer mesoniviralen
Exoribonuklease

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nils Schulz
aus Frankfurt am Main

Gießen, 2023

Aus dem Institut für Medizinische Virologie des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr
Gutachter: Prof. Dr. Bernd Niemann

Tag der Disputation: 11.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Nidovirales</i>	1
1.2	Taxonomie der <i>Nidovirales</i>	2
1.2.1	Cavallyvirus aus der Subordnung <i>Mesnidovirineae</i>	3
1.3	Genomorganisation.....	6
1.4	Expression und Prozessierung der viralen Replikationsproteine	7
1.5	Zur Replikation benötigte Nichtstrukturproteine	9
1.5.1	Nsp10 als wichtiges regulatorisches Protein.....	11
1.5.2	Nsp14 und dessen Interaktion mit nsp10	12
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Materialien	18
2.1	Chemikalien.....	18
2.2	Puffer und Lösungen	19
2.3	Enzyme und Kits	21
2.4	Molekularbiologische Reagenzien und Größenstandards	21
2.5	Filter und Membranen	21
2.6	Antikörper und immunologische Reagenzien	21
2.7	Antibiotika	22
2.8	Plasmide.....	22
2.9	Biologische Materialien.....	22
2.10	Medien.....	23
2.11	Oligonukleotide	23
2.12	Radioaktive Nukleotide	25
2.13	RNA-Substrate.....	26
2.14	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.15	Geräte und spezielle Artikel, Software.....	28
3	Methoden.....	29
3.1	Biochemische und biophysikalische Methoden	29
3.1.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> -Kulturen	29
3.1.2	Enzymatischer Zellaufschluss von <i>E. coli</i> mit anschließender Sonifizierung	29

3.1.3	Isolierung und Aufreinigung von Proteinen.....	29
3.1.4	Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinen.....	30
3.1.5	Gelelektrophorese und <i>Blotting</i> -Verfahren	31
3.1.6	Nachweis von Makromolekülen in Gelen oder Membranen	33
3.2	Molekularbiologische Arbeiten und Methoden.....	34
3.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.2.2	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	34
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
3.2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
3.2.5	Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR	36
3.2.6	³² P-End-Markierung von Nukleinsäuren.....	36
3.2.7	RNA/RNA-Hybridisierung	37
3.2.8	RNA-Spaltungsassay (<i>in-vitro</i> -RNA-Degradationsassays)	37
3.3	Zellkultur und virologische Methoden	38
3.3.1	Auftauen und Kultivierung von C6/36-Zellen	38
3.3.2	Einfrieren von C6/36-Zellen zur längerfristigen Lagerung.....	39
3.3.3	Virusinfektion.....	39
3.3.4	Zellfixierung und Konfokalmikroskopie.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Proteinexpression und Aufreinigung rekombinant hergestellter CavV-ExoN in <i>E. coli</i>	41
4.1.1	Quantifizierung der exprimierten Proteine.....	45
4.1.2	Trans-Spaltungsassay der Affinitätstags	46
4.1.3	Herstellung polyklonaler Antikörper gerichtet gegen CavV-ExoN-GSSG-His ₇	47
4.1.4	Herstellung polyklonaler Antikörper gerichtet gegen CavV-ExoN-GSSG-His ₇	47
4.2	Proteinvarianten der CavV-ExoN-Domäne.....	48
4.3	Nachweis des ExoN-Proteins in CavV-infizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	52
4.4	Mögliche Kofaktoren von CavV-ExoN.....	52
4.4.1	Expression und Aufreinigung der cavallyviralen Hpp8- und Hpp9-Proteine	54
4.4.2	Herstellung von Hpp8-GSSG-His ₇ - und Hpp9-GSSG-His ₇ -spezifischen polyklonalen Antikörpern	58

4.5	ExoN- <i>in-vitro</i> -Aktivitätstests (RNA- <i>in-vitro</i> -Degradationsassays)	60
4.5.1	Einfluss der verschiedenen Affinitätstags	61
4.5.2	CavV-ExoN-Nukleaseaktivität gegenüber verschiedenen Substraten .	62
4.5.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die mesonivirale ExoN ..	65
4.5.4	Vergleich der Aktivität der verschiedenen CavV-ExoN-Proteinvarianten mit Aminosäuresubstitutionen in konservierten Motiven	74
4.5.5	Nukleolytische Aktivität der mesoniviralen ExoN gegenüber ssRNA- Substraten	76
4.5.6	Interaktion der mesoniviralen ExoN mit möglichen Kofaktorproteinen	78
4.5.7	Nukleolytische Aktivität und Substratspezifität der CavV-ExoN unter optimierten Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Metallionen	81
5	Diskussion	83
5.1	Expression und Aktivität der CavV-ExoN	84
5.2	ExoN als Teil des Replikations-Transkriptions-Komplexes sowie dessen subzelluläre Lokalisation.....	85
5.3	Biochemische Charakterisierung der CavV-ExoN.....	85
5.3.1	Substratspezifität	85
5.3.2	Metallionabhängigkeit.....	87
5.4	Etablierung von optimierten Reaktionsbedingungen für die <i>In-vitro</i> -Nuklease- Aktivitätstests	88
5.5	Bedeutung der konservierten Motive der DEDDh-Exoribonuklease- Superfamilie	89
5.6	Mögliche Rolle weiterer viraler Proteine für die CavV-ExoN-Aktivität	91
5.7	CavV-ExoN als integraler Bestandteil des „ <i>Proofreading</i> -Prozesses“	93
5.8	Ausblick.....	94
6	Zusammenfassung	96
7	Summary	98
8	Abbildungsverzeichnis	99
9	Tabellenverzeichnis.....	100
10	Abkürzungsverzeichnis	101
11	Literaturverzeichnis.....	105
12	Erklärung zur Dissertation	111

1 Einleitung

1.1 *Nidovirales*

Die Ordnung der *Nidovirales* beinhaltet behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität (+ssRNA). Der Namensbestandteil „Nido“ (nidus, lat. für Nest) leitet sich von der Tatsache ab, dass die 3'-coterminal subgenomischen (sg) mRNAs in sich verschachtelt vorliegen (engl. „nested set of mRNAs“). Diese sind kennzeichnend für die Genomexpression dieser monophyletischen, jedoch genetisch außerordentlich diversen Gruppe von RNA-Viren. Die Ordnung *Nidovirales* beinhaltet acht Virus-Subordnungen: *Abnidovirineae*, *Arnidovirineae*, *Cornidovirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidovirineae*, *Nanidovirineae*, *Ronidovirineae* und *Tornidovirineae*. Nidoviren können eine Vielzahl von Tieren, wie beispielsweise Säugetiere (inklusive Menschen), Vögel, Fische, Reptilien und verschiedene Invertebraten (Insekten, Krustentiere, Weichtiere u.a.) infizieren. Sie verursachen veterinärmedizinisch bedeutsame Infektionen von Nutz- und Haustieren. Humane Coronaviren gehören nach den Rhinoviren zu den häufigsten Erregern von Infektionen des oberen Respirationstraktes beim Menschen (Fields, Knipe, & Howley, 2007).

Mit dem Aufkommen von SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 standen die Coronaviren im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses. Das SARS-CoV-2 ist verantwortlich für eine der bis dato folgenreichsten Pandemien mit vielen Millionen von Infizierten und Todesopfern (Arbour, Day, Newcombe, & Talbot, 2000; Balboni, Battilani, & Prospero, 2012; Breiman et al., 2003; Drosten, Preiser, Gunther, Schmitz, & Doerr, 2003; van den Hoogen et al., 2001). Viren der Ordnung *Nidovirales* besitzen im Vergleich zu den meisten anderen +ssRNA Viren eine außergewöhnliche Genomgröße und Komplexität. Die Genomgrößen liegen im Bereich zwischen ~12 - ~41 kb. Nidoviren kodieren in ihren Replikasegenen einen konservierten Satz von Proteinen in einer typischen Abfolge im Genom, die in dieser Konstellation bei anderen +RNA-Viren bisher nicht gefunden wurden, und nutzen ähnliche Strategien in der Genomexpression (Gorbalenya, Enjuanes, Ziebuhr, & Snijder, 2006; Saberi, Gulyaeva, Brubacher, Newmark, & Gorbalenya, 2018; Snijder et al., 2003). Zu den nidoviruspezifischen Domänen gehört beispielsweise eine Zink-bindende Domäne (ZBD) im N-terminalen Bereich der nidoviralen Helikase, die bei allen Nidoviren konserviert ist, sowie eine Uridylat-spezifische Endonuklease (NendoU)-Domäne, die bei allen vertebrateninfizierenden Nidoviren konserviert ist (Gorbalenya et al., 2006).

1.2 Taxonomie der *Nidovirales*

Die vor kurzem erfolgte Weiterentwicklung der Virustaxonomie durch das ICTV („International Committee on Taxonomy of Viruses“) von einem 5-Rang-System (1991-2017) zu einem 15-Rang-System trägt der Tatsache Rechnung, dass die Zahl vollständig bestimmter Genomsequenzen von Viren in den letzten Jahren enorm angestiegen ist. Daraus ergab sich zunehmend die Notwendigkeit, weitere Taxa einzuführen, die es ermöglichen, den phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der zahlreichen neuentdeckten und genetisch extrem diversen Viren exakter widerzuspiegeln.

Die Ordnung der *Nidovirales* gehört (neben den *Picornavirales* und *Sobelivirales*) zur Klasse der *Pisoniviricetes* (siehe auch <https://ictv.global/taxonomy>).

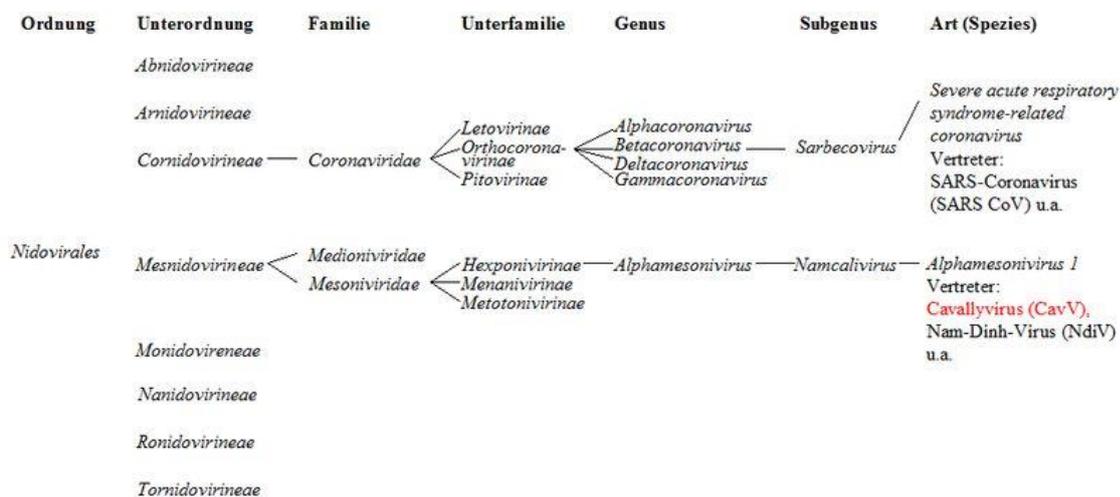


Abbildung 1: Die Ordnung *Nidovirales* und ihre Unterordnungen

Die Ordnung *Nidovirales* teilt sich auf in die hier gezeigten acht Unterordnungen *Abnidovirineae*, *Arnidovirineae*, *Cornidovirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidovirineae*, *Nanidovirineae*, *Ronidovirineae* und *Tornidovirineae*. Von besonderem medizinischem Interesse ist die Spezies *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* in der Subfamilie der *Orthocoronavirinae* (Familie *Coronaviridae*, Subordnung *Cornidovirineae*), da sie (neben anderen Viren) auch den Erreger der Covid-19-Pandemie enthält (SARS-CoV-2). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Cavallyvirus, ein Virus aus der Spezies *Alphamesonivirus 1* der Gattung *Alphamesonivirus* (Unterfamilie *Hexponivirinae*, Familie *Mesoniviridae*). Diese beiden Viren und ihre taxonomische Einordnung sind hier wiedergegeben (weitere Informationen im Text Kapitel 1.2.1)

1.2.1 Cavallyvirus aus der Subordnung *Mesnidovirineae*

Die Subordnung *Mesnidovirineae* beinhaltet zwei Virusfamilien: *Medioniviridae* und *Mesoniviridae*. Die *Mesoniviridae* beinhalten gegenwärtig eine einzige Subfamilie (*Hexponivirinae*), die wiederum nur eine Gattung (*Alphamesonivirus*) mit 9 Untergattungen enthält. Der Name Mesonivirus leitet sich aus dem griechischem „mesos“ in der Mitte und „ni“ für Nidovirus ab und wurde in Anspielung auf die Genomgröße dieser Viren gewählt, die zwischen den Genomgrößen „großer Nidoviren“ (also beispielweise *Coronaviridae* und *Roniviridae*, ca. 26-31 kb) und den deutlich kleineren Arteriviren (ca. 13-16 kb) liegt. Viren der Familie *Mesoniviridae* infizieren Insekten und sind weltweit verbreitet in Mosquitos (Vasilakis et al., 2014; Zirkel et al., 2013). Obwohl sie keine Vertebraten infizieren und deshalb auch keine Erkrankungen beim Menschen verursachen können, sind sie von besonderem Interesse, da sie interessante genetische Ähnlichkeiten zu einigen anderen Familien der *Nidovirales* aufweisen. Eine Besonderheit ist die Tatsache, dass *Mesoniviridae* keine Uridylat-spezifische Endonuklease (NendoU) exprimieren, die vor wenigen Jahren noch als universell konservierte Domäne bei allen Viren der Ordnung *Nidovirales* galt (Lauber et al., 2012; Nga et al., 2011). Inzwischen hat sich jedoch gezeigt, dass Nidoviren, die Invertebraten infizieren, keine NendoU kodieren. Als die am besten untersuchten Isolate sind Cavallyvirus (CavV) und Nam-Dinh-Virus (NDiV) zu nennen, die zuerst in der Elfenbeinküste und Vietnam gefunden werden konnten und beide der Spezies *Alphamesonivirus 1* zugeordnet wurden (Lauber et al., 2012; Zirkel et al., 2013).

Das Cavallyvirus wurde im tropischen Regenwald in der Elfenbeinküste in Westafrika erstmals nachgewiesen. Es konnte primär aus *Culex*-Mosquitos der Gattung *Aedes*, aber auch aus den Gattungen *Anopheles* und *Uranotaenia* isoliert werden. Der Virusname basiert auf dem Namen eines Flusses, in dessen Nähe die Mosquitos gefangen werden konnten. In der Zellkultur zeigen diese Viren einen starken zytopathischen Effekt in C6/36-Zellen und präsentieren sich als behüllte, kugelförmige Partikel im Zytoplasma. Als Vertreter der Familie *Mesoniviridae* besitzt es (mit Ausnahme der NendoU) die für die meisten Viren der Ordnung *Nidovirales* typischen funktionellen Domänen im Replikasegen und hat eine ähnliche allgemeine Genomorganisation (s.1.3). Das RNA-Genom umfasst 20.108 Nukleotide mit sieben offenen Leserastern (ORFs) (Zirkel et al., 2011).

Als erstes mesonivirales Nichtstrukturprotein wurde die virale 3CL^{pro} charakterisiert. Es wurden klar definierte Schnittstellen der Protease im pp1a/pp1ab herausgearbeitet.

Außerdem wurde die Struktur des Proteins mittels Röntgenkristallographie bestimmt (Blanck & Ziebuhr, 2016; Kanitz et al., 2019).

Abbildung 2 demonstriert die bisher publizierten Schnittstellen der cavallyviralen Hauptprotease 3CL^{pro} im Detail und gibt einen Überblick über die resultierenden Spaltprodukte. Diese werden in der vorliegenden Arbeit als „Hpp“ (Hauptproteaseprodukte) abgekürzt und durchnummeriert. Da es bisher keine Informationen zur proteolytischen Prozessierung der N-terminalen Bereiche der Polyproteine pp1a und pp1ab von CavV gibt, verweisen die hier vergebenen Nummern nicht auf homologe Proteine bei Coronaviren, deren Polyproteinprozessierungsprodukte als nsp1 bis nsp16 bezeichnet werden und von mindestens 2 viralen Proteasen freigesetzt werden (Ziebuhr, Snijder, & Gorbalenya, 2000).

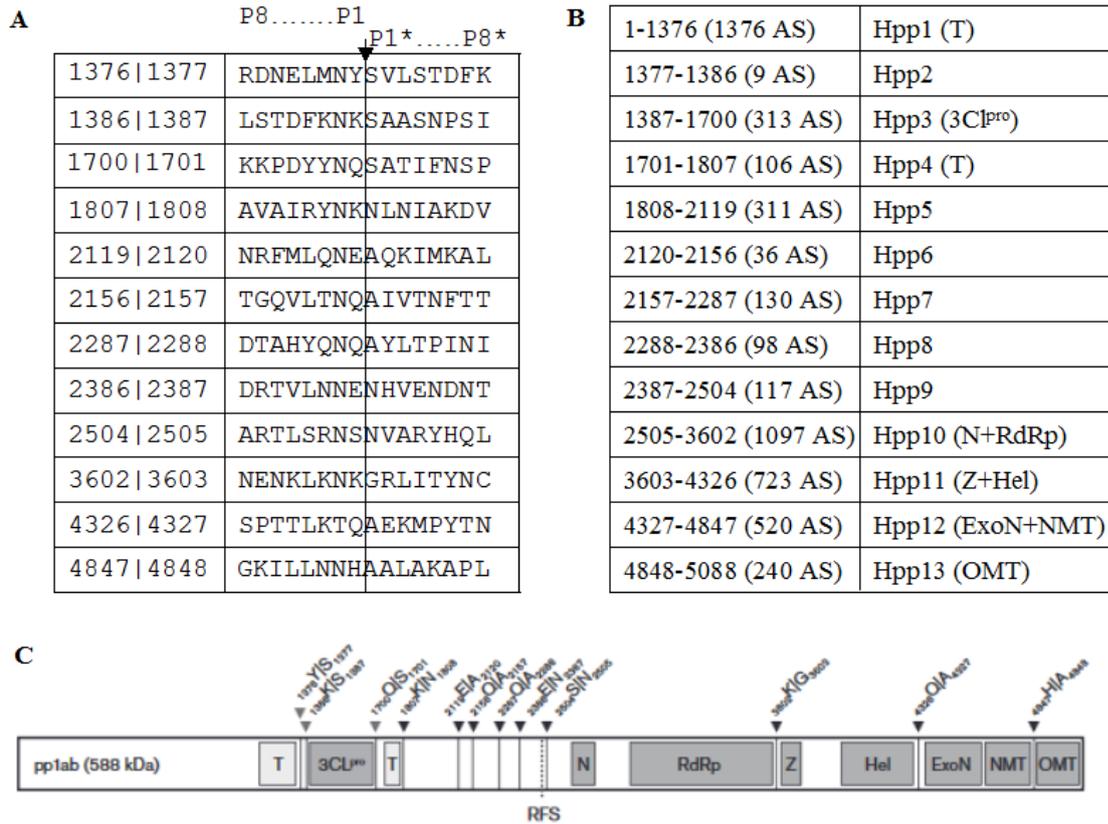


Abbildung 2: Schnittstellen der cavallyviralen Hauptprotease 3CL^{pro}

A Detaillierte Darstellung der Schnittstellen im CavV-pp1ab. Die Nummern stellen die Position der jeweiligen Aminosäure im pp1ab dar. Die Aminosäurereste sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. P8...P1 sowie P1*...P8* geben jeweils die 8 C-terminalen bzw. 8 N-terminalen Aminosäuren der beiden resultierenden Spaltprodukte an. Der Pfeil markiert die entsprechende Schnittstelle.

B Tabellarische Darstellung der resultierenden Spaltprodukte (Hauptproteaseprodukte „Hpp1-13“), deren Aminosäureanzahl (AS) und die darin beinhaltete funktionelle Domäne (soweit bekannt). Die Zahlen in der linken Spalte zeigen die Position im pp1a/pp1ab an.

C Schematische Darstellung des pp1ab (für weitere Informationen wird auf Kapitel 1.3, 1.4 und 1.5 verwiesen) sowie der mit Pfeilköpfen gekennzeichneten experimentell bestimmten Schnittstellen der cavallyviralen Hauptprotease (3CL^{pro}) (Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von Blanck und Ziebuhr 2016).

T - Transmembrandomäne, 3CL^{pro} – 3C-ähnliche Hauptprotease, N - Nidovirale RdRp-assoziierte Nucleotidyltransferasedomäne, RdRp - RNA-abhängige RNA-Polymerase, Z - Helikaseassoziierte Zinkbindedomäne, Hel - Helikase, ExoN - Exoribonuklease, NMT – Guanosin-N7-Methyltransferase, OMT - Ribose-2'-O-Methyltransferase

1.3 Genomorganisation

Das Genom der *Nidovirales* ist für die acht Subordnung ähnlich aufgebaut. Die Genomgröße der positiv-strängigen RNA-Viren variiert zwischen ~12 kb (*Arnidovirineae*) - 41 kb (*Monidovirineae*). Die Genomstruktur weist folgende Gemeinsamkeiten auf: Am 5'-Ende des Genoms befindet sich eine *Cap*-Struktur, es folgt eine 5'-untranslatierte Region (UTR), anschließend folgen zwei offene Leseraster: ORF1a und ORF 1b, die zusammen das Replikasegen bilden (Ausnahme *Monidovirineae*, hier nur ein einziges großes ORF1), eine variierende Anzahl an offenen Leserastern, welche für Struktur- und einige akzessorische Proteine kodieren, die 3'-UTR und die Polyadenylierung am 3'-Ende. Die 5'-UTR und 3'-UTR beinhalten cis-aktive RNA-Elemente, die für die virale RNA-Synthese essentiell sind (Gorbalenya et al., 2006; Sevajol, Subissi, Decroly, Canard, & Imbert, 2014).

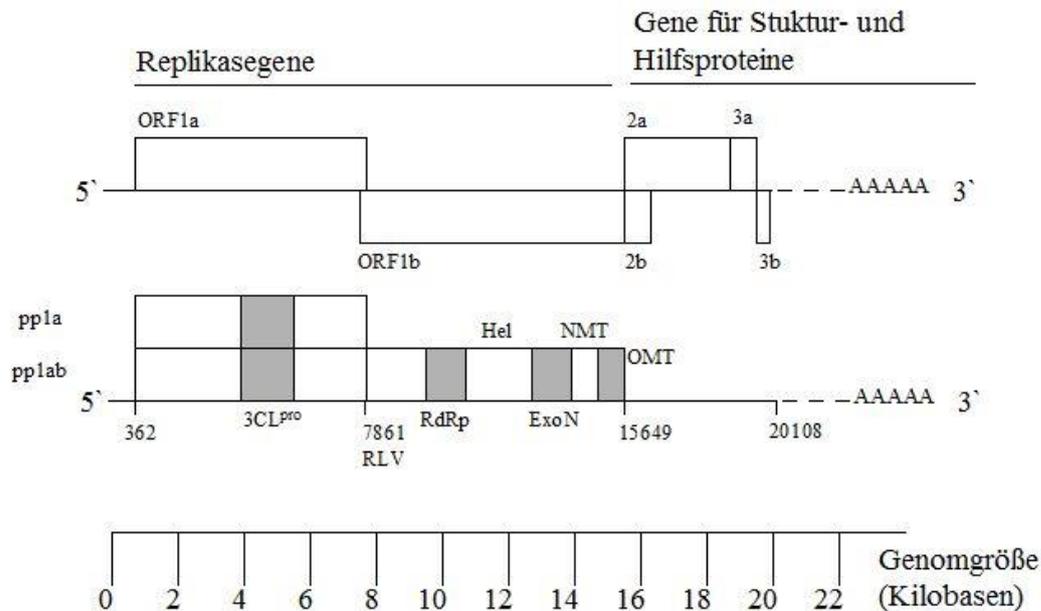


Abbildung 3: Genomorganisation der *Nidovirales* am Beispiel des mesoniviralen Cavallyvirus

Das RNA-Genom des CavV umfasst ohne die 3'-Poly(A)-Sequenz 20.108 Nukleotide. Das Replikasegen besteht aus den zwei großen offenen Leserastern ORF 1a und ORF 1b, welche für die Polyproteine pp1a und pp1ab kodieren, aus denen durch proteolytische Prozessierung die sogenannten Nichtstrukturproteine (nsps) freigesetzt werden. Die Expression der ORF-1b-Sequenz erfordert während der Translation der genomischen RNA eine programmierte ribosomale Leserasterverschiebung (RLV) in das (-1) Leseraster. Die nachfolgenden ORFs werden von subgenomischen mRNAs exprimiert. Sie kodieren für die viralen Strukturproteine und einige akzessorische Proteine unbekannter Funktion (hier nicht im Detail gezeigt). [3CL^{pro}] Picornavirus-3C-ähnliche Hauptprotease, [RdRp] RNA-abhängige RNA-Polymerase, [Hel] Helikase, [ExoN] Exoribonuklease, [NMT] Guanosin-N7-Methyltransferase, [OMT] Ribose-2'-O-Methyltransferase.

1.4 Expression und Prozessierung der viralen Replikationsproteine

Über den Replikationsvorgang und die Prozessierungswege der *Mesoniviridae* ist bis auf die Schnittstellen der 3CL^{pro} (Blanck & Ziebuhr, 2016) wenig bekannt, so dass sich das folgende Kapitel auf die verwandten *Coronaviridae* bezieht.

Während ORF 1a, welches für das Polyprotein 1a (pp1a) kodiert, den konventionellen Mechanismen der Initiierung und Terminierung der Translation folgt, benötigt das zweite Leseraster ORF1b einen nicht-konventionellen Translationsmechanismus, da für dessen Expression in infizierten Zellen keine eigene mRNA gebildet wird. Die Expression von ORF1b wird durch eine (-1) ribosomale Leserasterverschiebung gewährleistet, die unmittelbar vor Erreichen des ORF1a-Stopp-Codons erfolgt. Auf diese Weise erreicht das Ribosom den ORF1b und kann die Translation bis zum Erreichen des ORF1b-Stopp-Kodons fortsetzen, womit die Biosynthese der für die virale Replikation essentiellen Nichtstrukturproteine nsp12 – 16 sichergestellt wird. Diese Verschiebung in das ORF1b-Raster geschieht bei etwa 30-40 % der Translationen bevor das Stopp-Codon von ORF1a erreicht ist (Herold & Siddell, 1993). Dies ermöglicht die Expression des von den beiden ORFs 1a und 1b kodierten Polyproteins 1ab (pp1ab). Das Polyprotein pp1ab ist also eine C-terminal verlängerte Version des Polyproteins pp1a. Während die Nichtstrukturproteine nsp1 bis nsp10 in beiden Polyproteinen enthalten sind und daraus durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden können, kann nsp11 nur aus pp1a und nsp12 bis nsp16 nur aus pp1ab produziert werden. Der Mechanismus der (-1) ribosomalen Leserasterverschiebung wurde für die verschiedensten Vertreter der *Nidovirales* gezeigt (Plant & Dinman, 2008). Er wird durch spezifische Signale in den überlappenden Regionen von ORF1a und ORF1b vermittelt. Das Hauptsignal ist eine heptanukleotidische „*slippery sequence*“ (UUUAAAC bei Coronaviren, GGAUUUU bei Mesoniviren) gefolgt von einer stabilen RNA-Sekundärstruktur, welche durch eine kurze „*spacer*“-Sequenz voneinander getrennt sind. Diese stabile RNA-Sekundärstruktur besitzt in den meisten Fällen eine Pseudoknotenstruktur, wie es zuerst für das IBV gezeigt werden konnte (Brierley et al., 1987; Brierley, Digard, & Inglis, 1989). Des Weiteren konnten für eine Vielzahl anderer Coronaviren komplexe RNA-Strukturen gefunden werden, die dreistämmige Pseudoknoten beinhalten (Dos Ramos, Carrasco, Doyle, & Brierley, 2004; Herold & Siddell, 1993; Herold, Siddell, & Gorbalenya, 1999; Plant & Dinman, 2008; M. C. Su, Chang, Chu, Tsai, & Chang, 2005).

Die allgemeine Genomstruktur der *Coronaviridae* ähnelt derjenigen von Mesoniviren (s. 1.3 Genom-Organisation) und unterscheidet sich hauptsächlich in der Reihenfolge und Anwesenheit der N-terminalen viralen Zusatzproteine und einigen funktionalen Domänen der Replikaseproteine (De Groot et al., 2012; Snijder, Decroly, & Ziebuhr, 2016; Ziebuhr, 2005). Die coronaviralen Polyproteine pp1a und pp1ab werden von viruseigenen Proteasen prozessiert (Ziebuhr et al., 2000). Die mittleren und C-terminalen Bereiche werden von einer Cystein-Protease gespalten, deren Struktur Ähnlichkeiten mit der Serinprotease Chymotrypsin und den 3C-Proteasen von Picornaviren aufweist. Sie wird als „coronavirale Hauptprotease“ bezeichnet (in der englischsprachigen Literatur „*coronavirus main protease*“ (M^{pro}) oder auch „*3C-like protease*“ ($3CL^{pro}$)) (Anand et al., 2002; Ziebuhr, Herold, & Siddell, 1995). Die N-terminalen Bereiche der Polyproteine werden von einer oder zwei papain-ähnlichen Protease(n), die man als $PL1^{pro}$ und $PL2^{pro}$ bezeichnet prozessiert (Herold, Gorbalenya, Thiel, Schelle, & Siddell, 1998; Ziebuhr, Thiel, & Gorbalenya, 2001). Die coronavirale Hauptprotease entspricht dem nsp5, während die beiden papain-ähnlichen Proteasen Bestandteil von nsp3 sind. $PL1^{pro}$ und $PL2^{pro}$ (manchmal auch nur eine einzige PL^{pro}) spalten die N-proximale Region von pp1a und pp1ab an (meistens) 3 Stellen (zwischen nsp1/2, nsp2/3 und nsp3/4). Die restlichen nsps werden durch die coronavirale Hauptprotease aus den pp1a und pp1ab herausprozessiert. Diese besitzt somit insgesamt 11 Schnittstellen im C-terminalen Bereich (Ziebuhr, 2008; Ziebuhr et al., 2000).

Die ORF1a/b-kodierten Nichtstrukturproteine bilden zusammen den Replikations-Transkriptions-Komplex, welcher nicht nur das eigene virale Genom repliziert, sondern auch zahlreiche subgenomische (sg) mRNAs in großen Mengen produziert. Diese sg mRNAs exprimieren die im 3'-proximalen Genombereich kodierten Strukturproteine (Nukleokapsidprotein (N), Membranprotein (M), Spikeprotein (S) und Hüllprotein (E)) sowie andere akzessorische Proteine aus den nachfolgenden ORFs, die unter anderem wichtig für den Infektionszyklus im Wirt sind (Liu, Fung, Chong, Shukla, & Hilgenfeld, 2014). Sg mRNA besitzen am 5'-Ende eine „*Leader*“-Sequenz, die dem 5'-Ende des Genoms gleicht. Als letzten Schritt in der Negativstrang-RNA-Synthese wird eine komplementäre Kopie dieser „*Leader*“-Sequenz („*Antileader*“) an das 3'-Ende der sg Negativstränge angehängt, was ein Ablösen der naszierenden Negativ-RNA von der Matrize und anschließende Fortsetzung der RNA-Synthese an einer Position nahe am 5'-Ende der Genom-RNA erfordert. Die Synthese der sg Minusstrang-RNA erfolgt somit

diskontinuierlich und wird durch sogenannte „transkriptionsregulierende Sequenzen“ (TRS) mit Hilfe komplementärer Basenpaarungen ermöglicht. Die TRSs befinden sich jeweils *upstream* der einzelnen ORFs im 3'-Genombereich (sog. *body TRSs*) und *downstream* der 5'-*Leader*-Sequenz (sog. *leader TRS*) (Sawicki & Sawicki, 1995; Sola, Almazan, Zuniga, & Enjuanes, 2015). Abschließend werden die „*Antileader*“-enthaltenden Negativstränge als Matrize für die Synthese positivsträngiger sg RNA verwendet. Alle coronaviralen sg RNA besitzen wie auch die genomische RNA eine 5'-Cap-Struktur, eine 5'-*Leader*-Sequenz und eine 3'-Poly(A)-Sequenz (Spaan et al., 1983).

1.5 Zur Replikation benötigte Nichtstrukturproteine

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die Nichtstrukturproteine der *Nidovirales*. Da das Wissen für die *Mesoniviridae* bisher nur auf Sequenzvergleichen und Studien zu homologen Proteinen von unterschiedlichen Viren anderer Nidovirusfamilien basiert, wird in diesem Kapitel Bezug auf *Coronaviridae* genommen. Nach Expression und Prozessierung der nsps bilden diese Proteine durch Protein-Protein-Wechselwirkungen große Proteinkomplexe aus, die man als Replikations-Transkriptionskomplexe (RTC) bezeichnet. Hierbei scheinen die vom ORF1a kodierten Proteine (nsp1-11) eher regulatorische und unterstützende Funktionen auszuüben, während die vom ORF1b kodierten Proteine (nsp12-16) enzymatische Funktionen besitzen, die unmittelbar an der Synthese und Prozessierung der viralen RNA beteiligt sind (eine Übersicht gibt Tabelle 1 auf der folgenden Seite).

In den letzten Jahren konnten Kristallstrukturen einzelner nsps aufgeklärt werden und die Funktionen einzelner Proteine biochemisch untersucht werden (zusammengefasst in (Snijder et al., 2016)).

Die beiden nächsten Abschnitte geben einen detaillierten Einblick über die Funktionen sowie die Bedeutung und Interaktionen von nsp10 als regulatorische Untereinheit sowie über die hochkonservierte ExoN-Domäne (nsp14), die das zentrale Thema dieser Arbeit darstellt.

Für nähere Informationen zu den anderen nsps wird auf andere einschlägige Fachliteratur verwiesen.

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen coronaviralen Nichtstrukturproteine

Dargestellt in Tabellenform sind alle 16 coronaviralen Nichtstrukturproteine, die aus den ORF1a und 1b enkodieren mit deren molekularen Massen, Eigenschaften und Funktionen. Nsp1 - 11 gehören dem ORF1a, nsp12 - 16 exklusive dem ORF1b zu.

Protein	Molekulare Masse in kDa	Eigenschaften und Funktionen
Polyprotein 1a/1ab		
nsp1	12-27	Regulator der zellulären und viralen Translation, Immunevasion (Thoms et al., 2020)
nsp2	65-87	Unbekannte Funktion, gering konserviert
nsp3	177-222	Papainähnliche Protease (PL1 ^{pro}), Deubiquitinierung, De-ADP-Ribosylierung, RNA-bindende Domänen, mehrere zinkbindende Domänen, Transmembrandomäne (TM1)
nsp4	54-56	Transmembrandomäne (TM2)
nsp5	33-34	Coronavirale Hauptprotease (Main protease M ^{pro} /3CL ^{pro})
nsp6	32-34	Transmembrandomäne (TM3)
nsp7	9-10	Interaktion mit nsp8, Kofaktor von RdRp (nsp12)
nsp8	22-23	RNA-3'-terminale Adenylyltransferase, RNA-Bindeprotein, Kofaktor von RdRp (nsp12)
nsp9	12	Einzelstrang-RNA-Bindeprotein
nsp10	14-15	RNA-Bindeprotein, Kofaktor von nsp14 und nsp16
nsp11 (nur in pp1a)	1-2	Unbekannte Funktion
ORF1b-kodierter Teils des Polyproteins 1ab		
nsp12	105-108	RNA-abhängige RNA-Polymerase, Nukleotidyltransferase (NiRAN)
nsp13	66-67	RNA-Helikase, NTPase, RNA-5'-Triphosphatase
nsp14	58-60	3'→5'-Exoribonuklease mit vermutlicher Korrekturlesefunktion im Zusammenspiel mit RNA-Polymerase und Helikase; Guanodin-7-Methyltransferase (für Cap0-Struktur)
nsp15	38-42	Uridylatspezifische Endoribonuklease (NendoU)

nsp16	33-34	Ribose-2'-O-Methyltransferase (für Cap1-Struktur)
-------	-------	---

1.5.1 Nsp10 als wichtiges regulatorisches Protein

Der 3'-terminale Bereich von ORF1a kodiert für vier kleine Proteine: nsp7, 8, 9 und 10. Diese sind hochkonserviert in der Familie der *Coronaviridae*. Lange wurde angenommen, dass diese keine eigenen enzymatischen Funktionen besitzen, was aber im Laufe der Zeit zum Teil widerlegt werden konnte. Des Weiteren interagieren sie mit Proteinen, die (überwiegend oder komplett) vom ORF1b kodiert werden, wie z.B. nsp12 (RdRp), nsp13 (Hel), nsp14 (ExoN) und mit RNA. Ein weiteres sehr kleines Protein (nsp11, 12-23 Reste), das im Überlappungsbereich von ORF1a und ORF1b kodiert wird, ist mit den N-terminalen Aminosäuren von nsp12 identisch. Seine Funktion, falls es eine gibt, ist bis heute unbekannt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass nsp7 - 10 sich ebenfalls wie die membranösen Replikationsorganellen des CoV in der perinukleären Region infizierter Zellen befinden (Bost, Carnahan, Lu, & Denison, 2000; Gosert, Kanjanahaluethai, Egger, Bienz, & Baker, 2002; Knoops et al., 2008; Maier et al., 2013), was deren Funktion als Replikationsinterakteure stützt.

Nsp10 ist eines der höher konservierten RTC-Untereinheiten und im Fall von SARS-CoV 139 AS groß. Es spielt eine entscheidende Rolle im Replikationsprozess als multifunktionaler Kofaktor. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl mit sich selbst als auch mit nsp1, 7, 14 und 16 interagieren kann (Brockway, Lu, Peters, Dermody, & Denison, 2004; Imbert et al., 2008; Pan et al., 2008; von Brunn et al., 2007). Die entscheidende Rolle von nsp10 in der Replikation wurde zuerst bei MHV beschrieben, bei dem eine Mutation des nsp10 verantwortlich war für eine nicht funktionierende Minusstrang-RNA-Synthese (Sawicki et al., 2005). Zudem wurde vermutet, dass MHV nsp10 an der Regulation der Polyproteinspaltung beteiligt sei, als gezeigt werden konnte, dass ein doppelmutiertes MHV nsp10 (_D47A_H48A) die Prozessierung der nsp4 - 11 Region beeinträchtigte (Donaldson, Sims, Graham, Denison, & Baric, 2007). Es wird vermutet, dass das Protein zwei Zinkfingerdomänen besitzt auf Grund der Fähigkeit, zwei Zn^{2+} mit hoher Affinität zu binden (Matthes et al., 2006). Zusätzlich wurde in *In-vitro*-Studien beobachtet, dass nsp10 eine Bindung mit niedriger Affinität für einzel- und doppelsträngige RNA und DNA besitzt, obwohl die eigentliche Struktur darauf keinen Hinweis liefert. So wird angenommen, dass das Protein als Teil eines größeren

Komplexes interagiert. Kristallstrukturen von SARS-CoV nsp10 wurden in verschiedenen Laboren bestimmt (Joseph et al., 2007; D. Su et al., 2006). Die Kristallstrukturen zeigten eine neue Faltung, in der die Zn^{2+} -Ionen in einer einzigartigen Konformation koordiniert sind und bei der eine Gruppe basischer AS-Reste auf der Proteinoberfläche möglicherweise die RNA-Bindungsaffinität erklären könnten. Weitere biochemische Experimente zeigten die Interaktion von nsp10 mit nsp14 und nsp16 und die damit einhergehende Regulation bezüglich der ExoN- und Ribose-2'-O-MTase (2'-O-MTase) Aktivitäten (Bouvet et al., 2010; Bouvet et al., 2012).

1.5.2 Nsp14 und dessen Interaktion mit nsp10

Die CoV ExoN-Domäne wurde erstmals im Rahmen vergleichender Sequenzanalysen entdeckt (Snijder et al., 2003). Es wurde vermutet, dass die N-terminale Domäne des CoV nsp14 und vergleichbare Domänen anderer verwandter Nidoviren zu den DEDDh-Exonukleasen gehören könnten. Zu dieser Exonukleasen-Familie gehören diverse RNA- und DNA-Exonukleasen, die ubiquitär zu finden sind (Zuo & Deutscher, 2001). Die Bezeichnung DEDDh geht zurück auf einige konservierte Asp- bzw. Glu-Reste, welche Teil von drei Sequenzmotiven (I-III) sind und die Zugehörigkeit zu dieser Exonukleasefamilie bestimmen. Die sauren Aminosäurereste bilden zwei Bindestellen für Metallionen, die für die katalytische Aktivität erforderlich sind. Dieser katalytische Mechanismus findet sich in vielen zellulären Exonukleasen und katalytischen RNAs (Beese & Steitz, 1991; Steitz & Steitz, 1993). Das erste Metallion und ein konserviertes His aktivieren dabei ein Wassermolekül, welches einen nukleophilen Angriff auf die Phosphatgruppe eines 3'-terminalen Phosphodiesters ausübt, während das zweite Metallion den Übergangstatus stabilisiert (Derbyshire, Grindley, & Joyce, 1991). ExoN ist hochkonserviert in allen Nidoviren, die eine Genomgröße von mindestens ~20 kb besitzen, wie z. B. Mitglieder der Familien *Coronaviridae* und *Mesoniviridae* (Gorbalenya et al., 2006; Minskaia et al., 2006; Nga et al., 2011; Snijder et al., 2003; Zirkel et al., 2011). Außerhalb der Nidoviren ist lediglich ein Homolog in Arenaviren gefunden worden, welches jedoch eine andere Funktion ausübt (Hastie, Kimberlin, Zandonatti, MacRae, & Sapphire, 2011). Dies lässt vermuten, dass die konservierte ExoN-Domäne notwendig ist, um die enorme Genomgröße einiger Familien in der Ordnung *Nidovirales* zu ermöglichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ExoN dazu beiträgt, eine ausreichend hohe Kopiergenauigkeit während der RNA-Replikation zu gewährleisten und die Anzahl fehlerhaft eingebauter (nicht basenpaarender) Nukleotide

drastisch zu reduzieren. Biochemische Untersuchungen unterstützten diese Hypothese (Bouvet et al., 2012). So zeigten beispielsweise ExoN-Knockout-Mutanten des SARS-CoV und MHV eine deutlich erhöhte Mutationsrate im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Virus (Eckerle et al., 2010; Eckerle, Lu, Sperry, Choi, & Denison, 2007). Normalerweise liegt diese bei $>10^{-6}$ Mutationen pro Replikationszyklus für das MHV und SARS-CoV, während andere Viren Raten zwischen 10^{-3} bis 10^{-5} aufweisen (Drake & Holland, 1999; Sanjuan, Nebot, Chirico, Mansky, & Belshaw, 2010). MHV- und SARS-CoV-ExoN-Mutanten replizierten in Zellkultur mit deutlich niedrigeren Titern, blieben aber ausreichend replikationskompetent, um weitervermehrt werden zu können. Andere ExoN-Knockout-Mutanten der Alphacoronaviren HCoV-229E und TGEV waren hingegen gar nicht mehr replikationsfähig in Zellkultur (Becares et al., 2016; Minskaia et al., 2006). Im Vergleich zum Wildtyp konnte gezeigt werden, dass ExoN-defiziente Coronaviren deutlich anfälliger gegenüber der Wirkung von Mutagenen (z.B. bestimmten Nukleosidanalogen) sind und eine deutlich höhere Mutationsrate aufwiesen in deren Anwesenheit (Smith, Blanc, Surdel, Vignuzzi, & Denison, 2013). Die verfügbaren Informationen liefern somit überzeugende Evidenzen für die funktionelle Bedeutung der ExoN als Schlüsselenzym zur Aufrechterhaltung der erforderlichen Replikationsgenauigkeit im Vermehrungszyklus von Viren der Familie *Coronaviridae*. Wie weiter oben bereits erwähnt, handelt es sich bei dem N-terminalen Teil des CoV-nsp14 um eine Exonuklease. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein alleine (also ohne weitere Proteine des Replikations-Transkriptionskomplexes) eine exonukleolytische Aktivität besitzt (Chen et al., 2007; Minskaia et al., 2006), die jedoch signifikant gesteigert werden kann durch die Anwesenheit von CoV-nsp10 im Reaktionsgemisch (Bouvet et al., 2012). Mittlerweile wird angenommen, dass es keine direkte Interaktion von nsp10 mit dem katalytischen Zentrum der ExoN-Domäne gibt, sondern dass die N-terminale Domäne des nsp14 durch nsp10 strukturell stabilisiert wird, wodurch die RNA-Bindungsaktivität und katalytische Aktivität der ExoN-Domäne gesteigert werden. Der erste Nachweis einer CoV-ExoN-Aktivität gelang mit einer rekombinanten Form der ExoN des SARS-CoV, welche in *E. coli* produziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen benötigt, um verschiedene ssRNA in 3' \rightarrow 5' Richtung zu kleineren Reaktionsprodukten von etwa 8-12 Nukleotiden zu degradieren. Die Sekundärstruktur der ssRNA schien hierbei einen Effekt auf die Enzymaktivität zu haben. Die vorher angesprochenen konservierten Motive der DEDDh-Familie sind hierfür notwendig. Wurden diese Motive durch ortsspezifische

Mutagenese genetisch verändert, erfolgte keine Degradation der verwendeten Testsubstrate (Minskaia et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung das favorisierte Substrat der nsp14/10-Komplexe darstellt. Es wurden zudem verschiedenste Basen innerhalb dieser terminalen Fehlpaarungen untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied bezüglich des Degradationsprozesses beobachtet werden. Die Daten legen nahe, dass die terminale Fehlpaarung das entscheidende Signal für die ExoN-Aktivität ist, während die Identität der an dieser Fehlpaarung beteiligten Nukleotide eine deutlich geringere Rolle spielt. DNA sowie dsRNA mit drei oder mehr fehlgepaarten Nukleotiden konnten nicht degradiert werden. Auch eine Modifikation des freien 3'-Endes eines Substrates verhinderte den Degradationsprozess (Bouvet et al., 2012). Die Struktur der ExoN-Domäne besteht aus einem β -Faltblatt, welches aus fünf β -Strängen, die je von einer α -Helix zu beiden Seiten flankiert werden, aufgebaut ist. Im Vergleich zu anderen Nukleasen der DEDDh-Superfamilie besitzt die ExoN-Domäne zwei Unterdomänen, die an der Interaktion mit nsp10 beteiligt sind, sowie zwei Zinkfinger motive. Eines dieser Zinkfinger motive ist in der Nähe des katalytischen Zentrums gelegen und es wird angenommen, dass es an der enzymatischen Aktivität beteiligt ist. Diese Vermutung konnte in Mutationsanalysen erhärtet werden (Ma et al., 2015). Der andere Zinkfinger ist notwendig für die strukturelle Integrität von nsp14. Proteinvarianten, welche in diesem Motiv verändert waren, konnten nicht exprimiert werden. Die nukleolytische Aktivität von ExoN wird, wie weiter oben ausgeführt, durch einen Metall-Ionen-assistierten katalytischen Mechanismus vermittelt (Beese & Steitz, 1991; Chen et al., 2007; Ulferts & Ziebuhr, 2011), bei dem die konservierten Reste Asp-90, Glu-92, Glu-191, His-268 und Asp-273 zwei Mg^{2+} -Ionen koordinieren. Diese konservierten Metallion-koordinierenden Reste stimmen größtenteils mit denen überein, die andere bekannte zelluläre Exonukleasen mit Korrekturlesefunktion beinhalten (Beese, Derbyshire, & Steitz, 1993; Hamdan, Carr, Brown, Ollis, & Dixon, 2002) und für andere Nidoviren vorausgesagt worden sind (Snijder et al., 2003). Die Strukturanalyse ergab außerdem, dass hier (entgegen dem herkömmlichen DEDDh-Motiv) ein DEEDh-Motiv vorliegt, da eindeutig Glu-191 anstelle des ursprünglich vorgeschlagenen Asp-243 als metallkoordinierender Rest im aktiven Zentrum des Enzyms identifiziert werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das coronavirale nsp14 ein bifunktionelles Protein ist, in dessen N-terminalem Bereich eine Exonuklease und in dessen C-terminalem Bereich eine Guanodin-7-Methyltransferase sitzt. Die ExoN-Domäne interagiert mit nsp10, während die N7-Methyltransferase-Domäne keinen direkten Kontakt mit nsp10 hat, auch wenn die Methylierungsaktivität von nsp14 durch nsp10 stimuliert wird. Nsp14 spielt eine entscheidende Rolle in der RNA-Synthese, sorgt für eine hohe Replikationsgenauigkeit und ist zudem involviert im Prozess des Cappings und der Methylierung (hierfür wird auf andere Fachliteratur verwiesen) (Subissi et al., 2014).

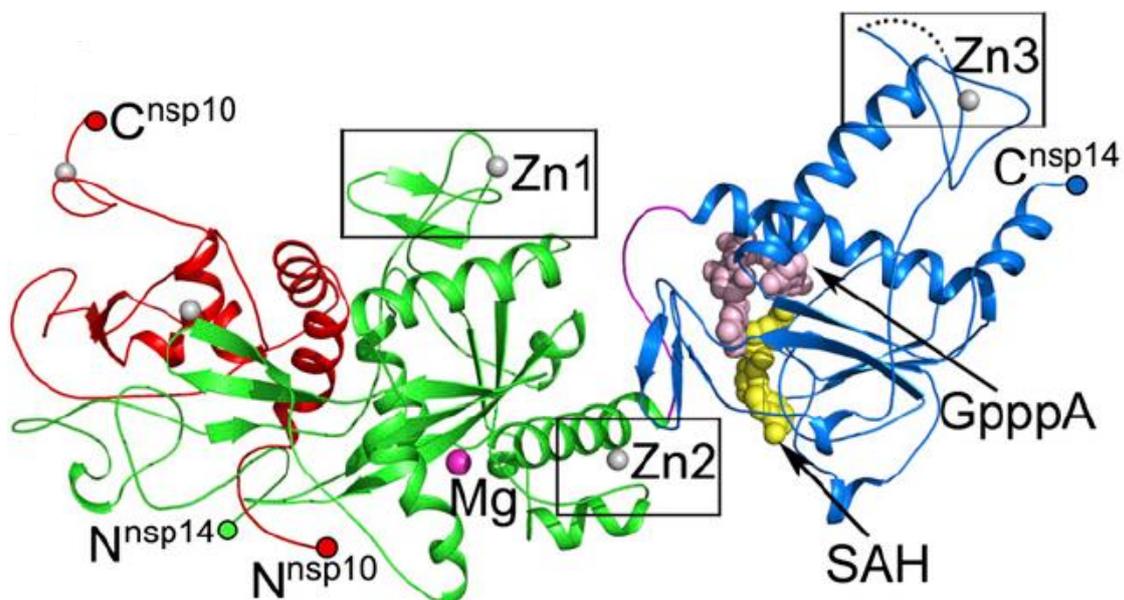


Abbildung 4: Kristallstruktur des heterodimeren Komplexes von SARS-CoV nsp14 und 10

Ein Molekül nsp10 (rot) interagiert mit der N-terminalen Domäne (ExoN) von nsp14 (grün). Amino- und Carboxyl-Reste der beiden Proteine sind als Kreise symbolisiert. Die C-terminale Domäne von nsp14 ist in blau dargestellt (N7-MTase). Deren Liganden S-Adenosyl-Homocystein (SAH) und Guanodin-5',5'-Triphosphat (GpppA) sind gelb bzw. lila gefärbt. Die drei Zinkfinger-Domänen sind als Zn1-3 dargestellt. Eines der beiden für die ExoN-Aktivität erforderlichen Mg^{2+} ist ebenfalls dargestellt (Mg). Dieses wird durch konservierte Aminosäuren des DEEDh-Motives koordiniert.

(Abbildung übernommen von Ma et al., 2015 mit freundlicher Genehmigung des PNAS Verlages (PNAS ist nicht verantwortlich für die Richtigkeit dieser Übersetzung)).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Coronaviren beeindrucken die Wissenschaft schon seit langer Zeit mit ihren extrem großen Genomen im Vergleich zu anderen plussträngigen RNA-Viren. Mit dem Aufkommen der SARS-CoV- und MERS-CoV-Epidemien rückten sie noch weiter in den Vordergrund des Interesses und spätestens seit dem Ausbruch der größten Pandemie der jüngeren Geschichte (COVID-19), die durch SARS-CoV-2 verursacht wird, befinden sich Coronaviren im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses.

Der Replikationsvorgang dieser Viren ist weiterhin nicht vollumfänglich aufgeklärt. Von besonderem Interesse ist dabei, zu verstehen, wie es diese Viren schaffen, eine ausreichende Replikationsgenauigkeit zu erreichen, die einen fehlerhaften Einbau ungepaarter Nukleotide auf möglichst niedrigem Niveau hält, sodass eine ausreichende genetische Stabilität dieser großen RNA-Viren und damit ihr langfristiges Überleben gesichert ist. Seit einigen Jahren wurden verwandte Viren der Coronaviren beschrieben, die sich sehr wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufervirus entwickelt haben, jedoch im Laufe der Evolution zahlreiche abweichende Merkmale entwickelt haben. Zu diesen entfernt verwandten Viren gehören auch die Viren der Familie *Mesoniviridae* (Subordnung *Mesnidovirineae*). Anhand von Experimenten des zur Familie *Mesoniviridae* gehörenden Cavallyvirus (CavV) sollte die Funktion eines Proteins, welches homolog zum coronaviralen nsp14 (ExoN) ist, näher untersucht werden, um damit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Eigenschaften und Funktionen eines für den nidoviralen Replikationszyklus zentralen Proteins zu leisten.

Zu diesem Zweck sollte eine putative mesonivirale Exoribonuklease in *Escherichia coli* produziert werden und dieses rekombinante Protein anschließend biochemisch hinsichtlich seiner Aktivität *in vitro*, potentiell benötigter Kofaktoren (Metallionen, andere virale Proteine) sowie seiner Substratspezifität charakterisiert werden. Dazu gehörte die Klonierung der kodierenden Sequenz der CavV-ExoN-Domäne, die Expression des Proteins in *E. coli* und die anschließende chromatographische Reinigung. Zudem sollte eine Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern, die gegen dieses Protein gerichtet sind, eingeleitet werden für spätere Zellkulturexperimente. Des Weiteren sollte eine Herstellung von CavV-Exoribonuklease-Proteinvarianten mit Substitutionen in hochkonservierten Sequenzmotiven erfolgen. Im Anschluss sollten C6/36-Zellen mit dem CavV infiziert werden sowie eine Konfokalmikroskopie erfolgen zum Nachweis der Expression der

CavV-Exoribonuklease und ihrer subzellulären Lokalisation im Vergleich zu anderen Komponenten des viralen Replikations-Transkriptions-Komplexes. Für Coronaviren konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die spezifische Exoribonukleaseaktivität durch einen Kofaktor (nsp10) gesteigert werden kann. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, einige weitere CavV-Proteine, die möglicherweise eine vergleichbare Funktion als Kofaktor der (CavV-) Exoribonuklease haben könnten, heterolog zu exprimieren und zu reinigen.

Abschließend sollte eine biochemische Charakterisierung der CavV-Exoribonuklease mittels *In-vitro*-Aktivitätstests unter Verwendung radioaktiv markierter RNA-Substrate stattfinden. Hierfür sollten zunächst geeignete Reaktionsbedingungen für die Aktivitätstests etabliert werden. Abschließend sollte die Rolle möglicher Kofaktorproteine überprüft werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
2-Ethansulfonsäure	Roth
Acrylamid/ Bisacrylamid (RotiphoreseGel 30)	Roth
Acrylamid-Puffer	Roth
Acrylamid-Verdünner	Roth
Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich
Anhydrotetracyclin	Roth
APS	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	BD
Borsäure	Roth
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Desthiobiotin	Iba
Dimethylsulfoxid	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol	Roth
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Manganchlorid	Merck
Natriumacetat	Roth
Natrium-Azid	Roth

Natriumchlorid	Roth
Natriumlaurylsulfat	Roth
Phosphorsäure	Roth
Saccharose	Roth
Serva Blue-G	Serva
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin	Roth
Thioglycerin	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Tween 20	Merck
Zinkchlorid	Merck

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Bestandteile
Anodenpuffer I	0,3 M Tris, 10 % [v/v] Ethanol, pH 9,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 10 % [v/v] Ethanol, pH 9,28
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Aminocapronsäure, pH 9,25
TBS	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
TBS-T	1 % [v/v] TBS, 0,1% [v/v] Tween 20, pH 8,0
Blockierlösung	1x TBS, 0,5% [v/v] Tween 20, 3 % [w/v] BSA
Antikörperlösung	1x TBS, 0,25% [v/v] Tween 20, 1 % [w/v] BSA
Coomassielösung A	2 % [v/v] o-Phosphorsäure, 10 % [w/v] Ammoniumsulfat
Coomassielösung B	5 % [w/v] Serva Blue-G
Coomassieendlösung	78,4 % [v/v] Coomassie Lösung A, 1,6 % [v/v] Coomassie Lösung B, 20 % [v/v] Ethanol
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS, pH 8,3
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris, 20 % [v/v] Glycerin, 4 % [w/v] SDS, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau, 20 % [v/v] Thioglycerin, pH 6,8

TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
Strep-Bindepuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5
Strep-Elutionspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5
Strep-Regenerationspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, 10 mM Thioglycerin, pH 7,5
Talon-Bindepuffer	20 mM HEPES, 10 mM Imidazol, 0,05 % [v/v] Tween 20, 500 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0
Talon-Waschpuffer	20 mM HEPES, 50 mM Imidazol, 0,05 % [v/v] Tween 20, 150 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0
Talon-Elutionspuffer	20 mM HEPES, 100 mM Imidazol, 0,05 % [v/v] Tween 20, 150 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0
Talon-Regenerationspuffer	20 mM HEPES, 400 mM Imidazol, 0,05 % [v/v] Tween 20, 150 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0
Protein-Lagerpuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,0
Fu-Mix	6M Harnstoff, 80 % [v/v] Formamid (deionisiert), 10 % 10x TBE, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylencyanol FF
STE-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
10x ExoN Puffer	500 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, (frisch zugegeben 10 mM $MgCl_2$)
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2HPO_4 , pH 7,4
$CaCl_2$ -Lösung	10 mM PIPES, 15% [w/v] Glycerin, 60 mM $CaCl_2$

2.3 Enzyme und Kits

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Benutzt mit den vom Hersteller mitgelieferten und empfohlenen Puffern

Bezeichnung	Hersteller
<i>High fidelity</i> DNA-Polymerase (Phusion HF)	Fermentas
Lysozym	Roche Diagnostics
T4-Polynukleotidkinase = PNK	Fermentas

Tabelle 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>innuPREP PCRpure Kit</i>	Analytik Jena
<i>innuPREP Plasmid Mini Kit</i>	Analytik Jena

2.4 Molekularbiologische Reagenzien und Größenstandards

Tabelle 6: Verwendete molekularbiologische Reagenzien und Größenstandards sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
30 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 : 1)	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen
Roti®-Quant (Bradford-Reagenz)	Roth
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific

2.5 Filter und Membranen

Filterpapier: 3 MM Filterpapier (GE Healthcare)

Membran: Protran® *Nitrocellulose transfer membrane*, 0.45 µm (GE Healthcare)

2.6 Antikörper und immunologische Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete Antikörper inklusive deren Herkunft, Klonalität, Hersteller und verwendeter Verdünnung in Antikörperlösung

Bezeichnung	Spezies	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
a-His (70796-4)	Maus	monoklonal	Novagen	1:1.000
a-CavV-ExoN-His	Kaninchen	polyklonal	Eurogentec	1:15.000

a-CavV-Hpp8-His	Kaninchen	polyklonal	Eurogentec	1:15.000
a-CavV-Hpp9-His	Kaninchen	polyklonal	Eurogentec	1:15.000
a-Maus-IgG IRDye 800CW (926-32210)	Ziege	polyklonal	Li-Cor	1:20.000
a-Kaninchen-IgG IRDye 800CW (926-32211)	Ziege	polyklonal	Li-Cor	1:20.000
a-dsRNA (J2)	Maus	monoklonal	Scicons	1:400
Alexa Fluor 594 (a-Maus-IgG) (A-11032)	Ziege	polyklonal	Invitrogen	1:1.000

Der Farbstoff DAPI (Sigma), welcher in der DNA interkaliert, wurde in der Verdünnung 1:2.500 verwendet.

2.7 Antibiotika

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen

Antibiotika	Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin (amp)	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Carbenicillin (carb)	75 mg/ml in H ₂ O	75 µg/ml
Chloramphenikol (cam)	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml

2.8 Plasmide

Tabelle 9: Verwendete Plasmide deren Antibiotikaresistenz und Promotor

Name (Firma)	Antibiotikaresistenz	Promotor
pET-11d (Novagen)	Ampicillin	T7
pASK –Ub (iba)	Ampicillin	Tetracyclin
pCGI	Chloramphenicol	

2.9 Biologische Materialien

Bakterienzellen: *Escherichia coli*-K12-Stämme:

E. coli-K12- Top10F' Stamm für Plasmidklonierungen:

Genotyp: F' [*lacIq Tn10*(tetR)] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *deoR nupG recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL*(StrR) *endA1 nupG*

E. coli-K12- BL21(DE3) Stamm für die heterologe Proteinexpression:

Genotyp: F *ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*

E. coli-K12- C2523 Stamm für die heterologe Proteinexpression:

Genotyp: *fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10*

Insekten-Zelllinie:

C6/36 Mosquitozelle (Klon C6/36 aus Gesamtlarve von *Aedes albopictus*; ATCC CRL-1660)

Virusisolat:

Cavally-Virus, Isolat C79 (von Dr. Sandra Junglen, Institut für Virologie der Universität Bonn, freundlicherweise zur Verfügung gestellt)

2.10 Medien

Bakterienmedien:

LB-Medium: 0,1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 1 % [w/v] NaCl mit ddH₂O auf 1 l auffüllen

LB-Agarplatten: 1,5 % [w/v] Micro-Agar in LB-Medium

Medien für Insektenzelllinie:

Nähr-Medium: Leibovitz's L15 (ThermoFisher Scientific) + 10 % [v/v] FKS + 100 units Pen/ Strep (GibcoTM)/ ml Nähr-Medium

2.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Klonierung der Proteinvarianten der ExoN, sowie die Primer für die Klonierung der kodierenden Sequenzen der CavV Hpp's wurden bei der Firma IDT bestellt, die Sequenzierprimer bei der Firma Metabion.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der CavV-ExoN-His-Proteinvarianten

Bezeichnung	Sequenz*	Konstrukt
CavV-SB-79	5' -GACTGTATATGCTTTG <u>ct</u> TGCTGAGTTCTTAAACC-3'	D4362A
CavV-SB-80	5' -GTTTAAGAACTCAGCA <u>g</u> CAAAGCATATACAGTCATC-3'	D4362A
CavV-SB-81	5' -TATGCTTTGATGCTG <u>ct</u> GTTCTTAAACCCTAGAGAC-3'	E4364A
CavV-SB-82	5' -CTAGGGTTTAAGAAC <u>g</u> CAGCATCAAAGCATATACAG-3'	E4364A
CavV-SB-111	5' -CTTTG <u>ct</u> TGCTG <u>ct</u> GTTCTTAAACCCTAGAGACAACCTTAC-3'	D4362A_ E4364A
CavV-SB-112	5' -GGTTTAAGAAC <u>g</u> CAGCA <u>g</u> CAAAGCATATACAGTCATC-3'	D4362A_ E4364A
CavV-SB-83	5' -CCTCGAGATCATAG <u>ct</u> TCTAAAAGTAGACCGCAATC-3'	D4545A
CavV-SB-84	5' -CGGTCTACTTTTAGA <u>g</u> CTATGATCTCGAGGTTTAC-3'	D4545A
CavV-SB-99	5' -CCCACCTTGATG <u>ct</u> TGCCATCATGACACAGTGTATTTAC-3'	D4604A
CavV-SB-100	5' -GTCATGATGGCA <u>g</u> CATCAAGTGGGTCATGTGGTGTG-3'	D4604A
CavV-SB-115	5' -CACCAACACCAG <u>ct</u> TGACCCACTTGATG <u>ct</u> TGCCATCATG-3'	H4599A_ D4604A
CavV-SB-116	5' -CAAGTGGGTCAG <u>ct</u> TGGTGTGGTGGTGCCTGTATGGTTC-3'	H4599A_ D4604A

*Der Austausch von spezifischen Nukleotiden im Vergleich zur ursprünglichen CavV-Sequenz ist fett gedruckt und unterstrichen.

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der CavV Hpp's aus dem pp 1a oder pp 1ab 2046-2504

Bezeichnung	Sequenz	Benutzt für Konstrukt
NS-1	5' -GGTAACAATTGCTCCACCGCGGAGACGCAGGAC-3'	Hpp7+8
NS-2	5' -CTCCGCGGTGGAGCAATTGTTACCAATTTTACC-3'	Hpp7+8
NS-3	5' -CTGAACAATGAAGGATCCTCTGGTCATCACCAT-3'	Hpp7+8
NS-4	5' -ACCAGAGGATCCTTCATTGTTTCAGGACAGTGCG-3'	Hpp7+8
NS-5	5' -TGTCAAATATGCTCCACCGCGGAGACGCAGGAC-3'	Hpp8+9
NS-6	5' -CTCCGCGGTGGAGCATATTTGACACCTATAAAT-3'	Hpp8+9
SB-105	5' -ACCAGAGGATCCGAGTACGAGCCACTTTGAAA-3'	Hpp8+9
SB-106	5' -GGGCTCGTACTCGGATCCTCTGGTCATCACCAT-3'	Hpp8+9
NS-9	5' -TACCAGAATCAAGGATCCTCTGGTCATCACCAT-3'	Hpp7
NS-10	5' -ACCAGAGGATCCTTGATTCTGGTAATGCGCTGT-3'	Hpp7
NS-11	5' -TTCCACATGGTTTCCACCGCGGAGACGCAGGAC-3'	Hpp9
NS-12	5' -CTCCGCGGTGGAAACCATGTGGAAAATGACAAC-3'	Hpp9
NS-13	5' -TATCTTCTGGGCTCCACCGCGGAGACGCAGGAC-3'	Hpp6-7
NS-14	5' -CTCCGCGGTGGAGCCCAGAAGATAATGAAAGCT-3'	Hpp6-7

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung der hergestellten Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz	Benutzt für
CavV-ExoN_fw-1	5' -GAAGCTTACTTTGGACCTC-3'	CavV-ExoN-Proteinvarianten
CavV-ExoN_fw-2	5' -GACGTATAGCAGGCATCC-3'	CavV-ExoN-Proteinvarianten
T7-promotor	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'	CavV-ExoN-Proteinvarianten
pASK-IBA_fw	5' -GAGTTATTTTACCACTCCCT-3'	CavV-Hpp-Proteine
pASK-IBA_RV	5' -CGCAGTAGCGGTAAACG-3'	CavV-Hpp-Proteine

2.12 Radioaktive Nukleotide

[γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) (Hartmann Analytic)

2.13 RNA-Substrate

Die Tabellen 13 und 14 zeigen die verwendeten Oligonukleotide, welche Verwendung in den *In-vitro*-Aktivitätstests fanden. Tabelle 13 zeigt die verwendeten einzelsträngigen-, Tabelle 14 die doppelsträngigen Substrate.

„Bio“ bezeichnet eine Biotinylierung mit der Zielsetzung, bei den jeweiligen Substraten das freie 3' Ende zu blockieren.

Tabelle 13: Verwendete einzelsträngige Substrate

Bezeichnung	Sequenz
A22	5' -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
A18C4	5' -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCC-3'
IDR8	5' -GGGCGAUUAGGAGCUAACUAAA-3'
JZR3	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCC-3'
JZR3 Bio	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCC-3' Bio
IDR1	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCA-3'
IDR1 Bio	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCA-3' Bio
IDR16	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCAA-3'
IDR16 Bio	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCAA-3' Bio
IDR12	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGAAA-3'
IDR12 Bio	5' -CGCAGUUAGCUCCUAAUCGAAA-3' Bio
IDR13	5' -CGCAGUUAGCUACUAAUCGCCC-3'
IDR13 Bio	5' -CGCAGUUAGCUACUAAUCGCCC-3' Bio
IDR15	5' -CGCAGUUAGCUAAUAAUCGCCC-3'
IDR15 New 3MM	5' -CGCAGUUAGCUAAUAAUCGCCC-3'
JZR8 Bio	5' -GGGCGAUUAGGAGCUAACUGCG-3' Bio

Tabelle 14: Verwendete Doppelstrang-Substrate

Rot hinterlegt ist der Indikatorstrang, Blau hinterlegte Basen zeigen ungepaarte Nukleotide an. „*“ hebt die radioaktive Markierung des Indikatorstranges hervor.

Bezeichnung	Sequenz
JZR3 - JZR8 Bio	5' *- CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCC-3' Bio 3' -GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG-5'
JZR3 Bio - JZR8 Bio	5' *- CGCAGUUAGCUCCUAAUCGCCC-3' Bio Bio 3' -GCGUCAAUUCGAGGAUUAGCGGG-5'

<i>cOmplete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail</i> (Tabletten)	Roche
HisTrap™-HP-Säulen (1 ml)	GE Healthcare
PD-10 Säulen, Sephadex G25-M	GE Healthcare
96 Well Platten	Sarstedt
150cm ² Platte	Sarstedt
Dialyseschlauch	Serva

2.15 Geräte und spezielle Artikel, Software

Tabelle 16: Verwendete Geräte und Vorrichtungen sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter SevenEasy	Mettler Toledo
Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifuge 5430R	Eppendorf
Semi-Dry Elektrobloetter unit	Roth
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExWS	Peqlab
Odyssey-Imaging-System	LI-COR Biosciences
Typhoon	GE Healthcare
Zellkulturbank <i>HERA SAFE KS</i>	Thermo Scientific
<i>phosphoimaging screen</i>	Fujifilm
Konfokalmikroskopie Leica TCS SP5	Leica

Software:

DNASarVersion 10.1.2 – Lasergene, DNASar Inc.

ImageJ 1.44p freeware

Bio Rad Quantity One V4.1.1

CorelDRAW® 2019

EndNote™ X8

Imaris 8.4 software package (Bitplane)

3 Methoden

3.1 Biochemische und biophysikalische Methoden

3.1.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*-Kulturen

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die jeweiligen Expressionskonstrukte in die entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert. Die Kultur wurde mit 1/100 einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 225 rpm in den Schüttler gestellt bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte₆₀₀ von 0,6 bis 0,9 hatte. Nach dem Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden 5 ml der Kultur abgenommen, welche nicht induziert wurden und als Negativkontrolle verwendet wurden. Danach erfolgte die Zugabe des entsprechenden Induktors (entweder 0,1 mM Anhydrotetracyclin beim pASK-Vektorsystem oder 1 mM IPTG beim pET-Vektorsystem). Zur Expression des gewünschten Proteins wurden die induzierten sowie die nichtinduzierten Kulturen in den Bakterenschüttler gestellt und bei 18°C und 225 rpm für 6 Std. geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 4°C sowie 6.000x g für 7 Min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.1.2 Enzymatischer Zellaufschluss von *E. coli* mit anschließender Sonifizierung

Mit der Zielsetzung des enzymatischen Zellaufschlusses der *E. coli*-Kulturen wurden die in 3.1.1 pelletierten Kulturen, die bei –20°C gelagert worden waren, mit 25 ml des jeweiligen Binde-Puffers des zugehörigen Affinitätschromatografie-Systems (s. 3.1.3) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 mg Lysozym zu den resuspendierten Kulturen. Diese wurden dann für 30 Min. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die aufgeschlossenen Kulturen in ein Becherglas überführt und auf Eis kaltgestellt. Die Sonifizierung fand für 6 Zyklen a 10 sekundige Pulse mit nachfolgender 59 sekundiger Pause bei 33% iger Amplitudenhöhe statt.

3.1.3 Isolierung und Aufreinigung von Proteinen

Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4°C mit 47.000x g für 30 Min. pelletiert. Zum Equilibrieren von 2 ml Matrix wurde diese mit je 25 ml ddH₂O und anschließend 25 ml des entsprechenden Bindepuffers gewaschen. Der Überstand wurde vor Zugabe zur equilibrierten Matrix über einen 0,45 µm Chromafil-Einmalfilter von verbliebenen unlöslichen Bestandteilen befreit und zum Binden für 1 Std. bei 4°C in einem verschlossenen Reaktionsgefäß auf einem Drehrad inkubiert.

Die anschließenden Schritte werden für die entsprechenden Affinitätschromatographiesysteme im Folgendem näher erläutert:

3.1.3.1 Talon-Affinitätschromatographie

Das Talon-Affinitätschromatographiesystem benutzt aufsteigende Imidazol-Konzentration in den Puffern, um das gewünschte Protein zu eluieren.

Die Protein-Matrix-Suspension wurde bei 4°C sowie 2700x g für 90 Sek. zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes abgenommen, der Rest des Überstandes wurde verworfen. Danach wurde das Pellet zweimal mit jeweils 25 ml des His-Bindepuffers gewaschen. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach den Waschsritten wurde die Protein-Matrix-Suspension auf eine Säule gegeben und mit 10 ml Puffer B1 gewaschen. Anschließend wurde jeweils 1 ml Elutionspuffer auf die Säule pipettiert und die durchgeflossene Lösung (je 1 ml) aufgefangen. Dieser Schritt wurde sechsmal wiederholt. Insgesamt wurden also 7 Elutionsfraktionen gesammelt.

3.1.3.2 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Analog zur Aufreinigung der Talon-Affinitätschromatographie (s. 3.1.3.1) wurde die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie ähnlich verwendet. Bezüglich des Elutionsschrittes wurden hierbei jeweils 1 ml des Strep-Elutionspuffers B auf die Matrix in der Säule gegeben und die Elution aufgefangen. Gesammelt wurden 7 Fraktionen zu je 1 ml.

3.1.4 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinen

Zum Weiterarbeiten mit den isolierten Proteinen ist in den meisten Fällen ein Pufferwechsel sowie eine Konzentrierung der Proteine notwendig. Im Folgendem soll auf die verschiedenen Methoden näher eingegangen werden:

3.1.4.1 Pufferwechsel von Proteinen mittels Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit PD-10 Säulen Sephadex G25-M vorgenommen. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml ddH₂O und anschließend mit 10 ml Protein-Lagerpuffer gewaschen. Danach wurden 2,5 ml des durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteins auf die Säulen gegeben. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml Proteinlagerpuffer.

3.1.4.2 Pufferwechsel von Proteinen mittels Dialyse

Die Dialyse ist ein gutes Verfahren, um bei Proteinen einen Pufferwechsel zu vollziehen. Dazu wurde die entsprechende Proteinsuspension in einen Dialyseschlauch pipettiert und bei 4°C in einem mit dem gewünschten Endpuffer gefülltem Gefäß unter ständigem Rühren über Nacht inkubiert. Der Dialyse-Puffer wurde mehrfach gewechselt.

3.1.4.3 Konzentrierung von Proteinen mittels Saccharose

Um gereinigte Proteine weiter zu konzentrieren, wurde Saccharose in Kombination mit Dialyseschläuchen verwendet. Das Protein wurde im Kühlraum in einen Dialyseschlauch (MWCO 12.000 – 14.000) pipettiert, dieser geschlossen und anschließend mit Saccharose bedeckt. Auf Grund osmotischer Kräfte wird der Proteinlösung im Verlauf Wasser entzogen. Nach gewünschter Konzentrierung konnte der Dialyseschlauch hervorgeholt werden, mit Wasser abgespült und geöffnet werden, sodass die Proteinlösung mit der Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt werden konnte.

3.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung der dialysierten Proteine (s. 3.1.4.2 und 3.1.4.3) wurde eine SDS-PAGE (s.3.1.5.2) durchgeführt, auf der neben dem zu bestimmenden Protein ansteigende BSA-Konzentrationen aufgetragen worden waren. Diese aufgetragenen BSA-Proben beinhalteten genau definierte Proteinmengen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das BSA sowie 3 verschiedene Mengen der zu interessierenden Proteinsuspension auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und mit Hilfe einer SDS-PAGE (s. 3.1.5.2) aufgetrennt. Nach dem Färbevorgang mit Coomassie (s. 3.1.6.1) über Nacht, wurde das Gel eingescannt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Software ImageJ 1.44p freeware ermittelt.

3.1.5 Gelelektrophorese und *Blotting*-Verfahren

3.1.5.1 Auftrennen von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung in Abhängigkeit der Größe der DNA wurde mittels Agarosegelen ermöglicht. Dazu wurde 1 % [w/v] Agarose in 1x TAE-Puffer eingewogen und unter Rühren aufgekocht. Zur Markierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde zusätzlich 0,005 % [v/v] Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gel wurde in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer gegossen. Als Elektrophoreselaufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit einer geeigneten

Menge 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Marker wurde O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Zur elektrophoretischen Auftrennung lief das Gel je nach Kammergröße bei konstanter Spannung von 80 – 120 V für 30 - 60 Min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit Hilfe von UV-Licht detektiert.

3.1.5.2 SDS-/ PAA-Gele zur Auftrennung von Proteinen

Mittels der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die SDS-PAGE funktioniert mit zwei verschiedenen Gelen: dem Sammelgel und dem Trenngel. Die Prozentigkeit der Trenngele wird anhand der zu erwartenden Molekülgröße der Proteine gewählt.

Als Standardgröße wurde ein 12 % Trenngel verwendet. Für niedermolekulare Proteine, wie sie teilweise in dieser Arbeit vorkommen, wurde ein 16 % Trenngel verwendet.

Nachfolgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der verschiedenen Gele an:

Tabelle 17: Zusammensetzung des Sammel- sowie Trenngels für die SDS-PAGE

	5 % Sammelgel	12 % Trenngel	16 % Trenngel
ddH ₂ O	3,85 ml	5,404 ml	3,273 ml
30 % Acrylamid	0,91 ml	6,394 ml	8,525 ml
Sammelgelpuffer	1,75 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	3,957 ml	3,957 ml
10 % SDS-Lösung	0,01 ml	0,1589 ml	0,1589 ml
TEMED	7 µl	7,9 µl	7,9 µl
10 % APS	35 µl	79,1 µl	79,1 µl

Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 2x oder 4x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht. Die SDS-PAGE wurde bei konstanter Stromstärke von 40 mA für etwa 75 – 105 Min. durchgeführt.

3.1.5.3 Übertragung von Proteinen von SDS-/ PAA-Gelen auf Membranen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semi-Dry-Western-Blot“-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Dazu wurde folgender Aufbau von unten nach oben vorbereitet: 2 *Whatman-Papiere*, welche in Anodenpuffer I eingelegt worden waren, 1 *Whatman-Papier*, welches in Anodenpuffer II eingelegt worden war, die Nitrocellulose Membran, welche ebenfalls in Anodenpuffer II inkubiert worden war,

das Gel, welches in Kathodenpuffer äquilibriert worden war und 3 *Whatman-Papiere*, welche ebenso in Kathodenpuffer eingelegt worden waren.

Der Proteintransfer geschah für 1 Std. bei 0,8 mA konstanter Spannung pro cm² in der dafür vorgesehenen *Semi-Dry-Blotting-Vorrichtung*.

3.1.6 Nachweis von Makromolekülen in Gelen oder Membranen

3.1.6.1 Färbung von Proteinen in Coomassie-Brillantblau

Die SDS-PAA-Gele aus der SDS-PAGE (s. 3.1.5.2) wurden mit dem kolloidalen Coomassie-Farbstoff über Nacht gefärbt. Die Reaktion beruht auf reversiblen elektrostatischen Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften zwischen den Farbstoffmolekülen und den Aminogruppen der Proteine. Am nächsten Tag wurden die Gele durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfärbt.

3.1.6.2 Färbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid besitzt die Fähigkeit zur Interkalation in dsDNA. Ebenso kann Ethidiumbromid mit Basen von ssDNA und auch RNA interagieren. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird Ethidiumbromid angeregt und emittiert dabei Licht im orange-roten Bereich. Dies macht man sich zunutze, um nach Größe aufgetrennte Nukleinsäuren in z.B. Agarosegelen (s. 3.1.5.1) nachzuweisen.

3.1.6.3 Phosphoimaging

Die *Phosphoimage Screens* funktionieren nach der Funktionsweise der Quantenphysik. Kristalle innerhalb der Screens werden durch den radioaktiven Zerfallsprozess angeregt. In Dunkelheit bleiben die Kristalle in diesem Zustand und es entsteht dadurch ein latentes Bandenmuster, welches beispielsweise durch radioaktiv markierte Nukleinsäuren, die in einem Gel aufgetrennt wurden (s.3.2.8), hervorgerufen wird. Durch Bestrahlung mit einem HeNe-Laser fallen diese wieder in den Grundzustand zurück und emittieren dabei Licht in einer bestimmten Wellenlänge, welche als photostimulierte Lumineszenz mit z.B. dem *Typhoon*-Gerät gemessen werden kann. Die Lumineszenz ist weitestgehend proportional zur radioaktiven Strahlung und kann dadurch quantitativ ausgewertet werden. Die erforderliche Expositionsdauer der Phosphoimaging Screens richtet sich nach der Menge der Radioaktivität der zu untersuchenden Proben.

3.1.6.4 Nachweis von Makromolekülen auf Membranen

Für den spezifischen Nachweis einzelner Proteine wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im *Semi-Dry-Blot*-Verfahren auf eine Membran transferiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu reduzieren, wurde für eine Stunde mit 1x TBS + 0,5 % [v/v] Tween 20 + 3 % [w/v] BSA blockiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 Min. mit TBS-T (+ 0,1 % [v/v] Tween 20) gewaschen. Die Membran wurde mit dem in Antikörperlösung verdünnten Primärantikörper für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch 3-maliges Waschen für je 5 Min. mit TBS-T (+ 0,1 % [v/v] Tween 20) entfernt. Danach erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in Antikörperlösung. Nach 45 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran 2-mal für je 1 Min. mit TBS-T (+ 0,1 % [v/v] Tween 20) und 2-mal für je 1 Min. mit 1x TBS gewaschen.

Anschließend wurde die Membran im Dunklen getrocknet und anschließend im *Licor Odyssey* eingelesen und ausgewertet.

3.2 Molekularbiologische Arbeiten und Methoden

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli* für eine nachfolgende Transformation chemisch kompetent zu machen, wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur des entsprechenden Bakterienstamms inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ 0,375 kultiviert. Die Zellen wurden zur Ernte für 15 Min. bei 3.000x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 20 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 Min. bei 734x g und 4°C. Abschließend wurde das Zellpellet in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und in Reagenzgefäße aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 70 µl einer Suspension kompetenter Bakterien zusammen mit der jeweiligen Plasmid-DNA pipettiert. Nach 20 Min. Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock: Dafür wurde das Reagenzgefäß für 90 Sek. bei 42°C auf einen Hitzeblock gestellt. Danach wurden die Bakterien für 2 Min. auf Eis abgekühlt und es erfolgt die Zugabe von 500 µl LB-Medium. Die Reagenzgefäße wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Abschließend wurden 100 µl auf die entsprechend der Resistenzen der Plasmidvektoren mit Antibiotika

versetzten Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *innuPREP Plasmid Mini Kit* aus *E. coli* isoliert. Dazu wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen und die Plasmid-DNA am Ende in 50 µl ddH₂O eluiert.

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Die Oligonukleotide, welche verwendet worden waren, sind Tabelle 10 zu entnehmen. Der Standardreaktionsansatz sowie die Reaktionsbedingungen können den Tabelle 18 und 19 entnommen werden.

Tabelle 18: PCR-Standardreaktionsmischung

Bezeichnung	Menge
DNA-Matrize	1 µl (~50-100 ng)
Primer vorwärts 50 µM	0,5 µl
Primer rückwärts 50 µM	0,5 µl
5x HF Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
6 % DMSO	3 µl
Phusion DNA Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	33,5 µl
Gesamt	50 µl

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die PCR

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	98°C	30 Sek.
Denaturierung	32	98°C	10 Sek.
Primerhybridisierung	32	66°C	10 Sek.
Elongation	32	72°C	3 Min.
Finale Elongation	1	72°C	5 Min.
Hold	1	4°	Unendlich

3.2.5 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Diese spezielle PCR-Technik findet Anwendung zur sequenzspezifischen Mutagenese in Plasmiden. Hierfür werden komplementäre Primer generiert, welche jeweils die gewünschte Mutation beinhalten. Diese können Tabelle 10 entnommen werden. Um die im Reaktionsansatz verbliebene DNA-Matrize zu entfernen, welches die Mutation nicht aufweist, wird das Reaktionsgemisch mit dem Restriktionsenzym DpnI inkubiert. Dieses Enzym schneidet ausschließlich methylierte DNA (also die als Matrize verwendete Plasmid-DNA), jedoch nicht das unmethylierte PCR-Produkt. Dazu wurden nach der PCR-Reaktion 1 µl DpnI zum Ansatz gegeben und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels einer Hitzeschock-Transformation (s. 3.2.2) das lineare PCR-Produkt in kompetente *E.-coli*-Zellen eingebracht und die durch homologe Rekombination rekonstituierte zirkuläre Plasmid-DNA vermehrt und aufgereinigt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung nach Sanger verifiziert (auswärtiges Unternehmen).

3.2.6 ³²P-End-Markierung von Nukleinsäuren

Zur Durchführung der RNA-Aktivitätstests war es notwendig, die verwendeten Nukleinsäure-Substrate radioaktiv zu markieren. Dazu wurde folgende Reaktion auf Eis pipettiert:

Tabelle 20: Reaktionsansatz γ -³²P -End-Markierung von Nukleinsäuren

Bezeichnung	Menge
ddH ₂ O	2 µl
10 pmol/ µl Primer	3 µl
10x PNK Puffer	1 µl
PNK	1 µl
[γ - ³² P]-ATP	3 µl (30 µCi)
Gesamt	10 µl

Die Reaktion wurde für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl STE-Puffer wurde die Reaktion gestoppt.

Nicht eingebaute freie Nukleotide wurden mit Hilfe einer G25 Säule aus der RNA-Lösung entfernt. Dazu wurde nach Herstellerangaben verfahren.

3.2.7 RNA/RNA-Hybridisierung

Doppelsträngige (ds) RNAs wurden wie folgt hergestellt. 3 µl einer 10 µM Lösung des späteren unmarkierten komplementären Stranges wurden in 47 µl STE-Puffer gegeben. Anschließend wurden 13 µl dieses Reaktionsgemisches mit 10 µl des vorher radioaktiv markierten Gegenstrangs gemischt, so dass ein Verhältnis von 1,3:1 herrschte und der unmarkierte komplementäre Strang im Überschuss vorlag. Der Reaktionsansatz wurde gevortext und kurz abzentrifugiert. Danach erfolgte die Reaktion auf 95°C für 5 Min. Anschließend wurde der Heizblock ausgestellt und die Reaktion langsam durch Herausnehmen des Einsatzes aus dem Heizblock auf Zimmertemperatur abgekühlt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Hybridisierung wurde eine Elektrophorese mittels eines 12 %igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgels (s. 3.1.5.2) durchgeführt.

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurde das Gel mit Hilfe eines *Phosphorimagers* (*Fujifilm*) sowie des Typhoons (GE Healthcare) autoradiographisch ausgewertet. War der Hybridisierungsprozess erfolgreich, konnten die gebildeten doppelsträngigen RNAs in nachfolgenden RNA-Aktivitätstests verwendet werden.

3.2.8 RNA-Spaltungsassay (*in-vitro*-RNA-Degradationsassays)

Zur Bestimmung von Nuklease-Aktivitäten wurden radioaktiv markierte RNA-Substrate (s. 3.2.6 und 3.2.7) eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 µl und wurde folgendermaßen auf Eis zusammenpipettiert:

Tabelle 21: Reaktionsansatz der RNA-Aktivitätstests

Bezeichnung	Menge
ddH ₂ O	6 µl
10x ExoN-Puffer	1 µl
10 mM MgCl ₂	1 µl
RNA (etwa 500 nM)	1 µl
Protein	1 µl
Gesamt	10 µl

Die Reaktion inkubierte für 1 Std. bei 37°C. Durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Azetat pH 5,2 und 10 Volumen 100 % eiskaltem Ethanol wurde die Reaktion gestoppt und die RNA bei -20°C über Nacht präzipitiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ansätze bei 4°C, 20.000x g für 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend gründlich in 8 µl Fu-mix

resuspendiert. Zur Auftrennung der RNA-Substrate wurde eine denaturierende 12 % Harnstoff-PAGE durchgeführt, welche bei 2000 V, 80 mA und 50 Watt für 90 Min. lief.

Die Zusammensetzung des Gels war folgendermaßen:

Tabelle 22: Zusammensetzung des denaturierenden 12 %-Polyacrylamid/7M-Harnstoff-Gels

Bezeichnung	Menge
Acrylamid (Rotiphorese®-Sequenziergel-Konzentrat)	28,8 ml
Acrylamid-Verdünner (Rotiphorese®-Sequenziergel-Verdünner)	25,2 ml
Acrylamid-Puffer (Rotiphorese®-Sequenziergel-Puffer-Konzentrat)	6 ml
10 % [w/v] APS	300 µl
TEMED	30 µl
Gesamt	60 ml

Nach Abschluss der denaturierenden PAGE wurde das Gel auf ein *Whatman*-Filterpapier überführt und mit Hilfe eines *Phosphorimager (Fujifilm)* sowie des Typhoons (GE Healthcare) autoradiographisch ausgewertet.

3.3 Zellkultur und virologische Methoden

3.3.1 Auftauen und Kultivierung von C6/36-Zellen

Zellen der Insekten-Zelllinie C6/36, einer kommerziell erhältlichen Zelllinie, die aus Larven von *Aedes albopictus* generiert wurde, wurden aus der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff entnommen und aufgetaut durch Resuspension in 10 ml Leibovitz's L15-Medium, welches zusätzlich mit 10 % [v/v] FKS sowie 100 Einheiten Penicillin/ 100 µg Streptomycin pro ml Medium versetzt worden war. Die Zellen wurden anschließend bei 200x g für 3 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen erneut mit 10 ml des vorher beschriebenen Mediums resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen ausgesät.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28°C im Brutschrank. Als Medium wurde Leibovitz's L15, welches zusätzlich mit 10 % [v/v] FKS sowie 100 units Pen/ Strep/ ml Medium versetzt worden war, verwendet. Bei konfluentem Zellrasen wurden die Zellen umgesetzt und aufgeteilt. Dazu wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen durch vorsichtiges Schaben und Kratzen mit dem Zellschaber sowie Abspülen mit frischem Medium von der Schale gelöst. Die Zellen wurden anschließend in der gewünschten Zelldichte in neue Zellkulturschalen pipettiert.

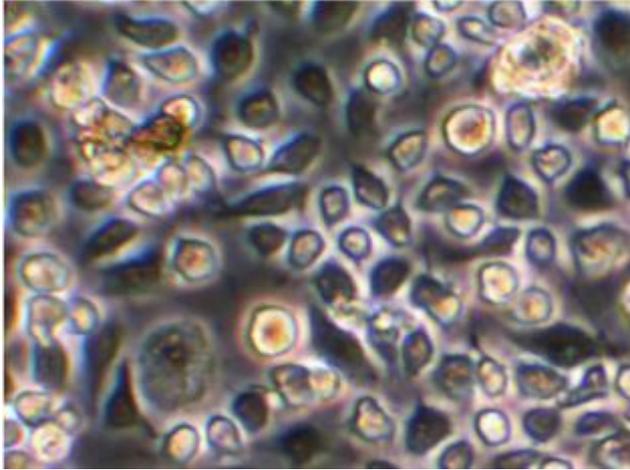


Abbildung 5: C6/36-Zellen

Kultivierte Mosquitozellen der Zelllinie C6/36 in Nähr-Medium bestehend aus Leibovitz's L15 (ThermoFisher Scientific) + 10 % [v/v] FKS + 100 units Pen/ Strep (Gibco™)/ ml Nähr-Medium unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung

3.3.2 Einfrieren von C6/36-Zellen zur längerfristigen Lagerung

Die Zellen wurden wie vorher beschrieben von der Schale gelöst (s. 3.3.1), in frischem Medium resuspendiert und für 5 Min. bei 100x g und 10°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Nähr-Medium und Einfrier-Medium (Nähr-Medium + 20 % [v/v] FKS + 20 % [v/v] DMSO) im Verhältnis 1 zu 1 aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert und über Nacht in –80°C gelagert, bevor sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.3.3 Virusinfektion

Für die Infektion mit CavV wurden die C6/36-Zellen in 150-cm²-Zellkulturplatten ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden einmal mit Leibovitz's L15-Medium mit 100 Einheiten Penicillin/100 µg/ml Streptomycin pro ml Medium gewaschen. Die nachfolgende Infektion fand in 20 ml serumfreiem Medium statt. Hierfür wurde 200 µl CavV-haltiger Überstand zugegeben und die Zellen bei 27°C für 48 Std. inkubiert.

Zwei Tage nach Infektion wurde der Überstand abgenommen und für 5 Min. bei 100x g zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Das verbleibende Zellpellet wurde in 1x PBS abgekratzt und für 5 Min. bei 100x g und 10°C zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschritte mit 1x PBS bevor die Zellpellets in 3 Aliquots bei –20°C gelagert wurden.

3.3.4 Zellfixierung und Konfokalmikroskopie

Für die Infektion wurden C6/36-Zellen in 24-well-Platten mit Deckgläsern ausgesät. Bei 100 % Konfluenz des Zellrasens wurde das Nährmedium durch 1 ml serumfreies Medium (+ 100 units Pen/ Strep/ ml Medium) ersetzt. Die Zellen wurden bei 27°C mit 250 µl Virus/ well infiziert. Nach 3 Std. wurde das virushaltige Medium abgenommen und durch frisches Nähr-Medium ersetzt.

Für die Zellfixierung wurden zwei verschiedene Chemikalien verwendet. Zum einen 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd + Triton = PFA+, zum anderen Methanol. Das Medium wurde abgenommen und entweder 400 µl PFA+ oder eiskaltes Methanol zugegeben. Die PFA-fixierten Zellen konnten anschließend direkt bis zur Färbung im Kühlschrank gelagert werden. Die Methanolfixierung erfolgte für 15 Min. bei -20°C. Anschließend wurde das Methanol abgenommen und 400 µl 1x PBS hinzugegeben, bevor die Zellen ebenfalls im Kühlschrank gelagert werden konnten.

Als Primärantikörper wurden der in dieser Arbeit hergestellte α -ExoN-His Antikörper in 1:10.000-Verdünnung, sowie ein α -dsRNA Antikörper in 1:500-Verdünnung verwendet. Diese waren in Antikörperlösung verdünnt worden. Nach Zugabe der Primärantikörper inkubierten die Zellen für 3 Std., sodass genügend Zeit für die Antikörperbindung zur Verfügung stand. Nach diesen 3 Std. bei Raumtemperatur wurden die Primärantikörper abgenommen und ungebundene Antikörper durch drei Waschschrte mit 1x PBS entfernt. Als Sekundärantikörper wurden (entsprechend des verwendeten Primärantikörpers) α -Kaninchen-IgG oder α -Maus-IgG eingesetzt, jeweils in einer Verdünnung von 1:1.000. Die Inkubationszeit wurde auf 2 Std. bei Raumtemperatur festgelegt. Erneut wurde nach der Inkubationszeit der Antikörper abgenommen und die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden in einem letzten Färbeschritt mit DAPI in einer Verdünnung von 1:2.500 für 5 Min. gefärbt. Auch hier wurden im Anschluss die Zellen dreimalig mit 1x PBS gewaschen, bevor sie auf Objektträger montiert wurden.

Die fertig gefärbten Zellen wurden nun vorsichtig auf einen Glasträger gelegt und mit Immersionsöl fixiert. Sie sollten in einem sonnenlichtgeschützten Raum aufbewahrt werden, sofern sie nicht sofort am Konfokalmikroskop untersucht werden.

Die Konfokalmikroskopie erfolgte abschließend in einem dunklen Raum mit dem Modell SP05 des Herstellers Leica.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinexpression und Aufreinigung rekombinant hergestellter CavV-ExoN in *E. coli*

Im Hinblick auf die später noch folgenden Experimente, bei denen die Funktionen des ExoN-Proteins untersucht werden sollten, war es von besonderem Interesse, ein Protein zu exprimieren, das sich nicht oder nur sehr wenig von dem in infizierten Zellen exprimierten Protein unterscheidet. Verwendet wurde hierfür ein Ubiquitin-Fusionsprotein-Expressionssystem, das sicherstellt, dass das gewünschte Protein (ExoN) mit seinem korrekten N-Terminus produziert werden kann. Dieses System beruht auf der Arbeit von Gohara et al., 1999, bei dem das C-terminale Ende von Ubiquitin (Ub) mit dem N-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert wird (Gohara et al., 1999). Der Ub-tag, welcher ursprünglich am N-terminalen Ende lokalisiert war, wird durch eine ubiquitinspezifische C-terminale Protease (Ubp1), die die Spaltungsstelle LRRG|XXXX zwischen dem Ub-tag und dem gewünschten Protein erkennt, gespalten, so dass das korrekte N-terminale Ende des gewünschten Proteins freigesetzt wird. Ubp1 wird zu diesem Zweck von einem zweiten Plasmid (pCGI) koexprimiert.

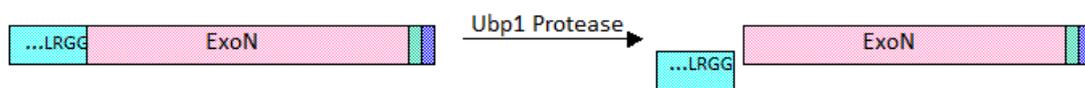


Abbildung 6: Ubiquitinsystem zur Expression der gewünschten Proteine

Schematische Darstellung des Ubiquitin-Expressionssystems anhand eines Beispiels von CavV Ub-ExoN-GSSG-His₇. Vorne anstehend befindet sich das Ubiquitin (hellblau), ...LRRG entspricht dem C-terminalen Ende des Ubiquitin und gleichzeitig der C-terminalen Hälfte der spezifischen Schnittfrequenz LRRG|XXXX der Ubp1-Protease (ubiquitinspezifischen Protease 1), welche auf einem zweiten Plasmid (in diesem Fall pCGI) kodiert ist und zusammen mit dem Ubiquitin-Fusionsprotein koexprimiert wird. An das Ubiquitin schließt sich C-terminal die ExoN-Domäne an, deren C-terminalen Ende ein GSSG-Spacer (grün), sowie der Heptahistidin-Affinitätstag (dunkelblau) folgt. Die Ubp1 spaltet die N-terminal gelegene Ubiquitin-Domäne vom Rest des Proteins ab, sodass die ExoN mit ihrer natürlichen N-terminalen Sequenz freigesetzt wird.

Zur Expression wurden zwei bereits aus vorherigen Arbeiten vorliegende (Dr. Sandra Blanck) Plasmidkonstrukte verwendet: pASK[Ub-ExoN-GSSG-His₇] und pET[Ub-ExoN-6aaOMT-Strep] (Abb. 7).

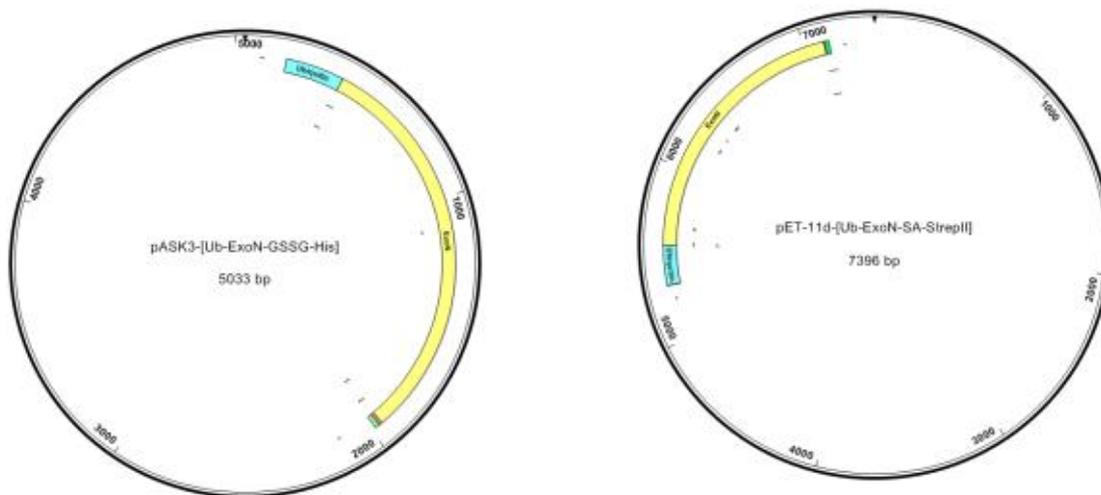


Abbildung 7: Verwendete mesonivirale ExoN-Konstrukte

Zur Darstellung kommen beide verwendete CavV-ExoN-Konstrukte: pASK3-[Ub-ExoN-GSSG-His₇] und pET-11d-[Ub-ExoN-6aaOMT-StrepII]. Beiden Konstrukten ist gemeinsam, dass sie Ubiquitin am N-terminalen Ende kodieren sowie einen *Linker* zwischen ExoN und dem jeweiligen Affinitätstag am C-terminalen Ende aufweisen. pASK3-[Ub-ExoN-GSSG-His₇] hat eine Größe von 5033 bp, pET-11d-[Ub-ExoN-6aaOMT-StrepII] dagegen 7396 bp.

4.1.1.1 Proteinexpression und Aufreinigung mittels Heptahistidin-Affinitätstag

Es wurde ein spezieller *E. coli*-Stamm „C2523“ verwendet, der –wie oben beschrieben– mit dem Plasmid pCGI, welches die ubiquitinspezifische Protease kodiert, transformiert wurde. So wurde zunächst pASK[Ub-ExoN-GSSG-His₇] mittels Hitze-Schock-Transformation in die Bakterien geschleust und diese über Nacht ausplattiert sowie eine Vorkultur mit den entsprechenden Antibiotika angelegt, womit am folgenden Tag die Hauptkultur (2l) inokuliert wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur mit 0,1 mM AHT (Anhydrotetracyclin) induziert und für weitere 6 Std. bei 18°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien pelletiert und wie in den Methoden beschrieben enzymatisch und durch Sonifizierung aufgeschlossen. Die Aufreinigung erfolgte durch die in 3.1.3.1 beschriebene Talon-Affinitätschromatographie. Die an die Affinitätsmatrix gebundenen Proteine wurden nach mehreren Waschschritten durch ansteigende Imidazol-Konzentrationen eluiert. Es wurden sieben Elutionsfraktionen zu je 1 ml gesammelt. Für das Konstrukt ExoN-GSSG-His₇ wurde ein Molekulargewicht von 62,2 kDa berechnet. Abbildung 8A zeigt das mit Coomassie-Brilliantblau gefärbte 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel, das die einzelnen Zwischenschritte der Aufreinigung dieses Proteins dokumentiert. Es ist deutlich das 62,2 kDa große ExoN-GSSG-His₇ zu identifizieren, welches sich zwischen den 55- und 70-kDa-Markerbanden befindet, sowohl im Pellet und der Ladefraktion als auch in den Elutionsfraktionen E1-7.

Abbildung 8B zeigt den zusätzlich durchgeführten spezifischen Nachweis des exprimierten Proteins mittels spezifischer Antikörper im Westernblot (rote Banden). Als Primärantikörper wurde ein α -His-Antikörper aus der Maus verwendet, der gegen den Heptahistidin-Affinitätstag des Fusionsproteins gerichtet ist. Es ist zu erkennen, dass die in der induzierten Probe nachweisbare Bande in der nicht-induzierten Probe (Negativkontrolle) fehlt. Der Durchfluss zeigt keine detektierbaren Mengen an ExoN-GSSG-His₇, sodass angenommen werden kann, dass das Protein nahezu vollständig an die Säule gebunden hatte.

Die Anreicherung des Proteins in den Eluat-Fractionen wurde als ausreichend für die weiteren Experimente bewertet. Es wurde deshalb mit einem Pool aus allen Elutionsfraktionen weitergearbeitet.

4.1.1.2 Proteinexpression und Aufreinigung über Strep-tag

Für die Aufreinigung des von pET[Ub-ExoN-6aaOMT-Strep] kodierten Proteins wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Auch dieser trug das Plasmid pCGI, um das N-terminale Ubiquitin abspalten zu können. Analog zum Konstrukt mit dem Heptahistidin-Affinitätstag wurde das Ub-ExoN-6aaOMT-Strep auf ähnliche Weise produziert. Als Induktor diente hierbei allerdings 0,1 mM Anhydrotetracyclin. Die Aufreinigung mittels Strep-Tactin wurde wie in 3.1.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin erfolgte in Säulen und es wurden sieben Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Die errechnete Proteingröße betrug 62,5 kDa. Abbildung 9 zeigt eine 12% SDS-PAGE zur Dokumentation der einzelnen Zwischenschritte der Aufreinigung. Es zeigen sich zwei deutliche Banden in den ersten beiden Elutionsfraktionen, welche sich zwischen den 55- und 70-kDa-Markerbanden befinden. Des Weiteren zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der nichtinduzierten Probe und der induzierten Probe. Es ist deutlich mehr Protein unlöslich im Pellet verblieben als löslich in der Ladefraktion. Die Elutionsfraktionen E1 und E2 zeigen eine sehr gute Reinheit und wurden für die späteren Versuche weiterverwendet.

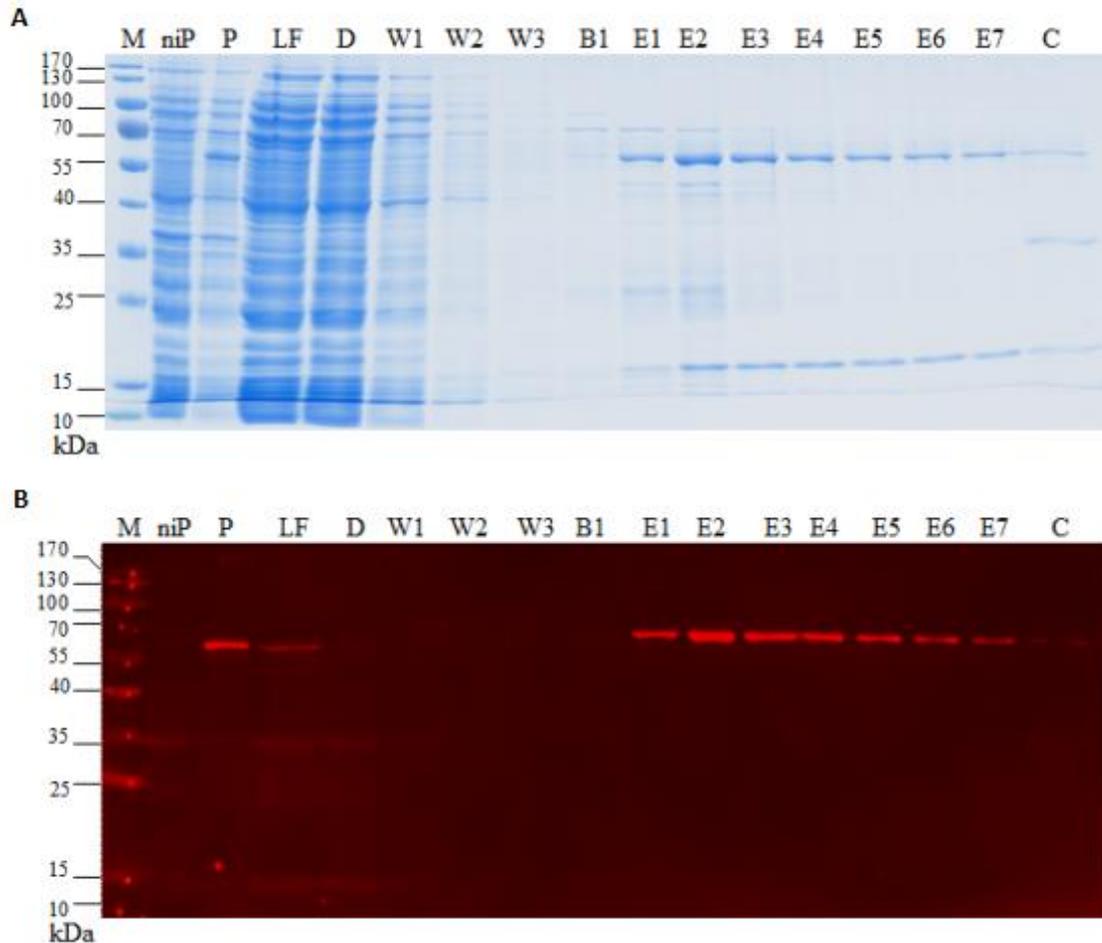


Abbildung 8: Proteinaufreinigung von CavV-ExoN-His₇

ExoN-His wurde in C2523+pCGI-*E. coli*-Zellen exprimiert, welche zuvor mit pASK[Ub-ExoN-GSSG-His₇] transformiert wurden. Nach Induktion der Expression wurden die Zellen für 6 Std. bei 18°C inkubiert, danach enzymatisch und mechanisch aufgeschlossen und die löslichen Proteine für eine Stunde an die Talon-Matrix gebunden. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mit Hilfe eines ansteigenden Imidazol-Gradienten. Die errechnete Proteinmolekülgröße beträgt 62,2 kDa. Es wurden jeweils 20 µl pro Lauftasche auf das Gel aufgetragen. (A) Gezeigt ist ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel, in der Proben aus den einzelnen Schritten des Reinigungsprozesses aufgetragen wurden. Hierbei wurden jeweils 20 µl pro Lauftasche aufgetragen. M – Marker; niP – Gesamtlysate von nicht-induzierten Bakterien (Pellet); P – Pelletfraktion von induzierten Bakterien; LF – Ladefraktion; D – Durchfluss; W1-3 - Waschschrte mit His-Bindepuffer; B1 - Waschschrte mit Puffer B1; E1-7 aufgefangene Eluate von je 1 ml pro Fraktion; C - Waschschrte mit Puffer C. (B) Westernblot-Analyse der mittels 12% SDS-PAGE aufgetrennten Proben der einzelnen Reinigungsschritte von CavV-ExoN-GSSG-His₇. Verwendet wurde als Primärantikörper ein Maus-α-His-Ak in einer Verdünnung von 1:1.000, als Sekundärantikörper ein Ziege-α-Maus-IgG-Ak in einer Verdünnung von 1:20.000.

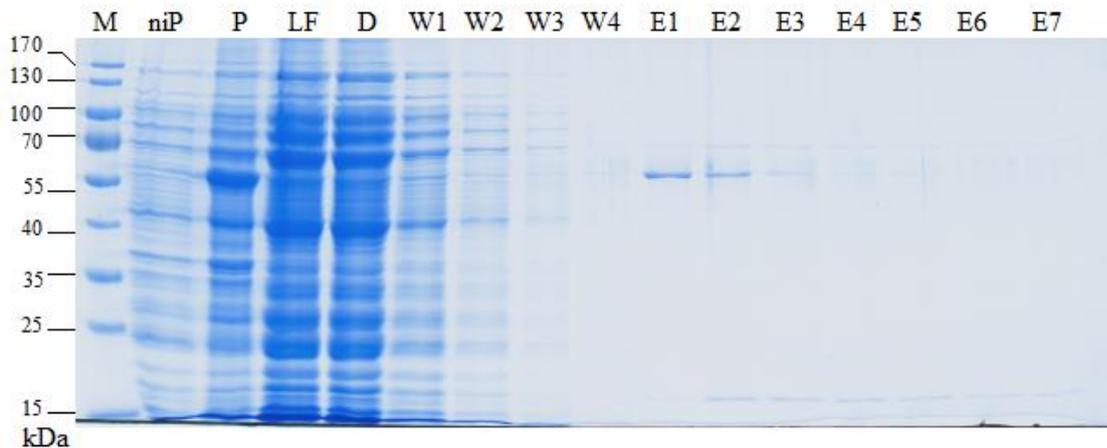


Abbildung 9: Proteinaufreinigung von CavV-ExoN-Strep

ExoN-Strep wurde in BL21(DE3)+pCGI-*E. coli*-Zellen exprimiert, welche mit pET[Ub-ExoN-6aaOMT-Strep] transformiert wurden. Die Zellen wurden nach Induktion der Expression für 6 Std. bei 18°C inkubiert, danach enzymatisch und mechanisch aufgeschlossen und die löslichen Proteine für eine Stunde an eine Strep-Tactin-Matrix gebunden. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mit Desthiobiotin. Es wurde eine 12 % SDS-PAGE durchgeführt, um Proben aus den einzelnen Schritten des Reinigungsprozesses zu untersuchen. Hierbei wurden jeweils 20 µl pro Lauftasche aufgetragen. Die errechnete Proteingröße beträgt 62,5 kDa.

M – Marker; niP – Pelletfraktion von nicht-induzierten Bakterien; P – Pelletfraktion von induzierten Bakterien; LF – Ladefraktion; D – Durchfluss; W1-4 - Waschschrte mit Strep-Bindepuffer; E1-7 - aufgefangene Eluate von je 1 ml pro Fraktion

4.1.2 Quantifizierung der exprimierten Proteine

Um mit den vorher exprimierten Fusionsproteinen ExoN-GSSG-His₇ und ExoN-6aaOMT-Strep weiterarbeiten zu können, wurden diese umgepuffert und dialysiert. Dazu wurden einerseits die Elutionsfraktionen E1-7 des in 4.1.1.1 aufgereinigten ExoN-GSSG-His₇ sowie andererseits die Fraktionen des in 4.1.1.2 aufgereinigten ExoN-6aaOMT-Strep getrennt zusammengeführt. Die Proteinlösungen wurden wie in den Methoden beschrieben in PD10 Gelfiltrationssäulen in Proteinlagerpuffer umgepuffert und anschließend mittels Osmose konzentriert.

Kleine Mengen der gereinigten Proteine wurden neben ansteigenden BSA-Konzentrationen auf ein 12 % SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 10). 3CL^{pro} entspricht der cavallyviralen Hauptprotease, welche ebenfalls aufgereinigt wurde (Daten werden nicht gezeigt) und Verwendung finden sollte in der Abspaltung der Affinitätstags. Es ist zu erkennen, dass die Proteinkonzentration von ExoN-GSSG-His₇ deutlich höher ist als die Konzentration des Exon-6aaOMT-Strep-Proteins. Anhand der aufgetragenen BSA-Konzentrationen mit genau definierten

Proteinmengen konnten die Konzentrationen der beiden ExoN-Konstrukte mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet werden. Die Konzentrationen wurden wie folgend errechnet: 3CL^{pro} 60 ng/μl, ExoN-GSSG-His₇ 20 ng/μl, ExoN-6aaOMT-Strep 4 ng/μl.

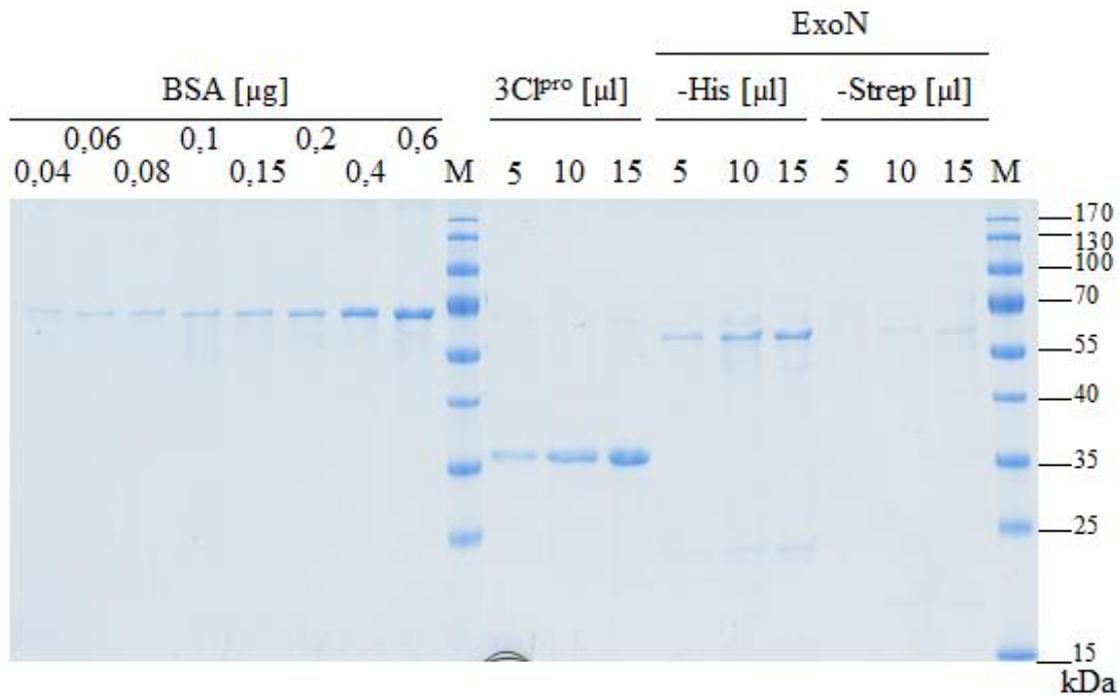


Abbildung 10: Konzentrationsbestimmung der exprimierten Proteine

Es wurde eine 12 % SDS-PAGE durchgeführt. Links anstehend wurden definierte BSA-Mengen von 0,04 μg bis 0,6 μg Protein aufgetragen. Diese wurden verwendet, um die Proteinmenge der exprimierten Proteine zu bestimmen. Es wurden jeweils 20 μl pro Laufentasche aufgetragen. 3CL^{pro}, Exon-His₇ und ExoN-Strep wurden jeweils mit 5, 10 und 15 μl aufgetragen.

M – Marker; 3CL^{pro} - cavallyvirale Hauptprotease; ExoN-His - ExoN-GSSG-His₇; ExoN-Strep - ExoN-6aaOMT-Strep

4.1.3 Trans-Spaltungsassay der Affinitätstags

Es wurde versucht, ein möglichst natives Protein herzustellen. Dazu sollten die entsprechenden Affinitätstags am C-terminalen Ende der ExoN-Konstrukte abgespalten werden. Hierfür wurde die cavallyvirale Hauptprotease (3CL^{pro}), welche, wie aus vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, alle vorgegebenen Spaltstellen des CavV pp1a/1ab spalten kann (Blanck et al., 2014), aus einem bereits vorliegenden Plasmid exprimiert und aufgereinigt (Daten werden nicht gezeigt). Leider war es jedoch nicht möglich, die Affinitätstags der beiden verschiedenen ExoN-Konstrukte abzuspalten.

So wurde entschieden, mit beiden Proteinkonstrukten die weiteren Experimente fortzuführen, mit dem Gedanken, dass die Affinitätstags lediglich ~1 kDa groß sind und

vermutlich keine oder nur sehr geringgradige strukturelle und/oder funktionelle Auswirkungen auf das jeweilige Protein haben sollten.

4.1.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gerichtet gegen CavV-ExoN-GSSG-His₇

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten CavV-ExoN-spezifische Antikörper hergestellt werden, die in weiteren Experimenten, wie beispielsweise zum Nachweis des Proteins in CavV-infizierten Zellen, eingesetzt werden können. Deswegen wurde das Proteinkonstrukt ExoN-GSSG-His₇ in großem Maßstab exprimiert, um genügend Protein für die Immunisierung zur Verfügung zu haben. Hierfür wurden insgesamt 10 l Kultur exprimiert, aufgereinigt, zusammengeführt, umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurde das Protein an die Firma *Eurogentec* geschickt mit dem Auftrag, polyklonale CavV-ExoN-spezifische Antikörper in Kaninchen zu produzieren. Nach dem Eintreffen wurden die zugesandten Kaninchenserum getestet. Eurogentec immunisierte zwei verschiedene Kaninchen, so dass das folgende Experiment in zweifacher Ausführung durchgeführt wurde. Es wurden jeweils das Präimmenserum und das Antiserum aus der letzten Blutentnahme (*final bleed*) in verschiedenen Verdünnungen an jeweils 100 und 200 ng Protein getestet. Erfreulicherweise war der Antikörper beider Kaninchen geeignet, selbst bei großen Verdünnungen von 1:40.000 das Zielantigen zuverlässig nachzuweisen. Das Serum des zweiten Kaninchens zeigte das Zielantigen deutlicher an, leider war aber bereits mit einem Präimmenserum (zumindest bei geringer Verdünnung des Serums) ein leicht positiver Nachweis zu verzeichnen. Deswegen wurde der Antikörper des ersten Kaninchens präferiert und in einer Verdünnung von 1:15.000 in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

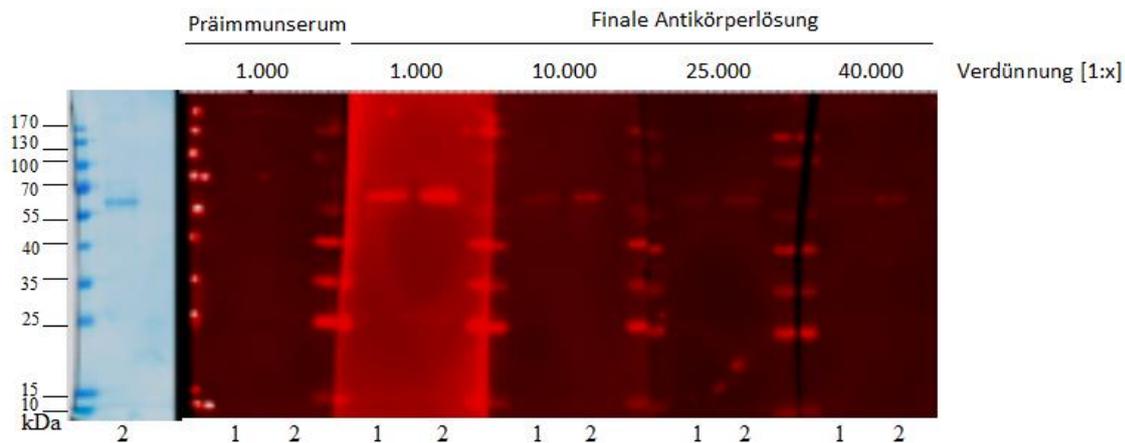


Abbildung 11: ExoN-Antikörpertestung

Es erfolgte eine immunspezifische Färbung von CavV-ExoN-GSSG-His7 nach Proteintransfer mittels *Westernblot* durch α -ExoN-GSSG-His-Ak (polyklonales Antiserum aus Kaninchen). Zuvor wurde eine 12 % SDS-PAGE durchgeführt. Als Primärantikörper wurde das in dieser Arbeit hergestellte polyklonale α -ExoN-GSSG-His7-Serum aus Kaninchen in verschiedenen Verdünnungen verwendet, als Sekundärantikörper ein Ziege- α -Kaninchen-IgG-Ak in einer Verdünnung von 1:20.000. Verdünnungen des Primärantikörpers: Präimmunserum 1:1.000, sowie Antiserum in Verdünnungen von 1:1.000, 1:10.000, 1:25.000 und 1:40.000. In den Spuren 1 wurden 100 ng Protein verwendet, in den Spuren 2 200 ng Protein.

4.2 Proteinvarianten der CavV-ExoN-Domäne

Um mehr Informationen über die einzelnen konservierten Motive und einzelner Aminosäurereste der DEDDh-Superfamilie von CavV-ExoN zu erlangen und deren Beitrag zur Enzymaktivität sowie deren mögliche Rolle im viralen Replikationszyklus zu bestimmen, sollte untersucht werden, wie sich Veränderungen innerhalb dieser Bereiche auswirken. Deswegen sollten konservierte Aminosäurereste, für die eine mögliche Beteiligung an der Substrat- und Metallionenbindung sowie der Katalyse vorhergesagt war, durch ein Alanin substituiert werden. Es wurden vier Proteinvarianten mit Austausch einer spezifischen Aminosäure in jeweils einem Motiv hergestellt (für Motiv I zwei, für die anderen Motive jeweils eine Proteinvariante): _D4362A, _E4364A, _D4545A und _D4604A, sowie je eine Proteinvariante für Motiv I und III, die eine doppelte Substitution beinhaltet: _D4362A_E4364A und _H4599A_D4604A. Die Motive wurden auf Grundlage einer im Labor durchgeführten vergleichenden Sequenzanalyse vorausgesagt. Mit Bestimmung der ExoN-Kristallstruktur durch Ma et al. (Ma et al., 2015) zeigte sich jedoch, dass das Motiv II mit F4537-D4545 sehr wahrscheinlich nicht korrekt vorausgesagt worden war. Die aufgrund der Strukturanalyse des homologen Proteins von Coronaviren revidierte Position des Motivs II in der mesoniviralen ExoN befindet sich

stattdessen an den Positionen S4480-K4483 des Polyproteins mit dem hochkonservierten sauren Aminosäurerest der Asparaginsäure an Position 4481.

Abbildung 12 zeigt eine vergleichende Sequenzanalyse der ExoN-Domäne verschiedener Mesoniviren, dessen Aminosäureabfolge und den Aufbau der verschiedenen Motive.

Die Proteinvarianten wurden mittels „*site-directed mutagenesis-PCR*“, wie in den Methoden beschrieben, hergestellt. Die Sequenzen der dazu verwendeten Primer können in den Materialien nachgeschlagen werden. Aufgebaut sind die verschiedenen Proteinvarianten analog des Wildtyps und bestehen aus der entsprechend veränderten CavV-ExoN-Domäne, einem GSSG-„*Linker*“, einem Heptahistidin-Affinitätstag und wurden analog des ExoN-GSSG-His₇ Konstrukts exprimiert sowie mittels Talon-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Abbildung 13 zeigt alle hergestellten Proteinvarianten, dem Wildtyp gegenübergestellt. Auffallend ist ein weiteres Protein bei den Varianten _D4362A, E4364A, _D4362A_E4364A und _D4604A, welche zwischen der 40- und 55-kDa-Markerbande läuft. Dieses Protein wurde in dem parallel durchgeführten Westernblot nicht angefärbt. Alle hergestellten Affinitätstags-tragenden ExoN-Varianten konnten im Westernblot durch spezifische Immunfärbung nachgewiesen werden. Es wurde versucht, eine annähernd gleiche Konzentration von ~0,2 µg/µl der Proteine einzustellen. Es zeigte sich allerdings, dass das Wildtyp-Enzym tendenziell am niedrigsten konzentriert ist, was aber kein großes Problem darstellte, da die Proteinvarianten hauptsächlich als Negativkontrollen in den weiteren Experimenten dienen sollten.

Abbildung 12: Vergleichende Sequenzanalyse verschiedener mesoniviraler ExoN-Domänen

Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenzen der ExoN-Domänen verschiedener Mesoniviren sowie deren Position im Polyprotein. Der Sequenzvergleich wurde mittels Clustal Omega erstellt und mittels Esript3 zur Darstellung gebracht (Robert & Gouet, 2014; Sievers et al., 2011). Schwarz hinterlegten Aminosäuren sind bei allen in die Analyse einbezogenen Viren konserviert. Die Motive I-III sind gekennzeichnet. Hier befinden sich die hochkonservierten Aminosäurereste D4362, E4364, D4481 und D4604, die auch die typische Signatur der DEDD-Exonukleasen einschließen und mit einem Sternchen markiert worden sind. Das zu Beginn dieser Arbeit vermutlich falsch vorausgesagte Motiv II ist rot gekennzeichnet. Hier befindet sich der saure Asparaginsäurerest D4545, der initial als Teil des DEDD-Motives dieser Klasse von Exonuklease angesehen wurde (durch rotes Sternchen gekennzeichnet).

Abkürzungen: CavV: Cavallyvirus (GenBank: NC_015874); NDV: Nam-Dinh-Virus (GenBank: NC_015874); CASV: Casuarinavirus (GenBank: NC_023986); NseV: Nsé-Virus (GenBank: NC_020901); HanaV: Hanavirus (GenBank: NC_020899); KADV: Kadiweuvirus (GenBank: NC_043488); KSAV: Karang-Sari-Virus (GenBank NC_038296); DKNV: Dak-Nong-Virus (GenBank: NC_038297); MenoV:

Ménovirus (GenBank: NC_020900); DiankeV: Diankevirus (GenBank: NC_036586); OFAV: Ofaivirus (GenBank: NC_043489)

	4327	337	347	357	367	377	387
CavV	AEKMTYTNVIRNLDKETH	TMQRKFP	MNIIVMDDC	ICFD	AFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
NDV	AEKMTYTNVIRHLDKNHT	TMQRKFP	MNIIVMDDC	ICFD	AFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
CASV	AENMKYINIRHLL	..NPTMCRKFP	MNIIVMDDY	TFDF	SEFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
NseV	.ASESFMNIRQLPKEDY	TMKRRFP	MNVVLDY	TFDF	SEFLNPKDN	PEP	VMSYGFSSKHGKRRIAGIPV
HanaV	.AEMSFINIRQL	..NSHTMERKFP	INIVMPDY	ICFD	AFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
KADV	...ATFINIRNLAGDTH	KLQTTFP	INIVMSDY	TFDF	SEFLNPLENR	QEPV	MLSYGFTHENKRRRIAGIPV
KSaV	AGKMSYINIRNLDKTH	TMQRKFP	MNIIVMDDY	ICFD	AFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
DRNV	SAPLEYINIRNIASSKQ	TLQRKY	PTNVIMDDY	TFDF	SEFLNPRDD	PREP	VMSYGFSSAYGNRRISAGIPV
MenoV	SAPLEYINIRNIASSKQ	TLQRKY	PTNVIMDDY	TFDF	SEFLNPRDD	PREP	VMSYGFSSAYGNRRISAGIPV
DiankeV	.AEMKYTNVIRHLDKNIY	TMQRKFP	MNIIVMDDC	ICFD	AFLNPRDNV	QEPV	MLSYGFSSKYGKRRIAGIPV
OFAV	..STNYINIRNLAGDSSH	KLKRKY	PMNIIVKDDY	TFDF	EFLNPHDAP	QEPV	VLSYGFSSVHGSRRIISAGIPV

* *
—————
motif I

	4397	407	417	427	437	447	457							
CavV	RYIKDKFNRI	TIPIH	KYNYKDN	NKPLTSTY	SCDMMKKQHP	DPQYKHL	LTSVLQGR	NRNDT	TVDLRPL	LNFCVDN				
NDV	RYIKDKFNRI	IVPQY	NYKDN	NKPLTSTY	TCDMRKQHP	PEQYKHL	LTSVMQGR	NRNDT	TVDLRPL	LNFCVDN				
CASV	RYIQDKFNRI	IVPLK	YNYKDN	NKPLTSTY	ACDMLRKAQ	PEQYKHL	LNSITQ	CHNNT	IVDIRH	LNFCVDN				
NseV	RYIKDNYNRI	ITPIK	YNYKDK	KPLTSTY	VSSMMKKDL	PTQFKH	LNNAV	CKGS	NDNT	IVDVKHM	LNFCVDN			
HanaV	RYIKDKFNRI	IVPQY	KYNYKDN	NKPLTSTY	VCEM	NKQKPE	QYQL	LNSITQ	CHSND	TVDLRPL	LNFCVDN			
KADV	RYVKNKFNRI	ILTPIQ	VNFV	DNPLTSTY	SCNWLKHKD	PSQFR	HLSFS	VKVG	KNN	TVELRHM	LNFCVDN			
KSaV	RYIKDKFNRI	IVPQY	KYNYKDN	NKPLTSTY	NCDMRKR	YPEQYKHL	LNSV	QGH	NL	TVDLRPL	LNFCVDN			
DRNV	RYVYSKFNRI	LTVPK	YNYKDN	NKPLTSTY	IATWLKAKA	PEQYNY	L	RD	IT	QGK	NN	TV	DKH	LNFCVDN
MenoV	RYVYSKFNRI	LTVPK	YNYKDN	NKPLTSTY	IATWLKAKA	PEQYNY	L	RD	IT	QGK	NN	TV	DKH	LNFCVDN
DiankeV	RYIILDKFNRI	IVPQY	KYNYKDN	NKPLTSTY	ICDMLRKAQ	PEQYKHL	LTSVMQGR	NRNDT	TVDLRPL	LNFCVDN				
OFAV	RYVVKDKFNRI	LVPTE	YKFKD	YNYKPLTSTY	VTNWLRHR	FKEQFDH	LNTAV	KFG	IT	SAK	VL	VNA	KHM	LNFCVDN

	4467	477	487	479	507	517	527																
CavV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLRAH	TLYPD	ISTV	CNITTR	CT	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KD	HINT				
NDV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKAH	TLYPD	IATV	CNITTR	CT	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KD	HVNT				
CASV	IHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKAH	TLYPD	IDVI	CNITTR	CT	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT				
NseV	VHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLRAN	TLYPD	VSQT	CNI	ASR	CL	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT			
HanaV	VHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKAY	TLYPD	ISTV	CNITTR	CT	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KD	HINT				
KADV	THVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKANT	LYP	PIST	QMCN	VIT	IK	CK	SP	PI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT	
KSaV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKANT	LYP	PIST	QMCN	VIT	IK	CK	SP	PI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT	
DRNV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKANT	LYP	PIST	QMCN	VIT	IK	CK	SP	PI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT	
MenoV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKANT	LYP	PIST	QMCN	VIT	IK	CK	SP	PI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT	
DiankeV	MHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLKAH	TLYPD	ISTV	CNITTR	CT	SQPI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KD	QINT				
OFAV	IHVKPVIVT	WAGSDH	CF	FLI	ANT	LYP	PIST	QMCN	VIT	IK	CK	SP	PI	YAS	PQGR	H	TY	LC	QY	HA	HQL	KE	QINT

*
—————
motif II

	4537	547	557	567	577	587	597																																						
CavV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNDY	LKLT	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
NDV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNDY	LKLT	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
CASV	HFVNLEI	IDLKLD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
NseV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
HanaV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
KADV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
KSaV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
DRNV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
MenoV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNNI	KL	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
DiankeV	HFVNLEI	IDLKVD	RNYQ	TNERT	LRVY	HNDY	LKLT	LDL	.NVA	SN	SL	TD	CH	TR	YCR	TI	HAP	TP	HD	PLDDA																									
OFAV	HFVNLEI	IDLTV	STN	KQ	.DVK	TL	LSV	T	HNE	V	K	L	T	L	NE	A	P	R	S	G	S	L	D	S	I	H	S	H	Y	C	N	T	K	H	K	V	I	T	P	H	D	P	L	D	D

*
—————
motif II

*
—————
motif III

	4607	617	627	637	647	657	677																																																							
CavV	IMTQCI	YQS	FFVLS	HLEK	LAYE	POAN	LKAF	TSMD	YRL	KNF	NPE	MCK	LRR	LE	LQ	KV	WY	E	K	Y	I	..	D	T	K	K	T	H	C	N	M																															
NDV	IMTQCI	YQS	FFVLS	HLEN	LAYE	POAN	LKAF	TSMD	YRL	KNF	NPE	MCK	LRR	LE	LQ	KV	WY	S	Q	Y	T	..	N	T	N	K	T	H	C	N	M																															
CASV	IMTQCI	FQ	SLV	KPH	LEK	LAYE	TOAN	LRAF	IG	MY	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	K	H	W	K	M	I	..	E	R	N	I	K	H	C	N	M																			
NseV	IMTQCI	FQ	SLV	QPH	FEK	LAYE	QGAN	LRAF	LS	MD	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	L	E	W	Y	E	R	Y	T	S	I	N	T	S	R	T	H	C	N	M															
HanaV	IMTQCI	FQ	SLV	QPH	FEK	LAYE	QGAN	LRAF	LS	MD	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	L	E	W	Y	E	R	Y	T	S	I	N	T	S	R	T	H	C	N	M															
KADV	LMTQCL	FHS	SIV	R	T	K	F	E	E	I	V	E	E	K	A	N	V	A	A	F	I	S	M	D	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	E	Y	W	Y	K	K	S	..	A	T	T	K	T	H	C	N	M			
KSaV	IMTQCI	FQ	SLV	QPH	FEK	LAYE	SEAN	LKAF	TSMD	YRL	KNF	NPE	MCK	LRR	LE	LQ	KV	WY	S	E	Y	I	..	T	H	N	I	T	H	C	N	M																														
DRNV	LMTQCL	FHS	SIV	R	T	K	F	E	E	I	V	E	E	K	A	N	V	A	A	F	I	S	M	D	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	K	H	W	Y	A	K	S	..	E	T	S	I	T	H	C	N	M			
MenoV	LMTQCL	FHS	SIV	R	T	K	F	E	E	I	V	E	E	K	A	N	V	A	A	F	I	S	M	D	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	K	H	W	Y	A	K	S	..	E	T	S	I	T	H	C	N	M			
DiankeV	IMTQCI	FQ	SLV	S	H	L	E	K	L	A	Y	E	P	O	A	N	L	K	A	F	T	S	M	D	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	K	I	W	Y	Q	Y	I	..	N	T	N	K	T	H	C	N	M			
OFAV	IMTR	CV	F	S	L	V	K	S	Q	F	D	K	L	L	Y	E	Q	K	A	N	L	T	A	F	L	S	M	D	Y	R	L	R	N	F	N	P	E	M	C	K	L	R	R	E	L	O	Q	Y	W	Y	Q	I	Y	'A	.T	N	K	T	H	C	N	M

	4687	697	707	717	727	737	747																																						
CavV	GCGKEP	HLKQ	ALHN	IDV	LQ	GKSN	PON	NM	N	T	H	C	S	DE	EH	I	F	D	S	H	W	Y	K	D	G	F	R	K	P	S	Y	I	F	S	D	I	N	K	E	H	Y	K	L	G	T
NDV	GCGKEP	HLKQ	ALHN	IDV	LQ	GKSN	PON	NM	N	T	H	C	S	DE	EH	I	F	D	S	H	W	Y	K	D	G	F	R	K	P	S	Y	I	F	S	D	I	N	K	E	H	Y	K	L	G	T
CASV	GCGKEP	HLKQ	ALHN	IDV	LQ	GKSN	PON	NM	N	T	H	C	S	DE	EH	I	F	D	S	H	W	Y	K	D	G	F	R	K	P	S	Y	I	F	S	D	I	N	K	E	H	Y	K	L	G	T
NseV	GCGKEP	HLKQ	ALHN	IDV	LQ	GKSN	PON	NM	N	T	H	C	S	DE	EH	I	F	D	S	H	W	Y	K	D	G	F	R	K	P	S	Y	I	F	S	D	I	N	K	E	H	Y	K	L	G	T
HanaV	GCGKEP	HLKQ	ALHN	IDV	LQ	GKSN	PON	NM	N	T	H	C	S	DE	EH	I	F	D	S	H	W	Y	K	D	G	F	R	K	P	S	Y	I	F	S	D	I									

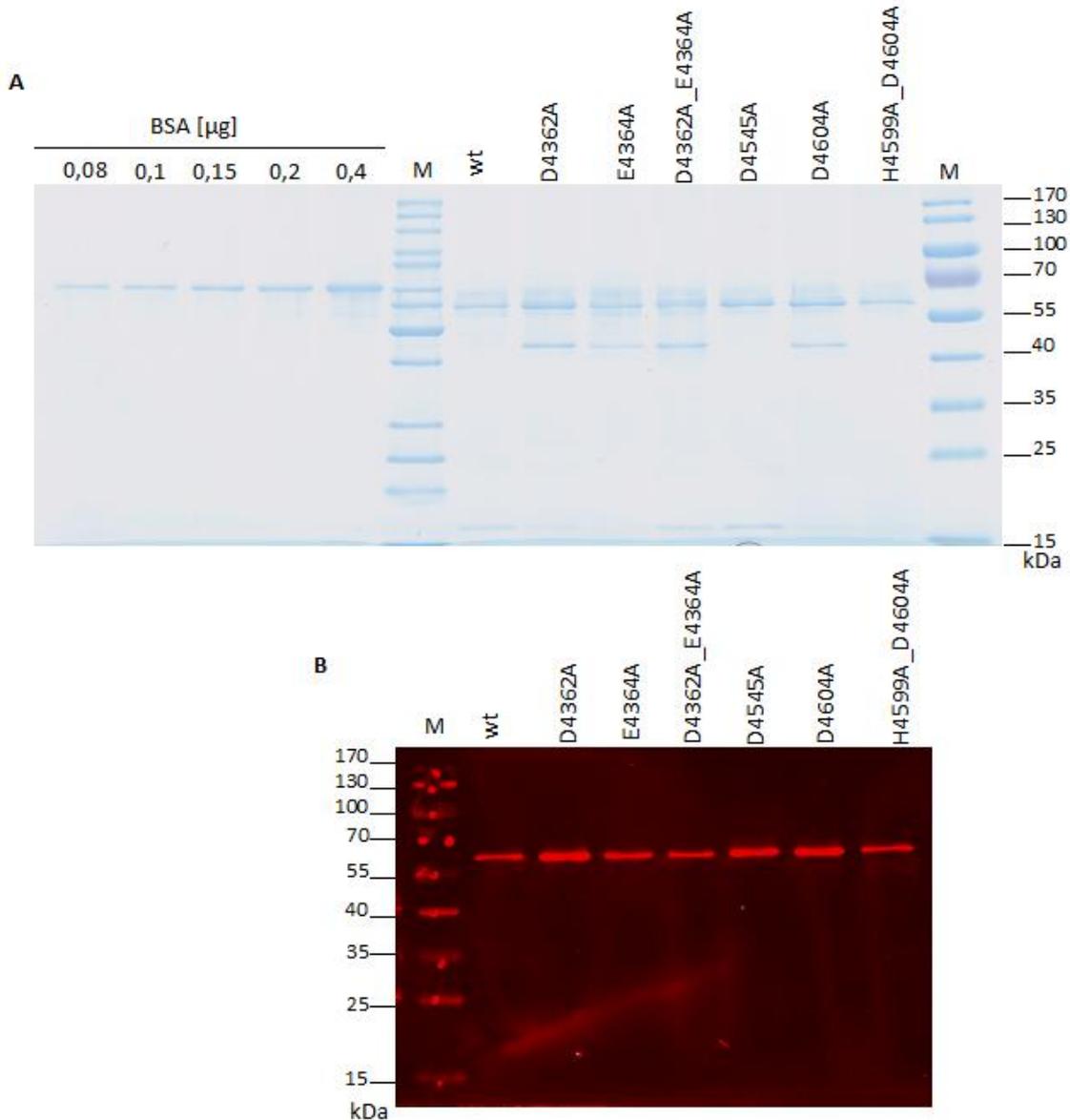


Abbildung 13: SDS-PAGE von CavV-ExoN-Proteinvarianten und CavV-Wildtyp-ExoN

Es wurde eine 12 % SDS-PAGE verwendet. Aufgetragen sind die Wildtyp-ExoN und die Proteinvarianten D4362A, E4364A, D4362A_D4364A, D4545A, D4604A und H4599A_D4604A. Die Proteine wurde in C2523+pCGI-*E. coli*-Zellen exprimiert und mittels Talon-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

(A) Links wurden ansteigende BSA-Mengen aufgetragen (0,08 µg bis 0,4 µg). Die errechneten Proteingrößen der CavV-ExoN-His₇-Varianten sowie Wildtyp-ExoN betragen ~62,2 kDa. Es wurden jeweils 1 µl der jeweiligen Proteinlösung mit 4 µl Laufpuffer vermischt auf das SDS-Gel aufgetragen. Alle ExoN-Konstrukte entsprachen etwa einer Konzentration 0,2 µg/µl.

(B) Immunfärbung nach Proteintransfer mittels Westernblot. Zuvor wurde eine 12 % SDS-PAGE durchgeführt. Als Primärantikörper diente ein Maus- α -His-Ak in einer Verdünnung von 1:1.000, als Sekundärantikörper wurde ein Ziege- α -Maus-IgG-Ak in einer Verdünnung von 1:20.000 verwendet.

4.3 Nachweis des ExoN-Proteins in CavV-infizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Um die Expression der ExoN in virusinfizierten Zellen nachzuweisen und die intrazelluläre Lokalisation dieses Proteins im Vergleich zur CavV dsRNA zu untersuchen, wurden wie in 3.3.3 beschrieben Mosquitozellen der Zelllinie C6/36 mit dem CavV infiziert und für die Konfokalmikroskopie vorbereitet. Es wurden Zellen untersucht, die für 48 Std. infiziert und anschließend in Methanol fixiert wurden. Dazu wurde der in 4.1.4 beschriebene Kaninchen- α -ExoN-Antikörper sowie der Maus- α -dsRNA-Antikörper verwendet. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop blau. DsRNA erscheint unter dem Mikroskop rot, das CavV-ExoN-Protein leuchtet grün auf. Abbildung 14 zeigt die Bilder der Mikroskopie. Es ist gut zu erkennen, dass in der Überlagerungsaufnahme der Negativkontrolle [mock] lediglich die Zellkerne blau leuchten und dass weder dsRNA noch ExoN anfärbbar sind. In den infizierten Zellen konnte hingegen sowohl dsRNA als auch ExoN spezifisch angefärbt werden. Auch hier ließen sich die Zellkerne blau anfärben. Mit zunehmender Vergrößerung zeigte sich außerdem, dass dsRNA und auch ExoN nicht im Zellkern angereichert waren, sondern im Zytoplasma.

Überlagerungsbilder zeigen, dass sich die rot angefärbte dsRNA und das grün angefärbte ExoN-Protein überlagern und ein gelbfarbiges Mischbild ergeben. Die Auswertung der Kolokalisation beider Substanzen mittels des Pearson-Korrelations-Koeffizienten ergab einen Wert von über 95 % (ausgewertet mittels Imaris 8.4 software package von Bitplane am Konfokalmikroskop TCS SP5 von Leica) (Barlow, Macleod, Noppen, Sanderson, & Guerin, 2010; Dunn, Kamocka, & McDonald, 2011).

4.4 Mögliche Kofaktoren von CavV-ExoN

Wie in früheren Experimenten für das SARS-CoV gezeigt werden konnte, erhöht die Anwesenheit von nsp10 die Aktivität von SARS-CoV-ExoN (siehe Einleitung). Deswegen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich ein ähnlicher aktivitätssteigernder Effekt durch andere CavV-Proteine, die in der vergleichbaren Region des Replikase-Gens (3'-terminaler Bereich des ORF1a) kodiert sind, erzielen lässt. Zur Annäherung an diese Fragestellung sollten daher die drei verschiedenen mesoniviralen Hauptproteaseprodukte („Hpp's“, Abb. 2) Hpp7 (pp1a2157-2287), Hpp8 (pp1a2288-2386) und Hpp9 (pp1a/pp1ab2387-2499/2504) einzeln, sowie als Fusionsproteine Hpp7-8 (pp1a2157-2386) und Hpp8-9 (pp1a/pp1ab2288-2499/2504) rekombinant hergestellt, exprimiert und

aufgereinigt werden. Diese Proteinkonstrukte sollten anschließend in RNA-Degradationsexperimenten zusammen mit der CavV-ExoN eingesetzt werden, um eine mögliche Interaktion oder mögliche Auswirkungen auf die ExoN-Aktivität untersuchen zu können.

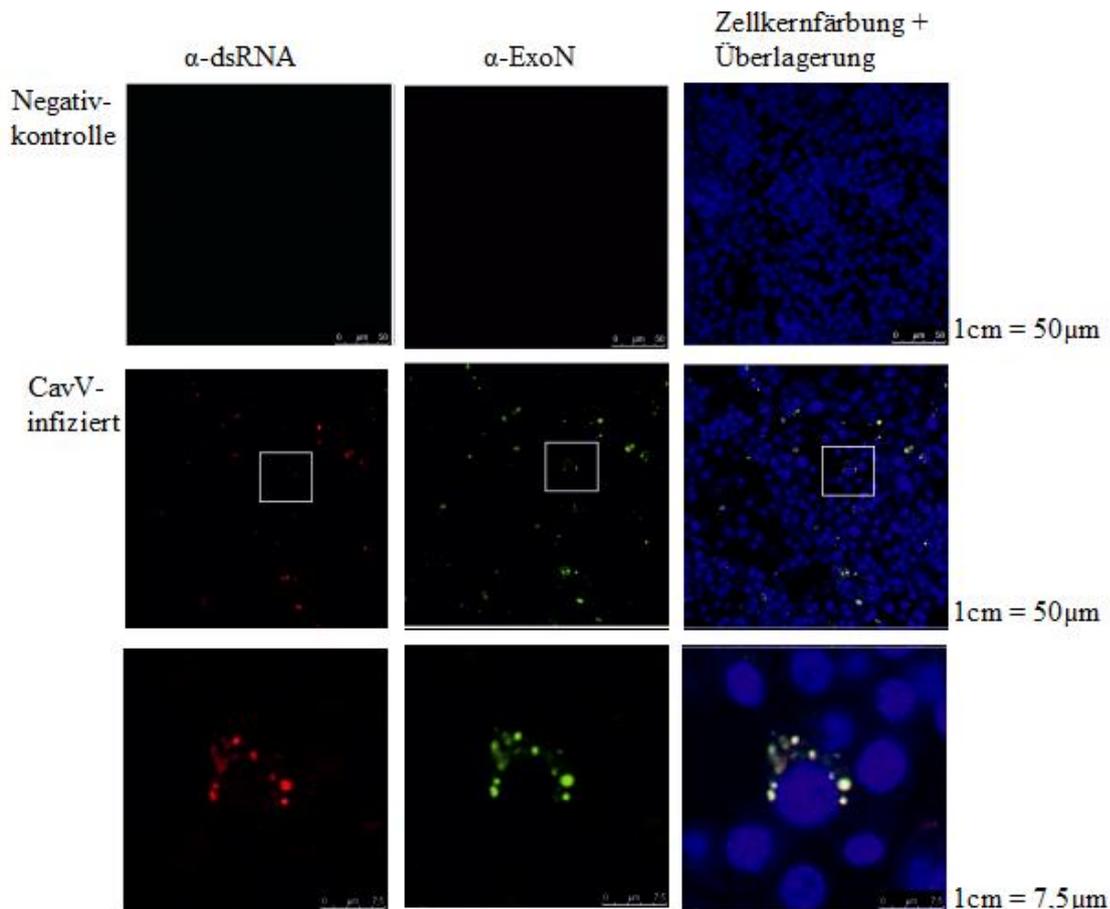


Abbildung 14: CavV-ExoN als integraler Bestandteil des Replikationskomplexes *in vivo*

Die Abbildung zeigt konfokalmikroskopische Bilder CavV-infizierter und nichtinfizierter C6/36-Zellen, die 48 Std. nach der Infektion in Methanol fixiert wurden. Als Primärantikörper wurden ein Maus- α -dsRNA-AK und ein polyklonaler Kaninchen- α -ExoN-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, als Sekundärantikörper dienten Ziege- α -Maus-IgG- bzw. Ziege- α -Kaninchen-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 (siehe Materialien). Der α -dsRNA-Antikörper vermittelte ein rotes Signal, der α -ExoN-Antikörper vermittelte ein grünes Signal. Die Zellkerne wurde mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Rechts wird die Überlagerung der drei Signale dargestellt. Die Überlagerung der rot gefärbten dsRNA und der grün gefärbten ExoN-Domäne zeigt eine gelbe Färbung. Rechts ist der zugehörige Maßstab angegeben.

4.4.1 Expression und Aufreinigung der cavallyviralen Hpp8- und Hpp9-Proteine

Zur Herstellung möglicher Kofaktoren der CavV-ExoN wurden geeignete Plasmidkonstrukte hergestellt (siehe Materialienkapitel). Die verschiedenen cavallyviralen Hpp's wurden, wie auch die bereits weiter oben beschriebenen rekombinant hergestellten Proteine, mit einem Ubiquitin am N-terminalem Ende, einem GSSG- „Linker“, sowie einem Heptahistidinaffinitätstag ausgestattet. Es wurden dann zunächst Testexpressionen der Hpp-Konstrukte durchgeführt, um geeignete Expressionsbedingungen für die einzelnen Konstrukte zu entwickeln. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm „C2523+pCGI“ verwendet, der zusätzlich mit einem weiteren Plasmid pASK[Ub-Hpp7/8/9-GSSG-His₇] transformiert wurde. Es war leider nicht möglich, Hpp7 zu exprimieren. Die durchgeführten SDS-PAGE zeigten wiederholt keine Bande eines Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht. Auch der Versuch, Hpp7 als Fusionsprotein Hpp6-7 oder Hpp7-8 zu exprimieren, scheiterte. Für die anderen Konstrukte wurden folgende Expressionsbedingungen erarbeitet: Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin für 6 Std. bei 18°C und 225 rpm. Abbildung 15 zeigt die beiden Testexpressionen von Hpp8 und Hpp9, einmal die jeweilige SDS-PAGE und darunter jeweils der zugehörige Westernblot unter Verwendung His-tag-spezifischer Antikörper.

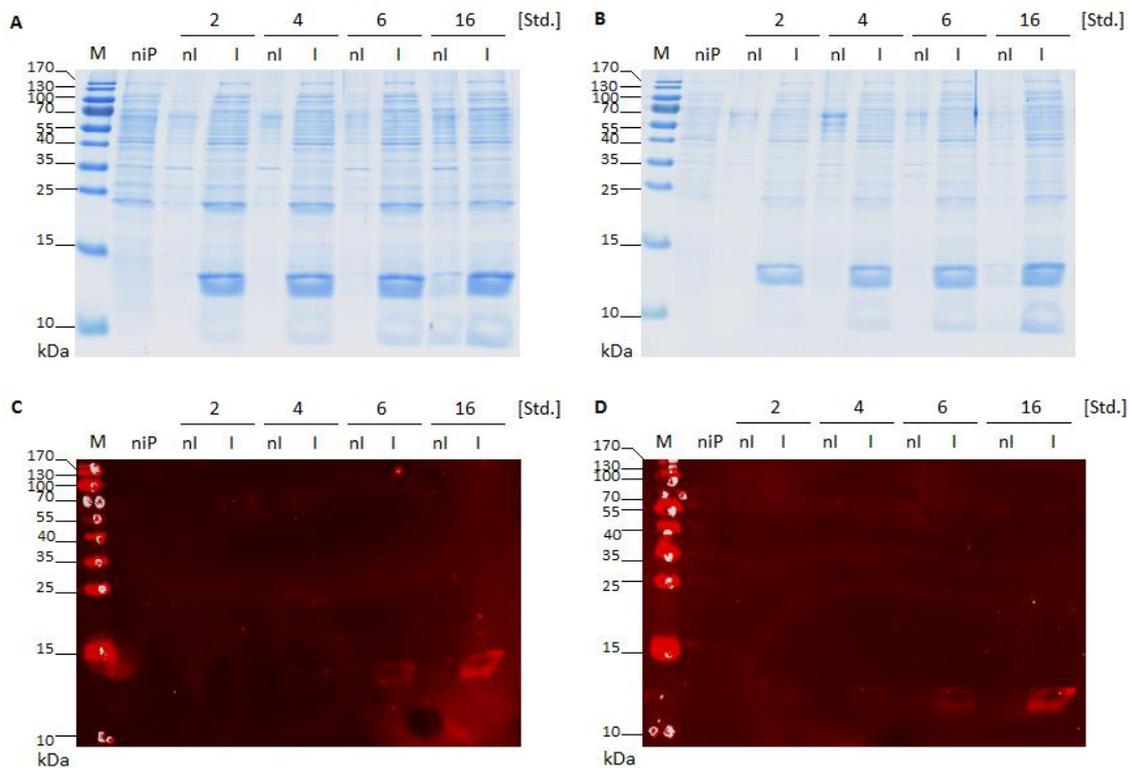


Abbildung 15: Testexpression von CavV-Hpp8 und Hpp9

A zeigt die Testexpression von Hpp8. **B** zeigt die Testexpression von Hpp9. **C** und **D** zeigen die zugehörige Immunfärbung im *Westernblot*. Die berechneten Proteingrößen für Hpp8 und Hpp9 betragen ~13 kDa und ~11 kDa. Die Proteine wurden jeweils in einem 16 % SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurde ein Maus- α -His-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet; als Sekundärantikörper diente ein Ziege- α -Maus-IgG-Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt wurde. Die Plasmide pASK[Ub-Hpp8 oder Hpp9-GSSG-His₇] wurden in C2523+pCGI-*E. coli*-Zellen transformiert und mittels Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin für 2, 4, 6 Std. oder über Nacht (16 Std.) bei 18°C und 225 rpm exprimiert.

Die exprimierten Proteine wurde analog zu ExoN-GSSG-His₇ aufgeschlossen und aufgereinigt. Anschließend wurde sowohl eine 16 % SDS-PAGE und eine Immunfärbung durchgeführt. Die errechneten Proteingrößen betragen ~13 kDa für Hpp8, ~11 kDa für Hpp9 und ~24 kDa für das Fusionsprotein Hpp8-9. Es zeigten sich in den induzierten Proben in beiden SDS-PAGE und den Immunfärbungen jeweils eine zusätzliche Bande, deren Migration im Gel den errechneten Molekulargewichten der jeweiligen CavV-Hpp-Proteinkonstrukte sehr gut entsprachen. Die Ausbeute sowie die Reinheit der aufgereinigten Proteine waren zufriedenstellend. Der Großteil der exprimierten Proteine befand sich in der löslichen Fraktion, nur ein kleiner Teil verblieb als unlösliches Material im Pellet.

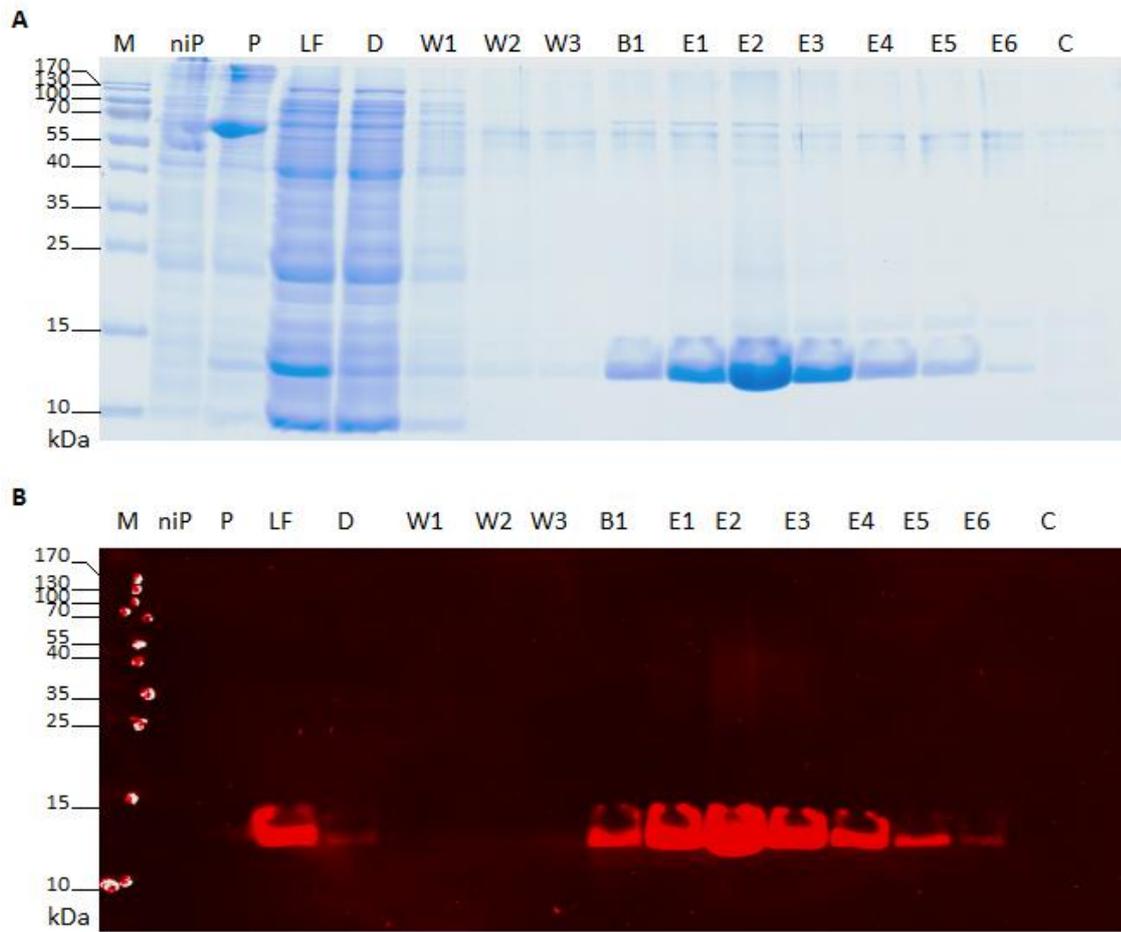


Abbildung 16: Proteinaufreinigung von CavV-Hpp8

Das Plasmid pASK[Ub-Hpp8-GSSG-His₇] wurde in den *E. coli*-Stamm C2523+pCGI transformiert, mittels Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin für 6 Std. bei 18°C exprimiert und mittels Talon-Affinitätschromatographie über einen ansteigenden Imidazol-Gradienten aufgereinigt. Das errechnete Proteinmolekulargewicht für dieses rekombinante Protein beträgt ~13 kDa.

(A) Proben der einzelnen Schritte des Reinigungsprozesses wurden in einem 16 % SDS-PAGE analysiert. Hierbei wurden jeweils 20 µl pro Lauftasche aufgetragen.

M – Marker; niP - nicht-induziertes Pellet; P - induziertes Pellet; LF – Ladefraktion; D – Durchfluss; W1-3 - Waschschrte mit His-Bindepuffer; B1 - Waschschrte mit Puffer B1; E1-6 - aufgefangene Eluate von je 1 ml pro Fraktion; C - Waschschrte mit Puffer C.

(B) Westernblot-Analyse der CavV-Hpp8-GSSG-His₇-Expression und -reinigung. Als Primärantikörper wurde ein Maus-α-His-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-α-Maus-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000.

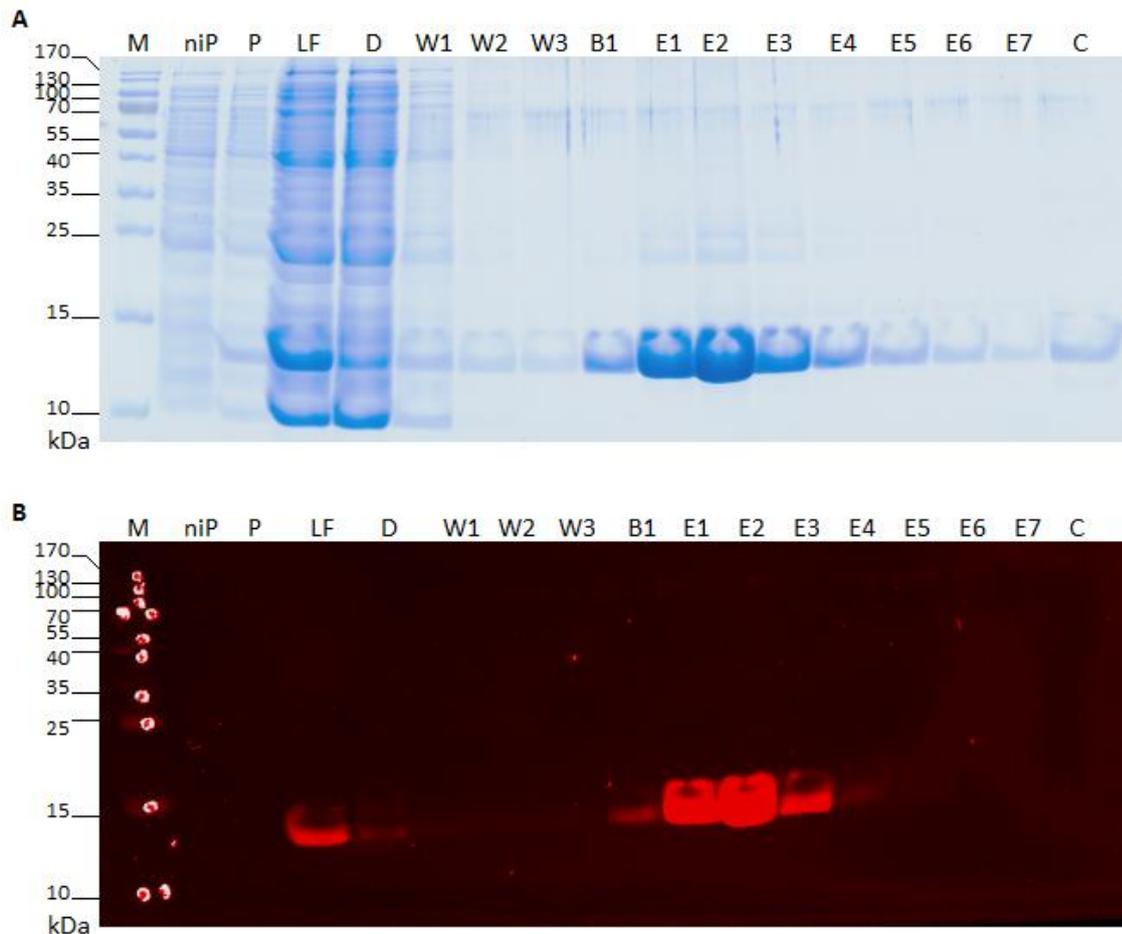


Abbildung 17: Proteinaufreinigung von CavV-Hpp9

Das Plasmid pASK[Ub-Hpp9-GSSG-His₇] wurde in den *E. coli*-Stamm C2523+pCGI transformiert, mittels Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin für 6 Std. bei 18°C exprimiert und mittels Talon-Affinitätschromatographie über einen ansteigenden Imidazol-Gradienten aufgereinigt. Das errechnete Molekulargewicht des rekombinanten Proteins beträgt 11 kDa.

(A) Es wurde eine 16 % SDS-PAGE zur Analyse einzelner Proben des Reinigungsprozesses durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 20 µl pro Lauftasche aufgetragen.

M – Marker; niP - nicht-induziertes Pellet; P - induziertes Pellet; LF – Ladefraktion; D – Durchfluss; W1-3 - Waschschrte mit His-Bindepuffer; B1 - Waschschrte mit Puffer B1; E1-7 - aufgefangene Eluate von je 1 ml pro Fraktion; C - Waschschrte mit Puffer C.

(B) Zugehöriger Westernblot zum immunologischen Nachweis des rekombinanten Proteins CavV-Hpp9-GSSG-His₇. Als Primärantikörper wurde ein Maus- α -His-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet, als Sekundärantikörper diente ein Ziege- α -Maus-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000.

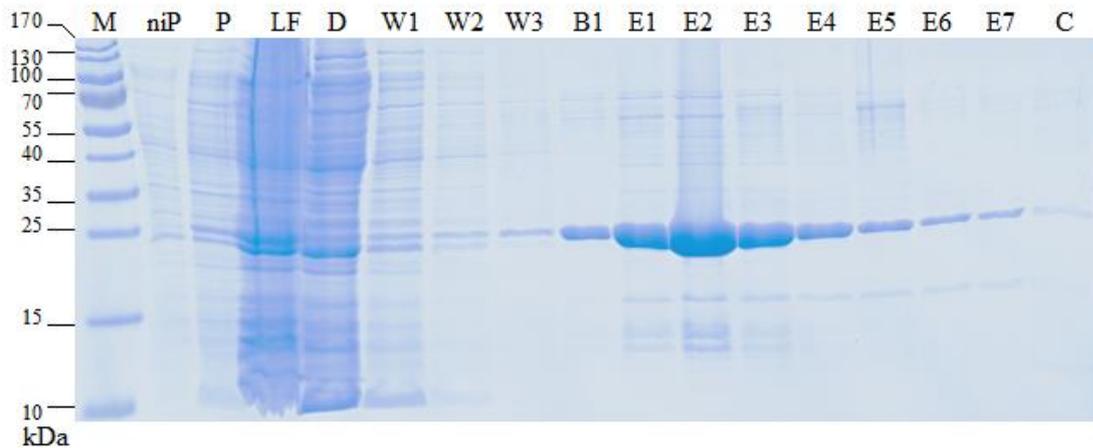


Abbildung 18: Proteinaufreinigung von CavV-Hpp8-9

Das Plasmid pASK[Ub-Hpp8-9-GSSG-His₇] wurde in den *E. coli*-Stamm C2523+pCGI transformiert, mittels Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin für 6 Std. bei 18°C exprimiert und mittels Talon-Affinitätschromatographie über einen ansteigenden Imidazol-Gradienten aufgereinigt. Das errechnete Molekulargewicht für das rekombinante Protein beträgt 24 kDa. Proben der einzelnen Schritte des Reinigungsprozesses wurden in einem 16 % SDS-PAGE analysiert. Hierbei wurden jeweils 20 µl pro Laufasche aufgetragen. M – Marker; niP - nicht-induziertes Pellet; P - induziertes Pellet; LF – Ladefraktion; D – Durchfluss; W1-3 - Waschschrte mit His-Bindepuffer; B1 - Waschschrte mit Puffer B1; E1-7 - aufgefangene Eluate von je 1 ml pro Fraktion; C - Waschschrte mit Puffer C.

4.4.2 Herstellung von Hpp8-GSSG-His₇- und Hpp9-GSSG-His₇-spezifischen polyklonalen Antikörpern

Im Laufe dieser Arbeit sollten Antikörper gegen weitere ORF1a-kodierte Proteine hergestellt werden, um deren Expression und mögliche Funktion (auch als mögliche Kofaktoren der ExoN) in zukünftigen Studien untersuchen zu können. Da es nicht möglich war das cavallyvirale Hpp7 zu exprimieren, konnten nur die erhaltenen Hpp8- und Hpp9-Präparationen zur Immunisierung eingesetzt werden. Die aufgereinigten Hpp8 und Hpp9 wurden konzentriert und an die Firma Eurogentec geschickt, die mit der Immunisierung von Kaninchen mit diesen Proteinen zur Herstellung polyklonaler Antikörper beauftragt wurde.

In den durchgeführten Immunfärbungen zeigte sich erfreulicherweise ein nicht-reaktives Präimmunserum sowie eine spezifische Anfärbung der rekombinanten Proteine (mit abnehmender Signalstärke bei hohen Verdünnungen). Es wurden 200 und 100 ng Protein im Vergleich pro einzelne Verdünnung getestet. Auch hier wird die 200 ng Proteinbande deutlich stärker markiert. Rechts anstehend ist jeweils das entsprechende SDS-PAGE Bild.

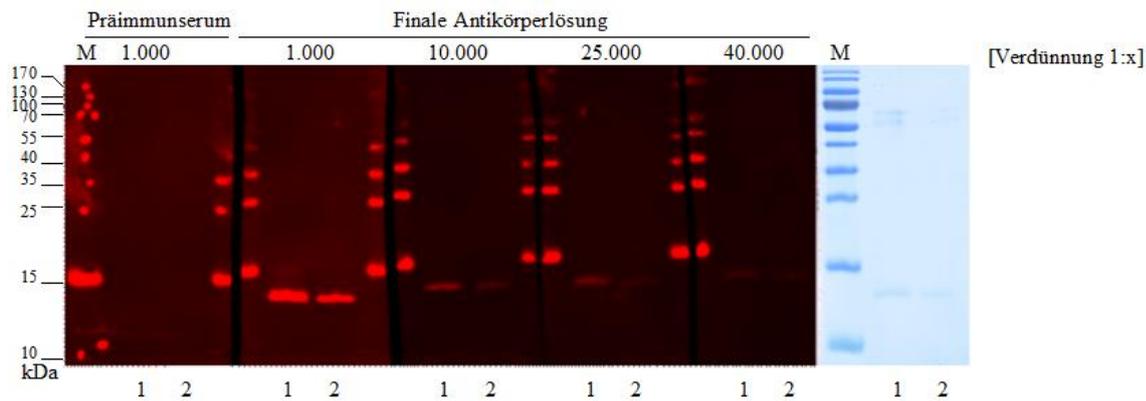


Abbildung 19: CavV-Hpp8-Antikörpertestung

Dargestellt ist die Immunfärbung von CavV Hpp8-GSSG-His₇ mittels *Westernblot* durch Kaninchen- α -Hpp8-GSSG-His₇-Antikörper. Die Proteine wurden in einem 16 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Primärantikörper wurde der in dieser Arbeit hergestellte Kaninchen- α -Hpp8-GSSG-His₇-Antikörper in verschiedenen Verdünnungen verwendet, als Sekundärantikörper ein Ziege- α -Kaninchen-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000. Die Verdünnungen des Primärantikörpers waren wie folgt: Präimmunserum 1:1.000, finales Serum in Verdünnungen von 1:1.000, 1:10.000, 1:25.000 und 1:40.000 wie oben angegeben. In den Spuren 1 wurden 200 ng, in den Spuren 2 100 ng Protein eingesetzt. M – Marker.

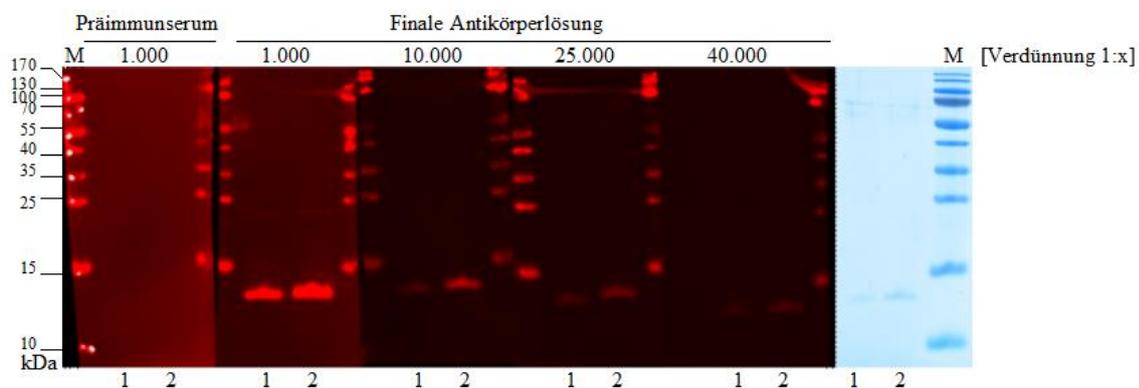


Abbildung 20: CavV-Hpp9-Antikörpertestung

Dargestellt ist die immunspezifische Färbung von CavV Hpp9-GSSG-His₇ nach Auftrennung der Proteine in einem 16% SDS-Polyacrylamid-Gel und *Westernblot* unter Verwendung des α -Hpp9-GSSG-His₇-Antikörpers. Als Primärantikörper wurde der in dieser Arbeit hergestellte Kaninchen- α -Hpp9-His₇-Antikörper in verschiedenen Verdünnungen verwendet, als Sekundärantikörper diente ein Ziege- α -Kaninchen-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000. Die Verdünnungen des Primärantikörpers waren wie folgt: Präimmunserum 1:1.000, finales Immunserum in Verdünnungen von 1:1.000, 1:10.000, 1:25.000 und 1:40.000. In den Spuren 1 wurden 100 ng, in den Spuren 2 200 ng Protein aufgetragen. M – Marker.

4.5 ExoN-*in-vitro*-Aktivitätstests (RNA-*in-vitro*-Degradationsassays)

Die von SARS-CoV kodierte ExoN-Domäne des nsp14 wurde schon mehrfach in der Literatur als Exoribonuklease beschrieben, die ihre Aktivität in 3' → 5'-Richtung ausführt (Bouvet et al., 2012; Chen et al., 2007; Minskaia et al., 2006). Sie soll beteiligt sein an der hohen Replikationsgenauigkeit, indem sie fehlgepaarte Nukleotide erkennt und entfernt, wobei ihre Funktion kein Nukleotid präferiert, sondern lediglich an die Voraussetzung der Fehlpaarung am 3'-Ende gekoppelt ist (Bouvet et al., 2012; Ma et al., 2015). Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit sollte der Vergleich der mesoniviralen ExoN gegenüber der bereits gut charakterisierten ExoN der Coronaviren sein, um mögliche Gemeinsamkeiten, aber auch mögliche Unterschiede hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften dieser Enzyme zu identifizieren.

Für die biochemische Charakterisierung der mesoniviralen ExoN wurden Aktivitätstests durchgeführt, bei denen ausgewählte RNA-Testsubstrate eingesetzt wurden, deren nukleolytische Spaltung durch Auftrennung der Reaktionsprodukte in denaturierenden Polyacrylamidgelen und Autoradiographie analysiert wurde. Zur Herstellung der Substrate wurden synthetische einzelsträngige (*single-stranded*, ss) RNAs radioaktiv markiert und gegebenenfalls zu dsRNA hybridisiert, welche als Substrate für die ExoN-Aktivitätstests genutzt wurden. Ein Reaktionsansatz des Aktivitätstests wurde wie in 3.2.8 beschrieben zusammengesetzt und bei 37°C für 1 Std. inkubiert. Wenn nicht anders angegeben erhielten die Reaktionsansätze jeweils 50 nM RNA. Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12 % Polyacrylamid-Gel (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1, 7 M Harnstoff) aufgetrennt, das durch 1x TBE gepuffert wurde. Der Reaktionspuffer bestand aus 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 50 mM NaCl und 1 mM DTT und wurde ergänzt durch 5 mM MgCl₂, da bekannt ist, dass die verwandte SARS-CoV-ExoN Metallionen-abhängig ist (Chen et al., 2007). Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

4.5.1 Einfluss der verschiedenen Affinitätstags

Zunächst wurde untersucht, ob die verschiedenen Affinitätstags der rekombinant hergestellten ExoN-Proteine deren Enzymaktivitäten in unterschiedlicher Weise beeinflussen. In Vorexperimenten zeigten sich bereits erste Hinweise auf eine höhere Aktivität des ExoN-GSSG-His₇- gegenüber der Aktivität des ExoN-6aaOMT-Strep-Proteins. ExoN-6aaOMT-Strep wurde in den Spuren 3 und 4 in einer Konzentration von je 0,1 µM verwendet, wohingegen ExoN-GSSG-His₇ in den Spuren 5-10 in diesem Experiment in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 µM verwendet wurde. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Substrate: zum einen eine ssRNA und zum anderen eine dsRNA, welche eine terminale Fehlpaarung aufwies. Diese dsRNA mit terminaler Fehlpaarung zeigte sich bereits in früheren Experimenten mit der SARS-CoV-ExoN als gut verwertbares Substrat. In den Spuren 1 und 2 sind zusätzlich zwei Negativkontrollen aufgetragen: Sowohl das dsRNA- als auch das ssRNA-Substrat, zu denen keine ExoN zugegeben wurde. Im Vergleich der beiden ExoN-Konstrukte zeigte sich eine deutlich höhere Aktivität des ExoN-GSSG-His₇-Konstrukts. Das ssRNA-Substrat zeigte sich in der Negativkontrolle (also ohne Proteinzugabe) sowie in den einzelnen Experimenten mit Zugabe des Enzyms ohne nennenswerte Degradation. Das dsRNA-Substrat wurde im Vergleich zur Negativkontrolle nahezu komplett in kleinere Produkte gespalten. Hier war der Unterschied der beiden verschiedenen ExoN-Konstrukte klar erkennbar: bereits eine Konzentration von 0,1 µM von ExoN-GSSG-His₇ führte zu einer nahezu vollständigen Degradation der Substrat-dsRNA, während die gleiche Konzentration von ExoN-6aaOMT-Strep nur einen geringen Teil des eingesetzten Substrats in diesem Zeitraum gespalten hatte.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde entschieden das ExoN-GSSG-His₇-Konstrukt für alle nachfolgenden Experimente zu verwenden.

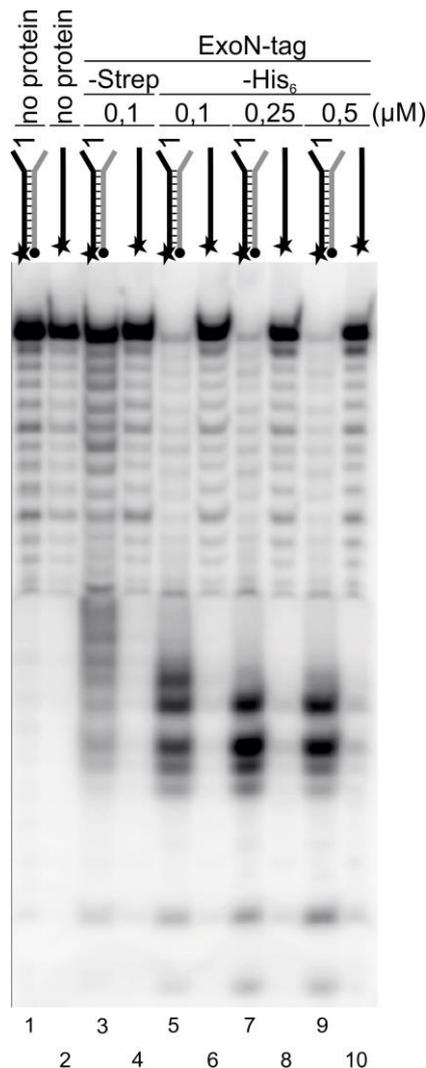


Abbildung 21: Einfluss der Affinitätstags auf die *In-vitro*-Nukleaseaktivität von CavV-ExoN gegenüber verschiedenen RNA-Substraten

Es erfolgte ein Aktivitätstest mit ExoN-His₇ und -Strep im Vergleich. Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) worden war und dessen Leit- bzw. Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) war. Der Gegenstrang war am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) (IDR1 - JZR8 Bio, s. Materialien). Außerdem wurde eine radioaktiv markierte (Stern) ssRNA verwendet (IDR1, s. Materialien). Oberhalb der einzelnen Spuren ist die Struktur des jeweiligen Substrats schematisch dargestellt. Die Produkte wurden in einem 12 % Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und anschließend einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde mit verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt: ExoN-GSSG-His₇ wurde in aufsteigender Konzentration von 0,1, 0,25 und 0,5 μM eingesetzt, ExoN-6aaOMT-Strep lediglich in der Konzentration 0,1 μM. In den einzelnen Reaktionsansätzen befanden sich zusätzlich 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 50 mM NaCl, 1 mM DTT und 5 mM Mg²⁺. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von ExoN und erfolgte für 1 Std. bei 37°C.

„no protein“ - Reaktionsansatz ohne Zugabe von Protein (dieser diene als Negativkontrolle).

4.5.2 CavV-ExoN-Nukleaseaktivität gegenüber verschiedenen Substraten

Um erste Einblicke in mögliche Substratpräferenzen der CavV-ExoN zu erhalten, wurde als nächstes ein umfangreicher Satz von synthetischen RNA-Testsubstraten eingesetzt, die im Labor vorhanden waren. In diesem Experiment wurde erstmals ein RNA-Marker verwendet, um die Größe der Reaktionsprodukte besser abschätzen zu können. Dieser bestand aus einem Mix dreier radioaktiv markierter ssRNAs von 22, 10 und 8 Nukleotiden Länge. Folgende Substrattypen wurden getestet: vollständig gepaarte dsRNA (Spur 1-5), dsRNA mit einer (Spur 6-10), zwei (Spur 11-15) oder drei (Spur 16-20) terminalen ungepaarten Nukleotiden sowie dsRNA mit einer (Spur 21-25), zwei (Spur 26-28) oder drei (Spur 29-31) internen ungepaarten Nukleotiden. Ein Überblick über die

verschiedenen Substrate geben die Tabellen 13 und 14. Getestet wurde in folgender Reihenfolge: (1.) Negativkontrolle ohne Zugabe von ExoN, (2.) ein doppelt biotinyliertes Substrat (dieses weist kein freies 3'-Ende auf, was für die Exonukleaseaktivität essentiell ist, wie in diversen vorherigen Arbeiten mit der SARS-CoV-ExoN gezeigt werden konnte), (2a) mit Zugabe des CavV-ExoN-Wildtyp-Konstrukts und (2b) mit Zugabe einer Proteinvariante von ExoN, bei dem ein putativer katalytischer Aspartat-Rest durch Alanin (D4362A) ersetzt war. Außerdem wurden eine Reihe von partiell doppelsträngigen RNA-Substraten getestet, die mit der (4.) Wildtyp-CavV-ExoN oder (5.) einer katalytisch inaktiven ExoN-Proteinvariante (D4362A) inkubiert wurden. Für die dsRNA-Substrate mit zwei und drei internen Fehlpaarungen lag keine doppelt biotinylierte Form vor. Die in diesem Experiment verwendete Proteinkonzentration für die Wildtyp-ExoN sowie die D4362A-ExoN-Variante betrug 0,5 μ M.

In der denaturierenden 12 % Polyacrylamid-7M-Harnstoff-PAGE (Abb. 22) zeigt sich, dass die Substrate weder in der Pufferkontrolle noch bei Zugabe der ExoN-D4362A-Proteinvariante umgesetzt werden. Diese beiden Reaktionsansätze können daher als Negativkontrolle herangezogen werden und zeigen, dass die beobachtete Nukleaseaktivität tatsächlich von der CavV-ExoN, nicht jedoch einer möglichen Verunreinigung (z.B. einer Nuklease aus *E. coli*) vermittelt wurde. Ein deutlicher Substratumsatz zeigte sich in den Reaktionsansätzen, bei denen Wildtyp-ExoN in Verbindung mit (1) dsRNA (Spur 4) oder (2) dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung (Spur 9) oder dsRNA mit (3) einer (Spur 24), (4) zwei (Spur 27) oder (5) drei (Spur 30) internen Fehlpaarungen verwendet wurden. Die Reaktionsansätze, bei denen ein doppelt 3'-biotinyliertes Substrat eingesetzt wurde, zeigten nur einen sehr geringen Substratumsatz (Spuren 2, 7, 12, 17, 22). Ein etwas höherer, wenngleich immer noch geringer Umsatz des Substrates war in den Ansätzen mit dem Wildtyp-Enzym in Kombination mit dsRNA mit zwei (Spur 14) und drei (Spur 19) terminalen ungepaarten Nukleotiden zu sehen. Ein Großteil des Substrates wurde jedoch in diesen Fällen nicht umgesetzt. In den restlichen Reaktionsansätzen konnte keine Degradation des eingesetzten Substrats beobachtet werden.

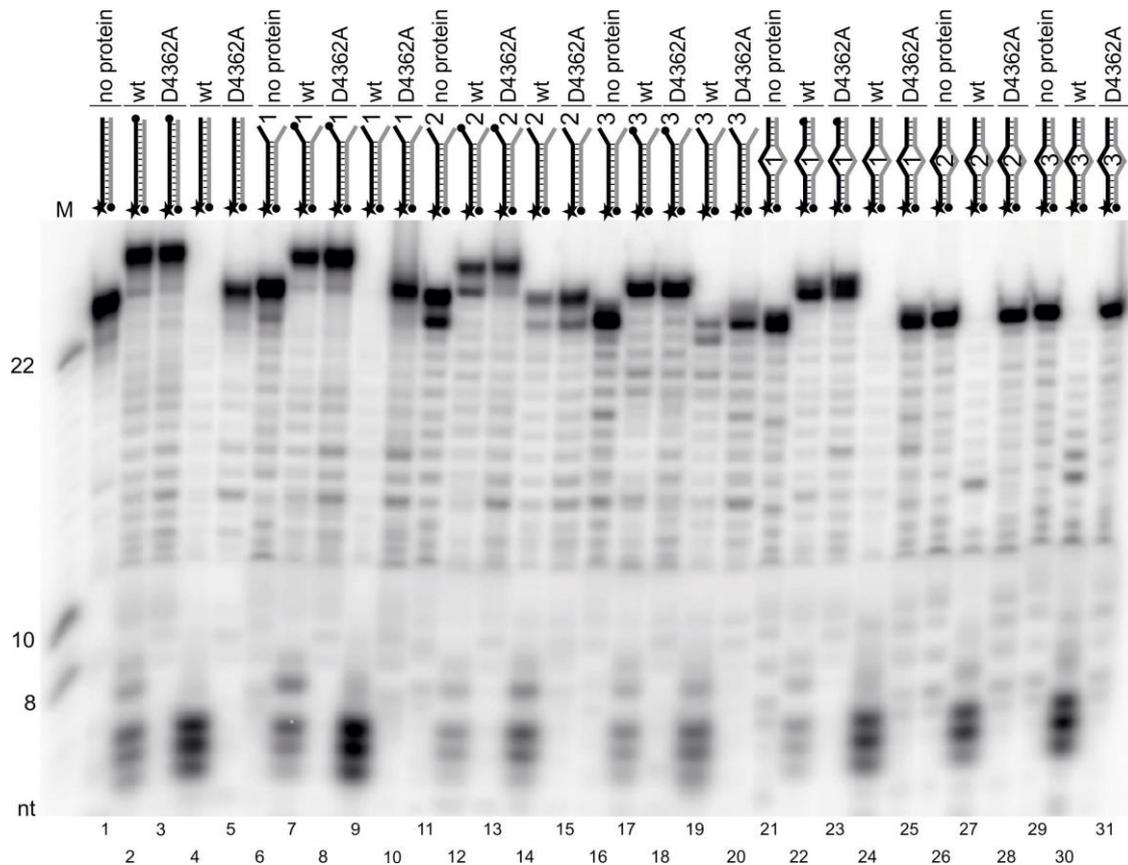


Abbildung 22: *In-vitro*-Aktivität von CavV-ExoN auf unterschiedliche dsRNA-Substrate

Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 0,5 μM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 50 mM NaCl, 1 mM DTT und 5 mM Mg^{2+} im jeweiligen Reaktionsansatz. Oberhalb der jeweiligen Spur ist das jeweilige Substrat schematisch abgebildet, dabei zeigt der Stern die radioaktive Markierung am 5'-Ende, der Kreis eine 3'-Biotinylierung und die Zahlen die jeweilige Anzahl an entweder terminalen oder internen ungepaarten Nucleotiden (detaillierte Übersicht der Substrate s. Materialien). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von ExoN und inkubiert für 1 Std. bei 37°C. M – 5'- ^{32}P -markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nucleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle); wt - Zugabe des Wildtyp-ExoN; D4362A - Zugabe der ExoN_D4362A-Variante

4.5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die mesonivirale ExoN

Da diese ersten Versuche unter Bedingungen durchgeführt worden waren, die sich in Vorexperimenten als geeignet für die SARS-CoV-ExoN erwiesen hatten, wurde nun der Versuch unternommen, die Reaktionsbedingungen für die weitere Charakterisierung der CavV-ExoN zu optimieren, um weitere biochemische Eigenschaften dieses Proteins besser untersuchen zu können. Als dsRNA-Substrat wurde für diese Experimente, wenn nicht anders angegeben, dsRNA mit einer einfachen terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert war. Es sollten im Folgenden Einflüsse der Protein- und NaCl-Konzentration auf die Nukleaseaktivität der CavV-ExoN, deren spezifische Metallionenabhängigkeit und ggf. der optimale pH-Wert und die optimale Reaktionstemperatur bestimmt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Reaktionszeit für einen vollständigen Substratumsatz unter definierten Bedingungen erforderlich ist.

4.5.3.1 Einfluss der Protein-Konzentration auf die mesonivirale ExoN-Aktivität

Zuerst wurde die niedrigste Proteinkonzentration gesucht, die noch einen nahezu kompletten Substratumsatz ermöglicht, denn je geringer die Proteinkonzentration ist desto spezifischer arbeiten die meisten Enzyme. Dafür wurde ein Experiment durchgeführt (Abb. 23), in dem verschiedene Proteinkonzentrationen von CavV-ExoN getestet wurden: 1 μ M, 0,5 μ M, 0,1 μ M, 50 nM und 10 nM. Auf das Gel zur Analyse der Reaktionsprodukte wurden alternierend die Reaktionsansätze mit Wildtyp-ExoN (Spuren 3, 5, 7, 9, 11) bzw. mit der katalytisch inaktiven ExoN-H4599A/D4604A-Variante (Spur 4, 6, 8, 10, 12) aufgetragen. Links anstehend ist der Marker aufgetragen, sowie zwei Negativkontrollen: eine Pufferkontrolle ohne Zugabe von Protein (Spur 1) sowie ein Reaktionsansatz mit 1 μ M Wildtyp-ExoN und einem dsRNA-Substrat, dessen beide Stränge 3'-biotinyliert waren (Spur 2). In den Reaktionsansätzen mit Proteinkonzentrationen von 1 μ M (Spur 3) und 0,5 μ M (Spur 5) erfolgte ein vollständiger, in den Konzentrationen von 0,1 μ M (Spur 7) und 50 nM (Spur 9) ein fast vollständiger und in der Konzentration 10 nM (Spur 11) lediglich ein minimaler Substratumsatz. Die Verwendung ExoN_H4599A_D4604A-Variante führte in keinem einzigen Reaktionsansatz zu einem erkennbaren Substratumsatz.

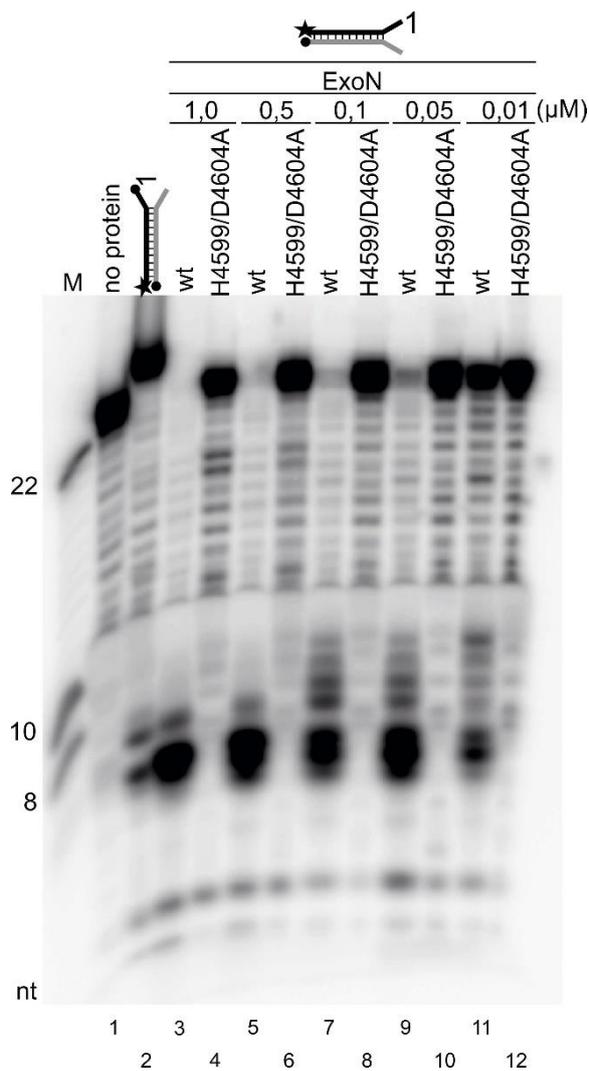


Abbildung 23: Einfluss der Proteinkonzentration auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt mit absteigenden Proteinkonzentrationen (von 1 μM bis 10 nM) in Reaktionspuffer, der aus 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 50 mM NaCl, 1 mM DTT und 5 mM Mg^{2+} bestand. Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) war (IDR1 - JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. M – 5'- ^{32}P -markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle). wt - Zugabe von Wildtyp-ExoN; H4599A_D4604A - Zugabe der Proteinvariante ExoN_H4599A_D4604A.

Auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse, insbesondere dem immer noch hohen Substratumsatz bei Verwendung von 50 nM Enzym, wurde entschieden, die nächsten Experimente mit einer Proteinkonzentration von 50 nM CavV-ExoN durchzuführen.

4.5.3.2 Einfluss der NaCl-Konzentration auf die mesonivirale ExoN-Aktivität

Nach der getroffenen Festlegung auf Verwendung einer Proteinkonzentration von 50 nM, wurde untersucht, welchen Einfluss die NaCl-Konzentration auf die Aktivität der CavV-ExoN hat.

Dazu wurde ein Experiment durchgeführt, in dem Reaktionsansätze mit ansteigender NaCl-Konzentration von 15 mM bis 150 mM untersucht wurden. Das Experiment (Abb. 24) ergab keinen erkennbaren Unterschied zwischen den einzelnen Reaktionsansätzen hinsichtlich des Substratumsatzes. In allen Reaktionen war das Substrat nahezu komplett umgesetzt.

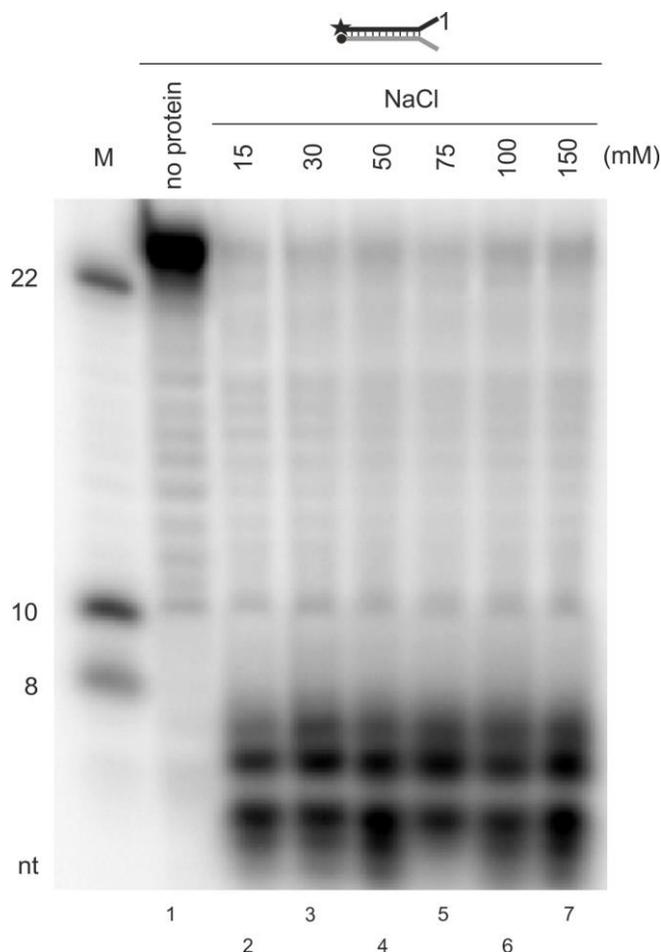


Abbildung 24: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde in einem Ansatz mit 50 nM Proteinkonzentration durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem unterschiedliche NaCl-Konzentrationen (aufsteigend von 15 mM bis 150 mM), 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 1 mM DTT und 5 mM Mg²⁺. Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) war (IDR1 – JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde

durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nucleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle).

Da die ExoN-Aktivität in einem breiten Bereich niedriger bis moderater Salzkonzentrationen vergleichbar hoch war und die anzuwendende Salzkonzentration für dieses RNA-bindende und -prozessierende Enzym möglichst gering gehalten werden sollte, wurde entschieden, die niedrigste getestete NaCl-Konzentration (15 mM) für die weiteren Experimente zu verwenden.

4.5.3.3 Einfluss divalenter Metallionen auf die mesonivirale ExoN-Aktivität

In vorherigen Arbeiten mit SARS-CoV-ExoN wurde beschrieben, dass das Enzym bestimmte divalente Metallionen für seine Aktivität benötigt (Chen et al., 2007). Deswegen wurde in nachfolgendem Experiment untersucht, welchen Einfluss divalente Metallionen in der Reaktion mit der CavV-ExoN ausüben (Abb. 25). Dazu wurden folgende Metallionen in der Konzentration von 1 mM verwendet: Magnesium (Spur 3), Mangan (Spur 4), Calcium (Spur 5), Kobalt (Spur 6) und Zink (Spur 7). Ebenso wurde ein Reaktionsansatz vorbereitet, in dem sich kein zweiwertiges Metallion befand (Spur 2).

Die nicht nachgewiesene Degradation der RNA im Reaktionsansatz, der keine divalenten Metallionen enthielt, unterschied sich nicht von der in der Negativkontrolle ohne Zugabe von ExoN, so dass davon auszugehen ist, dass divalente Metallionen als Kofaktor für die Enzymaktivität notwendig sind. In Anwesenheit von Magnesium und Mangan zeigte sich hingegen ein vollständiger Substratumsatz (Spur 3 und 4). Beide Ionen können also als Kofaktor verwendet werden. Calcium, Kobalt und Zink unterstützten hingegen die ExoN-Aktivität nur minimal mit geringfügigen Unterschieden hinsichtlich des Substratumsatzes und der Bildung von Spaltprodukten (Spuren 5, 6 und 7), wobei die folgende Reihenfolge der Effektivität bezüglich des Substratumsatzes besteht: Zink > Kobalt > Calcium.

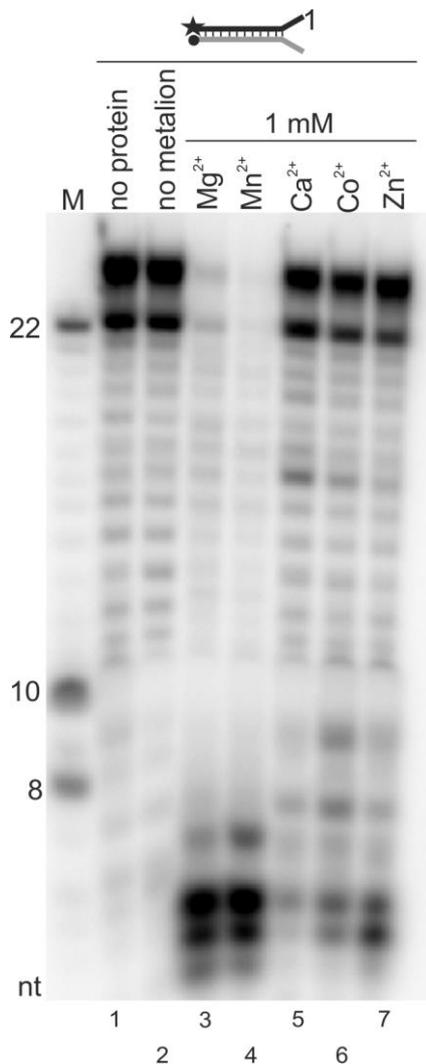


Abbildung 25: Einfluss von divalenten Metallionen auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid 7 M Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Die Aktivitätstest wurden durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Wildtyp-ExoN, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und einem der angegebenen Metallionen (Mg^{2+} - Magnesium; Mn^{2+} - Mangan; Ca^{2+} - Calcium; Co^{2+} - Kobalt oder Zn^{2+} - Zink) in einer Konzentrationen von jeweils 1 mM.

Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) war (IDR1 – JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. M – 5'- ^{32}P -markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle); „no metalion“ – Reaktionsansatz ohne Metallion.

4.5.3.4 Vergleich von Magnesium- und Manganionen auf die ExoN-Aktivität

Da im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, dass sowohl Magnesium als auch Mangan die Voraussetzungen erfüllen, um einen kompletten Substratumsatz unter den gewählten Bedingungen zu ermöglichen, wurden beide in verschiedenen Konzentrationen von 1 mM bis 20 mM im Vergleich gegenübergestellt (Abb. 26). Magnesium (Spuren 3-7) zeigte in allen Konzentrationen einen nahezu kompletten Substratumsatz, der bei 10 und 20 mM Magnesium (Spur 6 und 7) etwas abfällt. Mangan (Spuren 9-13) hingegen setzte das Substrat lediglich in einer Konzentration von 1 und 2 mM (Spur 9 und 10) komplett um. Bei höherer Konzentration blieb der Großteil der Substrate unverändert, die Enzymaktivität scheint inhibiert zu werden (Spuren 11, 12 und 13).

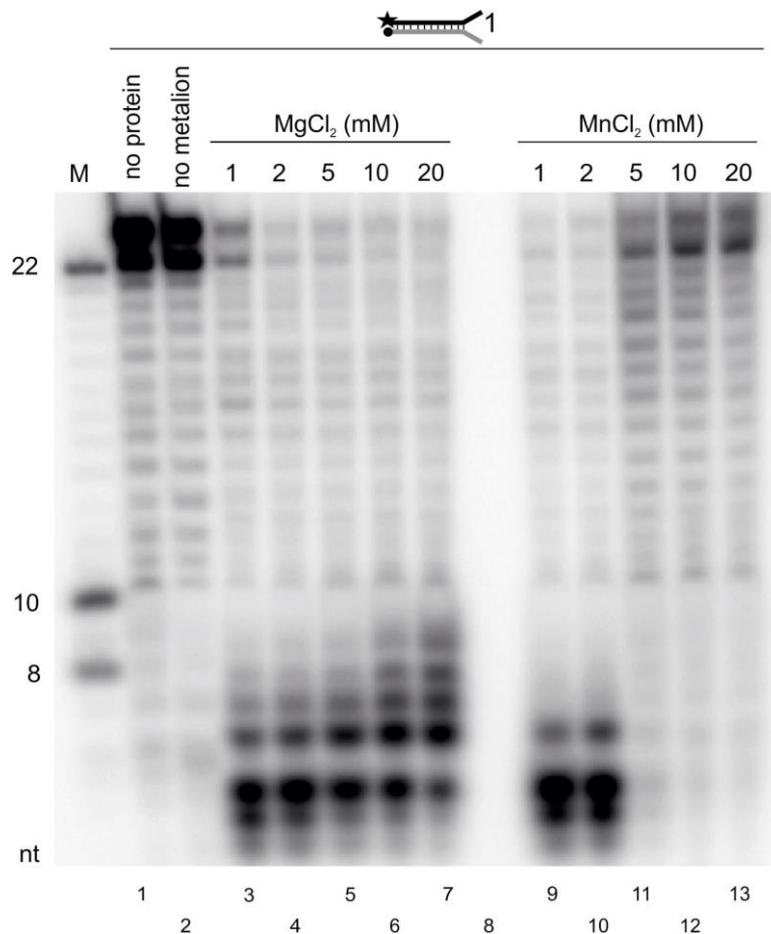


Abbildung 26: Vergleich von Magnesium und Mangan auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden separiert in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel- aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und MgCl₂ oder MnCl₂ in der angegebenen Konzentration (jeweils ansteigend von 1 mM bis 20 mM) im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrat wurde dsRNA mit terminaler Fehlpaarung verwendet, dessen

Folgestrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) worden ist und dessen Leitstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) worden ist (IDR1- JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von ExoN und inkubiert für 1 Std. bei 37°C.

M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser dient als Negativkontrolle); „no metalion“ - Reaktionsansatz ohne Metallion.

4.5.3.5 Einfluss des pH-Wertes auf die mesonvirale ExoN-Aktivität

Um optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, wurde ebenfalls der pH-Wert untersucht (Abb. 27). Dazu wurden Reaktionsansätze vorbereitet, die mit Hilfe von Zugabe von Säure oder Lauge sowie unter Zuhilfenahme eines pH-Meters einen unterschiedlichen pH-Wert zwischen 6,5 und 8,5 aufwiesen. In der durchgeführten denaturierenden PAGE zeigte sich, dass der Substratumsatz in allen pH-Werten diesen Bereiches gut vollzogen wird. Tendenziell erfolgt dieser jedoch vollständiger im unteren Bereich dieser Spanne und nimmt leicht ab, je alkalischer das Milieu ist. Es verbleiben größere Spaltprodukte in Reaktionsansätzen mit einem pH-Wert von 8,0 und 8,5 (Spur 5 und 6).



Abbildung 27: Einfluss des pH-Wertes auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH variierend], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺ im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) war (IDR1 – JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze unterschieden sich in Bezug auf deren pH-Wert (aufsteigend von pH 6,5 bis pH 8,5). „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse wurde entschieden, den pH-Wert bei 7,5 beizubehalten, da dieser Wert dem physiologischen am nächsten kommt und es lediglich marginale Unterschiede gibt.

4.5.3.6 Einfluss der Temperatur auf die spezifische ExoN-Aktivität

Die Temperatur könnte die Reaktion und Proteinstabilität als zusätzliche Größe ebenfalls beeinflussen und sollte daher im folgenden Experiment untersucht werden (Abb. 28). Dazu wurden gleiche Reaktionsansätze vorbereitet, welche bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden: 4°C, 21°C, 30°C, 37°C und 42°C. Es zeigte sich, dass das Substrat bei niedrigeren Temperaturen von 21°C (Zimmertemperatur) und 30°C am besten umgesetzt wird (Spur 3 und 4), tendenziell schlechter bei 37°C (Spur 5) und noch schlechter bei 42°C (Spur 6). Die Reaktion auf Eis bei 4°C (Spur 2) erfolgte ebenfalls nicht komplett, es verblieben inkomplett umgesetzte Reaktionszwischenprodukte mit Längen von 10 und 8 Nukleotiden.

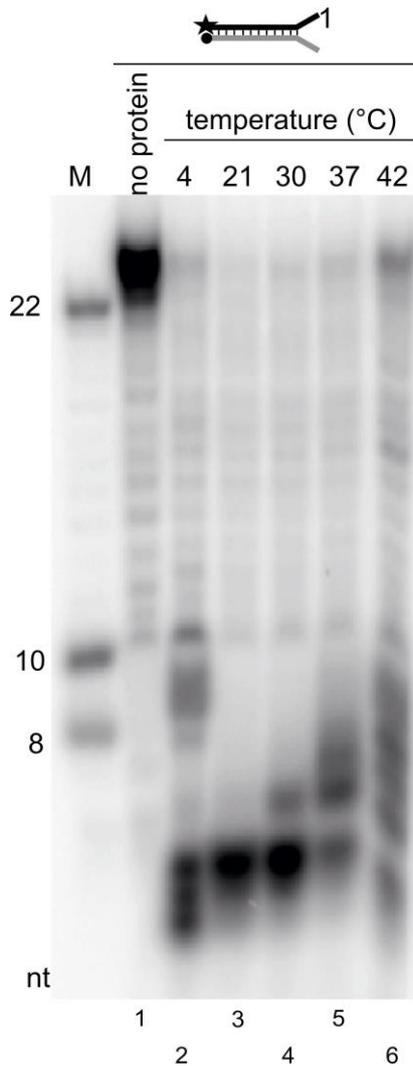


Abbildung 28: Einfluss der Temperatur auf die *In-vitro*-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺ im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrat wurde dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung verwendet, dessen Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und dessen Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis) war (IDR1 – JZR8 Bio, s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nucleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle).

Auf Grund dieses Experimentes wurde festgelegt, die nachfolgenden Experimente bei 30°C durchzuführen.

4.5.3.7 Substratumsatz der mesoniviralen ExoN-Aktivität im Zeitverlauf

Als letzte beeinflussbare Größe wurde die Zeit untersucht, in welchem Zeitraum unterschiedliche Substrate unter definierten Reaktionsbedingungen umgesetzt werden und ob es Zwischenstufen gibt, auf denen die Substrate während des Degradierungsprozesses verbleiben (Abb. 29). Es wurden drei verschiedene Substrate untersucht: eine vollständig gepaarte dsRNA (Spuren 2-9), eine dsRNA mit terminaler Fehlpaarung (Spuren 11-19) und eine ssRNA, welche einige intramolekulare Basenpaarungen ausbildet (Spuren 21-29). Als Untersuchungszeitpunkte wurden festgelegt: unmittelbar nach Start der Reaktion, 2, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Min. Abbildung 29 zeigt, dass die komplett basengepaarte dsRNA als auch die dsRNA mit terminaler Fehlpaarung extrem schnell umgesetzt werden. Beide sind bereits nach 5 Min.

(Spuren 4 und 14) nahezu komplett umgesetzt, wobei die komplett basengepaarte dsRNA tendenziell schneller umgesetzt wird. Die ssRNA wird deutlich langsamer umgesetzt und es bleiben selbst nach 60 Min. noch relativ große nichtdegradierte Zwischenprodukte zurück.

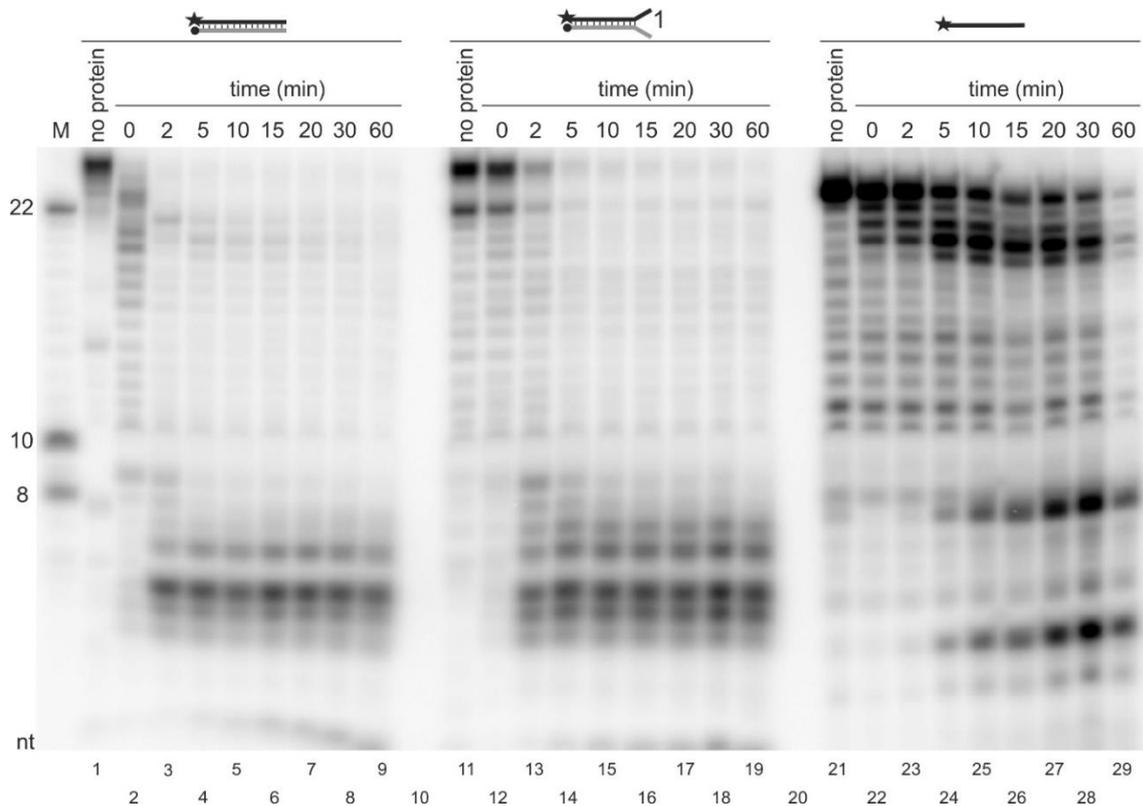


Abbildung 29: Zeitverlauf der Degradation verschiedener RNA-Substrate durch die CavV-ExoN

Die Produkte wurden in einem denaturierendem 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in der Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg^{2+} im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrat wurde komplementäre dsRNA und dsRNA mit terminaler Fehlpaarung verwendet (JZR3 – JZR8 Bio, IDR1 – JZR8 Bio, s. Materialien). Bei beiden war der Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und der Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis). Als drittes Substrat wurde eine lineare ssRNA verwendet, die ebenfalls am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) wurde (IDR1, s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 1 Std. bei 30°C inkubiert. Während dieser Stunde wurden die Reaktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt (sofort nach Enzymzugabe, nach 2, 5, 10, 15, 20, 30 und nach 60 Min.), um den Substratumsatz zu diesem Zeitpunkt festzustellen. M – $5'$ - ^{32}P -markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle).

Basierend auf diesen Daten wurde die Reaktionszeit auf 30 Min. festgelegt, also die Zeit, die unter den gewählten Bedingungen einen kompletten Substratumsatz ermöglichte.

Nach Beendigung aller Experimente, welche die an der Reaktion teilnehmenden und beeinflussbaren Größen erfasst haben, wurden die Rahmenbedingungen für alle folgenden Experimente, welche mit der CavV-ExoN durchgeführt werden sollten, standardisiert. Es wurden folgende Bedingungen als Fazit aus den vorherigen Experimenten festgelegt:

Tabelle 23: Optimierte Bedingungen für die CavV-ExoN-*in-vitro*-Aktivitätstests

Größe	Wert
Proteinkonzentration	50 nM
NaCl-Konzentration	15 mM
Magnesiumkonzentration	1 mM
pH	7,5
Temperatur	30°C
Zeit	30 Min.

Für die Aktivitätstests wurde eine RNA-Konzentration von 50 nM gewählt (Verhältnis Protein- zu RNA-Konzentration 1:1). Auch wenn der Substratumsatz in saurem Milieu bei einem pH-Wert von unter 7,5 und bei einer Temperatur von 21°C größer war, wurden die obenstehenden Bedingungen gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit ähnlichen Exoribonukleasen zu erzielen.

4.5.4 Vergleich der Aktivität der verschiedenen CavV-ExoN-Proteinvarianten mit Aminosäuresubstitutionen in konservierten Motiven

Die im Kapitel 4.2 beschriebenen ExoN-Proteinvarianten sollten in einem weiteren Experiment hinsichtlich ihrer nukleolytischen Aktivität im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein untersucht werden (Abb. 30). Hierfür wurden drei verschiedene Substrate verwendet: dsRNA (Spuren 2-8), dsRNA mit einem (Spuren 10-17) oder drei (Spuren 19-26) ungepaarten terminalen Nukleotid(en). Die Konzentrationen der verschiedenen Proteine wurden auf 50 nM eingestellt. Wie bereits in den vorherigen Experimenten, spaltete die Wildtyp-ExoN sowohl komplett doppelsträngige RNA als auch dsRNA mit einem (einzigem) terminalen ungepaarten Nukleotid (Spuren 2 und 11). Auffällig war, dass auch die ExoN_D4545A-Variante in der Lage war, komplett doppelsträngige RNA zu spalten. Darüber hinaus spaltete ExoN_D4545A auch dsRNA mit einem terminalen ungepaarten Nukleotid, wenn auch deutlich weniger effektiv als das Wildtyp-Protein (Spuren 5 und 14). Die restlichen Proteinvarianten mit Alanin-Substitutionen

konservierter Reste in den Motiven I und III (vgl. Abb. 12) zeigten keinen Substratumsatz.

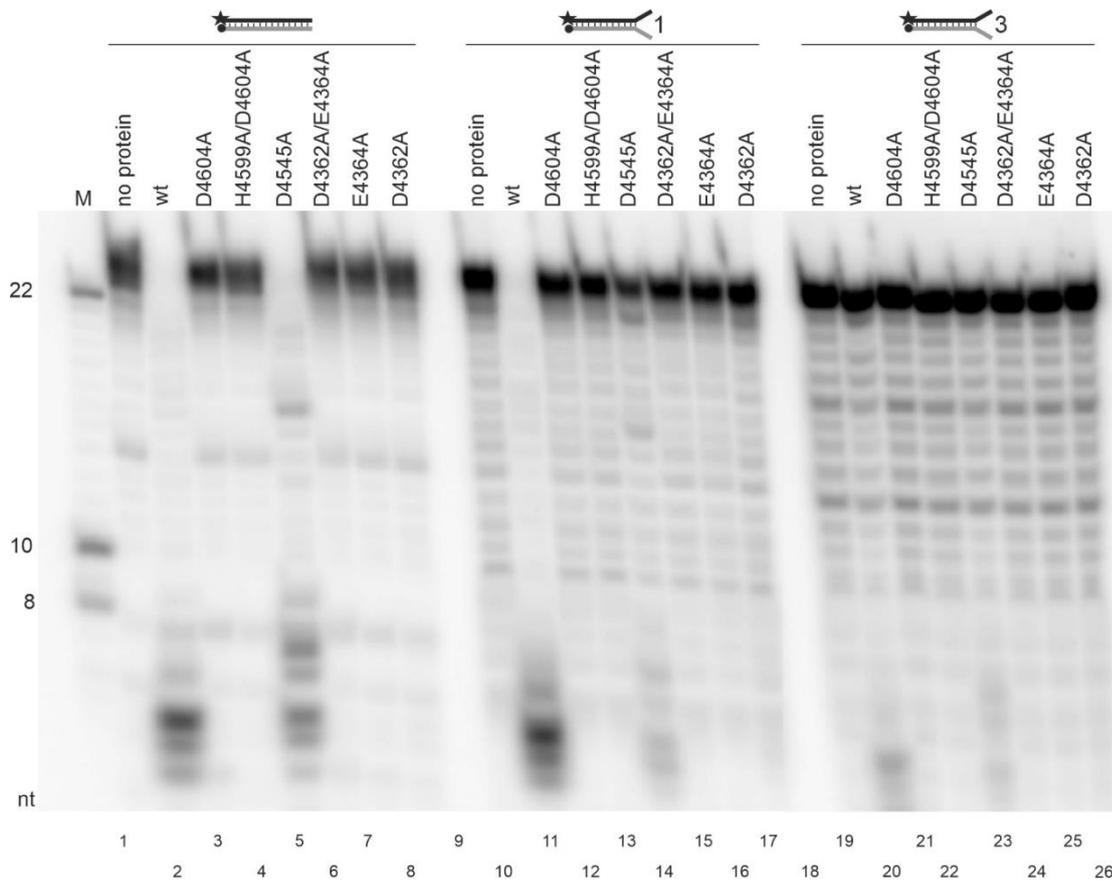


Abbildung 30: Bestimmung der *In-vitro*-Nuklease-Aktivitäten des CavV-ExoN-Wildtyp-Proteins und davon abgeleiteter ExoN-Varianten mit Alaninsubstitutionen konservierter Reste unter Verwendung verschiedener doppelsträngiger RNA-Substrate

Die Produkte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺ im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrate wurden vollständig doppelsträngige RNA, dsRNA mit einem ungepaarten Nukleotid am 3'-Ende des Indikatorstrangs und dsRNA mit drei 3'-terminalen ungepaarten Nukleotiden verwendet (JZR3 – JZR8 Bio, IDR1 – JZR8 Bio, IDR12 – JZR8 Bio, s. Materialien). Bei allen Substraten war der Indikatorstrang am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) und der Gegenstrang am 3'-Ende biotinyliert (Kreis). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN bzw. der angegebenen ExoN-Variante gestartet und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diene als Negativkontrolle); wt - Zugabe von Wildtyp-ExoN; XxxxxA – ExoN-Variante mit Austausch von einer oder zwei hochkonservierten Aminosäure(n) mit Alanin (wie oberhalb der Autoradiographie des Gels angegeben).

4.5.5 Nukleolytische Aktivität der mesoniviralen ExoN gegenüber ssRNA-Substraten

Um in einem weiteren Schritt die nukleolytische Aktivität der CavV-ExoN gegenüber einzelsträngiger RNA zu untersuchen (Abb. 31), wurden drei verschiedene ssRNA-Substrate verwendet: zwei nichtstrukturierte ssRNAs bestehend aus 22 Adeninen (A_{22}) (Spuren 1-8) oder aus 18 Adeninen gefolgt von 4 Cytosinen ($A_{18}C_4$) (Spuren 10-17) und eine strukturierte ssRNA (IDR8), die (aufgrund von Strukturvorhersagen) einige intramolekulare Basenpaarungen ausbilden konnte (Spuren 19-26). SsRNAs, die keine Sekundärstruktur ausbildeten, wurden weder von der Wildtyp-ExoN noch von den verschiedenen ExoN-Varianten degradiert. Die strukturierte ssRNA konnte dagegen von der Wildtyp-ExoN umgesetzt werden, wenn auch nicht komplett, wie auch schon im Kapitel 4.5.3.7 für dsRNA-Substrate gezeigt (vgl. Abb. 29). Die ExoN_D4545A-Variante hatte nicht nur gegenüber dsRNA (Abb. 30), sondern auch gegenüber partiell doppelsträngiger RNA eine nachweisbare Restaktivität (Abb. 31, Spur 23), während alle anderen ExoN-Varianten keine nachweisbare nukleolytische Aktivität besaßen.

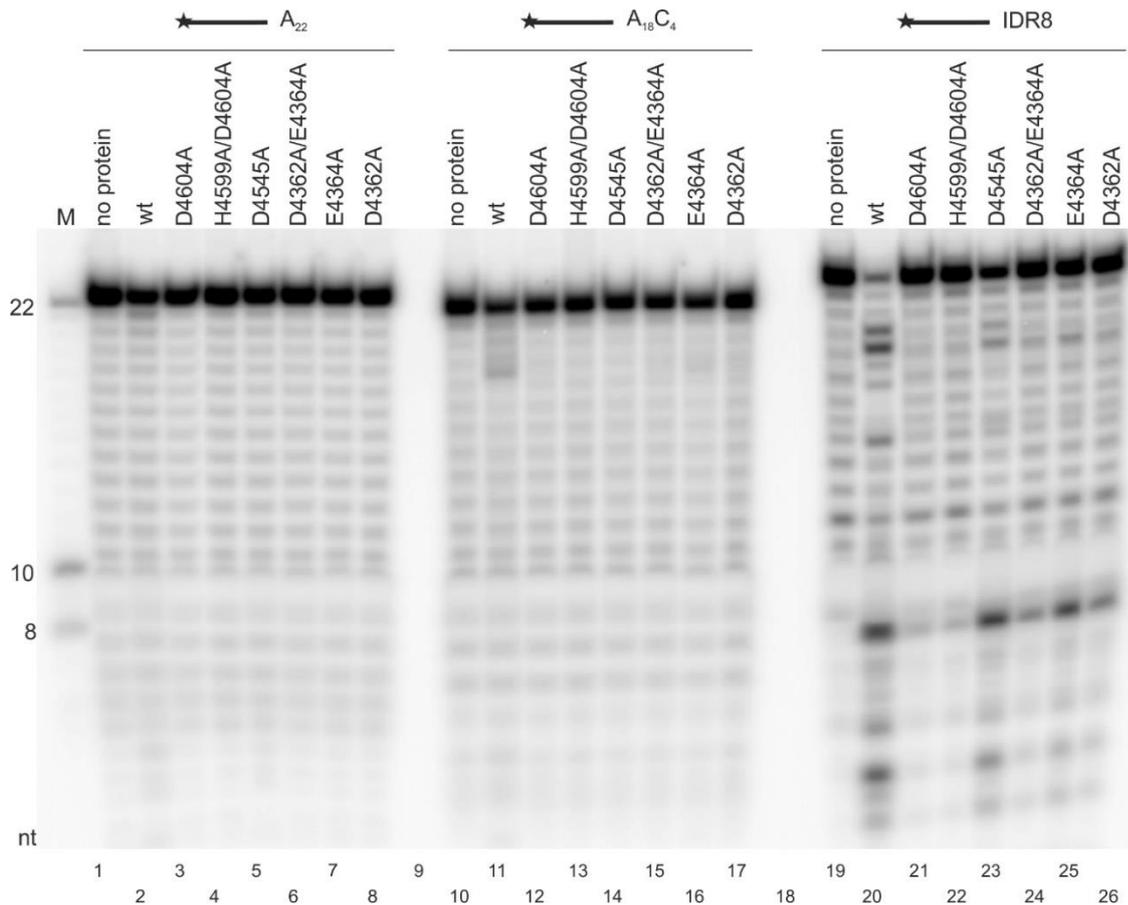


Abbildung 31: Bestimmung der *In-vitro*-Nuklease-Aktivitäten des CavV-ExoN-Wildtyp-Proteins und davon abgeleiteter ExoN-Varianten mit Alaninsubstitutionen konservierter Reste unter Verwendung verschiedener einzelsträngiger RNA-Substrate

Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺ im jeweiligen Reaktionsansatz. Als Substrate wurden zwei nichtstrukturierte ssRNA (A₂₂ und A₁₈C₄) und eine partiell strukturierte ssRNA (IDR8) verwendet, die am 5'-Ende radioaktiv markiert (Stern) waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. Getestet wurden der Wildtyp sowie die angegebenen ExoN-Varianten mit (1 oder 2) Alaninsubstitutionen konservierte Reste in konservierten Sequenzmotiven (vgl. Abb. 12). M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nucleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle); wt - Zugabe von Wildtyp ExoN; XxxxxA - ExoN-Variante mit Austausch von einer oder zwei hochkonservierten Aminosäure(n) mit Alanin (wie oberhalb der Autoradiographie des Gels angegeben).

4.5.6 Interaktion der mesoniviralen ExoN mit möglichen Kofaktorproteinen

Die im Kapitel 4.4 beschriebenen, rekombinant hergestellten CavV-Hpp8- und Hpp9-Proteine sollten im Folgenden zusammen mit der CavV-ExoN in Aktivitätstests eingesetzt werden, um mögliche Auswirkungen der Anwesenheit dieser Proteine auf die nukleolytische Aktivität und/oder Substratspezifität der ExoN zu untersuchen.

Es wurden verschiedene Reaktionsansätze vorbereitet: (1.) eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Wildtyp-ExoN, (2.) ein Ansatz mit Wildtyp-ExoN, (3a) ein Ansatz mit dem entsprechenden Hpp in einer Konzentration von 50 nM sowie (3b) ein Ansatz mit einer Konzentration von 250 nM und zusätzlich zwei Ansätze, in denen die Wildtyp-ExoN zusammen mit einem Hpp in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eingesetzt wurde, und zwar (5.) im Verhältnis 1:1 oder (6.) im Verhältnis 1:5. Die Konzentration der CavV-ExoN wurde bei 50 nM belassen und die des potentiellen Kofaktors entsprechend angepasst, um die angestrebten molaren Verhältnisse zu gewährleisten. Als Substrate wurden eine komplett doppelsträngige RNA (Spuren 1-6) sowie dsRNAs, die ein (Spuren 8-13), zwei (Spuren 15-20) oder drei (Spuren 22-27) 3'-terminale(s) nichtgepaarte(s) Nukleotid(en) enthielten, eingesetzt.

Die für Hpp8 und Hpp9 erhaltenen Ergebnisse (Abb. 32 und 33) waren nahezu identisch. In Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten wurde die komplett doppelsträngige RNA und die dsRNA mit einem 3'-terminalen ungepaarten Nukleotid gespalten, sowohl von der Wildtyp-ExoN alleine, als auch in Kombination mit Hpp8 oder Hpp9 (Abb. 32 und 33, jeweils Spuren 2, 5, 6, 9, 12, 13). Weder Hpp8 noch Hpp9 (alleine) waren unter den verwendeten Bedingungen in der Lage, dsRNA-Substrate zu degradieren (Spuren 3, 4, 10, 11). DsRNA mit zwei oder drei 3'-terminalen nichtgepaarten Nukleotiden wurden nur in minimalem Umfang degradiert; der ganz überwiegende Teil dieser beiden Substrate blieb in voller Länge erhalten (Spuren 15-20, 22-27). Es zeigten sich auch keine Unterschiede zwischen Reaktionen, bei denen die CavV-ExoN allein oder in Kombination mit einem der beiden Proteine, Hpp8 oder Hpp9, verwendet wurde. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass diese beiden Proteine (unter den verwendeten Bedingungen) keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivität und Substratspezifität der ExoN haben.

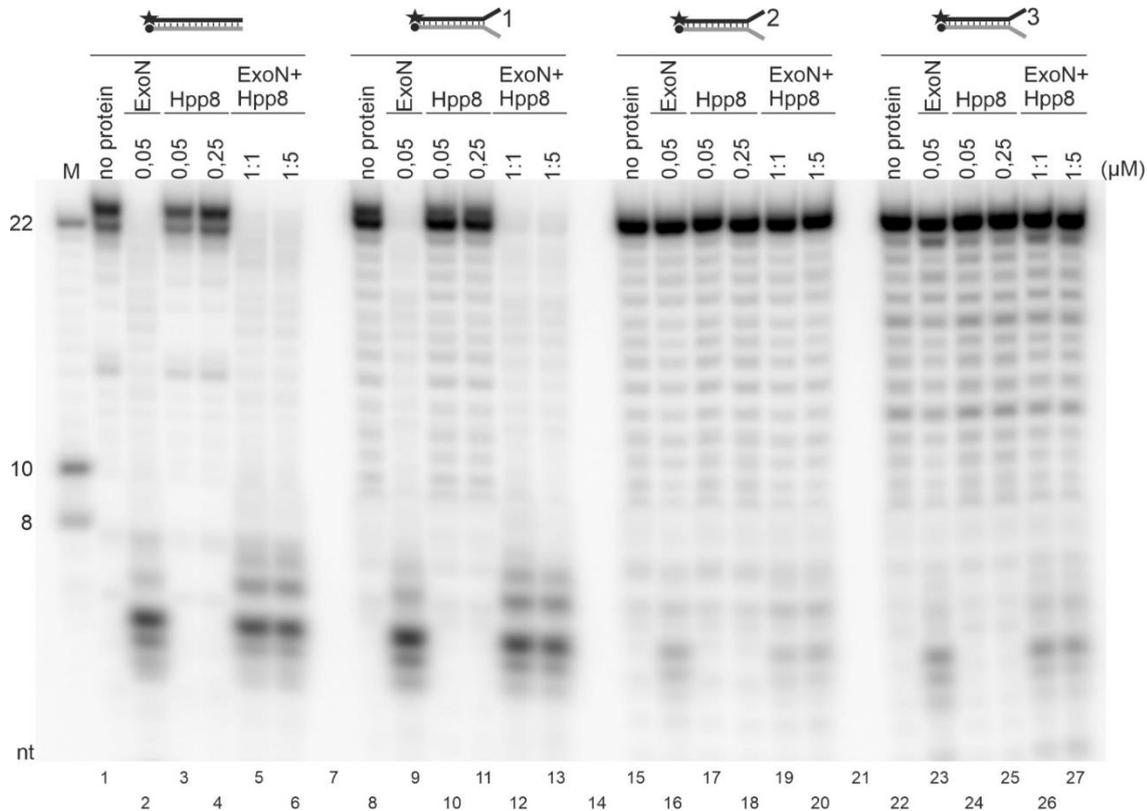


Abbildung 32: Bestimmung der In-vitro-Nuklease-Aktivitäten von CavV-ExoN und CavV-Hpp8 sowie einer Kombination der beiden Proteine

Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und anschließend einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit der angegebenen Protein-Konzentrationen sowie 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺. Als Substrat wurden entweder komplett doppelsträngige RNA oder dsRNA mit einfacher, zweifacher oder dreifacher 3'-terminaler Fehlpaarung verwendet (JZR3 – JZR8 Bio, IDR1 – JZR8 Bio, IDR16 – JZR8 Bio, IDR12 – JZR8 Bio, s. Materialien). Bei allen Substraten war das 3'-Ende des Gegenstrangs biotinyliert (Kreis) und das 5'-Ende des Indikatorstrangs radioaktiv markiert (Stern). Oberhalb der jeweiligen Spur ist das jeweilige Substrat schematisch dargestellt. Die Zahlen zeigen die jeweilige Anzahl ungepaarter terminaler Nukleotide an. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diene als Negativkontrolle); ExoN - Zugabe von Wildtyp-ExoN in einer Konzentration von 0,05 μM; Hpp8 - Zugabe von Hpp8 in einer Konzentration von 0,05 oder 0,25 μM; ExoN+Hpp8 - Zugabe von Wildtyp-ExoN und Hpp8 im molaren Verhältnis von 1:1 oder 1:5.

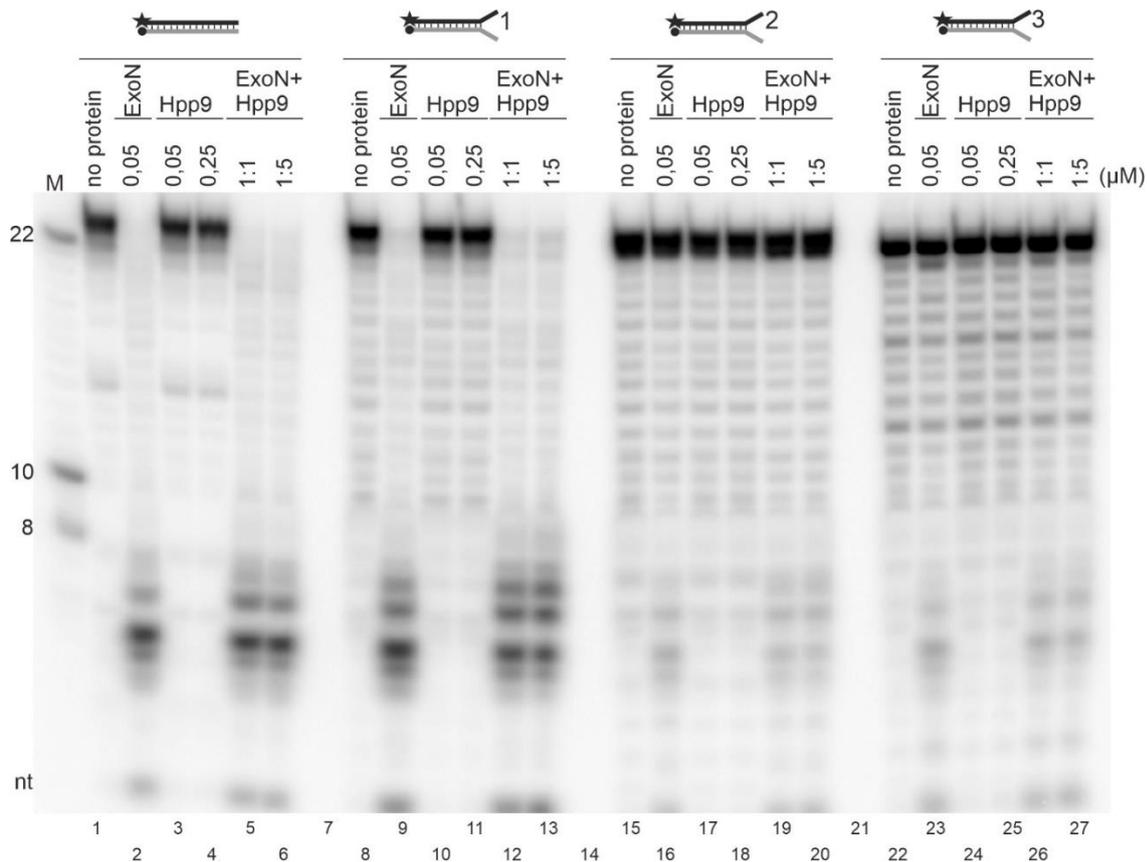


Abbildung 33: Bestimmung der In-vitro-Nuklease-Aktivitäten von CavV-ExoN und CavV-Hpp9 sowie einer Kombination der beiden Proteine

Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und anschließend einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit der angegebenen Protein-Konzentrationen sowie 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg²⁺. Als Substrat wurden entweder komplett doppelsträngige RNA oder dsRNA mit einfacher, zweifacher oder dreifacher 3'-terminaler Fehlpaarung verwendet (JZR3 – JZR8 Bio, IDR1 – JZR8 Bio, IDR16 – JZR8 Bio, IDR12 – JZR8 Bio, s. Materialien). Bei allen Substraten war das 3'-Ende des Gegenstrangs biotinyliert (Kreis) und das 5'-Ende des Indikatorstrangs radioaktiv markiert (Stern). Oberhalb der jeweiligen Spur ist das jeweilige Substrat schematisch dargestellt. Die Zahlen zeigen die jeweilige Anzahl ungepaarter terminaler Nukleotide an. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. M – 5'-³²P-markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nukleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle); ExoN - Zugabe von Wildtyp-ExoN in einer Konzentration von 0,05 µM; Hpp9 - Zugabe von Hpp9 in einer Konzentration von 0,05 oder 0,25 µM; ExoN+Hpp9 - Zugabe von Wildtyp-ExoN und Hpp9 im molaren Verhältnis von 1:1 oder 1:5.

4.5.7 Nukleolytische Aktivität und Substratspezifität der CavV-ExoN unter optimierten Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Metallionen

Nach der oben beschriebenen umfangreichen Optimierung der Reaktionsbedingungen sollte in einem abschließenden Experiment die Aktivität und Substratspezifität der CavV-ExoN unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen sowie unterschiedlicher Substrate und Metallionen-Kofaktoren untersucht werden (Abb. 34). Getestet wurden alle Substrate, die bereits in früheren Experimenten (Kapitel 4.5.2, Abb. 22) zum Einsatz kamen. In den Spuren 1-13 wurden diejenigen Reaktionsansätze analysiert, die in Anwesenheit von Magnesium durchgeführt wurden, während in den Spuren 17-29 die Reaktionsansätze mit Mangan analysiert wurden. Ein Vergleich der Reaktionsprodukte ergab, dass in Gegenwart von Mangan-Ionen (mit Ausnahme der Negativkontrolle und Substraten, bei denen beide Stränge 3'-biotinyliert waren) alle Substrate komplett degradiert worden waren. Im Gegensatz dazu verlief die Spaltung der eingesetzten Substrate in Gegenwart von Magnesium-Ionen deutlich differenzierter und in Abhängigkeit von der Struktur des verwendeten Testsubstrats. Eine vollständige Spaltung des Substrats erfolgte mit Magnesium als Kofaktor nur in Reaktionsansätzen mit vollständig doppelsträngiger RNA (Spur 3) oder einer dsRNA, die ein (einziges) ungepaartes Nukelotide am 3'-Ende (Spur 5) oder einer internen Position enthielt (Spur 11). Im Gegensatz dazu wurden dsRNA-Substrate mit zwei oder drei 3'-terminalen ungepaarten Nukleotiden in Gegenwart von Magnesium nicht gespalten (Spuren 7 und 9). Bemerkenswert ist die Aktivität der ExoN gegenüber dsRNA-Substraten mit zwei oder drei internen Fehlpaarungen. Bei dsRNA mit zweifacher oder dreifacher terminaler Fehlpaarung spaltete die ExoN nur zwei bis drei 3'-terminale Nukleotide vom Substrat ab, der restliche Strang blieb unter den gewählten Reaktionsbedingungen intakt (Spuren 7 und 9). Bei dsRNA mit zweifacher interner Fehlpaarung wurde der Indikatorstrang bis zu einer definierten Position nahe dem basengepaarten Bereich der Substrate exonukleolytisch gespalten. Im Ergebnis entstand ein relativ stabiles Hauptreaktionsprodukt, das nicht weiter degradiert wurde. Bei Anwesenheit von 3 internen Fehlpaarungen entstanden mehrere Reaktionsprodukte, die eine exonukleolytische Spaltung bis zu einer Position in der Nähe der ungepaarten Nukleotide anzeigten. Es sammelten sich dabei inkomplett umgesetzte Substrate mit Nukleotidlängen von 13 bis 16 Nukleotiden (Spur 13). Das kleinste dieser Reaktionsprodukte komigrierte im Gel mit dem Hauptreaktionsprodukt des Substrates mit zwei internen Fehlpaarungen (Spur 12). Die Daten legen nahe, dass bei beiden Substraten das Enzym seine 3'-5'

exonukleolytische Aktivität ausübt bis es sich der Position annähert, an der der (nächste) basengepaarte Bereich des Substrats beginnt. An dieser Stelle wird möglicherweise eine weitere exonukleolytische Spaltung unterdrückt oder stark verlangsamt.

Mangan als unspezifischer Kofaktor befähigte die CavV-ExoN dazu, alle Substrate zu degradieren mit Ausnahme der Substrate, bei denen beide Stränge am 3'-Ende biotinyliert waren, sodass auch hier die Vermutung nahe liegt, dass ExoN unabhängig vom Kofaktor ein freies 3'-OH-Ende für seine Aktivität benötigt.

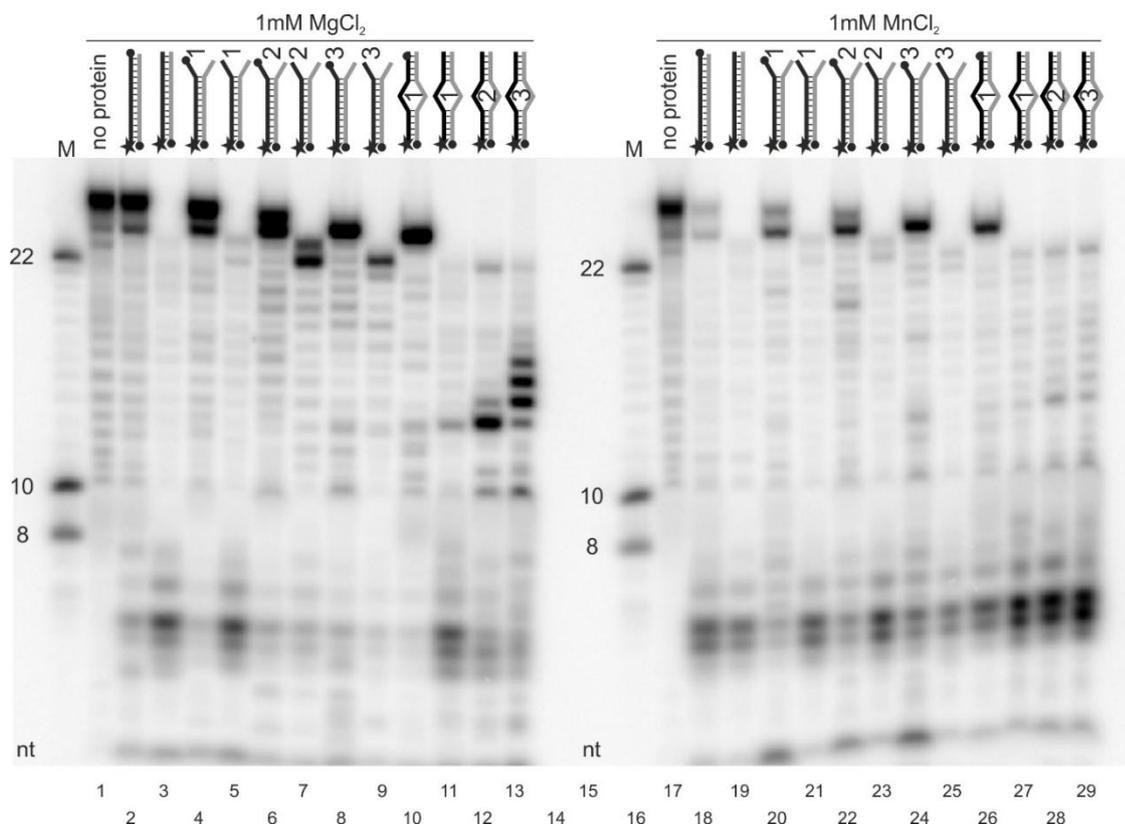


Abbildung 34: Bestimmung der In-vitro-Nuklease-Aktivität der CavV-ExoN unter optimierten Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Metallionen

Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden 12%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-TBE-Gel aufgetrennt und anschließend einer Autoradiographie unterzogen. Der Aktivitätstest wurde durchgeführt in Anwesenheit von 50 nM Protein, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 15 mM NaCl, 1 mM DTT und 1 mM Mg^{2+} /1 mM Mn^{2+} im jeweiligen Reaktionsansatz. Oberhalb der jeweiligen Spur ist die Struktur des jeweiligen Substrats schematisch dargestellt, dabei zeigt der Stern die radioaktive Markierung am 5'-Ende, der Kreis eine 3'-Biotinylierung und die Zahlen die jeweilige Anzahl an entweder terminalen oder internen Fehlpaarungen (für detaillierte Übersicht der Substrate s. Materialien). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ExoN gestartet und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. M – $5'$ - ^{32}P -markierte RNAs mit Längen von 22, 10 und 8 Nucleotiden wurden als Größenmarker verwendet; „no protein“ - Reaktionsansatz ohne Protein (dieser diente als Negativkontrolle).

5 Diskussion

Coronaviren sind neben den Monidoviren die größten bekannten Positiv-Einzelstrang-RNA-Viren. Ihr Genom umfasst bis zu etwa 32 kb. Sie gehören zur Ordnung der *Nidovirales*.

Die Subordnung *Mesnidovirineae* beinhaltet die Familie der *Mesoniviridae*, welche relativ zeitgleich sowohl in Vietnam und der Elfenbeinküste entdeckt worden ist. Sie infizieren nur Arthropoden und sind weltweit in Mosquitos verbreitet. Mit einer Genomgröße zwischen ~20-21 kb liegen sie zwischen den großen *Monidoviridae* und den kleinen *Arnidoviridae* (Lauber et al., 2012; Nga et al., 2011; Zirkel et al., 2013). Trotz der Tatsache, dass sie lediglich Insekten infizieren, sind sie biologisch sehr interessant, da sie phylogenetisch mit medizinisch und veterinärmedizinisch wichtigen Viren aus anderen Familien der Ordnung *Nidovirales* verwandt sind und ihre Erforschung zu einem besseren Verständnis beitragen könnte, wie sich diese gesamte große Gruppe von Plusstrang-RNA-Viren mit ihren zahlreichen besonderen Eigenschaften entwickeln konnte. Die bisher am besten untersuchten Vertreter der *Mesoniviridae* sind das in dieser Arbeit verwendete Cavallyvirus (CavV) und das Nam Dinh Virus (NDiV), die beide zur gleichen Virusspezies (*Alphamesonivirus 1*) gehören (Zirkel et al., 2011).

Um ein solch große RNA-Genome, wie diejenigen der meisten Viren in der Ordnung *Nidovirales*, stabil zu vermehren, bedarf es einiger Voraussetzungen, so z.B. einer ausreichend hohen Replikationsgenauigkeit, die dafür Sorge tragen muss, dass die Fehlerrate der Replikation so gering wie möglich gehalten wird, um alle für die Replikation erforderlichen Protein- und RNA-Funktionen aufrechtzuerhalten und somit eine ausreichende Anzahl replikationskompetenter Virusnachkommen hervorzubringen, sodass deren langfristiges Überleben gesichert ist. Eine solche Funktion erfüllen RNA-abhängige RNA-Polymerasen (allein) normalerweise nicht, da sie eine relativ hohe Fehlerrate aufweisen (Bull, Meyers, & Lachmann, 2005; Denison, Graham, Donaldson, Eckerle, & Baric, 2011). Es wurde daher seit langem spekuliert, dass Coronaviren und viele andere Nidoviren zusätzliche Protein kodieren, die dazu beitragen, die Fehlerrate während der RNA-Replikation auf einem niedrigen Niveau zu halten (Gorbalenya et al., 2006). Eine entscheidende Rolle wurde dabei dem Nichtstrukturprotein nsp14 von Coronaviren zugewiesen, welches eine Exoribonuklease (ExoN) enthält, die auch bei anderen Nidoviren konserviert ist (Snijder et al., 2003). Die vorhergesagte Exonukleaseaktivität wurde biochemisch bestätigt (Minskaia et al., 2006) und eine mögliche „*proof-reading*“-Funktion durch genetische Experimente unterstützt.

Mutationen, die dieses Proteins in seiner Funktion einschränken oder vollständig inaktivieren, erhöhen die Mutationsrate während der viralen RNA-Replikation bis zu 20-fach (Übersicht in (Denison et al., 2011)).

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der ExoN von SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass deren exonukleolytische Aktivität in 3' → 5'-Richtung auf der Substrat-RNA erfolgt. Ihre „*proof-reading*“-Funktion basiert auf dem Erkennen und Entfernen von fehlgepaarten Basenpaaren (Bouvet et al., 2012; Ferron et al., 2018).

In dieser Arbeit sollte erstmals die ExoN-Domäne eines Vertreters der *Mesoniviridae* (anhand des Cavallyvirus) biochemisch charakterisiert werden, um damit zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise und des Zusammenspiels von ExoN mit anderen Proteinen des Replikations-Transkriptions-Komplexes (RTC) in dieser bisher wenig untersuchten Virusfamilie beizutragen. Dabei sollten insbesondere auch mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den ExoN-Aktivitäten dieser beiden phylogenetisch weit auseinanderliegenden Nidovirusfamilien (*Mesoniviridae*, *Coronaviridae*) herausgearbeitet werden.

5.1 Expression und Aktivität der CavV-ExoN

Die Aufreinigung der mesoniviralen ExoN-Domäne konnte in dieser Arbeit sowohl mit einem Heptahistidin- als auch mit einem Strep-Affinitätstag bewerkstelligt werden. Die Reinheit der zu untersuchenden Proteine war gut und die erreichte Konzentration ausreichend (Abb. 8 und 9). Die Abspaltung der Affinitätstags konnte leider nicht realisiert werden und so wurden die weiteren Experimente mit Proteinen durchgeführt, die einige zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus enthielten. Ein großer Einfluss dieser zusätzlichen Reste auf die Enzymaktivität wurde als relativ unwahrscheinlich erachtet, da der jeweilige Tag nur ~1 kDa groß war (also sehr klein im Vergleich zur Größe der ExoN von ~62 kDa). Es zeigte sich jedoch auch, dass die Identität dieser zusätzlichen Aminosäuren durchaus einen Einfluss auf die Aktivität hatte. Ein direkter Vergleich der *In-vitro*-Nuklease-Aktivitäten der beiden in dieser Arbeit hergestellten ExoN-Konstrukte ergab, dass das ExoN-Konstrukt mit Histidin-Tag eine höhere Stabilität und Aktivität besaß im Vergleich zu einem Protein mit Strep-Tag. Es wurde deshalb entschieden, mit dem ExoN-Konstrukt, das den Heptahistidin-Affinitätstag aufwies, weiterzuarbeiten (Abb. 21).

5.2 ExoN als Teil des Replikations-Transkriptions-Komplexes sowie dessen subzelluläre Lokalisation

Es sollten weitere Erkenntnisse gewonnen werden bezüglich der Lokalisation der mesoniviralen ExoN in der infizierten Zelle selbst. Zu diesem Zweck wurden Mosquitozellen der Zelllinie C6/36 mit dem Cavallyvirus infiziert und auf Objektgläsern fixiert, um diese später mikroskopieren zu können (s. 3.3.3 und 3.3.4). Der für dieses Vorhaben notwendige Antikörper, der gegen die cavallyvirale ExoN gerichtet ist, wurde im Laufe dieser Arbeit hergestellt. Es wurde ExoN-GSSG-His₇ im großen Maßstab exprimiert und aufgereinigt. Mit entsprechend großer Konzentration und Reinheit wurde das Protein an die Firma Eurogentec gesendet, welche zwei Kaninchen damit immunisierte. Die hergestellten Antikörper konnten in der immunspezifischen Färbung das Zielantigen nachweisen (Abb. 11). In der durchgeführten Konfokalmikroskopie konnte mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Barlow et al., 2010; Dunn et al., 2011) in infizierten Zellen eine Kolo-kalisation von cavallyviraler ExoN und dsRNA von über 95% detektiert werden, so dass gezeigt werden konnte, dass die ExoN ein Teil des Replikations-Transkriptions-Komplexes ist. Die Lokalisation in der infizierten Zelle befand sich im Zytoplasma. Im Zellkern selbst befand sich weder dsRNA noch die ExoN, wie bereits experimentell für das NamDinh Virus (NDiV), einem anderen Vertreter der *Mesoniviridae*, gezeigt werden konnte (Thuy et al., 2013). Zudem lieferten die durchgeführten Experimente eine weitere Bestätigung für die Spezifität des generierten polyklonalen Antikörpers, der für zukünftige Studien mesoniviraler RTCs in Zellkultur oder auch *in vivo* geeignet zu sein scheint.

5.3 Biochemische Charakterisierung der CavV-ExoN

5.3.1 Substratspezifität

In früheren Studien konnte für das SARS-CoV gezeigt werden, dass ExoN seine Aktivität in 3' → 5'-Richtung ausübt und ein freies 3'-Ende benötigt (Bouvet et al., 2012; Chen et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl ssRNA als auch dsRNA prozessiert werden können (Minskaia et al., 2006). In einem ersten Satz von Experimenten sollte getestet werden, ob diese Charakteristika auch für die mesonivirale ExoN gelten. Die Substrate wurden so gestaltet, dass (1) die radioaktive Markierung am 5'-Ende des Indikatorstranges erfolgte, (2) das freie 3'-Ende am gegenüberliegenden Strang biotinyliert wurde und damit (3) lediglich das 3'-Ende des Indikatorstranges frei zugänglich war. Die postulierte 3' → 5'-Richtung der ExoN-Aktivität konnte durch die

Beobachtung gestützt werden, dass RNAs, bei denen das 3'-Ende des Indikatorstranges biotinyliert war, wodurch kein freies 3'-Ende mehr vorlag, von der ExoN nicht gespalten wurden. Zusätzlich zu den gewonnenen Informationen zur Richtung der exonukleolytischen Aktivität auf dem RNA-Substrat unterstützten diese Experimente auch die Schlussfolgerung, dass die beobachteten Spaltungen nicht durch eine fragliche Endonukleaseaktivität erfolgt sein konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl vollständig komplementäre als auch dsRNA mit einer (einzigen) terminalen Fehlpaarung nukleolytisch gespalten wurden. Substrate mit zwei oder drei 3'-terminal ungepaarten Nukleotiden konnten hingegen von der mesoniviralen ExoN nicht prozessiert werden. Vergleichbare Daten wurden auch für die ExoN von SARS-CoV berichtet (Bouvet et al., 2012). Des Weiteren wurde deutlich, dass die mesonivirale ExoN auch Substrate spalten kann, die eine interne Fehlpaarung aufweisen. Eine dsRNA mit einer singulären internen Fehlpaarung wurde sehr effizient gespalten, während dsRNA mit zwei oder drei intern fehlgepaarten Basen nur teilweise degradiert werden, es verbleiben dabei relativ stabile Zwischenprodukte, die der Position der mehrfach fehlgepaarten Basen entsprechen und möglicherweise darauf hindeuten, dass die 3'-5'-Exonukleaseaktivität bei Erreichen und/oder nach Entfernung der intern gelegenen ungepaarten Nukleotide attenuiert wird. Vergleichbare experimentelle Daten liegen bisher für keine anderen Vertreter der *Nidovirales* vor und so konnte leider kein Vergleich zu den anderen Virenfamilien gezogen werden.

Neben den Untersuchungen mit dsRNA war es von Interesse zu untersuchen, wie sich die ExoN in Bezug auf ssRNA als potenzielle Substrate verhält. In der Literatur wurde bereits für das SARS-CoV beschrieben, dass sowohl dsRNA als auch ssRNA als Substrate umgesetzt werden können (Minskaia et al., 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lediglich solche ssRNAs gespalten werden können, die Sekundärstrukturen ausbilden, also ein Minimum von basengepaarten Bereichen aufweisen. Zwei nichtstrukturierte ssRNA zeigten hingegen keinerlei Substratumsatz. Eine ssRNA, die vermutlich durch intramolekulare Basenpaarungen eine Sekundärstruktur mit basengepaarten Bereichen ausbilden konnte, wurde zumindest partiell von der Wildtyp-ExoN degradiert, wobei jedoch diverse Zwischenprodukte verblieben (Abb. 31). Insgesamt war jedoch die Spaltungseffizienz deutlich geringer als bei den verwendeten dsRNA-Substraten (ohne Fehlpaarung oder mit nur einer Fehlpaarung).

Weitere Experimente auf diesem Gebiet sind notwendig, um diese Schlussfolgerungen weiter zu untermauern. Zudem sollten weitere ssRNA-Substrate zum Einsatz kommen, um weitere Feinheiten und Charakteristika der cavallyviralen ExoN herauszuarbeiten.

5.3.2 Metallionabhängigkeit

In der Literatur finden sich Arbeiten, die Hinweise liefern, dass die ExoN-Aktivität metallionen-abhängig ist. Für die ExoN des SARS-CoV konnte bewiesen werden, dass die enzymatische Aktivität abhängig ist von divalenten Metallionen. Hierbei ist vorrangig Mg^{2+} zu nennen (Beese & Steitz, 1991; Chen et al., 2007). Zn^{2+} hingegen kann zu einer Konformationsänderung des Proteins führen (korrekte Positionierung der Reste und Seitketten; Ausbildung Zinkfinger). Die Bedeutung für dessen nukleolytische Aktivität ist diskutiert worden und scheint für Zn^{2+} jedoch schwächer ausgeprägt (Chen et al., 2007). In dieser Arbeit konnten diese Erkenntnisse auf die ExoN des Cavallyvirus ausgeweitet und präzisiert werden. Die Zugabe von entweder Mg^{2+} oder Mn^{2+} war notwendige Voraussetzung für die enzymatische Aktivität der CavV-ExoN. Bei einer Zugabe von Zn^{2+} , Co^{2+} oder Ca^{2+} konnte nur ein minimaler Umsatz festgestellt werden. Die Abhängigkeit von divalenten Metallionen konnte bewiesen werden durch einen Reaktionsansatz ohne Zugabe jeglichen divalenten Metallions, der zu keinem Substratumsatz führte (Abb. 25). Mg^{2+} und Mn^{2+} führten beide zu einer hohen nukleolytischen Aktivität. Es zeigt sich jedoch, dass es bei hohen Konzentrationen ab 5 mM Mn^{2+} zu dem Ausbleiben der Reaktion kommt. Dies ist für Mg^{2+} nicht der Fall, wengleich die Effektivität des Substratumsatzes ab 10 mM leicht abnimmt (Abb. 26). In einem später durchgeführten Experiment unter Bedingungen, die eine höhere Substratspezifität der ExoN gewährleisten sollten, führte die Verwendung von Mn^{2+} als Kofaktor zu einer eher unspezifischen Spaltung, die unabhängig von der Substratstruktur nahezu alles umsetzte, was ein freies 3'-Ende aufwies: So auch dsRNA mit zwei oder drei terminal fehlgepaarten Basen sowie zwei oder drei internen Fehlpaarungen, die mit Mg^{2+} als Kofaktor nicht von ExoN umgesetzt werden konnten. Angesichts der postulierten Rolle der ExoN in einem (regulierten) Korrekturleseprozess (*proofreading*) im Zusammenwirken mit anderen Komponenten des Replikations-Transkriptions-Komplexes (RTC), insbesondere der RNA-Polymerase und der Helikase (Ulferts & Ziebuhr, 2011), erscheint eine unspezifische/unkontrollierte Degradation verschiedenster Substrate als biologisch wenig sinnvoll. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass

Mg²⁺ (nicht Mn²⁺) der physiologisch relevante Kofaktor der CavV-ExoN in der infizierten Zelle ist.

5.4 Etablierung von optimierten Reaktionsbedingungen für die *In-vitro*-Nuklease-Aktivitätstests

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein geeignetes System etabliert werden, um die spezifische Aktivität der mesoniviralen ExoN Aktivität zu studieren. Die dafür genutzten Bedingungen wurden in sorgfältig mehrfach wiederholten Experimenten erarbeitet. So konnte sowohl das optimale Substrat (dsRNA mit einfacher terminaler Fehlpaarung) als auch 1 mM Mg²⁺ als biologisch relevanter Kofaktor, wie weiter oben schon beschrieben, bestimmt werden. Die geringste Proteinkonzentration, die unter den gewählten Bedingungen noch zu einem kompletten Substratumsatz führte, betrug 50 nM (molares Verhältnis Protein zu RNA 1:1; Abb. 23). Zudem konnte gezeigt werden, dass bereits eine Konzentration von 15 mM NaCl eine ausreichende Stabilität des Proteins im Reaktionsgemisch ermöglicht und somit diese geringe Konzentration gewählt wurde, wobei auch höhere Konzentrationen wie 100 oder 150 mM keine erkennbaren inhibitorischen Effekte bzgl. des Substratumsatzes ausübten (Abb. 24). Einen weiteren Einflussfaktor auf die Reaktion stellte der pH-Wert dar, welcher ebenfalls untersucht wurde. Es zeigten sich geringe Abweichungen in der Effektivität der enzymatischen Umsetzung. Der größte Umsatz wird bei einem leicht sauren pH-Wert von 6,5 erreicht und nimmt tendenziell immer weiter ab, je alkalischer das Milieu wird, wobei jedoch unabhängig vom pH-Wert keine ungespalteten Ausgangssubstrate zurückblieben (Abb. 27). Wie seit langen bekannt, spielt die Temperatur eine bedeutende Rolle in der Geschwindigkeit von biochemischen Vorgängen und letztendlich in der Effektivität der Reaktion. Bereits 1884 beschrieb der niederländische Chemiker Jacobus Henricus van-'t-Hoff die nach seinem Namen benannte van-'t-Hoff'sche oder auch RTG- (Reaktionstemperaturgeschwindigkeits-) Regel, die besagt, dass chemische Reaktionen bei einer Erhöhung der Temperatur von 10 K, um das doppelte ablaufen. Auf der anderen Seite muss bedacht werden, dass bei hohen Temperaturen die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Proteine denaturieren und dadurch ihre Funktion verlieren. In den durchgeführten Experimenten konnte ein maximaler Substratumsatz bei einer Temperatur von 21 und 30°C festgestellt werden. Die Nukleaseaktivität war auch bei einer Inkubation auf Eis und bei 42°C nachweisbar, wobei bei letzterer Temperatur unvollständig gespaltene Zwischenprodukte verblieben (Abb. 27). Nachfolgend wurde das charakteristische

Degradationsverhalten für verschiedene Substrate untersucht und eine Zeitreihe aufgestellt. Es konnte nur ein marginaler Unterschied zwischen Substraten festgestellt werden, die entweder komplett doppelsträngig waren oder eine singuläre 3'-terminale Fehlpaarung aufwiesen. Beide wurden unverzüglich nach Zugabe aller Reaktionspartner umgesetzt und schienen bereits nach 5 Min. einen annähernden Endzustand erreicht zu haben. Eine getestete ssRNA, die vermutlich eine Sekundärstruktur durch intramolekulare Basenpaarungen ausbilden konnte, wies hingegen ein deutlich anderes Degradationsmuster auf. Reaktionsprodukte akkumulierten zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (30 – 60 Min.; Abb. 29). Die Zusammenschau dieser Erkenntnisse untermauert die These, dass komplett doppelsträngige RNA und dsRNA mit einer singulären terminalen Fehlpaarung die bevorzugten Substrate der CavV-ExoN darstellen.

Zusammenfassend können die optimierten Bedingungen zur Untersuchung der spezifischen cavallyviralen ExoN wie folgt zusammengefasst werden:

Tabelle 24: Optimierte Bedingungen für die CavV-ExoN *in-vitro*-Aktivitätstests

Größe	Wert
Proteinkonzentration	50 nM
NaCl-Konzentration	15 mM
Magnesiumkonzentration	1 mM
pH	7,5
Temperatur	30°C
Reaktionszeit	30 Min.

Für die Aktivitätstests wurde eine RNA Konzentration von 50 nM gewählt (Verhältnis Protein- zu RNA-Konzentration 1:1). Auch wenn der Substratumsatz in saurem Milieu bei einem pH-Wert von unter 7,5 und bei einer Temperatur von 21°C größer war, wurden die obenstehenden Bedingungen gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit ähnlichen Exoribonukleasen zu erzielen.

5.5 Bedeutung der konservierten Motive der DEDDh-Exoribonuklease-Superfamilie

Es wurden sechs verschiedene Proteinvarianten hergestellt, ausgehend von den initial vorausgesagten konservierten Motiven I – III der zur DEDDh-Exonukleasen-Superfamilie gehörigen CavV-ExoN-Domäne in Analogie zur vergleichenden Sequenzanalyse der coronaviralen ExoN-Domäne (Snijder et al., 2003). Die zu Beginn

dieser Studie vorausgesagten konservierten Motive mit potentiell katalytischen wirksamen Aminosäureresten erstreckten sich über die Bereiche: Motiv I C4357 bis E4364, Motiv II F4537 bis D4545 und Motiv III H4599 bis Q4610. Die Aminosäurereste, die vermutlich den zentralen konservierten Resten von DEDDh-Exonukleasen entsprechen, waren dabei die folgenden: D4362 und E4364 (beide im Motiv I zu finden), D4545 (Motiv II) und D4604 (Motiv III). Es wurde vorausgesagt, dass diese zusammen das katalytische Zentrum bilden. Um deren funktionelle Relevanz zu testen, wurden die konservierten Aminosäurereste mit Alanin substituiert und somit aus den sauren, metallkoordinierenden Resten neutrale Reste gemacht. Zusätzlich wurden zwei Doppelmutanten (ExoN_D4362A_E4354A (Motiv I)) und (ExoN_H4599A_D4604A (Motiv III)) hergestellt, falls wider Erwarten noch eine Restaktivität der veränderten ExoN zurückbleiben sollte, die eine Verwendung als Negativkontrolle in den geplanten Experimenten erschwert hätte.

Alle ExoN-Varianten konnten in einer hohen Konzentration sowie guter Reinheit exprimiert werden. Auffällig hierbei war jedoch eine zweite Proteinbande im Größenbereich zwischen 40 kDa und 55 kDa bei den Varianten ExoN_D4362A, ExoN_E4364A, ExoN_D4362A_E4364A, sowie ExoN_D4604A. Diese zusätzliche Bande wurde nicht beobachtet bei den beiden Varianten ExoN_D4545A und ExoN_H4599A_D4604A. Dieses zusätzliche Protein färbte sich im Westernblot mit einem Antikörper gegen den Histidin-Affinitätstag nicht an. Es handelte sich deshalb voraussichtlich um ein N-terminales Spaltprodukt (oder vorzeitig terminiertes Translationsprodukt) des rekombinanten Proteins, dem der C-terminale Affinitätstag fehlte (Abb. 13). Die Genese und Ursachen für eine mögliche Instabilität dieser Proteine bleibt in weiteren Studien zu untersuchen.

In den durchgeführten *In-vitro*-Nuklease-Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass die konservierten Aminosäurereste der DEDDh-Motive entscheidend für die enzymatische Aktivität von ExoN sind. Einzig D4545 schien hierbei nicht übereinzustimmen bezüglich der Vorhersage der DEDDh-Zugehörigkeit. Die Proteinvariante ExoN_D4545A zeigte eine hohe enzymatische (Rest-)Aktivität und setzte komplementäre dsRNA beinahe so effizient wie das Wildtyp-Enzym um, wengleich der Anteil von Zwischenprodukten deutlich höher war. Die Spaltungseffizienz von dsRNA mit einer 3'-terminalen Fehlpaarung (also dem vermutlich relevanten Substrat) war hingegen gering und glich mehr derjenigen der restlichen Proteinvarianten.

Somit konnte die Voraussage, dass die hochkonservierten putativen katalytischen Aminosäurereste D4362, E4364 und D4604 Teil des DEDDh-Motives sind, weiter bekräftigt werden. Die Bedeutung sowie die Dazugehörigkeit von D4545 und des ursprünglich vorhergesagten Motivs II (F4537 bis D4545 des Polyproteins) ist basierend auf diesen Ergebnissen wenig wahrscheinlich. Hinzu kommt, dass die Aufklärung der Kristallstruktur der SARS-CoV-ExoN durch Ma et al. (Ma et al., 2015) und die daraus resultierende Neuordnung des Motivs II in der coronaviralen ExoN die früheren Aussagen zur möglichen Position des Motivs II in der Mesonivirus-ExoN in Frage stellt. Es gilt inzwischen als sehr wahrscheinlich, dass die korrekte Position des Motivs II die Reste S4480 bis K4483 im CavV-Polyprotein umfasst. Der hochkonservierte Aspartatrest als Teil des DEDDh-Motives würde sich demnach an Position D4481 des Polyproteins befinden (Abb. 12).

5.6 Mögliche Rolle weiterer viraler Proteine für die CavV-ExoN-Aktivität

Einige frühere Arbeiten zur SARS-CoV-ExoN-Aktivität konnten eine deutlich erhöhte Nukleaseaktivität durch Interaktionen von nsp14 (insbesondere dessen ExoN-Domäne) mit nsp10 zeigen. Sowohl die Effektivität der Degradation als auch die Substratspezifität von SARS-CoV-ExoN konnten durchgreifend gesteigert werden (Bouvet et al., 2012). Es war deshalb von besonderem Interesse, die für die SARS-CoV-ExoN gewonnenen Erkenntnisse mit den Charakteristika der Cavallyvirus-ExoN zu vergleichen. Auffällig war bereits zuvor, dass die mesonivirale ExoN alleine sowohl komplett doppelsträngige RNA als auch dsRNA mit einer 3'-terminalen Fehlpaarung degradieren konnte, was für die SARS-CoV-ExoN nicht in dieser Form gezeigt werden konnte (Bouvet et al., 2012). Für das Cavallyvirus sind bisher lediglich 12 konservierte Spaltungsstellen der 3CL^{pro} (cavallyvirale Hauptprotease) sowie einzelne Proteindomänen *in vitro* untersucht worden (Blanck & Ziebuhr, 2016). Basierend auf diesen Daten und Analysen von (bei allen Nidoviren) konservierten funktionellen Proteindomänen in den Replikase-Polyproteinen konnten somit lediglich in begrenztem Umfang Hypothesen zur Identität und den exakten Grenzen einzelner Nichtstrukturproteine und deren möglichen Funktionen gemacht werden (Blanck et al., 2014; Blanck & Ziebuhr, 2016; Nga et al., 2011; Zirkel et al., 2013).

Auf der Suche nach einem möglichen Kofaktor der mesoniviralen ExoN sollten die vom C-terminalen Ende ausgehenden cavallyviralen Hpp7, 8 und 9 rekombinant hergestellt werden. Sie sollten alle mit einem C-terminalen Heptahistidin-Affinitätstag ausgestattet

und mit der entsprechenden Talon-Affinitätschromatografie aufgereinigt werden. Für die Hpp8 und Hpp9 war dies problemlos möglich, Hpp7 konnte hingegen nicht exprimiert werden. Auch der Versuch einer Expression der Fusionsproteine Hpp6-7 und Hpp7-8 schlug fehl. Die erarbeiteten Expressionsbedingungen für die Hpp8 und Hpp9 waren folgende: Induktion mit 0,1 mM Anhydrotetracyclin, 6 Std., bei 18°C und 225 rpm. Beide Konstrukte konnten in erheblicher Konzentration aufgereinigt werden, die Verunreinigung war vernachlässigbar gering.

Im Laufe dieser Arbeit wurden Antikörper hergestellt, die gegen die möglichen Kofaktoren der cavallyviralen ExoN gerichtet sind, um diese in späteren Experimenten zur Verfügung zu haben auch im Hinblick auf weiterführende Infektionsstudien in Zellkultur. Die aufgereinigten Hpp8 und Hpp9 wurden konzentriert und an die Firma Eurogentec geschickt, welche zwei Kaninchen mit diesen Proteinen immunisierte, um polyklonale Antikörper herzustellen. Sowohl die gegen Hpp8 als auch die gegen Hpp9 gerichteten Antikörper konnten in der Immunfärbung ihr Zielantigen detektieren (Abb. 19 und 20).

Die mögliche Interaktion der exprimierten Proteine sollte in *In-vitro*-Nuklease-Aktivitätstests untersucht werden. Die Daten zeigten, dass weder Hpp8 noch Hpp9 eine intrinsische exonukleolytische Aktivität besitzen. Die ExoN-Nukleaseaktivität konnte in Anwesenheit der beiden Proteine nicht weiter gesteigert werden. Es bleibt zu untersuchen, ob eines oder beide Proteine mit der ExoN interagieren, um auf diese Weise beispielsweise beitragen könnten, die ExoN in den RTC zu rekrutieren, wie dies für den coronaviralen nsp10-nsp14-Komplex vermutet wurde (Bouvet et al., 2014; Ma et al., 2015). Es ergaben sich auch keine Hinweise auf eine Veränderung der Substratspezifität in Anwesenheit eines der beiden Proteine, sowohl bei einer Zugabe des potentiellen Interaktors bzw. Kofaktors im Verhältnis von 1:1 als auch bei Zugabe im Überschuss von 1:5. Die Daten zeigen erneut, dass die mesonivirale ExoN (analog zur SARS-ExoN) eine ausgeprägte Präferenz für komplett doppelsträngige RNA-Substrate sowie dsRNA-Substrate mit singulären Fehlpaarungen besitzt (Abb. 32 und 33).

5.7 CavV-ExoN als integraler Bestandteil des „Proofreading-Prozesses“

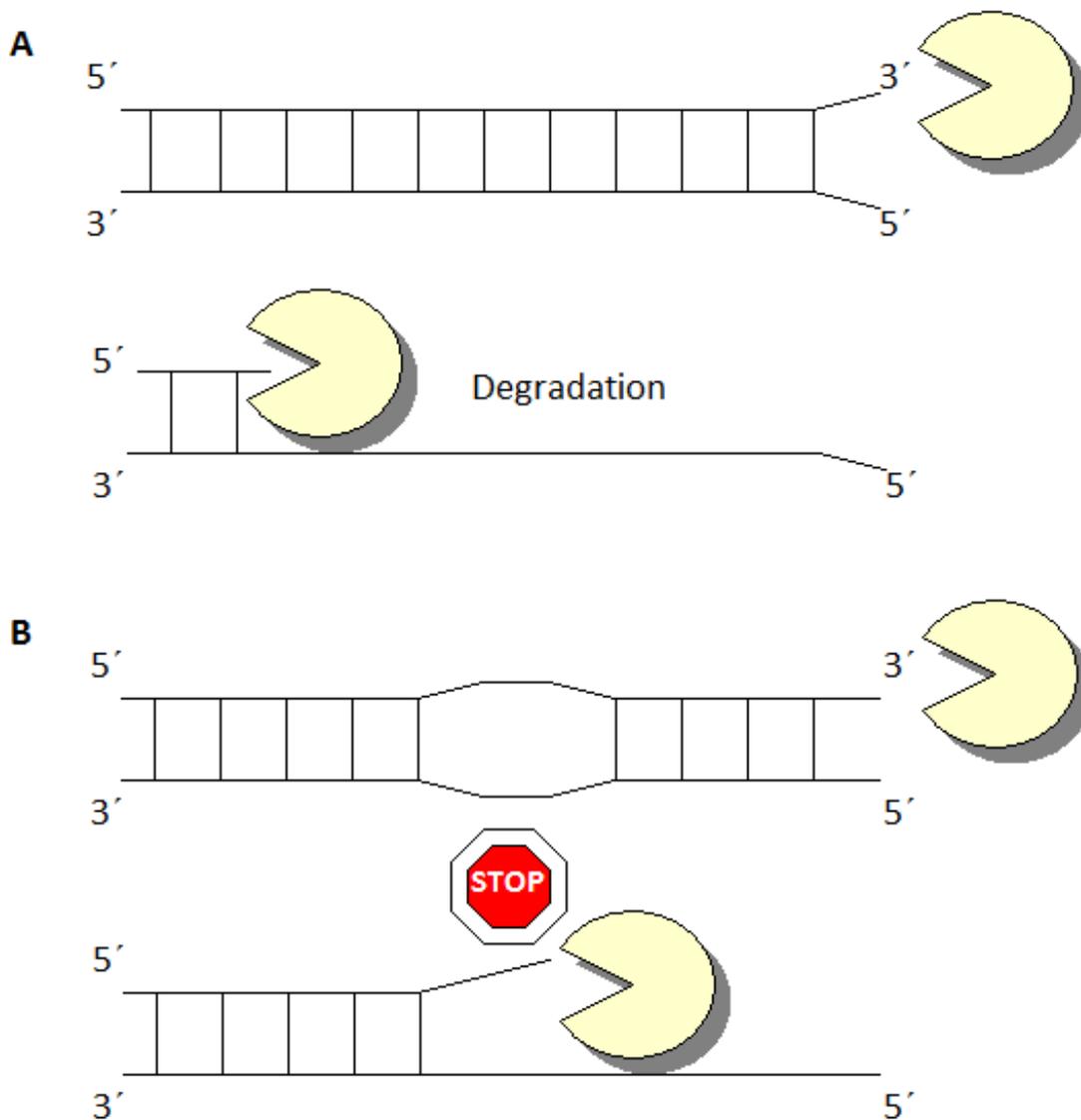


Abbildung 35 „Proofreading“

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung einer möglichen CavV-ExoN-Beteiligung im Kontext einer *Proofreading*-Funktion.

(A) Bei Antreffen der ExoN auf ein doppelsträngiges RNA-Substrat mit einer terminalen oder internen Fehlpaarung, wird der initial gebundene Strang in Anlehnung an die erhobenen Daten aus dieser Arbeit nahezu komplett in 3'-5'-Richtung degradiert.

(B) Führt die ExoN ihre spezifische exoribonukleolytische Funktion aus und trifft auf mehrfache (2-3) interne Fehlpaarungen, verlangsamt sie den Degradationsprozess und verweilt in unmittelbarer Nähe zu den internen Fehlpaarungen. Nach Entfernung der ungepaarten Nucleotide könnte dann die Polymerase (möglicherweise unterstützt durch die Helikase) den Replikations-Transkriptions-Komplex repositionieren, um auf diese Weise die für eine Fortsetzung der RNA-Synthese erforderliche Position am 3'-Ende des neu synthetisierten RNA-Strangs einzunehmen, worauf die RNA-Synthese fortgeführt werden kann.

5.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein System etabliert werden, um die spezifische Aktivität der cavallyviralen ExoN in *In-vitro*-Exonuklease-Aktivitätstests zu untersuchen. Des Weiteren wurden drei Antikörper hergestellt, welche sowohl im Westernblot als auch in der Immunfluoreszenz-Konfokalmikroskopie zum spezifischen Nachweis mesoniviraler Proteine verwendet werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die mesonivirale ExoN als potente Exoribonuklease in 3' → 5'-Richtung agiert, die sowohl strukturierte ssRNA als auch dsRNA prozessiert in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Mg²⁺ (Mn²⁺). Anders als für z.B. die Aktivität der SARS-CoV-ExoN bekannt, konnte gezeigt werden, dass das Protein diese Funktion ohne ein weiteres virales Protein ausüben kann (SARS-CoV ExoN entfaltet seine komplette Funktionalität lediglich im Zusammenwirken mit nsp10). Neu in diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass die ExoN auch dsRNA-Substrate prozessieren kann, welche eine interne Fehlpaarung aufweisen. Derartige Experimente wurde bisher nicht für ExoN-Enzyme anderer Nidoviren publiziert. Hierbei scheint sie bei mehrfacher Basenfehlpaarung vor dieser ihre Prozessivität zu verlangsamen oder gar ganz einzustellen. Ein Verharren an dieser Position könnte im Zusammenhang mit ihrer Funktion im Rahmen des „*proofreading*“ stehen, so dass andere virale Proteine hier ansetzen und in Zusammenarbeit mit der ExoN diese Fehlpaarung aufheben und somit zu der mehrfach beschriebenen niedrigen Mutationsrate beitragen. Welche Proteine hierbei welche Rolle einnehmen, ist bisher nicht bekannt und Bedarf weiterer Bemühungen und intensiver Forschung in der Zukunft.

Die Motive wie auch die hochkonservierten Aminosäurereste der DEDDh-Superfamilie konnten größtenteils verifiziert werden, die Aminosäure D4545 sowie Motiv II muss hierbei ausgeklammert werden. Spätere Experimente zeigten eine andere Lokalisation des Motivs II und somit ein anderes Aspartat als Teil des DEDDh-Motives auf dem Polyprotein an.

Eine Verstärkung oder Modulation der CavV-ExoN-Aktivität durch andere virale Proteine, die eine ähnliche Rolle wie das SARS-CoV-nsp10 zur Unterstützung der ExoN-Aktivität haben könnten, konnte nicht nachgewiesen werden. Einerseits erfüllt die mesonivirale ExoN alle Funktionen, die die SARS-CoV-ExoN (nur) mit Hilfe von SARS-CoV-nsp10 erfüllt, andererseits war es nicht möglich das cavallyvirale Hpp7 zu exprimieren, welches als möglicher Kofaktor eine Rolle spielen könnte. Man könnte vermuten, dass nicht zwangsläufig die Effektivität der enzymatischen Aktivität gesteigert

werden könnte, sondern vielleicht die Substratspezifität. Vielleicht benötigt die mesonivirale ExoN aber auch keinen vergleichbaren unterstützenden Faktor für ihre Aktivität. Diese Frage gilt es in Zukunft zu beantworten.

Zusätzlich zu den gewonnenen Erkenntnissen zu den biochemischen Eigenschaften der mesoniviralen ExoN-Aktivität konnten in Zellkulturexperimenten C6/36 Zellen mit dem Virus infiziert werden und konfokalmikroskopisch untersucht werden. Unter Zuhilfenahme der in dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen die CavV-ExoN konnte das Protein im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert werden, wobei es mit viraler dsRNA kolokalisierte, was darauf hindeutet, dass die ExoN ein integraler Bestandteil des mesoniviralen Replikations-Transkriptions-Komplexes ist. Weiterführend sollte in Zukunft mit Hilfe der hergestellten Antikörper in geeigneten Zellkulturmodellen untersucht werden, welche subzellulären Lokalisationen die mesoniviralen Hpp8 und 9 einnehmen und ob auch diese Proteine Teil des Replikations-Transkriptions-Komplexes sind.

6 Zusammenfassung

Mesoniviren sind umhüllte RNA-Viren der Ordnung *Nidovirales*. Wie auch andere Viren dieser Ordnung kodieren Mesoniviren in ihrem Replikase-Gen eine Exoribonuklease (ExoN). Gegenstand der Arbeit war eine umfassende biochemische Charakterisierung dieses Enzyms. Dabei wurden die ExoN eines repräsentativen Mesonivirus (Cavally-Virus, CavV) und einige davon abgeleitete Enzymvarianten in *Escherichia coli* rekombinant hergestellt, mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt und hinsichtlich ihrer 3'-5'-Exoribonuklease-Aktivität und Substratspezifität mit Hilfe von radioaktiv markierten RNA-Testsubstraten untersucht. Zunächst wurden die für diese Aktivität erforderlichen Reaktionsbedingungen (Salzkonzentration, pH, Temperatur, Metallionen) und die Rolle möglicher Kofaktoren bestimmt. Die rekombinant hergestellte CavV-ExoN zeigte eine Mg^{2+} -Ionen-abhängige 3'-5'-Exoribonuklease-Aktivität *in vitro*. Untersuchungen von Proteinvarianten von ExoN mit Substitutionen einzelner konservierter Aminosäure-Reste der ExoN-DEEDh-Motive I, II und III durch Alanin unterstützten die vorhergesagte katalytische Rolle dieser Reste und zeigten, dass die gefundene nukleolytische Aktivität durch das heterolog exprimierte virale Protein, nicht jedoch potentiell kontaminierende bakterielle Nukleasen, vermittelt wurde. Experimente mit verschiedenen RNA-Substraten zeigten, dass doppelsträngige (ds) RNA und dsRNA mit einer terminalen Fehlpaarung die bevorzugten Substrate der CavV-ExoN darstellen. Auch dsRNA-Substrate mit internen Fehlpaarungen erwiesen sich als ausgezeichnete Substrate. Im Gegensatz dazu wurden dsRNA-Substrate mit zwei oder drei terminalen Fehlpaarungen oder auch homopolymerische einzelsträngige (ss) RNA-Substrate deutlich weniger effektiv gespalten. 3'-biotinylierte RNA-Substrate erwiesen sich als vollständig resistent gegenüber einer nukleolytischen Spaltung durch ExoN, wodurch eine mögliche Beteiligung einer endonukleolytischen Aktivität bei der Genese der beobachteten RNA-Degradationsprodukte ausgeschlossen werden konnte. In weiteren Experimenten wurden CavV-ORF1a-Proteine, die in einem ähnlichen Genomabschnitt wie das coronavirale nsp10 kodiert sind, in *E. coli* hergestellt, um eine mögliche ExoN-Aktivitätssteigerung durch diese Proteine zu untersuchen. Im Gegensatz zu coronaviralen ExoN/nsp10-Proteinkomplexen führte die Zugabe der CavV-ORF1a-Proteine jedoch zu keiner Stimulation der CavV-ExoN-Aktivität. Das gereinigte CavV-ExoN-Wildtyp-Protein wurde auch genutzt, um polyklonale Antikörper herzustellen, mit deren Hilfe die subzelluläre Lokalisation von ExoN in CavV-infizierten Zellen untersucht wurde. Immunfluoreszenz-Untersuchungen ergaben, dass ExoN mit dem Ort der viralen RNA-

Synthese im Zytoplasma infizierter Zellen kolokalisiert, was darauf hindeutet, dass die ExoN ein integraler Bestandteil des viralen Replikations-/Transkriptionskomplexes ist.

7 Summary

Mesoniviruses are enveloped RNA viruses of the order *Nidovirales*. Like other viruses of this order, mesoniviruses encode an exoribonuclease (ExoN) in their replicase gene. The subject of this work was a comprehensive biochemical characterization of this enzyme. For this purpose, the ExoN of a representative mesonivirus (Cavally virus, CavV) and some enzyme variants derived from this protein were recombinantly produced in *Escherichia coli*, purified by affinity chromatography, and investigated with respect to their 3'-5' exoribonuclease activity and substrate specificity using radiolabeled RNA substrates. First, the reaction conditions required for this activity (salt concentration, pH, temperature, metal ions) and the role of possible cofactors were determined. The recombinantly produced CavV-ExoN showed Mg²⁺ ion-dependent 3'-5' exoribonuclease activity *in vitro*. Studies of protein variants of ExoN with substitutions of individual conserved amino acid residues of ExoN-DEEDh motifs I, II, and III by alanine supported the predicted catalytic role of these residues and showed that the observed nucleolytic activity was mediated by the heterologously expressed viral protein but not potentially contaminating bacterial nucleases. Experiments with different RNA substrates revealed that double-stranded (ds) RNA and dsRNA with a terminal mismatch are the preferred substrates of CavV-ExoN. Also, dsRNA substrates with internal mismatches were found to be excellent substrates. In contrast, dsRNA substrates with two or three terminal mismatches or homopolymeric single-stranded (ss) RNA substrates were cleaved much less effectively. 3'-biotinylated RNA substrates were found to be completely resistant to nucleolytic cleavage by ExoN, ruling out the possible involvement of endonucleolytic activity in the genesis of the observed RNA degradation products. In further experiments, CavV-ORF1a proteins encoded in a similar genomic segment as coronaviral nsp10 were produced in *E. coli* to investigate possible ExoN activity enhancement by these proteins. However, in contrast to coronaviral ExoN/nsp10 protein complexes, addition of the CavV ORF1a proteins did not stimulate CavV-ExoN activity. The purified CavV-ExoN wild-type protein was also used to produce polyclonal antibodies that were used to investigate the subcellular localization of ExoN in CavV-infected cells. Immunofluorescence studies revealed that ExoN colocalizes with the site of viral RNA synthesis in the cytoplasm of infected cells, suggesting that ExoN is an integral component of the viral replication/transcription complex.

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIE ORDNUNG <i>NIDOVIRALES</i> UND IHRE UNTERORDNUNGEN	2
ABBILDUNG 2: SCHNITTSTELLEN DER CAVALLYVIRALEN HAUPTPROTEASE 3CL ^{PRO}	5
ABBILDUNG 3: GENOMORGANISATION DER NIDOVIRALES AM BEISPIEL DES MESONIVIRALEN CAVALLYVIRUS	6
ABBILDUNG 4: KRISTALLSTRUKTUR DES HETERODIMEREN KOMPLEXES VON SARS-COV NSP14 UND 10.....	15
ABBILDUNG 5: C6/36-ZELLEN.....	39
ABBILDUNG 6: UBIQUITINSYSTEM ZUR EXPRESSION DER GEWÜNSCHTEN PROTEINE	41
ABBILDUNG 7: VERWENDETE MESONIVIRALE EXON-KONSTRUKTE	42
ABBILDUNG 8: PROTEINAUFREINIGUNG VON CAVV-EXON-HIS ₇	44
ABBILDUNG 9: PROTEINAUFREINIGUNG VON CAVV-EXON-STREP.....	45
ABBILDUNG 10: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER EXPRIMIERTEN PROTEINE	46
ABBILDUNG 11: EXON-ANTIKÖRPERTESTUNG	48
ABBILDUNG 12: VERGLEICHENDE SEQUENZANALYSE VERSCHIEDENER MESONIVIRALER EXON-DOMÄNEN	49
ABBILDUNG 13: SDS-PAGE VON CAVV-EXON-PROTEINVARIANTEN UND CAVV-WILDTYP- EXON.....	51
ABBILDUNG 14: CAVV-EXON ALS INTEGRALER BESTANDTEIL DES REPLIKATIONSKOMPLEXES <i>IN VIVO</i>	53
ABBILDUNG 15: TESTEXPRESSION VON CAVV-HPP8 UND HPP9	55
ABBILDUNG 16: PROTEINAUFREINIGUNG VON CAVV-HPP8.....	56
ABBILDUNG 17: PROTEINAUFREINIGUNG VON CAVV-HPP9.....	57
ABBILDUNG 18: PROTEINAUFREINIGUNG VON CAVV-HPP8-9	58
ABBILDUNG 19: CAVV-HPP8-ANTIKÖRPERTESTUNG.....	59
ABBILDUNG 20: CAVV-HPP9-ANTIKÖRPERTESTUNG.....	59
ABBILDUNG 21: EINFLUSS DER AFFINITÄTSTAGS AUF DIE <i>IN-VITRO</i> - NUKLEASEAKTIVITÄT VON CAVV-EXON GEGENÜBER VERSCHIEDENEN RNA- SUBSTRATEN	62
ABBILDUNG 22: <i>IN-VITRO</i> -AKTIVITÄT VON CAVV-EXON AUF UNTERSCHIEDLICHE DSRNA-SUBSTRATE	64
ABBILDUNG 23: EINFLUSS DER PROTEINKONZENTRATION AUF DIE <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE- AKTIVITÄT DER CAVV-EXON	66
ABBILDUNG 24: EINFLUSS DER NA ₂ CL-KONZENTRATION AUF DIE <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE- AKTIVITÄT DER CAVV-EXON	67
ABBILDUNG 25: EINFLUSS VON DIVALENTEN METALLIONEN AUF DIE <i>IN-VITRO</i> - NUKLEASE-AKTIVITÄT DER CAVV-EXON.....	69
ABBILDUNG 26: VERGLEICH VON MAGNESIUM UND MANGAN AUF DIE <i>IN-VITRO</i> - NUKLEASE-AKTIVITÄT DER CAVV-EXON.....	70

ABBILDUNG 27: EINFLUSS DES PH-WERTES AUF DIE <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄT DER CAVV-EXON	71
ABBILDUNG 28: EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄT DER CAVV-EXON	72
ABBILDUNG 29: ZEITVERLAUF DER DEGRADATION VERSCHIEDENER RNA-SUBSTRATE DURCH DIE CAVV-EXON	73
ABBILDUNG 30: BESTIMMUNG DER <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄTEN DES CAVV-EXON-WILDTYP-PROTEINS UND DAVON ABGELEITETER EXON-VARIANTEN MIT ALANINSUBSTITUTIONEN KONSERVIERTER RESTE UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER DOPPELSTRÄNGIGER RNA-SUBSTRATE.....	75
ABBILDUNG 31: BESTIMMUNG DER <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄTEN DES CAVV-EXON-WILDTYP-PROTEINS UND DAVON ABGELEITETER EXON-VARIANTEN MIT ALANINSUBSTITUTIONEN KONSERVIERTER RESTE UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER EINZELSTRÄNGIGER RNA-SUBSTRATE.....	77
ABBILDUNG 32: BESTIMMUNG DER <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄTEN VON CAVV-EXON UND CAVV-HPP8 SOWIE EINER KOMBINATION DER BEIDEN PROTEINE	79
ABBILDUNG 33: BESTIMMUNG DER <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄTEN VON CAVV-EXON UND CAVV-HPP9 SOWIE EINER KOMBINATION DER BEIDEN PROTEINE	80
ABBILDUNG 34: BESTIMMUNG DER <i>IN-VITRO</i> -NUKLEASE-AKTIVITÄT DER CAVV-EXON UNTER OPTIMIERTEN REAKTIONSBEDINGUNGEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN METALLIONEN	82
ABBILDUNG 35 „ <i>PROOFREADING</i> “	93

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERSCHIEDENEN CORONAVIRALEN NICHTSTRUKTURPROTEINE.....	10
TABELLE 2: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND DEREN HERSTELLER	18
TABELLE 3: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN SOWIE DEREN ZUSAMMENSETZUNG	19
TABELLE 4: VERWENDETE ENZYME	21
TABELLE 5: VERWENDETE KITS.....	21
TABELLE 6: VERWENDETE MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN UND GRÖßENSTANDARDS SOWIE DEREN HERSTELLER.....	21
TABELLE 7: VERWENDETE ANTIKÖRPER INKLUSIVE DEREN HERKUNFT, KLONALITÄT, HERSTELLER UND VERWENDETER VERDÜNNUNG IN ANTIKÖRPERLÖSUNG	21
TABELLE 8: VERWENDETE ANTIBIOTIKA UND DEREN KONZENTRATIONEN	22
TABELLE 9: VERWENDETE PLASMIDE DEREN ANTIBIOTIKARESISTENZ UND PROMOTOR	22

TABELLE 10: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE ZUR HERSTELLUNG DER CAVV-EXON-HIS-PROTEINVARIANTEN	24
TABELLE 11: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE ZUR HERSTELLUNG DER CAVV HPP'S AUS DEM PP 1A ODER PP 1AB 2046-2504	25
TABELLE 12: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE ZUR SEQUENZIERUNG DER HERGESTELLTEN KONSTRUKTE.....	25
TABELLE 13: VERWENDETE EINZELSTRÄNGIGE SUBSTRATE.....	26
TABELLE 14: VERWENDETE DOPPELSTRANG-SUBSTRATE.....	26
TABELLE 15: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN SOWIE DEREN HERSTELLER ...	27
TABELLE 16: VERWENDETE GERÄTE UND VORRICHTUNGEN SOWIE DEREN HERSTELLER	28
TABELLE 17: ZUSAMMENSETZUNG DES SAMMEL- SOWIE TRENNGELS FÜR DIE SDS-PAGE	32
TABELLE 18: PCR-STANDARDREAKTIONSMIXTUR	35
TABELLE 19: REAKTIONSBEDINGUNGEN FÜR DIE PCR.....	35
TABELLE 20: REAKTIONSANSATZ γ - ³² P -END-MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	36
TABELLE 21: REAKTIONSANSATZ DER RNA-AKTIVITÄTSTESTS.....	37
TABELLE 22: ZUSAMMENSETZUNG DES DENATURIERENDEN 12 %-POLYACRYLAMID/7M-HARNSTOFF-GELS	38
TABELLE 23: OPTIMIERTE BEDINGUNGEN FÜR DIE CAVV-EXON- <i>IN-VITRO</i> -AKTIVITÄTSTESTS.....	74
TABELLE 24: OPTIMIERTE BEDINGUNGEN FÜR DIE CAVV-EXON <i>IN-VITRO</i> -AKTIVITÄTSTESTS.....	89

10 Abkürzungsverzeichnis

3CL ^{pro}	<i>3C like Protease</i>
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serum-Albumin)
Ca ²⁺	Kalzium
Cam	Chloramphenicol
CavV	Cavallyvirus

cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
Co ²⁺	Kobalt
CoV	Coronavirus
°C	Grad Celsius
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (aus dem engl. <i>desoxyribonucleinacid</i>)
ds	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency Europäische Arzneimittelbehörde
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
ExoN	Exonuklease
FDA	US Food and Drug Administration US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
fw	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
Hpp	Hauptprotease(3Cl ^{Pro})-Spaltprodukte
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
ICTV	<i>International Committee of the Taxonomy of Viruses</i>
LB	Luria Bertani
M	Marker
mA	Milliampere
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MERS	<i>Middle east respiratory syndrome</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
Min.	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn ²⁺	Mangan
M ^{pro}	Main protease (Hauptprotease)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NendoU	Endoribonuklease
nsp	<i>nonstructural protein</i> (Nichtstrukturprotein)
NTR	Nichttranslatierte Region
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	potential hydrogenii
PL ^{pro}	Papain-ähnliche Protease
PNK	Polynukleotidkinase
pp	Polyprotein
RdRp	<i>RNA-dependent RNA-polymerase</i> (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RFS	<i>ribosomale frameshift</i> (Ribosomale Leserasterverschiebung)
RNA	Ribonukleinsäure (aus dem engl. <i>ribonucleinacid</i>)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Rotationen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTC	Replikations-Transkriptions-Komplex
RV	<i>reverse</i> (rückwärts)
s.	siehe
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SDS PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)-

	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
Sek.	Sekunde
sg	subgenomisch
ss	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Bor-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	<i>transmembrane domaine</i> (Transmembran-Domäne)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitin
Ubp1	Ubiquitin spezifische Protease
UV	Ultraviolett (UV-Licht)
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
Zn ²⁺	Zink

Die Namen der Aminosäuren sind in dieser Arbeit nach der Nomenklatur von IUPAC mit den Ein- sowie Dreibuchstaben-Codes abgekürzt. Die Zahlen hinter den Buchstaben geben die Position der Aminosäure in der Aminosäuresequenz des Cavallyvirus wieder (beginnend am C-Terminus). Mutagenetisch veränderte Substitutionen von spezifischen Aminosäuren der Wildtypsequenz werden durch einen Unterstrich „_“ mit darauffolgender Position sowie den Großbuchstaben des Einbuchstaben Codes nach IUPAC der Ursprungsaminosäure und der substituierten Aminosäure gekennzeichnet. So bedeutet etwa pp1a_D4364A der Austausch der Aminosäure Asparagin (D) an der Position 4364 des Polyproteins 1a des Cavallyvirus beginnend vom N-Terminus mit der Aminosäure Alanin (A).

11 Literaturverzeichnis

- Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J., & Hilgenfeld, R. (2002). Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J*, *21*(13), 3213-3224. doi:10.1093/emboj/cdf327
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., & Talbot, P. J. (2000). Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol*, *74*(19), 8913-8921. doi:10.1128/jvi.74.19.8913-8921.2000
- Balboni, A., Battilani, M., & Prosperi, S. (2012). The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus. *New Microbiol*, *35*(1), 1-16.
- Barlow, A. L., Macleod, A., Noppen, S., Sanderson, J., & Guerin, C. J. (2010). Colocalization analysis in fluorescence micrographs: verification of a more accurate calculation of pearson's correlation coefficient. *Microsc Microanal*, *16*(6), 710-724. doi:10.1017/S143192761009389X
- Becares, M., Pascual-Iglesias, A., Nogales, A., Sola, I., Enjuanes, L., & Zuniga, S. (2016). Mutagenesis of Coronavirus nsp14 Reveals Its Potential Role in Modulation of the Innate Immune Response. *J Virol*, *90*(11), 5399-5414. doi:10.1128/JVI.03259-15
- 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. doi:10.1126/science.8469987
- 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. *EMBO J*, *10*(1), 25-33.
- Blanck, S., Stinn, A., Tsiklauri, L., Zirkel, F., Junglen, S., & Ziebuhr, J. (2014). Characterization of an alphamesonivirus 3C-like protease defines a special group of nidovirus main proteases. *J Virol*, *88*(23), 13747-13758. doi:10.1128/JVI.02040-14
- Blanck, S., & Ziebuhr, J. (2016). Proteolytic processing of mesonivirus replicase polyproteins by the viral 3C-like protease. *J Gen Virol*, *97*(6), 1439-1445. doi:10.1099/jgv.0.000458
- 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. *J Virol*, *74*(7), 3379-3387. doi:10.1128/jvi.74.7.3379-3387.2000
- 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 Pathog*, *6*(4), e1000863. doi:10.1371/journal.ppat.1000863
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(24), 9372-9377. doi:10.1073/pnas.1201130109
- Bouvet, M., Lugari, A., Posthuma, C. C., Zevenhoven, J. C., Bernard, S., Betzi, S., . . . Morelli, X. (2014). Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem*, *289*(37), 25783-25796. doi:10.1074/jbc.M114.577353
- Breiman, R. F., Evans, M. R., Preiser, W., Maguire, J., Schnur, A., Li, A., . . . MacKenzie, J. S. (2003). Role of China in the quest to define and control severe acute

- respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis*, 9(9), 1037-1041. doi:10.3201/eid0909.030390
- Brierley, I., Bournsnel, M. E., Binns, M. M., Bilimoria, B., Blok, V. C., Brown, T. D., & Inglis, S. C. (1987). An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J*, 6(12), 3779-3785.
- Brierley, I., Digard, P., & Inglis, S. C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, 57(4), 537-547. doi:10.1016/0092-8674(89)90124-4
- 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. *J Virol*, 78(21), 11551-11562. doi:10.1128/JVI.78.21.11551-11562.2004
- Bull, J. J., Meyers, L. A., & Lachmann, M. (2005). Quasispecies made simple. *PLoS Comput Biol*, 1(6), e61. doi:10.1371/journal.pcbi.0010061
- Chen, P., Jiang, M., Hu, T., Liu, Q., Chen, X. S., & Guo, D. (2007). Biochemical characterization of exoribonuclease encoded by SARS coronavirus. *J Biochem Mol Biol*, 40(5), 649-655.
- De Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., . . . Ziebuhr, J. (2012). Virus Taxonomy. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), (pp. 785-795). Amsterdam: Elsevier.
- Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol*, 8(2), 270-279. doi:10.4161/rna.8.2.15013
- 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. *EMBO J*, 10(1), 17-24.
- 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. *J Virol*, 81(12), 6356-6368. doi:10.1128/JVI.02805-06
- Dos Ramos, F., Carrasco, M., Doyle, T., & Brierley, I. (2004). Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6), 1081-1083. doi:10.1042/BST0321081
- Drake, J. W., & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13910-13913. doi:10.1073/pnas.96.24.13910
- Drosten, C., Preiser, W., Gunther, S., Schmitz, H., & Doerr, H. W. (2003). Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med*, 9(8), 325-327.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(4), C723-742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
- Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., Lu, X., . . . Denison, M. R. (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*, 6(5), e1000896. doi:10.1371/journal.ppat.1000896
- 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. *J Virol*, 81(22), 12135-12144. doi:10.1128/JVI.01296-07
- Ferron, F., Subissi, L., Silveira De Moraes, A. T., Le, N. T. T., Sevajol, M., Gluais, L., . . . Imbert, I. (2018). Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(2), E162-E171. doi:10.1073/pnas.1718806115

- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins.
- 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 Expr Purif*, *17*(1), 128-138. doi:10.1006/prev.1999.1100
- Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., & Snijder, E. J. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*, *117*(1), 17-37. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.017
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., & Baker, S. C. (2002). RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol*, *76*(8), 3697-3708. doi:10.1128/jvi.76.8.3697-3708.2002
- Hamdan, S., Carr, P. D., Brown, S. E., Ollis, D. L., & Dixon, N. E. (2002). Structural basis for proofreading during replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Structure*, *10*(4), 535-546. doi:10.1016/s0969-2126(02)00738-4
- Hastie, K. M., Kimberlin, C. R., Zandonatti, M. A., MacRae, I. J., & Sapphire, E. O. (2011). Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(6), 2396-2401. doi:10.1073/pnas.1016404108
- Herold, J., Gorbalenya, A. E., Thiel, V., Schelle, B., & Siddell, S. G. (1998). Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J Virol*, *72*(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 Res*, *21*(25), 5838-5842. doi:10.1093/nar/21.25.5838
- Herold, J., Siddell, S. G., & Gorbalenya, A. E. (1999). A human RNA viral cysteine proteinase that depends upon a unique Zn²⁺-binding finger connecting the two domains of a papain-like fold. *J Biol Chem*, *274*(21), 14918-14925. doi:10.1074/jbc.274.21.14918
- Imbert, I., Snijder, E. J., Dimitrova, M., Guillemot, J. C., Lecine, P., & Canard, B. (2008). The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res*, *133*(2), 136-148. doi:10.1016/j.virusres.2007.11.017
- Joseph, J. S., Saikatendu, K. S., Subramanian, V., Neuman, B. W., Buchmeier, M. J., Stevens, R. C., & Kuhn, P. (2007). Crystal structure of a monomeric form of severe acute respiratory syndrome coronavirus endonuclease nsp15 suggests a role for hexamerization as an allosteric switch. *J Virol*, *81*(12), 6700-6708. doi:10.1128/JVI.02817-06
- Kanitz, M., Blanck, S., Heine, A., Gulyaeva, A. A., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J., & Diederich, W. E. (2019). Structural basis for catalysis and substrate specificity of a 3C-like cysteine protease from a mosquito mesonivirus. *Virology*, *533*, 21-33. doi:10.1016/j.virol.2019.05.001
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., . . . Snijder, E. J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol*, *6*(9), e226. doi:10.1371/journal.pbio.0060226
- Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P. T., . . . Gorbalenya, A. E. (2012). Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch Virol*, *157*(8), 1623-1628. doi:10.1007/s00705-012-1295-x

- Liu, D. X., Fung, T. S., Chong, K. K., Shukla, A., & Hilgenfeld, R. (2014). Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res*, *109*, 97-109. doi:10.1016/j.antiviral.2014.06.013
- Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., . . . Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(30), 9436-9441. doi:10.1073/pnas.1508686112
- Maier, H. J., Hawes, P. C., Cottam, E. M., Mantell, J., Verkade, P., Monaghan, P., . . . Britton, P. (2013). Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *MBio*, *4*(5), e00801-00813. doi:10.1128/mBio.00801-13
- Matthes, N., Mesters, J. R., Coutard, B., Canard, B., Snijder, E. J., Moll, R., & Hilgenfeld, R. (2006). The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett*, *580*(17), 4143-4149. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.061
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(13), 5108-5113. doi:10.1073/pnas.0508200103
- Nga, P. T., Parquet Mdel, C., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F., . . . Gorbalenya, A. E. (2011). Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathog*, *7*(9), e1002215. doi:10.1371/journal.ppat.1002215
- Pan, J., Peng, X., Gao, Y., Li, Z., Lu, X., Chen, Y., . . . Guo, D. (2008). Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One*, *3*(10), e3299. doi:10.1371/journal.pone.0003299
- Plant, E. P., & Dinman, J. D. (2008). The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Front Biosci*, *13*, 4873-4881. doi:10.2741/3046
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, *42*(Web Server issue), W320-324. doi:10.1093/nar/gku316
- Saberi, A., Gulyaeva, A. A., Brubacher, J. L., Newmark, P. A., & Gorbalenya, A. E. (2018). A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. *PLoS Pathog*, *14*(11), e1007314. doi:10.1371/journal.ppat.1007314
- Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J Virol*, *84*(19), 9733-9748. doi:10.1128/JVI.00694-10
- Sawicki, S. G., & Sawicki, D. L. (1995). Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*, *380*, 499-506. doi:10.1007/978-1-4615-1899-0_79
- 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 Pathog*, *1*(4), e39. doi:10.1371/journal.ppat.0010039
- Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B., & Imbert, I. (2014). Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res*, *194*, 90-99. doi:10.1016/j.virusres.2014.10.008
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, *7*, 539. doi:10.1038/msb.2011.75
- Smith, E. C., Blanc, H., Surdel, M. C., Vignuzzi, M., & Denison, M. R. (2013). Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal

- mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003565. doi:10.1371/journal.ppat.1003565
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., . . . Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol*, 331(5), 991-1004. doi:10.1016/s0022-2836(03)00865-9
- Snijder, E. J., Decroly, E., & Ziebuhr, J. (2016). The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res*, 96, 59-126. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.008
- Sola, I., Almazan, F., Zuniga, S., & Enjuanes, L. (2015). Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*, 2(1), 265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218
- Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., . . . Siddell, S. G. (1983). Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J*, 2(10), 1839-1844.
- Steitz, T. A., & Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14), 6498-6502. doi:10.1073/pnas.90.14.6498
- Su, D., Lou, Z., Sun, F., Zhai, Y., Yang, H., Zhang, R., . . . Rao, Z. (2006). Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol*, 80(16), 7902-7908. doi:10.1128/JVI.00483-06
- Su, M. C., Chang, C. T., 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 Res*, 33(13), 4265-4275. doi:10.1093/nar/gki731
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., & Canard, B. (2014). SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res*, 101, 122-130. doi:10.1016/j.antiviral.2013.11.006
- Thoms, M., Buschauer, R., Ameismeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., . . . Beckmann, R. (2020). Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*, 369(6508), 1249-1255. doi:10.1126/science.abc8665
- Thuy, N. T., Huy, T. Q., Nga, P. T., Morita, K., Dunia, I., & Benedetti, L. (2013). A new nidovirus (NamDinh virus NDiV): Its ultrastructural characterization in the C6/36 mosquito cell line. *Virology*, 444(1-2), 337-342. doi:10.1016/j.virol.2013.06.030
- Ulferts, R., & Ziebuhr, J. (2011). Nidovirus ribonucleases: Structures and functions in viral replication. *RNA Biol*, 8(2), 295-304. doi:10.4161/rna.8.2.15196
- van den Hoogen, B. G., de Jong, J. C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R. A., & Osterhaus, A. D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, 7(6), 719-724. doi:10.1038/89098
- Vasilakis, N., Guzman, H., Firth, C., Forrester, N. L., Widen, S. G., Wood, T. G., . . . Tesh, R. B. (2014). Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range. *Virol J*, 11, 97. doi:10.1186/1743-422X-11-97
- von Brunn, A., Teepe, C., Simpson, J. C., Pepperkok, R., Friedel, C. C., Zimmer, R., . . . Haas, J. (2007). Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome. *PLoS One*, 2(5), e459. doi:10.1371/journal.pone.0000459
- Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 287, 57-94. doi:10.1007/3-540-26765-4_3

- Ziebuhr, J. (2008). Coronavirus replicative proteins. In S. Perlman, T. Gallagher, & E. J. Snijder (Eds.), *Nidoviruses*. Washington, DC: ASM Press.
- Ziebuhr, J., Herold, J., & Siddell, S. G. (1995). Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J Virol*, *69*(7), 4331-4338.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J., & Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*, *81*(Pt 4), 853-879. doi:10.1099/0022-1317-81-4-853
- Ziebuhr, J., Thiel, V., & Gorbalenya, A. E. (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem*, *276*(35), 33220-33232. doi:10.1074/jbc.M104097200
- Zirkel, F., Kurth, A., Quan, P. L., Briese, T., Ellerbrok, H., Pauli, G., . . . Junglen, S. (2011). An insect nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. *MBio*, *2*(3), e00077-00011. doi:10.1128/mBio.00077-11
- Zirkel, F., Roth, H., Kurth, A., Drosten, C., Ziebuhr, J., & Junglen, S. (2013). Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family Mesoniviridae. *J Virol*, *87*(11), 6346-6358. doi:10.1128/JVI.00416-13
- Zuo, Y., & Deutscher, M. P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res*, *29*(5), 1017-1026. doi:10.1093/nar/29.5.1017

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift