

Virale Makrodomänen: biochemische Charakterisierung und Rolle in der Regulation
zellulärer ADP-Ribosyltransferasen

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

vorgelegt von Hartmann, Holger
aus Berlin

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Medizinische Virologie

Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 18.03.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Coronaviren	1
1.1.1	Taxonomie	3
1.1.2	Morphologie	4
1.1.3	Genomorganisation	7
1.1.4	Genomreplikation und Translation	8
1.2	Makrodomänen	11
1.2.1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs)	12
1.2.2	Coronavirale Makrodomäne	13
1.3	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.2.1	Puffer und Lösungen	19
2.1.2.1.1	Puffer zur Präparation chemisch kompetenter Zellen	19
2.1.2.1.1.1	CaCl ₂ -Puffer	19
2.1.2.1.2	Puffer zur DNA-Isolation	19
2.1.2.1.2.1	Puffer 1 (DNA-Minipräparation)	19
2.1.2.1.2.2	Puffer 2 (DNA-Minipräparation)	19
2.1.2.1.2.3	Puffer 3 (DNA-Minipräparation)	19
2.1.2.1.3	Puffer für Arbeiten mit Proteinen	19
2.1.2.1.3.1	Protein-Puffer für Co ²⁺ -TALON®-Affinitätschromatographie	19
2.1.2.1.3.1.1	Puffer A	19
2.1.2.1.3.1.2	Puffer B	20
2.1.2.1.3.1.3	Dialysepuffer	20
2.1.2.1.3.2	Protein-Puffer für Glutathion Sepharose™-Aufreinigung	20
2.1.2.1.3.2.1	Lysis- und Dialysepuffer	20
2.1.2.1.3.2.2	Elutionspuffer	20
2.1.2.1.3.3	Aktivitätsassaypuffer	21
2.1.2.1.3.3.1	Pulldown-Puffer	21
2.1.2.1.3.3.2	1x-ADPr-Puffer	21
2.1.2.1.3.4	Puffer zur Proteinquantifizierung	21
2.1.2.1.3.4.1	Bradfordpuffer	21
2.1.2.1.3.5	Puffer für Elektrophoresen	21
2.1.2.1.3.5.1	1x SDS-Laufpuffer	21
2.1.2.1.3.5.2	5x SDS-Ladepuffer	22

2.1.2.1.3.5.3	Coomassie-Färbelösung	22
2.1.2.1.3.5.4	50x Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer	22
2.1.2.1.3.5.5	5x TAE-Ladepuffer	22
2.1.2.1.3.5.6	1x Transferpuffer	22
2.1.2.1.3.5.7	1x TBS (engl. Tris-buffered saline)-Puffer	23
2.1.2.1.3.5.8	1x TBST-Puffer	23
2.1.2.1.3.5.9	PBS (engl. phosphate buffered saline)-Puffer (pH 7,4)	23
2.1.2.1.3.5.10	PBST-Puffer	23
2.1.2.2	Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien	23
2.1.2.3	Enzyme	24
2.1.2.4	Marker	24
2.1.3	Plasmide	24
2.1.4	Oligonukleotide für Klonierungen	24
2.1.5	Oligonukleotide für ortsspezifische Mutagenesen	26
2.1.6	Oligonukleotide für Sequenzierung	28
2.1.7	Bakterienstämme	28
2.1.8	Antibiotika	29
2.1.9	EDV-Programme	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Biologische Sicherheit	30
2.2.2	Aktivitätsprüfung viraler Makrodomänen	30
2.2.2.1	Präparation chemisch kompetenter E. coli	30
2.2.2.2	Ortsspezifische Mutagenese von Plasmiden	30
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.2.4	DNA-Sequenzierung	31
2.2.2.5	DNA-Aufreinigung	31
2.2.2.6	Transformation kompetenter E. coli-Zellen	31
2.2.2.7	Plasmid-DNA-Isolation	31
2.2.2.8	Virale Proteinexpression in E. coli-Bakterien	32
2.2.2.9	Proteinexpression und -aufreinigung von PARP10	33
2.2.2.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.2.2.11	Semi-dry-Westernblot	34
2.2.2.12	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.2.2.13	De-mono-ADP-Ribosylierungsexperiment	35
2.2.2.13.1	Biotin-NAD ⁺ als Substrat	35
2.2.2.13.2	³² P-NAD ⁺ als Substrat	36
2.2.3	Transkriptomanalyse	37
2.2.3.1	Zelllinien	37
2.2.3.1.1	Huh-7-Zellen	37
2.2.3.1.2	MRC-5-Zellen	37
2.2.3.2	Zellkultur und Medien	38

2.2.3.3	Auftauen von etablierten Zelllinien	38
2.2.3.4	Infektion.....	38
2.2.3.5	RNA-Transfektion.....	39
2.2.3.6	Plaque-Assay	39
2.2.3.7	Virusaufreinigung	40
2.2.3.8	Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID ₅₀) Assay	40
2.2.3.9	Immunfluoreszenzfärbung	40
2.2.3.10	RNA-Aufreinigung	41
2.2.4	Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Klonierung viraler cDNAs, Proteinproduktion und Proteinaufreinigung	42
3.1.1	HCoV-229E.....	42
3.1.2	Chikungunya-Virus (CHIKV).....	45
3.1.3	Hepatitis-E-Virus (HEV)	46
3.1.4	Weißbrassenvirus (WBV)	48
3.2	Expression und Aufreinigung von PARP10	49
3.3	Untersuchung des Einflusses der Makrodomäne auf Replikation und Infektion	50
3.3.1	Immunfluoreszenz	50
3.4	Überprüfung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität viraler Makrodomänen	52
3.4.1	De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomänen von HCoV-229E, HEV, CHIKV und WBV	54
3.4.2	De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität coronaviraler Makrodomänenmutanten ...	57
3.5	Transkriptomanalyse.....	65
3.5.1	Differentielle Genexpression in mit HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen	65
3.5.2	Deregulierte humane PARPs in MRC-5-Zellen nach HCoV-229E-Infektion	68
3.5.3	IFN- β -abhängig differentiell regulierte PARPs in nichtinfizierten MRC-5-Zellen ...	69
3.5.4	IFN- β -abhängig deregulierte PARPs in HCoV-229E-infizierten Zellen	71
3.5.5	PARP-Regulation in MRC-5-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.....	72
3.5.6	PARP-Regulation in mit Interferon- β vorbehandelten MRC-5-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E	74
4	Diskussion	76
4.1	Biotin-NAD ⁺ versus ³² P-NAD ⁺ als detektierbares Substrat für die De-mono-ADP-Ribosylierungsexperimente.....	76
4.2	Expression und Aktivität viraler Makrodomänen im Vergleich	77
4.3	Expression und Aktivität coronaviraler Makrodomänen	77

4.3.1	Mutationen in der Region der Schleife 1	78
4.3.2	Mutationen in der Region der Schleife 2	80
4.3.3	Mutationen außerhalb von Schleife 1 und Schleife 2	82
4.4	PARP-Expression als zelluläre Antwort auf die Infektion mit HCoV-229E ...	83
4.5	Ausblick	85
5	<i>Zusammenfassung</i>	86
5.1	Summary	87
6	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	88
7	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	91
8	<i>Tabellenverzeichnis</i>	93
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	94
10	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	116
11	<i>Danksagung</i>	117
12	<i>Tabellarischer Lebenslauf</i>	117

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

Bereits im Jahr 1931 beschrieben Arthur F. Schalk und Merle C. Hawn vom *North Dakota Agricultural College* eine neue, hoch ansteckende Erkrankung, die den oberen Respirationstrakt von neugeborenen Hühnern befiel und dabei eine hohe Letalität aufwies (Schalk & Hawn, 1931). Beaudette und Hudson gelang es 1937, das als infektiöses Bronchitisvirus (IBV) bekannte Coronavirus zu kultivieren (Beaudette & Hudson, 1937). Das Genom des sogenannten Beaudette-Stammes von IBV wurde als erstes Coronavirus im Jahr 1986 vollständig sequenziert (Boursnell et al., 1987).

Ein neuartiges humanpathogenes Virus wurde im Winter 1962 aus dem Nasensekret von Medizinstudenten der *Chicago University* entnommen und in der Folge isoliert und charakterisiert. Es erhielt den Namen 229E (Hamre & Procknow, 1966). 1968 schlugen acht Wissenschaftler gemeinsam vor, die bis dato nicht näher klassifizierten neuartigen Viren IBV, Maus-Hepatitisvirus (MHV), 229E und B814 aufgrund ihrer gemeinsamen Morphologie, die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen entfernte Ähnlichkeiten mit der Sonnenkorona gezeigt hatte, zur Gruppe der Coronaviren zusammenzufassen (Almeida et al., 1968). Im Jahr 1976 hat das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) die Familie *Coronaviridae* und das Genus *Coronavirus* legitimiert (Fenner & Maurin, 1976). Spätere Revisionen der Virustaxonomie führten dazu, dass Coronaviren im engeren Sinne inzwischen die Unterfamilie der *Orthocoronavirinae* in der Familie *Coronaviridae* bilden. Die Unterfamilie *Orthocoronavirinae* wird in 4 Genera eingeteilt, die als *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- und *Deltacoronavirus* bezeichnet werden (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2022; Zerbini et al., 2023).

Aktuell sind sieben humanpathogene Coronaviren bekannt (Andersen et al., 2020), die sechs unterschiedlichen Coronavirusspezies der Alpha- und Betacoronaviren angehören (Gorbalenya et al., 2020).

Die Mehrzahl der bekannten humanpathogenen Coronaviren verursacht zumeist milde, respiratorische Infektionen und nur selten, bei entsprechender Prädisposition, schwere Infektionen des unteren Atemtraktes mit Pneumonie und teils letalem Ausgang (Pene et al., 2003; Vabret et al., 2003). Zu diesen Coronaviren zählen: HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-HKU1 (Corman et al., 2019).

Im Jahr 2002 erlangte ein bis dato unbekanntes Coronavirus weltweite Bekanntheit. Es handelt sich um das *Severe-acute-respiratory-syndrome*-Coronavirus (SARS-CoV). Nach seinem erstmaligen Auftreten im November 2002 in der Provinz Guangdong im

südlichen China verbreitete sich das Virus durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung bis 2003 erst über die Grenzen Chinas hinaus in die Nachbarländer und später weltweit, sodass die Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization* (WHO)) im März 2003 einen weltweiten Alarm ausrief, bevor die Infektionszahlen im Sommer 2003 stetig fielen (World Health Organization (WHO), 2003; Zhong et al., 2003; Oshitani, 2005; Su et al., 2016; Yin & Wunderink, 2018). Der WHO sind weltweit 8096 Infektionen mit SARS-CoV gemeldet worden, wovon 774 letal verliefen. Die meisten dieser Fälle wurden aus China und Hong Kong gemeldet (World Health Organization (WHO), 2015). Die häufigsten Symptome waren Fieber, Husten und Auswurf. Die Erkrankung kann zu einer interstitiellen Pneumonie, mit pulmonaler Schädigung, Organversagen und Tod führen. Zudem hatte die Mehrzahl der Infizierten pathologische Veränderungen der Lunge in der Röntgen-Thorax-Untersuchung (Xu et al., 2004; Drosten et al., 2003).

Im Juni 2012 erkrankte ein 60 Jahre alter Mann in Saudi-Arabien an einer Infektion mit einem zuvor unbekannten Virus. 11 Tage nach der Krankenhauseinweisung verstarb der Patient an respiratorischem Versagen und akuter Nierenschädigung (Zaki et al., 2012). Die *Coronavirus Study Group* (CSG) des *International Committee on Taxonomy of Viruses* benannte dieses Coronavirus als *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) (de Groot et al., 2013). Die Infektion mit MERS-CoV verläuft häufig schwer mit hoher Letalität (Al-Dorzi et al., 2016). Wie auch bei der durch SARS-CoV hervorgerufenen Erkrankung leiden die Patienten bei Hospitalisierung an Fieber, Husten, Dyspnoe, Hals- und Muskelschmerzen. Atypische Symptome wie Diarrhoe und Erbrechen wurden auch beobachtet (Assiri et al., 2013; Buchholz et al., 2013; Saad et al., 2014; Arabi et al., 2014; Yin & Wunderink, 2018). Insgesamt wurden der WHO bis zum September 2019 2468 bestätigte Infektionen mit MERS-CoV in 27 Ländern gemeldet, wovon 851 letal verliefen (World Health Organization (WHO), 2019).

Ausgehend von Wuhan, der Hauptstadt der chinesischen Provinz Hubei, kam es im Dezember 2019 zu Fällen von atypischer Pneumonie in Menschen durch ein bisher unbekanntes Virus (Wu et al., 2020b). Genomsequenzierungen erbrachten die Erkenntnis, dass es sich um ein neuartiges Coronavirus handelt (Wu et al., 2020a; Zhu et al., 2020; Zhou et al., 2020). Die Herkunft dieses Virus und die Umstände seiner erstmaligen Übertragung auf den Menschen sind derzeit noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt. Es gilt jedoch als sehr wahrscheinlich, dass es sich um zoonotisches Virus handelt, das sein natürliches Reservoir in Tieren (vermutlich Fledermäusen) hat und möglicherweise über einen oder mehrere Zwischenwirte wiederholt auf einzelne Menschen übertragen wurde (Lu et al., 2020; World Health Organization (WHO), 2021). Die Weiterverbreitung erfolgte dann durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung, die durch spezifische Mutationen im Virusgenom im Laufe der Pandemie zunehmend effizienter

wurde (Chan et al., 2020; Araf et al., 2022; Shanmugaraj et al., 2022). Die Erkrankung wurde später Covid-19 benannt und das Virus, aufgrund der großen Übereinstimmung des Genoms mit SARS-CoV, wurde SARS-CoV-2 benannt (Gorbalenya et al., 2020). Innerhalb weniger Wochen konnte sich das Virus weltweit ausbreiten, sodass die Weltgesundheitsorganisation am 11.03.2020 erklären musste, dass es sich um eine Pandemie handelt (World Health Organization (WHO), 2020). Seit Beginn der Pandemie bis zum 16. Juli 2023 haben sich über 768 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert. Von diesen verstarben über 6,9 Millionen (World Health Organization (WHO), 2023).

1.1.1 Taxonomie

Die moderne taxonomische Klassifizierung von Viren erfolgt ausschließlich auf der Grundlage der Genomsequenz anhand von Übereinstimmungen in der Sequenzanalyse. (Simmonds, 2015; Lefkowitz et al., 2018).

Die Subordnungen *Abnidovirineae*, *Arnidovirineae*, *Cornidovirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidovirineae*, *Nanidovirineae*, *Ronidovirineae* und *Tornidovirineae* bilden die Ordnung der *Nidovirales*. Dies sind behüllte Viren mit einem positivsträngigen RNA-Genom. Viele – jedoch nicht alle – Nidoviren exprimieren alle Gene, die im 3'-terminalen Bereich des Genoms hinter dem 5'-terminal lokalisierten Replikase-Gen liegen, über einen typischen „geschachtelten“ (engl. „nested“) und 3'-koterminalen Satz subgenomischer mRNAs (Cavanagh & Britton, 2008). Mit wenigen Ausnahmen wird jeweils nur das 5'-terminal gelegene offene Leseraster dieser unterschiedlich großen mRNAs translatiert (Enjuanes et al., 2008). Das internationale Komitee für die Taxonomie von Viren (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) ordnet die Coronaviren wie folgt ein: Innerhalb der Subordnung der *Cornidovirineae* befindet sich die Familie der *Coronaviridae*, die sich in die drei Subfamilien *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* und *Pitovirinae* gliedert. Die derzeitigen bekannten humanpathogenen Coronaviren befinden sich alle in der Subfamilie der *Orthocoronavirinae*. Die Spezies *Human coronavirus 229E* des Subgenus *Duvinacovirus* und die Spezies *Human coronavirus NL63* des Subgenus *Setracovirus* gehören dem Genus *Alphacoronavirus* an. Die Spezies *Betacoronavirus 1* und *Human coronavirus HKU1* des Subgenus *Embecovirus*, die Spezies *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* des Subgenus *Merbecovirus* sowie die Spezies *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* des Subgenus *Sarbecovirus* gehören dem Genus *Betacoronavirus* an. In den Genera *Gammacoronavirus* und *Deltacoronavirus* befinden sich nach aktuellem Stand keine

humanpathogenen Coronaviren (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2022).

Tabelle 1: Einordnung der humanpathogenen Coronaviren nach der Klassifikation des *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, 2021. Gekürzte Darstellung mit Fokus auf die Einordnung der humanpathogenen Coronaviren. Die humanpathogenen Coronaviren befinden sich in unterschiedlichen Spezies der Genera *Alphacoronavirus* und *Betacoronavirus*.

Ordnung	Nidovirales							
Subordnung	Coronavirineae							
Familie	Coronaviridae							
Subfamilie	Orthocoronavirinae							
Genus	Alphacoronavirus		Betacoronavirus				Gamma-coronavirus	Delta-coronavirus
Subgenus	Duvinacovirus	Setracovirus	Embecovirus	Merbecovirus	Sarbecovirus	...	...	...
Spezies	Human coronavirus 229E	Human coronavirus NL63	Beta-coronavirus 1	Human coronavirus HKU1	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	...	...
Virus	HCoV-229E	HCoV-NL63	HCoV-OC-43	HCoV-HKU1	MERS-CoV	SARS-CoV SARS-CoV-2	...	...

1.1.2 Morphologie

Die Virionen haben eine annähernd kugelförmige Struktur mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 80-120 nm (de Haan & Rottier, 2005). Unter dem Elektronenmikroskop kann man einen Ring aus ca. 20 nm langen keulenförmigen Fortsätzen erkennen, welcher an die Sonnenkorona erinnert (lat. *Corona* = Krone) und für die Namensgebung der Coronaviren ausschlaggebend war (Almeida et al., 1968).

Coronaviren besitzen eine Lipidhülle, in der sich das Nukleokapsid befindet. Dieses ist helikal symmetrisch, was für positivsträngige RNA-Viren ungewöhnlich und eher bei negativsträngigen RNA-Viren zu finden ist (Fehr & Perlman, 2015). Coronaviren kodieren für vier Strukturproteine, die sich am 3'-Ende des Genoms befinden (Fehr & Perlman, 2015).

Das *Spike*-Protein (engl. *spike* = Stachel, auch S-Protein) hat eine molekulare Masse von ca. 150 kDa und ist maßgeblich verantwortlich für die typische elektronenmikroskopische Erscheinung (Delmas & Laude, 1990). Es bildet Trimere und ragt aus der Hüllmembran heraus. Durch das S-Protein wird die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle vollzogen (Delmas & Laude, 1990). Danach vermittelt es die Fusion von viraler und zellulärer Membran, um das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle einschleusen zu können (Delmas & Laude, 1990).

Das Membranprotein (M-Protein) hat eine molekulare Masse von ungefähr 29-36 kDa und kommt am häufigsten auf der Oberfläche des Virions vor, wobei es die Doppelmembran dreimalig durchspannt (Baudoux et al., 1998) und gemeinsam mit dem E-Protein maßgeblich zur Form des Virions beiträgt (Vennema et al., 1996). Zudem interagiert das M-Protein mit dem Nukleokapsid-Protein (Escors et al., 2001).

Das *Envelope*-Protein (engl. *envelope* = Hülle, auch E-Protein) ist ein integrales Membranprotein mit einer Molekularmasse von ca. 10 kDa (Kuo & Masters, 2003). Das zahlenmäßige Vorkommen innerhalb des Virions ist wesentlich geringer im Vergleich zu M-, N- und S-Protein (Liu & Inglis, 1991; Godet et al., 1992). Es handelt sich um ein konserviertes Protein, das in allen Spezies der Coronaviren zu finden ist. Jedoch zeigt es unter den einzelnen Gruppen eine ausgeprägte Heterogenität, wenngleich die Grundstruktur des E-Proteins weitgehend identisch ist (Liu & Inglis, 1991; Godet et al., 1992; Kuo & Masters, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass das SARS-CoV-E-Protein die Membranpermeabilität in Bakterien- und Säugetierzellen verändert (Liao et al., 2004; Liao et al., 2006). Zudem fungiert es als Ionenkanal, der selektiver für monovalente Kationen als für monovalente Anionen ist (Wilson et al., 2004). Die Funktion als Ionenkanal ist zwar nicht zwingend notwendig für die Virusproduktion, jedoch steigert sie die Virulenz, beeinflusst die Immunantwort des Wirtes und steigert die virale Fitness (Nieto-Torres et al., 2014).

Das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) ist ein Strukturprotein, das zusammen mit der genomischen RNA einen Ribonukleoproteinkomplex bildet und an der Genomreplikation beteiligt ist (Schelle et al., 2006). Dieser Ribonukleoproteinkomplex wird durch Bindung an die carboxy-terminale Endodomäne des M-Proteins im Virion verankert (Hurst et al., 2009). Zudem wurde berichtet, dass das N-Protein eine Bindung mit dem Nicht-Strukturprotein 3 (nsp3) eingeht und dadurch möglicherweise an der Transkription und Replikation beteiligt ist (Hurst et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass das N-Protein von SARS-CoV und SARS-CoV-2, die Interferon- β -Produktion des Wirtes

modulieren und inhibieren kann (Kopecky-Bromberg et al., 2007; Chen et al., 2020; Yelemali et al., 2022).

Ein weiteres Strukturprotein, das Hämagglutinin-Esterase-Protein (HE-Protein), kommt nur in einigen Spezies der Betacoronaviren vor. Diese Viren besitzen die Fähigkeit der Bindung an Erythrozyten und der Hämagglutination (Sugiyama et al., 1998). Das HE-Protein spaltet 9-O-acetylierte Sialoglycane auf der Zelloberfläche und trägt damit zum einen zur Bindung an die Zielzelle bei, kann zum anderen aber auch die Bindung durch Zerstörung des Rezeptors lösen (Schultze et al., 1991; de Groot, 2006; Lang et al., 2020).

Im Zuge der Covid-19-Pandemie sind zahlreiche Übersichtsarbeiten, die sich mit den coronaviralen Strukturproteinen befassen veröffentlicht worden (Malik, 2020; Arya et al., 2021; Bai et al., 2022).

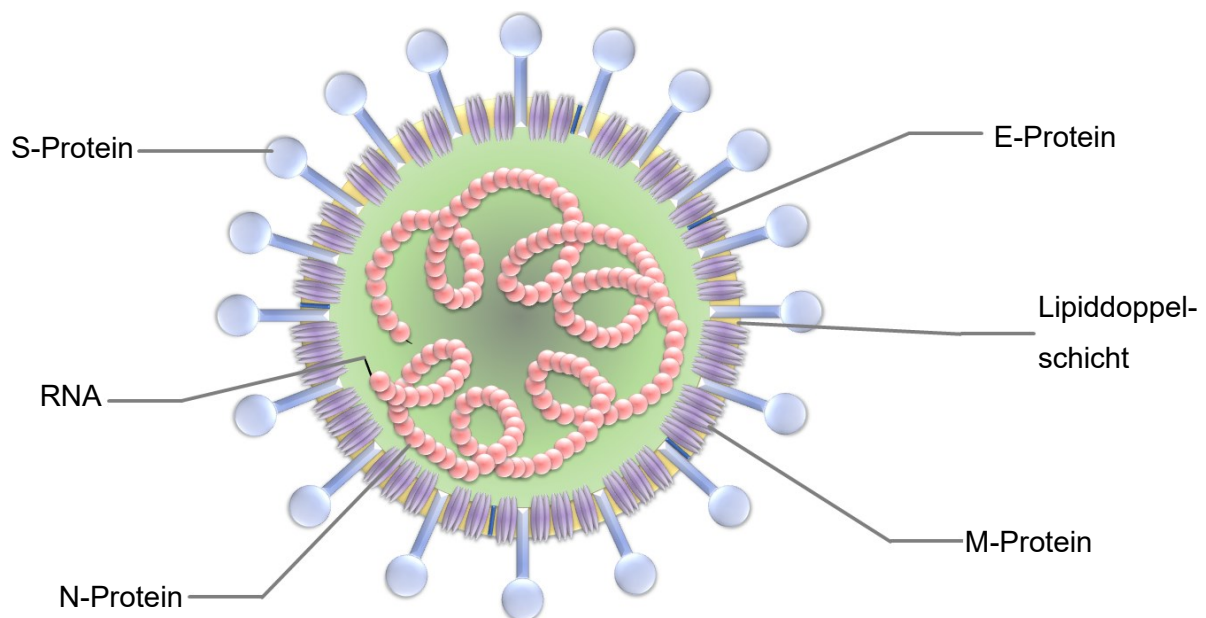


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Virions des HCoV-229E. Die einzelsträngige, positiv orientierte RNA ist vom Nukleokapsid-Protein (N-Protein) umgeben und bildet mit diesem das Nukleokapsid. Das *Envelope*-Protein (E-Protein), das Membran-Protein (M-Protein) und das *Spike*-Protein (S-Protein) sind in die Lipiddoppelschicht eingebunden, wobei das *Spike*-Protein, welches als Trimer vorliegt, die Lipidhülle nach außen hin überragt. Eigene Darstellung. Die Abbildung wurde mit Microsoft 365® (Power Point® und Word®) erstellt.

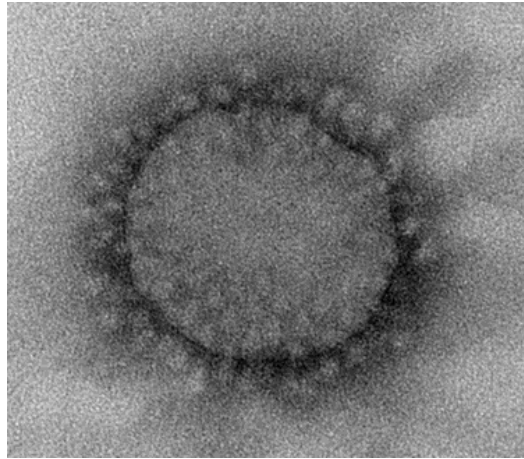


Abbildung 2: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions des humanen Coronavirus 229E. Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Die kranzförmige Anordnung der *Spike*-Proteine, die in der elektronenmikroskopischen Aufnahme einer Sonnenkorona ähnelt, war namensgebend für die Coronaviren. Zur Verfügung gestellt von Dr. Christin Müller, Arbeitsgruppe Prof. John Ziebuhr.

1.1.3 Genomorganisation

Das Genom von Coronaviren gehört zu den größten Genomen aller derzeit bekannter RNA-Viren. Es ist ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges, etwa 27-32 Kilobasen (kb) großes RNA-Genom positiver Orientierung (Fehr & Perlman, 2015). Das Genom ist am 5'-Ende mit einer *Cap*-Gruppe (engl. *cap* = Kappe) modifiziert und am 3'-Ende befindet sich eine Polyadenylsäure (Poly(A)-Schwanz) (Fehr & Perlman, 2015). Die RNA fungiert als mRNA zur Translation für die Replikase-Polypeptide und ist infektiös (Fehr & Perlman, 2015). Die an der Replikation beteiligten Nichtstrukturproteine werden durch das Replikase-Gen kodiert, das ungefähr zwei Drittel des Genoms einnimmt (ca. 20 kb), wohingegen die Strukturproteine und die akzessorischen Proteine nur etwa 10 kb des Genoms ausmachen (Fehr & Perlman, 2015). Am 5'-Ende startet die RNA mit einer *Leader*-Sequenz von 65-98 Nukleotiden, auf die ein nicht translatierter Abschnitt von 200 bis 400 Nukleotiden folgt (engl. *untranslated region* = UTR = nicht translatierte Region = NTR) (Brian & Baric, 2005; Fehr & Perlman, 2015). Innerhalb der nicht translatierten Region befinden sich mehrere Haarnadelstrukturen, die für die RNA-Replikation und Transkription erforderlich sind (Brian & Baric, 2005). Transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) sind allen Genen vorangestellt, die für die Strukturproteine und akzessorischen Proteine kodieren. Diese sind zur Genexpression zwingend erforderlich (Fehr & Perlman, 2015). Auch die 3'-NTR enthält Abschnitte, die für die Synthese der viralen RNA vonnöten sind. Das Genom ist wie folgt aufgebaut: 5'-*Leader*-Sequenz- 5' NTR- Replikasegene- S (*Spike*)- E (*Envelope*)- M (Membran)- N (Nukleokapsid)- 3' NTR- Poly(A)-Schwanz (Fehr & Perlman, 2015). Außerdem können weitere akzessorische und

Strukturgene im 3'-terminalen Bereich des Genoms vorhanden sein (Spaan et al., 1988; Brian & Baric, 2005; Fehr & Perlman, 2015).

1.1.4 Genomreplikation und Translation

Alle Schritte der Replikation der Coronaviren finden im Cytoplasma statt. Die 5'-Cap-Struktur vermittelt die Bindung der viralen RNA an die Ribosomen (Breyne et al., 2020). Das Replikasegen der Coronaviren nimmt etwa zwei Drittel des gesamten Genoms ein (Gorbalenya et al., 2006; V'kovski et al., 2021). Dieses untergliedert sich in zwei offene Leseraster (engl. *open reading frame* = ORF), nämlich ORF1a und ORF1b. Zuerst werden die Polyproteine pp1a und pp1ab translatiert, die entweder vom ORF1a (pp1a) oder zusammen von ORF1a und ORF1b (pp1ab) kodiert werden (V'kovski et al., 2021). Für die Biosynthese des pp1ab ist eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters um exakt ein Nukleotid in das -1-Leseraster kurz vor dem Erreichen des ORF1a-Stopp-Codons erforderlich, wodurch die Proteinsynthese bis zum Ende des zweiten Leserasters fortgesetzt (Brierley et al., 1989) und das deutlich größere pp1ab gebildet werden kann (Molekulargewicht von 750 bis 800 kD) (Ziebuhr & Siddell, 1999). Dieser Leserastersprung findet in etwa 50 % der Translationsvorgänge statt, sodass doppelt so viele Proteine aus ORF1a wie aus ORF1b translatiert werden. Diese relativ hohe Frequenz des Leserastersprungs ist wichtig, da der ORF1b nicht weniger als fünf für die Virusreplikation essenzielle Nichtstrukturproteine kodiert (Grellet et al., 2022).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Häufigkeit des Leserastersprungs in SARS-CoV zu einer starken Abnahme der Infektiosität führt (Plant et al., 2010).

Die viralen Polyproteine pp1a und pp1ab enthalten mehrere Proteasen: PL1^{pro}, PL2^{pro} (engl. *papain-like* = Papain-ähnlich) und 3CL^{pro} (engl. *chymotrypsin-like* = Chymotrypsin-ähnlich, auch M^{pro} von engl. *main protease*). Die Papain-ähnliche Protease 1, die nicht in allen Coronaviren zu finden ist und die Papain-ähnliche Protease 2 sind Bestandteile des Nichtstrukturproteins 3 (nsp3). Die Protease 3CL^{pro} entspricht dem Nichtstrukturprotein 5 (nsp5). Die viralen Proteasen spalten die beiden Polyproteine in insgesamt 16 Nichtstrukturproteine, wobei das zentrale Enzym der viralen RNA-Synthese, die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), Bestandteil des nsp12 ist (Ziebuhr et al., 2000; Wojdyla et al., 2010).

Mindestens 14 dieser 16 Nichtstrukturproteine sind an der Bildung von großen Proteinkomplexen beteiligt, die man Replikations-Transkriptionskomplexe nennt (engl. *replication-transcription complexes* = RTCs). Sie steuern sowohl die Replikation der

genomischen RNA als auch die Transkription der subgenomischen mRNAs (Subissi et al., 2014).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (nsp12), die RNA-Helikase (nsp13) und die Exoribonuklease (nsp14) arbeiten nun gemeinsam mit weiteren ORF1a/1b-kodierten Proteinen und synthetisieren eine komplementäre Kopie der viralen genomischen RNA, die als Matrize dient (Masters, 2006). Der synthetisierte Gegenstrang enthält das gesamte virale Genom mit negativer Orientierung und dient im weiteren Replikationszyklus als Matrize für die Bildung neuer Virusgenome. Zudem werden negativ orientierte subgenomischer RNAs (sg mRNA) synthetisiert, die als Matrize für die positiv orientierten sg mRNAs dienen (Masters, 2006).

Aufgrund der Größe des coronaviralen RNA-Genoms und der bekanntermaßen hohen Fehlerrate RNA-abhängiger RNA-Polymerasen besteht die Gefahr, dass während der Replikation zahlreiche Mutationen entstehen, die allein oder in ihrer Gesamtheit die Replikations- und Übertragungsfähigkeit des Virus reduzieren oder vollständig ausschalten (Gorbalenya et al., 2006; Robson et al., 2020). Um dies zu verhindern, kodieren Coronaviren und die meisten anderen Nidoviren in ihren Replikase-Genen eine 3'-5'-Exonuklease (Minskaia et al., 2006), die zu einer *Proof-reading*-Aktivität des viralen RTC zur Erhöhung der Kopiergenauigkeit während der viralen RNA-Synthese beiträgt (Robson et al., 2020).

Die subgenomischen mRNAs werden diskontinuierlich synthetisiert (Jacobs et al., 1981; Sawicki & Sawicki, 1995). Zwar haben alle das gleiche 3'-Ende, jedoch befinden sich ihre Startpunkte an unterschiedlichen Stellen zwischen dem 3'-Ende des ORF1b und dem 3'-Ende des Genoms (Malone et al., 2022). Alle subgenomischen mRNA-Moleküle haben zusätzlich am 5'-Ende eine einheitliche, gecappte *Leader*-Sequenz, die je nach Coronavirus 65 bis 98 Nukleotide umfasst und komplementär zum 3'-Ende des Gegenstranges ist (van der Most & Spaan, 1995). Die Verbindung nichtkontinuierlicher Genomsequenzen erfolgt während der Negativstrangsynthese in einem bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus unter Beteiligung von transkriptionsregulierenden Sequenzelementen (TRS), die den einzelnen Genen im 3'-Genombereich vorgeschaltet sind (Fehr & Perlman, 2015). Nachdem diese sogenannten *Body*-TRS-Elemente (engl. *body* = Körper = TRS-B) während der Negativstrangsynthese kopiert wurden (anti-TRS-B), besteht die Möglichkeit einer Basenpaarung mit der unmittelbar hinter der *Leader*-Sequenz gelegenen TRS (der sogenannten *Leader*-TRS) am 5'-Ende des Genoms, wonach die Negativstrang-Synthese bis zum Erreichen des 5'-Endes der genomischen Matrize und dem Kopieren der Leader-Sequenz fortgesetzt wird (Alonso et al., 2002). Diese Anti-*Leader*-enthaltende subgenomische Minusstrang-RNA dient anschließend

als Matrize zur Synthese einer 5'-Leader-enthaltenden sg mRNA (Sawicki et al., 2007). Darauf folgt die Translation der Proteine der jeweiligen sg mRNA. Die sg mRNAs codieren für die Strukturproteine S, E, M und N sowie eine Reihe akzessorischer Proteine, deren Sequenz und Anzahl je nach Coronavirusspezies unterschiedlich ist (Yang & Leibowitz, 2015).

Während der Virusmorphogenese verbinden sich die N-Proteine mit der genomischen RNA zu Nukleokapsiden. Diese interagieren mit den carboxyterminalen Domänen von M- und E-Proteinen (Masters, 2006). Dies initiiert die Knospung und das Nukleokapsid wird mit der Membran, die die viralen M-, S- und, falls vorhanden, HE- Proteine enthält, umgeben. Die entstandenen Viruspartikel werden in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) abgegeben. Es folgt der Transport zum Golgi-Apparat und die Exozytose aus der Zelle (Masters, 2006).

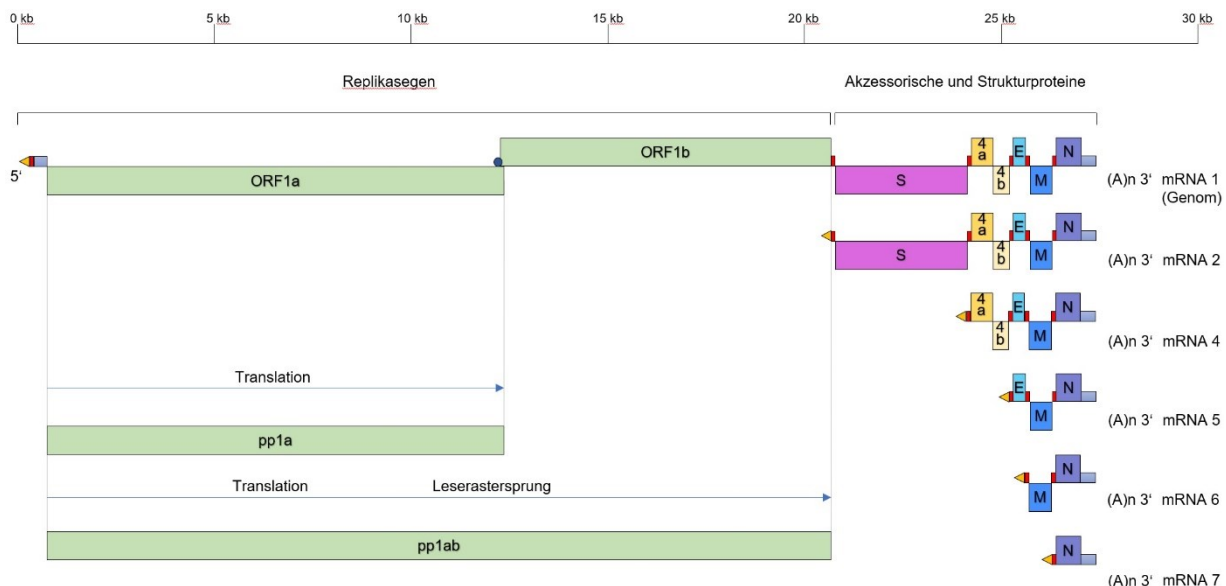


Abbildung 3: Genomorganisation des humanen Coronavirus 229E und subgenomische mRNA (sg mRNA). Zu sehen sind die zwei offenen Leseraster ORF1a und ORF1b, die die beiden Polyproteine pp1a und pp1ab kodieren. Damit pp1ab synthetisiert werden kann, findet in ca. 50 % der Translationsvorgänge eine programmierte ribosomale Verschiebung in das Leseraster mit der Position -1 statt. Das Leserasterverschiebungssignal wird durch den dunkelblauen Kreis dargestellt. Andernfalls würde die Synthese mit dem Stoppcodon am Ende der Sequenz von pp1a enden und somit nur pp1a translatiert. Am 5'-Ende der mRNAs befindet sich eine gepappte Leader-Sequenz (gelbes Dreieck). Die roten Rechtecke stellen transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) dar. Am 5'-Ende der genomischen RNA und am 3'-Ende jeder mRNA befindet sich eine nicht translatierte Region (graues Rechteck). (A)n steht für den 3'-Poly(A)-Schwanz.

1.2 Makrodomänen

Makrodomänen (MacD) sind weit verbreitete Proteine, die aus 130-190 Aminosäuren bestehen und in Eukaryoten, Bakterien, Archaeen und Viren nachgewiesen wurden. Sie liegen entweder als ein einzelnes Protein vor oder sind Teil eines größeren Proteins (Egloff et al., 2006; Till & Ladurner, 2009; Rack et al., 2016).

Die Erstbeschreibung einer MacD (zunächst X-Domäne genannt) in Viren erfolgte während der vollständigen Genomsequenzierung und Analyse von MHV und IBV (Lee et al., 1991). Später wurden sie aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Sequenz zur größten Histonvariante MacroH2A, der C-terminalen Domäne des Histons H2A, in Makrodomänen umbenannt (Pehrson & Fuji, 1998). Sie haben ein molekulares Gewicht von ungefähr 23 Kilodalton (kDa) und sind globuläre Proteine, die ein einzelnes siebensträngiges β -Faltblatt, fünf α -Helices und eine 3_{10} -Helix aufweisen (Till & Ladurner, 2009).

Eine Interaktion von Makrodomänen mit ADP-Ribose wurde erstmals im Rahmen einer Proteomuntersuchung von Hefen beschrieben. Damals wurde ein Enzym gefunden, dass ADP-Ribose-1"-Phosphat (Appr1p), ein Nebenprodukt des tRNA-Splittings, zu ADP-Ribose dephosphorylieren kann (Culver et al., 1993; Martzen et al., 1999). Im Jahr 2003 wurde erstmals eine Makrodomäne, nämlich AF1521, ein Protein von dem Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus*, anhand ihrer Kristallstruktur charakterisiert (Allen et al., 2003). Wenig später konnte gezeigt werden, dass AF1521, wie zuvor anhand der Kristallstruktur vermutet, enzymatisch aktiv ist und spezifisch an mono-ADP-Ribose (MAR) und poly-ADP-Ribose (PAR) bindet (Karras et al., 2005). Makrodomänen können phylogenetisch in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden: MacroD (u. a. humanes Coronavirus HKU1 nsp3 und *Archaeoglobus fulgidus* 1521), macroH2A (u. a. Homo sapiens macro H2A1 und H2A2), ALC1 (u. a. Homo sapiens TARG1), PARG (u. a. Homo sapiens PARG), Macro2 und SUD-M (u. a. MERS-CoV nsp3) (Rack et al., 2016).

Mittlerweile sind einige MacD-Funktionen analysiert worden. Zu ihren unterschiedlichen Aktivitäten gehören beispielsweise O-Acetyl-ADP-Deacetylase-Aktivität (MacroD-ähnliche Makrodomänen von Bakterien und Eukaryonten) (Chen et al., 2011), ADP-Ribose-Bindung (sowohl MAR als auch PAR), ADP-Ribose-1"-Monophosphatase-Aktivität (unter anderem HCoV-229E) (Putics et al., 2005) und, ihre vermutlich wichtigste Funktion als Protein-ADP-Ribose-Hydrolase (Li et al., 2016).

1.2.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs)

Das menschliche Genom kodiert 17 Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) (Vyas et al., 2014). Sie katalysieren posttranslationale Modifikationen von Proteinen, in denen über kovalente Bindungen entweder ein (mono-ADP-Ribosylierung = MARYlierung) oder mehrere (poly-ADP-Ribosylierung = PARYlierung) ADP-Ribose-Moleküle von oxidiertem Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) auf ein Protein übertragen werden (Hottiger et al., 2010). PARP1, PARP2, PARP5a und PARP5b PARYlieren. Die anderen PARPs, unter anderem PARP10, MARYlieren oder haben keine (bisher nachweisbare) enzymatische Funktion (Vyas et al., 2014). Die posttranslationale ADP-Ribosylierung ist, wie viele andere posttranslationale Modifikationen, reversibel. Enzyme, die de-ADP-ribosylieren können, sind Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolasen (PARG), ADP-Ribosylhydrolasen (ARH) und Makrodomänen (Jankevicius et al., 2013; Rosenthal et al., 2013; Sharifi et al., 2013; Rack et al., 2016; Palazzo et al., 2017).

Proteine werden durch ADP-Ribosylierung in Struktur und Funktion verändert. Dies kommt z.B. bei DNA-Reparaturvorgängen, als Antwort auf zellulären Stress oder im Rahmen von Virusinfektionen vor. PARP1 und PARP2 sowie PARP5a/b greifen beispielsweise durch PARYlierung regulatorisch in DNA-Reparaturen, Transkription und den Wnt-Signalweg ein (Messner & Hottiger, 2011; Mao et al., 2011; Yang et al., 2016; Kuny & Sullivan, 2016).

Auch die mono-ADP-Ribosylierung spielt eine wichtige Rolle in der Zelle. So wird PARP16 für die Aktivierung des ER-Stress-Signalweges benötigt (Jwa & Chang, 2012), PARP14 bindet an STAT-6 (eng. *signal transducer and activator of transcription 6* = Signalwandler und Transkriptionsaktivator 6) und steigert die Interleukin (IL)-4-abhängige Genexpression (Goenka & Boothby, 2006; Goenka et al., 2007; Mehrotra et al., 2011; Iwata et al., 2016). PARP9 erhöht die Interferon-gamma (IFN-γ)-abhängige Genexpression in Makrophagen (Iwata et al., 2016).

Viele Viren greifen in die posttranslationalen Modifikationen ihrer Wirte ein, um ihre eigene Replikation zu ermöglichen oder um antiviralen Immunitätsmechanismen zu entgehen. Die starke positive Selektion in Primaten und die schnelle Evolution von PARP4, PARP9, PARP14 und PARP15 lässt darauf schließen, dass diese PARP-Gene durch Virusinfektionen beeinflusst werden und der Virusabwehr dienen (Daugherty et al., 2014).

Zudem wird vermutet, dass PARP7, PARP10 und PARP12L eine wichtige Rolle in der Regulation virusinfizierter Zellen spielen (Atasheva et al., 2014).

Demgegenüber machen sich Viren die posttranslationale Modifikation PARylierung des Wirts für ihre eigene Replikationsfähigkeit zunutze. So zeigten Ha et al., dass die Deletion von PARP1 die Infektion von Fibroblasten der Maus durch das HI-Virus verhindert, indem die virale Integration inhibiert wird (Ha et al., 2001).

1.2.2 Coronavirale Makrodomäne

Interferone sind Zytokine und Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie haben eine große Bedeutung im Kontext viraler Infektionen. Nachdem virale RNA im Zytoplasma erkannt wurde, beginnen die infizierten Zellen des menschlichen Körpers mit der Produktion und Sekretion von Interferonen (IFN). Typ 1 Interferone wie IFN- α oder IFN- β können von fast allen Zelltypen sezerniert werden (Ivashkiv & Donlin, 2014; McNab et al., 2015). Typ 2 Interferone (IFN- γ) werden durch Immunzellen, wie natürliche Killerzellen sezerniert (Mah & Cooper, 2016; Alspach et al., 2019). Typ-3-Interferone (IFN- λ) werden durch epitheliale Zellen (Wang et al., 2009; Khaitov et al., 2009; Ioannidis et al., 2013) oder dendritische Zellen (Coccia et al., 2004; Megjugorac et al., 2010; Yin et al., 2012) sezerniert.

Die Interferonsignalkaskade wurde durch Schoggins wie folgt zusammengefasst: Typ-1-, -2- und -3-Interferone binden an Transmembranrezeptoren (Typ-1-Interferone: IFNAR1/IFNAR2; Typ-2-Interferone: IFNGR1/IFNGR2; Type-3-Interferone: IFNLR1/IL10RB) und aktivieren dadurch die Januskinasen (JAK) Tyrosinkinase 2 (TYK2), JAK1 und JAK2. Die durch Interferon Typ 1 und 3 induzierten Kinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2. Zusammen mit dem Interferon-Regulationsfaktor 9 (IRF9) bilden sie den Transkriptionsfaktorkomplex Interferon-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3). Im Fall von Typ-2-Interferonen führt der JAK/STAT-Signalweg zu phosphorylierten STAT1-Homodimeren, die auch Interferon- γ -aktivierter Faktor (GAF = Gamma-aktivierter Faktor) genannt werden. ISGF3 und GAF translozieren in den Nukleus und binden an ISRE und GAS (engl. *IFN-stimulated response elements* = IFN-stimulierte Antwortelemente und engl. *gamma activated sequence* = Gamma-aktivierte Sequenz). Dadurch kommt es zur Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISG) (Schoggins, 2019).

Zu diesen ISGs gehören auch Mitglieder der PARP-Familie, die die posttranslationale Modifikation mit ADP-Ribose unter Verwendung von NAD⁺ als Substrat katalysieren. Um dieser posttranslationalen Modifikation zu begegnen, codieren alle Coronaviren für eine konservierte Makrodomäne (Mac1), welche sich im N-terminalen Bereich des Nichtstrukturproteins 3 (nsp3) befindet und für die in einigen Fällen gezeigt wurde, dass

sie kovalent gebundene ADP-Ribose von ADP-ribosylierten Proteinen abspalten kann (Leung et al., 2018).

Die erste beschriebene Kristallstruktur einer coronaviralen Makrodomäne war jene von SARS-CoV (Saikatendu et al., 2005; Egloff et al., 2006). Im Verlauf wurden die Strukturen weiterer coronaviraler Makrodomänen erforscht (HCoV-229E (Xu et al., 2009b), IBV (Xu et al., 2009b), HCoV-NL63 (Piotrowski et al., 2009), MERS-CoV (Cho et al., 2016b) und SARS-CoV-2 (Lin et al., 2020)). Dabei wurde gezeigt, dass alle eine konservierte dreischichtige $\alpha/\beta/\alpha$ -Faltung aufweisen. Das zentrale β -Faltblatt enthält 7 β -Stränge in der Reihenfolge $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 7$ - $\beta 6$ - $\beta 3$ - $\beta 5$ - $\beta 4$, wobei $\beta 1$ und $\beta 4$ antiparallel zu den restlichen liegen. Auf beiden Seiten des β -Blattes sind sechs α -Helices lokalisiert. Die Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ liegen auf einer Seite des β -Blattes, die Helices $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ auf der anderen (Lei et al., 2018).

Alle Viren der Familien *Coronaviridae*, *Togaviridae* und *Hepeviridae* kodieren für Makrodomänen. Ursprünglich wurde angenommen, dass sie die Funktion einer ADP-ribose-1"-Phosphatase haben oder an PAR binden (Putics et al., 2005; Putics et al., 2006; Fehr et al., 2016).

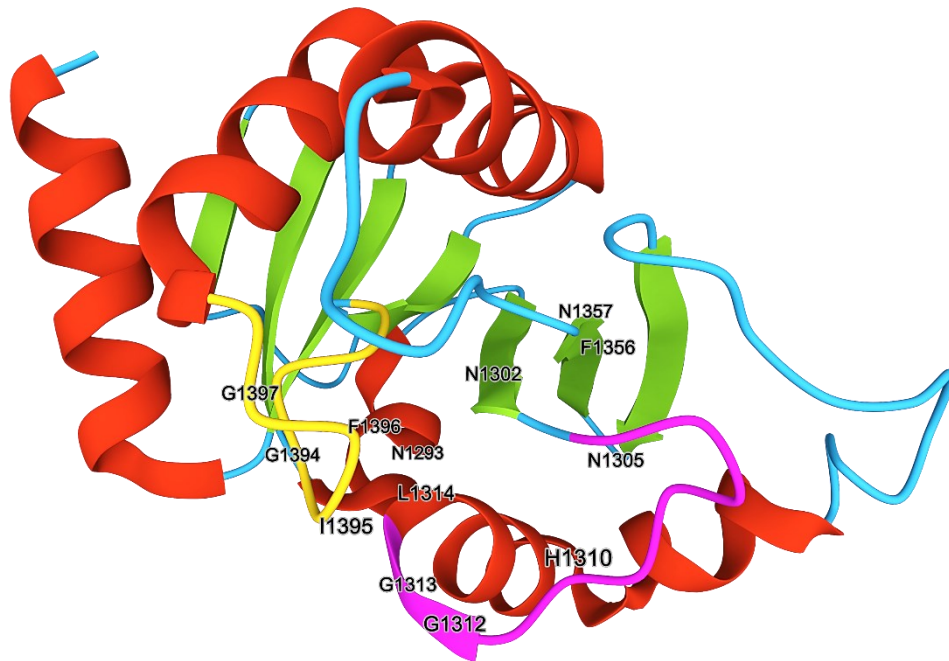
Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass das Hepatitis-E-Virus, das SARS-Coronavirus und das humane Coronavirus 229E Proteine *in vitro* de-MARYlieren und de-PARYlieren können (Li et al., 2016). Die globuläre Makrodomäne besitzt auf ihrer Oberfläche eine konservierte Spalte, die ADP-Ribose bindet (Karras et al., 2005), und viele der hoch konservierten Aminosäurereste von Makrodomänen befinden sich in der Nähe dieser ADP-Bindungsstelle (Fehr et al., 2018).

Es gibt Hinweise, dass die Makrodomäne der Gattungen Alpha- und Coronaviren eine wichtige Rolle in Virulenz und Pathogenität spielt, wohingegen Mutationen der Makrodomäne die Replikation *in vitro* nur in geringem Maß beeinflussen (Putics et al., 2005; Eriksson et al., 2008; Kuri et al., 2011; Fehr et al., 2015; Fehr et al., 2016). Im Vergleich dazu zeigten Abraham et al., dass die Makrodomäne des Sindbis-Virus, ein Alphavirus, sowohl für die Replikation in neuronalen Zellen *in vitro* als auch *in vivo* wichtig ist und eine Schlüsselrolle im Infektionsverlauf und der Prognose des Krankheitsverlaufs einnimmt (Abraham et al., 2020).

Abbildung 4 zeigt Kristallstrukturen der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E. Hierbei liegt der Fokus auf den Sekundärstrukturen (α -Helices rot, β -Stränge grün) und der Lage von Schleife 1 (pink) und Schleife 2 (gelb). Zum besseren Verständnis und der räumlichen Orientierung in den weiteren Kristallstrukturabbildungen sind die in dieser

Dissertationsschrift besprochenen Aminosäuren nahe der jeweiligen Sekundärstruktur eingezeichnet.

(A)



(B)

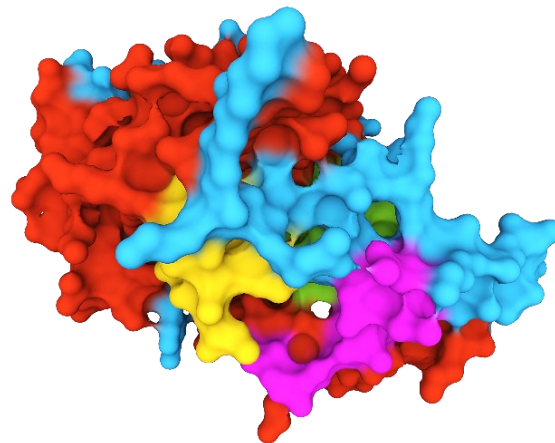


Abbildung 4: (A) Schematische Darstellung der Kristallstruktur der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit den für diese Arbeit relevanten Aminosäureresten. (B) Moleküloberfläche der Makrodomäne. Die Anteile der Sekundärstrukturen sind farblich hervorgehoben: α -Helices rot, β -Stränge grün. Des Weiteren sind die Schleife 1 (pink) und die Schleife 2 (gelb) zu erkennen. Die Kristallstrukturen sind zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (Burley et al., 2019; Berman et al., 2000), Mitglied von *worldwide PDB*, wwpdb.org (Berman et al., 2003)): 3EWQ (Xu et al., 2009c; Xu et al., 2009b), die Abbildungen wurden mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

1.3 Zielsetzung

Früher galten humane Coronaviren als relativ harmlose Viren, die typische Erkältungserkrankungen verursachen. Seit 2002 das SARS-Coronavirus entdeckt wurde und dieses Coronavirus zu vielen schweren Krankheitsverläufen mit, im Vergleich zu den bisher bekannten Coronaviren, hoher Mortalität führte, hat sich dies gewandelt. Es sollte weitere 10 Jahre dauern, bis ein weiteres tödliches Coronavirus, MERS-CoV, in Erscheinung trat und bis heute weiterhin auf der arabischen Halbinsel endemisch vorkommt. Seit Ende des Jahres 2019 hält ein weiteres Coronavirus, SARS-CoV-2, die Welt in Atem. Dabei handelt es sich um eine Pandemie mit bisher kaum bekannten gesundheitlichen und sozioökonomischen Auswirkungen. Seitdem wurden viele verschiedene Ansätze verfolgt, um Coronaviren besser verstehen zu lernen, sodass der Wissenszuwachs der letzten Jahre enorm war.

Auf der Suche nach möglichen pharmazeutischen Angriffspunkten spielen die coronaviralen Makrodomänen eine wichtige Rolle, da ihnen möglicherweise eine bedeutende Rolle in Virulenz und Pathogenität zukommt.

In dieser Arbeit sollten weitere Erkenntnisse zur Rolle einzelner konservierter Reste der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E (HCoV-229E) für die De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität *in vitro* sowie mögliche Funktionen der MacD in infizierten Zellen gewonnen werden. Dafür sollten verschiedene mutierte Formen der HCoV-229E-MacD heterolog exprimiert und in Aktivitätsexperimenten mit ADP-ribosylierten Testsubstraten untersucht werden. Zudem sollte mit Hilfe einer Transkriptomanalyse die (differentielle) zelluläre Genexpression in Zellen, die mit HCoV-229E oder mit HCoV-229E-Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum der MacD infiziert wurden, charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
BioPhotometer plus	Eppendorf
Electrophorese-Netzgeräte	Peqlab/Biorad
Epson Expression 1680 PRO	Epson
Inkubationsschüttler, Innova 44R	New Brunswick Scientific
Molecular dynamics Zentrifuge 5430	Eppendorf
Sorvall™ RC 6 Plus Zentrifuge	Thermo Scientific™
Optima™ LE-80 Präparative Ultrazentrifuge	Beckman Coulter™
MiniAmp™ <i>Thermal Cycler</i>	Thermo Scientific™
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH
Semidry-Blotter	Roth
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific™
Typhoon 9200	GE Healthcare

2.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
2-Propanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Albumin Fraktion V	Roth
Agarose, <i>ultrapure</i>	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Anhydrotetracyclin	IBA
β-Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Agar	Gibco
Bromphenolblau	Roth
BSA-Standard	Biorad
Coomassie R-250	Merck
Dimethylsulfat (DMS)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth

Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glyzerin	Roth
HEPES	Roth
Imidazol	Roth
Kaliumazetat	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kalziumchlorid	Merck
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumazetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
NP40	Fluka Chemie AG
Schwefelsäure	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck

2.1.2.1 Puffer und Lösungen

2.1.2.1.1 Puffer zur Präparation chemisch kompetenter Zellen

2.1.2.1.1.1 CaCl_2 -Puffer

Substanz	Zusammensetzung
PIPES pH 7	10mM
CaCl_2	60mM
Glyzerin	15 % [v/v]

Im Anschluss an die Einstellung des pH-Wertes wurde die Lösung steril filtriert.

2.1.2.1.2 Puffer zur DNA-Isolation

2.1.2.1.2.1 Puffer 1 (DNA-Minipräparation)

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	0,1 mg/ml

2.1.2.1.2.2 Puffer 2 (DNA-Minipräparation)

Substanz	Zusammensetzung
NaOH	200 mM
SDS	1 % [w/v]

2.1.2.1.2.3 Puffer 3 (DNA-Minipräparation)

Substanz	Zusammensetzung
Kaliumazetat pH 5,5	3 M

2.1.2.1.3 Puffer für Arbeiten mit Proteinen

2.1.2.1.3.1 Protein-Puffer für Co^{2+} -TALON®-Affinitätschromatographie

2.1.2.1.3.1.1 Puffer A

Substanz	Zusammensetzung
HEPES-NaOH pH 7,5	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0,05 % [v/v]
Imidazol	10 mM
β -Mercaptoethanol	5 mM

2.1.2.1.3.1.2 Puffer B

Substanz	Zusammensetzung
HEPES-NaOH pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 % [v/v]
Imidazol	200 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM

2.1.2.1.3.1.3 Dialysepuffer

Substanz	Zusammensetzung
HEPES-KOH pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 % [v/v]
DTT	1 mM

*2.1.2.1.3.2 Protein-Puffer für Glutathion Sepharose™-Aufreinigung**2.1.2.1.3.2.1 Lysis- und Dialysepuffer*

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	250 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NP-40	0,5 % [v/v]
Triton X-100	0,1 % [v/v]

2.1.2.1.3.2.2 Elutionspuffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	250 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NP-40	0,5 % [v/v]
Triton X-100	0,1 % [v/v]
Reduziertes Glutathion	10 mM

2.1.2.1.3.3 Aktivitätsassaypuffer

2.1.2.1.3.3.1 Pulldown-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,6	100 mM
NaCl	250 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NP-40	0,5 % [v/v]
Triton X-100	0,1 % [v/v]

2.1.2.1.3.3.2 1x-ADPr-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 8	50 mM
MgCl ₂	4 mM
NP-40	0,2 % [v/v]
TCEP	0,2 mM

2.1.2.1.3.4 Puffer zur Proteinquantifizierung

2.1.2.1.3.4.1 Bradfordpuffer

Substanz	Zusammensetzung
HEPES-KOH pH 8,0	25 mM
KCl	150 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

2.1.2.1.3.5 Puffer für Elektrophoresen

2.1.2.1.3.5.1 1x SDS-Laufpuffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 % [w/v]

2.1.2.1.3.5.2 5x SDS-Ladepuffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10 % [w/v]
Glycerin	50 % [v/v]
Bromphenolblau	0,1 % [w/v]
DTT	200 mM

2.1.2.1.3.5.3 Coomassie-Färbelösung

Substanz	Zusammensetzung
Methanol	40 % [v/v]
Essigsäure	10 % [v/v]
Coomassie-Brilliantblau (R250)	0,1 % [w/v]

2.1.2.1.3.5.4 50x Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA, pH 8,0	50 mM

2.1.2.1.3.5.5 5x TAE-Ladepuffer

Substanz	Zusammensetzung
Bromphenolblau	0,2 % [v/v]
Xylene cyanol FF	0,25 % [v/v]
Glycerin	30 % [v/v]
TAE	5x

2.1.2.1.3.5.6 1x Transferpuffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-Cl (pH 7,6)	25 mM
Glyzin	192 mM
Methanol	20 % [v/v]

2.1.2.1.3.5.7 1x TBS (engl. Tris-buffered saline)-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,6	20 mM
NaCl	150 mM

2.1.2.1.3.5.8 1x TBST-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Tris-HCl pH 7,6	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 % [v/v]

2.1.2.1.3.5.9 PBS (engl. phosphate buffered saline)-Puffer (pH 7,4)

Substanz	Zusammensetzung
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
KCl	2,7 mM

2.1.2.1.3.5.10 PBST-Puffer

Substanz	Zusammensetzung
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
KCl	2,7 mM
Tween 20	0,1 % [v/v]

2.1.2.2 Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Name	Hersteller
TALON® Superflow™	GE Healthcare
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare
Roti®-Quant	Carl Roth

2.1.2.3 Enzyme

Name	Hersteller
<i>FastDigest</i> DpnI	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Roth
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific

2.1.2.4 Marker

Name	Hersteller
<i>prestained</i> Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
<i>unstained</i> Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
<i>GeneRuler 1kb DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Plasmide

Name	Antibiotikaresistenz	Promotor
pASK-IBA3plus	Ampicillin	Tetracyclin
pCGI	Chloramphenicol	GAL10
pGEX	Ampicillin	tac

2.1.4 Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz
HCoV-229E_MD_	
vec_for	5'-TGGTTTAGTGCATCACCATCATCACCACCACTGAGGCC-3'
vec_rev	5'-CAACAAATTCTCCACCGCGGAGACGCAGGAC-3'
ins_for	5'-CCGCGGTGGAGAATTTGTTGTTAAAGAGAA-3'
ins_rev	5'-GATGGTGATGCACTAAACCAGACACAAAAT-3'
pASK_WBV_C1	
—	
ins_for	5'-CCGCGGTGGAGTAACCATCAATAACCCATT-3'
ins_rev	5'-GATGGTGATGCAGGGGTTTGACAGGGTCTG-3'
vec_for	5'-CAAACCCCTGCATCACCATCATCACCACCACTGAGG-3'
vec_rev	5'-TGATGGTTACTCCACCGCGGAGACGCAGGA-3'
pASK_WBV_C2	
—	
ins_for	5'-CCGCGGTGGAGTAACCATCAATAACCCATT-3'
ins_rev	5'-GATGGTGATGGTTTGTACGAGCAGGTTGA-3'

vec_for	5'-CGTAACAAACCATCACCATCATCACCACCACTGAGG-3'
vec_rev	5'-TGATGGTTACTCCACCGCGGAGACGCAGGA-3'
pASK_CHIKV_	
ins_for	5'-CCGCGGTGGAGCACCGTCGTACCGGGTAAA-3'
INS_REV	5'-GATGGTGATGGGTCCGCATCTGTATGGCCT-3'
vec_for	5'-GATGCGGACCCATCACCATCATCACCACCACTGAGGCCG- 3'
vec_rev	5'-ACGACGGTGCTCCACCGCGGAGACGCAGGA-3'
pASK_Ub_HepE _BC_	
ins_for	5'- GTCTCCGCGGTGGACCGGCCATAACCCACCAGGCGGCCCG GCATC-3'
ins_rev	5'- GAGTGCGGCCTCAGTGGTGGTGATGATGGTGATGATTTGCT GTCCGTGCAACATCCTCAG-3'
vec_for	5'- CACGGACAGCAAATCATCACCATCATCACCACCACTGAGGC CGCACTCGAGGTGCACCTG-3'
vec_rev	5'- CTGGTGGGTTATGGCCGGTCCACCGCGGAGACGCAGGACC AGATG-3'
pASK-Ub-HepE- NA_Vec_	
ins_for	5'- GTCTCCGCGGTGGAGCCCGGCATCGCCGCCTGCTCTTTAC CTAC-3'
ins_rev	5'- GAGTGCGGCCTCAGTGGTGGTGATGATGGTGATGGCCGGC ACAGGCCCGGCCGACGTCTG-3'
vec_for	5'CCTGTGCCGGCCATCACCATCATCACCACCACTGAGGCC GCACTCGAGGTGCACCTG-3'
vec_rev	5'- CAGGCGGCGATGCCGGGCTCCACCGCGGAGACGCAGGAC CAGATG-3'
pMAL_WBV_C1 _MD	

ins_for	5'-GATCGAGGGAAGGGTAACCATCAATAACCCATTTCGCCTC-3'
ins_rev	5'-GACGGCCAGTGCTTAGTGATGGTGATGATGGTGATGCAGG GGTTTGACAGGGTCTGAG-3'
vec_for	5'-CAAACCCCTGCATCACCATCATCACCATCACTAAGCACTGG CCGTCGTTTTACAAC-3'
vec_rev	5'-GGTTATTGATGGTTACCCTTCCCTCGATCCCGAGGTTGTTG-3'
pMAL_WBV_C2	
_MD	
ins_for	5'- GATCGAGGGAAGGGTAACCATCAATAACCCATTTCGCCTC-3'
ins_rev	5'-GACGGCCAGTGCTTAGTGATGGTGATGATGGTGATGGTTTG TTACGAGCAGGTTGAGG-3'
vec_for	5'-GCTCGTAACAAACCATCACCATCATCACCATCACTAAGCACT GGCCGTCGTTTTACAAC-3'
vec_rev	5'-GGTTATTGATGGTTACCCTTCCCTCGATCCCGAGGTTGTTG-3'

2.1.5 Oligonukleotide für ortsspezifische Mutagenesen

Name	Sequenz
HCoV-229E nsp3_	
N1293A_fw	5'-TACTGTTGTTGCTGGTGTTGACTTTGACTTTA-3'
N1293A_rev	5'-GTCAACACCAGCAACAACAGTATCAACATCAC-3'
N1302A_fw	5'-CTTTATTGTAGCTGCTGCTAATGAGAACCCTTGC-3'
N1302A_rev	5'-CATTAGCAGCAGCTACAATAAAGTCAAAGTCAA-3'
N1305A_fw	5'-AAATGCTGCTGCTGAGAACCTTGCTCATGGTG-3'
N1305A_rev	5'-AAGGTTCTCAGCAGCAGCATTTACAATAAAGT-3'
H1310A_fw	5'-AACCTTGCTGCTGGTGGAGGACTTGCCAAAGC-3'
H1310A_rev	5'-GTCCTCCACCAGCAGCAAGGTTCTCATTAGCAG-3'

G1312for	5'-TGCTCATGGTGCAGGACTTGCCAAAGCTTTAGA-3'
G1312A_rev	5'-TTGGCAAGTCCTGCACCATGAGCAAGGTTCTCA-3'
G1313Afor	5'-TCATGGTGGAGCACTTGCCAAAGCTTTAGATGT-3'
G1313Arev	5'-CTTTGGCAAGTGCTCCACCATGAGCAAGGTTCT-3'
L1314Afor	5'-TGGTGGAGGAGCTGCCAAAGCTTTAGATGTGTA-3'
L1314Arev	5'-AAGCTTTGGCAGCTCCTCCACCATGAGCAAGGT-3'
F1356A_fw	5'-CCTTAGAATTGCTAATGTTGTTGGTCCAC-3'
F1356A_rev	5'-CAACAACATTAGCAATTCTAAGGCTATCA-3'
F1356L_fw	5'-CCTTAGAATTCTGAATGTTGTTGGTCCAC-3'
F1356L_rev	5'-CAACAACATTCAGAATTCTAAGGCTATCA-3'
F1356Y_fw	5'-CCTTAGAATTTATAATGTTGTTGGTCCAC-3'
F1356Y_rev	5'-CAACAACATTATAAATTCTAAGGCTATCA-3'
N1357Afor	5'-TAGAATTTTTTGCTGTTGTTGGTCCACG-3'
N1357A_rev	5'-GACCAACAACAGCAAAAATTCTAAGG-3'
N1357D_fw	5'-TAGAATTTTTGACGTTGTTGGTCCACG-3'
N1357D_rev	5'-GACCAACAACGTCAAAAATTCTAAGG-3'
N1357H_fw	5'-TAGAATTTTTCATGTTGTTGGTCCACG-3'
N1357H_rev	5'-GACCAACAACATGAAAAATTCTAAGG-3'
N1357Q_fw	5'-TAGAATTTTTCAAGTTGTTGGTCCACG-3'
N1357Q_rev	5'-GACCAACAACCTGAAAAATTCTAAGGC-3'
N1357S_fw	5'-TAGAATTTTTTCAGTTGTTGGTCCACG-3'
N1357S_rev	5'-GACCAACAACCTGAAAAATTCTAAGG-3'
G1394A_for	5'-TTTGAGCTGTGCGATTTTTGGTATCAAACCTCGA-3'
G1394A_rev	5'-TACCAAAAATCGCACAGCTCAAAATTGGTGTTA-3'
I1395A_for	5'-GAGCTGTGGTGCTTTTGGTATCAAACCTCGAAAC-3'
I1395A_rev	5'-TGATACCAAAAGCACCACAGCTCAAAATTGGTG-3'
F1396A_for	5'-CTGTGGTATTGCTGGTATCAAACCTCGAACTTC-3'
F1396A_rev	5'-GTTTGATACCAGCAATACCACAGCTCAAAATTG-3'
G1397A_for	5'-TGGTATTTTTGCAATCAAACCTCGAACTTCATT-3'
G1397A_rev	5'-CGAGTTTGATTGCAAAAATACCACAGCTCAAAA-3'
pMAL_WBV_C3_MD_	
del_3313-3315_fw	5'-GCTCGTAACACATCACCATCATCACCATCACTAAG-3'
del_3313-3315_rev	5'-GATGGTGATGTGTTACGAGCAGGTTGAGGAATT-3'
pMal_WBV_MD_Con3_fw	5'-ATCGAGGGAAGGtcAggCAATAACCCATTCGCCTCAAA CGAAG-3'

pMal_WBV_MD_Con3_	5'-
rev	CGAATGGGTTATTGccTgaCCTTCCCTCGATCCCGAGG TTGTTG-3'
pMAL_WBV_C1_MD_	
mut	
pMAL_WBV_mut_fw	5'-AAATGCAGCCGCCAAACAGCTCAATAACGGGTA-3'
pMAL_WBV_mut_rev	5'-GAGCTGTTTGGCGGCTGCATTTACGATAAATT-3'
pMAL_WBV_C2_MD_	
mut	
pMAL_WBV_mut_fw	5'-AAATGCAGCCGCCAAACAGCTCAATAACGGGTA-3'
pMAL_WBV_mut_rev	5'-GAGCTGTTTGGCGGCTGCATTTACGATAAATT-3'
pMAL_WBV_C3_MD_	
mut	
pMAL_WBV_mut_fw	5'-AAATGCAGCCGCCAAACAGCTCAATAACGGGTA-3'
pMAL_WBV_mut_rev	5'-GAGCTGTTTGGCGGCTGCATTTACGATAAATT-3'

2.1.6 Oligonukleotide für Sequenzierung

Name	Sequenz
Ki00	5'-CCATCGAATGGCCAGATGATTAAT-3'
pASKdown	5'-GGTCAAGCTTATTATTTTTCGAACTGC-3'
pMAL_seq_fw	5'-TATGCCGTGCGTACT-3'
pMAL-5 MCS_rv	5'-TGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC-3'
5800 down	5'-TTCGACACTGACTATAATAGC-3'
TNI 4600 up	5'-TTTGTAAGACTATTCAATCAGC-3'
3800 up	5'-GGTACCATAATATTTGTGCAA-3'

2.1.7 Bakterienstämme

Name	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F'ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F' {lacIq, Tn10(TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> TB1	<i>F⁻ ara Δ(lac-proAB) [Φ80dlac Δ(lacZ)M15] rpsL(Str^R) thi hsdR</i>

2.1.8 Antibiotika

Name	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml in EtOH	200 ng/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH	34 µg/ml

2.1.9 EDV-Programme

Zur Textverarbeitung wurde Microsoft 365® (Excel®, Power Point®, Word®, Microsoft, USA) verwendet. Als Literaturverwaltungsprogramm kam Citavi 6 (Swiss Academic Software GmbH) zum Einsatz. Zudem wurden die Programme QuantityOne (Version 4.6.5, BioRad Laboratories GmbH, München) und GraphPad Prism 5 und 6 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Biologische Sicherheit

Die Experimente fanden unter biologischer Sicherheitsstufe 2 (BSL-2) in den von dem Regierungspräsidium Gießen geprüften und zugelassenen Laboratorien statt.

2.2.2 Aktivitätsprüfung viraler Makrodomänen

2.2.2.1 Präparation chemisch kompetenter *E. coli*

Eine Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes wurde von einer LB-Agar-Platte in 5 ml LB-Medium transferiert und über Nacht bei 37 °C und 220 U/min schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit 2 ml der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,375 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Min. bei 5000 x g und 4 °C pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 20 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer (2.1.2.1.1.1) resuspendiert. Das Pelletieren und Resuspendieren wurde einmal wiederholt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 5.000 x g und 4 °C für 15 min wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer (2.1.2.1.1.1) gelöst. Es wurden 100 µl Aliquots angefertigt, welche für 30 min auf Eis inkubierten. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmiden

Punktmutationen wurden in Plasmid-kodierte Gene mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *polymerase chain reaction* = PCR) eingefügt. Hierfür wurde die Polymerase Phusion™ (Thermo Scientific) verwendet und Primer eingesetzt, die beide homologe Enden und die zu mutierende Nukleotid-Sequenz beinhalteten.

Der Ansatz der Reaktion und die PCR-Bedingungen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Amplifikate wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Nun schloss sich ein DpnI-Verdau an, um die methylierte Plasmid-DNA, die als Matrizierte, zu entfernen. Dieser wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe. In dieser Dissertation wird diese Methode zur Validierung der PCR-Effizienz und der Größe der entstandenen Produkte genutzt. Hierfür wurde ein Teil des PCR-Ansatzes mit 5x TAE-Ladepuffer (2.1.2.1.3.5.5) gemischt. Anschließend wurden die Proben auf einem 1%[w/v]igen Agarose / 1x TAE / EtBr-Gel in 1x TAE-Puffer bei konstanter elektrischer Spannung aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

2.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch LGC Genomics (LGC Genomics, Ostendstraße 25, 12459 Berlin, Deutschland). Die Konzentration der DNA lag hierbei idealerweise bei 100 ng/µl. Diese wurde in einem 14-µl-Ansatz mit 5 pmol/µl des entsprechenden Sequenzierprimers versendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms DNASTAR-Lasergene.

2.2.2.5 DNA-Aufreinigung

Die PCR-Produkte wurden vor der weiteren Verwendung mittels innuprep PCRpure Kit (Analytik Jena) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA in Bakterienzellen wurden chemisch kompetente *E.-coli*-Stämme eingesetzt. Diese wurden auf Eis aufgetaut und mit DNA versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis, wobei eine Anlagerung der DNA an die Bakterienwand stattfand. Nachfolgend wurden die Bakterien 90 Sekunden lang einem Hitzeschock von 42 °C exponiert, wodurch die Effizienz der DNA-Aufnahme in die Bakterien gesteigert wurde. Nach weiteren zwei Minuten Inkubationszeit auf Eis wurde dem Ansatz 500 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben. Darauffolgend wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C und 220 U/min im Thermoshaker inkubiert. Der Ansatz wurde pelletiert, der Überstand größtenteils abgenommen und das Zellpellet in den verbleibenden 50–100 µl vorsichtig resuspendiert. Die Pellets wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.7 Plasmid-DNA-Isolation

Zur Plasmid-DNA-Isolierung wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechend zugesetztem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie inokuliert. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 U/min im Thermoshaker inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 4 ml dieser Über-Nacht-Kultur bei 21.000 x g für 1 min pelletiert und das entstandene Pellet in 250 µl Puffer 1 (2.1.2.1.2.1) gelöst. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 250 µl des Puffers 2 (2.1.2.1.2.2). Die Probe wurde invertiert, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 250 µl von Puffer 3 (2.1.2.1.2.3) versetzt. Nun wurde sie erneut invertiert und für 10 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol gemischt, invertiert und für weitere 10 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet anschließend mit 300 µl 70 % [v/v] Ethanol gewaschen. Nach

Zentrifugation bei 21.000 x g für 4 min und 4 °C wurde der Überstand verworfen, erneut für 1 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der verbliebene Überstand vorsichtig abpipettiert. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl Nuklease freiem Wasser resuspendiert.

2.2.2.8 Virale Proteinexpression in *E. coli*-Bakterien

Für die Expression von HCoV-229E-, WBV-, CHIKV-, und HEV-Makrodomänen und deren Mutanten wurde der *E.-coli*-Stamm TB1-pCGI genutzt und als terminales Ubiquitin-Fusionsprotein mit C-terminalem Hexahistidin-*tag* exprimiert. Die für die Expression verwendeten *E.-coli*-Zellen enthielten zusätzlich noch das Plasmid pCGI, welches für die Ubiquitin-spezifische Protease Ubp1 kodiert. Nach der Induktion des Fusionsproteins mit Anhydrotetracyclin spaltet die Ubiquitin-Protease spezifisch an der Erkennungssequenz LRGG↓XXX zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und dem N-Terminus der Makrodomäne.

Die jeweilige DNA wurde in Bakterien transformiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol gegeben und über Nacht bei 37 °C und 220 U/min im Thermoshaker inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum versetzt und mit 5 ml der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 U/min im Thermoshaker inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Nun wurde 1 ml Kultur als Negativkontrolle abgenommen und die restliche Kultur mit 2 µg/ml Anhydrotetracyclin versetzt. Sowohl Negativkontrolle als auch die Kultur wurden für 4 Stunden bei 25 °C und 220 U/min im Thermoshaker inkubiert. Die induzierte Kultur wurde 15 min bei 6.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml eiskalter Puffer-A-Lösung (2.1.2.1.3.1.1) resuspendiert und anschließend für 30 min mit Lysozym (100 mg/ml) rotierend bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurde zum Aufbrechen der Bakterien eine Ultraschallbehandlung mit 15 Pulsen von je 10 Sekunden bei 75 % Intensität mit 10 Sekunden Pause durchgeführt. Nun wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 38.000 x g für 30 min und 4 °C pelletiert. Währenddessen wurde 1 ml TALON®-Superflow™-Matrix mit zweimal 20 Säulenvolumen destilliertem Wasser gewaschen und mit zweimal 20 Säulenvolumen Protein-Puffer A equilibriert. Abschließend wurde die Matrix in 5 ml Protein-Puffer A gelöst. Hiernach wurden 5 ml zum löslichen Proteinüberstand gegeben und das Gemisch für 2 Stunden bei 3 U/min rotierend im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Die Suspension wurde auf eine Filtersäule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nun folgte ein zweimaliges Waschen mit je 10 Säulenvolumen eiskaltem Protein-Puffer A (2.1.2.1.3.1.1), wodurch alle nicht oder

unspezifisch an die TALON®-Superflow™-Matrix gebundenen Proteine von der Säule entfernt wurden. Danach wurden sechs Fraktionen mit je 1 ml Protein-Puffer B (2.1.2.1.3.1.2) eluiert. Die Menge und Reinheit des aufgereinigten Proteins wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel kontrolliert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden bei 4 °C gegen Dialysepuffer (2.1.2.1.3.1.3) dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2.2.9 Proteinexpression und -aufreinigung von PARP10

Um ein mono-ADP-ribosyliertes Substrat für die Aktivitätsexperimente bereitstellen zu können, wurde die katalytische Domäne von PARP10 (im Folgenden PARP10 genannt) verwendet, die bereits sehr häufig in Studien genutzt wurde, um die Aktivität von Makrodomänen zu überprüfen (Fehr et al., 2016; Li et al., 2016; McPherson et al., 2017; Abraham et al., 2020; Alhammad et al., 2021).

Das Enzym PARP10 und die Mutante PARP10_G888W wurden als Gluthation-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimiert. Für die Expression wurde der *E.-coli*-Stamm BL21 DE3 verwendet. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2 Stunden bei 25 °C. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem Lysispuffer (2.1.2.1.3.2.1) gelöst und anschließend für 30 min mit Lysozym (100 mg/ml) rotierend bei 4 °C inkubiert. Darauf folgte eine Ultraschallbehandlung mit 15 Pulsen je 10 Sekunden bei 75 % Intensität mit 10 Sekunden Pause. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 38000 x g für 30 min und 4 °C pelletiert und der lösliche Überstand mit Glutathion-Sepharose™ über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Filtersäule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Dann erfolgte ein zweimaliges Waschen mit je 10 Säulenvolumen Puffer (2.1.2.1.3.2.1). Anschließend wurde das gebundene Protein in 10 Fraktionen mit je 1 ml Elutionspuffer (2.1.2.1.3.2.2) eluiert. Die Menge und Reinheit der aufgereinigten Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel kontrolliert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden bei 4 °C gegen Dialysepuffer (2.1.2.1.3.2.1) dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2.2.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels *SDS-PAGE* wurden Menge und Reinheit der aufgereinigten Proteine analysiert. Bei diesem Verfahren macht man es sich zunutze, dass vollständig denaturierte Proteine, die mit SDS versetzt wurden, innerhalb eines elektrischen Feldes entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Dabei besteht eine indirekte Proportionalität zwischen dem Molekulargewicht der Proteine und ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel. Dafür wurden die Proteinlysate in

einem reduzierenden Probenpuffer (2.1.2.1.3.5.2) bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 35 mA.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.

Lösung	15%iges Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	2,3 ml	2,7 ml
30 % Acrylamidmix	5,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	
1,0 M Tris pH 6,8		0,5 ml
10 % [w/v] SDS	0,2 ml	0,08 ml
10 % [w/v] APS	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

2.2.2.11 Semi-dry-Westernblot

Nach Auftrennung der Proteine durch *SDS-PAGE* wurden diese mittels *Semi-dry-Westernblot* auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Protran™ 0,45 µM NC) transferiert. Sowohl die Membran als auch die Whatman-Papiere wurden in 1x Transferpuffer (2.1.2.1.3.5.6) getränkt. Whatman-Papiere, Membran und Gel wurden in der Westernblot-Kammer luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 2,5 mA pro cm² Gelfläche für 30 min. Anschließend wurden alle Bindungsstellen der Nitrozellulose-Membran durch einstündige Inkubation in 5 % [w/v] Magermilch in 1x PBS (2.1.2.1.3.5.9) bei Raumtemperatur abgesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in 5 % [w/v] Magermilch in 1x PBST (2.1.2.1.3.5.10) schüttelnd über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Membran dreimal mit 1x PBS gewaschen. Darauf folgte die Zugabe des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers in 5 % [w/v] Magermilch in 1x PBST mit konsekutiver 60-minütiger Inkubation, schüttelnd und lichtgeschützt. Die Membran wurde abermals dreimal mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurde die Bindung der Antikörper mit Hilfe des Odyssey-LiCor®-Systems visualisiert.

2.2.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der aufgereinigten und dialysierten Proteine wurden mittels Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford quantifiziert. Es wurden 800 µl Proteinpuffer (2.1.2.1.3.4.1) vorgelegt, woraufhin die Zugabe von 200 µl Bradfordreagenz (Roti®-Quant) mit nachfolgender Invertierung des Eppendorf-Gefäßes erfolgte. Im direkten Anschluss wurden 2 µl des unverdünnten, zu bestimmenden

Proteins dem Ansatz hinzugegeben und mit der Pipette gemischt. Ohne Verzögerung wurde der Ansatz in eine Küvette zur photometrischen Bestimmung der OD₆₀₀ transferiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer zuvor erstellten Eichgerade (Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich 0–12 µg/µl) mittels des Programmes GraphPad Prism 5.

Zudem wurden quantitative *SDS-PAGE*-Analysen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Quantity One.

2.2.2.13 *De-mono-ADP-Ribosylierungsexperiment*

2.2.2.13.1 Biotin-NAD⁺ als Substrat

Es wurden je Reaktion 30 µL Gluthation-Sepharose mit drei Säulenvolumen doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen, mit zwei Säulenvolumen *Pulldown*-Puffer (2.1.2.1.3.3.1) äquilibriert und in 350 µl *Pulldown*-Puffer resuspendiert. Nun erfolgte die Zugabe von 3 µg PARP10 bzw. PARP10_G888W. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 4 °C rotierend inkubiert, so dass die Enzyme mittels GST-tag an die Matrix gebunden werden konnten. Danach wurde mit zwei Säulenvolumen *Pulldown*-Puffer gewaschen sowie mit zwei Säulenvolumen 1x ADPr-Puffer (2.1.2.1.3.3.2) äquilibriert. Zur Glutathion-Sepharose™ wurden 100 µM Biotin-NAD⁺ in 30 µl ADPr-Puffer gegeben. Die Auto-ADP-Ribosylierung der PARP10-Enzyme erfolgte bei 30 °C für 30 min. Hiernach wurde die Matrix mit zwei Säulenvolumen ADPr-Puffer gewaschen und 100 ng Makrodomäne in 1x ADPr-Puffer hinzugefügt, sodass ein Reaktionsvolumen von 30 µL vorlag. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C für 30 min inkubiert, um die De-ADP-Ribosylierung zu vollziehen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10 µl SDS-Ladepuffer (2.1.2.1.3.5.2) hinzugegeben und die Proben bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel. Anschließend wurden die Proteine mittels *Semi-dry*-Westernblot auf eine PVDF-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid) transferiert. Danach wurde diese in 3%iger BSA-Lösung in TBST (2.1.2.1.3.5.8) für eine Stunde blockiert, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, bevor sie schließlich mit dem Primärantikörper (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY sc-101339 1:1.000) über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert wurde.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (LI-COR Biosciences, 926-32210 1:15.000) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und abschließend mit Hilfe des LI-COR-Odyssey®-Fc-Imaging-Systems gescannt und mittels Image Studio™ Lite ausgewertet.

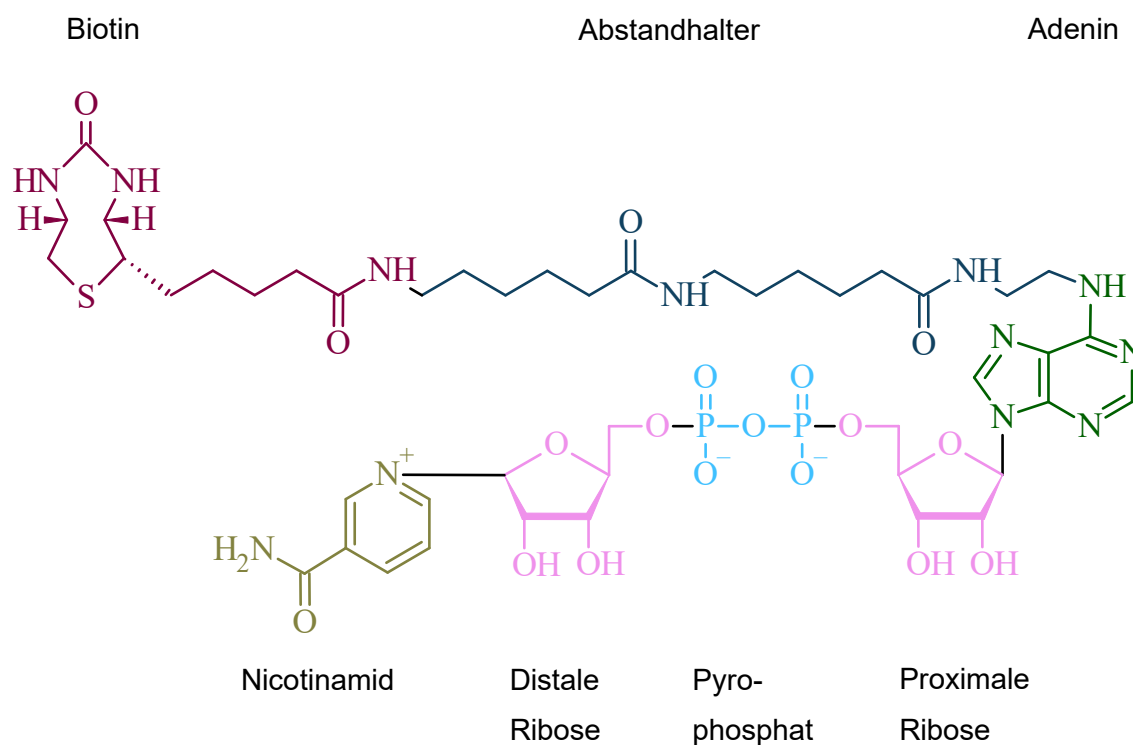


Abbildung 5: Strukturformel von 6-Biotin-17-NAD⁺ (Biolog, Cat. No.: N 012). Das in dieser Arbeit verwendete Biotin-markierte NAD⁺ dient als Substrat für die Auto-mono-ADP-Ribosylierung von PARP10 und als nichtradioaktiver *Tracer* (engl. Spur) für die Darstellung der De-mono-ADP-Ribosylierung der in dieser Dissertationsschrift verwendeten viralen Makrodomänen. Die Strukturformel wurde mit ChemSketch erstellt (ChemSketch, version 2021.2.1, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com).

2.2.2.13.2 ³²P-NAD⁺ als Substrat

Es wurden je Reaktion 15 μL *Glutathione High Capacity Magnetic Agarose Beads* (Merck G0924) mit drei Säulenvolumen doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) gewaschen, mit zwei Säulenvolumen *Pulldown*-Puffer (2.1.2.1.3.3.1) äquilibriert und in 350 μL *Pulldown*-Puffer resuspendiert. Nun erfolgte die Zugabe von je 1 μg PARP10 bzw. PARP10_G888W. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 4 °C rotierend inkubiert, so dass die Enzyme mittels GST-*tag* an die Matrix gebunden werden konnten. Danach wurde mit zwei Säulenvolumen *Pulldown*-Puffer gewaschen sowie mit zwei Säulenvolumen 1x ADPr-Puffer (2.1.2.1.3.3.2) äquilibriert. Zur an die *Glutathione High Capacity Magnetic Agarose Beads* gebundenen PARP10 bzw. PARP10_G888W wurden 1,5 μL 10 mM $\beta\text{-NAD}^+$ und 1 μCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ (800 Ci/mmol) in 30 μL ADPr-Puffer gegeben. Die Auto-mono-ADP-Ribosylierung der PARP10-Enzyme erfolgte bei 30 °C für 30 min. Nichtgebundenes NAD⁺ wurde mit zwei Säulenvolumen ADPr-Puffer gewegewaschen und anschließend wurden je Ansatz 1 μg der jeweiligen Makrodomäne

in einem Gesamtvolumen von 30 µl 1x ADPr-Puffer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C für 1 Stunde inkubiert, um die De-mono-ADP-Ribosylierung zu ermöglichen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl SDS-Ladepuffer (2.1.2.1.3.5.2) gestoppt und die Proben auf 95 °C für 10 min erhitzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 15%igen SDS-Gel, wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt. Nach Exposition des Gels über Nacht, wurde der *phosphorimager screen* mit Hilfe eines *Amersham Typhoon 9200 Imager* gescannt. Die Auswertung erfolgte mittels der Programme Quantity One und GraphPad Prism 6.

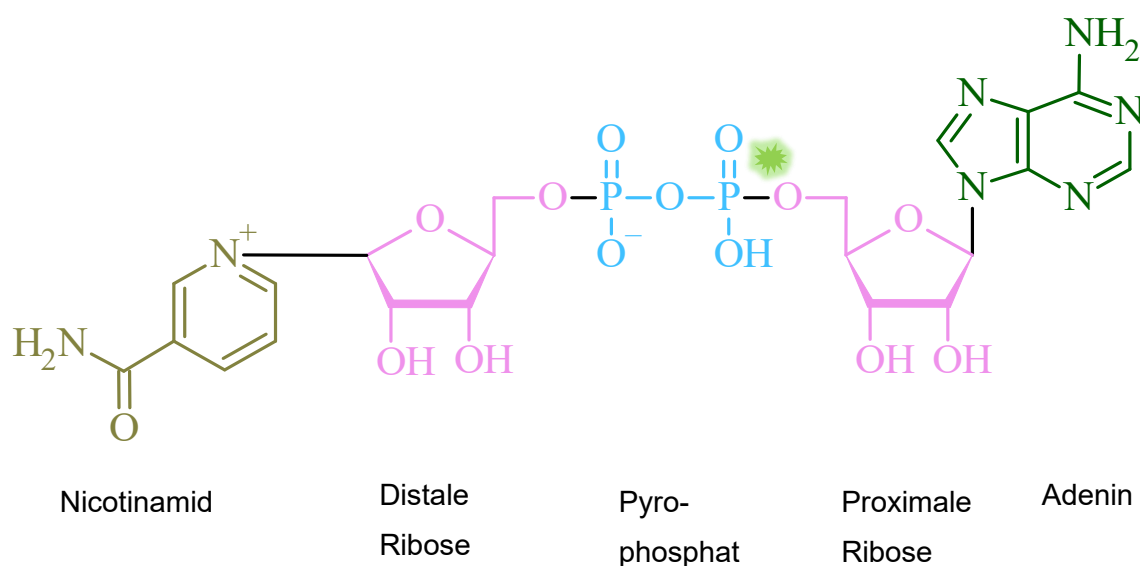


Abbildung 6: Strukturformel von ^{32}P -NAD $^{+}$. Das in dieser Arbeit verwendete ^{32}P -NAD $^{+}$ (HARTMANN ANALYTIC: FP-821) diente als Substrat für die Auto-mono-ADP-Ribosylierung von PARP10 und für die Überprüfung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der in dieser Dissertationsschrift verwendeten viralen Makrodomänen. Die Strukturformel wurde mit ChemSketch erstellt (ChemSketch, version 2021.2.1, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com).

2.2.3 Transkriptomanalyse

2.2.3.1 Zelllinien

2.2.3.1.1 Huh-7-Zellen

Die permanente Zelllinie Huh7 wurde 1982 aus Epithelzellen eines gut differenzierten Leberzellkarzinoms eines 57-jährigen männlichen Japaners isoliert (Nakabayashi et al., 1982). Huh7-Zellen eignen sich gut, um humane Coronaviren wie das HCoV-229E anzuzüchten (Freythuth et al., 2005).

2.2.3.1.2 MRC-5-Zellen

Bei MRC-5-Zellen handelt es sich um humane Lungenfibroblastenzellen, welche aus einem gesunden männlichen in der 14. Schwangerschaftswoche abortierten Fötus

entnommen wurden (Jacobs et al., 1970). Sie eignen sich zur Infektion mit dem HCoV-229E (Wang et al., 2000).

2.2.3.2 Zellkultur und Medien

Wenn nicht anders in dieser Dissertationsschrift beschrieben, wurden die in der Zellkultur verwendeten Zellen in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM, Thermo Scientific) mit 10 % [v/v] fetalem Kälberserum (FKS, Gibco) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die adhärent wachsenden Zellen mit Hilfe einer 1x Trypsin-Lösung (Thermo Scientific) bei 37 °C vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von FKS-haltigem DMEM gestoppt, die Zellen vorsichtig resuspendiert und anschließend in jeweils zuvor festgelegten Volumenanteilen in neue Kulturschalen überführt, denen dann entsprechend ihrer Größe FKS- und Antibiotika-haltiges Nährmedium hinzugefügt wurde.

2.2.3.3 Auftauen von etablierten Zelllinien

Die Zelllinien wurden in Suspensionen in Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -170 °C gelagert und vor der Verwendung in Zellsuspensionen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Hiernach wurden die Suspensionen in 10-cm²-Zellkulturschalen, in welche zuvor 10 ml Wachstumsmedium pipettiert wurde, getropft und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.4 Infektion

Die Infektion mit HCoV-229E (*GenBank accession no.* AF304460) erfolgte mit einem zuvor festgelegten Verhältnis zwischen der Anzahl infektiöser Viruspartikel und der Anzahl von Zellen in der Kultur. Diese Multiplizität der Infektion wird mit MOI abgekürzt (engl. *multiplicity of infection* = Multiplizität der Infektion). Beispielsweise werden bei einer MOI von 1 Virus/Zelle genau so viele infektiöse Viren (ermittelt als *plaque-forming units*, pfu) eingesetzt, wie sich Zielzellen in der Kultur befinden. In Abhängigkeit von der Zellzahl in der verwendeten Kulturschale wurde die erforderliche Menge an virushaltigem Überstand in DMEM (Gibco), 10 % [v/v] fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) verdünnt, auf den Zellrasen gegeben und für 2 Stunden bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inokulationszeit wurde das virushaltige Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

2.2.3.5 RNA-Transfektion

Zur Anwendung kam das Transfektionskit „*TransIT®-mRNA Transfection Kit*“ der Firma Mirus.

Huh7-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät und bis zu einer 90%igen Konfluenz wachsen gelassen. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel mit einem Endvolumen von 2,5 ml Medium je Vertiefung. 1,25 µg Vollängen-Virusgenom-RNA wurde mit 0,75 µg Nukleokapsid-RNA gemischt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der Nukleokapsid-RNA in Kombination mit einer Vollängen-Virusgenom-RNA enthielt, bei der jedoch die virale Polymeraseaktivität durch Mutationen in zwei Codons katalytischer Aminosäurereste ausgeschaltet war. Zum Ansatz wurden 250 µl Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium gegeben. Nun wurden 3 µl des Reagenz mRNA Boost hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Anschließend wurden 5 µl TransIT-mRNA-Reagenz hinzugefügt, abermals mit der Pipette gemischt und die Ansätze kurz zentrifugiert. Der Transfektionskomplex wurde vorsichtig auf die Zellkultur getropft. Abschließend wurde die Zellkulturplatte vorsichtig geschwenkt und bei 33 °C für 72 Stunden inkubiert.

2.2.3.6 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay (franz. *plaque* = Fleck) dient in dieser Dissertation der Virustiterbestimmung durch Quantifizierung von infektiösen Viruspartikeln, welche die Wirtszelle lysieren. Huh-7-Zellen wurden in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät und bis zur Erreichung der Konfluenz bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe der virushaltigen Probe als logarithmische Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} mit einem finalen Gesamtvolumen von 500 µl je Vertiefung. Die Inokulation erfolgte für eine Stunde bei 33 °C. Anschließend wurde das Inokulationsmedium verworfen und durch Überschichtmedium (1 x DMEM, 1,2 % [w/v] Avicel, 10 % [v/v] FKS) ersetzt. Die hohe Viskosität des Überschichtmediums verhindert eine großflächige Verbreitung der austretenden Viruspartikel, sodass sichergestellt wird, dass nicht der gesamte Zellrasen lysiert wird, sondern nur einzelne Plaques durch Lyse unmittelbar benachbarter Zellen gebildet werden. Nach vier Tagen Inkubationszeit bei 33 °C wurde das Überschichtmedium verworfen und der Zellrasen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,15 % [w/v] Kristallviolett-Lösung in 20 % [v/v] Ethanol angefärbt, wodurch die Plaques, hervorgerufen durch virusinduzierte Zelllyse, sichtbar werden. Diese lassen sich jeweils auf einen infektiösen Viruspartikel zurückführen. Die Anzahl an Plaques wird ins Verhältnis zu der Verdünnungsstufe gesetzt und man erhält den Titer in *plaque forming units* pro Milliliter [pfu/ml].

2.2.3.7 Virusaufreinigung

Je zwei konfluente 150-cm²-Zellkulturschalen Huh7-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle für 72 Stunden bei 33 °C infiziert. Nun wurde der Überstand geerntet und bei 7.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und anschließend der Überstand in 50-mL-Falcon™-Röhrchen überführt. In die Ultrazentrifugen-Röhrchen wurden 8 ml 30% [w/v]ige Sucrose in TNE-Puffer (50 mM Tris-HCL pH 7,4, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA) gegeben. Danach wurde der Virusüberstand vorsichtig über das Sucrose-Kissen geschichtet, sodass zwei Phasen im Ultrazentrifugenröhrchen erkennbar waren. Die befüllten Ultrazentrifugenröhrchen wurden exakt austariert und bei 11.2000 x g und 4 °C für 2,5 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation verworfen und das Viruspellet auf Eis gestellt. Die Viruspellets wurden in 1 ml DMEM resuspendiert und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3.8 Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID₅₀) Assay

Der *Tissue Culture Infection Dose*₅₀ Assay (TCID₅₀) wurde in den Arbeiten zu dieser Dissertationsschrift als weitere Methode der Virustiterbestimmung angewandt. MRC-5-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in 100 µL DMEM mit 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C erfolgte die Infektion mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ mit 100 µl DMEM-Viruszellen-Gemisch je Vertiefung und nachfolgender Inkubation über sieben Tage bei 33 °C. Anschließend wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und die Vertiefungen, in denen ein zytopathischer Effekt erkennbar war, ausgezählt. Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Read und Münch (Reed & Muench, 1938; Ramakrishnan, 2016) mit folgender Formel:

$$x = \frac{\text{Prozentgehalt} > 50\% - 50\%}{\text{Prozentgehalt} > 50\% - \text{Prozentgehalt} < 50\%}$$

Log₁₀-Stufe der Reihe Prozentgehalt > 50 % + Logarithmus von x = Titer/ 0,1 ml

2.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbung

MRC-5-Zellen wurden in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen, in denen sich Deckgläser befanden, ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37 °C inkubiert. Das Nährmedium wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen mit einem Virus-Medium-Gemisch mit HCoV-229E-Wildtyp oder den entsprechenden Mutanten mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert, für 48 Stunden bei 33 °C inkubiert und anschließend mit 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd + 0,1 % [v/v] Triton fixiert und permeabilisiert.

Die Zellen wurden mit einem Maus-anti-Doppelstrang-RNA (dsRNA) -Antikörper (J2, English & Scientific Consulting Kft.) (Lundin et al., 2014) und einem Kaninchen-anti-

HCoV-229E-nsp8-Antikörper (Ziebuhr & Siddell, 1999; Müller et al., 2016) in PBS mit 3 % [w/v] BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Hiernach wurden die Deckgläser dreimalig mit PBS gewaschen und mit Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 594 *goat anti mouse* IgG; Alexa Fluor 488 (ab')² *fragment of goat anti rabbit* IgG) 1:500 in 3 % [w/v] BSA versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS, bevor die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma) 1:1000 in PBS für 15 min inkubiert wurden. Nach abermaligem dreifachen Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit Hilfe von *ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI* (Invitrogen™) auf Objektträgern fixiert und bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt und trocken gelagert.

2.2.3.10 RNA-Aufreinigung

MRC-5-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit oder ohne 100 U/ml IFN-beta vorbehandelt. Nach 16 Stunden bei 37 °C wurde der Überstand mit Interferon-beta abgenommen und die Infektion mit HCoV-229E-Wildtyp und den entsprechenden Virusmutanten erfolgte mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle für 48 Stunden bei 33 °C. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gespült.

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von *easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology)* mit 500 µl Lysispuffer nach Anweisung des Herstellers. Die extrahierte RNA wurde durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer eluiert.

Die gewonnene RNA wurde quantifiziert und 1 µg für die *Microarray*-Analyse an den Kooperationspartner Dr. Jochen Wilhelm (Justus-Liebig-Universität Gießen) weitergegeben.

2.2.4 Statistik

Die Ergebnisse der Experimente wurden mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism 6 statistisch ausgewertet. Nach der Erhebung der Daten erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung und ein gepaarter t-Test. Für das Signifikanzniveau α wurde 0,05 gewählt. Signifikante Unterschiede mit einem Signifikanzwert $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ wurden in den erstellten Abbildungen entsprechend mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung viraler cDNAs, Proteinproduktion und Proteinaufreinigung

3.1.1 HCoV-229E

Die in dieser Arbeit durchgeführten Plasmidklonierungen und Mutagenesen der kodierenden Sequenzen von HCoV-229E-Makrodomänen dienten der heterologen Produktion dieser Makrodomänen in *E. coli* als N-terminale Ubiquitin-Fusionsproteine mit einem C-terminalen Hexahistidin-tag. Die proteinkodierenden pASK-Plasmidkonstrukte wurden in *E.-coli*-TB1-pCGI-Bakterien transformiert, die Kultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C geschüttelt und die Genexpression zur Produktion des viralen Proteins durch Zugabe von 2 µg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Nach 16 Stunden bei 18 °C wurden die Zellen pelletiert und die Induktion (nichtinduzierte (NI), induzierte Gesamtlysate (I)) mittels *SDS-PAGE* überprüft.

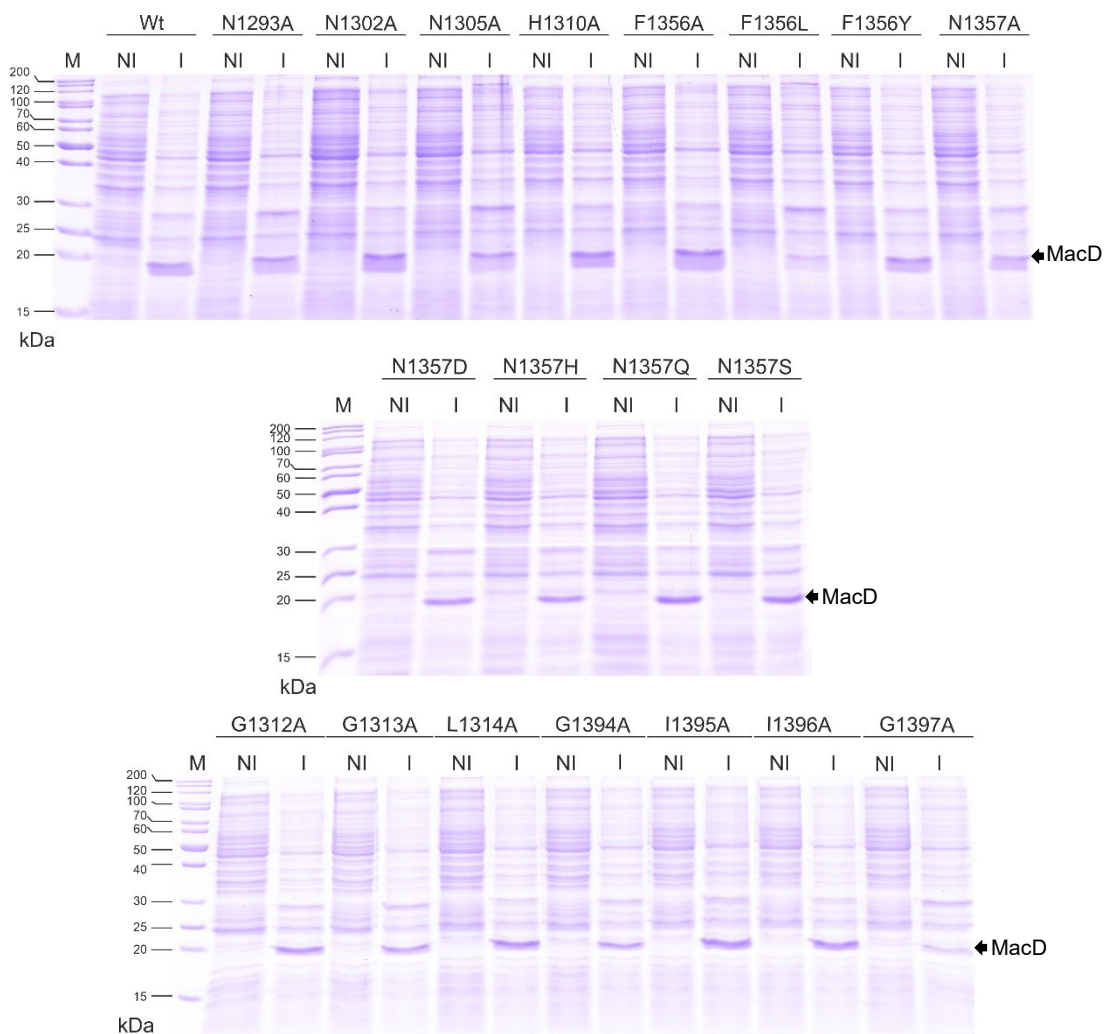


Abbildung 7: SDS-PAGE-Analyse von Gesamtlysaten von *E.-coli*-Zellen, die mit Expressionsplasmiden zur Produktion der wildtypischen Makrodomäne oder einer der angegebenen mutierten Formen der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E transformiert worden waren.

15 % *SDS-PAGE* mit HCoV-229E-Makrodomänen-Induktion. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*); NI: nicht induziert; I: induziert; MacD: Makrodomäne.

Die exprimierten Proteine entsprechen dem zuvor errechneten Molekulargewicht der Makrodomänen (HCoV-229E: 16,3 kDa). Bei den weiteren, weniger auffälligen zusätzlichen Banden nach der Induktion von etwa 28 kDa (Abbildung 7) handelt es sich vermutlich um ungeschnittenes Ubiquitinfusionsprotein. Das zuvor errechnete Molekulargewicht von Ubiquitin beträgt 8,5 kDa. Die Anreicherung der rekombinanten viralen Proteine zeigt sich als deutlich sichtbare zusätzliche Bande in den induzierten Proben im Vergleich zu den nichtinduzierten Proben.

Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe von Lysozym (100 mg/ml) und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Daraufhin wurden die Proteine durch Affinitätschromatographie mit einer TALON®-Superflow™-Matrix aufgereinigt und durch Zugabe von Imidazol (200 mM) eluiert.

Anschließend wurden Westernblots durchgeführt, um die Identität der aufgereinigten Proteine zu verifizieren. Zu ihrem Nachweis wurde die Bindung des His-*tag*-spezifischen Antikörpers an den Hexahistidin-*tag* der rekombinanten Proteine genutzt.

Nach *SDS-PAGE* und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, wurde diese mit 5%[w/v]iger Magermilch in 1x PBS für eine Stunde geblockt und mit dem Maus-anti-Histidin-Primärantikörper (OB05-100UG Sigma-Aldrich) über Nacht inkubiert. Folgend wurde die Nitrozellulosemembran mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (IRDye® 680 LI-COR Biosciences) für 60 Minuten inkubiert. Mit Hilfe des Odyssey-LI-COR®-Systems wurden die gebildeten Immunkomplexe visualisiert.

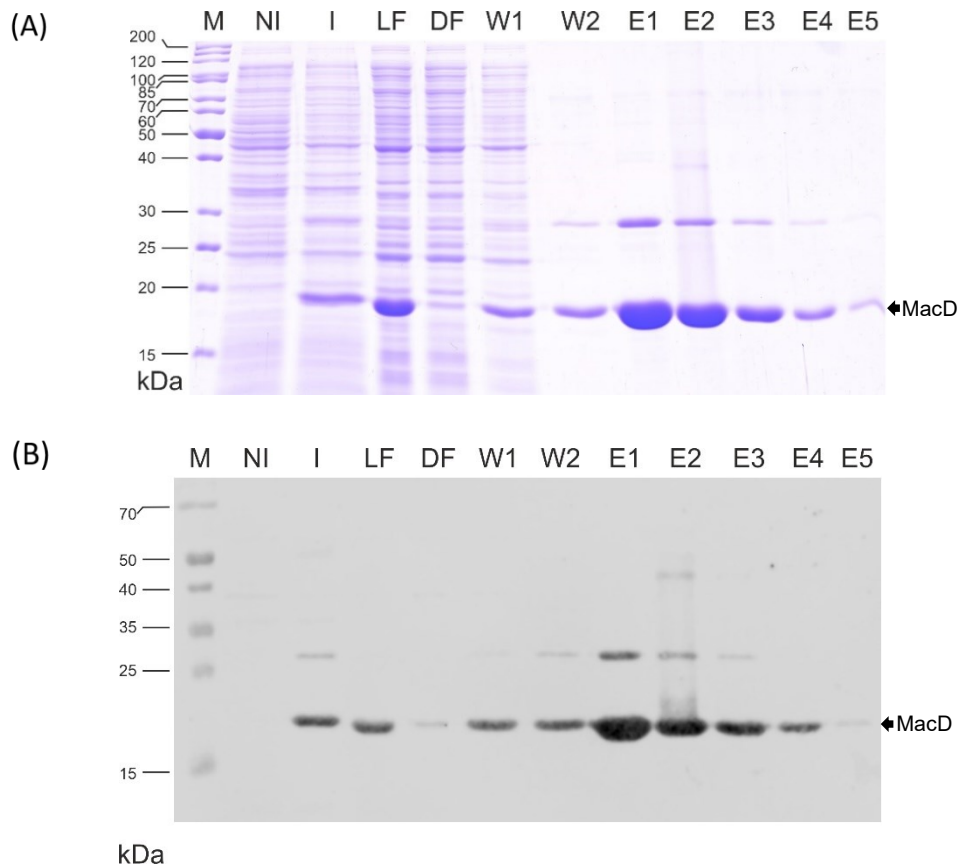


Abbildung 8: Produktion von HCoV-229E-Makrodomänen in *E. coli* und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. (A) 15 % SDS-PAGE zur Analyse der Aufreinigung der HCoV-229E-Makrodomäne. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*); NI: Lysat nichtinduzierter Zellen; I: Lysat induzierter Zellen; LF: Ladefraktion; DF: Durchfluss; W1: Waschen 1; W2: Waschen 2; E1-E5: Eluatfraktionen 1-5; MacD: Makrodomäne. (B) Westernblot-Analyse zum Nachweis der rekombinanten HCoV-229E-Makrodomäne in den einzelnen Proben (vgl. Teilbild A). kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder* 10 bis 180 kDa); NI: Lysat nichtinduzierter Zellen; I: Lysat induzierter Zellen; LF: Ladefraktion; DF: Durchfluss; W1: Waschen 1; W2: Waschen 2; E1-E5: Eluatfraktionen 1-5; MacD: Makrodomäne; Primärantikörper: Sigma-Aldrich OB05-100UG (Verdünnung 1:1000), Sekundärantikörper LI-COR Biosciences IRDye® 680 (Verdünnung 1:15000).

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Proteine über Nacht gegen den Lagerungspuffer dialysiert, die Konzentration nach Bradford bestimmt und Aliquots dieser Proteine mittels SDS-PAGE analysiert, um ihre Reinheit und strukturelle Integrität zu überprüfen.

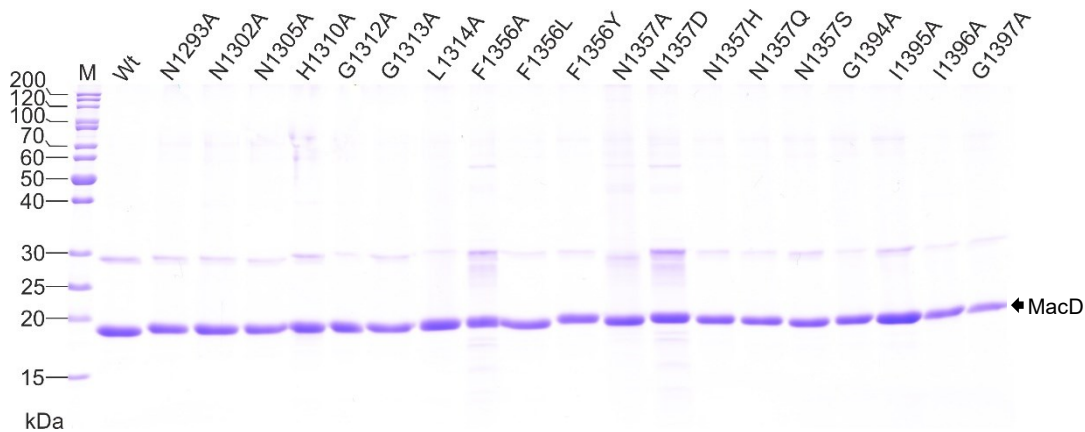


Abbildung 9: SDS-PAGE der coronaviralen Makrodomänen nach Dialyse der Proteine. 15 % SDS-PAGE mit HCoV-229E-Makrodomänen. Es wurden 2 µg des jeweiligen Proteins aufgetragen. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*); MacD: Makrodomäne.

3.1.2 Chikungunya-Virus (CHIKV)

Die Proteinexpression und die Durchführung der Westernblots erfolgten wie in 3.1.1 beschrieben. Wie in Abb. 10 (A) an den Banden der Eluatfraktionen erkennbar ist, konnte durch die TALON®-Superflow™-Affinitätschromatographie ausreichend Protein isoliert werden. Das errechnete Molekulargewicht der CHIKV-Makrodomäne liegt bei 17,5 kDa und entspricht somit dem Ergebnis der SDS-PAGE. Auch in diesem Fall wurde ein zusätzliches Protein von ca. 26 kDa gereinigt, dessen (aus dem Laufverhalten im Gel geschätztes) Molekulargewicht dem errechneten Molekulargewicht des Ubiquitininfusionsproteins (26 kDa) sehr gut entspricht.

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Proteine zum Pufferwechsel über Nacht dialysiert, die Konzentration nach Bradford bestimmt und durch SDS-PAGE analysiert, um die Reinheit und strukturelle Integrität des Proteins zu überprüfen.

Anschließend wurden Westernblots durchgeführt, um die Identität der aufgereinigten Proteine zu verifizieren. Auch in diesem Fall wurde dabei ein His-tag-spezifischer Antikörper genutzt, der den Hexahistidin-tag am C-terminus der heterolog exprimierten CHIKV-Makrodomäne nachweisen kann.

Nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, wurde diese mit 5%[w/v]iger Magermilch in 1x PBS für eine Stunde geblockt und mit dem Maus-anti-Histidin-Primärantikörper (OB05-100UG Sigma-Aldrich) über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (IRDye® 680 LI-COR Biosciences) für 60 Minuten inkubiert. Mit Hilfe des Odyssey LI-COR®-Systems wurden die gebildeten Immunkomplexe visualisiert.

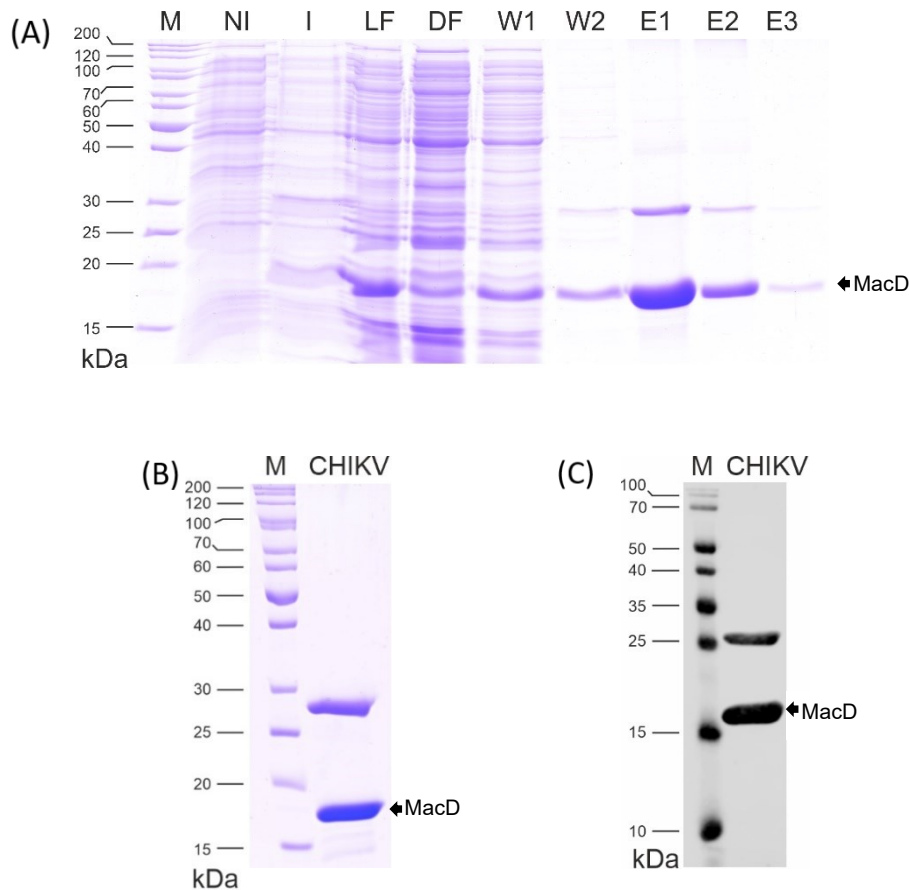


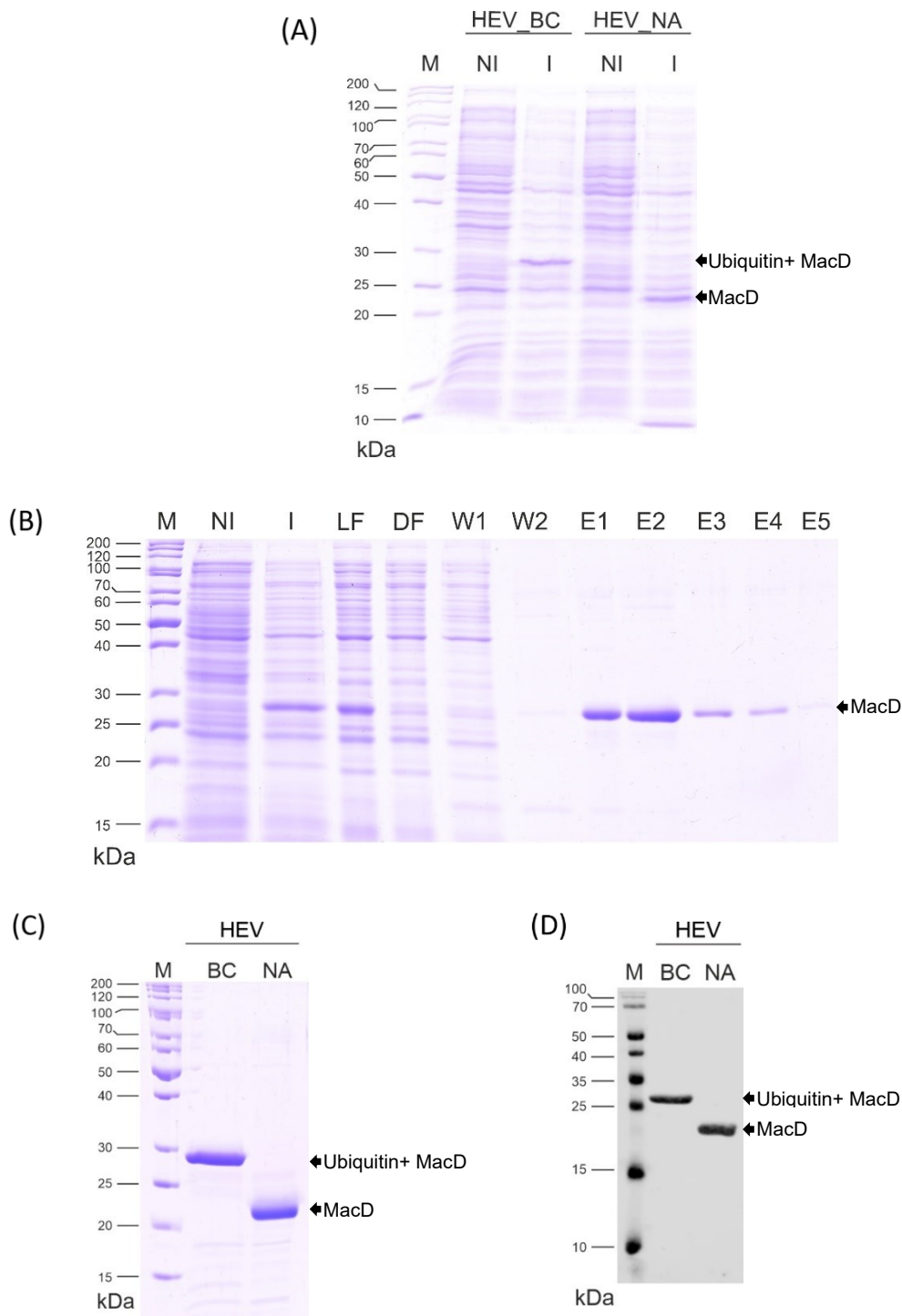
Abbildung 10: Produktion in *E. coli* und Aufreinigung der CHIKV-Makrodomäne.

(A) 15 % SDS-PAGE zur Dokumentation der Produktion und Aufreinigung der CHIKV-Makrodomäne. NI: Gesamtylsat nichtinduzierter Zellen; I: Gesamtylsat induzierter Zellen; LF: Ladefraktion; DF: Durchfluss; W1: Waschen 1; W2: Waschen 2; E1-E3: Eluatfraktionen 1-3; MacD: Makrodomäne. (B) Commassie-gefärbtes 15 % SDS-Polyacrylamid-Gel zur Analyse der gereinigten CHIKV-Makrodomäne nach Dialyse. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder* 10-200 kDa); MacD: Makrodomäne. (C) Westernblot zum Nachweis der CHIKV-Makrodomäne mit C-terminalem Hexahistidin-tag nach Dialyse; kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder* 10 bis 180 kDa); MacD: Makrodomäne; Primärantikörper: Sigma-Aldrich OB05-100UG (Verdünnung 1:1000), Sekundärantikörper LI-COR Biosciences IRDye® 680 (Verdünnung 1:15000).

3.1.3 Hepatitis-E-Virus (HEV)

Die Klonierung, Expression, Aufreinigung, Dialyse und der Westernblot erfolgten wie in 3.1.1 beschrieben. Das errechnete Molekulargewicht von HEV_BC beträgt 19,6 kDa, jenes für HEV_NA 20,5 kDa und für Ubiquitin 8,5 kDa.

Aus Abb.11 (D) geht hervor, dass vermutlich der Großteil der Makrodomäne von HEV_BC als ungeschnittenes Ubiquitininfusionsprotein vorliegt.



3.1.4 Weißbrassenvirus (WBV)

Die Klonierung, Expression, Aufreinigung, und Dialyse erfolgten wie in 3.1.1 beschrieben. Die Makrodomäne des Weißbrassenvirus wurde mit zwei verschiedenen C-terminalen Enden exprimiert (WBV_C1 und WBV_C2), wobei zu beobachten ist, dass bei gleichen Volumina der Ladefraktionen die Eluatfraktionsbanden von WBV_C1 stärker ausgeprägt sind als jene von WBV_C2. Das errechnete Molekulargewicht von WBV_C1 beträgt in etwa 20,9 kDa, das von WBV_C2 ca. 22,7 kDa.

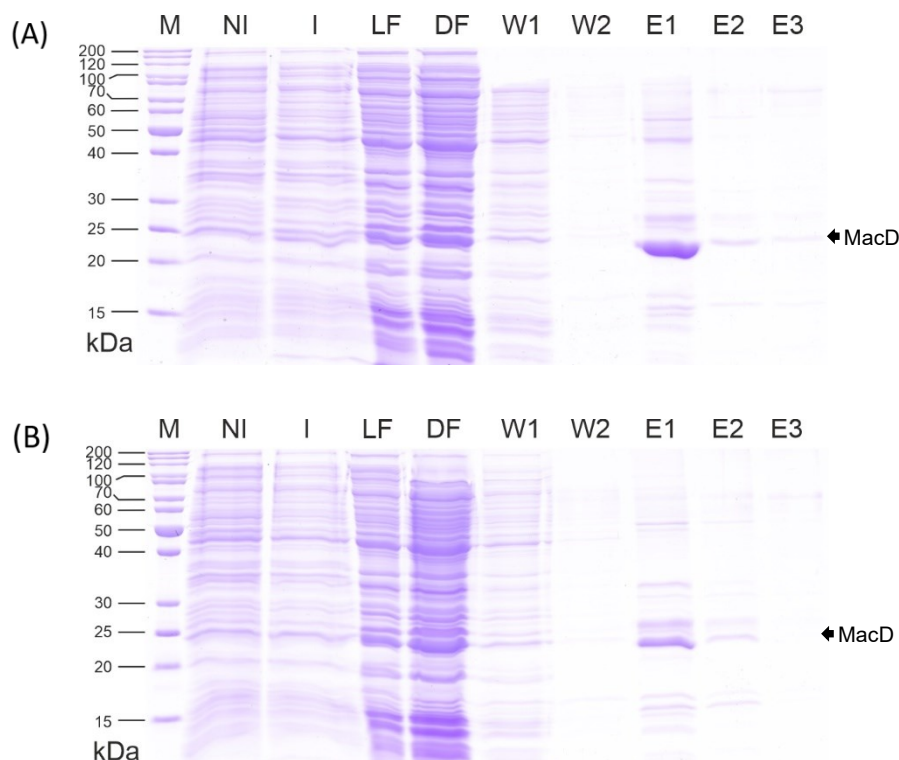


Abbildung 12: Produktion in *E. coli* und Aufreinigung der WBV-Makrodomänen mittels Affinitätschromatographie. (A) 15 % SDS-PAGE zur Dokumentation der WBV_C1-Aufreinigung. (B) 15 % SDS-PAGE zur Dokumentation der WBV_C2-Aufreinigung. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*); NI: Gesamtlysate nichtinduzierter Zellen; I: Gesamtlysate induzierter Zellen; LF: Ladefraktion; DF: Durchfluss; W1: Waschen 1; W2: Waschen 2; E1-E3: Eluatfraktionen 1-3; MacD: Makrodomäne.

3.2 Expression und Aufreinigung von PARP10

Das Enzym PARP10 und die Mutante PARP10_G888W wurden als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Das proteinkodierende Plasmidkonstrukt wurde in *E.-coli*-Bakterien transformiert, die bei 37 °C inkubiert wurden, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreichte. Daraufhin erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2 Stunden bei 25 °C. Während dieser Inkubationszeit produzierten die Bakterien das interessierende Protein. Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte durch Nutzung des Glutathion-S-Transferase-Anteils am Fusionsprotein. Mittels *SDS-PAGE* wurde die erfolgreiche Induktion sowie die Menge des aufgereinigten Enzyms in den Eluatfraktionen überprüft. Dabei wurden Gesamtllysate nichtinduzierter (NI) und induzierter (I) Zellen, Ladefraktionen (LF), Durchflussfraktionen (DF), Waschfraktionen (W) und Eluatfraktionen analysiert.

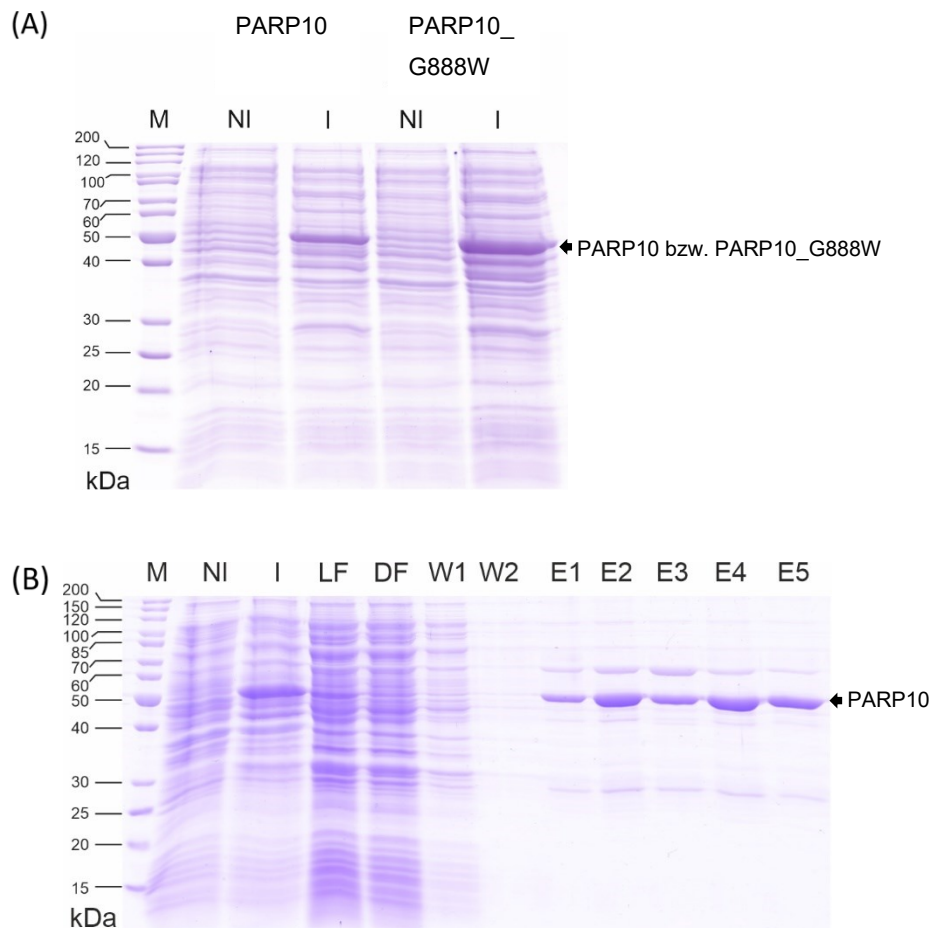


Abbildung 13: Expression in *E. coli* und affinitätschromatographische Aufreinigung von PARP10.

(A) 15 % *SDS-PAGE* zur Dokumentation der Produktion von PARP10- und PARP10_G888W. (B) 15 % *SDS-PAGE* zur Dokumentation der PARP10-Aufreinigung. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder* 10-200 kDa); NI: Gesamtllysate nichtinduzierter Zellen; I: Gesamtllysate induzierter Zellen; LF: Ladefraktion; DF: Durchfluss; W1: Waschen 1; W2: Waschen 2; E1-E5: Eluatfraktionen 1-5.

Die mittels *SDS-PAGE* geschätzte Molekularmasse der exprimierten Proteine entspricht der errechneten Molekularmasse (46,17 kDa). Die Anreicherung der Proteine zeigt sich als deutlich sichtbare Bande der induzierten Proben im Vergleich zu den nichtinduzierten Proben (vgl. Abbildung 13 (A)). Es konnte ausreichend Protein exprimiert und aufgereinigt werden (vgl. Abbildung 13 (B)), welches anschließend durch Dialyse in den Lagerungspuffer überführt wurde.

3.3 Untersuchung des Einflusses der Makrodomäne auf Replikation und Infektion

3.3.1 Immunfluoreszenz

Um die Replikationsfähigkeit verschiedener HCoV-229E-Mutanten mit Substitutionen einzelner Aminosäurereste in der Makrodomäne zu überprüfen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden MRC-5-Zellen mit Wildtyp und Mutanten des HCoV-229E mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert, für 48 Stunden bei 33 °C inkubiert und mit 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd + 0,1 % [v/v] Triton fixiert und permeabilisiert.

Als Primärantikörper wurden anti-HCoV-229E-nsp8-Antikörper verwendet, um die Replikationskomplexe nachzuweisen (Ziebuhr & Siddell, 1999; Müller et al., 2016) sowie anti-dsRNA-Antikörper, um Doppelstrang-RNA zu identifizieren, welche als Replikationsintermediate während der viralen RNA-Synthese gebildet werden (Lundin et al., 2014).

Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 14 gezeigt. Die Daten lassen den Schluss zu, dass sowohl der Wildtyp als auch die HCoV-229E-MacD-Mutanten in den MRC-5-Zellen replizieren, da sowohl das nsp8 als auch die dsRNA und deren Kolokalisation nachgewiesen werden konnten. Eine Aussage, inwiefern Wildtyp und die daraus hergestellten MacD-Mutanten besser oder schlechter replizieren, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht treffen, da Anreicherung und Kolokalisation der jeweiligen Mutanten und des Wildtyps konfokalmikroskopisch nicht ausreichend zuverlässig quantifiziert werden können.

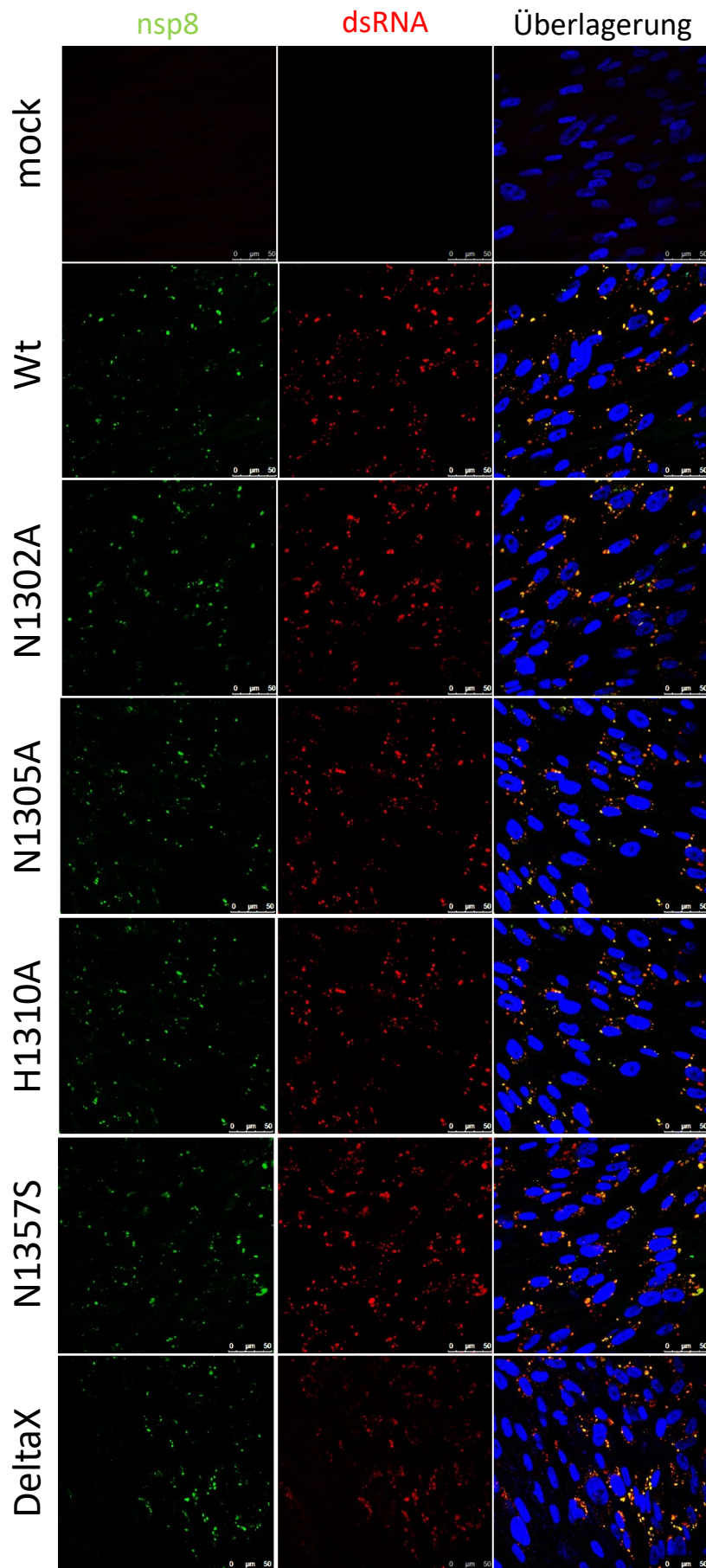


Abbildung 14: Immunfluoreszenzanalyse von MRC-5-Zellen, die mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert und 48 h p.i. fixiert und mittels Immunfluoreszenz analysiert (grünes Signal: nsp8, rotes Signal: dsRNA). Die rechts gezeigten, übereinander gelegten Aufnahmen zeigen eine partielle Kolo-kalisation von nsp8 und dsRNA (gelbes Signal). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal); Primärantikörper: Maus-anti-dsRNA-IgG, polyklonales Kaninchen-anti-nsp8-Serum; Sekundärantikörper: Alexa-Fluor-488 F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa-Fluor-594-Ziege-anti-Maus IgG; mock: nichtinfizierte Zellen, Wt: Wildtyp; Skala: 50 µm. Die für die Infektion verwendeten Viren sind links angezeigt. Neben 4 Mutanten mit den angegebenen Substitutionen einzelner Aminosäurereste in der Makrodomäne wurde eine Deletionsmutante verwendet, bei der die kodierende Sequenz der kompletten Makrodomäne aus dem Genom deletiert worden war.

3.4 Überprüfung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität viraler Makrodomänen

Die Experimente wurden in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurden die beiden Substratproteine PARP10 und die Mutante PARP10_G888W, bei der die Fähigkeit zur MARYlierung durch eine Gly-Trp-Substitution im aktiven Zentrum ausgeschaltet wurde, vorbereitet. Durch Zugabe von ³²P-NAD⁺ erfolgte eine Auto-mono-ADP-Ribosylierungsreaktion des katalytisch aktiven Proteins (PARP10). Das katalytisch inaktive Kontrollprotein (PARP10_G888W) wurde in gleicher Weise behandelt. Durch einen nachfolgenden Waschschrift wurde ungebundenes NAD⁺ entfernt. Die (mehrfach) mono-ADP-ribosylierte Form von PARP10 wurde anschließend als Substrat zur Bestimmung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der verschiedenen Makrodomänenproteine eingesetzt.

Zunächst wurde die De-mono-ADP-Ribosylierungsfähigkeit der heterolog exprimierten Makrodomänen von HEV und WBV überprüft. Anschließend wurden Aktivitätsexperimente mit mutierten Formen der HCoV-229E-Makrodomäne durchgeführt, bei denen einzelne Aminosäurereste im putativen aktiven Zentrum ausgetauscht worden waren, um daraus Rückschlüsse auf die mögliche funktionelle Bedeutung dieser konservierten Reste ziehen zu können. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit QuantityOne und die Visualisierung mit GraphPad Prism 6.

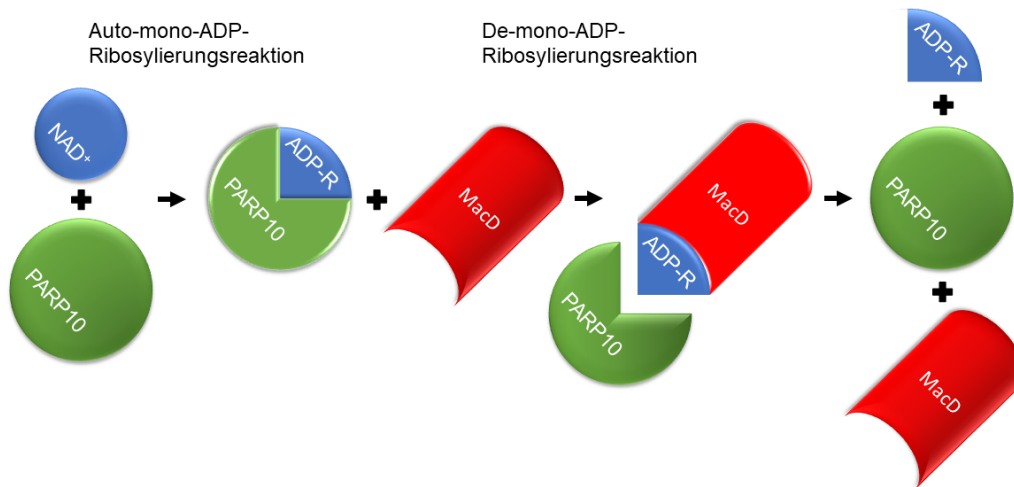


Abbildung 15: Schematische Darstellung des De-mono-ADP-Ribosylierungsexperiments. PARP10 bzw. PARP10_G888W wurden unter Nutzung des bei beiden Proteinen vorhandenen GST-Tag an eine Gluthation-Sephrose-Matrix gebunden. Durch Zugabe von ^{32}P -NAD $^{+}$ erfolgte eine Auto-mono-ADP-Ribosylierung von PARP10, womit eine radioaktive Markierung des Proteins verbunden war. Das katalytisch inaktive Kontrollprotein PARP10_G888W wurde hingegen nicht ADP-ribosyliert und damit auch nicht radioaktiv markiert. Nach Entfernung von nicht eingebautem ^{32}P -NAD $^{+}$ wurden die verschiedenen Makrodomänenproteine (Wildtyp oder mutiert) mit ^{32}P -ADP-ribosylierter PARP10 inkubiert. Aktive Formen der Makrodomänen katalysierten dann die De-mono-ADP-Ribosylierung des eingesetzten Substratproteins. ADPr: ADP-Ribose; MacD: Makrodomäne. Eigene Darstellung. Die Abbildung wurde mit Microsoft 365® (Power Point® und Word®) erstellt.

3.4.1 De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomänen von HCoV-229E, HEV, CHIKV und WBV

Die De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität wurde bereits für verschiedene virale Makrodomänen nachgewiesen. Zu diesen gehören auch einige Viren der Familien *Coronaviridae* (HCoV-229E, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 u. a. (Alhammad et al., 2021; Li et al., 2016)), *Hepeviridae* (Hepatitis-E-Virus (Li et al., 2016)) und *Togaviridae* (Chikungunya-Virus (Ecke et al., 2017; McPherson et al., 2017), venezolanisches Pferdeenzephalomyelitis-Virus (engl. *venezuelan equine encephalomyelitis virus* = VEEV (Li et al., 2016; Ecke et al., 2017) u. a.). Um weiterführende Studien zur biochemischen und/oder strukturellen Charakterisierung viraler Makrodomänen zu ermöglichen, wurden die Makrodomänen vom HCoV-229E, CHIKV, HEV und WBV in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Aktivität überprüft. Da die exakten Grenzen der Makrodomäne des Hepatitis-E-Virus im viralen Polyprotein unbekannt sind, wurden zwei Proteinkonstrukte (HEV_BC (Li et al., 2016), HEV_NA (Neuvonen & Ahola, 2009)), die sich sowohl C- als auch N-terminal voneinander unterscheiden, exprimiert. Die Makrodomäne des Weißbrassenvirus wurde unter Verwendung zweier Sequenzen exprimiert, die sich hinsichtlich ihres C-Terminus unterscheiden. Abb. 16 zeigt einen Sequenzvergleich der in dieser Arbeit produzierten und charakterisierten Makrodomänen unterschiedlicher Viren.

HCoV-229E-MacD	1	- - - - -	KEKLNA	F	LVHDNVAFYQGDVD	TVVNGVDFDF	I	
CHIKV-MacD	1	- - - - -	- - - - -	-	APSYRVKRMD	- - - -	IAKNDEECV	
HEV-MacD_BC	1	PAITHQAARHRRL	L	F	TPDG	GSKVFAGS	- - - -	LFESTCTWL
HEV-MacD_NA	1	- - - - -	ARHRRL	L	F	TPDG	GSKVFAGS	- - - -
WBV-MacD_C1	1	- - - - -	VTINNPF	A	SNEG	VTFAVHN	-	IGA ITTTEGEFI
WBV-MacD_C2	1	- - - - -	VTINNPF	A	SNEG	VTFAVHN	-	IGA ITTTEGEFI
HCoV-229E-MacD	33	VNAAN	ENLAH	GG	GLAKA	LDVYTKGKLQRLSKE	- - - -	HIGL
CHIKV-MacD	20	VNAAN	PRGLP	GD	GVCKA	VYKKWPESFKNS	- - - -	- - - -
HEV-MacD_BC	37	VNASN	VDHRP	GG	GLCHA	FYQRYPASFDAA	- - - -	- - - -
HEV-MacD_NA	30	VNASN	VDHRP	GG	GLCHA	FYQRYPASFDAA	- - - -	- - - -
WBV-MacD_C1	32	VNAAN	KQLNNGT	G	VTGAI	FAAHDKELKLTQA	I	KALPTYGA
WBV-MacD_C2	32	VNAAN	KQLNNGT	G	VTGAI	FAAHDKELKLTQA	I	KALPTYGA
HCoV-229E-MacD	69	AGKV	- - - -	K	VGTG	- - -	VMVECDSLR	I
CHIKV-MacD	49	- - AT	- - - -	P	VGTA	- - -	KTVMCGTYPV	I
HEV-MacD_BC	66	- - SF	- - - -	V	MRDG	- - -	AAAYTLTPRP	I
HEV-MacD_NA	59	- - SF	- - - -	V	MRDG	- - -	AAAYTLTPRP	I
WBV-MacD_C1	72	SDKLESHQH	VVQTI	I	KNNNSTHAIN	I	LHAAAPI	I
WBV-MacD_C2	72	SDKLESHQH	VVQTI	I	KNNNSTHAIN	I	LHAAAPI	I
HCoV-229E-MacD	98	- - - - -	HERDL	L	IKAYNTINNE	- - - -	QGTPLTP	I
CHIKV-MacD	79	- - - - -	SEGREL	L	AAAYREVAKEVTRLGVNSVAI	P	LL	
HEV-MacD_BC	94	- - - - -	EHNPKMLEAAY	R	ETCSR	- - - -	LGTAAYP	LL
HEV-MacD_NA	87	- - - - -	EHNPKMLEAAY	R	ETCSR	- - - -	LGTAAYP	LL
WBV-MacD_C1	112	NPEVLLAHN	ETAQSEL	K	ETYKA	IVDYAQLNKL	L	THIYLP
WBV-MacD_C2	112	NPEVLLAHN	ETAQSEL	K	ETYKA	IVDYAQLNKL	L	THIYLP
HCoV-229E-MacD	123	SC	GIFGIKLETS	L	EVLLDV	- - -	CNTKEVKVFVYTD	- - -
CHIKV-MacD	110	ST	GVYSGGKDRLTQSLNHLFTAMDSTDADVVIYCRDK	E	WE			
HEV-MacD_BC	120	GT	GIYQVP	I	GPS	FD	AWERN	- - -
HEV-MacD_NA	113	GT	GIYQVP	I	GPS	FD	AWERN	- - -
WBV-MacD_C1	152	GAGAY	GHKPLDS	L	EAF	LDAMRNRSPQSTTQY	T	LL
WBV-MacD_C2	152	GAGAY	GHKPLDS	L	EAF	LDAMRNRSPQSTTQY	T	LL
HCoV-229E-MacD	156	- - - -	EVCKVKDFV	S	GLV	- - - - -	- - - - -	- - - - -
CHIKV-MacD	150	KKIS	- - - - -	- - - - -	- - - - -	EAIQMRT	- - - - -	- - - - -
HEV-MacD_BC	156	EANRPTCPTLT	T	IT	EDVARTAN	- - - - -	- - - - -	- - - - -
HEV-MacD_NA	149	EANRPTCPTLT	T	IT	EDVARTANLA	I	ELDSATDVGRACAG	- -
WBV-MacD_C1	192	PL	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
WBV-MacD_C2	192	PLDNPS	-	F	SYEFLNLLVTN	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Abbildung 16: Proteinsequenzen der in dieser Arbeit untersuchten viralen Makrodomänen HCoV-229E-MacD, CHIKV-MacD, HEV-MacD_BC, HEV-MacD_NA, WBV-MacD_C1 und WBV-MacD_C2. Das Sequenzalignment (engl. *alignment* = Abgleich, Ausrichtung, Anordnung) erfolgte mit Hilfe von Clustal Omega (Madeira et al., 2022). Die grün hinterlegten Spalten geben den Grad der Konservierung der

Aminosäuren an (Dunkelgrün $\geq 90\%$, grün $\geq 70\%$). Die Nummerierung gibt die Positionen in der Aminosäuresequenz der jeweiligen Makrodomäne an.

Die Aktivitäten der Makrodomänen wurden in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Wie in Abb. 17 dargestellt, besitzen die Makrodomänen von HCoV-229E, HEV (sowohl HEV_BC als auch HEV_NA) und CHIKV eine zweifelsfrei nachweisbare De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. In dem hier verwendeten Test waren diese Aktivitäten auf einem ähnlichen Niveau und die Ergebnisse zeigten (im Vergleich zur proteinfreien Kontrollreaktion) eine hohe Signifikanz im gepaarten t-Test ($p_{\text{HCoV-229E}} < 0,001$; $p_{\text{CHIKV}} < 0,01$; $p_{\text{HEV_BC}} < 0,001$; $p_{\text{HEV_NA}} < 0,001$). Beide hier getesteten Varianten der Makrodomäne des Weißbrassenvirus zeigten hingegen keine nachweisbare enzymatische Aktivität.

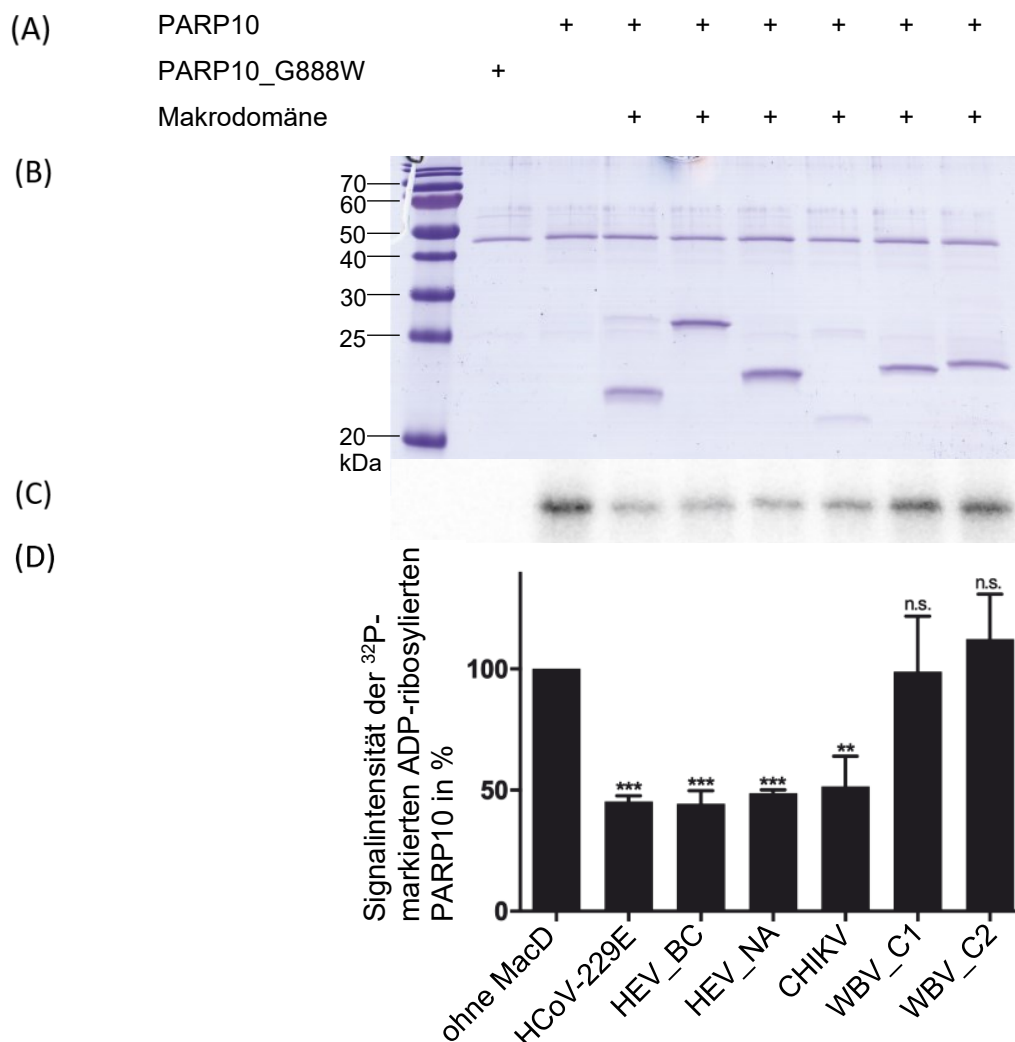


Abbildung 17: De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomänen des HCoV-229E, HEV, CHIKV und WBV. (A) Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze in den verschiedenen Spuren des Gels (B) bzw. der Autoradiographie dieses Gels (C) hinsichtlich PARP10, PARP10_G888W und Makrodomäne (Details siehe (D)). (B) 15 % SDS-PAGE von Reaktionsansätzen mit Makrodomänen verschiedener Viren und/oder PARP10 bzw. PARP10_G888W. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder). (C) Autoradiographie zur

Visualisierung ^{32}P -ADP-ribosylierter Proteine zur Bestimmung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der verwendeten Makrodomänen. Die quantitative Bestimmung der Signalstärken erfolgte mittels Quantity One. (D) Statistische Auswertung der Experimente und Visualisierung mit Hilfe von GraphPad Prism 6. Daten aus 3 unabhängigen Experimenten wurden verwendet und in einem gepaarten t-Test analysiert. Dabei wurde die relative Abnahme der Signalintensität der ^{32}P -markierten ADP-ribosylierten PARP10 nach Inkubation mit einer der angezeigten Makrodomänen bestimmt und mit einer Reaktion ohne Zugabe einer Makrodomäne verglichen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). MacD: Makrodomäne.

3.4.2 De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität coronaviraler Makrodomänenmutanten

Sequenzvergleiche coronaviraler Makrodomänen zeigen einige hochkonservierte Bereiche und einzelne hochkonservierte Aminosäurereste in der Proteinsequenz (Putics et al., 2005). Für einige dieser konservierten Reste, nämlich Asparagin 1302, Asparagin 1305, Histidin 1310 sowie Glycin 1312 und Glycin 1313, wurden bereits erste Daten erhoben, mit deren Hilfe eine mögliche Rolle für die früher beschriebene ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität der HCoV-229E-Makrodomäne bestimmt wurde (Putics et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun weitere Aminosäurereste der Makrodomäne und einige der vorgenannten Reste hinsichtlich ihrer möglichen Rolle in der De-mono-ADP-Ribosylierung untersucht. Tabelle 3 zeigt die jeweilige Position in der Aminosäuresequenz der HCoV-229E-Polyproteine pp1a und pp1ab und den vorgenommenen Austausch einzelner Aminosäurereste mit Alanin oder anderen Aminosäuren in der Makrodomäne.

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Makrodomänenmutanten des humanen Coronavirus 229E.

Virusklon	Vorgenommener Austausch	Position in der Proteinsequenz	Domäne
N1293A	Asparagin → Alanin	1293	Makrodomäne
N1302A	Asparagin → Alanin	1302	Makrodomäne
N1305A	Asparagin → Alanin	1305	Makrodomäne
H1310A	Histidin → Alanin	1310	Makrodomäne
G1312A	Glycin → Alanin	1312	Makrodomäne
G1313A	Glycin → Alanin	1313	Makrodomäne
L1314A	Leucin → Alanin	1314	Makrodomäne
F1356A	Phenylalanin → Alanin	1356	Makrodomäne
F1356L	Phenylalanin → Leucin	1356	Makrodomäne
F1356Y	Phenylalanin → Tyrosin	1356	Makrodomäne
N1357A	Asparagin → Alanin	1357	Makrodomäne
N1357D	Asparagin → Asparaginsäure	1357	Makrodomäne
N1357H	Asparagin → Histidin	1357	Makrodomäne
N1357Q	Asparagin → Glutamin	1357	Makrodomäne
N1357S	Asparagin → Serin	1357	Makrodomäne
G1394A	Glycin → Alanin	1394	Makrodomäne
I1395A	Isoleucin → Alanin	1395	Makrodomäne
F1396A	Phenylalanin → Alanin	1396	Makrodomäne
G1397A	Glycin → Alanin	1397	Makrodomäne

Strukturbiologische Studien ergaben Hinweise auf substratbindungsinduzierte Konformationsänderungen und die Ausbildung einer tiefen Bindungstasche (Putics et al., 2005; Karras et al., 2005). Die distale Ribose des Substrates wird dabei durch zwei stark konservierte Schleifen der Makrodomäne flankiert (Alhammad & Fehr, 2020). Die erste Schleife enthält ein stark konserviertes Glycin-Tripeptid. Dieses interagiert mit dem Alphaphosphat sowie der 1''- und 2''-OH-Gruppe der distalen Ribose (Rack et al., 2020). Die zweite Schleife enthält ein stark konserviertes Glycin-Isoleucin-Phenylalanin-Motiv, das an das Betaphosphat der ADP-Ribose bindet und mittels van-der-Waals-Kräften die Lage der distalen Ribose koordiniert (Alhammad & Fehr, 2020). Es konnte gezeigt werden, dass diese Schleifen der Makrodomäne des venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis Virus (engl. *venezuelan equine encephalomyelitis virus* = VEEV) eine sehr ausgeprägte Konformationsänderung vollziehen, wenn sie mit ADP-Ribose in Kontakt treten (Makrynitsa et al., 2019).

Die Abbildungen 18 und 19 dienen der räumlichen Zuordnung der untersuchten Aminosäuren in die Gesamtstruktur der Makrodomäne und der Interaktionen der Makrodomäne mit dem Substrat. Der Vergleich mit Abbildung 4 erlaubt einen Einblick in die substratinduzierte Konformationsänderung des Proteins.

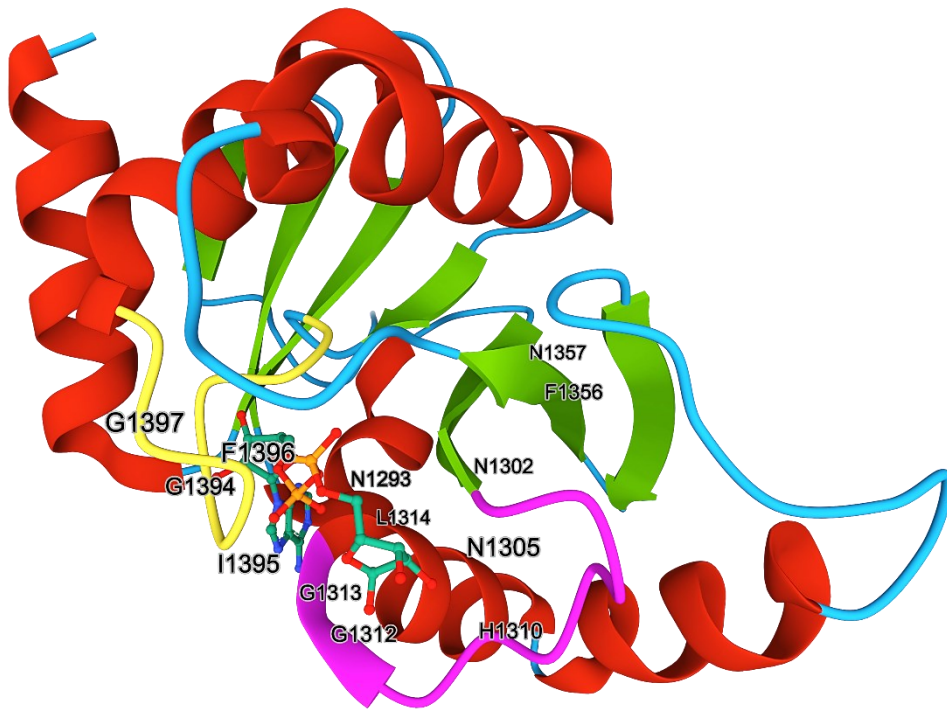
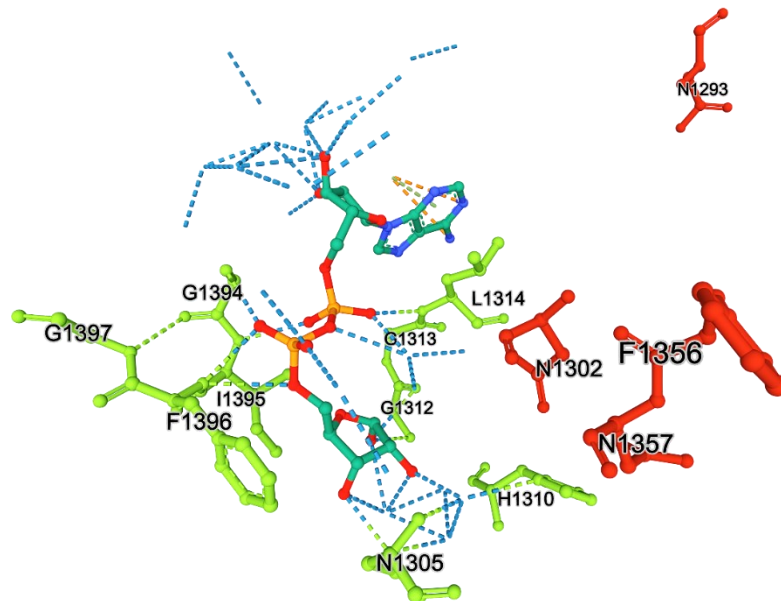


Abbildung 18: Kristallstruktur der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit gebundener ADP-Ribose. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Struktur der Makrodomäne mit den in dieser Dissertationsschrift untersuchten Aminosäuren und der gebundenen ADP-Ribose, letztere als Kugel-Stab-Darstellung (Sauerstoff: rot, Phosphat: orange, Kohlenstoff: dunkelgrün, Stickstoff: blau). Die Anteile der Sekundärstrukturen der Makrodomäne sind folgendermaßen farblich hervorgehoben: α -Helices: rot, β -Stränge: grün. Des Weiteren sind die Schleife 1 (pink) und die Schleife 2 (gelb) zu erkennen. Die Kristallstrukturen sind zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (Burley et al., 2019; Berman et al., 2000), Mitglied von worldwide PDB, wwpdb.org (Berman et al., 2003)): 3EWR (Xu et al., 2009b; Xu et al., 2009a). Die Abbildung wurde mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

(A)



(B)

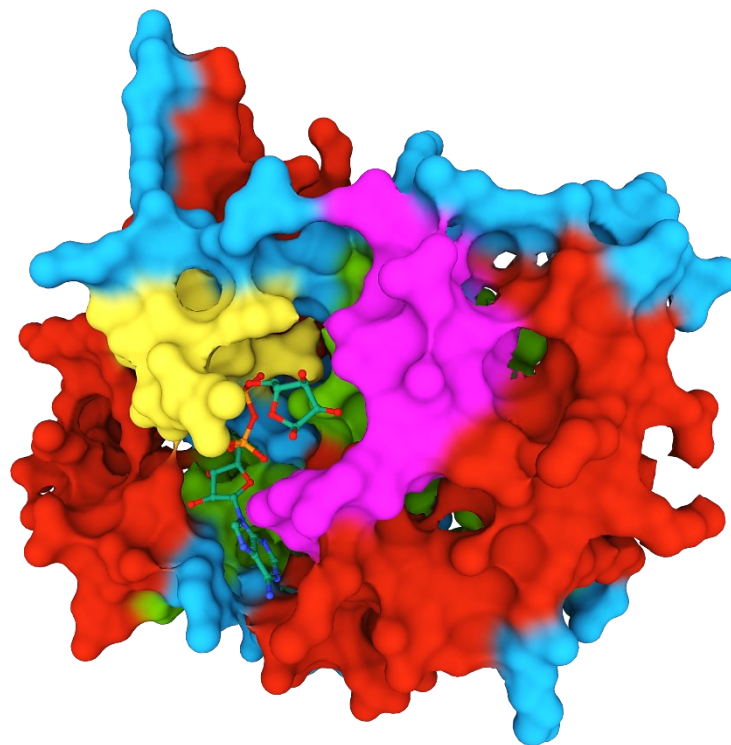


Abbildung 19: Nichtkovalente Bindungen zwischen der Makrodomäne und ADP-Ribose und molekulare Oberfläche der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit gebundener ADP-Ribose. (A) Abgebildet sind die untersuchten Aminosäuren und deren Wasserstoffbrückenbindungen zur ADP-Ribose in einer Kugel-Stab-Darstellung. Die Aminosäuren, die nichtkovalente Bindungen mit ADP-Ribose eingehen oder jene direkt stabilisieren, sind grün gefärbt. Aminosäuren, die keine direkten Interaktionen mit ADP-Ribose eingehen, sind rot dargestellt. Die Farbgebung der Atome der ADP-Ribose ist: Sauerstoff: rot, Phosphat: orange, Kohlenstoff: dunkelgrün, Stickstoff: blau. (B) Dargestellt ist die molekulare Oberfläche der Makrodomäne. Gut zu sehen ist die tiefe Bindungstasche, die durch Konformationsänderungen der Schleife 1 (pink) und Schleife 2 (gelb) gebildet wird. In der Bindungstasche ist ADP-Ribose in einem Kugel-Stab-Modell abgebildet (Sauerstoff: rot, Phosphat: orange, Kohlenstoff: dunkelgrün, Stickstoff: blau). Die übrige Farbgebung entspricht derjenigen von Abbildung 18. Die

Kristallstrukturen sind zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (Burley et al., 2019; Berman et al., 2000), Mitglied von worldwide PDB, wwplib.org (Berman et al., 2003)): 3EWR (Xu et al., 2009b; Xu et al., 2009a). Die Abbildungen wurden mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

Die folgende Abbildung 20 soll anhand der gezeigten Konservierung innerhalb der Corona- und anderer Viren sowie der Sekundärstrukturen des humanen Coronavirus 229E zu einem besseren Verständnis für die in dieser Dissertation zur Untersuchung gewählten Aminosäuren führen und die korrespondierenden Aminosäuren anderer ausgewählter (Corona-) Viren zur Verdeutlichung der konservierten Abschnitte darstellen.

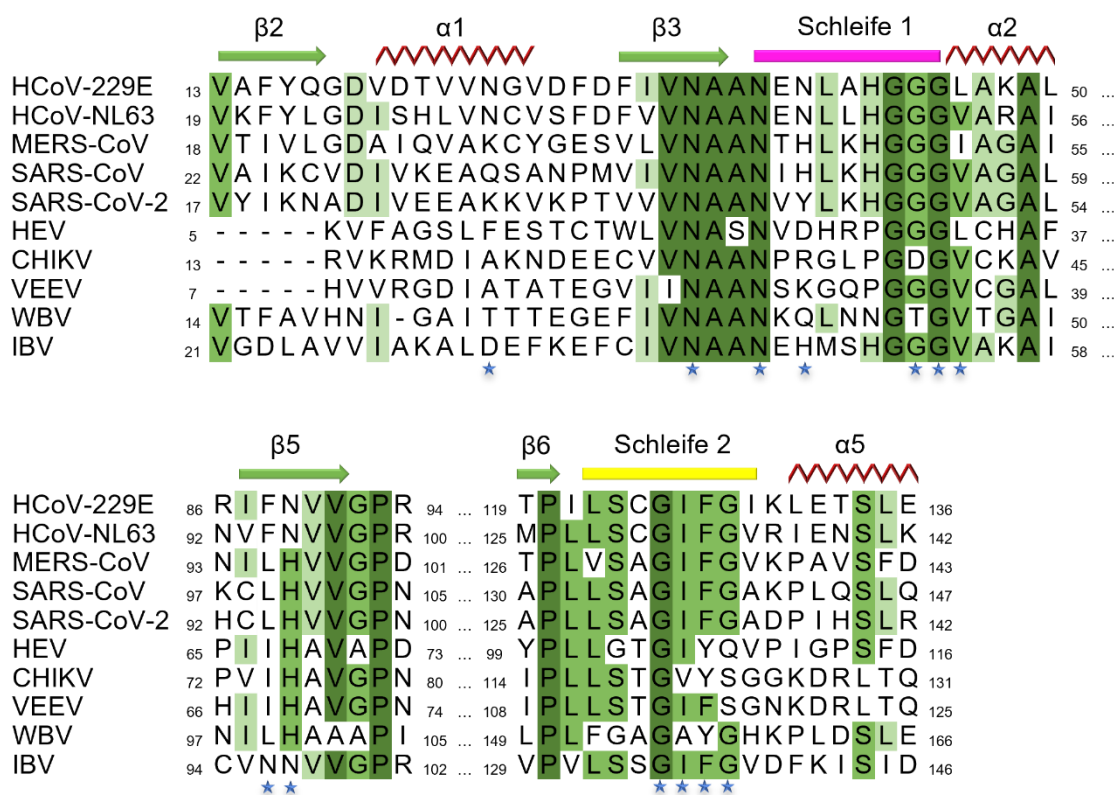


Abbildung 20: Sequenzvergleich ausgewählter viraler Makrodomänen. Die Proteinsequenzen wurden entweder der Proteindatenbank auf www.rcsb.org (Berman et al., 2000) oder der Website www.uniprot.org (The UniProt Consortium, 2023) entnommen. Gezeigt sind die folgenden: HCoV-229E (PDB: 3EWQ (Xu et al., 2009c; Xu et al., 2009b)), HEV (UniProt: P29324 · POLN_HEVBU (785-942)), CHIKV (PDB: 3GPG (Malet et al., 2009b; Malet et al., 2009a)), VEEV (PDB: 3GQE (Jamal et al., 2009; Malet et al., 2009a)), WBV (UniProt: Q008X6 · R1AB_WBV24 (1637-1827)), IBV (PDB: 3EWO (Xu et al., 2009d; Xu et al., 2009b)), HCoV-NL63 (PDB: 2VRI (Piotrowski et al., 2009)), MERS-CoV (PDB: 5DUS (Cho et al., 2016a; Cho et al., 2016b)), SARS-CoV (PDB: 2ACF (Saikatendu et al., 2006; Saikatendu et al., 2005)) und SARS-CoV2 (PDB: 7BF5 (Ni et al., 2021a; Ni et al., 2021b)). Das Sequenzalignment erfolgte mit Hilfe von Clustal Omega (Madeira et al., 2022). Oberhalb der Sequenzen sind die Sekundärstrukturen für die HCoV-229E-Makrodomäne angegeben. Die Farbgebung dieser entspricht jener von Abbildung 18. Zudem sind die für diese Dissertationsschrift untersuchten HCoV-229E-Aminosäuren mit Sternen markiert. Die grün

hinterlegten Spalten geben den Grad der Konservierung der Aminosäuren an (Dunkelgrün ≥ 90 %, grün ≥ 70 % und hellgrün ≥ 50 %). Die Nummerierung entspricht den in den oben genannten Datenbankeinträgen hinterlegten Aminosäuresequenzen für die jeweilige Makrodomäne.

Die untersuchten Aminosäuresubstitutionen innerhalb der ersten Schleife sind N1305A, H1310A, G1312A, G1313A. Die Substitution N1305A zeigt eine signifikante ($p < 0,01$) Reduktion der enzymatischen Aktivität um ca. 30 % im Vergleich zum Wildtyp. Die Aktivität der Makrodomäne mit der Substitution G1313A ist um ca. 45 % reduziert ($p < 0,05$). Die Substitution H1310A zeigt in den Experimenten zwar eine reduzierte Aktivität, die jedoch nicht signifikant ist ($p > 0,05$). Dagegen ist durch die Substitution G1312A keine Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomäne festzustellen. Direkt nach der ersten Schleife zu Beginn der α -Helix 2 befindet sich ein Leucin an der Position 1314 in der Proteinsequenz von HCoV-229E. Der an dieser Stelle eingeführte Austausch mit Alanin bewirkt eine ca. 25-prozentige Reduktion der enzymatischen Aktivität der Makrodomäne ($p < 0,05$).

Die getesteten Aminosäuresubstitutionen innerhalb der zweiten Schleife lauten G1394A, I1395A, F1396A und G1397A. Die Substitution G1394A führt zu einer ca. 25-prozentigen Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomäne im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,05$). Die Substitution I1395A führt zu keiner reduzierten Aktivität. Die Aminosäuresubstitutionen F1396A und G1397A weisen in den Experimenten eine geringe Reduktion der Aktivität der Makrodomäne auf, die nicht signifikant ist ($p > 0,05$). F1356 und N1357 sind nicht unmittelbar an der Bildung der Bindungstasche beteiligt und bisher sind keine Bindungen zwischen Substrat und diesen beiden Aminosäuren nachgewiesen worden. Jedoch zeigten erste Experimente, in denen Phenylalanin durch Alanin (F1356A) bzw. Asparagin durch Alanin (N1357A) ersetzt wurde, einen Verlust der ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität der jeweiligen Makrodomäne (Dammann, 2011). In den hier durchgeführten Experimenten konnten auch bezüglich der De-mono-ADP-Ribosylierungsfähigkeit der Makrodomäne Einschränkungen bis zum nahezu vollständigen Aktivitätsverlust beobachtet werden. Sowohl F1356A ($p < 0,001$), als auch N1357A ($p < 0,001$) zeigen einen sehr ausgeprägten Abfall der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Dagegen zeigen die Mutanten mit den Aminosäuresubstitutionen F1356L, F1356Y und N1357Q in den Experimenten allenfalls geringe Einschränkungen ihrer De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität, die im Vergleich zum Wildtyp als nicht signifikant bestimmt wurde. Für die Mutante N1357D konnte in den Experimenten keine Aktivität nachgewiesen werden ($p < 0,01$). N1357H zeigt eine Minderung der Aktivität um etwa 40 % ($p < 0,01$), N1357S eine Minderung um ca. 30 % im Vergleich zur Aktivität des Wildtyps ($p < 0,05$).

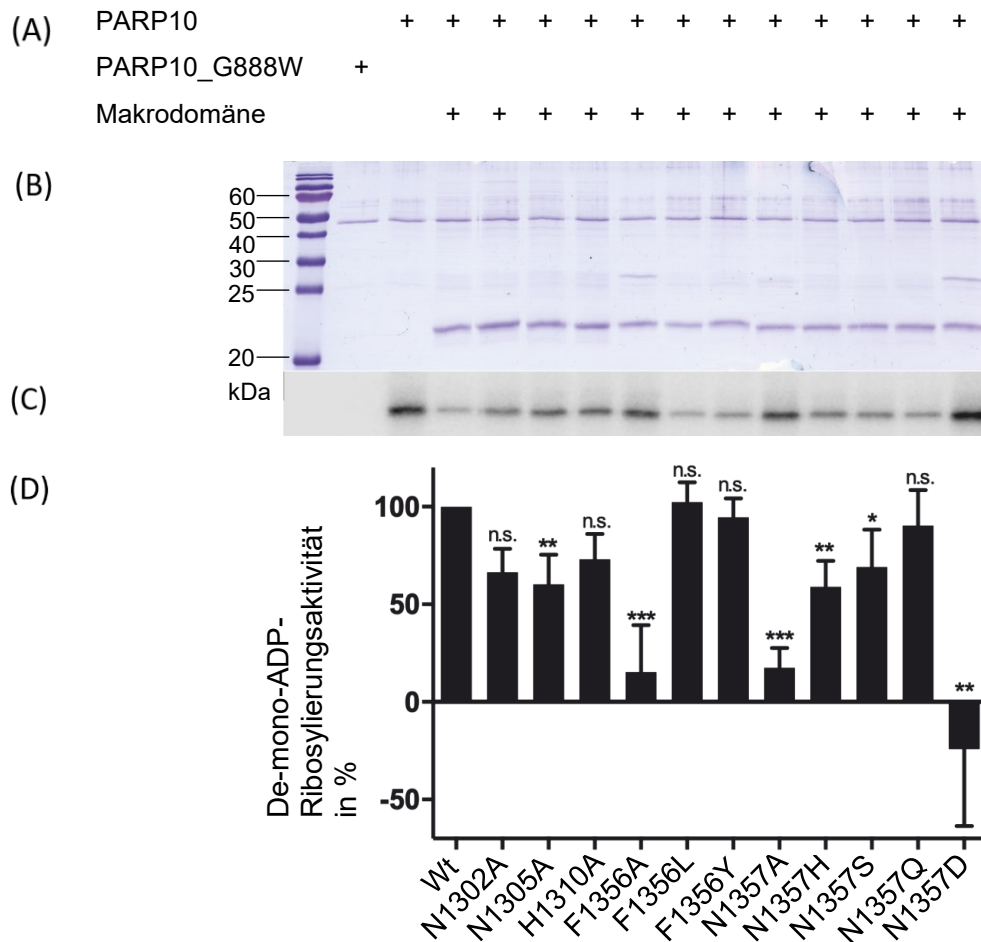


Abbildung 21: De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivitäten heterolog exprimierter HCoV-229E-Makrodomänen (Teil 1). (A) Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze in den verschiedenen Spuren des Gels (B) bzw. der Autoradiographie dieses Gels (C) hinsichtlich PARP10, PARP10_G888W und Makrodomäne (Details siehe (D)). (B) 15 % SDS-PAGE von Reaktionsansätzen mit Makrodomänen verschiedener Viren und/oder PARP10 bzw. PARP10_G888W. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*). (C) Autoradiographie zur Visualisierung ^{32}P -ADP-ribosylierter Proteine zur Bestimmung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der verwendeten Makrodomänen. Die quantitative Bestimmung der Signalstärken erfolgte mittels Quantity One. (D) Statistische Auswertung der Experimente und Visualisierung mit Hilfe von GraphPad Prism 6. Daten aus 3 unabhängigen Experimenten wurden verwendet und in einem gepaarten t-Test analysiert. Dabei wurde die relative Abnahme der Signalintensität der ^{32}P -markierten ADP-ribosylierten PARP10 nach Inkubation mit einer der angezeigten Makrodomänen bestimmt und mit der Reaktion der Makrodomäne des Wildtyps verglichen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

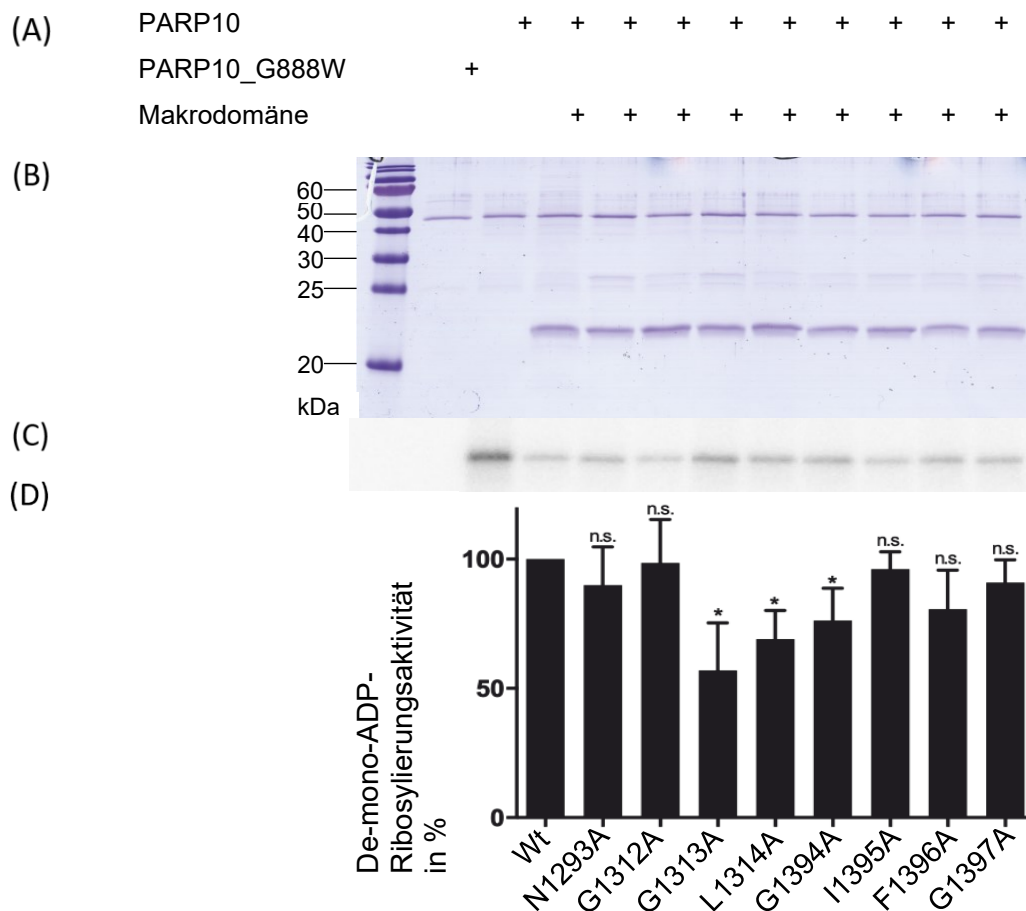


Abbildung 22: De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivitäten heterolog exprimierter HCoV-229E-Makrodomänen (Teil 2). (A) Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze in den verschiedenen Spuren des Gels (B) bzw. der Autoradiographie dieses Gels (C) hinsichtlich PARP10, PARP10_G888W und Makrodomäne (Details siehe (D)). (B) 15 % SDS-PAGE von Reaktionsansätzen mit Makrodomänen verschiedener Viren und/oder PARP10 bzw. PARP10_G888W. kDa: Molekularmasse in Kilodalton; M: Marker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Unstained Protein Ladder*). (C) Autoradiographie zur Visualisierung ^{32}P -ADP-ribosylierter Proteine zur Bestimmung der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der verwendeten Makrodomänen. Die quantitative Bestimmung der Signalstärken erfolgte mittels Quantity One. (D) Statistische Auswertung der Experimente und Visualisierung mit Hilfe von GraphPad Prism 6. Daten aus 3 unabhängigen Experimenten wurden verwendet und in einem gepaarten t-Test analysiert. Dabei wurde die relative Abnahme der Signalintensität der ^{32}P -markierten ADP-ribosylierten PARP10 nach Inkubation mit einer der angezeigten Makrodomänen bestimmt und mit der Reaktion der Makrodomäne des Wildtyps verglichen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3.5 Transkriptomanalyse

3.5.1 Differentielle Genexpression in mit HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen

In einer abschließenden Serie von Experimenten sollten mögliche Auswirkungen einer katalytisch inaktiven Makrodomäne im Kontext HCoV-229E-infizierter Zellen auf die zelluläre Genexpression untersucht werden. Hierzu wurden MRC-5-Zellen in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit oder ohne 100 U/ml IFN- β vorbehandelt. Nach 16 Stunden bei 37 °C wurde der Überstand mit Interferon- β abgenommen und die Infektion mit HCoV-229E (Wildtyp) oder einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten erfolgte mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle für 48 Stunden bei 33 °C. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gespült.

Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde quantifiziert und davon 1 μ g für nachfolgende Transkriptomanalysen (Microarray) an Dr. Jochen Wilhelm (Justus-Liebig-Universität Gießen) übergeben. Auf Grundlage der übermittelten Daten wurden zwei Tabellen erstellt, die die 50 am stärksten hochregulierten (Tabelle 4) bzw. die 49 am stärksten herunterregulierten Transkripte (Tabelle 5) in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen ohne Interferonvorbehandlung zeigen. Dabei wurden Zellen, die mit einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden, mit Zellen verglichen, die mit HCoV-229E (Wildtyp) infiziert wurden. Außerdem wurden die am stärksten deregulierten Gene von HCoV-229E-infizierten Zellen im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen („mock“) identifiziert. Nach Infektion mit dem Wildtyp kam es zu einer mindestens sechzehnfachen Erhöhung der Genexpression bei den in Tabelle 4 aufgeführten Genen, wohingegen im Gefolge einer HCoV-229E-Infektion die Expression der in Tabelle 5 aufgeführten Gene auf weniger als ein Sechzehntel, der in nichtinfizierten Zellen gemessenen Genexpression, abfiel. Es fällt auf, dass (im Vergleich zum Wildtypvirus mit intakter Makrodomäne) jede der getesteten MacD-Mutanten zu einigen stark ausgeprägten Veränderungen in der Expression dieser Gene in den infizierten Zellen führte.

Tabelle 4: Darstellung der 50 am stärksten hochregulierten Gene in HCoV-229E-Wildtyp-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zur Deregulation dieser Gene in MRC-5-Zellen, die mit einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.

Expressionsverhältnis in $\log_2$ fold change -4  4

Signifikanzniveau in $(-\log_{10})$ 1,3  max.

Genbezeichnung	N1302A - Wt	N1305A - Wt	H1310A - Wt	N1357S - Wt	DeltaX - Wt	Wt - mock	Wt - mock
HSPA6	-3,8	-2,4	-0,6	-2,8	-7,5	13,2	13,32
CXCL2	-0,6	0,4	0,4	-0,2	-1,0	11,0	15,18
DNAJA4	-4,9	-3,4	-2,2	-3,9	-7,8	9,7	12,84
KIAA1407	-1,3	-0,8	-0,1	-1,1	-3,2	7,9	6,46
IL6	-0,3	-0,1	1,0	0,0	-1,0	7,8	7,68
CXCL8	-1,5	-0,9	-0,2	-0,7	-0,2	7,7	7,42
CTNNA2	-1,4	-1,7	-0,9	-1,1	-3,4	7,5	4,05
LOC344887	-0,9	-0,2	-0,9	-0,5	-4,3	7,1	8,62
HID1	-1,0	-0,6	-1,0	-0,7	-4,2	7,0	8,78
IL1A	-1,0	-0,3	-0,2	-0,5	-0,3	6,9	8,86
FOS	-4,8	-3,5	-3,9	-4,0	-6,1	6,8	5,87
AMIGO3	-0,9	-0,7	0,3	-0,6	-3,3	6,7	9,60
ZFAND2A	-2,4	-1,6	-1,7	-2,0	-4,9	6,6	10,83
CXCL3	-0,1	0,9	-0,2	0,2	0,3	6,6	9,34
DUSP1	-0,8	-0,5	-0,2	-0,4	-3,7	6,5	12,68
RGS16	-0,9	-0,3	0,1	-0,5	-3,8	6,4	8,03
HSPA1B	-1,4	-0,5	-0,2	-0,8	-5,3	6,2	11,12
A_33_P3355252	-0,2	0,2	-0,2	-0,1	-1,3	6,2	8,35
SNORA47	-0,9	-1,2	-0,7	-1,0	-2,8	6,1	8,66
RRAD	-2,6	-2,6	-1,1	-2,6	-3,5	6,0	7,00
DDIT3	-0,4	-0,3	-0,9	-0,5	-2,6	5,9	7,76
ATF3	-1,7	-1,3	-1,6	-1,5	-4,1	5,8	9,29
LHB	-1,0	-1,1	-1,0	-1,1	-2,5	5,8	6,83
A_22_P00018931	-1,1	-1,0	-1,1	-0,9	-2,7	5,8	8,76
NFKBIZ	-2,0	-1,1	-1,3	-1,6	-2,9	5,8	6,15
EGR1	-2,8	-2,9	-1,5	-2,4	-4,1	5,7	9,11
HSPA1A	-0,8	-0,2	0,0	-0,3	-4,4	5,7	10,80
SESN2	-1,3	-1,2	-0,4	-1,2	-3,5	5,5	8,15
ABL2	-1,6	-1,0	-1,2	-1,6	-3,6	5,5	10,09
TNFAIP3	-1,2	-0,4	-0,6	-1,0	-0,2	5,4	9,26
CDH15	0,5	0,8	0,6	0,9	-1,3	5,4	7,65
MORF4L2-AS1	-0,8	-0,6	-0,2	-0,5	-2,1	5,3	4,19
ZC3H12A	-0,8	-0,6	-0,3	-0,7	-1,4	5,3	8,31
STAM	-0,5	-0,5	0,0	-0,5	-2,0	5,3	6,33
Hs.744953	-1,0	-0,3	-0,2	-0,5	-2,3	5,3	5,60
PTGS2	-0,9	-0,5	0,6	-0,3	-1,0	5,3	5,40
Hs.613082	-2,3	-1,4	-1,3	-1,7	-4,0	5,2	9,94
DNAJB9	0,2	0,6	-0,3	-0,1	-2,8	5,2	7,98
BAG3	-3,2	-2,1	-1,7	-2,9	-4,8	5,2	10,33
SDE2	-1,3	-1,2	-0,1	-1,0	-3,0	5,1	9,06
A_21_P0004206	-0,6	-0,2	-0,3	-0,6	-1,8	5,1	4,65
DUSP5	-1,3	-1,1	-0,2	-0,8	-2,2	5,1	6,73
DHDH	-2,3	-1,2	-0,8	-1,3	-5,3	5,1	7,46
A_22_P00009923	-1,1	-0,7	-0,6	-0,6	-2,5	5,1	6,37
NCF2	-1,3	-0,6	-0,2	-0,5	-3,3	5,1	6,31
SYNE1	-1,2	-0,6	-0,1	-1,1	-3,2	5,0	8,50
ENSG00000235513	-0,4	0,1	0,3	-0,1	-2,2	5,0	7,75
C3orf52	-1,3	-1,1	-0,1	-1,1	-2,8	5,0	7,35
DNAJB1	-2,8	-1,9	-1,6	-2,4	-4,9	5,0	9,27
EIF2AK3	-0,2	-0,3	0,2	-0,2	-2,1	5,0	7,66

Tabelle 5: Darstellung der 49 am stärksten herunterregulierten Gene in HCoV-229E-Wildtyp-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zur Deregulation dieser Gene in MRC-5-Zellen, die mit einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.

Expressionsverhältnis in $\log_2$ fold change -4  4

Signifikanzniveau in $(-\log_{10})$ 1,3  max.

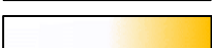
Genbezeichnung	N1302A - Wt	N1305A - Wt	H1310A - Wt	N1357S - Wt	DeltaX - Wt	Wt - mock	Wt - mock
APOC1	1,5	0,7	0,4	0,3	2,8	-4,0	8,62
HMG3	1,4	1,2	1,3	1,2	3,4	-4,0	8,42
ANP32A	1,8	1,1	2,1	1,5	3,5	-4,0	4,09
KRTAP1-5	2,5	1,4	2,5	2,1	4,5	-4,0	3,36
TOPORS-AS1	1,4	0,8	0,8	0,9	3,3	-4,0	7,46
TMEM171	1,4	2,3	1,0	0,6	3,2	-4,1	5,74
S100A3	1,4	0,6	0,5	0,9	3,8	-4,1	9,01
LXN	1,4	1,1	0,8	1,1	2,7	-4,1	7,35
KRTAP2-3	2,3	-0,1	0,8	1,5	3,7	-4,1	5,52
MT1L	1,6	0,5	0,3	0,8	3,8	-4,1	8,81
Hs.584854	1,7	1,3	0,6	1,0	2,7	-4,2	7,31
TMSB15A	1,4	1,0	0,5	1,1	3,2	-4,2	8,30
YBEY	1,2	0,8	0,4	1,5	3,1	-4,2	7,09
SDPR	1,8	0,7	0,6	1,5	3,2	-4,2	7,98
CDKN3	1,8	0,9	0,9	1,5	3,7	-4,2	9,11
IMPA2	1,8	1,3	1,2	1,8	3,1	-4,2	8,26
GMFG	1,3	0,8	1,1	1,2	3,7	-4,2	7,74
ATP2A1-AS1	1,5	0,5	1,5	0,9	3,6	-4,3	8,05
BEND5	1,0	0,2	-0,6	1,1	1,8	-4,3	6,77
A_33_P3231156	1,6	0,6	1,0	0,9	4,2	-4,3	6,23
SMIM1	0,9	1,7	0,8	1,1	3,4	-4,3	7,70
ENSG00000261863	0,7	1,1	0,7	0,6	0,4	-4,3	2,68
MFI2-AS1	1,3	0,6	0,6	0,8	3,3	-4,3	7,75
A_21_P0002185	0,7	1,0	-0,1	1,1	1,4	-4,3	5,64
SECTM1	1,2	0,7	1,0	1,3	3,3	-4,3	6,36
ADIRF	1,4	0,1	-0,3	0,7	3,2	-4,4	6,62
PRRT2	0,7	-0,8	0,3	0,5	3,4	-4,4	7,55
NUDT7	2,1	1,8	0,7	1,9	3,1	-4,4	7,96
A_21_P0001894	0,7	0,3	0,1	0,1	0,4	-4,5	2,16
TBX2-AS1	1,5	0,8	0,5	1,2	3,9	-4,5	9,34
CCDC28B	1,3	0,6	1,4	0,5	3,8	-4,5	6,16
MT1HL1	2,0	0,9	-0,1	1,0	3,9	-4,5	8,31
A_22_P00002012	2,0	1,6	1,2	1,5	5,1	-4,5	5,80
PET100	1,5	0,1	1,6	1,2	3,5	-4,5	6,36
LINC01082	0,0	-0,3	-1,4	0,4	2,8	-4,6	4,92
HOXB6	1,7	0,8	0,1	1,2	3,6	-4,7	7,16
LOC101926967	0,6	0,6	0,2	1,4	3,1	-4,7	7,17
SPC25	1,8	0,9	0,6	1,5	3,8	-4,8	6,59
Hs.744892	0,7	-0,2	-1,3	-0,7	2,4	-4,8	5,55
ZNF436-AS1	1,8	1,2	1,5	1,4	3,7	-4,8	7,66
A_21_P0012872	2,0	1,6	1,3	2,0	3,7	-4,8	9,00
NDUFA3	1,4	0,6	0,2	0,9	3,7	-4,8	8,80
LOC101928000	1,6	0,8	1,5	2,1	4,1	-4,9	9,80
SERTAD4-AS1	2,1	1,3	1,3	1,7	4,0	-5,1	8,17
SPA17	2,4	1,9	2,0	2,0	4,7	-5,1	9,37
S100A4	1,9	1,2	1,4	1,4	4,6	-5,3	10,00
NKD2	1,7	0,7	0,0	1,2	3,4	-5,3	7,71
PRR34-AS1	2,3	0,4	1,1	2,2	5,0	-5,5	9,33
LAMA4	2,3	1,2	1,8	1,8	4,2	-5,6	7,42

3.5.2 Deregulierte humane PARPs in MRC-5-Zellen nach HCoV-229E-Infektion

Nach der Analyse der am stärksten deregulierten Gene in MRC-5-Zellen, die mit HCoV-229E oder einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden, wurde auch die Genexpression zellulärer PARP-Enzyme in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen in Abhängigkeit einer Interferonvorbehandlung analysiert. Die Daten zeigen, dass eine Interferonvorbehandlung zu einer erhöhten Expression von PARP10 führt. Für HCoV-229E-infizierte Zellen (verglichen mit nichtinfizierten Zellen) ergaben sich hingegen keine Hinweise auf eine signifikante Änderung des PARP10-Expressionsniveaus, während in Interferon- β -vorbehandelten Zellen die HCoV-229E-Infektion zu einer reduzierten Steigerung der PARP10-Expression führte, was als Hinweis auf eine zumindest partielle infektionsassoziierte Suppression der Interferon- β -induzierten PARP10-Hochregulation gelten kann. Für PARP8 zeigte sich eine signifikant verringerte Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen sowie eine Interferon- β -induzierte Erhöhung der PARP8-Expression. Weiterhin zeigen die Daten, dass eine HCoV-229E-Infektion zu einer signifikanten Erhöhung der PARP7-Expression in MRC-5-Zellen führt. Wenn diese Zellen mit Interferon- β vorbehandelt wurden, erfolgt die infektionsinduzierte Erhöhung der PARP7-Expression in deutlich geringerem Umfang.

In der folgenden Tabelle 6 sind die erhaltenen Daten zum differentiellen Expressionsniveau zellulärer PARPs in HCoV-229E-infizierten Zellen zusammengefasst.

Tabelle 6: Expressionslevels humaner PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich mit nichtinfizierten Zellen und in Abhängigkeit einer Interferonvorbehandlung.

Expressionsverhältnis in $\log_2$ fold change -4  4
Signifikanzniveau in $(-\log_{10})$ 1,3  max.

Enzym	Wt – mock	IFN Wt – IFN mock	IFN mock – mock	IFN Wt – Wt	Wt – mock	IFN mock – mock	IFN Wt – Wt
PARP1	-1,25	-0,57	-0,78	-0,09	1,25	0,65	0,05
PARP2	-0,23	-0,56	-0,27	-0,60	0,30	0,37	1,08
PARP3	-1,61	0,07	-0,28	1,40	1,97	0,20	1,63
PARP4	-1,12	-0,72	0,25	0,66	1,41	0,20	0,68
PARP5a	0,24	0,21	-0,11	-0,15	0,20	0,08	0,11
PARP5b	0,35	0,35	-0,62	-0,63	0,21	0,42	0,43
PARP6	1,08	-0,16	0,39	-0,85	2,66	0,68	1,94
PARP7	2,77	1,96	-0,57	-1,38	4,52	0,57	1,88
PARP8	-1,90	-0,24	-0,33	1,34	4,93	0,49	3,27
PARP9	-0,54	2,22	0,11	2,87	0,29	0,05	2,62
PARP10	-0,77	1,88	2,07	4,73	0,38	1,43	4,15
PARP11	1,63	1,35	0,73	0,45	1,80	0,61	0,33
PARP12	0,26	2,43	-0,10	2,07	0,14	0,05	1,94
PARP13 (ZAPL)	-0,52	-0,13	-0,18	0,21	0,50	0,14	0,16
PARP13 (ZAPS)	-0,25	1,48	-0,87	0,86	0,16	0,77	0,76
PARP14	-0,31	1,50	-0,58	1,24	0,15	0,30	0,81
PARP15	-0,59	-0,39	0,21	0,41	0,68	0,18	0,42
PARP16	-1,52	0,24	-1,34	0,41	1,12	0,95	0,21

3.5.3 IFN- β -abhängig differentiell regulierte PARPs in nichtinfizierten MRC-5-Zellen

Nach der Analyse der exprimierten Gene sowie der hoch- bzw. runterregulierten PARPs wurden die PARPs nach hoch- bzw. runterreguliert gruppiert und nach Ausprägung der Expressionsveränderung von größter Hoch- bzw. Runterregulierung absteigend sortiert. Hiernach wurden mit Hilfe von Metascape (Zhou et al., 2019) *Pathway*-Analysen durchgeführt, um Hinweise zu erhalten, zu welchen zellulären Prozessen diese Regulierungen beitragen könnten. Als Ergebnis dieser Analysen erhält man eine *Heatmap*, die die Signifikanz zeigt, mit welcher die jeweiligen Cluster in den unterschiedlichen *Pathways* repräsentiert sind.

Zuerst wurden nichtinfizierte, mit Interferon- β vorbehandelte MRC-5-Zellen untersucht, indem die Veränderung der Expression der PARP-Enzyme mit MRC-5-Zellen verglichen wurde, die zuvor nicht mit Interferon- β vorbehandelt wurden. Die höchste Steigerung erfolgte in der Expression von PARP10. Des Weiteren erfolgte eine messbare Zunahme von PARP11, PARP6, PARP4, PARP15 und PARP9. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei diesen PARPs um Interferon-stimulierte Gene (ISG) handelt, die durch Interferon- β aktiviert werden.

Tabelle 7: Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in humanen MRC-5-Zellen nach Interferonvorbehandlung. In der linken Spalte sind die Produkte von PARP-Genen aufgeführt, die in MRC-5-Zellen nach Interferon- β -Vorbehandlung verstärkt exprimiert werden. In der rechten Spalte sind Proteine von PARP-Genen aufgeführt, die in MRC-5-Zellen nach Interferon- β -Vorbehandlung in reduziertem Umfang exprimiert werden.

IFN mock – mock $\uparrow$	IFN mock – mock $\downarrow$
PARP10	PARP16
PARP11	PARP13
PARP6	PARP1
PARP4	PARP5b
PARP15	PARP14
PARP9	PARP7
	PARP8
	PARP3
	PARP2
	PARP5a
	PARP12

Eine nachfolgende *Pathway*-Analyse ergab, dass sowohl die Hochregulation als auch die Herunterregulation einzelner PARP-Gene wichtige zelluläre Prozesse der Auto-ADP-Ribosylierung von Proteinen und der Reifung von Nukleoproteinen beeinflusst. Durch die Interferonvorbehandlung wurde die Expression von PARPs reduziert, die Einfluss auf die Protein-(poly)ADP-Ribosylierung und die DNA-ADP-Ribosylierung haben.

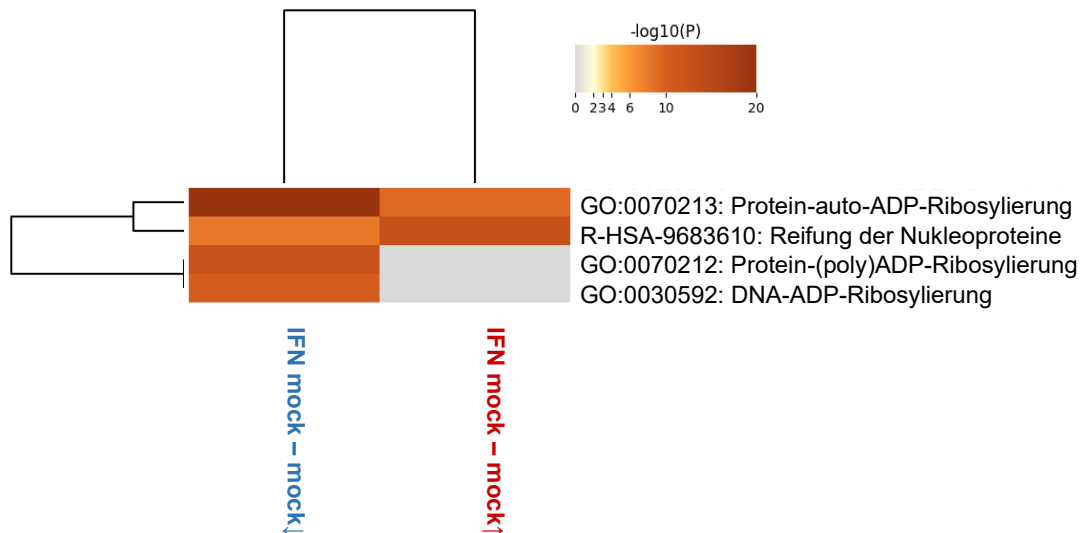


Abbildung 23: *Pathway*-Analyse der Veränderung der PARP-Expression in nichtinfizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine *Heatmap*. In dieser Analyse wurde die IFN- β -abhängige PARP-Expression nichtinfizierter MRC-5-Zellen betrachtet. Die *Pathway*-Analysen wurden mit Hilfe von Metascape (Zhou et al., 2019) durchgeführt. Die *Pathways* befinden sich in den Datenbanken „Gene Ontology“ (Ashburner et al., 2000; Aleksander et al., 2023) und „Reactome“ (Gillespie et al., 2022). Die *Heatmap* zeigt die vier häufigsten Cluster der analysierten PARPs mit den entsprechenden Zuordnungen anhand der funktionellen Eigenschaften. Dabei wurden die hochregulierten PARPs (IFN mock - mock↑) rechts und die herunterregulierten PARPs (IFN mock - mock↓) links aufgetragen und gemäß ihrer p-Werte farblich dargestellt.

3.5.4 IFN- β -abhängig deregulierte PARPs in HCoV-229E-infizierten Zellen

In der Betrachtung der Interferon- β -abhängigen Regulation während der Virusinfektion sind vor allem PARP10, PARP 9, PARP12, PARP 3 und PARP8 hochreguliert, wohingegen PARP7 und PARP6 am stärksten herunterreguliert wurden.

In der durchgeführten *Pathway*-Analyse zeigte sich, dass die verringerte Expression der PARPs die Protein-auto-ADP-Ribosylierung und die Protein-(poly)ADP-Ribosylierung beeinflusst.

Die erhöhte Expression der in Tabelle 9 aufgeführten PARPs wirkt sich auf die Reifung der Nukleoproteine, die Protein-auto-ADP-Ribosylierung, die DNA-Reparatur und die angeborene Immunantwort aus.

Tabelle 8: Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen in Abhängigkeit einer Interferon- β -Vorbehandlung. In der linken Spalte befinden sich die im Vergleich der mit Interferon- β vorbehandelten MRC-5-Zellen zu den Zellen ohne Vorbehandlung hochregulierten PARP-Enzyme nach Infektion mit dem Wildtyp des HCoV-229E. In der rechten Spalte befinden sich die im Vergleich der mit Interferon- β vorbehandelten MRC-5-Zellen zu den Zellen ohne Vorbehandlung runterregulierten PARP-Enzyme nach Infektion mit dem Wildtyp des HCoV-229E.

IFN Wt – Wt $\uparrow$	IFN Wt – Wt $\downarrow$
PARP10	PARP7
PARP9	PARP6
PARP12	PARP5b
PARP3	PARP2
PARP8	PARP5a
PARP14	PARP1
PARP13	
PARP4	
PARP11	
PARP15	
PARP16	

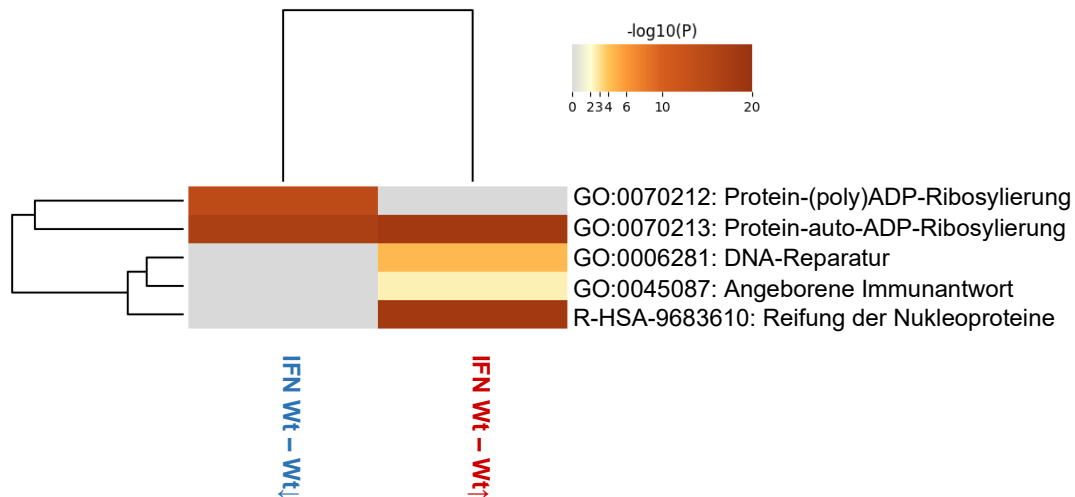


Abbildung 24: Pathway-Analyse der Veränderung der PARP-Expression in mit IFN- β vorbehandelten und mit dem Wildtyp des HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine *Heatmap*. In dieser Analyse wurde die IFN- β -abhängige PARP-Expression in MRC-5-Zellen, die mit dem Wildtyp des HCoV-229E infiziert wurden, betrachtet. Die *Pathway*-Analysen wurden mit Hilfe von Metascape (Zhou et al., 2019) durchgeführt. Die *Pathways* befinden sich in den Datenbanken „Gene Ontology“ (Ashburner et al., 2000; Aleksander et al., 2023) und „Reactome“ (Gillespie et al., 2022). Die *Heatmap* zeigt die fünf häufigsten Cluster der analysierten PARPs mit den entsprechenden Zuordnungen anhand der funktionellen Eigenschaften. Dabei wurden die hochregulierten PARPs (IFN Wt - Wt↑) rechts und die herunterregulierten PARPs (IFN Wt - Wt↓) links aufgetragen und gemäß ihrer p-Werte farblich dargestellt.

3.5.5 PARP-Regulation in MRC-5-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E

Nach Infektion der MRC-5-Zellen ohne Interferonvorbehandlung mit HCoV-229E waren insbesondere PARP 7, PARP11, und PARP6 hochreguliert, wohingegen insbesondere PARP 8 und PARP3 in der Expression im Vergleich zu nichtinfizierten MRC-5-Zellen gehemmt wurden. Die erhöhte Expression wirkte sich vor allem auf die Protein-auto-ADP-Ribosylierung (vgl. Abb. 25) aus. Protein-auto-ADP-Ribosylierung, negative Regulation der Immunantwort, Protein-(poly)ADP-Ribosylierung und die Reifung der Nukleoproteine wurden durch die verringerte Expression, der in der rechten Spalte der Tabelle 10 aufgeführten, PARPs beeinflusst.

Tabelle 9: Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen. In der linken Spalte sind die Produkte von PARP-Genen aufgeführt, die in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen (im Vergleich mit nichtinfizierten Zellen) verstärkt exprimiert werden. In der rechten Spalte sind Proteine von PARP-Genen aufgeführt, die in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen in reduziertem Umfang exprimiert werden.

Wt – mock ↑	Wt – mock ↓
PARP7	PARP8
PARP11	PARP3
PARP6	PARP16
PARP5b	PARP1
PARP12	PARP4
PARP5a	PARP10
	PARP15
	PARP9
	PARP14
	PARP13
	PARP2

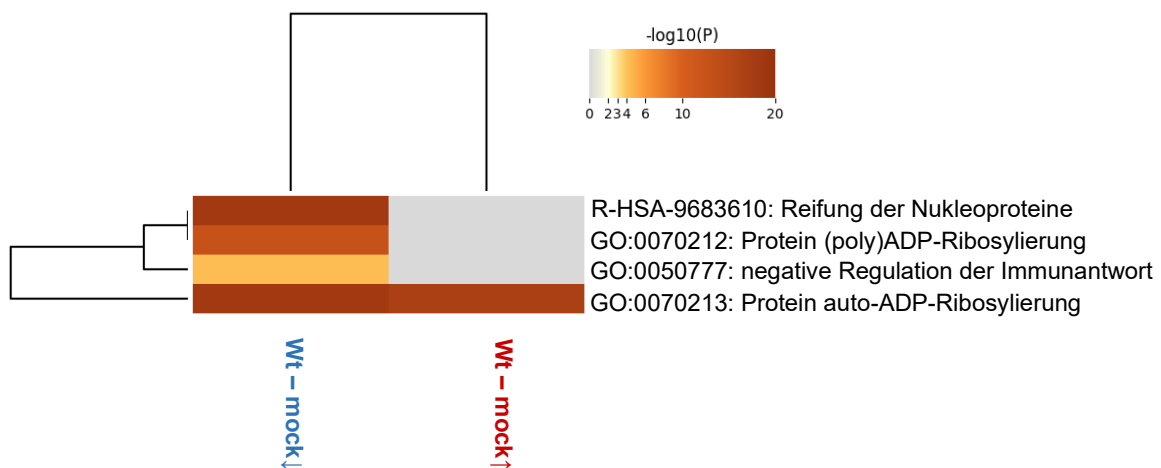


Abbildung 25: Pathway-Analyse der Veränderung der PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine Heatmap. In dieser Analyse wurde die PARP-Expression von HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen betrachtet. Die Pathway-Analysen wurden mit Hilfe von Metascape (Zhou et al., 2019) durchgeführt. Die Pathways befinden sich in den Datenbanken „Gene Ontology“ (Ashburner et al., 2000; Aleksander et al., 2023) und „Reactome“ (Gillespie et al., 2022). Die Heatmap zeigt die vier häufigsten Cluster der analysierten PARPs mit den entsprechenden Zuordnungen anhand der funktionellen Eigenschaften. Dabei wurden die hochregulierten PARPs (Wt – mock ↑) rechts und die herunterregulierten PARPs (Wt – mock ↓) links aufgetragen und gemäß ihrer p-Werte farblich dargestellt.

3.5.6 PARP-Regulation in mit Interferon- β vorbehandelten MRC-5-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E

In HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen mit Interferonvorbehandlung war v.a. die Expression von PARP12, PARP9, PARP7 und PARP10 hochreguliert. PARP4, PARP1, PARP2 und andere wurden im Vergleich zu nichtinfizierten, mit Interferon- β vorbehandelten MRC-5-Zellen weniger exprimiert. Sowohl die erhöhte als auch die verringerte Expression der in Tabelle 10 aufgeführten PARPs beeinflusst die Protein-(poly)ADP-Ribosylierung, die Reifung der Nukleoproteine und die Protein-auto-ADP-Ribosylierung. Teile der Gruppe der PARPs mit verringerter Expression beeinflussen die Basen-Exzisionsreparatur, wohingegen Teile der Gruppe der PARPs mit erhöhter Expression Einfluss auf die angeborene Immunantwort haben.

Tabelle 10: Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in Interferon- β -vorbehandelten und HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zu nichtinfizierten Interferon- β -vorbehandelten Zellen. In der linken Spalte befinden sich die im Vergleich der mit Interferon- β vorbehandelten und mit HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen zu den mit Interferon- β vorbehandelten, nichtinfizierten Zellen hochregulierten PARP-Enzyme. In der rechten Spalte befinden sich die im Vergleich der mit Interferon- β vorbehandelten und mit HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen zu den mit Interferon- β vorbehandelten, nichtinfizierten Zellen herunterregulierten PARP-Enzyme.

IFN Wt – IFN mock $\uparrow$	IFN Wt – IFN mock $\downarrow$
PARP12	PARP4
PARP9	PARP1
PARP7	PARP2
PARP10	PARP15
PARP14	PARP8
PARP13	PARP6
PARP11	
PARP5b	
PARP16	
PARP5a	
PARP3	

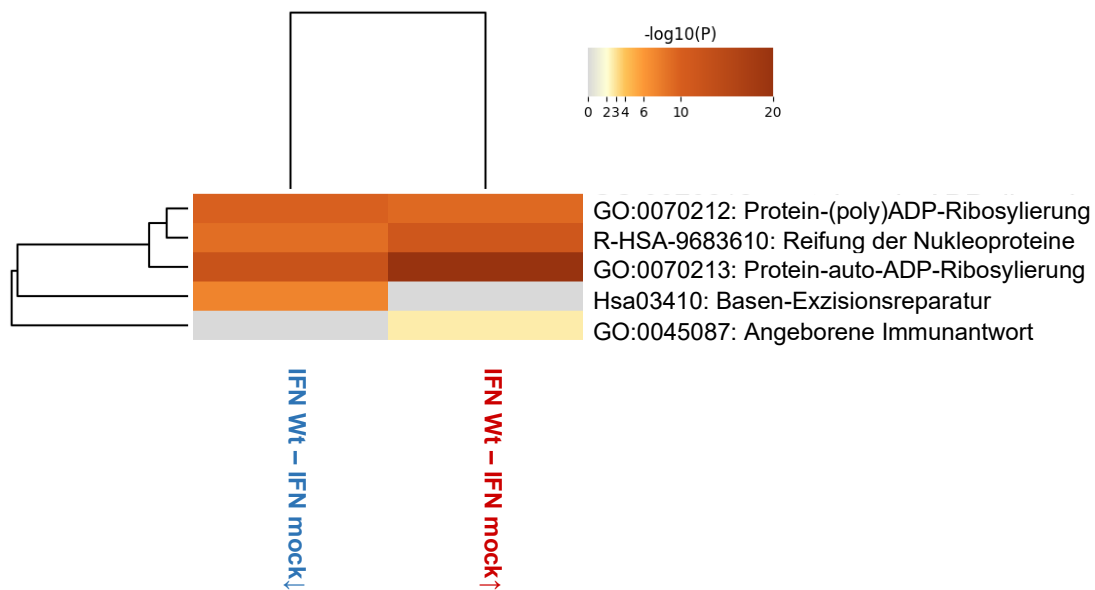


Abbildung 26: Pathway-Analyse der Veränderung der PARP-Expression in MRC-5-Zellen mit Interferonvorbehandlung nach Infektion durch HCoV-229E, dargestellt durch eine *Heatmap*. In dieser Analyse wurde die infektionsabhängige PARP-Expression von Interferon- β -vorbehandelten MRC-5-Zellen betrachtet. Die *Pathway*-Analysen wurden mit Hilfe von Metascape (Zhou et al., 2019) durchgeführt. Die *Pathways* befinden sich in den Datenbanken „Gene Ontology“ (Ashburner et al., 2000; Aleksander et al., 2023) „KEGG“ (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa et al., 2023) und „Reactome“ (Gillespie et al., 2022). Die *Heatmap* zeigt die fünf häufigsten Cluster der analysierten PARPs mit den entsprechenden Zuordnungen anhand der funktionellen Eigenschaften. Dabei wurden die hochregulierten PARPs (IFN Wt - IFN mock↑) rechts und die herunterregulierten PARPs (IFN Wt - IFN mock↓) links aufgetragen und gemäß ihrer p-Werte farblich dargestellt.

4 Diskussion

Die Covid-19-Pandemie zeigt, dass Viren, die bisher keine oder lediglich eine untergeordnete Rolle für die Menschheit spielten, plötzlich zu einer globalen Bedrohung der Gesundheit aller Menschen und zu Einschränkungen bis zum Zusammenbruch der internationalen Wirtschaft führen können. Die Pandemie zeigt auch, dass unsere wirtschaftlich globalisierte Welt auf solche Bedrohungen unzureichend vorbereitet ist. Daher ist es wichtig, auch für den Menschen potenziell bedrohliche Krankheitserreger zu erforschen. Coronaviren waren bis zum Auftreten des *Severe-acute-respiratory-syndrome*-Coronavirus (SARS-CoV, siehe 1.1.) vor allem als Erreger für gewöhnliche Infektionen des oberen Respirationstraktes bekannt. Seit 2002 wuchs das wissenschaftliche Interesse an Coronaviren stetig und hat zur Entdeckung und umfassenden Charakterisierung zahlreicher coronaviraler Enzymfunktionen geführt, die teilweise auch für die Entwicklung wirksamer antiviraler Therapeutika genutzt werden konnten (Brady et al., 2022; Tian et al., 2022; Johnson et al., 2023). Zu den bei allen Coronaviren konservierten Enzymfunktionen gehört auch die im nsp3 vorhandene Makrodomäne, deren Funktionen für die Virusreplikation und -pathogenese bisher jedoch nur unvollständig verstanden sind. Durch die kontinuierlichen Fortschritte in der Charakterisierung der viralen Makrodomänen ergeben sich zunehmend auch Optionen, diese viralen Enzyme als pharmakologische Angriffspunkte zu verwenden, wofür die in dieser Dissertationsschrift zusammengefassten Arbeiten einen Beitrag leisten könnten, da sie nicht nur geeignete Protokolle zur heterologen Expression und Reinigung unterschiedlicher viraler Makrodomänen in löslicher und enzymatisch aktiver Form bereitstellen, sondern auch Möglichkeiten der Nutzung unterschiedlicher Aktivitätstests zum Nachweis von De-ADP-Riboylsierungsaktivitäten dieser Enzyme und weitere Einblicke in funktionell bedeutsame Aminosäurereste im aktiven Zentrum dieser Enzyme zur Verfügung stellen. Im Folgenden sollen einige ausgewählte Aspekte der weiter oben dargestellten Ergebnisse der Arbeit herausgehoben und diskutiert werden.

4.1 Biotin-NAD⁺ versus ³²P-NAD⁺ als detektierbares Substrat für die De-mono-ADP-Ribosylierungsexperimente

Für diese Dissertationsschrift wurden zwei unterschiedliche Methodiken für die Überprüfung der De-mono-ADP-Ribosylierungsfähigkeit der Makrodomänen angewendet. Die erste beruht auf der Detektion von an PARP10 gebundener Biotin-markierter ADP-Ribose (siehe 2.2.2.13.1), während beim zweiten Versuchsaufbau an PARP10 gebundene ³²P-markierte ADP-Ribose (siehe 2.2.2.13.2) verwendet wurde, um die Aktivität der viralen Makrodomänen zu untersuchen. Beide Verfahren eignen sich zur Prüfung, ob eine De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität vorhanden ist. Das Verfahren

mit an PARP10 gebundener Biotin-markierter ADP-Ribose als Substrat erwies sich jedoch nicht als konsistent genug, sodass die erhobenen Aktivitätswerte wiederholt durchgeführter Experimente stark voneinander abwichen. Im Gegensatz dazu eignet sich das unter 2.2.2.13.2 geschilderte Vorgehen sehr gut, um präzise und damit vergleichbare Aktivitätsunterschiede erheben zu können und wurde somit für die hier präsentierten Daten genutzt.

4.2 Expression und Aktivität viraler Makrodomänen im Vergleich

Die Makrodomänen wurden mit Hexahistidin-*tag* in *E. coli* exprimiert und über eine TALON®-Superflow™-Matrix aufgereinigt. Die Expression führte für Wildtyp sowie Mutanten des HCoV-229E, für HEV_BC, HEV_NA und CHIKV zu ausreichenden Proteinmengen. Dagegen fiel die Menge gereinigten Proteins für WBV_C1 und WBV_C2 deutlich geringer aus. In den Aktivitätsexperimenten (siehe Abbildung 17) zeigten die Makrodomänen des HCoV-229E, des HEV_BC, des HEV_NA und des CHIKV eine ähnliche De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Die hier getesteten Makrodomänen des Weißbrassenvirus WBV_C1 und WBV_C2 zeigten keine nachweisbare De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Am ehesten liegt dies an den hier verwendeten Aminosäuresequenzen, da die exakte C-terminale Begrenzung der Makrodomäne des WBV bis heute nicht bekannt ist. Demnach ist weitere Forschung nötig, um die Makrodomäne von WBV zu charakterisieren.

4.3 Expression und Aktivität coronaviraler Makrodomänen

Die in dieser Dissertationsschrift untersuchten coronaviralen Makrodomänen wurden mit Hexahistidin-*tag* exprimiert, über eine TALON®-Superflow™-Matrix aufgereinigt und anschließend in Aktivitätsexperimenten auf ihre Funktion bezüglich der Fähigkeit zur De-mono-ADP-Ribosylierung untersucht. Die Aktivitätsexperimente zeigen, dass einzelne Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Proteinsequenz der Makrodomäne zu eingeschränkter Funktionalität bis zum vollständigen Funktionsverlust führen können. Demgegenüber zeigten einige der getesteten Makrodomänenmutanten keinen signifikanten Funktionsverlust. Die möglichen Gründe hierfür werden im Folgenden erörtert.

Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Proteinsequenz der Makrodomäne haben unterschiedliche Auswirkungen, die zur Einschränkung der enzymatischen Aktivität oder zum Funktionsverlust führen können. So kann beispielsweise die Bindungsaffinität für ADP-Ribose herabgesetzt werden, die Zugänglichkeit der Substratbindungstasche oder das Zusammenspiel katalytisch wichtiger Aminosäurereste beeinträchtigt werden.

Der am häufigsten in Studien untersuchte Aminosäurenaustausch innerhalb der coronaviralen Makrodomäne ist die Substitution eines hochkonservierten Asparagins zu Alanin (N1305A in HCoV-229E) (Fehr et al., 2018). In SARS-CoV führt sie zu einem vollständigen Verlust der ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität (Egloff et al., 2006), während sie in HCoV-229E eine Aktivitätsreduktion bedingt (Putics et al., 2005). Interessanterweise zeigten Malet et al. einen Verlust der ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität für die korrespondierende CHIKV-MacD-Aminosäuresubstitution N24A (Malet et al., 2009a), wohingegen Ecke et al. lediglich eine Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität durch diese Substitution in der Proteinsequenz der Makrodomäne des CHIKV feststellten (Ecke et al., 2017). Die Asparagin-zu-Alanin-Substitution könnte durch eine Reduktion der Affinität für ADP-Ribose zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen führen. Insbesondere Coronaviren haben eine geringere Affinität zu ADP-Ribose im Vergleich zur humanen Makrodomäne D2 (20 µM gegenüber 15 µM). So könnte bereits der Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der coronaviralen Makrodomäne und der ADP-Ribose die Affinität so stark herabsetzen, dass keine enzymatische Aktivität messbar ist (Fehr et al., 2018).

4.3.1 Mutationen in der Region der Schleife 1

Die auf ihren möglichen Beitrag zur De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität hin getesteten Aminosäuren N1305, H1310, G1312 und G1313 befinden sich auf der Schleife 1, bilden mit Unterstützung des umgebenen Wassers Wasserstoffbrückenbindungen zur distalen Ribose aus (vergleiche Abbildung 27) und gehören zum aktiven Zentrum (Xu et al., 2009b). Übereinstimmend mit vorangegangenen Studien konnte eine Aktivitätsreduktion durch die Substitution N1305A beobachtet werden. Das stark konservierte Asparagin N1305 bildet eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zur 3"-Hydroxygruppe der distalen Ribose aus und steht zudem zusammen mit H1310 über Wasserstoffbrückenbindungen, verlängert durch freies Wasser, mit der 2"-Hydroxygruppe der distalen Ribose in Verbindung. Neben der hier gezeigten Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität durch die Substitutionen N1305A und H1310A führen selbige außerdem zu einer verminderten ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität (Putics et al., 2005) und zu einer verminderten Virulenz des SARS-CoV *in vivo*, was durch die Substitution der korrespondierenden Aminosäuren in SARS-CoV (N1040A und H1045A) gezeigt wurde (Fehr et al., 2016). Egloff et al. zeigten, dass die zu N1305 korrespondierende Aminosäure in SARS-CoV eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zur 2"-Hydroxygruppe der distalen Ribose ausbildet (Egloff et al., 2006) und diese somit stärker stabilisiert. Dies könnte erklären, weshalb der Austausch der Aminosäure Asparagin mit Alanin in SARS-CoV zu einem

vollständigen Verlust der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomäne führt (Fehr et al., 2016), wohingegen die Substitution N1305A in der Makrodomäne von HCoV-229E lediglich zu einer Reduktion dieser Aktivität führt.

Die Aminosäuren G1312 und G1313 liegen am distalen Ende der Schleife 1. G1312 bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur 1''-Hydroxygruppe der distalen Ribose aus und stabilisiert diese. Zwischen G1313 und der ADP-Ribose werden keine Bindungen eingegangen, jedoch geht G1313 auf der dem Substrat abgewandten Seite eine Wasserstoffbrückenbindung mit freiem Wasser ein. Dies könnte zur Stabilisierung der Bindungstasche beitragen. Zusammen mit G46 vollzieht die zu G1312 in SARS-CoV-2 korrespondierende Aminosäure G47 eine Konformationsänderung und bewirkt dadurch, dass die Schleife 1 näher an die ADP-Ribose rückt (Ni et al., 2021b). Die Substitutionen G1312A und G1313A führen zu einer Abnahme der ADP-Ribose-1''-Phosphatase-Aktivität (Putics et al., 2005). Dass in den hier gezeigten Experimenten keine Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität durch die Substitution G1312A gezeigt werden konnte, könnte in einer zu geringen Differenz der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Glycin und Alanin (*Dissimilarity* (engl. Unähnlichkeit) Index $D = 9\%$ (Sneath, 1966)) begründet sein. Um mögliche Auswirkungen auf die Bindungsverhältnisse im Detail zu erforschen, müsste eine Kristallstruktur mit der hier getesteten Substitution bestimmt werden. Zudem könnte eine andere Aminosäuresubstitution getestet werden, zum Beispiel G1312V (*Dissimilarity* Index D von Glycin und Valin $= 19\%$), die ebenfalls zu einer Reduktion der ADP-Ribose-1''-Phosphatase-Aktivität führt (Putics et al., 2005). Demgegenüber zeigte die Mutante G1313A eine deutliche Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Dies zeigte sich auch in Experimenten von Mc Pherson et al., welche die korrespondierende Substitution G32A der Makrodomäne des Chikungunya-Virus untersuchten. In derselben Studie zeigten die Autoren zudem, dass die Substitution G32S eine moderate Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität bewirkt, wohingegen die Substitutionen G32D, G32Q und G32E zu einem nahezu vollständigen Verlust dieser führen. Zudem fanden sie heraus, dass die Substitutionen G32A und G32S zu einer reduzierten Virulenz führen und die Mortalität im Mausmodell übereinstimmend mit der Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität 58 % für G32A bzw. 4 % für G32S gegenüber einer 100%igen Mortalität der mit dem Wildtyp infizierten Mäuse beträgt (McPherson et al., 2017). Li et al. konnten zeigen, dass die Substitution der Aminosäuren des Glycintripeptids (G48S-G49S-G50A) innerhalb der Schleife 1 der Makrodomäne des Hepatitis-E-Virus zu einer sehr starken Minderung der Aktivität führt, wohingegen die einzelne Substitution G50A lediglich eine moderate Abnahme bewirkt (Li et al., 2016). Dies und die starke Konservierung dieses Glycin-Tripeptides lässt darauf schließen,

dass diese Aminosäuren im Verbund eine sehr wichtige Rolle in der Bindung der ADP-Ribose spielen und G1313 in Zusammenschau der für diese Dissertationsschrift erhobenen Daten und der vorgenannten Studien überdies relevant für die katalytische Aktivität des Enzyms ist.

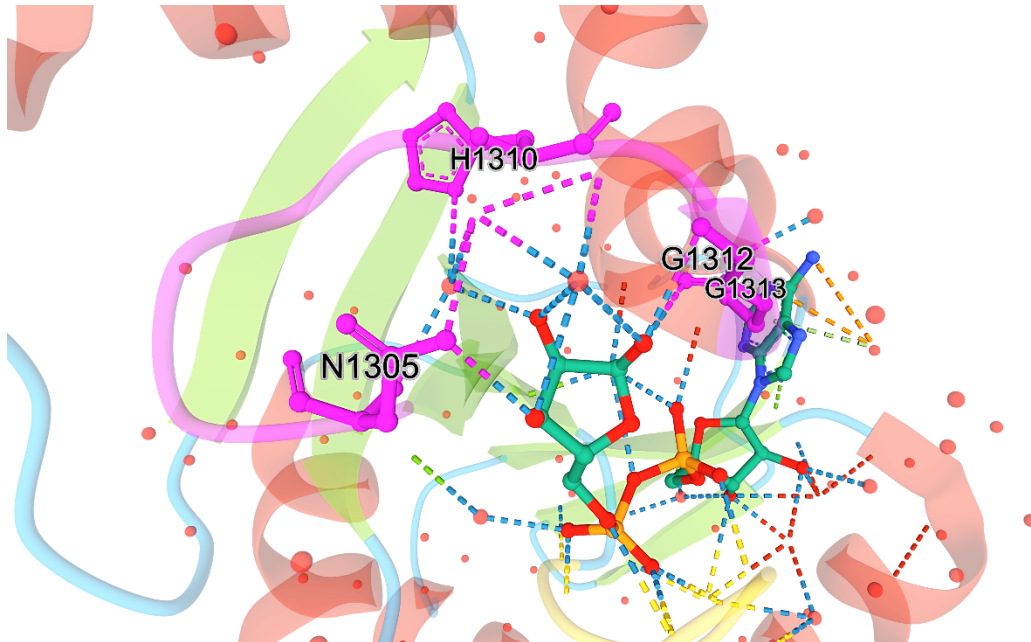


Abbildung 27: Nichtkovalente Bindungen zwischen der Schleife 1 und ADP-Ribose. Die distale Ribose wird durch die Schleife 1 umschlossen und durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu dieser in der Bindungstasche orientiert. Die ADP-Ribose (Sauerstoff: rot, Phosphat: orange, Kohlenstoff: dunkelgrün, Stickstoff: blau) und die hier näher besprochenen Aminosäuren der Schleife 1 sind als Kugel-Stab-Modelle abgebildet. Die roten Kugeln stellen freies Wasser dar, die Schleife 1 ist pink, die Schleife 2 ist gelb, α -Helices sind rot, β -Faltblattstrukturen sind grün dargestellt. Die Kristallstruktur ist zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (Berman et al., 2000; Burley et al., 2019), Mitglied von *worldwide PDB*, [wwpdb.org](https://www.pdb.org) (Berman et al., 2003)): 3EWR (Xu et al., 2009b; Xu et al., 2009a). Die Abbildung wurde mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

4.3.2 Mutationen in der Region der Schleife 2

Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Schleife 2 sind G1394A, I1395A, F1396A und G1397A. Die Schleife 2 koordiniert das Pyrophosphat in der Bindungstasche. Eine kürzlich von Ni et al. veröffentlichte Studie konnte nähere Informationen zu Konformationsänderungen der Makrodomäne Mac1 von SARS-CoV-2 durch Substratbindung liefern: Wenn ADP-Ribose gebunden wird, schwingt F132, die korrespondierende Aminosäure zu F1396 des HCoV-229E, um ca. 56° aus der Bindungstasche und schafft somit Platz für die ADP-Ribose. Die Seitenkette von I131 (korrespondierend zu I1395 des HCoV-229E) rotiert, sodass die distale Ribose flankiert wird. Die Carbonyl-Gruppe der Hauptkette von A129 (korrespondierend zu C1393 des HCoV-229E) kippt und ermöglicht so die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem

Amin von G130 (korrespondierend zu G1394 des HCoV-229E) und dem Phosphat der ADP-Ribose (Ni et al., 2021b).

Die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Kristallstrukturen des humanen Coronavirus 229E (PDB: 3EWR und 3EWQ) ergibt ein ähnliches Bild. G1394 und I1395 stehen jeweils über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphat der ADP-Ribose in Kontakt. F1396 bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu diesem aus. G1397 wirkt durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisierend auf G1394. Korrespondierend zu A129 des SARS-CoV-2 befindet sich C1393 in der Aminosäuresequenz der Makrodomäne des HCoV-229E. Dieses könnte eine wichtige Rolle in der Koordination der proximalen Ribose einnehmen. Es wirkt über eine Wasserstoffbrückenbindung zur 3'-Hydroxygruppe direkt auf die proximale Ribose und bildet je eine Wasserstoffbrückenbindung zu E1425, I1390 und freiem Wasser und könnte dadurch mitwirken, die proximale Ribose in der Bindungstasche zu orientieren und zu fixieren. Somit sind die Aminosäuren der zweiten Schleife vor allem für die Orientierung des Pyrophosphates zuständig und zudem an der Ausrichtung der proximalen Ribose in der Bindungstasche beteiligt.

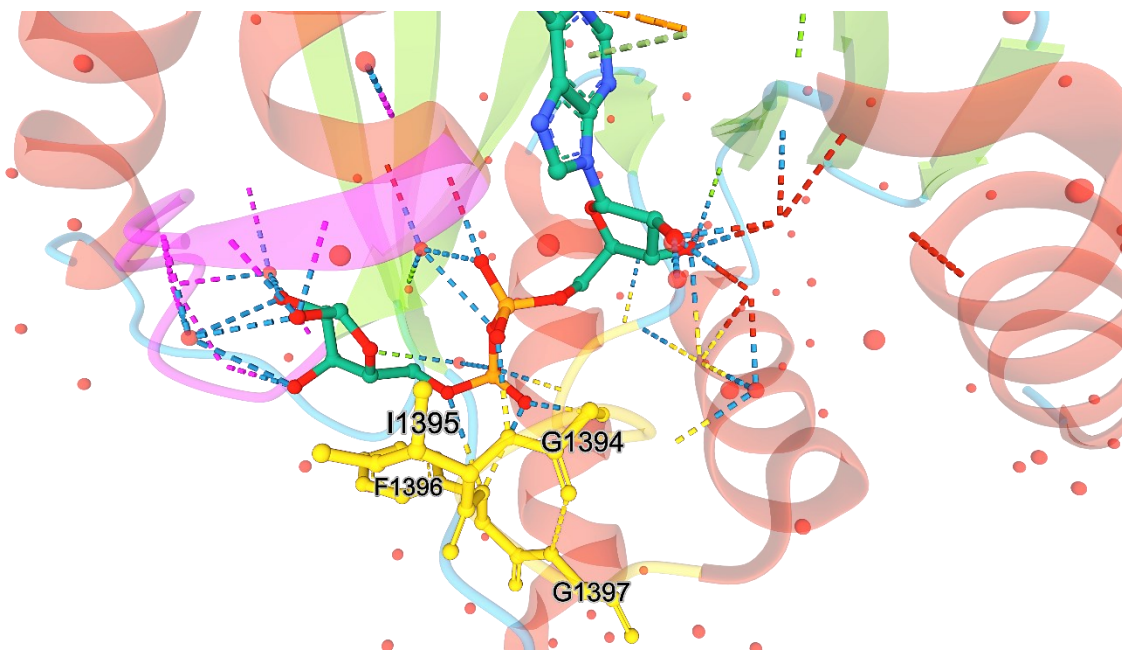


Abbildung 28: Nichtkovalente Bindungen zwischen der Schleife 2 und ADP-Ribose. Die Schleife 2 ist an der Ausrichtung der proximalen Ribose in der Bindungstasche beteiligt und wirkt über Wasserstoffbrückenbindungen auf das Pyrophosphat der ADP-Ribose. Die ADP-Ribose (Sauerstoff rot, Phosphat orange, Kohlenstoff dunkelgrün, Stickstoff blau) und die hier näher besprochenen Aminosäuren der Schleife 2 sind als Kugel-Stab-Modelle abgebildet. Die roten Kugeln stellen freies Wasser dar, die Schleife 1 ist pink, die Schleife 2 gelb, α -Helices sind rot, β -Faltblattstrukturen sind grün dargestellt. Die Kristallstruktur ist zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (Berman et al., 2000; Burley et al., 2019), Mitglied von worldwide PDB, wwpdb.org (Berman et al., 2003)): 3EWR (Xu et al., 2009b; Xu et al., 2009a). Die Abbildung wurde mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

Die Substitution G1394A zeigt eine Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Dies könnte darin begründet sein, dass sich womöglich die wirkenden Kräfte auf das Phosphat verändern und die stabilisierende Verbindung zu G1397 gestört wird. Interessanterweise zeigen die Substitutionen I1395A, F1396A und G1397A keine signifikante Enzymaktivitätsreduktion im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte an ähnlichen Bindungsverhältnissen liegen, welche das substituierende Alanin womöglich eingeht, da das Phosphat trotz dieser jeweiligen Aminosäuresubstitutionen scheinbar ausreichend in der Bindungstasche stabilisiert und ausgerichtet werden kann. Im Vergleich zu den hier präsentierten Ergebnissen konnten Li et al. für die Aminosäuresubstitution I124A in der Makrodomäne des HEV (korrespondierend zu I1395A des HCoV-229E) eine moderate Aktivitätsreduktion und für G123A (korrespondierend zu G1394 des HCoV-229E) eine starke Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität zeigen (Li et al., 2016). Daraus kann geschlossen werden, dass I1395 vor allem für die Bindung der ADP-Ribose wichtig ist, wohingegen G1394 die katalytische Funktion beeinflusst.

4.3.3 Mutationen außerhalb von Schleife 1 und Schleife 2

Es wurden die folgenden Aminosäuren der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E, die nicht auf einer der Schleifen liegen, untersucht: N1293, N1302, L1314, F1356 und N1357. Für die Substitution N1293A wurde bereits ein fehlender Einfluss auf die ADP-Ribose-1"-Phosphatase-Aktivität festgestellt (Putics et al., 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuresubstitution die De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität ebenfalls nicht signifikant reduziert. Die Aminosäure Asparagin 1302 (N1302) befindet sich in der Nähe der Bindungstasche auf dem β -Faltblatt 3. Sie geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit F1356 ein, welches auf dem benachbarten β -Faltblatt 5 positioniert ist. Die Aminosäuresubstitutionen N1302A, F1356L, F1356Y und N1357Q zeigten keine signifikante Reduktion der enzymatischen Aktivität. Die Makrodomänenmutanten F1356A und N1357A haben eine stark eingeschränkte De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität, jene von N1357H und N1357S ist moderat eingeschränkt. Dies könnte in einer Konformationsänderung der β -Faltblatt-Strukturen begründet sein, welche sich negativ auf die Formierung der Bindungstasche auswirkt. Ebenfalls bewirkte die Substitution L1314A eine Reduktion der De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Die Aminosäure L1314 befindet sich am Boden der Bindungstasche in unmittelbarer Nähe des Substrates (Entfernung 3,91 Å) und wirkt auf das Pyrophosphat der ADP-Ribose über eine Wasserstoffbrückenbindung. Die Aktivitätsreduktion durch die Substitution L1314A könnte durch eine Konformationsänderung sowie durch veränderte Bindungsverhältnisse erklärt werden.

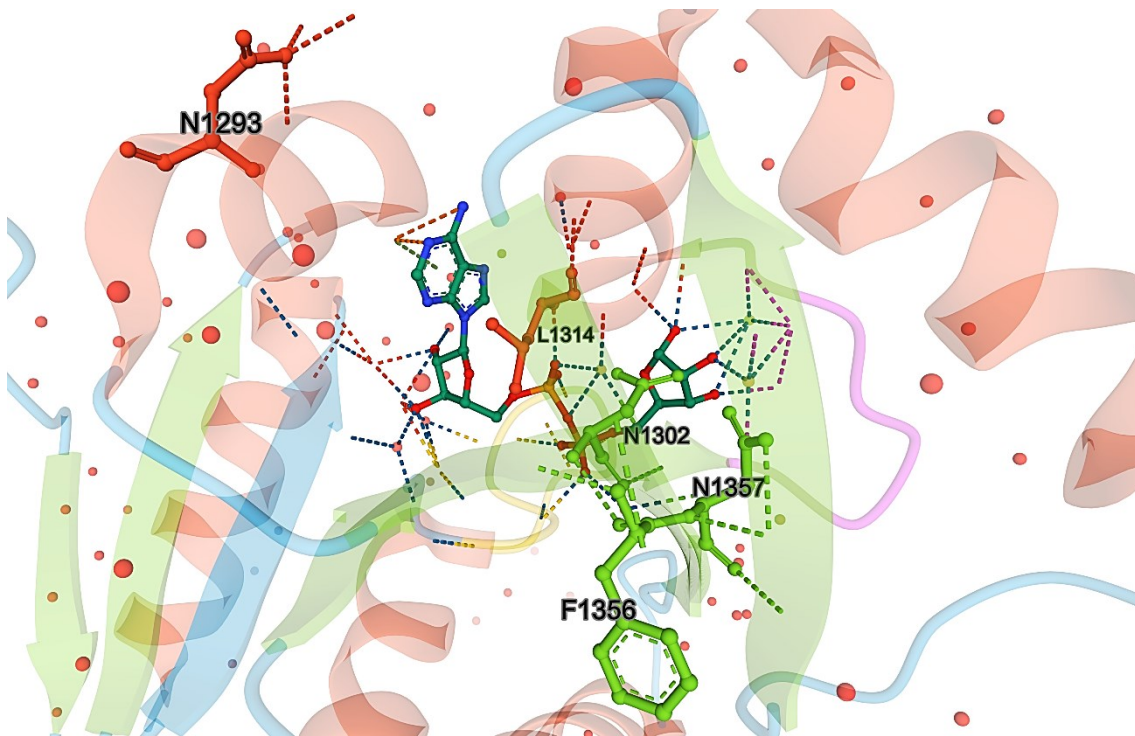


Abbildung 29: Untersuchte Aminosäuren außerhalb der Schleifen 1 und 2. N1293 liegt auf der α -Helix 1. N1302 befindet sich auf dem β -Faltblatt 3 und steht mit F1356 über eine Wasserstoffbrückenbindung in Verbindung. F1356 und N1357 sind benachbarte Aminosäuren. Die beiden Aminosäuren befinden sich auf dem β -Faltblatt 5. L1314 befindet sich am Boden der Bindungstasche und wirkt über eine Wasserstoffbrückenbindung auf das Pyrophosphat der ADP-Ribose. Die ADP-Ribose (Sauerstoff rot, Phosphat orange, Kohlenstoff dunkelgrün, Stickstoff blau) und die hier näher besprochenen Aminosäuren sind als Kugel-Stab-Modelle abgebildet. Die roten Kugeln stellen freies Wasser dar, die Schleife 1 ist pink, die Schleife 2 gelb, α -Helices sind rot, β -Faltblattstrukturen sind grün dargestellt. Die Kristallstruktur ist zu finden unter rcsb.org (RCSB PDB (Berman et al., 2000; Burley et al., 2019), Mitglied von *worldwide PDB*, wwpdb.org (Berman et al., 2003)): 3EWR (Xu et al., 2009b; Xu et al., 2009a). Die Abbildung wurde mit Mol* (Sehnal et al., 2021) erstellt.

4.4 PARP-Expression als zelluläre Antwort auf die Infektion mit HCoV-229E

Um Einblicke in die zelluläre Antwort auf die Infektion mit HCoV-229E zu erlangen, wurden MRC-5-Zellen mit dem HCoV-229E-Wildtyp sowie mit HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert, wobei sie zum Teil mit Interferon- β vorbehandelt wurden. Im Rahmen der Microarray-Transkriptomanalysen wurden die hoch- bzw. runterregulierten PARP-Enzyme identifiziert und tabellarisch nach Ausmaß der veränderten Expression sortiert. Typ-I-Interferone, zu denen auch das in dieser Dissertationsschrift benutzte Interferon- β zählt, aktivieren einen antiviralen Zustand in nichtinfizierten Zellen und führen zur Ausschüttung von ISGs in virusinfizierten Zellen (Atasheva et al., 2014).

PARP9, PARP12, PARP13 und PARP14 gehören zu den in vielen Säugetieren vorkommenden ISGs und werden aus diesem Grund auch als Kern-ISGs bezeichnet (Shaw et al., 2017).

Die bioinformatische Analyse des für diese Dissertationsschrift durchgeführten Microarrays ergab eine signifikante Überexpression von PARP10 und zudem eine Steigerung der Expression von PARP11, PARP6, PARP4, PARP15 und PARP9 nach Zugabe von Interferon- β zu den MRC-5-Zellen, ohne dass eine Infektion mit Coronaviren stattgefunden hat. PARP10 besitzt eine bedeutende antivirale Funktion. So konnte gezeigt werden, dass es mit NS1 von aviären Influenza-A-Viren interagiert und so die Virusvermehrung inhibiert (Yu et al., 2011). Interessanterweise konnte keine gesteigerte Expression von PARP10 in infizierten Zellen ohne Interferonvorbehandlung gesehen werden, was einerseits an einer Inhibition durch das HCoV-229E liegen könnte oder an einer Abhängigkeit von dem durch Fibroblasten sezernierten IFN- β . Mahmoud et al. konnten bereits 2011 eine Induktion von PARP10 durch Interferon- α nachweisen (Mahmoud et al., 2011).

In nicht mit Interferon- β vorbehandelten, jedoch mit HCoV-229E infizierten Zellen sind im Vergleich dazu bis auf PARP11 andere PARPs hochreguliert. Zu diesen zählen PARP7, PARP11, PARP6, PARP12 sowie PARP5a und PARP5b. Dabei ist unklar, ob die Expressionssteigerung provirale oder antivirale Konsequenzen hat.

PARP7 erfuhr die größte Steigerung der Expression. In der Replikation von MHV besitzt es provirale Eigenschaften (Grunewald et al., 2020). Dies könnte auch beim HCoV-229E der Fall sein und müsste durch weiterführende Experimente mit Zellen, die einen Gen-Knockout für PARP7 aufweisen, geprüft werden.

Eine Expressionssteigerung von PARP11 und PARP12 findet man auch in den mit IFN- β vorbehandelten und mit HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen. Li et al. konnten zeigen, dass PARP11 als ISG zusammen mit PARP12 zum Abbau von NSP1 und NSP3 des Zika-Virus im Proteasom führt (Li et al., 2021).

Die Expression des Zinkfingerproteins PARP13 stieg in den hier durchgeführten Experimenten nur interferonstimuliert während der Infektion an. PARP13 ist an der Abwehr verschiedener viraler Infektionen beteiligt. Das Enzym inhibiert die Replikation der Alphaviren Sindbis-Virus, Semliki-Forest-Virus, Ross River-Virus und VEEV (Bick et al., 2003), die Replikation der Filoviren Marburg-Virus und Ebolavirus (Müller et al., 2007), die Replikation des Retrovirus Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) (Zhu et al., 2011), und die Replikation des Hepatitis-B-Virus (Mao et al., 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass PARP13 allein und in Kombination mit Interferon effektiv die Replikation von SARS-CoV2 einschränkt (Nchioua et al., 2020).

Die hier diskutierten Daten zeigen quantitative Unterschiede in der PARP-Expression in Abhängigkeit von Interferonvorbehandlung und Virusinfektion. Die genauen Hintergründe des Expressionsverhaltens bleiben hierbei verborgen und müssen in nachfolgenden Studien beforscht werden. PARPs spielen eine Schlüsselrolle in der viralen Infektion von Zellen. Wenn es gelingt, Wege zu finden, regulatorisch in diese Prozesse einzugreifen, können so gegebenenfalls provirale Effekte blockiert oder antivirale Effekte verstärkt werden und somit schwere oder letale Verläufe durch gezielt wirkende Medikamente abgewendet werden.

4.5 Ausblick

In den Experimenten, die für diese Dissertation durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass Aminosäuresubstitutionen in den stark konservierten Abschnitten der Aminosäuresequenz der coronaviralen Makrodomäne die enzymatische Aktivität zum Teil erheblich einschränken können. Hierdurch und durch die Analyse der Kristallstrukturen wurde sowohl die Bindungstasche als auch benachbarte Bereiche dieser Strukturen näher biochemisch charakterisiert. Die hochkonservierten Strukturen der coronaviralen Makrodomäne bieten einen möglichen Angriffspunkt für die pharmazeutische Forschung und Entwicklung. Dabei helfen Erkenntnisse über Bindungsverhältnisse und das aktive Zentrum des Enzyms. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Entwicklung von Inhibitoren, die spezifisch irreversibel in der Bindungstasche der coronaviralen Makrodomäne binden und somit eine De-mono-ADP-Ribosylierung als Antwort auf posttranslationale Modifikationen im Rahmen der Immunantwort verhindern. Dies könnte zu verringerter Virulenz und einer besseren Prognose für die Erkrankung des Patienten führen.

Auch wenn bereits antivirale Funktionen der PARPs erforscht wurden, bedarf es eines sehr viel tieferen Verständnisses der Wirkungsweisen auf molekularer Ebene, vor allem auch *in vivo*, sodass in diesem Bereich weitere extensive Forschung gebraucht wird, um die antiviralen Eigenschaften pharmakologisch nutzen zu können.

Die Covid-19-Pandemie hat gezeigt, dass Coronaviren ernstzunehmende Krankheitserreger sind, die sich unter bestimmten Umständen rasant weltweit ausbreiten können. Durch Forschung im Bereich viraler Makrodomänen eröffnen sich in Zukunft möglicherweise Therapieansätze für zielgerichtete und spezifische Medikamente, die insbesondere vulnerable Gruppen vor einem schweren Verlauf einer Infektion schützen könnten.

5 Zusammenfassung

Coronaviren waren bis zur Covid-19-Pandemie als relativ harmlose Viren bekannt, die zumeist mild verlaufende Erkrankungen des oberen Respirationstraktes verursachen. Sie sind behüllte Viren, die über eine Einzelstrang-RNA positiver Polarität verfügen. Neben den Strukturproteinen sind die Nichtstrukturproteine Gegenstand aktueller Forschung. Die konservierte coronavirale Makrodomäne (MacD) ist Teil des Nichtstrukturproteins 3 (nsp3). Sie besitzt ADP-Ribose-1"-Monophosphatase-Aktivität, kann an ADP-Ribose binden und hat De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität. Diese Aktivitäten interferieren sehr wahrscheinlich mit den durch die Wirtszelle initiierten antiviral wirkenden posttranslationale Modifikationen zellulärer und/oder viraler Proteine und steigern so die virale Virulenz oder Replikationseffizienz.

Für diese Dissertationsschrift wurden die Makrodomänen des Hepatis-E-Virus, des Chikungunya-Virus, des Weißbrassenvirus und des humanen Coronavirus 229E sowie davon abgeleitete durch ortsspezifische Mutagenese generierte Varianten in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Makrodomäne zur Beeinträchtigung der Aktivität oder zum Funktionsverlust führen. Mögliche Ursachen dieser reduzierten Aktivität werden auf der Grundlage vorhandener Strukturmodelle diskutiert.

Virale Infektionen führen zu einer umfassenden zellulären Antwort, einschließlich der angeborenen Immunantwort. Dazu gehören auch postrtranslationale Modifikationen von Proteinen durch zelluläre poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) und die Ausschüttung von Interferonen. Im Rahmen einer Transkriptomanalyse wurde die differentielle Genexpression von Interferon-kompetenten MRC-5-Zellen nach Infektion mit dem humanen Coronaviren 229E (Wildtyp und Makrodomänen-Mutanten) untersucht. Die hier gezeigten Daten erweitern das Verständnis für die Struktur und Funktionsweise der coronaviralen Makrodomäne und geben Einblicke in die zelluläre Antwort auf Infektionen von Viren, die aktive oder inaktive Makrodomänen kodieren.

5.1 Summary

Coronaviruses were known to be relatively harmless viruses until the Covid-19 pandemic, causing mostly mild upper respiratory tract illnesses.

They are enveloped viruses that have single-stranded RNA of positive polarity. In addition to the structural proteins, the nonstructural proteins are the subject of current research. The conserved coronaviral macrodomain (MacD) is part of non-structural protein 3 (nsp3). It has ADP-ribose-1"-monophosphatase activity, can bind to ADP-ribose, and has de-mono-ADP ribosylation activity. These activities most likely interfere with host cell-initiated antiviral post-translational modifications of cellular and/or viral proteins, thereby enhancing viral virulence or replication efficiency.

For this dissertation writing, the macrodomains of hepatitis E virus, chikungunya virus, white bream virus and human coronavirus 229E, as well as derived variants generated by site-directed mutagenesis, were expressed in *E. coli*, purified, and examined for their de-mono-ADP-ribosylation activity. This demonstrated that certain amino acid substitutions within the macrodomain lead to impaired activity or loss of function. Possible causes of this reduced activity are discussed based on existing structural models.

Viral infections lead to a comprehensive cellular response including the innate immune response. This includes post-translational modifications of proteins by cellular poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) and the release of interferons. Transcriptome analysis was used to examine differential gene expression of interferon-competent MRC-5 cells after infection with human coronavirus 229E (wild-type and macrodomain mutants). The data shown here extend our understanding of the structure and function of the coronaviral macrodomain and provide insights into the cellular response to infection by viruses encoding active or inactive macrodomains.

6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-R	ADP-Ribose
ARH	ADP-Ribosylhydrolase
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CHIKV	Chikungunya-Virus
CoV	Coronavirus
CSG	<i>Coronavirus Study Group</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
GO	<i>Gene Ontology</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HCoV-229E	humanes Coronavirus 229E
HEV	Hepatitis-E-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IBV	Infektiöses-Bronchitis-Virus
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha-Rezeptor
IFNGR	Interferon-gamma-Rezeptor
IFNLR1	Interferon-lambda-Rezeptor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL10RB	Interleukin-10-Rezeptor, Beta-Untereinheit
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISGF3	Interferon-stimulierter Genfaktor 3
IRF9	Interferon-Regulationsfaktor 9

JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
korr.	korrespondierend
Mac1	konservierte coronavirale Makrodomäne
MacD	engl. <i>macrodomain</i> = Makrodomäne
MAR	mono-ADP-Ribose
MARylieren	mono-ADP-ribosylieren
MERS-CoV	<i>Middle-East-Respiratory-Syndrome</i> Coronavirus
MHV	Maus Hepatitis Virus
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein von aviären Influenza-A-Viren
nsp	Nichtstrukturprotein des HCoV-229E
NSP	Nichtstrukturprotein
NTR	nicht translatierte Region
OD ₆₀₀	Optische Dichte einer Probe bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARG	poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase
PARP	poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PARylieren	(poly)ADP-ribosylieren
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Ketten-Reaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pfu	engl. <i>plaque-forming units</i> = Plaque bildende Einheiten
p. i.	lat. <i>post infectionem</i> = nach der Infektion
pp1a	Polyprotein 1a
pp1ab	Polyprotein 1ab
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RCSB PDB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RTC	engl. <i>replication-transcription complex</i> = Replikations- und Transkriptionskomplex
SARS-CoV	<i>Severe-Acute-Respiratory-Syndrome</i> Coronavirus
STAT	eng. <i>signal transducer and activator of transcription</i> = Signalwandler und Transkriptionsaktivator
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i> = Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TRS	transskriptionsregulierende Sequenz
TYK	Tyrosinkinase
u. a.	und andere, unter anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
VEEV	engl. <i>venezuelan equine encephalomyelitis virus</i> = venezolanisches Pferdeenzephalomyelitis-Virus
vgl.	vergleiche
WBV	Weißbrassenvirus
Wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung eines Virions des HCoV-229E.	Seite 6
Abbildung 2	Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions des humanen Coronavirus 229E.	Seite 7
Abbildung 3	Genomorganisation des humanen Coronavirus 229E und subgenomische mRNA (sg mRNA).	Seite 10
Abbildung 4	(A) Schematische Darstellung der Kristallstruktur der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit den für diese Arbeit relevanten Aminosäurenresten. (B) Moleküloberfläche der Makrodomäne.	Seite 15
Abbildung 5	Strukturformel von 6-Biotin-17-NAD ⁺ (Biolog, Cat. No.: N 012).	Seite 36
Abbildung 6	Strukturformel von ³² P-NAD ⁺ .	Seite 37
Abbildung 7	SDS-PAGE-Analyse von Gesamtllysaten von <i>E.-coli</i> -Zellen, die mit Expressionsplasmiden zur Produktion der wildtypischen Makrodomäne oder einer der angegebenen mutierten Formen der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E transformiert worden waren.	Seite 42
Abbildung 8	Produktion von HCoV-229E-Makrodomänen in <i>E. coli</i> und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.	Seite 44
Abbildung 9	SDS-PAGE der coronaviralen Makrodomänen nach Dialyse der Proteine.	Seite 45
Abbildung 10	Produktion in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der CHIKV-Makrodomäne.	Seite 46
Abbildung 11	Produktion in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der HEV-Makrodomänen.	Seite 47
Abbildung 12	Produktion in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der WBV-Makrodomänen mittels Affinitätschromatographie.	Seite 48
Abbildung 13	Expression in <i>E. coli</i> und affinitätschromatographische Aufreinigung von PARP10.	Seite 49
Abbildung 14	Immunfluoreszenzanalyse von MRC-5-Zellen, die mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.	Seite 51
Abbildung 15	Schematische Darstellung des De-mono-ADP-Ribosylierungsexperiments.	Seite 53

Abbildung 16	Proteinsequenzen der in dieser Arbeit untersuchten viralen Makrodomänen HCoV-229E-MacD, CHIKV-MacD, HEV-MacD_BC, HEV-MacD_NA, WBV-MacD_C1 und WBV-MacD_C2.	Seite 55
Abbildung 17	De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivität der Makrodomänen des HCoV-229E, HEV, CHIKV und WBV.	Seite 56
Abbildung 18	Kristallstruktur der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit gebundener ADP-Ribose.	Seite 59
Abbildung 19	Nichtkovalente Bindungen zwischen Makrodomäne und ADP-Ribose und molekulare Oberfläche der Makrodomäne des humanen Coronavirus 229E mit gebundener ADP-Ribose.	Seite 60
Abbildung 20	Sequenzvergleich ausgewählter viraler Makrodomänen.	Seite 61
Abbildung 21	De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivitäten heterolog exprimierter HCoV-229E-Makrodomänen (Teil 1).	Seite 63
Abbildung 22	De-mono-ADP-Ribosylierungsaktivitäten heterolog exprimierter HCoV-229E-Makrodomänen (Teil 2).	Seite 64
Abbildung 23	<i>Pathway</i> -Analyse der Veränderung der PARP-Expression in nichtinfizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine <i>Heatmap</i> .	Seite 70
Abbildung 24	<i>Pathway</i> -Analyse der Veränderung der PARP-Expression in mit IFN- β vorbehandelten und mit dem Wildtyp des HCoV-229E infizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine <i>Heatmap</i> .	Seite 72
Abbildung 25	<i>Pathway</i> -Analyse der Veränderung der PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen, dargestellt durch eine <i>Heatmap</i> .	Seite 73
Abbildung 26	<i>Pathway</i> -Analyse der Veränderung der PARP-Expression in MRC-5-Zellen mit Interferonvorbehandlung nach Infektion durch HCoV-229E, dargestellt durch eine <i>Heatmap</i> .	Seite 75
Abbildung 27	Nichtkovalente Bindungen zwischen der Schleife 1 und ADP-Ribose.	Seite 80
Abbildung 28	Nichtkovalente Bindungen zwischen der Schleife 2 und ADP-Ribose.	Seite 81
Abbildung 29	Untersuchte Aminosäuren außerhalb der Schleifen 1 und 2.	Seite 83

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einordnung der humanpathogenen Coronaviren nach der Klassifikation des <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV), 2021.	Seite 4
Tabelle 2	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die <i>SDS-PAGE</i> .	Seite 34
Tabelle 3	Auflistung der untersuchten Makrodomänenmutanten des humanen Coronavirus 229E.	Seite 58
Tabelle 4	Darstellung der 50 am stärksten hochregulierten Gene in HCoV-229E-Wildtyp-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zur Deregulation dieser Gene in MRC-5-Zellen, die mit einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.	Seite 66
Tabelle 5	Darstellung der 49 am stärksten herunterregulierten Gene in HCoV-229E-Wildtyp-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zur Deregulation dieser Gene in MRC-5-Zellen, die mit einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.	Seite 67
Tabelle 6	Expressionslevels humaner PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich mit nichtinfizierten Zellen und in Abhängigkeit einer Interferonvorbehandlung.	Seite 68
Tabelle 7	Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in humanen MRC-5-Zellen nach Interferonvorbehandlung.	Seite 69
Tabelle 8	Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer Interferon- β -Vorbehandlung.	Seite 71
Tabelle 9	Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in HCoV-229E(WT)-infizierten MRC-5-Zellen.	Seite 73
Tabelle 10	Gegenüberstellung hoch- und herunterregulierter PARPs in Interferon- β -vorbehandelten und HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich zu nichtinfizierten Interferon- β -vorbehandelten Zellen.	Seite 74

9 Literaturverzeichnis

Abraham, R.; McPherson, R. L.; Dasovich, M.; Badiie, M.; Leung, A. K. L.; Griffin, D. E. (2020): Both ADP-Ribosyl-Binding and Hydrolase Activities of the Alphavirus nsP3 Macrodomain Affect Neurovirulence in Mice. *mBio* (1), S. 1–21. DOI: 10.1128/mBio.03253-19.

Al-Dorzi, H. M.; Alsolamy, S.; Arabi, Y. M. (2016): Critically ill patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Critical care (London, England)* (20), S. 1–6. DOI: 10.1186/s13054-016-1234-4.

Aleksander, S. A.; Balhoff, J.; Carbon, S.; Cherry, J. M.; Drabkin, H. J.; Ebert, D.; Feuermann, M.; Gaudet, P.; Harris, N. L.; Hill, D. P.; Lee, R.; Mi, H.; Moxon, S.; Mungall, C. J.; Muruganugan, A.; Mushayahama, T.; Sternberg, P. W.; Thomas, P. D.; van Auken, K.; Ramsey, J.; Siegele, D. A.; Chisholm, R. L.; Fey, P.; Aspromonte, M. C.; Nugnes, M. V.; Quaglia, F.; Tosatto, S.; Giglio, M.; Nadendla, S.; Antonazzo, G.; Attrill, H.; Dos Santos, G.; Marygold, S.; Strelets, V.; Tabone, C. J.; Thurmond, J.; Zhou, P.; Ahmed, S. H.; Asanitthong, P.; Luna Buitrago, D.; Erdol, M. N.; Gage, M. C.; Ali Kadhum, M.; Li, K. Y. C.; Long, M.; Michalak, A.; Pesala, A.; Pritazahra, A.; Saverimuttu, S. C. C.; Su, R.; Thurlow, K. E.; Lovering, R. C.; Logie, C.; Oliferenko, S.; Blake, J.; Christie, K.; Corbani, L.; Dolan, M. E.; Ni, L.; Sitnikov, D.; Smith, C.; Cuzick, A.; Seager, J.; Cooper, L.; Elser, J.; Jaiswal, P.; Gupta, P.; Naithani, S.; Lera-Ramirez, M.; Rutherford, K.; Wood, V.; Pons, J. L. de; Dwinell, M. R.; Hayman, G. T.; Kaldunski, M. L.; Kwitek, A. E.; Laulederkind, S. J. F.; Tutaj, M. A.; Vedi, M.; Wang, S.-J.; D'Eustachio, P.; Aimò, L.; Axelsen, K.; Bridge, A.; Hyka-Nouspikel, N.; Morgat, A.; Engel, S. R.; Karra, K.; Miyasato, S. R.; Nash, R. S.; Skrzypek, M. S.; Weng, S.; Wong, E. D.; Bakker, E.; Berardini, T. Z.; Reiser, L.; Auchincloss, A.; Argoud-Puy, G.; Blatter, M.-C.; Boutet, E.; Breuza, L.; Casals-Casas, C.; Coudert, E.; Estreicher, A.; Livia Famiglietti, M.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hulo, C.; Jungo, F.; Le Mercier, P.; Lieberherr, D.; Masson, P.; Pedruzzi, I.; Pourcel, L.; Poux, S.; Rivoire, C.; Sundaram, S.; Bateman, A.; Bowler-Barnett, E.; Bye-A-Jee, H.; Denny, P.; Ignatchenko, A.; Ishtiaq, R.; Lock, A.; Lussi, Y.; Magrane, M.; Martin, M. J.; Orchard, S.; Raposo, P.; Speretta, E.; Tyagi, N.; Warner, K.; Zaru, R.; Diehl, A. D.; Chan, J.; Diamantakis, S.; Raciti, D.; Zarowiecki, M.; Fisher, M.; James-Zorn, C.; Ponferrada, V.; Zorn, A.; Ramachandran, S.; Ruzicka, L.; Westerfield, M. (2023): The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics* (1), S. 1–14. DOI: 10.1093/genetics/iyad031.

Alhammad, Y. M. O.; Fehr, A. R. (2020): The Viral Macrodomain Counters Host Antiviral ADP-Ribosylation. *Viruses* (4), S. 1–12. DOI: 10.3390/v12040384.

Alhammad, Y. M. O.; Kashipathy, M. M.; Roy, A.; Gagné, J.-P.; McDonald, P.; Gao, P.; Nonfoux, L.; Battaile, K. P.; Johnson, D. K.; Holmstrom, E. D.; Poirier, G. G.; Lovell, S.; Fehr, A. R. (2021): The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomein Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase. *Journal of virology* (3), S. 1–20. DOI: 10.1128/JVI.01969-20.

Allen, M. D.; Buckle, A. M.; Cordell, S. C.; Löwe, J.; Bycroft, M. (2003): The Crystal Structure of AF1521 a Protein from *Archaeoglobus fulgidus* with Homology to the Non-histone Domane of MacroH2A. *Journal of molecular biology* (3), S. 503–511. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00473-X.

Almeida, J. D.; Berry, D. M.; CUNNINGHAM, C. H.; Hamre, D.; Hofstad, M. S.; Mallucci, L.; McIntosh, K.; TYRRELL, D. A. (1968): Virology: Coronaviruses. *Nature* (5168), S. 650. DOI: 10.1038/220650b0.

Alonso, S.; Izeta, A.; Sola, I.; Enjuanes, L. (2002): Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *Journal of virology* (3), S. 1293–1308. DOI: 10.1128/JVI.76.3.1293-1308.2002.

Alspach, E.; Lussier, D. M.; Schreiber, R. D. (2019): Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (3), S. 1–20. DOI: 10.1101/cshperspect.a028480.

Andersen, K. G.; Rambaut, A.; Lipkin, W. I.; Holmes, E. C.; Garry, R. F. (2020): The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature medicine* (4), S. 450–452. DOI: 10.1038/s41591-020-0820-9.

Arabi, Y. M.; Arifi, A. A.; Balkhy, H. H.; Najm, H.; Aldawood, A. S.; Ghabashi, A.; Hawa, H.; Alothman, A.; Khaldi, A.; Al Raiy, B. (2014): Clinical course and outcomes of critically ill patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Annals of internal medicine* (6), S. 389–397. DOI: 10.7326/M13-2486.

Araf, Y.; Akter, F.; Tang, Y.-D.; Fatemi, R.; Parvez, M. S. A.; Zheng, C.; Hossain, M. G. (2022): Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Journal of medical virology* (5), S. 1825–1832. DOI: 10.1002/jmv.27588.

Arya, R.; Kumari, S.; Pandey, B.; Mistry, H.; Bihani, S. C.; Das, A.; Prashar, V.; Gupta, G. D.; Panicker, L.; Kumar, M. (2021): Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology* (433), S. 1–25. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.11.024.

Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A.; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M.;

Sherlock, G. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* (1), S. 25–29. DOI: 10.1038/75556.

Assiri, A.; Al-Tawfiq, J. A.; Al-Rabeeah, A. A.; Al-Rabiah, F. A.; Al-Hajjar, S.; Al-Barrak, A.; Flemban, H.; Al-Nassir, W. N.; Balkhy, H. H.; Al-Hakeem, R. F.; Makhdoom, H. Q.; Zumla, A. I.; Memish, Z. A. (2013): Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* (9), S. 752–761. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4.

Atasheva, S.; Frolova, E. I.; Frolov, I. (2014): Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. *Journal of virology* (4), S. 2116–2130. DOI: 10.1128/JVI.03443-13.

Bai, C.; Zhong, Q.; Gao, G. F. (2022): Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China. Life sciences* (2), S. 280–294. DOI: 10.1007/s11427-021-1964-4.

Baudoux, P.; Carrat, C.; Besnardeau, L.; Charley, B.; Laude, H. (1998): Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes. *Journal of virology* (11), S. 8636–8643. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8636-8643.1998.

Beaudette, F. R.; Hudson, C. B. (1937): Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (90), S. 51–58.

Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H. (2003): Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature structural biology* (12), S. 980. DOI: 10.1038/nsb1203-980.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* (1), S. 235–242. DOI: 10.1093/nar/28.1.235.

Bick, M. J.; Carroll, J.-W. N.; Gao, G.; Goff, S. P.; Rice, C. M.; MacDonald, M. R. (2003): Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *Journal of virology* (21), S. 11555–11562. DOI: 10.1128/jvi.77.21.11555-11562.2003.

Boursnell, M. E.; Brown, T. D.; Foulds, I. J.; Green, P. F.; Tomley, F. M.; Binns, M. M. (1987): Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *The Journal of general virology* (68), S. 57–77. DOI: 10.1099/0022-1317-68-1-57.

Brady, D. K.; Gurijala, A. R.; Huang, L.; Hussain, A. A.; Lingan, A. L.; Pembridge, O. G.; Ratangee, B. A.; Sealy, T. T.; Vallone, K. T.; Clements, T. P. (2022): A guide to COVID-

19 antiviral therapeutics: a summary and perspective of the antiviral weapons against SARS-CoV-2 infection. *The FEBS journal*, S. 1–31. DOI: 10.1111/febs.16662.

Breyne, S. de; Vindry, C.; Guillin, O.; Condé, L.; Mure, F.; Gruffat, H.; Chavatte, L.; Ohlmann, T. (2020): Translational control of coronaviruses. *Nucleic acids research* (22), S. 12502–12522. DOI: 10.1093/nar/gkaa1116.

Brian, D. A.; Baric, R. S. (2005): Coronavirus genome structure and replication. *Current topics in microbiology and immunology*, S. 1–30. DOI: 10.1007/3-540-26765-4_1.

Brierley, I.; Digard, P.; Inglis, S. C. (1989): Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: Requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* (4), S. 537–547. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90124-4.

Buchholz, U.; Müller, M. A.; Nitsche, A.; Sanewski, A.; Wevering, N.; Bauer-Balci, T.; Bonin, F.; Drosten, C.; Schweiger, B.; Wolff, T.; Muth, D.; Meyer, B.; Buda, S.; Krause, G.; Schaade, L.; Haas, W. (2013): Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* (8), S. 1–7.

Burley, S. K.; Berman, H. M.; Bhikadiya, C.; Bi, C.; Chen, L.; Di Costanzo, L.; Christie, C.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Feng, Z.; Ghosh, S.; Goodsell, D. S.; Green, R. K.; Guranovic, V.; Guzenko, D.; Hudson, B. P.; Liang, Y.; Lowe, R.; Peisach, E.; Periskova, I.; Randle, C.; Rose, A.; Sekharan, M.; Shao, C.; Tao, Y.-P.; Valasatava, Y.; Voigt, M.; Westbrook, J.; Young, J.; Zardecki, C.; Zhuravleva, M.; Kurisu, G.; Nakamura, H.; Kengaku, Y.; Cho, H.; Sato, J.; Kim, J. Y.; Ikegawa, Y.; Nakagawa, A.; Yamashita, R.; Kudou, T.; Bekker, G.-J.; Suzuki, H.; Iwata, T.; Yokochi, M.; Kobayashi, N.; Fujiwara, T.; Velankar, S.; Kleywegt, G. J.; Anyango, S.; Armstrong, D. R.; Berrisford, J. M.; Conroy, M. J.; Dana, J. M.; Deshpande, M.; Gane, P.; Gáborová, R.; Gupta, D.; Gutmanas, A.; Koča, J.; Mak, L.; Mir, S.; Mukhopadhyay, A.; Nadzirin, N.; Nair, S.; Patwardhan, A.; Paysan-Lafosse, T.; Pravda, L.; Salih, O.; Sehnal, D.; Varadi, M.; Vařeková, R.; Markley, J. L.; Hoch, J. C.; Romero, P. R.; Baskaran, K.; Maziuk, D.; Ulrich, E. L.; Wedell, J. R.; Yao, H.; Livny, M.; Ioannidis, Y. E. (2019): Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic acids research* (47), S. D520-D528. DOI: 10.1093/nar/gky949.

Cavanagh, D.; Britton, P. (2008): Coronaviruses: General Features. In *Encyclopedia of Virology*, S. 549–554. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00370-8.

Chan, J. F.-W.; Yuan, S.; Kok, K.-H.; To, K. K.-W.; Chu, H.; Yang, J.; Xing, F.; Liu, J.; Yip, C. C.-Y.; Poon, R. W.-S.; Tsoi, H.-W.; Lo, S. K.-F.; Chan, K.-H.; Poon, V. K.-M.;

Chan, W.-M.; Ip, J. D.; Cai, J.-P.; Cheng, V. C.-C.; Chen, H.; Hui, C. K.-M.; Yuen, K.-Y. (2020): A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet* (10223), S. 514–523. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

Chen, D.; Vollmar, M.; Rossi, M. N.; Phillips, C.; Kraehenbuehl, R.; Slade, D.; Mehrotra, P. V.; Delft, F. von; Crosthwaite, S. K.; Gileadi, O.; Denu, J. M.; Ahel, I. (2011): Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases. *The Journal of biological chemistry* (15), S. 13261–13271. DOI: 10.1074/jbc.M110.206771.

Chen, K.; Xiao, F.; Hu, D.; Ge, W.; Tian, M.; Wang, W.; Pan, P.; Wu, K.; Wu, J. (2020): SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production. *Viruses* (47), S. 1–15. DOI: 10.3390/v13010047.

Cho, C.-C.; Lin, M.-H.; Chuang, C.-Y.; Hsu, C.-H. (2016a): Crystal structure of MERS-CoV macro domain in complex with ADP-ribose. DOI: 10.2210/pdb5dus/pdb.

Cho, C.-C.; Lin, M.-H.; Chuang, C.-Y.; Hsu, C.-H. (2016b): Macro Domain from Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Is an Efficient ADP-ribose Binding Module: CRYSTAL STRUCTURE AND BIOCHEMICAL STUDIES. *The Journal of biological chemistry* (10), S. 4894–4902. DOI: 10.1074/jbc.M115.700542.

Coccia, E. M.; Severa, M.; Giacomini, E.; Monneron, D.; Remoli, M. E.; Julkunen, I.; Cella, M.; Lande, R.; Uzé, G. (2004): Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology* (3), S. 796–805. DOI: 10.1002/eji.200324610.

Corman, V. M.; Lienau, J.; Witzentrath, M. (2019): Coronaviren als Ursache respiratorischer Infektionen. *Der Internist* (11), S. 1136–1145. DOI: 10.1007/s00108-019-00671-5.

Culver, G. M.; McCraith, S. M.; Zillmann, M.; Kierzek, R.; Michaud, N.; LaReau, R. D.; Turner, D. H.; Phizicky, E. M. (1993): An NAD derivative produced during transfer RNA splicing: ADP-ribose 1"-2" cyclic phosphate. *Science (New York, N.Y.)* (5118), S. 206–208. DOI: 10.1126/science.8392224.

Dammann, Sabine (2011): A reverse genetics study of the Human Coronavirus 229E ADP-ribose-1"-phosphatase. Queen's University Belfast, Belfast.

Daugherty, M. D.; Young, J. M.; Kerns, J. A.; Malik, H. S. (2014): Rapid evolution of PARP genes suggests a broad role for ADP-ribosylation in host-virus conflicts. *PLoS genetics* (5), 1-13. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004403.

de Groot, R. J. (2006): Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconjugate journal* (1-2), S. 59–72. DOI: 10.1007/s10719-006-5438-8.

de Groot, R. J.; Baker, S. C.; Baric, R. S.; Brown, C. S.; Drosten, C.; Enjuanes, L.; Fouchier, R. A. M.; Galiano, M.; Gorbalenya, A. E.; Memish, Z. A.; Perlman, S.; Poon, L. L. M.; Snijder, E. J.; Stephens, G. M.; Woo, P. C. Y.; Zaki, A. M.; Zambon, M.; Ziebuhr, J. (2013): Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology* (14), S. 7790–7792. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.

de Haan, C. A.; Rottier, P. J. (2005): Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. In *Advances in virus research*, S. 165–230. DOI: 10.1016/S0065-3527(05)64006-7.

Delmas, B.; Laude, H. (1990): Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *Journal of virology* (11), S. 5367–5375. DOI: 10.1128/JVI.64.11.5367-5375.1990.

Drosten, C.; Preiser, W.; Günther, S.; Schmitz, H.; Doerr, H. W. (2003): Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends in Molecular Medicine* (8), S. 325–327. DOI: 10.1016/S1471-4914(03)00133-3.

Eckeï, L.; Krieg, S.; Bütepage, M.; Lehmann, A.; Gross, A.; Lippok, B.; Grimm, A. R.; Kümmerer, B. M.; Rossetti, G.; Lüscher, B.; Verheugd, P. (2017): The conserved macrodomains of the non-structural proteins of Chikungunya virus and other pathogenic positive strand RNA viruses function as mono-ADP-ribosylhydrolases. *Scientific reports*, S. 1–18. DOI: 10.1038/srep41746.

Egloff, M.-P.; Malet, H.; Putics, A.; Heinonen, M.; Dutartre, H.; Frangeul, A.; Gruez, A.; Campanacci, V.; Cambillau, C.; Ziebuhr, J.; Ahola, T.; Canard, B. (2006): Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *Journal of virology* (17), S. 8493–8502. DOI: 10.1128/JVI.00713-06.

Enjuanes, L.; Gorbalenya, A. E.; de Groot, R. J.; Cowley, J. A.; Ziebuhr, J.; Snijder, E. J. (2008): Nidovirales. In *Encyclopedia of Virology*, S. 419–430. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00775-5.

Eriksson, K. K.; Cervantes-Barragán, L.; Ludewig, B.; Thiel, V. (2008): Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *Journal of virology* (24), S. 12325–12334. DOI: 10.1128/JVI.02082-08.

Escors, D.; Ortego, J.; Laude, H.; Enjuanes, L. (2001): The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *Journal of virology* (3), S. 1312–1324. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1312-1324.2001.

Fehr, A. R.; Athmer, J.; Channappanavar, R.; Phillips, J. M.; Meyerholz, D. K.; Perlman, S. (2015): The nsp3 macrodomain promotes virulence in mice with coronavirus-induced encephalitis. *Journal of virology* (3), S. 1523–1536. DOI: 10.1128/JVI.02596-14.

Fehr, A. R.; Channappanavar, R.; Jankevicius, G.; Fett, C.; Zhao, J.; Athmer, J.; Meyerholz, D. K.; Ahel, I.; Perlman, S. (2016): The Conserved Coronavirus Macrodomain Promotes Virulence and Suppresses the Innate Immune Response during Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio* (6), S. 1–12. DOI: 10.1128/mBio.01721-16.

Fehr, A. R.; Jankevicius, G.; Ahel, I.; Perlman, S. (2018): Viral Macrodomains: Unique Mediators of Viral Replication and Pathogenesis. *Trends in microbiology* (7), S. 598–610. DOI: 10.1016/j.tim.2017.11.011.

Fehr, A. R.; Perlman, S. (2015): Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (1282), S. 1–23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

Fenner, F.; Maurin, J. (1976): The classification and nomenclature of viruses. *Archives of virology* (1-2), S. 141–149. DOI: 10.1007/BF01317843.

Freymuth, F.; Vabret, A.; Rozenberg, F.; Dina, J.; Petitjean, J.; Gouarin, S.; Legrand, L.; Corbet, S.; Brouard, J.; Lebon, P. (2005): Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line. *Journal of medical virology* (2), S. 295–301. DOI: 10.1002/jmv.20449.

Gillespie, M.; Jassal, B.; Stephan, R.; Milacic, M.; Rothfels, K.; Senff-Ribeiro, A.; Griss, J.; Sevilla, C.; Matthews, L.; Gong, C.; Deng, C.; Varusai, T.; Ragueneau, E.; Haider, Y.; May, B.; Shamovsky, V.; Weiser, J.; Brunson, T.; Sanati, N.; Beckman, L.; Shao, X.; Fabregat, A.; Sidiropoulos, K.; Murillo, J.; Viteri, G.; Cook, J.; Shorser, S.; Bader, G.; Demir, E.; Sander, C.; Haw, R.; Wu, G.; Stein, L.; Hermjakob, H.; D'Eustachio, P. (2022): The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic acids research* (D1), S. 687–692. DOI: 10.1093/nar/gkab1028.

Godet, M.; L'Haridon, R.; Vautherot, J.-F.; Laude, H. (1992): TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* (2), S. 666–675. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90521-P.

Goenka, S.; Boothby, M. (2006): Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (11), S. 4210–4215. DOI: 10.1073/pnas.0506981103.

Goenka, S.; Cho, S. H.; Boothby, M. (2007): Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly(ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription. *The Journal of biological chemistry* (26), S. 18732–18739. DOI: 10.1074/jbc.M611283200.

Gorbalenya, A. E.; Baker, S. C.; Baric, R. S.; de Groot, R. J.; Drosten, C.; Gulyaeva, A. A.; Haagmans, B. L.; Lauber, C.; Leontovich, A. M.; Neuman, B. W.; Penzar, D.; Perlman, S.; Poon, L. L. M.; Samborskiy, D. V.; Sidorov, I. A.; Sola, I.; Ziebuhr, J. (2020): The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology* (4), S. 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.

Gorbalenya, A. E.; Enjuanes, L.; Ziebuhr, J.; Snijder, E. J. (2006): Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus research* (1), S. 17–37. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.01.017.

Grellet, E.; L'Hôte, I.; Goulet, A.; Imbert, I. (2022): Replication of the coronavirus genome: A paradox among positive-strand RNA viruses. *The Journal of biological chemistry* (5), S. 1–15. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101923.

Grunewald, M. E.; Shaban, M. G.; Mackin, S. R.; Fehr, A. R.; Perlman, S. (2020): Murine Coronavirus Infection Activates the Aryl Hydrocarbon Receptor in an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Independent Manner, Contributing to Cytokine Modulation and Proviral TCDD-Inducible-PARP Expression. *Journal of virology* (3), S. 1–17. DOI: 10.1128/JVI.01743-19.

Ha, H. C.; Juluri, K.; Zhou, Y.; Leung, S.; Hermankova, M.; Snyder, S. H. (2001): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for efficient HIV-1 integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (6), S. 3364–3368. DOI: 10.1073/pnas.051633498.

Hamre, D.; Procknow, J. J. (1966): A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* (1), S. 190–193. DOI: 10.3181/00379727-121-30734.

Hottiger, M. O.; Hassa, P. O.; Lüscher, B.; Schüler, H.; Koch-Nolte, F. (2010): Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in biochemical sciences* (4), S. 208–219. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.12.003.

Hurst, K. R.; Koetzner, C. A.; Masters, P. S. (2009): Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of virology* (14), S. 7221–7234. DOI: 10.1128/JVI.00440-09.

Hurst, K. R.; Koetzner, C. A.; Masters, P. S. (2013): Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. *Journal of virology* (16), S. 9159–9172. DOI: 10.1128/JVI.01275-13.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2022): Virus Taxonomy: 2021 Release, EC 53, Online, July 2021 Email ratification March 2022 (MSL #37), 13.07.2022. Online verfügbar unter <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

Ioannidis, I.; Ye, F.; McNally, B.; Willette, M.; Flaño, E. (2013): Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *Journal of virology* (6), S. 3261–3270. DOI: 10.1128/JVI.01956-12.

Ivashkiv, L. B.; Donlin, L. T. (2014): Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* (1), S. 36–49. DOI: 10.1038/nri3581.

Iwata, H.; Goettsch, C.; Sharma, A.; Ricchiuto, P.; Goh, W. W. B.; Halu, A.; Yamada, I.; Yoshida, H.; Hara, T.; Wei, M.; Inoue, N.; Fukuda, D.; Mojcher, A.; Mattson, P. C.; Barabási, A.-L.; Boothby, M.; Aikawa, E.; Singh, S. A.; Aikawa, M. (2016): PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation. *Nature communications* (7), S. 1–19. DOI: 10.1038/ncomms12849.

Jacobs, J. P.; Jones, C. M.; Baille, J. P. (1970): Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* (5254), S. 168–170. DOI: 10.1038/227168a0.

Jacobs, L.; Spaan, W. J.; Horzinek, M. C.; van der Zeijst, B. A. (1981): Synthesis of subgenomic mRNA's of mouse hepatitis virus is initiated independently: evidence from UV transcription mapping. *Journal of virology* (2), S. 401–406. DOI: 10.1128/JVI.39.2.401-406.1981.

Jamal, S.; Malet, H.; Coutard, B.; Canard, B. (2009): Crystal structure of macro domain of Venezuelan Equine Encephalitis virus. DOI: 10.2210/pdb3gqe/pdb.

Jankevicius, G.; Hassler, M.; Golia, B.; Rybin, V.; Zacharias, M.; Timinszky, G.; Ladurner, A. G. (2013): A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-

ribosylation. *Nature structural & molecular biology* (4), S. 508–514. DOI: 10.1038/nsmb.2523.

Johnson, M. G.; Strizki, J. M.; Brown, M. L.; Wan, H.; Shamsuddin, H. H.; Ramgopal, M.; Florescu, D. F.; Delobel, P.; Khaertynova, I.; Flores, J. F.; Fouche, L. F.; Chang, S.-C.; Williams-Diaz, A.; Du, J.; Grobler, J. A.; Paschke, A.; Anda, C. de (2023): Molnupiravir for the treatment of COVID-19 in immunocompromised participants: efficacy, safety, and virology results from the phase 3 randomized, placebo-controlled MOVE-OUT trial. *Infection*, S. 1–12. DOI: 10.1007/s15010-022-01959-9.

Jwa, M.; Chang, P. (2012): PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1 α -mediated unfolded protein response. *Nature cell biology* (11), S. 1223–1230. DOI: 10.1038/ncb2593.

Kanehisa, M. (2019): Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society* (11), S. 1947–1951. DOI: 10.1002/pro.3715.

Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Ishiguro-Watanabe, M. (2023): KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic acids research* (51), S. 587–592. DOI: 10.1093/nar/gkac963.

Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* (1), S. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

Karras, G. I.; Kustatscher, G.; Buhecha, H. R.; Allen, M. D.; Pugieux, C.; Sait, F.; Bycroft, M.; Ladurner, A. G. (2005): The macro domain is an ADP-ribose binding module. *The EMBO journal* (11), S. 1911–1920. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600664.

Khaitov, M. R.; Laza-Stanca, V.; Edwards, M. R.; Walton, R. P.; Rohde, G.; Contoli, M.; Papi, A.; Stanciu, L. A.; Kotenko, S. V.; Johnston, S. L. (2009): Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy* (3), S. 375–386. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01826.x.

Kopecky-Bromberg, S. A.; Martínez-Sobrido, L.; Frieman, M.; Baric, R. A.; Palese, P. (2007): Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *Journal of virology* (2), S. 548–557. DOI: 10.1128/JVI.01782-06.

Kuny, C. V.; Sullivan, C. S. (2016): Virus-Host Interactions and the ARTD/PARP Family of Enzymes. *PLoS pathogens* (3), S. 1–7. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005453.

Kuo, L.; Masters, P. S. (2003): The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *Journal of virology* (8), S. 4597–4608. DOI: 10.1128/jvi.77.8.4597-4608.2003.

Kuri, T.; Eriksson, K. K.; Putics, A.; Züst, R.; Snijder, E. J.; Davidson, A. D.; Siddell, S. G.; Thiel, V.; Ziebuhr, J.; Weber, F. (2011): The ADP-ribose-1"-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *Journal of General Virology* (Pt 8), S. 1899–1905. DOI: 10.1099/vir.0.031856-0.

Lang, Y.; Li, W.; Li, Z.; Koerhuis, D.; van den Burg, A. C. S.; Rozemuller, E.; Bosch, B.-J.; van Kuppeveld, F. J. M.; Boons, G.-J.; Huizinga, E. G.; van der Schaar, H. M.; de Groot, R. J. (2020): Coronavirus hemagglutinin-esterase and spike proteins coevolve for functional balance and optimal virion avidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (41), S. 25759–25770. DOI: 10.1073/pnas.2006299117.

Lee, H.-J.; Shieh, C.-K.; Gorbalenya, A. E.; Koonin, E. V.; La Monica, N.; Tuler, J.; Bagdzhadzhyan, A.; Lai, M. M. (1991): The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* (2), S. 567–582. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90071-I.

Lefkowitz, E. J.; Dempsey, D. M.; Hendrickson, R. C.; Orton, R. J.; Siddell, S. G.; Smith, D. B. (2018): Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research* (D1), S. 708–717. DOI: 10.1093/nar/gkx932.

Lei, J.; Kusov, Y.; Hilgenfeld, R. (2018): Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral research* (149), S. 58–74. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.11.001.

Leung, A. K. L.; McPherson, R. L.; Griffin, D. E. (2018): Macrodomein ADP-ribosylhydrolase and the pathogenesis of infectious diseases. *PLoS pathogens* (3), S. 1–9. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006864.

Li, C.; Debing, Y.; Jankevicius, G.; Neyts, J.; Ahel, I.; Coutard, B.; Canard, B. (2016): Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation. *Journal of virology* (19), S. 8478–8486. DOI: 10.1128/JVI.00705-16.

Li, L.; Shi, Y.; Li, S.; Liu, J.; Zu, S.; Xu, X.; Gao, M.; Sun, N.; Pan, C.; Peng, L.; Yang, H.; Cheng, G. (2021): ADP-ribosyltransferase PARP11 suppresses Zika virus in synergy with PARP12. *Cell & Bioscience* (1), S. 116. DOI: 10.1186/s13578-021-00628-y.

Liao, Y.; Lescar, J.; Tam, J. P.; Liu, D. X. (2004): Expression of SARS-coronavirus envelope protein in Escherichia coli cells alters membrane permeability. *Biochemical and biophysical research communications* (1), S. 374–380. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.10.050.

Liao, Y.; Yuan, Q.; Torres, J.; Tam, J. P.; Liu, D. X. (2006): Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* (2), S. 264–275. DOI: 10.1016/j.virol.2006.01.028.

Lin, M.-H.; Chang, S.-C.; Chiu, Y.-C.; Jiang, B.-C.; Wu, T.-H.; Hsu, C.-H. (2020): Structural, Biophysical, and Biochemical Elucidation of the SARS-CoV-2 Nonstructural Protein 3 Macro Domain. *ACS infectious diseases* (11), S. 2970–2978. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00441.

Liu, D. X.; Inglis, S. C. (1991): Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* (2), S. 911–917. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90572-S.

Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; Bi, Y.; Ma, X.; Zhan, F.; Wang, L.; Hu, T.; Zhou, H.; Hu, Z.; Zhou, W.; Zhao, L.; Chen, J.; Meng, Y.; Wang, J.; Lin, Y.; Yuan, J.; Xie, Z.; Ma, J.; Liu, W. J.; Wang, D.; Xu, W.; Holmes, E. C.; Gao, G. F.; Wu, G.; Chen, W.; Shi, W.; Tan, W. (2020): Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* (10224), S. 565–574. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

Lundin, A.; Dijkman, R.; Bergström, T.; Kann, N.; Adamiak, B.; Hannoun, C.; Kindler, E.; Jónsdóttir, H. R.; Muth, D.; Kint, J.; Forlenza, M.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Thiel, V.; Trybala, E. (2014): Targeting membrane-bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the middle East respiratory syndrome virus. *PLoS pathogens* (5), S. 1–15. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004166.

Madeira, F.; Pearce, M.; Tivey, A. R. N.; Basutkar, P.; Lee, J.; Edbali, O.; Madhusoodanan, N.; Kolesnikov, A.; Lopez, R. (2022): Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic acids research* (50), S. 276–279. DOI: 10.1093/nar/gkac240.

Mah, A. Y.; Cooper, M. A. (2016): Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Critical reviews in immunology* (2), S. 131–147. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.2016017387.

Mahmoud, L.; Al-Saif, M.; Amer, H. M.; Sheikh, M.; Almajhdi, F. N.; Khabar, K. S. A. (2011): Green fluorescent protein reporter system with transcriptional sequence

heterogeneity for monitoring the interferon response. *Journal of virology* (18), S. 9268–9275. DOI: 10.1128/JVI.00772-11.

Makrynitsa, G. I.; Ntonti, D.; Marousis, K. D.; Birkou, M.; Matsoukas, M.-T.; Asami, S.; Bentrop, D.; Papageorgiou, N.; Canard, B.; Coutard, B.; Spyroulias, G. A. (2019): Conformational plasticity of the VEEV macro domain is important for binding of ADP-ribose. *Journal of structural biology* (1), S. 119–127. DOI: 10.1016/j.jsb.2019.02.008.

Malet, H.; Coutard, B.; Jamal, S.; Dutartre, H.; Papageorgiou, N.; Neuvonen, M.; Ahola, T.; Forrester, N.; Gould, E. A.; Lafitte, D.; Ferron, F.; Lescar, J.; Gorbalenya, A. E.; Lamballerie, X. de; Canard, B. (2009a): The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *Journal of virology* (13), S. 6534–6545. DOI: 10.1128/JVI.00189-09.

Malet, H.; Jamal, S.; Coutard, B.; Canard, B. (2009b): Crystal structure of macro domain of Chikungunya virus. DOI: 10.2210/pdb3gpg/pdb.

Malik, Y. A. (2020): Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology* (1), S. 3–11.

Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E. J.; Campbell, E. A. (2022): Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature reviews. Molecular cell biology* (1), S. 21–39. DOI: 10.1038/s41580-021-00432-z.

Mao, R.; Nie, H.; Cai, D.; Zhang, J.; Liu, H.; Yan, R.; Cuconati, A.; Block, T. M.; Guo, J.-T.; Guo, H. (2013): Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. *PLoS pathogens* (7), S. 1–18. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003494.

Mao, Z.; Hine, C.; Tian, X.; van Meter, M.; Au, M.; Vaidya, A.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. (2011): SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science (New York, N.Y.)* (6036), S. 1443–1446. DOI: 10.1126/science.1202723.

Martzen, M. R.; McCraith, S. M.; Spinelli, S. L.; Torres, F. M.; Fields, S.; Grayhack, E. J.; Phizicky, E. M. (1999): A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science (New York, N.Y.)* (5442), S. 1153–1155. DOI: 10.1126/science.286.5442.1153.

Masters, P. S. (2006): The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in virus research*, S. 193–292. DOI: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.

McNab, F.; Mayer-Barber, K.; Sher, A.; Wack, A.; O'Garra, A. (2015): Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews. Immunology* (2), S. 87–103. DOI: 10.1038/nri3787.

McPherson, R. L.; Abraham, R.; Sreekumar, E.; Ong, S.-E.; Cheng, S.-J.; Baxter, V. K.; Kistemaker, H. A. V.; Filippov, D. V.; Griffin, D. E.; Leung, A. K. L. (2017): ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (7), S. 1666–1671. DOI: 10.1073/pnas.1621485114.

Megjugorac, N. J.; Gallagher, G. E.; Gallagher, G. (2010): IL-4 enhances IFN-lambda1 (IL-29) production by plasmacytoid DCs via monocyte secretion of IL-1Ra. *Blood* (21), S. 4185–4190. DOI: 10.1182/blood-2009-09-246157.

Mehrotra, P.; Riley, J. P.; Patel, R.; Li, F.; Voss, L.; Goenka, S. (2011): PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *The Journal of biological chemistry* (3), S. 1767–1776. DOI: 10.1074/jbc.M110.157768.

Messner, S.; Hottiger, M. O. (2011): Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in cell biology* (9), S. 534–542. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.06.001.

Minskaia, E.; Hertzog, T.; Gorbalenya, A. E.; Campanacci, V.; Cambillau, C.; Canard, B.; Ziebuhr, J. (2006): Discovery of an RNA virus 3'-5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (13), S. 5108–5113. DOI: 10.1073/pnas.0508200103.

Müller, C.; Karl, N.; Ziebuhr, J.; Pleschka, S. (2016): D, L-lysine acetylsalicylate + glycine Impairs Coronavirus Replication. *J Antivir Antiretrovir* (4), S. 142–150. DOI: 10.4172/jaa.1000151.

Müller, S.; Möller, P.; Bick, M. J.; Wurr, S.; Becker, S.; Günther, S.; Kümmerer, B. M. (2007): Inhibition of filovirus replication by the zinc finger antiviral protein. *Journal of virology* (5), S. 2391–2400. DOI: 10.1128/JVI.01601-06.

Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T.; Sato, J. (1982): Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* (9), S. 3858–3863. DOI: Study.

Nchioua, R.; Kmiec, D.; Müller, J. A.; Conzelmann, C.; Groß, R.; Swanson, C. M.; Neil, S. J. D.; Stenger, S.; Sauter, D.; Münch, J.; Sparrer, K. M. J.; Kirchhoff, F. (2020): SARS-CoV-2 Is Restricted by Zinc Finger Antiviral Protein despite Preadaptation to the Low-CpG Environment in Humans. *mBio* (5), S. 1–19. DOI: 10.1128/mBio.01930-20.

Neuvonen, M.; Ahola, T. (2009): Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *Journal of molecular biology* (1), S. 212–225. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.045.

Ni, X.; Knapp, S.; Chaikuad, A. (2021a): Crystal structure of SARS-CoV-2 macrodomain in complex with ADP-ribose-phosphate (ADP-ribose-2'-phosphate, ADPRP). DOI: 10.2210/pdb7bf5/pdb.

Ni, X.; Schröder, M.; Olieric, V.; Sharpe, M. E.; Hernandez-Olmos, V.; Proschak, E.; Merk, D.; Knapp, S.; Chaikuad, A. (2021b): Structural Insights into Plasticity and Discovery of Remdesivir Metabolite GS-441524 Binding in SARS-CoV-2 Macrodomain. *ACS medicinal chemistry letters* (4), S. 603–609. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.0c00684.

Nieto-Torres, J. L.; DeDiego, M. L.; Verdiá-Báguena, C.; Jimenez-Guardeño, J. M.; Regla-Nava, J. A.; Fernandez-Delgado, R.; Castaño-Rodriguez, C.; Alcaraz, A.; Torres, J.; Aguilera, V. M.; Enjuanes, L. (2014): Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS pathogens* (5), S. 1–19. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004077.

Oshitani, H. (2005): Lessons learned from international responses to severe acute respiratory syndrome (SARS). *Environmental health and preventive medicine* (5), S. 251–254. DOI: 10.1007/BF02897698.

Palazzo, L.; Mikoč, A.; Ahel, I. (2017): ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *The FEBS journal* (18), S. 2932–2946. DOI: 10.1111/febs.14078.

Pehrson, J. R.; Fuji, R. N. (1998): Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic acids research* (12), S. 2837–2842. DOI: 10.1093/nar/26.12.2837.

Pene, F.; Merlat, A.; Vabret, A.; Rozenberg, F.; Buzyn, A.; Dreyfus, F.; Cariou, A.; Freymuth, F.; Lebon, P. (2003): Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (7), S. 929–932. DOI: 10.1086/377612.

Piotrowski, Y.; Mesters, J. R.; Moll, R.; Hilgenfeld, R. (2009): Structure of the NSP3 X-domain of human coronavirus NL63. DOI: 10.2210/pdb2vri/pdb.

Plant, E. P.; Rakauskaitė, R.; Taylor, D. R.; Dinman, J. D. (2010): Achieving a golden mean: mechanisms by which coronaviruses ensure synthesis of the correct stoichiometric ratios of viral proteins. *Journal of virology* (9), S. 4330–4340. DOI: 10.1128/JVI.02480-09.

Putics, A.; Filipowicz, W.; Hall, J.; Gorbalenya, A. E.; Ziebuhr, J. (2005): ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *Journal of virology* (20), S. 12721–12731. DOI: 10.1128/JVI.79.20.12721-12731.2005.

Putics, Á.; Gorbalenya, A. E.; Ziebuhr, J. (2006): Identification of protease and ADP-ribose 1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *The Journal of general virology* (87), S. 651–656. DOI: 10.1099/vir.0.81596-0.

Rack, J. G. M.; Perina, D.; Ahel, I. (2016): Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annual review of biochemistry* (85), S. 431–454. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014935.

Rack, J. G. M.; Zorzini, V.; Zhu, Z.; Schuller, M.; Ahel, D.; Ahel, I. (2020): Viral macrodomains: a structural and evolutionary assessment of the pharmacological potential. *Open biology* (11), S. 1–21. DOI: 10.1098/rsob.200237.

Ramakrishnan, M. A. (2016): Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology* (2), S. 85–86. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

Reed, L. J.; Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* (3), S. 493–497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Robson, F.; Khan, K. S.; Le, T. K.; Paris, C.; Demirbag, S.; Barfuss, P.; Rocchi, P.; Ng, W.-L. (2020): Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Molecular Cell* (5), S. 710–727. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.07.027.

Rosenthal, F.; Feijs, K. L. H.; Frugier, E.; Bonalli, M.; Forst, A. H.; Imhof, R.; Winkler, H. C.; Fischer, D.; Cafilisch, A.; Hassa, P. O.; Lüscher, B.; Hottiger, M. O. (2013): Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nature structural & molecular biology* (4), S. 502–507. DOI: 10.1038/nsmb.2521.

Saad, M.; Omrani, A. S.; Baig, K.; Bahloul, A.; Elzein, F.; Matin, M. A.; Selim, M. A. A.; Al Mutairi, M.; Al Nakhli, D.; Al Aidaroos, A. Y.; Al Sherbeen, N.; Al-Khashan, H. I.; Memish, Z. A.; Albarrak, A. M. (2014): Clinical aspects and outcomes of 70 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a single-center experience in Saudi Arabia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* (29), S. 301–306. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.09.003.

Saikatendu, K. S.; Joseph, J. S.; Subramanian, V.; Clayton, T.; Griffith, M.; Moy, K.; Velasquez, J.; Neuman, B. W.; Buchmeier, M. J.; Stevens, R. C.; Kuhn, P. (2005): Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure* (11), S. 1665–1675. DOI: 10.1016/j.str.2005.07.022.

Saikatendu, K. S.; Joseph, J. S.; Subramanian, V.; Neuman, B. W.; Buchmeier, M. J.; Stevens, R. C.; Kuhn, P. (2006): NMR Structure of SARS-CoV non-structural protein NSP3A (SARS1) from SARS Coronavirus. DOI: 10.2210/pdb2acf/pdb.

Sawicki, S. G.; Sawicki, D. L. (1995): Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Advances in experimental medicine and biology* (380), S. 499–506. DOI: 10.1007/978-1-4615-1899-0_79.

Sawicki, S. G.; Sawicki, D. L.; Siddell, S. G. (2007): A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of virology* (1), S. 20–29. DOI: 10.1128/JVI.01358-06.

Schalk, A. F.; Hawn, M. C. (1931): An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (78), S. 413–422.

Schelle, B.; Karl, N.; Ludewig, B.; Siddell, S. G.; Thiel, V. (2006): Nucleocapsid protein expression facilitates coronavirus replication. *Advances in experimental medicine and biology* (581), S. 43–48. DOI: 10.1007/978-0-387-33012-9_6.

Schoggins, J. W. (2019): Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual review of virology* (1), S. 567–584.

Schultze, B.; Wahn, K.; Klenk, H. D.; Herrler, G. (1991): Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology* (1), S. 221–228. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90026-8.

Sehnal, D.; Bittrich, S.; Deshpande, M.; Svobodová, R.; Berka, K.; Bazgier, V.; Velankar, S.; Burley, S. K.; Koča, J.; Rose, A. S. (2021): Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic acids research* (49), S. W431–W437. DOI: 10.1093/nar/gkab314.

Shanmugaraj, B.; Malla, A.; Khorattanakulchai, N.; Phoolcharoen, W. (2022): SARS-CoV-2 omicron variant: Could it be another threat? *Journal of medical virology* (4), S. 1284–1288. DOI: 10.1002/jmv.27532.

Sharifi, R.; Morra, R.; Appel, C. D.; Tallis, M.; Chioza, B.; Jankevicius, G.; Simpson, M. A.; Matic, I.; Ozkan, E.; Golia, B.; Schellenberg, M. J.; Weston, R.; Williams, J. G.; Rossi, M. N.; Galehdari, H.; Krahm, J.; Wan, A.; Trembath, R. C.; Crosby, A. H.; Ahel, D.; Hay, R.; Ladurner, A. G.; Timinszky, G.; Williams, R. S.; Ahel, I. (2013): Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *The EMBO journal* (9), S. 1225–1237. DOI: 10.1038/emboj.2013.51.

Shaw, A. E.; Hughes, J.; Gu, Q.; Behdenna, A.; Singer, J. B.; Dennis, T.; Orton, R. J.; Varela, M.; Gifford, R. J.; Wilson, S. J.; Palmarini, M. (2017): Fundamental properties of

the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. *PLoS biology* (12), S. 1–23. DOI: 10.1371/journal.pbio.2004086.

Simmonds, P. (2015): Methods for virus classification and the challenge of incorporating metagenomic sequence data. *Journal of General Virology* (6), S. 1193–1206. DOI: 10.1099/jgv.0.000016.

Sneath, P. (1966): Relations between chemical structure and biological activity in peptides. *Journal of Theoretical Biology* (2), S. 157–195. DOI: 10.1016/0022-5193(66)90112-3.

Spaan, W.; Cavanagh, D.; Horzinek, M. C. (1988): Coronaviruses: structure and genome expression. *The Journal of general virology* (69), S. 2939–2952. DOI: 10.1099/0022-1317-69-12-2939.

Su, S.; Wong, G.; Shi, W.; Liu, J.; Lai, A. C. K.; Zhou, J.; Liu, W.; Bi, Y.; Gao, G. F. (2016): Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in microbiology* (6), S. 490–502. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003.

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 research* (101), S. 122–130. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.11.006.

Sugiyama, K.; Kasai, M.; Kato, S.; Kasai, H.; Hatakeyama, K. (1998): Haemagglutinin-esterase protein (HE) of murine corona virus: DVIM (diarrhea virus of infant mice). *Archives of virology* (8), S. 1523–1534. DOI: 10.1007/s007050050395.

The UniProt Consortium (2023): UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic acids research* (D1), S. 523–531. DOI: 10.1093/nar/gkac1052.

Tian, L.; Pang, Z.; Li, M.; Lou, F.; An, X.; Zhu, S.; Song, L.; Tong, Y.; Fan, H.; Fan, J. (2022): Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in immunology* (13), S. 1–20. DOI: 10.3389/fimmu.2022.855496.

Till, S.; Ladurner, A. G. (2009): Sensing NAD metabolites through macro domains. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* (9), S. 3246–3258. DOI: 10.2741/3448.

Vabret, A.; Mourez, T.; Gouarin, S.; Petitjean, J.; Freymuth, F. (2003): An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (8), S. 985–989. DOI: 10.1086/374222.

van der Most, R. G.; Spaan, W. J. M. (1995): Coronavirus Replication, Transcription, and RNA Recombination. In *The Coronaviridae*, S. 11–31. DOI: 10.1007/978-1-4899-1531-3_2.

Vennema, H.; Godeke, G. J.; Rossen, J. W.; Voorhout, W. F.; Horzinek, M. C.; Opstelten, D. J.; Rottier, P. J. (1996): Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *The EMBO journal* (8), S. 2020–2028. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00553.x.

V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. (2021): Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology* (3), S. 155–170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

Vyas, S.; Matic, I.; Uchima, L.; Rood, J.; Zaja, R.; Hay, R. T.; Ahel, I.; Chang, P. (2014): Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nature communications* (5), S. 1–13. DOI: 10.1038/ncomms5426.

Wang, G.; Deering, C.; Macke, M.; Shao, J.; Burns, R.; Blau, D. M.; Holmes, K. V.; Davidson, B. L.; Perlman, S.; McCray, P. B. (2000): Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *Journal of virology* (19), S. 9234–9239. DOI: 10.1128/jvi.74.19.9234-9239.2000.

Wang, J.; Oberley-Deegan, R.; Wang, S.; Nikrad, M.; Funk, C. J.; Hartshorn, K. L.; Mason, R. J. (2009): Differentiated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN-lambda 1) in response to influenza A infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (3), S. 1296–1304. DOI: 10.4049/jimmunol.182.3.1296.

Wilson, L.; McKinlay, C.; Gage, P.; Ewart, G. (2004): SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* (330), S. 322–331. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.033.

Wojdyla, J. A.; Manolaridis, I.; van Kasteren, P. B.; Kikkert, M.; Snijder, E. J.; Gorbalenya, A. E.; Tucker, P. A. (2010): Papain-like protease 1 from transmissible gastroenteritis virus: crystal structure and enzymatic activity toward viral and cellular substrates. *Journal of virology* (19), S. 10063–10073. DOI: 10.1128/JVI.00898-10.

World Health Organization (WHO) (2003): Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS), 2003 (WHO/CDS/CSR/GAR/2003.11). Online verfügbar unter <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70863>, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

World Health Organization (WHO) (2015): Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Online verfügbar unter

<https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

World Health Organization (WHO) (2019): MERS Situation Update September 2019. Online verfügbar unter <https://applications.emro.who.int/docs/EMROPub-MERS-SEP-2019-EN.pdf?ua=1&ua=1>, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

World Health Organization (WHO) (2020): Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report - 51. Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

World Health Organization (WHO) (2021): WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part. Joint WHO-China Study 14 January-10 February 2021. Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/final-joint-report_origins-studies-6-april-201.pdf?sfvrsn=4f5e5196_1&download=true, zuletzt geprüft am 13.07.2022.

World Health Organization (WHO) (2023): COVID-19 Weekly Epidemiological Update Edition 152 published 20 July 2023. Online verfügbar unter <https://reliefweb.int/report/world/covid-19-weekly-epidemiological-update-edition-152-published-20-july-2023>, zuletzt geprüft am 24.07.2023.

Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; Yuan, M.-L.; Zhang, Y.-L.; Dai, F.-H.; Liu, Y.; Wang, Q.-M.; Zheng, J.-J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y.-Z. (2020a): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (7798), S. 265–269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.

Wu, J. T.; Leung, K.; Leung, G. M. (2020b): Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *The Lancet* (10225), S. 689–697. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30260-9.

Xu, R.-H.; He, J.-F.; Evans, M. R.; Peng, G.-W.; Field, H. E.; Yu, D.-W.; Lee, C.-K.; Luo, H.-M.; Lin, W.-S.; Lin, P.; Li, L.-H.; Liang, W.-J.; Lin, J.-Y.; Schnur, A. (2004): Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerging infectious diseases* (6), S. 1030–1037. DOI: 10.3201/eid1006.030852.

Xu, Y.; Cong, L.; Chen, C.; Wei, L.; Zhao, Q.; Xu, X.; Ma, Y.; Bartlam, M.; Rao, Z. (2009a): Complex of substrate ADP-ribose with HCoV-229E Nsp3 ADRP domain. DOI: 10.2210/pdb3ewr/pdb.

- Xu, Y.;** Cong, L.; Chen, C.; Wei, L.; Zhao, Q.; Xu, X.; Ma, Y.; Bartlam, M.; Rao, Z. (2009b): Crystal structures of two coronavirus ADP-ribose-1"-monophosphatases and their complexes with ADP-Ribose: a systematic structural analysis of the viral ADRP domain. *Journal of virology* (2), S. 1083–1092. DOI: 10.1128/JVI.01862-08.
- Xu, Y.;** Cong, L.; Chen, C.; Wei, L.; Zhao, Q.; Xu, X.; Ma, Y.; Bartlam, M.; Rao, Z. (2009c): HCov-229E Nsp3 ADRP domain. DOI: 10.2210/pdb3ewq/pdb.
- Xu, Y.;** Cong, L.; Chen, C.; Wei, L.; Zhao, Q.; Xu, X.; Ma, Y.; Bartlam, M.; Rao, Z. (2009d): IBV Nsp3 ADRP domain. DOI: 10.2210/pdb3ewo/pdb.
- Yang, D.;** Leibowitz, J. L. (2015): The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus research* (206), S. 120–133. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.02.025.
- Yang, E.;** Tacchelly-Benites, O.; Wang, Z.; Randall, M. P.; Tian, A.; Benchabane, H.; Freemantle, S.; Pikielny, C.; Tolwinski, N. S.; Lee, E.; Ahmed, Y. (2016): Wnt pathway activation by ADP-ribosylation. *Nature communications*, S. 1–14. DOI: 10.1038/ncomms11430.
- Yelemali, P.;** Hao, L.; Liu, Q. (2022): Mechanisms of host type I interferon response modulation by the nucleocapsid proteins of alpha- and betacoronaviruses. *Archives of virology* (10), S. 1925–1930. DOI: 10.1007/s00705-022-05513-8.
- Yin, Y.;** Wunderink, R. G. (2018): MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology (Carlton, Vic.)* (2), S. 130–137. DOI: 10.1111/resp.13196.
- Yin, Z.;** Dai, J.; Deng, J.; Sheikh, F.; Natalia, M.; Shih, T.; Lewis-Antes, A.; Amrute, S. B.; Garrigues, U.; Doyle, S.; Donnelly, R. P.; Kotenko, S. V.; Fitzgerald-Bocarsly, P. (2012): Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (6), S. 2735–2745. DOI: 10.4049/jimmunol.1102038.
- Yu, M.;** Zhang, C.; Yang, Y.; Yang, Z.; Zhao, L.; Xu, L.; Wang, R.; Zhou, X.; Huang, P. (2011): The interaction between the PARP10 protein and the NS1 protein of H5N1 AIV and its effect on virus replication. *Virology journal* (546), S. 1–10. DOI: 10.1186/1743-422X-8-546.
- Zaki, A. M.;** van Boheemen, S.; Bestebroer, T. M.; Osterhaus, A. D. M. E.; Fouchier, R. A. M. (2012): Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* (19), S. 1814–1820. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
- Zerbini, F. M.;** Siddell, S. G.; Lefkowitz, E. J.; Mushegian, A. R.; Adriaenssens, E. M.; Alfenas-Zerbini, P.; Dempsey, D. M.; Dutilh, B. E.; García, M. L.; Hendrickson, R. C.; Junglen, S.; Krupovic, M.; Kuhn, J. H.; Lambert, A. J.; Łobocka, M.; Oksanen, H. M.;

Robertson, D. L.; Rubino, L.; Sabanadzovic, S.; Simmonds, P.; Smith, D. B.; Suzuki, N.; van Doorslaer, K.; Vandamme, A.-M.; Varsani, A. (2023): Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). *Archives of virology* (7), S. 1–11. DOI: 10.1007/s00705-023-05797-4.

Zhong, N. S.; Zheng, B. J.; Li, Y. M.; Poon, L. L.; Xie, Z. H.; Chan, K. H.; Li, P. H.; Tan, S. Y.; Chang, Q.; Xie, J. P.; Liu, X. Q.; Xu, J.; Li, D. X.; Yuen, K. Y.; Peiris, J. S.; Guan, Y. (2003): Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet* (9393), S. 1353–1358. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14630-2.

Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Chen, H.-D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R.-D.; Liu, M.-Q.; Chen, Y.; Shen, X.-R.; Wang, X.; Zheng, X.-S.; Zhao, K.; Chen, Q.-J.; Deng, F.; Liu, L.-L.; Yan, B.; Zhan, F.-X.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Shi, Z.-L. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* (7798), S. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Zhou, Y.; Zhou, B.; Pache, L.; Chang, M.; Khodabakhshi, A. H.; Tanaseichuk, O.; Benner, C.; Chanda, S. K. (2019): Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature communications* (1), S. 1–10. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6.

Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W. (2020): A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* (8), S. 727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.

Zhu, Y.; Chen, G.; Lv, F.; Wang, X.; Ji, X.; Xu, Y.; Sun, J.; Wu, L.; Zheng, Y.-T.; Gao, G. (2011): Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (38), S. 15834–15839. DOI: 10.1073/pnas.1101676108.

Ziebuhr, J.; Siddell, S. G. (1999): Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab. *Journal of virology* (1), S. 177–185. DOI: 10.1128/JVI.73.1.177-185.1999.

Ziebuhr, J.; Snijder, E. J.; Gorbalenya, A. E. (2000): Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of general virology* (Pt 4), S. 853–879. DOI: 10.1099/0022-1317-81-4-853.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. John Ziebuhr für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich arbeiten zu dürfen, bedanken. Ebenso bedanke ich mich für den fachlichen Austausch, die Betreuung und die Unterstützung während der Fertigstellung meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Dr. Ramakanth Madhugiri für die Betreuung, die wissenschaftliche Diskussion, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und den Ideenaustausch.

Ein besonderer Dank gilt Nadja Karl, die mir seit meinen ersten Handgriffen im Labor stets helfend zur Seite stand und mit ihrer Expertise eine große Hilfe und Stütze war.

Ebenso möchte ich Dr. Christin Müller für die Hilfe beim Mikroskopieren mit dem Konfokalmikroskop sowie den fachlichen Austausch danken.

Ich danke Dr. Jochen Wilhelm für die Durchführung des Microarrays.

Ich danke Lisa-Marie Seeber für die Unterstützung bei der Datenauswertung der Transkriptomanalyse.

Außerdem danke ich allen weiteren Labormitgliedern der medizinischen Virologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen: Heiko, Alex, Karin, Ulli und Ganesh.

Ich danke Benjamin Reddel, der mir seit Beginn des Medizinstudiums stets ein guter Freund war und maßgeblich dazu beigetragen hat, dass die Zeit im Labor unvergesslich bleibt.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung während meiner Studienzeit, für den Rückhalt und die Fürsorge über all die Jahre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die Wegbegleitung und die gemeinsame Zeit bedanken.