Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
des bunyaviralen L-Proteins

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen

angefertigt in der Abteilung Virologie
am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg

von

Tobias Holm

Hamburg, April 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2014 bis April 2018 in der Abteilung Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stephan Günther angefertigt.

Erster Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Andreas Dotzauer *Fachbereich 2 Biologie/Chemie* *Universität Bremen*
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. med. Stephan Günther *Abteilung Virologie* *Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg*

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG IV

ABSTRACT V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1 Bunyaviren als Humanpathogene 1
1.1.1 Systematische Einordnung der Bunyaviren 1
1.1.2 Klinische Einordnung und Epidemiologie bunyaviraler Erkrankungen 2
1.1.3 Das Rifttalfieber 3
1.1.4 Das Krim-Kongofieber 4

1.2 Molekularer Aufbau der Bunyaviren 4
1.2.1 Aufbau des Virions und Bedeutung der Virusproteine 4
1.2.2 Replikationszyklus von Bunyaviren 6
1.2.4 Das bunyavirale L-Protein als Schlüsselprotein der Virusreplikation 8
1.2.5 Therapieansätze zur Behandlung bunyaviraler Infektionen 10

1.3 Der *Cap-Snatching*-Mechanismus 12
1.3.1 Der Cap-Snatching-Mechanismus des Influenza-Virus 12
1.3.2 Die Endonuklease als Schlüsselenzym des Cap-Snatching-Mechanismus 13
1.3.3 Der Cap-Snatching-Mechanismus als therapeutisches Target bei Influenza 15

1.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* 16

1.5 Methoden der Strukturbiologie 18
1.5.1 Röntgendiffraktometrie 18
1.5.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) 20

1.6 Zielsetzung 24

2. MATERIAL UND METHODEN 25

2.1 Materialien 25
2.1.1 Plasmide 25
2.1.2 E. coli-Stämme 25
2.1.3 Virusisolate und Gensequenzen 25
2.1.4 Enzyme und Kits 26
2.1.5 Medien 26
2.1.6 DNA-Oligonukleotide 27
2.1.7 Chemikalien 27
2.1.8 Puffer 28
2.1.9 Oligonukleotide als Substrate für biochemische Assays 29
2.1.10 Radioisotope 30
2.1.11 Materialien für die Kristallisierung 30
2.1.12 Materialien für die Proteinreinigung 30
2.1.13 Software 31
2.1.14 Geräte 31

2.2 Methoden **32**
2.2.1 Bioinformatische Methoden 32
2.2.2 Genamplifikation, Klonierung und Mutagenese der Expressionsfragmente 32
2.2.3 Proteinexpression in E. coli BL21 33
2.2.4 Zelllyse 33
2.2.5 Chromatographische Methoden 34
2.2.6 SDS-PAGE 36
2.2.7 Löslichkeitsuntersuchung 36
2.2.8 Limitierte Proteolyse 37
2.2.9 Thermal-Shift-Assay (Thermofluor-Assay) 37
2.2.10 Isotherme Titrationskalorimetrie 38
2.2.11 Gelbasierte Endonuklease-Aktivitätsassays 39
2.2.12 FRET-basierte Endonuklease-Aktivitätsassays 41
2.2.13 Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) 42
2.2.14 Kristallisation von Proteinen 43

3. ERGEBNISSE **44**

3.1 Identifizierung der löslichen CCHFV-Endonuklease **44**
3.1.1 Vorhersage von Sekundärstrukturelementen im N-Terminus des L-Proteins 44
3.1.2 Konstruktion und Löslichkeitsscreen N-terminaler Trunkierungsfragmente 46
3.1.3 Identifizierung, Klonierung und Expression einzelner Endonukleasefragmente 46
3.1.4 Optimierung der CCHFV-Endonuklease nach N- und C-terminaler Trunkierung 49

3.2 Optimierung der Expression und Reinigung der CCHFV-Endonuklease **50**

3.3 Untersuchungen zur Domänenstruktur der CCHFV-Endonuklease **54**
3.3.1 Limitierte Proteolyse 54
3.3.2 Massenspektrometrische Sequenzierung der erhaltenen Fragmente 55
3.3.3 Nachweis der Interaktion des N- und C-terminalen Proteolysefragments 57
3.3.4 Nachweis des strukturell intakten, aktiven Zentrums 59

3.4 SAXS-Strukturen des CCHFV-Endonuklease **60**
3.4.1 Auswertung und Vergleich der Streudaten 61
3.4.2 Ab-initio Strukturmodellierung 62

3.5 Endonukleasen verwandter Nairoviren **64**
3.5.1 Identifizierung der Endonukleasen ausgewählter nairoviraler L-Proteine 64
3.5.2 Löslichkeit und Thermostabilität ausgewählter Endonukleasen 65
3.5.3 Reinigungsoptimierung der EREV-, HAZV- und NSDV-Endonuklease 67
3.5.4 SAXS-Strukturen der EREV- und NSDV-Endonukleasen 70

3.6 Kristallisationsversuche **72**

3.7 Biochemische Charakterisierung der RVFV *Cap-Snatching*-Endonuklease **73**
3.7.1 Expression und Reinigung der RVFV-Endonuklease 73
3.7.2 Endonuklease-Aktivität und Substratspezifität der RVFV-Endonuklease 74
3.7.3 Identifizierung eines Histidin-Restes im aktiven Zentrum 75
3.7.4 Untersuchung des Einflusses experimenteller Inhibitoren 77

3.8 Untersuchungen zur Ribonuklease-Aktivität bunyaviraler Endonukleasen **79**
3.8.1 Vergleichende Untersuchung der Aktivität der RVFV-Endonuklease 79
3.8.2 Vergleichende Untersuchung der Aktivität nairoviraler Endonukleasen 80

3.9 Charakterisierung des aktiven Zentrums der CCHFV-Endonuklease **84**
3.9.1 Identifizierung potenziell Metallion-koordinierender Aminosäurereste 84
3.9.2 Alanin-Mutagenese ausgewählter Aminosäurereste 85
3.9.3 Vergleichende Untersuchung der Bindung experimenteller Inhibitoren 87

3.10 Topologie-Modell der CCHFV-Endonuklease **89**

4. DISKUSSION **91**

4.1 Die RVFV-Endonuklease sitzt im verlängerten N-Terminus des L-Proteins und zeigt Aktivität *in-vitro* **92**

4.2 Die RVFV-Endonuklease ist eine His(+)-Endonuklease **93**

4.3 Die CCHFV-Endonuklease sitzt im verlängerten N-Terminus des L-Proteins und bindet Manganionen **94**

4.4 Die CCHFV-Endonuklease ist eine His(-)-Endonuklease **95**

4.5 Die proteasezugängliche Insertion 1 ragt aus dem aktiven Zentrum der CCHFV-Endonuklease heraus **97**

4.6 Die längenvariable Insertion 2 liegt außerhalb des aktiven Zentrums **100**

4.7 Die CCHFV-Endonuklease ist zu verwandten Bunyaviren strukturhomolog und um die Insertionen 1 und 2 vergrößert **102**

4.8 Das aktive Zentrum der Endonukleasen kann durch Inhibitoren blockiert werden **104**

4.9 Ausblick: Die Endonukleasen eignen sich als therapeutisches Target **105**

LITERATURVERZEICHNIS **107**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS **117**

ANHANG **119**

LEBENSLAUF **130**

VERÖFFENTLICHUNGEN **131**

VERSICHERUNG AN EIDES STATT **132**

DANKSAGUNG **133**

ZUSAMMENFASSUNG

Bunyaviren stellen im Hinblick auf Artenreichtum und Wirtspektrum die vielfältigste Ordnung der RNA-Viren dar. Trotz eines einfachen, molekularen Aufbaus mit nur wenigen Proteinen sind sie in der Lage, in vielen Wirtsorganismen hocheffizient zu replizieren.

Ein Schlüsselprotein der viralen Replikation und Transkription ist das L-Protein, das zur Einleitung der Translation die eukaryotischen Erkennungssequenzen (5'-*Cap*-Strukturen) der zellulären mRNA auf die virale RNA überträgt. Dieser Prozess heißt *Cap-Snatching* und wird durch eine RNA-spezifische Endonuklease ermöglicht.

In der Literatur sind bereits drei bunyavirale Endonukleasen beschrieben, die trotz geringer Sequenzkonservierung strukturelle und funktionelle Homologie zeigen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bisher unbekannten Endonukleasen zweier bunyaviraler Endonukleasen zu charakterisieren.

Die CCHFV-Endonuklease wurde im verlängerten N-Terminus des L-Proteins identifiziert und als lösliches Protein rekombinant in hoher Reinheit hergestellt. Die Struktur der Endonuklease ist zu den verwandten Endonukleasen homolog und um zwei Insertionen vergrößert. Vergleichende biochemische Untersuchungen zur biochemischen Aktivität sowie zur Koordination von Manganionen im aktiven Zentrum legen nahe, dass die Endonuklease in näherer Verwandtschaft zu arenaviralen als zu anderen bunyaviralen Endonukleasen steht.

Die RVFV-Endonuklease wurde am N-Terminus des L-Proteins identifiziert und rekombinant hergestellt. Das aktive Zentrum bindet Manganionen und schneidet einzelsträngige RNA. Dies lässt auf funktionelle Homologie schließen. Strukturelle Informationen konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit mit diesem Protein nicht gewonnen werden.

Die Ergebnisse zeigen biochemische Daten für bisher uncharakterisierte *Cap-Snatching*-Endonukleasen und belegen, dass sie trotz fehlender Sequenzkonservierung strukturell und funktionell weitgehend homolog sind. Die identifizierten Proteine sind vielversprechende Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung. Die vorliegende Arbeit leistet damit einen entscheidenden Beitrag für Fortschritte in der Behandlung bunyaviraler Infektionskrankheiten.

ABSTRACT

The order *Bunyavirales* possesses the largest diversity of species and hosts among all RNA viruses and represents a major health concern not only for low income countries. Despite a rather simple molecular architecture with only a few proteins the different viruses replicate highly efficient in various host species. The L protein is the key player of viral replication and besides genome replication performs the specific and highly efficient cap-snatching mechanism to prime the translation of the viral genome which requires an endonuclease activity. This mechanism has most intensively been studied for the related influenza virus.

So far there is evidence for cap-snatching endonucleases in the N-terminus of three bunyaviral L proteins which despite low sequence conservation show structural and functional homology to the influenza endonuclease.

The CCHFV endonuclease has been recombinantly expressed and recovered in high purity. The protein shows structural homology in comparision to related nairoviruses but is larger in size compared to related bunyaviral families which can be attributed to two insertions in the sequence. The lack of *in-vitro* activity and a different coordination of manganese ions in the active site reveal closer relation to the endonuclease of the *Arenaviridae* family.

The RVFV endonuclease has been identified in a recombinantly expressed N-terminal fragment of the L protein. The active site binds manganese ions and cleaves ssRNA *in-vitro* which is consistent with recently published data on related bunyaviral endonucleases and proves functional homology. Detailed structural data were not obtained due to poor protein quality.

This thesis presents fundamental new insights in the cap-snatching endonucleases of two uncharacterized bunyaviral endonucleases which further underlines the structural and functional homology of the endonucleases and validates the conservation of the cap-snatching mechanism. The identified proteins are a valuable tool for high-throughput screening applications and thus the presented work provides an important progress in the future development of drugs to combat bunyaviral infectious diseases.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Å	Ångström
bp	Basenpaare
CCHFV	Krim-Kongo-Virus
CD	Zirkulardichroismus
DPBA	2,4-Dioxo-4-phenylbutansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EREV	Erve-Virus
et al.	und andere (lat. *et alii).*
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
HAZV	Hazara-Virus
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
IVT	*in-vitro*-Transkript
kDa	Kilodalton
LASV	Lassa-Virus
LACV	La Crosse-Virus
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
MBP	Maltosebindungsprotein
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotetraessigsäure
NP	Nukleoprotein
NSDV	Nairobi-Sheep-Disease-Virus
NSV	Negativstrang-RNA-Virus
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol

PCR	Polymerasekettenreaktion
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RVFV	Rifttalfieber-Virus
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
TOFV	Tofla-Virus
UTR	untranslatierte Region
U/µL	Einheit der Enzymaktivität (Unit pro µL)
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1 Bunyaviren als Humanpathogene

1.1.1 Systematische Einordnung der Bunyaviren

Die Ordnung *Bunyavirales* gehört zu den einzelsträngigen Negativstrang-RNA-Viren mit einem segmentierten Genom und stellt die artenreichste und im Hinblick auf übertragene Erkrankungen vielfältigste Ordnung der RNA-Viren dar [1]. Zu dieser Ordnung gehören über 350 Vertreter aus neun Familien, die sich in ihrem Wirtsspektrum und Übertragungswegen deutlich unterscheiden. Der erste Vertreter der Bunyaviren wurde 1943 in Uganda bei Untersuchungen zum damals bereits bekannten Gelbfieber aus Stechmücken der Gattung *Aedes* isoliert [2]. Nach dem Ort der Entdeckung wurde das Virus als Bunyamwera-Virus bezeichnet und war damit Namensgeber für eine gesamte Familie. In der Folge wurden eine Vielzahl von Viren, die sich serologisch ähnlich verhalten, isoliert und als Bunyaviren klassifiziert [3]. Die seitdem bestehende Klassifizierung der Bunyaviren als Familie und die Unterteilung in fünf Genera wurde im Jahr 2017 durch das International Commitee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) aufgrund neuer Erkenntnisse zu gemeinsamen evolutionären Vorfahren insektenbefallender Bunyaviren geändert [4,5]. Seither stehen die Bunyaviren als eigene Ordnung da und werden in insgesamt neun Familien unterteilt. Neben der Ordnung *Bunyavirales* gehören zu den Negativstrang-RNA-Viren die Ordnung *Mononegavirales* sowie eine nicht weiter spezifizierte Ordnung, unter der u. a. die Familien *Arenaviridae* und *Orthomyxoviridae* zusammengefasst werden. Die Familien *Arenaviridae* und *Orthomyxoviridae* tragen ebenfalls ein segmentiertes Genom und sind mit den Familien der Ordnung *Bunyavirales* in Bezug auf die molekularen Mechanismen der Virusreplikation verwandt. Im späteren Verlauf der Arbeit werden Erkenntnisse aus der Replikation von Arena- und Orthomyxoviren für vergleichende Diskussion herangezogen.

1.1.2 Klinische Einordnung und Epidemiologie bunyaviraler Erkrankungen

Zu den verschiedenen Familien der Ordnung *Bunyavirales* gehören viele hochpathogene Arten, die verschiedene Wirtsspektren haben und unterschiedlichste Erkrankungen und Symptome auslösen können. So gehören beispielsweise zur Familie *Tospoviridae* Arten, die ausschließlich Pflanzen befallen, was aus einem ökonomischen Aspekt heraus für die Landwirtschaft eines Landes von großer Bedeutung sein kann [6]. Unter den Familien *Hantaviridae, Phenuiviridae* und *Nairoviridae* gibt es jedoch viele humanpathogene und tierpathogene Arten, die eine entscheidende gesundheitliche Bedrohung für Individuen oder eine gesamte Gesellschaft darstellen [7]. Dazu zählen das Rifttalfieber-Virus (RVFV), das SFTS-Virus (*Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus)* und das Krim-Kongo-Virus (CCHFV). Die durch solche Arten ausgelösten Infektionen präsentieren sich klinisch mit unterschiedlich starken Verläufen, können jedoch im Fall von CCHFV die Symptome eines virales hämorrhagischen Fiebers mit Multiorganversagen und Sterblichkeitsraten von bis zu 30% auslösen [8]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Mensch ist bei vielen dieser Viren durch den Kontakt mit infizierten Körperflüssigkeiten möglich und spielt gerade für medizinisches Personal eine große Rolle. Da die meisten Bunyaviren durch Arthropoden wie Stechmücken oder Zecken übertragen werden, ist ein häufiger Übertragungsweg neben der direkten Übertragung auf den Menschen die Übertragung der Erkrankungen durch Kontakt mit Haus- oder Nutztieren. Auch hier kann bereits der Kontakt mit Körperflüssigkeiten oder Exkrementen der Tiere für eine Infektion ausreichend sein.

Die beschriebenen Möglichkeiten der Übertragung deuten auf eine hohe Infektiösität der Bunyaviren hin. Nicht zu unterschätzen ist vor diesem Hintergrund auch die Gefahr des Missbrauchs dieser Viren für bioterroristische Zwecke.

Die drei bunyaviralen Vertreter RVFV, SFTSV und CCHFV wurden 2016 auf die Blueprint-Liste der WHO zur Priorisierung der Erforschung dieser Erkrankungen aufgenommen [9].

1.1.3 Das Rifttalfieber

Das Rifttalfieber ist die virale Erkrankung, die durch das Rifttalfieber-Virus (RVFV) ausgelöst wird und wurde erstmals 1931 in Kenia isoliert und beschrieben [10]. Das Virus gehört zusammen mit dem SFTSV (*Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus*) in die Familie *Phenuiviridae* und kommt hauptsächlich auf dem afrikanischen Kontinent südlich der Sahara vor, wo es große Bestände an Nutztieren wie Schafen und Ziegen befallen kann. Einzelne Ausbrüche wurden aber auch schon auf der arabischen Halbinsel dokumentiert [11]. SFTS als weiterer Vertreter der Familie *Phenuiviridae* wurde erst kürzlich in China isoliert [12], scheint jedoch durch hohe Fallzahlen und eine Sterblichkeitsrate von ca. 10% ein ernstzunehmendes, neuauftretendes Virus aus der Familie *Phenuiviridae* zu sein [13].

RVFV kann durch Stechmücken auf Haus- oder Nutztiere übertragen werden und findet dadurch seinen Übertragungsweg auf den Menschen [14]. Die Infektion von Menschen durch Mückenstiche ist selten. Der Fall einer Übertragung von Mensch zu Mensch wurde noch nicht beschrieben. Die Infektion erfolgt durch Nutztierkontakt während der Schlachtung, aber auch bei tiermedizinischen Maßnahmen, beispielsweise der Geburtenhilfe [15]. Das Vorkommen von Ausbrüchen korreliert deutlich mit der Stechmückenpopulation, die ihrerseits von saisonalen Schwankungen der Regenfälle und Überflutungen abhängt [16].

Beim Menschen führt die Infektion in der Regel zu einem milden, grippeähnlichen Verlauf. In 8 – 10% der Fälle kommt es zu schwereren Verläufen mit Störungen des Sehvermögens, Hirnhautentzündung oder in weniger als 1% zu hämorrhagischem Fieber, das in der Regel innerhalb von 3 – 6 Tagen zum Tod führt. Wesentlich häufiger sind Landwirte von ökonomischen Schäden der Infektion ihrer Nutztierbestände betroffen. Die Infektion führt bei 100% der trächtigen Tiere zum Abort [17]. Für das Rifttalfieber-Virus gibt es weder ein Impfung noch einen spezifischen antiviralen Wirkstoff.

1.1.4 Das Krim-Kongofieber

Das Krim-Kongofieber ist die virale Erkrankung, die durch Infektion mit dem Krim-Kongo-Virus (CCHFV) ausgelöst wird und wurde erstmals 1944 bei einem Ausbruch auf der Krim beschrieben [18]. Die Symptome Kopf-, Glieder- und Gelenkschmerz, starke Übelkeit und Erbrechen treten schnell ein. Im weiteren Verlauf kann es zu den Symptomen eines hämorrhagischen Fiebers mit unkontrollierbaren Blutungen kommen [19]. Unter allen Bunyaviren ist die Infektion mit CCHFV mit der höchsten Sterblichkeit assoziiert, die bei hospitalisierten Patienten mit bis zu 30% dokumentiert wurde [18]. Das Virus kann durch Kontakt mit den Körperflüssigkeiten eines infizierten Menschen oder Tieres, sowie durch Zeckenbisse der Gattung *Hyalomma* direkt auf den Menschen übertragen werden [20]. Das Ausbreitungsgebiet ist nicht wie RVFV nur auf Afrika beschränkt, sondern erstreckt sich über die arabische Halbinsel bis in den westlichen Bereich von China [21]. Auf dem europäischen Festland sind Fälle auf dem Balkan, in der Türkei und der Ukraine sowie 2015 sogar ein Fall in Spanien beschrieben [22–25].

1.2 Molekularer Aufbau der Bunyaviren

Bunyaviren sind verhältnismäßig einfach aufgebaut und besitzen nur vier bis sechs Proteine. Dennoch sind sie in der Lage, das menschliche Immunsystem zu unterwandern, in Wirtszellen einzudringen und sich mit häufig für den Wirt letalen Folgen hocheffizient zu vermehren. Im Folgenden werden kurz der Aufbau der Viruspartikel und die Funktion im Rahmen des Replikationszyklus beschrieben.

1.2.1 Aufbau des Virions und Bedeutung der Virusproteine

Bunyaviren sind lipidbehüllte Viren meist sphärischer Gestalt mit einem Durchmesser von 80 – 120 nm [26]. Sie tragen an ihrer Oberfläche eine Ansammlung von Heterodimeren zweier verschiedener Glykoproteine G1 und G2, die für die Integrität des Viruspartikels und die Adhäsion an Oberflächenrezeptoren auf den Wirtszellen benötigt werden [27,28]. Die Glykoproteine werden als Vorläufer-Polyprotein translatiert und kotranslational gespalten. Für die Glykoprotein-Heterodimere sind unterschiedliche Anordnungen auf der Oberfläche beschrieben,

beispielsweise pleomorph beim Bunyamwera-Virus (BUNV) [29] oder icosahedral bei RVFV [30].

Die Viren gehören zusammen mit der Familie *Arenaviridae* und *Orthomyxoviridae* zu den Negativstrang-RNA-Viren mit einzelsträngigen, segmentierten Genomen. Bei Bunyaviren befinden sich innerhalb des Virions drei Genomsegmente. Die Aufteilung des Genoms in drei Segmente ist ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber Arenaviren, hier ist das Genom nur bisegmentiert.

Die Segmente heißen entsprechend ihrer Größe L-, M- und S-Segment und tragen einen codierenden Bereich (ORF) für die viralen Proteine [1]. Das L-Segment codiert für das L-Protein, welches die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA dependent RNA polymerase, RdRP) enthält, das M-Segment codiert für die viralen Glykoproteine und das S-Segment für das Nukleoprotein (NP). An den jeweiligen 5' und 3'-Enden der Gensegmente befinden sich untranslatierte Bereiche (UTR), von denen mindestens acht Nukleotide einander komplementär und innerhalb der bunyaviralen Familien für alle drei Segmente konserviert sind [31]. Strukturelle und funktionelle Daten vom La Crosse-Virus (LACV, *Peribunyaviridae*) zeigen, dass sich in diesem Bereich der Promotor für die virale Replikation befindet [32].

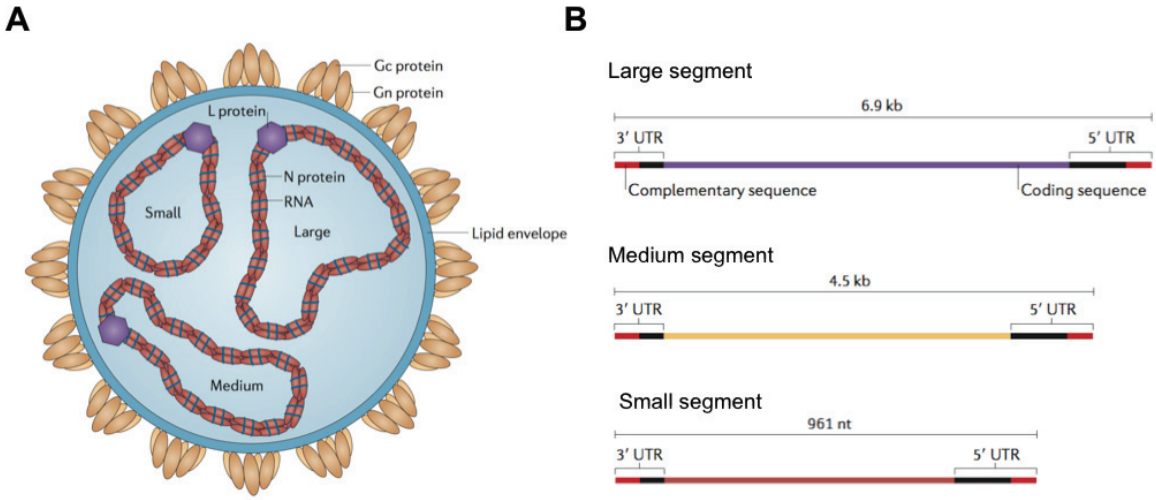


Abbildung 1: Schematische Darstellung des bunyaviralen Virions (A) und der Gensegmente (B) anhand der Familie *Peribunyaviridae*

(modifiziert nach Elliot *et al.* [1])

Die RNA liegt im Virion nicht frei vor, sondern ist in Ribonukleotid-Partikeln (RNPs) organisiert. Der RNA-Strang ist von einer Vielzahl an Nukleoprotein-Molekülen ummantelt, während ein Molekül des L-Proteins die komplementären Enden bindet und dem RNP damit eine pseudozirkulare Struktur gibt.

Das NP ist das im Virus am häufigsten vorkommende Protein und erfüllt eine Vielzahl an Funktionen im Replikationszyklus der Viren. In erster Linie schützt es die virale RNA vor Abbau und versteckt sie vor den antiviralen Erkennungsmechanismen der Wirtszelle. Es besitzt durch flexible N- und C-Termini hohe strukturelle Flexibilität und ist in der Lage, im Rahmen der RNA-Bindung und Virusreifung neben der Oligomerisierung mit sich selbst auch mit anderen Proteinen, beispielsweise den Glykoproteinen, zu interagieren [33]. Für das NP von CCHFV und RVFV als Vertreter verschiedener bunyaviraler Familien sind Kristallstrukturen bekannt [34–36].
Das L-Protein ist das Schlüsselprotein der viralen Replikation und beherbergt neben der RdRP-Domäne weitere enzymatische Aktivitäten, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden.
Einige Bunyaviren verfügen zusätzlich über sogenannte Nichtstrukturproteine, die je nach Segment als NSm oder NSs bezeichnet werden und unterschiedlich codiert sein können. Bei Phenuiviren und Nairoviren wird das NSm-Protein auf dem M-Segment in negativer Polarität codiert. Zusätzlich gibt es bei beiden ein NSs-Protein, das auf dem S-Segment in positiver Polarität codiert [37]. Die Codierung zweier Gene mit unterschiedlicher Polarität auf dem gleichen Gensegment bezeichnet man als Ambisense-Codierung. Bei Orthobunyaviren gibt es auch ein NSs-Protein, dessen Gen jedoch in negativer Orientierung auf dem S-Segment liegt. Je nach Virus sind unterschiedliche Funktionen in der Regulation der Immunabwehr des Wirts für das NSs-Protein beschrieben [37–39]. Das NSm-Protein ist ein integrales Membranprotein mit unterschiedlichen Funktionen. Für RVFV scheint es eine Rolle bei der Apoptose zu spielen [40], für Bunyamwera wurde Beteiligung an der Virusreifung nachgewiesen [41].

1.2.2 Replikationszyklus von Bunyaviren

Der Replikationszyklus von Bunyaviren ähnelt dem der Arenaviren und kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Die Replikation findet anders als bei der Familie *Orthomyxoviridae* im Zytoplasma statt.
Das Virus gelangt nach Adhäsion an die Wirtszelle durch ein oder zwei Glykoproteinmoleküle über rezeptor-vermittelte Endozytose ins Zellinnere. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Endozytose sind bei den Bunyaviren nicht einheitlich. Für einige Viren, z. B. CCHFV, findet die Endozytose Clathrin-vermittelt

statt [42] während für andere Viren, z. B. RVFV ein Caveolae-vermittelter Mechanismus gezeigt wurde [43]. Nach der Endozytose erfolgt das Uncoating der Viruspartikel nach zunehmender Acidifizierung der Endosomen. Der sich verringernde pH-Wert im Endosom bewirkt eine konformative Umlagerung der Glykoproteine und ermöglicht so ein Verschmelzen der viralen Lipidmembran mit der endosomalen Membran. Die Ribonukleotid-Partikel werden daraufhin ins Zytoplasma freigegeben.

Im Zytoplasma finden zunächst zwei Prozesse statt: Transkription und Replikation des viralen Genoms. Da die viralen Ribonukleotid-Partikel bereits die replikationsfähige Einheit bilden, werden zunächst durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität des L-Protein und mithilfe eines viruseigenen *Cap-Snatching*-Mechanismus positiv polare mRNA-Transkripte der negativ polaren viralen RNA (vRNA) generiert. Der Mechanismus wird in Abschnitt 1.3 näher beschrieben. Diese Transkripte der viralen RNA können direkt am Ribosom der Wirtszelle in virale Proteine translatiert werden. Für das Bunyamwera-Virus (BUNV) als Prototyp der Bunyaviren konnte durch Barr *et al.* 2007 eine direkte Kopplung zwischen viraler Transkription und ribosomaler Translation gezeigt werden [44], was darauf hindeutet, wie effektiv die Viren die Translationsmaschinerie der Wirtszellen unterlaufen.

Gleichzeitig generiert das L-Protein Replikate der viralen RNA (cRNA), die ihrerseits als Matrize für die Synthese neuer viraler RNA (vRNA) dienen. Zusammen mit neu translatierten L- und Nukleoproteinen entstehen neue Ribonukleotid-Partikel, die zum nächsten Schritt, der Virusknospung (*Budding*), transportiert werden. Im Gegensatz zu vielen anderen behüllten Viren erfolgt die Virusknospung bei Bunyaviren nicht an der Plasmamembran, sondern überwiegend intrazellulär am Golgi-Apparat. Dabei kommt es zur Zusammenlagerung von mit viralen Glykoproteinen besetzter Golgi-Membran und den Ribonukleotid-Partikeln zu vollständigen Viruspartikeln. Die mit Viruspartikeln gefüllten Golgi-Vesikel werden durch einen exozytotischen Signalweg an die Plasmamembran transportiert und anschließend durch Verschmelzung der Golgi-Membran mit der äußeren Plasmamembran in den Extrazellulärraum freigegeben [45].

1.2.4 Das bunyavirale L-Protein als Schlüsselprotein der Virusreplikation

Die L-Proteine einzelner Vertreter haben eine Länge von 2200 Aminosäuren für die Familie *Peribunyaviriade* bis knapp 4000 Aminosäuren für die Familie *Nairoviridae* [46]. Die Konservierung der Aminosäuresequenz aller L-Proteine ist so gering, dass Sequenzvergleiche kein verlässliches Werkzeug zur Vorhersage funktioneller Bereiche sind. Einzige Ausnahme ist eine zentrale Domäne, die das Motiv einer RdRP beherbergt. Dieses Motiv ist unter allen L-Proteinen konserviert und dessen Position kann durch Sequenzvergleiche vorhergesagt werden [47]. Anhand der Konservierung der RdRP-Domäne können die Viren in die verschiedenen Familien eingeordnet werden. Interessanterweise zeigt die RdRP-Domäne der bunyaviralen Familie *Nairoviridae* eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zur Familie der *Arenaviridae* als zu anderen Bunyaviren [48].

Zusätzlich kann anhand von Sequenzvergleichen im N-Terminus das katalytische Motiv einer Endonuklease vorhergesagt werden, deren Existenz 2010 für das La Crosse-Virus (LACV) mit der Publikation der Kristallstruktur durch Reguera *et al.* erstmals biochemisch bestätigt wurde [49]. Basierend auf dieser Struktur kann die Endonuklease der Viren anderer Vertreter aufgrund zu geringer Sequenzkonservierung jedoch nicht modelliert werden, was die Notwendigkeit der umfassenden strukturellen Aufklärung der Endonuklease-Domänen von Vertretern möglichst vieler Familien unterstreicht.

Das L-Protein der *Nairoviridae* ist mit einer Länge von knapp 4000 Aminosäuren deutlich größer und beherbergt im N-Terminus eine für Bunyaviren einzigartige OTU-Domäne, die mit der Unterdrückung des Immunsystems des Wirts assoziiert ist [50]. Die Grenzen der Endonuklease-Domäne können nicht durch Sequenzvergleiche identifiziert werden, die Position wird jedoch anhand des transkriptionsrelevanten Aspartat-Restes D693 postuliert [51].

Erste detailliertere Einblicke in die atomare Struktur des L-Proteins wurden 2015 mit der Publikation der Kristallstruktur des LACV L-Proteins durch Gerlach *et al.* möglich [32]. Hierbei präsentiert sich im Zentrum des Proteins im durch Sequenzvergleiche vorhergesagten Bereich die RdRP-Domäne, die von den restlichen Domänen des L-Proteins umgeben ist. In der Struktur wird deutlich, dass die zuvor bereits publizierte Endonuklease eine separate Domäne darstellt, die aus dem L-Protein fortsatzartig

herausragt (vgl. Abbildung 2 A). Der C-Terminus mit der postulierten *Cap*-Bindungsdomäne ist in der Struktur des Proteins nicht vorhanden.

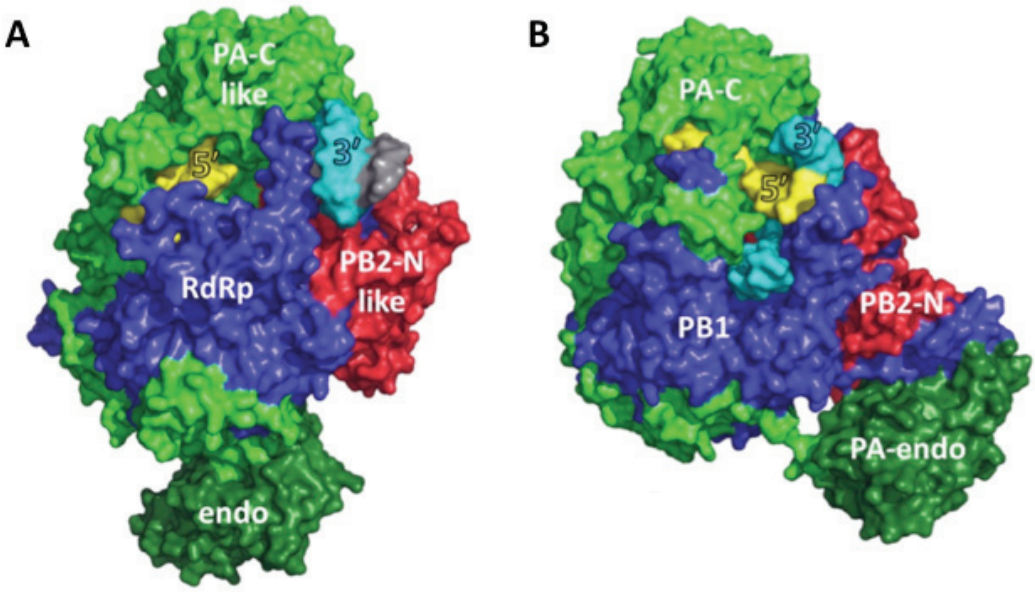


Abbildung 2: Strukturen des LACV L-Proteins und des Influenza-Polymerasekomplexes

Homologe Strukturelemente des LACV L-Proteins (**A**) und des Influenza-Polymerasekomplexes (**B**) sind in gleichen Farben dargestellt (Endonuklease – dunkelgrün; RdRP – blau; Cap-Bindungsdomäne – rot). In der Darstellung des L-Proteins fehlt der C-Terminus mit der postulierten *Cap*-Bindungsdomäne (modifiziert nach Gerlach *et al.* [32])

Die RdRP-Domäne bildet die Struktur eines für viele Polymerasen beschriebenen Rechte-Hand-Motivs mit den drei Unterdomänen Finger (*fingers*), Daumen (*thumb*) und Handballen (*palm*), was eine Verwandtschaft mit anderen viralen Polymerasen beweist [52].

Die Domänenstruktur des L-Proteins ist derjenigen des Influenza-Polymerasekomplexes weitgehend homolog, weshalb auf eine Homologie in der Funktion geschlossen werden kann [53]. Die Endonuklease-Domäne befindet sich hier in der PA-Untereinheit, die RdRP-Domäne in der PB1-Untereinheit. Ein der PB2-Untereinheit homologer C-Terminus des L-Proteins wird vermutet, konnte jedoch kristallographisch sowie funktionell bislang nicht nachgewiesen werden.

Anhand von Mutagenesestudien mittels Replikon-Assay konnten im L-Protein des nahe verwandten Lassa-Virus (LASV, *Arenaviridae*) im C-Terminus Aminosäuren identifiziert werden, die für die Transkription essentiell sind [54]. Wenig später konnte zudem die Kristallstruktur der postulierten *Cap*-Bindungsdomäne eines dem Lassa-Virus entfernt verwandten Vertreters der Reptarenaviren gelöst werden, welche strukturelle Homologie zur PB2-Domäne der Influenzaviren zeigt [55]. Diese

bildet sich jedoch nicht auf der Sequenzebene ab, was umso mehr die Bedeutung strukturbiologischer Methoden bei der Aufklärung molekularer Mechanismen der Virusreplikation zeigt. Ein direkter biochemischer Nachweis für die *Cap*-Bindung analog der PB2-*Cap*-Bindungsdomäne konnte hier jedoch auch nicht gezeigt werden.
Aufgrund der Präsenz einer Endonuklease-Domäne im N-Terminus wird trotz des fehlenden Nachweises für die *Cap*-Bindung vermutet, dass der *Cap-Snatching*-Mechanismus durch das L-Protein der Bunyaviren realisiert wird und große Ähnlichkeiten zum Influenzavirus hat.

1.2.5 Therapieansätze zur Behandlung bunyaviraler Infektionen

Für die Behandlung und Prophylaxe bunyaviraler Infektionskrankheiten gibt es derzeit keinen spezifischen Wirkstoff, sondern lediglich experimentelle Ansätze und den *off-label*-Gebrauch von Wirkstoffen, die eigentlich für eine andere Indikation zugelassen sind.
Dafür können verschiedene Ursachen diskutiert werden. Die Viren sind teilweise hochpathogen, treten aber in der Regel nur vereinzelt, zudem häufig in Regionen extremer Armut auf. Durch die hohe Pathogenität braucht es zur Erforschung dieser Viren eine spezielle Laborinfrastruktur, die an vielen Forschungseinrichtungen nicht zur Verfügung steht. Aus diesem Grund werden vielfach Reverse-Genetik-Systeme etabliert, die den Prozess der Replikation im Zellmodell abbilden aber nicht zur Bildung replikationsfähiger Viren führen. Mithilfe solcher Systeme können die molekularen Mechanismen der Replikation und Transkription auch außerhalb eines Hochsicherheitslabors erforscht werden [56].
Im Gegensatz zu Erkrankungen, die für Industrieländer relevant sind, sind bunyavirale Infektionskrankheiten in vielen Fällen Armutserkrankungen, für die die Forschung nicht im gleichen Ausmaß vorangeschritten ist. Umso wichtiger erscheint es, Forschung in die Richtung eines antiviralen Wirkstoffs mit möglichst breitem Wirkspektrum voranzutreiben, mit dem möglichst viele bunyavirale Erkrankungen gleichzeitig behandelt werden können.
Das Nukleosidanalogon Ribavirin wird *off-label* bei CCHFV-Infektionen eingesetzt, jedoch mit nur geringem Erfolg [57]. Im Maus-Tiermodell konnte für RVFV, CCHFV, SFTSV und einige Hantaviren eine Verlängerung der Überlebenszeit unter Behandlung mit Ribavirin nachgewiesen werden [58–60]. Für SFTS konnte dies

jedoch im Hamster-Tiermodell nicht bestätigt werden [61]. Hinweise auf eine Wirksamkeit am Menschen konnte Rusnak *et al.* bei der Behandlung von Hantaan-Virus-Infektionen liefern [62]. Hier konnten bei rechtzeitiger Gabe von Ribavirin die renalen und hämorrhagischen Symptome der Infektion reduziert werden. Dennoch bestehen, nicht zuletzt auch wegen der vorhandenen Toxizität bei therapeutischen Dosen, Bedenken gegen die Nutzung von Ribavirin beim Menschen.

Ein zweites Nukleosidanalogon, das bereits zur Anwendung am Menschen, jedoch mit anderer Indikation zugelassen ist, ist Favipiravir. Der Wirkstoff wird in Japan zur Behandlung der Influenza eingesetzt, jedoch verdichten sich die Hinweise für eine Wirksamkeit bei bunya- und arenaviralen Infektionen. In mit CCHFV- und RVFV-infizierten Mäusen konnte unter Behandlung mit Favipiravir eine deutliche Abnahme der Viruslast sowie Reduktion der Krankheitssymptome gezeigt werden [58].

Mit dem experimentellen Nukleosidanalogon BCX4430 konnten ebenfalls vielversprechende Experimente mit RVFV-Infektionen im Mausmodell dokumentiert werden [63].

Das Target dieder Nukleosidanaloga ist die RdRP-Domäne des L-Proteins. Diese Substanzen wirken daher als direkte Antiviralia. Zwei weitere Strategien, die bei der Entwicklung von Therapien genutzt werden, sind die gezielte Blockade von Wirtszellproteinen, die die Virusvermehrung ermöglichen, oder eine Modulierung der Immunabwehr des Wirtsorganismus. So ist die Gabe von β-Interferon als Immunmodulator in der Behandlung von Hepatitis C beim Menschen langjährige klinische Praxis. Damit ist jedoch keine Erradikation des Virus möglich. Für bunyavirale Infektionen gibt es keine Hinweise auf ausreichende Wirksamkeit.

Die gezeigten experimentellen Ansätze stellen im Ernstfall des Ausbruchs eines hämorrhagischen Fiebers keine sichere Behandlungsmöglichkeit dar. Daher ist weitere Forschung an möglichen Targets zwingend notwendig. Ein solches Target könnte der *Cap-Snatching*-Mechanismus sein, der im folgenden Kapitel anhand des Influenza-Virus vorgestellt wird.

1.3 Der *Cap-Snatching*-Mechanismus

1.3.1 Der Cap-Snatching-Mechanismus des Influenza-Virus

Der *Cap-Snatching-Mechanismus* ist für segmentierte Negativstrang-RNA-Viren spezifisch und ist am besten für das Influenza-Virus beschrieben.

In der eukaryotischen Wirtszelle trägt die mRNA an ihrem 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Struktur, die als „*Cap*-Struktur" bezeichnet wird, sowie zusätzlich eine poly-Adenosin-Sequenz am 3'-Ende. Neben dem Schutz der mRNA vor vorzeitigem Abbau dienen diese Strukturen als Signal zur Initiation der ribosomalen Translation durch Bindung an verschiedene Wirtszellfaktoren. Erst dadurch werden die Translation und damit die Proteinbiosynthese ermöglicht. Zur Synthese eigener viraler Proteine müssen Viren diese Translationsmaschinerie unterwandern und für sich ausnutzen, was nur mithilfe der *Cap*-Struktur möglich ist. Da die segmentierten Negativstrang-RNA-Viren keine eigenen Enzyme zur Synthese der *Cap*-Struktur besitzen, „stehlen" sie diese vom 5'-Ende der Wirtszell-mRNA. Dies wurde 1981 erstmals für das Influenza-Virus nachgewiesen als durch Plotch *et al.* eukaryotische Nukleotid-sequenzen an den 5'-Enden viraler Gensegmente gefunden wurden [64]. Die strukturelle Aufklärung des Mechanismus gelang 2014 durch die Kristallstrukturen des Influenza-Polymerasekomplexes und ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt [65,66].

Die für die *Cap*-Bindung notwendige Domäne befindet sich in der PB2-Untereinheit des Komplexes (orange). Die Bindungsstelle wird u. a. durch zwei aromatische Aminosäurereste gebildet, die durch Kation-π-Interaktionen das positiv geladene 7-Methylguanosin der *Cap*-Struktur binden [67]. Die PB2-Domäne kann nach der Bindung der mRNA durch Drehung um ca. 70° den RNA-Strang zunächst so in das aktive Zentrum der Endonuklease auf der PA-Domäne (grün) platzieren, dass dieser nukleolytisch nach 10 – 15 Nukleotiden geschnitten wird. Der verkürzte RNA-Strang wird anschließend in das aktive Zentrum der RdRP (blau) eingebracht und dient als Primer für die Transkription der viralen RNA (vRNA) zu viraler mRNA [65,66,68].

Die Präsenz eukaryotischer Sequenzen in der viralen mRNA infizierter Zellen war initial der Beweis dafür, dass auch Bunyaviren und Arenaviren durch einen analogen Mechanismus ihr Genom transkribieren [69].

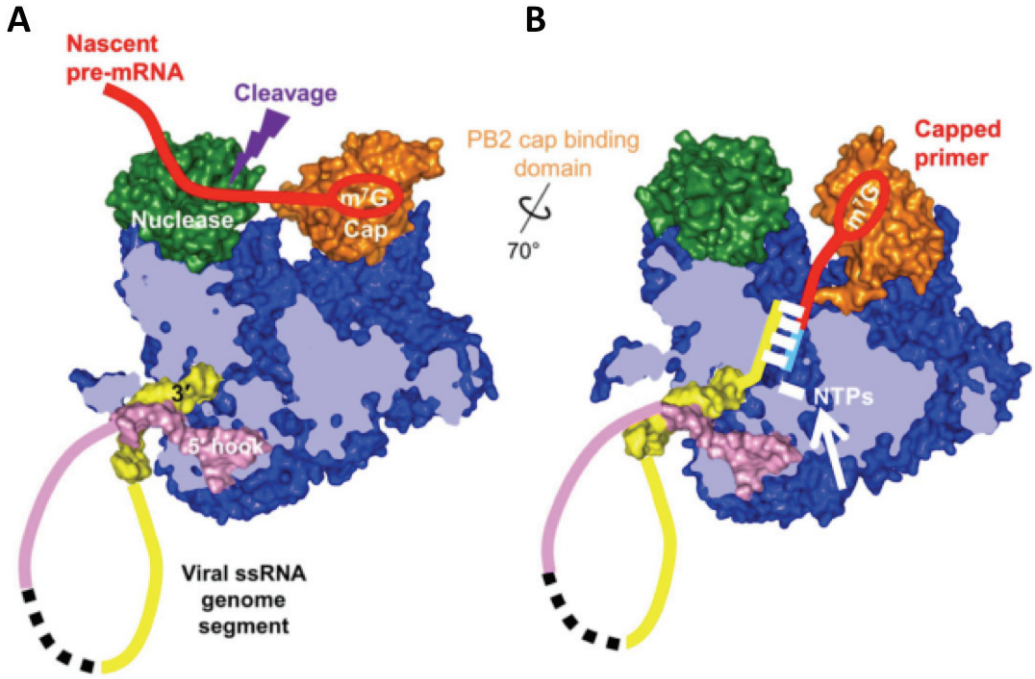


Abbildung 3: Der *Cap-Snatching*-Mechanismus bei Influenza-Viren

(A) Nach der Bindung an die *Cap*-Bindungsdomäne (orange) wird die mRNA (rot) durch die Endonuklease (grün) nach 10 – 15 Nukleotiden gespalten. **(B)** Das erhaltene Nukleotid wird durch Drehung der Domäne in das aktive Zentrum der Polymerase (blau) eingebracht und dient als Primer für die Transktiption des viralen Genoms. (modifiziert nach Reich *et al.* [66])

1.3.2 Die Endonuklease als Schlüsselenzym des Cap-Snatching-Mechanismus

Die Endonuklease lässt sich sowohl bei Arenaviren als auch bei Bunyaviren im N-Terminus des L-Proteins nachweisen, zeigt jedoch biochemische Unterschiede. Die Unterschiede werden im Folgenden vorgestellt.

Die bekannten Endonuklease-Domänen befinden sich im N-Terminus des entsprechenden L-Proteins innerhalb der ersten 170 bis 210 Aminosäuren. Die Abbildung 3 zeigt repräsentativ die Endonuklease-Domänen des La Crosse-Virus (LACV, *Peribunyaviridae*) und des Lassa-Virus (LASV, *Arenaviridae*). Die Domänen bestehen in ihrem Zentrum aus einer Anordnung von drei bis vier β-Faltblättern, die auf der einen Seite von einer 12 bis 28 Aminosäurereste langen α-Helix und auf der anderen Seite von einem Bündel mehrerer α-Helices umgeben sind. Das α-Helixbündel wird durch die N- und C-terminalen α-Helices der gesamten Domäne gebildet und enthält noch ein bis zwei weitere α-Helices.

Das aktive Zentrum wird durch ein charakteristisches, metallionenbindendes PD-E/D-K-Motiv gebildet Das Motiv ist für alle Endonukleasen der segmentierten Negativstrang-RNA-Viren konserviert. Die Anordnung der Aminosäurereste im

aktiven Zentrum ermöglicht die Bindung zweier zweiwertiger Metallionen, die für die RNase-Aktivität im Rahmen des *Cap-Snatching*-Mechanismus notwendig sind. Dabei ist der Aspartat-Rest nach dem Prolin-Rest in allen Endonukleasen auf einem Loop direkt vor dem ersten β-Faltblatt so angeordnet, dass er durch seine Carboxylgruppe mit zwei Metallionen eine koordinative Bindung eingehen kann. Dieser Aspartat-Rest wird fortwährend als katalytisches Aspartat bezeichnet und befindet sich bei LASV in Position 89 und bei LACV in Position 79. Das zweite Aspartat folgt 10 bis 13 Aminosäuren weiter C-terminal auf dem zweiten β-Faltblatt und koordiniert eine weitere Bindungsstelle am ersten Metallion. Das katalytische Lysin befindet sich auf der einzelnen Helix, die das aktive Zentrum von der einen Seite flankiert, und ist für die Substratbindung und –positionierung im aktiven Zentrum notwendig [70].

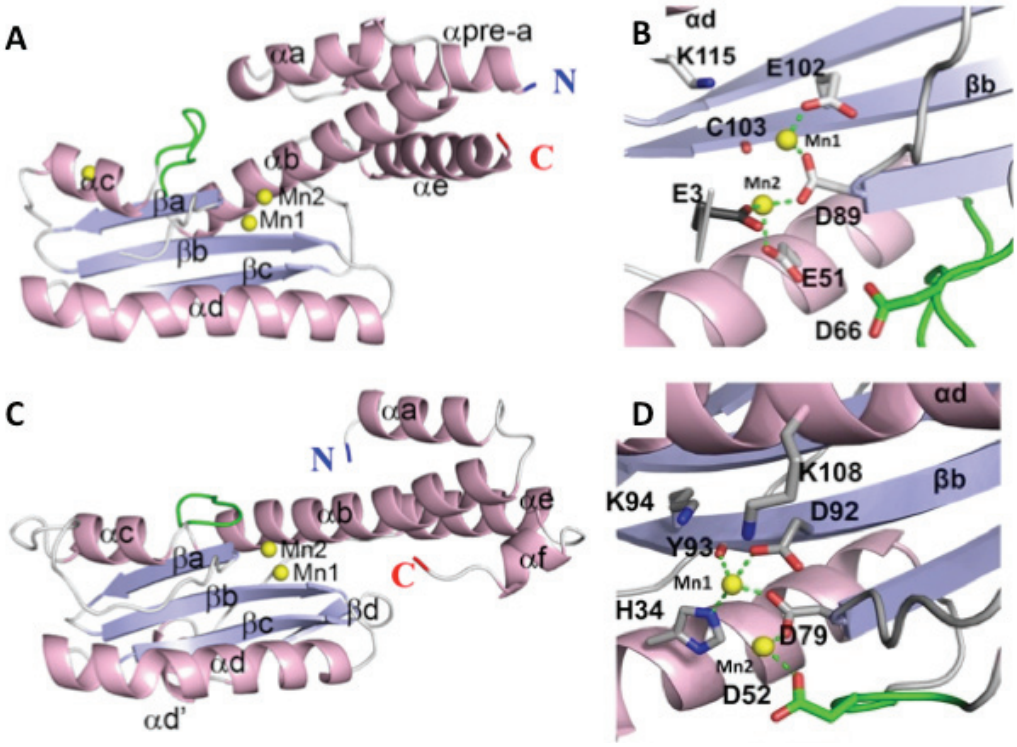


Abbildung 4: Vergleich Kristallstrukturen der LASV- und LACV-Endonukleasen

Die Abbildung zeigt die Endonukleasen des Lassa-Virus (LASV, *Arenaviridae*) (A und B) sowie des La Crosse-Virus (LACV, *Peribunyaviridae*) (C und D) mit zwei Manganionen im aktiven Zentrum. In Abbildung B und D ist jeweils vergrößert das aktive Zentrum mit den katalytischen Resten dargestellt. In grün dargestellt ist ein variabler Loop der bei LACV Teil des aktiven Zentrums ist und bei LASV nicht. (modifiziert nach Reguera *et al.* [71])

Zusätzlich zu diesen Aminosäuren befindet sich vor dem katalytischen Motiv entweder ein Histidin- oder ein Aspartat-Rest, wonach die Endonukleasen in His(+)- und His(-)-Endonukleasen unterteilt werden [71]. Der Histidin-Rest ist Teil des aktiven Zentrums und koordiniert in der atomaren Struktur der His(+)-

Endonukleasen das erste Metallion. Dies ist exemplarisch anhand des Restes His34 der La Crosse-Endonuklease in Abbildung 4D gezeigt. Demgegenüber koordiniert in der atomaren Struktur der Lassa-Endonuklease (His(-)-Endonuklease) der Aspartat-Rest in Position 51 von der äquivalenten Helix aus das zweite Metallion im aktiven Zentrum (Abbildung 4 B). Im aktiven Zentrum der His(+)-Endonukleasen wird das zweite Manganion durch einen Glutamat-Rest koordiniert, der auf einem variablen Loop vor dem katalytischen Motiv liegt (vgl. Abbildung 3 D, grüner Loop), bein der La Crosse-Endonuklease ist dies der Rest D52. Ein äquivalenter Rest befindet sich auch im variablen Loop der His(-)-Endonuklease (vgl. Abbildung 3 B, grüner Loop), bei der Lassa-Endonuklease ist dies der Rest D66. Hier konnte jedoch weder eine Koordination eines Metallions noch eine Rolle dieses Restes für die Replikation anhand eines Reveren Genetik-Systems (Replikon-Assay) nachgewiesen werden, was mit dem erhöhten Abstand vom aktiven Zentrum in der Kristallstruktur der LASV-Endonuklease korreliert [71].

Zu den His(+)-Endonukleasen zählen nach aktuellem Stand der Literatur alle Vertreter der Ordnung *Bunyavirales* sowie der Familie *Orthomyxoviridae.* Zu den His(-)-Endonukleasen zählen die Endonukleasen der Familie *Arenaviridae*.

Die Autoren Reguera *et al.* postulieren, dass die Metallionen-Koordination entscheidenden Einfluss auf die Regulation des *Cap-Snatching*-Mechanismus und damit der viralen Transkription im nativen L-Protein haben könnte [71].

1.3.3 Der Cap-Snatching-Mechanismus als therapeutisches Target bei Influenza

Der *Cap-Snatching*-Mechanismus ist hochspezifisch für segmentierte Negativstrang-RNA-Viren und könnte daher ein vielversprechender Angriffspunkt für neuartige antivirale Wirkstoffe sein. Dafür kommen Substanzen infrage, die mit der *Cap*-Bindung in der PB2-Untereinheit oder mit der Endonuklease-Domäne in der PA-Untereinheit interferieren.

Dies wurde für das Influenza-Virus anhand von experimentellen Inhibitoren der Endonuklease bereits vielfach untersucht. Die bisher bekannten Inhibitoren lassen sich in fünf Substanzklassen einteilen [72]. Ein prominenter Vertreter ist die Substanz DPBA mit einem 2,4-Diketocarbonsäure-Rest als Pharmakophor. Kristallstrukturen zeigen, dass der Inhibitor im aktiven Zentrum der Endonuklease die zwei Metallionen komplexiert [73]. Die Inhibitoren unterscheiden sich in ihren Pharmakophoren, die

Komplexierung von Metallionen ist jedoch eine Gemeinsamkeit aller Substanzklassen und wurde durch Co-Kristallisation oder molekulares Docking gezeigt [73,74].
Darüber hinaus gibt es eine Gruppe nicht-klassifizierter experimenteller Inhibitoren, die Substanz PA-30 ist ein Vertreter und zeigt potente Inhibition der Endonuklease [75].
Die Konformation der *Cap*-Bindungsdomäne der PB2-Untereinheit unterscheidet sich von eukaryotischen Proteinen [67]. Dies ermöglicht neben der Endonuklease ebenfalls die Entwicklung spezifischer Inhibitoren [76]. Die Substanz VX-787 erwies sich als potent und oral bioverfügbar, zeigte jedoch in präklinischen Studien auch Resistenzbildung, was bei den Endonuklease-Inhibitoren bislang nicht nachweisbar war [77]. Für das Influenzavirus, das ebenfalls zu den segmentierten Negativstrang-RNA-Viren gehört und über einen den Bunyaviren ähnlichen Mechanismus repliziert, gibt es bereits klinische Erfolge mit dem Endonukleaseinhibitor Baloxavir. Der Wirkstoff konnte als Prodrug (Baloxavirmarboxil, S-033188) in einer klinischen Studie Überlegenheit gegenüber Placebo und der Standardtherapie mit Oseltamivir zeigen [78] und wurde Ende Februar 2018 unter dem Handelsnamen *Xofluza*™ in Japan zur Behandlung von Influenza zugelassen [79]. Dies zeigt die herausragende Bedeutung der *Cap-Snatching*-Endonuklease in der Replikation der Viren.

1.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für strukturbiologische Studien braucht es eine große Menge an Protein, weit mehr als aus den Zellen bzw. dem entsprechenden Organismus isoliert werden kann. Durch Fortschritte in der Sequenzierungstechnik ist es heute möglich, von nahezu allen Organismen die Genome zu sequenzieren und die einem Protein zugehörigen Gensegmente zu identifizieren. Die Gensegmente werden amplifiziert und in einen geeigneten Vektor zur rekombinanten Expression mit hohen Ausbeuten in einem geeigneten Expressionswirt exprimiert. Zur erfolgreichen Expression eines Proteins sind mehrerere Faktoren zu berücksichtigen, die im Folgenden kurz erörtert werden.
Wichtig für die strukturbiologische und biochemische Forschung ist es, eine große Vielzahl an Proteinen in kurzer Zeit nach Exprimierbarkeit und Löslichkeit zu screenen. Dies erfordert ein Expressionssystem mit einfacher Transformierbarkeit der Fremd-DNA sowie schnellem Zellwachstum, hohen Ausbeuten und einfach

durchzuführendem *Scale-up*, was am ehesten für *E. coli* zutrifft. Zur Expression in *E. coli* liegen langjährige Erfahrungen vor und der Stamm wurde für verschiedene Anwendungen optimiert. Der *E. coli*-Stamm BL21 verfügt über genetische Veränderungen, die die Proteinexpression verbessern bzw. erst ermöglichen. Zum Verhindern des vorzeitigen Abbaus von Fremdproteinen fehlt die Protease *Lon* sowie die membranständige Protease OmpT, die bei der späteren Zelllyse zum Abbau führen könnte [80]. Zur Stabilisierung des Plasmids ist eine hsdSB Mutation eingeführt, die DNA-Methylierung und –Abbau verhindert.

Die Genexpression in *E. coli* BL21 basiert auf dem lac-Operon in Kombination mit dem T7-Expressionssystem. Die T7-RNA-Polymerase ist die hochaktive RNA-Polymerase des T7-Phagen und ermöglicht hohe Ausbeuten an Protein. Um diese stabil in den Zellen zu halten, wurde ein Prophage (λDE3) in das bakterielle Genom eingeführt, der unter der Kontrolle eines *lac*UV5-Promotors für die T7-Polymerase codiert. Die Expression der T7-Polymerase wird durch Zugabe des hydrolysestabilen Lactose-Analogons IPTG induziert. Die Vektoren besitzen die T7-Promotorsequenz, welche nach Erkennung durch die T7-RNA-Polymerase zur Bildung einer großen Menge Transkripten führt. Mehrere Hersteller haben ihre Vektoren für dieses System optimiert. In dieser Arbeit werden pOPIN-Plasmide [81] verwendet.

Allerdings gehen mit der Expression in *E. coli* auch Einschränkungen einher. Eine posttranslationale Modifizierung ist bei zytoplasmatischer Expression in *E. coli* BL21-Zellen nicht in gleichem Maße möglich, wie in eukaryotischen Zellen. Zur Expression von Proteinen, die für die native Faltung Disulfidbrücken benötigen, kann auf trxB-defiziente Zellen (Origami oder AD494) zurückgegriffen werden, die eine stärker oxidierende Umgebung im Zytoplasma haben. Eine weitere Möglichkeit ist die Expression im periplasmatischen Kompartiment, wofür die Proteine mit Signalsequenzen zur Translokation fusioniert werden müssen. Das Periplasma ist ein Zellkompartiment zwischen der Zytoplasmamembran und der äußeren Membran von *E. coli* und besitzt zusätzliche Enzyme, die die Bildung von Disulfidbrücken ermöglichen [82].

In *E. coli* sind Glykosylierungen nicht im gleichen Ausmaß wie in eukaryotischen Zellen möglich. Da diese aber für das L-Protein der Bunyaviren nicht relevant sind und aufgrund der entstehenden Heterogenität bei der Kristallisation ohnehin stören würden, ist dies zunächst nicht als Nachteil zu werten.

Bei der heterologen Expression ist zudem zu bedenken, dass *E. coli* nicht für alle Codons anderer Organismen die entsprechenden tRNA bilden kann, was zu verringerter, fehlender oder unlöslicher Expression der Proteine führen kann. Zu diesem Zweck kann entweder das Gen durch Codon-Optimierung modifiziert oder der Wirt auf *E. coli* Rosetta (DE3) gewechselt werden. Diese Zellen enthalten zusätzliche Codons zur Expression von Fremd-DNA mit in *E. coli* selten vorkommenden Codons.

Neben der Eignung des Expressionswirts muss auch das Protein an die jeweilige Fragestellung angepasst werden. Häufig geht es darum, die Löslichkeit schwach löslicher Protein zu verbessern oder deren Reinigung zu optimieren. Für diesen Zweck eignen sich Fusionsproteine mit Affinitäts-Tags. Neben dem häufig verwendeten Hexahistidin-Tag (His_6), der ausschließlich der Reinigung und Identifizierung des Zielproteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie dient, gibt es peptidbasierte Affinitäts-Tags und Fusionsproteine. Zu den relevantesten Fusionsproteinen zählen, Glutathion-S-Transferase (GST) [83] und Maltose-Bindeprotein [84]. Neben der Eignung zur Affinitätschromatographie fungiert besonders MBP als Enhancer für Expression, Faltung und Löslichkeit des fusionierten Proteins [85].

1.5 Methoden der Strukturbiologie

1.5.1 Röntgendiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie ist eine bewährte Methode zur atomaren Strukturauflösung von Proteinen und beruht auf der Beugung von Röntgenstrahlen an den Elektronen kristallisierter Proteine.

Die Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristallgitter wurde 1912 erstmals durch Max von Laue beschrieben. William Lawrence Bragg und sein Vater erkannten im selben Jahr den Zusammenhang, dass in Abhängigkeit vom Einfallswinkel der Röntgenstrahlung auf die Ebenen des Kristallgitters Beugungsmaxima auftreten. Das Auftreten der Beugungsmaxima entsteht durch konstruktive Interferenz und ist neben dem Einfallswinkel der Strahlung θ auch abhängig vom Abstand der Gitterebenen d und der Wellenlänge λ der Strahlung. Den mathematischen Zusammenhang bildet die Bragg-Gleichung ab:

Bragg-Gleichung:	$n\lambda = 2d \sin \theta$	n:	*natürliche Zahl (Beugungsordnung)*
		λ:	*Wellenlänge der Röntgenstrahlung*
		d:	*Abstand der Gitterebenen*
		θ:	*Einfallswinkel der Strahlung*

In der experimentellen Anordnung der Röntgenkristallographie wird ein drehbar gelagerter Kristall in den Strahlengang einer hochenergetischen Strahlungsquelle eingebracht. Hinter dem Kristall befindet sich ein Detektor, der zur Detektion entstehender Beugungsmaxima dient. Aus der Position und Intensität der Signale auf dem Detektor kann in Abhängigkeit vom Drehwinkel des Kristalls die Geometrie der kleinsten sich wiederholenden Einheit des Kristallgitters errechnet werden. Diese Einheit wird als Einheitszelle bezeichnet.

In der Proteinkristallographie macht man sich diese physikalischen Grundlagen zunutze, indem die Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen gemessen wird. Aus den Beugungsmaxima erhält man durch mathematische Berechnungen eine Elektronendichteverteilung, die als Matrize für den Einbau der Polypeptidkette des Proteins dient. Auf diesem Wege kann die dreidimensionale Struktur eines Proteinmoleküls mit einer Auflösung im atomaren Detail bestimmt werden.

Die erste auf diesem Wege bestimmte Struktur war die Struktur des Myoglobins durch Kendrew *et al.* [86]. Seither wurden die atomaren Strukturen vieler Proteine bestimmt und sind als pdb-Dateien über die RCSB-Proteindatenbank zugänglich.

Die Methode ermöglicht neben der Strukturaufklärung auch die Identifizierung der Bindung von Kofaktoren, Liganden und Substraten an entsprechende Bindungsstellen im Protein. Der experimentell aufwendigste Teil ist die Gewinnung von Proteinkristallen, da das Kristallisationsverhalten von Proteinen nicht vorhergesagt werden kann und damit von einem erfolgreichen Screening nach geeigneten Kristallisationsbedingungen abhängt. Jedoch hat die Methode auch bei erfolgreicher Kristallisation und Strukturauflösung den Nachteil, dass sie das Protein im artifiziellen Zustand eines starren Kristallgitters abbildet. Die atomare Auflösung strukturell flexibler Teile eines Proteins ist damit nicht möglich. Zudem können im Kristallgitter artifizielle Protein-Protein-Kontakte entstehen, die für die native Funktion des Protein nicht von Bedeutung sind. Die Kristallisierbarkeit eines Proteins wird dementsprechend als wahrscheinlicher angenommen, je globulärer und weniger flexibel es in seiner äußeren Gestalt ist. Ein großes Bemühen im Prozess der

Strukturauflösung eines Proteins stellt damit die Optimierung des Proteins dar, was einen erheblichen Anteil der vorliegenden Arbeit bildet.

1.5.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS)

Während bei der Röntgendiffraktometrie die Kristallisation des Proteins zwingende Voraussetzung zum Generieren von Messdaten ist, können mittels Kleinwinkelröntgenstreuung strukturelle Informationen aus der wässrigen Lösung eines geeigneten Proteins gewonnen werden. Die zu erreichende Auflösung ist mit 10 – 50 Å deutlich geringer, es können jedoch auch Informationen über flexible Teile des Moleküls gewonnen werden. Die Methode wird genutzt, um Größe, Konformation und äußere Form eines Makromoleküls anhand der Streuung von hochenergetischen Röntgenstrahlen an dessen Elektronenhülle bei kleinen Streuwinkeln zu bestimmen. Gleichzeitig kann die Methode zur Validierung von mittels Röntgenkristallographie erhaltenen atomaren Strukturen genutzt werden, da das Protein frei beweglich und nicht in einer durch die Kristallisation möglicherweise artifiziell erzeugten Konformation vorliegt.

Der Versuchaufbau besteht vereinfacht aus einer hochenergetischen Strahlungsquelle, einer Probenküvette und einem Detektor im Abstand von mehreren Metern. Gemessen wird die Intensität der Streuung bei kleinen Streuwinkeln. Die Prozessierung und Auswertung der Daten erfolgt durch mathematische Umformung der Streuintensität als Funktion des Streuwinkels.

Im Gegensatz zur Röntgendiffraktometrie sind die einzelnen Moleküle nicht in einem regelmäßigen Gitter arrangiert, sondern diffundieren frei in der Lösung. Die erhaltenen Streudaten sind daher ein Mittelwert aller Orientierungen eines Moleküls im Raum. Da auch die Wassermoleküle sowie gelöste Salze der Pufferlösung mit ihrer Elektronenhülle einen entscheidenden Beitrag zur Streuung leisten, werden die Streudaten der Pufferlösung stets separat gemessen und von den gesamten Streudaten der Probe subtrahiert.

Eine wichtige Vorraussetzung ist die Homogenität und Monodispersität der Probe, wobei die Methode auch genutzt werden kann, um eben diese Eigenschaften zu untersuchen.

Im Ergebnis der Messung erhält man die Streuintensität als Funktion des Streuvektors. Je nach mathematischer Umformung können unterschiedliche

Informationen aus der Streuintensität extrahiert werden. Für besonders kleine Streuwinkel und bei niedrigen Proteinkonzentrationen wird der Idealfall einer monodispersen Lösung mit identischen Partikeln und keinen intermolekularen Wechselwirkungen angenommen. Die Intensität der Streuung I(s) ist bei Annäherung an einen Streuwinkel von Null direkt proportional zur Elektronendichte der streuenden Partikel und folgt der Guinier-Näherung [87]:

Guinier-Näherung: $I(s) = I(0)e^{-\frac{1}{3}s^2R_g^2}$

s: *Streuvektor*
I(s): *Streuintensität*
I(0) *Streuintensität für s = 0*
R_g: *Gyrationsradius*

Solange näherungsweise gilt $sR_g \leq 1{,}3$ ergibt sich bei mathematischer Auftragung des natürlichen Logarithmus der Streuintensität I(s) gegen das Quadrat des Streuvektors s eine Gerade mit dem Anstieg a, aus der durch Extrapolation auf die Ordinatenachse die Intensität I(0) bestimmt werden kann. Da I(0) proportional zur Gesamtmenge an Elektronen ist, lässt sich aus diesem Wert mithilfe eines Standards (meist Bovines Serumalbumin) das Molekulargewicht der Probe berechnen. Aus dem Anstieg der Geraden a kann der Gyrationsradius R_g (Trägheitsradius) berechnet werden.

Gyrationsradius: $R_g = \sqrt{-3a}$

R_g *Gyrationsradius*
a: *Anstieg der Regressionsgerade*

Der Gyrationsradius R_g ist ein Maß für die äußere Form des Moleküls und entspricht nicht dem hydrodynamischen Radius des Partikels. Die Linearität der Guinier-Auftragung ist ein Qualitätsparameter. Ein nicht linearer Verlauf kann auf Aggregation des Proteins, fehlende Monodispersität oder unzureichende Subtraktion des Hintergrundwertes hindeuten.
Die Guinier-Näherung gilt unabhängig von der äußeren Form der Partikel bei kleinen Streuwinkeln, während bei höheren Streuwinkeln die Partikelform einen entscheiden Einfluss auf die Form der Streukurve nimmt. Im Bereich höherer Streuwinkel folgt die Streuintensität vieler Proteine dem Porod-Gesetz. Unter der Annahme einer homogenen Elektronendichteverteilung in allen Partikeln nimmt die Streuintensität

mit der vierten Potenz des Streuwinkels ab [88]. Aus den höheren Streuwinkels können Informationen über die Form der Partikel gewonnen werden.

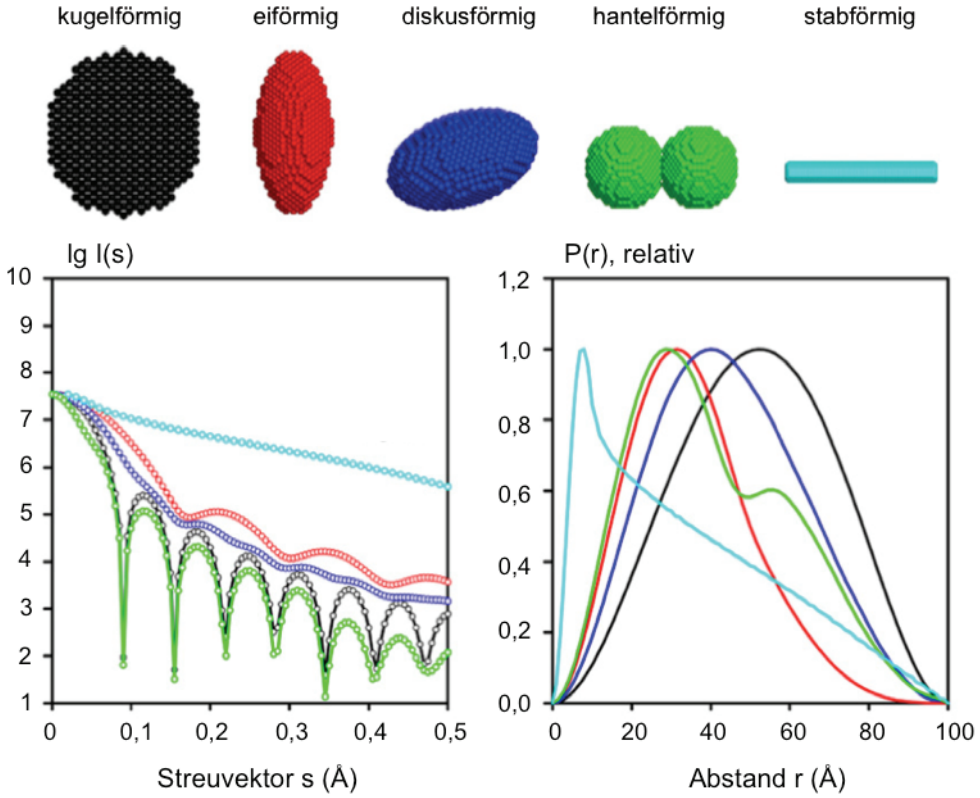


Abbildung 5: Streuintensität I(s) und P(r)-Verteilung theoretischer geometrischer Formen

Die Abbildung zeigt die theoretischen Streukuven und P(r)-Verteilungen fünf verschieden geformter Partikel. Allen Partikeln wird eine maximale Ausdehnung von D_{max} = 100 Å zugeordnet.
(modifiziert nach Mertens *et al.* [89])

Eine Umformung der Streukurve mittels indirekter Fourier-Transformation ergibt die Abstandsverteilungsfunktion P(r). Diese gibt die Häufigkeitsverteilung aller Abstände zweier Punkte an, die im Protein vorliegen. Der größte Wert entspricht damit der Längenausdehnung D_{max} des Proteins. Im Gegensatz zur Streukurve (reziproker Raum) stellt die Abstandsverteilungsfunktion den realen Raum dar, ist damit intuitiver und erlaubt auf ersten Blick eine Abschätzung der groben Partikelform. Die Abstandsverteilungsfunktion nimmt für bestimmte geometrische Formen einen charakteristischen Verlauf an, der exemplarisch in Abbildung 5 dargestellt ist.

Die graphische Darstellung des Produktes aus I(s) und s^2 gegen den Streuwinkel s bezeichnet man als Kratky-Auftragung. Diese wird genutzt, um eine Aussage über die Faltung bzw. Flexibilität des Proteins zu treffen. Globuläre Proteine zeigen ein

Maximum bei niedrigen Streuwinkeln während ein kontinuierlicher Anstieg von $s^2I(s)$ mit höheren Streuwinkeln auf flexible Linker in einem Protein hindeutet.

Die Proteinstruktur wird aus den Streudaten nicht direkt berechnet. Eine *ab-initio* Strukturmodellierung erfolgt mithilfe eines Kugelmodells, wobei zwei verschiedene Algorithmen zur Verfügung stehen, DAMMIN (Dummy Atom Minimisation) [90] und GASBOR [91]. Beide Algorithmen kalkulieren die Struktur als Ansammlung von Kugeln, die etwa die Größe einer Aminosäure haben und zu Beginn der Berechnung ein sphärisches Volumen füllen, das den Durchmesser D_{max} besitzt. Diesen Kugeln wird nun die Eigenschaft „Protein“ oder „Nicht-Protein“ zugeordnet und die resultierende Struktur mit den Streudaten verglichen. Für alle Kugeln wird diese Zuordnung iterativ so lange variiert, bis die theoretisch berechnete Streukurve des Strukturmodells mit den experimentellen Daten bestmöglich übereinstimmt. Im Gegensatz zu DAMMIN werden die Kugeln bei GASBOR als Perlen an einer Schnur behandelt, um mehr Übereinstimmung mit dem Polymercharakter des Proteins zu haben. Dies gibt eine bessere Auflösung.

Die besondere Stärke der Röntgenkleinwinkelstreuung liegt in ihrer Kombination mit anderen biochemischen oder strukturbiologischen Methoden.

1.6 Zielsetzung

Bunyaviren sind trotz ihres einfachen molekularen Aufbaus in der Lage, in unzähligen Wirten hocheffizient zu replizieren. Im Mittelpunkt der Virusreplikation steht das L-Protein, das durch einen viruseigenen *Cap-Snatching*-Mechanismus erst die Transkription des Virusgenoms und damit die Bereitstellung der Virusproteine für neue Viruspartikel ermöglicht. Diese Funktion ist neben weiteren Funktionen von einer Endonuklease im N-Terminus des L-Proteins abhängig. Diese Endonuklease besitzt ein aktives Zentrum, das in den meisten Wirtszellen nicht vorkommt, und könnte daher als vielversprechender Angriffspunkt antiviraler Wirkstoffe fungieren.

Die Endonukleasen einzelner Vertreter sind bereits strukturell charakterisiert, aber die Sequenzkonservierung ist innerhalb der bunyaviralen Virusfamilien derart gering, dass Vorhersagen zur Struktur bisher uncharakterisierter Endonukleasen nicht möglich sind.

Die entscheidende Frage ist, ob trotz der hohen Sequenzvariabilität die Strukturen aller Endonukleasen zueinander homolog sind, also einen einheitlichen Bauplan haben. Die Kenntnis dieses Bauplans könnte ausgenutzt werden, um Wirkstoffe gegen alle Viren mit *Cap-Snatching*-Mechanismus, also v. a. Bunya- und Arenaviren, zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit soll das Verständnis der Struktur und Funktion bunyaviraler Endonukleasen der zwei Virusfamilien *Nairoviridae* und *Phenuiviridae* erweitern. Die Methode der Wahl ist die Röntgenkristallographie, die große Mengen rekombinanter Proteine mit hohen Ansprüchen an die Proteinqualität erfordert.

Zur Gewinnung geeigneter Proteine sollen die L-Proteine des Rifttalfieber-Virus und des Krim-Kongo-Virus im Bereich der jeweiligen Endonuklease trunkiert werden. Zur Definition von Trunkierungsgrenzen dienen bioinformatische Vorhersage-programme. Die Trunkierungsfragmente werden mit Affinitätstag kloniert, in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie auf Löslichkeit getestet. Lösliche Proteine sollen gereinigt und durch geeignete Methoden zur Kristallisation und Strukturaufklärung optimiert werden. Darüber hinaus sollen die Proteine mithilfe geeigneter Assays auf biochemische Aktivität getestet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide

pOPIN-E, pOPIN-F, pOPIN-M, pOPIN-J	Berrow *et al.* [81]
pGEX-HRV-3C	Dr. Colin E. McVey, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras

2.1.2 E. coli-Stämme

DH5α	[Genotyp: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 Δ(lacZ)M15], New England Biolabs
BL21-Gold(DE3)	[Genotyp: F– ompT hsdS(rB–mB–) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte], Agilent Technologies
Rosetta™ 2(DE3)	[Genotyp: F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)], Merck

2.1.3 Virusisolate und Gensequenzen

Nairovirale Gensequenzen wurden vom Hersteller Centic Biotec bezogen:

CCHFV	Uniprot: ADD64466.1 (L-Sequenz, aufgeteilt in 5 Fragmente Y4813A, Y4813B1B2, Y4813B3, Y4813B4, Y4813C)
EREV	Uniprot: AFH89032.1
TOFV	Uniprot: YP_009227122.1
HAZV	Uniprot: AJW66841.1
NSDV	Uniprot: AED88229.1
DUGV	Uniprot: AB18834.1
LCMV	Uniprot: DQ361066.1
LACV	Uniprot: U12396.1 mit den Mutationen V129I und K136R
ANDV	Uniprot: AF291704
RVFV	BNITM-Stamm

2.1.4 Enzyme und Kits

InFusion® EcoDry Kit,	Takada
Nucleospin® Plasmid	Machery Nagel
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Machery Nagel
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific
SuperScript™ III One-Step RT-PCR system	Thermofisher Scientific
Z-competent™ *E. coli* Buffer Set	Zymo Research
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Restiktionsenzyme	New England Biolabs
Benzonase® Nuclease (25 U/µL)	Novagen
JBS Floppy-Choppy	Jena Bioscience
Lysozym	Roth
Proteinase K	Boehringer Mannheim 1992
T4 Polynucleotide Kinase	Thermo Scientific
Gel Filtration Kalibration Kit LMW und HMW	GE Healthcare
MegaScript® T7 Transcription-Kit	Life Technologies
G-25 SpinColumn	GE Healthcare

2.1.5 Medien

LB	Pepton (10 g/L), Hefeektrakt (5 g/L), NaCl (10 g/L)
SOC	Pepton (20 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ Das Medium wird nach dem Autoklavieren mit 10 mM steril filtrierter Glucose versetzt
TB	Pepton (12 g/L), Hefeextrakt (24 g/L), Glycerol (4 g/L) 900 mL Medium werden mit frisch mit 100 mL 10x Phosphatstock versetzt (2,31 g KH_2PO_4, 12,54 g K_2HPO_4)
LB-Agar	Invitrogen

2.1.6 DNA-Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide zur DNA-Amplifizierung wurden vom Hersteller MWG bezogen. Eine Auflistung befindet sich im Anhang.

2.1.7 Chemikalien

Die folgenden aufgelisteten Chemikalien wurden vom Hersteller Roth bezogen: Ammoniumsulfat, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Carbenicillin, Chloramphenicol, Citronensäure, Coomassie G250, Coomassie R250, Diethyldicarbonat (DEPC), 1,4-Dithiothretiol (DTT), Essigsäure, Ethanol (96% vergällt oder 99,8% unvergällt) Ethidiumbromid (0,5%) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), α-D-Glucose, L-Glutathion (reduziert), Glycerol, Glycin, Harnstoff, Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG), Imidazol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriummonohydrogenphosphat, β-Mercaptoethanol, Methanol, Natriumcitrat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, EDTA (Dinatriumsalz), Nickel(II)chlorid, 2-Propanol, Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1), Salzsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

Folgende Chemikalien wurden vom Hersteller Merck bezogen:
Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Maltose, Manganchlorid

Agarose UltraPure™	Invitrogen
Agarose LE	Biozym
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi
Bromphenolblau	Serva
DPBA	Chembridge
PA-30	Chembridge
PMSF	Boehringer Mannheim
RNAsin®	Promega
SYPR®-Green I	Life Technologies
SYPRO® Orange	Life Technologies

2.1.8 Puffer

Elektrophorese

TAE (10x)	2 M Tris, 50 mM Na_2EDTA, pH-Einstellung mit Essigsäure auf pH 8,0
DNA-Probenpuffer (6x)	60 % (w/v) Glycerol, 10 mM Tris, 60 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylenxyanol FF, pH 7,6
SDS-Laufpuffer (10x)	1 % (w/v) SDS, 250 mM Tris, 2 M Glycin
SDS-Probenpuffer (4x)	125 mM Tris pH 6,8, 50 % (w/v) Glycerol, 5 % SDS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngel (8-15%) für SDS-PAGE	375 mM Tris, 20-37% Rotiphorese® Gel 40, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,3% TEMED, pH 6,8
Sammelgel (4%) für SDS-PAGE	125 mM Tris, 10% Rotiphorese® Gel 40, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,3% TEMED, pH 6,8
Ambion Ladepuffer (2x)	Ambion
Denaturierende Gele (15-20%)	7 M Harnstoff, 15 – 20% Polyacrylamid (37,5:1), 90 mM Tris-HCl, 90 mM Natriumtetraborat, 2 mM EDTA, 0,1% APS, 0,1% TEMED
TBE Laufpuffer	90 mM Tris-HCl, 90 mM Natriumtetraborat, 2 mM EDTA
DEPC-Wasser	1% DEPC in entionisiertem Wasser
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	ThermoFisher Scientific
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	ThermoFisher Scientific

Puffer zur Proteinreinigung

Lysispuffer für Löslichkeitkeitsscreen	50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerol, 10 mM Imidazol, pH 7,5
CC_05 Lysispuffer	40 mM KH_2PO_4, 40 mM Na_2HPO_4, 1 M NaCl, 10 mM Imidazol, 5% (w/v) Glycerol, pH 6,8

CC_05 Elutionspuffer	50 mM Tris, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 5% (w/v) Glycerol, pH 7,5
RVFV Lysispuffer	50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerol, 10 mM Imidazol, pH 7,5

Puffer für Chromatographie

AE-01	20 mM Tris, 80 mM NaCl, 5% (w/v)Glycerol, pH 7,5
AE-02	20 mM Tris, 1 M NaCl, 5% (w/v) Glycerol, pH 7,5
HepA	20 mM Citrat, pH 6,0
HepB	20 mM Citrat, 1 M NaCl, pH 6,0
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris, 200 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,5

Puffer für biochemische Assays

Assaypuffer	50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerol pH 7,5 (für Endonuklease-Assays in RNase freiem Wasser angesetzt)
Bindungspuffer (ITC)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5% (w/v) Glycerol pH 7,5 (filtriert und entgast)

2.1.9 Oligonukleotide als Substrate für biochemische Assays

Alle DNA- und RNA-Oligonukleotide, die als Substrate für biochemische Assays dienten, wurden vom Hersteller Biomers als Lyophilisat bezogen und in Ampuwa (mit 0,5 U/µL RNAsin® zu Endkonzentrationen von 100 µM gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

ssRNA 19mer	5'- AUUUUGUUUUUAAUAUUUC-3'
ssRNA 27+ (strukturiert)	5'-GAUGAUGCUAUCACCGCGCUCGUCGUC-3'
ssRNA 27-	5'-GACGACGAGCGCGGUGAUAGCAUCAUC-3'
ssRNA 27+ (unstrukturiert)	5'-CAUCAUCCUAUCACCGCGCUCGUCCUC-3'
ssRNA polyA	5'-$(A)_{40}$-3'
ssDNA 27+	5'- GATGATGCTATCACCGCGCTCGTCGTC-3'
ssDNA 27-	5'-GACGACGAGCGCGGUGATAGCATCATC-3'

ssRNA12mer (FRET)	5'-6-FAM-$(A)_{12}$-BHQ-1-3'
IVT	*in-vitro*-Transkript (beginnend am T7-Promotor eines pOPIN-M-Plamides, Länge 469 nt)

2.1.10 Radioisotope

[y-^{32}P]-ATP (20 mCi/mmol)	Hartmann Analytic

2.1.11 Materialien für die Kristallisierung

Die Kristallisierung der Proteine erfolgte in den Laboren der Sample Preparation and Charakterisation Facility am EMBL in Hamburg.

JCSG Suite I bis IV und Plus	Qiagen
PEGs I und II Suite	Qiagen
Nucleix Suite	Qiagen
PACT Suite	Qiagen
Morpheus_HT-96	Molecular Dimensions
Clear Stategy_HT-96 Screen I,	Molecular Dimensions
Clear Strategy_HT-96 Screen II	Molecular Dimensions
Additive Screen	Hampton Research

2.1.12 Materialien für die Proteinreinigung

Amicon® Ultra-4 und Amicon Ultra-15	Merck
VIVASpin 5000	Sartorius
Polypropylen Chromatographiesäulen	Qiagen
HisPur™ Ni-NTA Agarose	Thermo Scientific
Amylose Resin	New England Biolabs
HiCap Glutathion-Matrix	Qiagen
Source 15Q	GE Healthcare
HiTrap Heparin FF (1 mL)	GE Healthcare
HiTrap Q FF, HiTrap SP FF (5 mL)	GE Healthcare
HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare

ZelluTrans Dialysemembran	Roth

2.1.13 Software

ATSAS-Software Paket	EMBL Hamburg [92]
GeneSilico (http://genesilico.pl/metadisorder) [93]	
JPred 4.0 (http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred) [94]	
Mac PyMol	DeLano Scientific (Palo Alto, USA)
MacVector	Symanec Corporation
Microsoft Office Paket	Microsoft Corporation
MultiGauge,	Fujifilm
Origin 7.0	OriginLab Corporation
PRALINE (http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww) [95]	
PROMALS (http://prodata.swmed.edu/promals/promals.php) [96]	
Protparam (https://web.expasy.org/protparam) [97]	
UCSF Chimera	Pettersen *et al.* [98]
Unicorn 7.0	GE Healthcare

2.1.14 Geräte

Tunair™ Schüttelkolben (2500 mL)	Merck
Schüttelinkubator innova 42	Eppendorf
Kalorimeter MicroCal VP-ITC	Malvern Panalytical
ÄKTAprime und ÄKTApure	GE Healthcare
P1 Sample Pump	GE Healthcare
LightCycler® 480	Roche
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Laserscanner Typhoon FLA 7000	GE Healthcare
Lichtmikroskop Stemi 508	Zeiss
Storage Phosphor Screen	GE Healthcare
Swissci Crystallization Plates	TTPLabtech
Mosquito-LCP Crystallization Robot	TTPLabtech
The RockImager-1000	Formulatrix

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Methoden

Bioinformatische Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Primärsequenz der Proteine zu analysieren und zu vergleichen. Zur Vorhersage ungeordneter Sequenzabschnitte diente der Server GeneSilico, der verschiedene Vorhersagealgorithmen vereint. Alignements wurden mit Clustal Omega erstellt. Zur Sekundärstrukurvorhersage anhand der Primärsequenz diente JPred 4.0, PredictProtein und APSSP2 [94,99,100]. Sekundärstrukturbasierte Sequenzvergleiche wurden mittels PRALINE [95] und PROMALS [96] erstellt.
Zur Vorhersage der Proteineigenschaften dienten verschiedene Programme der Plattform ExPASy.

2.2.2 Genamplifikation, Klonierung und Mutagenese der Expressionsfragmente

Die codierenden Sequenzen wurden entweder durch Gensynthese (Centic Biotec) oder durch cDNA-Synthese aus genomischer, viraler RNA mittels SuperScript™ III One-Step RT-PCR System nach dem Protokoll des Herstellers erhalten.
Zur Amplifikation der codierenden Gensegmente wurden Klonierungsprimer mit 15 überhängenden Nukleotiden nach Berrow et al. konstruiert und als Lyophilisat bei der Firma MWG Eurofins bezogen [81]. Die Primer wurden zu einer Endkonzentration von 100 µM in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Gensegmente wurden mittels Polymerasekettenreaktion mit der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers amplifiziert.
Die Erzeugung von Punktmutationen erfolgte durch ortsspezifische Mutagenese mittels Mutageneseprimern mit einer Länge von 20 – 30 Nucleotiden.
Die amplifizierte DNA wurde mittels 1 – 2%iger Agarose-Gelektrophorese von Verunreinigungen getrennt und aus dem Gel mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*-Kit nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Klonierung in pOPINE/F/J-Plasmide erfolgte durch InFusion® mit 20 ng Plasmid und 10 ng – 20 ng PCR-Produkt.
Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 42 °C inkubiert und anschließend in 50 µL chemisch kompetente *E. coli* DH5α mittels Hitzeschock transformiert. Erfolgreich transformierte Klone wurden durch Ausstreichen der Zellen auf Agarplatten mit

Ampicillin und Inkubation über Nacht bei 37 °C selektiert. Vier einzelne Kolonien wurden anschließend gepickt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in 4 mL LB-Medium inkubiert. Die anschließende Lyse der Zellen und Isolation der Plasmide erfolgte mittels MiniPrep Kit *Nucleospin® Plasmid* nach dem Protokoll des Herstellers. Die Richtigkeit der Expressionsplasmide wurde mittels Sanger-Sequenzierung bei der Firma SeqLab bzw. LGC Genomics bestätigt. Alle Plasmide wurden bei –20 °C gelagert.

2.2.3 Proteinexpression in E. coli BL21

Die Expression der Zielgene erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* BL21-Zellen. Die Transformation erfolgte mit ca. 1 µg Plasmid auf 50 µL Zellsuspension durch Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Zur Herstellung der Vorkultur wurden die Zellen nach 60 Minuten Inkubation in 250 µL SOC-Medium zu 50 – 100 mL LB-Medium mit Carbenicillin bei einer Konzentration von 100 µg/mL gegeben. Die erhaltene Vorkultur wurde über Nacht bei 180 rpm und 37 °C inkubiert.
Zur Expression wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:125 in frisch angesetztes TB-Medium mit Carbenicillin bei einer Konzentration von 100 µg/mL überführt. Die Inkubation erfolgte in 1,5 L Zellkultur in Tunair™-Schüttelkolben bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator. Die Zelldichte wurde photometrisch in regelmäßigen Abständen durch Messung der optischen Dichte OD_{600} mit einer Probe von 1 mL verfolgt. Bei einem OD_{600}-Wert zwischen 0,7 und 0,8 wurde der Inkubationskolben 10 min im Eiswasser unter gelegentlichem Schwenken gekühlt und anschließend zur Induktion der Genexpression mit IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 µM versetzt. Die Expression erfolgte über Nacht bei 17 °C.
Nach 16 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 x g vom Überstand getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.4 Zelllyse

Die Zelllyse erfolgte durch Sonifizierung in Anwesenheit von Lysozym. Das Zellpellet wurde in frisch mit PSMF und Lysozym versetzten Lysispuffer zu einer homogenen Suspension resupendiert und anschließend dreimal für zehn Minuten mit jeweils zehnminütiger Pause im Eisbad sonifiziert. Der Überstand wurde anschließend durch

Zentrifugation bei 30.000 x g für 30 min von Zellrückständen separiert. Die Proteine wurden aus dem Überstand in nativer Form isoliert.

2.2.5 Chromatographische Methoden

Affinitätschromatographie

Alle Expressionsfragmente besitzen einen Affinitäts-Tag, der zur Isolation der Proteine aus dem Überstand des Zelllysats genutzt wurde. Die Affinitätschromatographie basiert auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen des Affinitäts-Tags mit einer chemisch funktionalisierten stationären Phase (*Beads*). In dieser Arbeit kamen die Nickel-Affinitätschromatographie, die Glutathion-Affinititätschromatographie und die Amylose-Affinitätschromatographie zum Einsatz. Sofern nicht anders beschrieben wurden zur Reinigung von Proteinen mit His_6-Tag 0,5 bis 1,5 mL der in 20% Ethanol gelagerten *Beads* (Ni-NTA) in einer 10 mL Polypropylen-Säule vorgelegt und mit zehn Säulenvolumen Lysispuffer äquilibiert. Die *Beads* wurden mit dem Überstand des Zelllysats beladen und anschließend mit 20 Säulenvolumen Lysispuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol, sofern nicht anders angegeben.
Zur Reinigung von MBP-Fusionsproteinen (Maltosebindungsprotein) wurde der Überstand des Zelllysats für 1 h mit einem Überschuss an Amylose-*Beads* inkubiert und nach dem Waschen mit einem Puffer mit 10 mM Maltose eluiert.
Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde der Überstand der Zelllysats für 4 h mit 2 - 4 mL Glutathion-*Beads* inkubiert und anschließend gespült. Durch Koinkubation des gebundenen Fusionsproteins mit 3C-Protease wurde das Zielprotein vom GST-Tag gespalten und eluiert.
Die auf Eis gelagerten Eluate wurden sofort für weitere Reinigungsschritte verwendet.

Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrer Oberflächenladung und basiert auf deren Interaktion mit geladenen Trägermaterialien. Diese Interaktion ist von der Ladung des Trägermaterials und des

Proteins sowie vom pH-Wert und der Ionenstärke der Pufferlösung abhängig. In dieser Arbeit kommt sowohl die Anionenaustauschchromatographie mit positiv geladenem Trägermaterial als auch die Kationenaustauschchromatographie mit negativ geladenem Trägermaterial zum Einsatz. Für die Proteinreinigung wurde das FPLC-System ÄKTAprime oder ÄKTApure genutzt.

Für beide Verfahren wurde die proteinhaltige Lösung durch Verdünnung auf eine Leitfähigkeit von unter 10 mS/cm eingestellt und mittels P1 Pumpe (GE Healthcare) auf das Säulenmaterial geladen.

Die Säule wurde, sofern nicht anders beschrieben, anschließend mit zehn Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer (AE-01) gewaschen. Die Elution erfolgt mittels linearem Gradienten oder Stufengradienten über 20 Säulenvolumen mit Hochsalzpuffer (AE-02). Es wurden Fraktionen von 1 – 2 mL gesammelt.

Die Kationenaustauschchromatographie erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, an einer 1 mL HiTrap Heparin-Säule oder einer 5 mL HiTrap SP FF-Säule, jeweils mit dem Niedrigsalzpuffer HepA und dem Hochsalzpuffer HepB.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ist eine Methode zur Separation von Proteinen nach ihrem hydrodynamischen Volumen und erlaubt eine Abschätzung des Molekulargewichtes der eluierten Fraktionen. Die Trennung basiert auf verschiedenen Diffusionseigenschaften von Proteinen mit unterschiedlichem hydrodynamischen Volumen. Größere Proteine wandern schneller als kleine Proteine. In dieser Arbeit diente die Methode zum Separieren von verschiedenen Oligomeren eines Proteins bzw. zum Nachweis der Monodispersität der Proteinlösung. Zum Einsatz kam eine HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule des Herstellers GE Healthcare. Die Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine erfolgte nach Kalibration mit verschiedenen Referenzproteinen (Abbildung 29, Anhang)

2.2.6 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung sowie zum Nachweis der Reinheit von Proteinen genutzt und folgt der Methode nach Laemmli [101]. 12%ige oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele wurden selbst hergestellt. Gradientengele (4 – 12%) zur Vorbereitung von massenspektrometrischen Untersuchungen wurden vom Hersteller Thermofisher bezogen.

Die Proteine werden in vierfachem SDS-Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 400 mM NaCl, 8% SDS, 40% Glycerol, 0,4% Bromphenolblau) bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert und bei 180 V für 1 h in Tris-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM Glycin, 0,1% SDS) getrennt. Die Visualisierung der Proteine auf dem Gel erfolgte durch Coomassie-Färbung.

Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden die Proteine mit NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) versetzt, die SDS-PAGE erfolgte mit NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gradientengelen in MES SDS Running Buffer.

2.2.7 Löslichkeitsuntersuchung

Die Methode wurde genutzt, um möglichst viele Expressionsfragmente auf Expression und Löslichkeit zu testen. Die Vorkultur wurde in 5 mL LB-Medium über 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Expression wurden 40 µL der Vorkultur in 5 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin überführt. Die Expression erfolgte bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,7. Die Proteine wurden nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht bei 17 °C exprimiert. Die Zellen wurden nach 16 h durch Zentrifugation getrennt und in 0,5 – 1 mL Lysispuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5% Glycerol, pH 7,5) in Anwesenheit von PMSF und Lysozym resuspendiert und unter Eiskühlung sonifiziert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation von Löslichen getrennt. Die löslichen Proteine wurden aus dem Überstand durch 25 µL Ni-NTA isoliert, mit 5 mL Lysispuffer gespült und mit Elutionspuffer eluiert.

Zur Detektion unlöslicher Proteine wurden die resuspendierten, unlöslichen Zellbestandteile und zur Detektion löslicher Proteine wurden die an die Ni-NTA gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.8 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse ist ein Verfahren zur Optimierung der Kristallisierbarkeit von Proteinen, da flexible und damit proteasezugängliche Seitenketten entfernt werden können. Die Methode kann außerdem zur Charakterisierung der Domänenstruktur eines Proteins genutzt werden. Dazu wurden die Proteine bei einer Endkonzentration von 0,1 mg/mL in 14 µL Assaypuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,5) vorgelegt und mit jeweils 1 µL einer seriellen Verdünnung der jeweiligen Protease (Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin, Papain, Proteinase K) versetzt. Die serielle Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:1 aus einer Stocklösung mit 0,1 mg/mL Protease. Der Ansatz wurde, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (20 °C) für eine Stunde inkubiert und anschließend zum Beenden der Reaktion mit PMSF und 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Visualiseriung der Fragmente erfolgte durch SDS-PAGE.

2.2.9 Thermal-Shift-Assay (Thermofluor-Assay)

Der Thermal-Shift-Assay (TSA) ist eine Methode zur Messung der thermischen Stabilität eines Proteins in verschiedenen Puffern oder in Anwesenheit verschiedener Liganden.

Die Proteinlösung wurde in Anwesenheit des Fluorophors SYPRO Orange einem Temperaturgradienten ausgesetzt. Die Fluoreszenz von SYPRO Orange ist in hydrophiler Umgebung nicht messbar Die temperaturabhängige Entfaltung des Proteins führt zur Exposition hydrophober Seitenketten, an die das Fluorophor bindet und durch Verlust der fluoreszenzlöschenden Wirkung des hydrophilen Puffers ein ansteigendes Fluoreszenzsignal generiert.

In dieser Arbeit wurde die Methode zur Optimierung von Pufferbedingungen zur Reinigung von Proteinen zur Kristallisation sowie zum Nachweis der Bindung von Metallionen genutzt.

In einer 96 well LightCycler® 480 Multwell Plate 96 (Roche) wurde das Protein in 25 µL des zu testenden Puffers mit dem Fluorophor SYPRO Orange vorgelegt und anschließend im LightCycler® 480 einem linearen Temperaturanstieg von 20 °C bis 80 °C ausgesetzt.

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte zwischen 465 nm und 580 nm. Die Auswertung erfolgte durch Normalisierung der einzelnen Messwerte auf die maximale Fluoreszenzintensität. Die Temperatur bei halbmaximaler Fluoreszenz heißt Denaturierungstemperatur (T_m). Der Unterschied der Denaturierungstemperatur eines Proteins in einer Testbedingung im Bezug auf eine Referenzbedingung wird als thermische Stabilisierung (Thermal Shift ΔT_m) definiert.

2.2.10 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Bindung von Manganionen im aktiven Zentrum verschiedener Endonuklease-Proteine nachzuweisen. Die Proteine wurden dafür zunächst in einem Dialysierschlauch (MWCO 6 – 8 kDa) gegen einen Bindungspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol, pH 7,5) bei 4 °C dialysiert und anschließend auf 100 – 160 µM eingeengt. Der Ligand $MnCl_2$ wurde zu Endkonzentrationen zwischen 5 und 8 mM im Bindungspuffer nach der Dialyse gelöst.

Die Messung der Wärmeaufnahme oder -abgabe erfolgte mit einem VP-ITC Kalorimeter in den Laboren der *Sample Preparation and Characterization Facility* (SPC) am EMBL Hamburg [102] mit einem Messzellvolumen von 1469 µL durch Titration mit 10 – 30 Injektionen von 15 µL des Liganden.

Die Integration und Auswertung der Bindungsisothermen erfolgte mit Origin 7.0.

2.2.11 Gelbasierte Endonuklease-Aktivitätsassays

Die gelbasierten Endonuklease-Assays wurden in dieser Arbeit zur Charakterisierung des Substrats hinsichtlich Sekundärstruktur- und Sequenzpräferenz des Proteins genutzt. Dafür kamen verschiedene Oligonukleotidsubstrate zum Einsatz.

Markierung und Hybridisierung der Oligonukleotidsubstrate

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der Nuklease-Aktivität einzelner Proteine kam ein PAGE-basierter Endonuklease-Assay mit am 5'-Ende ^{32}P-markierten Oligonukleotiden zum Einsatz. Die kurzkettigen RNA- und DNA-Oligonukleotide werden als synthetisiertes Lyophilisat bezogen oder aus einem DNA-Template mittels T7-Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers *in-vitro* transkribiert. Radioaktives [γ^{32}P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol (radioaktive Konzentration: 10 mCi/mL) wurde vom Hersteller Hartmann Analytics bezogen und bei 4 °C gelagert.
Die Oligonukleotide wurden mit der T4-Polynukleotidkinase nach dem Protokoll des Herstellers markiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit 30 µL RNase freiem Wasser versetzt.
Die markierten Oligonukleotide wurden anschließend durch G-25 Microspin-Chromatographiesäulen nach dem Protokoll des Herstellers durch Zentrifugation bei 0,7 x g für 2 min gegen eine Vorlage von 100 µL RNase freiem Wasser mit 0,5 U/µL RNasin® von freiem [γ^{32}P]-ATP getrennt. Die erfolgreiche Markierung der Nukleotide wurde anschließend durch Messung des Durchflusses am Geiger-Zähler bestätigt. Die erhaltene Lösung heißt „Markierungsstocklösung" und wurde bei 4 °C gelagert.
Doppelsträngige heterologe RNA und DNA-Oligonukleotide wurden durch Hybridisierung eines radioaktiv markierten Einzelstranges mit dem komplementären, nicht radioaktiv markierten Strang erhalten. Die äquimolare Mischung beider Oligonukleotide wurde dafür 5 min auf 98 °C erhitzt und anschließend innerhalb von 2 h langsam auf 20 °C heruntergekühlt.
Einzelsträngige, strukturierte RNA wurde nach dem gleichen Protokoll erhalten.

Durchführung des Endonuklease-Assays

Der Assay erfolgte bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,1 µM und 1 µM in einem Volumen von 20 µL für eine Stunde bei 30 °C. Sofern nicht anders angegeben wurde zunächst das Protein in 18 µL Assaypuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl und 5% Glycerol, pH 7,5) vorgelegt und mit $MnCl_2$-Lösung zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzt. Im Isotopenlabor wurden 2 µL einer 1:10 Verdünnung der Markierungsstocklösung hinzupipettiert und sofort die Inkubationszeit von 60 min bei 30 °C gestartet.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden 10 µL im Verhältnis 1:1 mit Loading Buffer des Herstellers Ambion gemischt und für 5 min zur Denaturierung auf 95 °C erhitzt, gefolgt von Eiskühlung für 5 min. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Kettenlänge getrennt.
Die Visualisierung der getrennten Reaktionsprodukte erfolgte durch Inkubation des Gels mit einem Storage Phosphor Screen für 1 h bei 4 °C und anschließende radiographische Auswertung in einem Typhoon FLA 7000 Laserscanner.

2.2.12 FRET-basierte Endonuklease-Aktivitätsassays

Der FRET-basierte Endonuklease-Assay diente zur Messung der Endonuklease-Aktivität der RVFV Endonuklease bei verschiedenen Konzentrationen von spezifischen Endonuklease-Inhibitoren. Der Assay basiert auf der steigenden Intensität eines Fluoreszenzsignals bei der Spaltung eines FRET-Substrates. Das verwendete FRET-Substrat ist ein einzelsträngiges Ribonukleotid (12mer polyA), das an seinem 5'-Ende das Donorfluorophor 6-FAM und an seinem 3'-Ende das Akzeptorfluorophor BHQ-1 trägt (6-FAM-5'-$(A)_{12}$-3'-BHQ-1). Im ungeschnittenen Substrat ist die Fluoreszenz des 6-FAM durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer auf den Farbstoff BHQ-1 nicht messbar. Kommt es zur Spaltung des Substrates erhöht sich die räumliche Distanz der beiden Farbstoffe über ein für Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer nötiges Minimum, wodurch das Fluoreszenzsignal des Fluoreszenzfarbstoffs 6-FAM messbar wird.

1 µM des entsprechenden Endonuklease-Proteins wurde in einer 96-well-Platte (LightCycler® Multiwell plate 96) in 18 µL Assaypuffer in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ und dem zu testenden Inhibitor vorgelegt. 2 µL des FRET-Substrates (10 µM) wurden hinzugesetzt und Messung der Fluoreszenzzunahme wurde nach 90 Sekunden gestartet.

Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Aus dem initialen, linearen Abschnitt der Fluoreszenzintensität wurde durch lineare Regression der Anstieg ermittelt. Die Linearität wurde für den Regressionskoeffizienten $R^2 > 0{,}99$ definiert.

Der Anstieg ist die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_0 der enzymatischen Reaktion und diente als Vergleichsparameter für den Einfluss verschiedener Konzentrationen eines Inhibitors auf die Ezymaktivität.

2.2.13 Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS)

In dieser Arbeit wurde die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung zur Untersuchung der Form und Konformation verschiedener Endonuklease-Proteine genutzt.

Probenvorbereitung und Aufnehmen der Messdaten

Die Vorbereitung der Proteine erfolgte durch Expression und Reinigung nach etabliertem Protokoll. Die nach der Größenausschlusschromatographie erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und eingeengt. Während des Einengens wurden Proben von 30 µL mit unterschiedlicher Konzentration zwischen 0,5 und 5,0 mg/mL genommen. Die Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch.
Die Durchführung sämtlicher Messungen erfolgte an der Beamline P12 des Synchrotronrings PETRAIII am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1{,}24$ Å und einer Strahlungsenergie von E = 10 keV [103]. Die Streuintensität I wurde im Bereich des Streuvektors $0{,}01\ Å^{-1} < s < 0{,}45\ Å^{-1}$ durch einen PILATUS 2M Pixel Detektor im Abstand von 3,1 m zur Probe detektiert. Der Streuvektor s ergibt sich aus dem Streuwinkel θ zu $s = 4\pi \sin\frac{\theta}{\lambda}$. Zur Subtraktion des Hintergrundsignals wurde vor und nach jeder Messung das Streusignal der Pufferlösung gemessen. Zum Prozessieren der aufgenommen Daten wurde das im Software-Paket ATSAS 2.8.3 enthaltene Programm PRIMUS verwendet [92].
Die Guinier-Näherung wurde mit der AutoRG-Funktion kalkuliert und diente zur Bestimmung der Gyrationsradien und der Intensität I(0). Die maximalen Partikeldurchmesser D_{max} und die P(r)-Verteilungen wurden mit GNOM berechnet. Die durch GNOM erstellte Datei diente zur Strukturmodellierung.

Ab-initio-Strukturmodellierung

Zur *ab-initio*-Strukturmodellierung wurde das Programm GASBOR genutzt. Das Programm generiert beim einmaligen Ausführen ein Strukturmodell als pdb-Datei. Es wurden 30 Strukturmodelle generiert und mit einer iterativen Abfolge von Programmen aus dem ATSAS-Software-Paket weiter prozessiert. Das Programm DAMSEL diente zum Vergleich der Ähnlichkeit der 30 Modelle. Bei zu geringer Ähnlichkeit wurde ein Modell verworfen. Die Modelle wurden durch das Programm

DAMSUP in eine äquivalente räumliche Orientierung gebracht und durch das Programm DAMAVER zu einem einzelnen Modell als pdb-Datei gemittelt. Dieses Modell enthält noch die Dichte der Hydrathülle des Proteins. Zur Subtraktion der Hydrathülle diente das Programm DAMFILT, wodurch die finale SAXS-Struktur entstand.
Die Oberfläche des mittels DAMFILT erstellten Strukturmodells wurde in dieser Arbeit mit dem Programm UCSF Chimera visualisiert.

2.2.14 Kristallisation von Proteinen

Die Kristallisation der Proteine erfolgte größtenteils in den Laboren der *Sample Preparation and Characterization-Facility* (SPC) am EMBL Hamburg [102]. Die Nutzung der Facility wurde durch iNEXT finanziert (Projekt-Nr. 653706).
Das Screening erfolgte durch Gasphasendiffusion (*sitting-drop vapor diffusion*) im 96-well-Format durch Mischung von 100 – 200 nL Proteinlösung und 100 – 200 nL Reservoir. Als Reservoirlösung dienten vorpipettierte Screens verschiedener Hersteller, die unter Kapitel 2.1.11 aufgelistet sind. Zum Ansetzen der Platten wurde der Kristallisationsroboter „Mosquito-LCP Crystallization Robot“ genutzt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 19 °C im Inkubator „The RockImager-1000“. Von den einzelnen Tröpfchen wurden in regelmäßigen Abständen Bilder erstellt, die zur Verfolgung des Kristallwachstums über die webbasierte Plattform CRIMS zugänglich waren.
Daneben wurden auch eigenhändig Ansätze pipettiert. Hierfür wurden 1 µL Protein mit 1 µL Reservoirlösung gemischt und bei 4 °C bzw. 20 °C inkubiert. Das Kristallwachstum wurde lichtmikroskopisch verfolgt.

3. ERGEBNISSE

Die bunyavirale, RNA-spaltende Endonuklease befindet sich in einer Domäne im N-Terminus des L-Proteins von Bunyaviren. Die atomaren Strukturen einzelner bunyaviraler Endonuklease-Domänen sind bereits bekannt und zu denen anderer segmentierter Negativstrang-RNA-Viren strukturell homolog. Die N-terminalen Sequenzen der L-Proteine sind innerhalb der Ordnung *Bunyavirales* nicht konserviert, sodass die Strukturen bisher unbekannter Endonukleasen nicht allein durch Sequenzvergleiche vorhergesagt werden können. Beim CCHFV als Vertreter der Familie *Nairoviridae* kommt hinzu, dass sich die Endonuklease nicht am N-Terminus des Proteins befindet und daher bereits die Identifizierung von Domänengrenzen anhand von Sequenzvergleichen nicht möglich ist.

Zugrundeliegende Arbeitshypothese ist, dass alle Bunyaviren eine strukturell und funktionell homologe Endonuklease-Domäne besitzen, die als Angriffspunkt für Antiviralia mit breitem Wirkspektrum dienen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels biochemischer und strukturbiologischer Methoden eine Endonuklease-Domäne im N-Terminus des L-Proteins des Rifttalfieber-Viruses (RVFV) und des Krim-Kongo-Viruses (CCHFV) sowie verwandter Nairoviren zu identifizieren sowie strukturell und funktionell zu charakterisieren.

3.1 Identifizierung der löslichen CCHFV-Endonuklease

3.1.1 Vorhersage von Sekundärstrukturelementen im N-Terminus des L-Proteins

Im Gegensatz zu verwandten L-Proteinen mit ca. 250 kDa hat das CCHFV L-Protein ein Molekulargewicht von ca. 450 kDa und eine Länge von ca. 4000 Aminosäuren. Zudem befindet sich am nativen N-Terminus eine OTU-Domäne, deren Struktur und Funktion durch Bergeron *et al.* beschrieben wurde [50]. Die RdRP-Domäne wurde zwischen den Positionen 2045 und 2710 anhand von Sequenzvergleichen vorhergesagt [104,105]. Unter der Annahme, dass in den Nairoviren – sowie in allen segmentierten Negativstrang-RNA-Viren – die Endonuklease im L-Protein vor der RdRP-Domäne zu finden ist, kommt für deren Position der Bereich zwischen den Aminosäuren 160 und 2040 infrage.

In diesem Bereich kann aufgrund der geringen Sequenzhomologie keine funktionelle Domäne eindeutig vorhergesagt werden. Das aus anderen bunyaviralen Endonukleasen bekannte, katalytische Aspartat des PD-E/D-K-Motivs wurde durch Devignot *et al.* 2015 anhand eines zellbasierten Replikationsassays in Position 693 postuliert [51]. Die Arbeitsgruppe liefert jedoch keinen biochemischen Nachweis und keine strukturellen Informationen für die Endonuklease-Domäne.

Ziel ist die strukturelle und biochemische Charakterisierung der Endonuklease-Domäne des CCHFV L-Proteins. Dies erfordert eine große Menge rekombinanten Proteins in hoher Reinheit. Zur Gewinnung von löslichem Protein wurde zunächst die N-terminale Sequenz des L-Proteins mit verschiedenen bioinformatischen Vorhersageprogrammen analysiert. Mithilfe der Vorhersage wurden Grenzen von Trunkierungsfragmenten definiert. Die Analyse der Primärsequenz erfolgte durch GeneSilico und JPred 4.0.

Abbildung 6 zeigt schematisch die ersten 1059 Aminosäuren des L-Proteins (schwarze Linie). Das überstehende Diagramm in Abbildungsteil A veranschaulicht den Verlauf der Vorhersagewahrscheinlichkeit für ungeordnete Sequenzabschnitte (DISOPred und MetaDisorderMD). Ein Sequenzabschnitt auf dem Protein wird als ungeordnet definiert, sobald die Vorhersagewahrscheinlichkeit einen Wert von 0,5 übersteigt. Im N-Terminus des L-Proteins befinden sich gemäß MetaDisorderMD zwei größere Sequenzabschnitte mit höherer Unordnung. Der Erste folgt auf die OTU-Domäne und liegt zwischen den Positionen 180 und 250, der zweite wird begrenzt durch die Positionen 702 und 814.

Aus der Vorhersage der Sekundärstruktur mittels JPred 4.0 lässt sich der N-Terminus im ausgewählten Sequenzabschnitt neben der OTU-Domäne in drei Abschnitte unterteilen. Die Abschnitte zwischen den Aminosäuren 170 bis 670 sowie von 913 bis 1059 werden fast ausschließlich durch α-Helices dominiert. Im Bereich zwischen 671 und 912 befinden sich neben α-Helices auch Abschnitte, in denen Abfolgen von β-Faltblättern vorhergesagt wurden.

3.1.2 Konstruktion und Löslichkeitsscreen N-terminaler Trunkierungsfragmente

Die Informationen aus der Sekundärstrukturvorhersage wurden zum Konstruieren von Trunkierungsfragmenten genutzt. Dabei war das Ziel, Trunkierungsfragmente so zu konstruieren, dass sie möglichst vollständige Domänen des Proteins enthalten. Da die Domänengrenzen nicht eindeutig anhand der Primär- und Sekundärstruktur vorhergesagt werden können, erfolgte die Trunkierung schrittweise.

Die Löslichkeit eines Fragmentes wurde als umso höher eingeschätzt, je weniger ungefaltet das Protein ist. Die Wahrscheinlichkeit zur korrekten Faltung wurde als höher angenommen, je mehr Sekundärstrukturelemente vorhergesagt sind. Die Trunkierungsfragmente wurden daher so konstruiert, dass an ihren Enden α-Helices liegen.

Es wurden sieben Fragmente mit nativem N-Terminus und vier Fragmente mit nicht-nativem N-Terminus konstruiert (Tabelle 1, Anhang). Die entsprechenden C-Termini wurden an sieben Positionen definiert. Die Genseqmente wurden amplifiziert und in pOPIN-E-Plasmide zur Expression mit C-terminalem His_6-Tag kloniert. Der Test auf Löslichkeit erfolgte gemäß Methode 2.2.7.

Die Abbildung 6 B zeigt eine Auswahl exprimierbarer Trunkierungsfragmente. Das Fragment mit nativem N-Terminus und einer Länge von 579 Aminosäuren zeigte die beste Löslichkeit. Ein verkürztes (482 Aminosäuren) bzw. ein verlängertes (670 Aminosäuren) Fragment konnte nicht löslich exprimiert werden. Unter den Fragmenten mit nicht-nativem N-Terminus zeigte keines Löslichkeit (nicht dargestellt in Abbildung 6 B).

3.1.3 Identifizierung, Klonierung und Expression einzelner Endonukleasefragmente

Die Löslichkeitsgrenze eines N-terminalen Trunkierungsfragmentes des CCHFV L-Proteins an der Position 578 ließ die Hypothese zu, dass in diesem Bereich eine Domänengrenze auf dem L-Protein besteht. Diese Erkenntnis wurde genutzt, um die Endonuklease-Domäne zu identifizieren.

Der Bereich zwischen den Aminosäuren 482 und 670 ist in der Sekundärstruktur-vorhersage durch α-Helices dominiert, ab 671 gibt es eine Abfolge von β-Faltblättern und α-Helices. Die Präsenz von β-Faltblättern ist aus den Kristallstrukturen der Endonukleasen verwandter (-)ssRNA-Viren bekannt. Zusammen mit dem durch Devignot *et al.* postulierten Aspartat-Rest in Position 693 bestand die Hypothese,

dass in diesem Abschnitt die Endonuklease des CCHFV lokalisiert ist. Die Homologie der Sekundärstruktur und der Sequenz ist jedoch so gering, dass die Tertiärstruktur und die Domänengrenzen der Endonuklease nicht vorhergesagt werden können.

Zur Gewinnung löslichen Proteins erfolgte eine schrittweise Trunkierung der erwarteten Endonuklease-Domäne. Dafür wurden im Bereich zwischen 482 und 670 sieben N-terminale Trunkierungsgrenzen am Anfang vorhergesagter α-Helices definiert. Sechs entsprechende C-terminale Trunkierungsgrenzen werden zwischen den Aminosäuren 895 und 1059 jeweils am Ende vorhergesagter α-Helices definiert. Für diesen Bereich sind ähnlich dem Bereich zwischen den Aminosäuren 160 und 670 hauptsächlich α-Helices vorhergesagt.

Aus sieben N-terminal definierten Grenzen zwischen den Positionen 513 und 629 sowie einer C-terminalen Grenze an der Position 895 wurden Trunkierungsfragmente definiert. Die Gensegmente wurden amplifiziert und in pOPIN-F-Plasmide zur Expression mit N-terminalem His_6-Tag kloniert. Das Screening nach Löslichkeit erfolgte gemäß Methode 2.2.7.

Eine Übersicht der getesteten Trunkierungsfragmente zeigen die Abbildung 6 C und die Tabelle 2 im Anhang.

Das Fragment CC_05 mit den Grenzen 587 und 895 ist als Einziges löslich. Daraufhin wurden sechs Trunkierungsfragmente mit dem N-Terminus in Position 587 und den C-Termini zwischen den Positionen 921 und 1059 definiert und auf Löslichkeit getestet. Keines dieser Fragmente konnte löslich exprimiert werden.

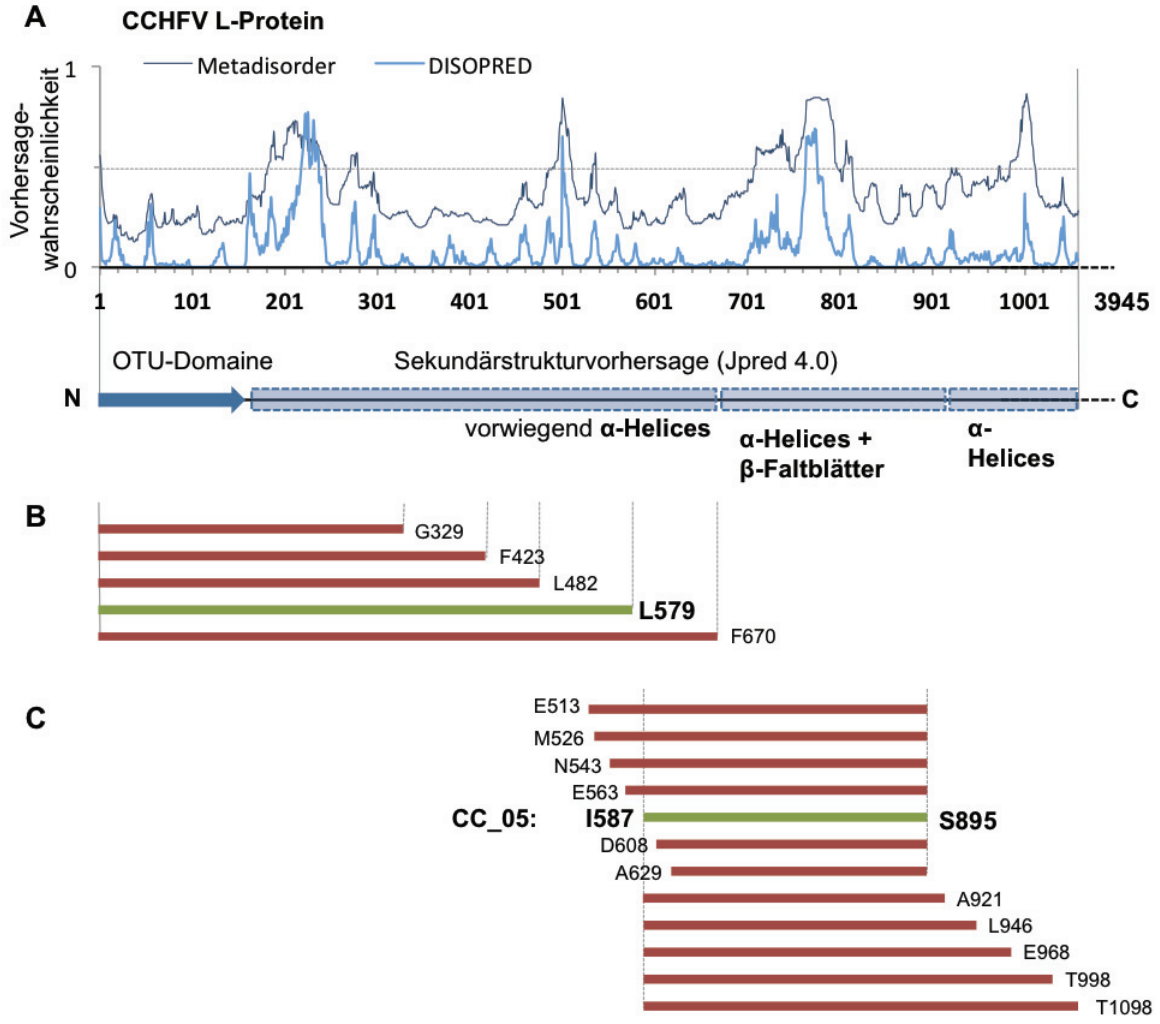


Abbildung 6: Identifizierung löslicher Trunkierungsfragmente des N-Terminus und der Endonuklease des CCHFV L-Proteins anhand bioinformatischer Vorhersageprogramme

Der N-terminale Sequenzabschnitt des CCHFV L-Proteins wurde mit GeneSilico und Jpred 4.0 analysiert. Die Ergebnisse wurden zur Definition von Trunkierungsgrenzen innerhalb der ersten 1059 N-terminalen Aminosäurereste genutzt. **(A)** Graphisch dargestellt ist exemplarisch der mit den Algorithmen DISOPRED (hellblau) und MetaDisorder (dunkelblau) ermittelte Verlauf der Vorhersagewahrscheinlichkeit ungeordneter Sequenzabschnitte über der Sequenz des L-Proteins. Basierend auf der Sekundärstrukturvorhesage wurde die Sequenz zwischen 168 und 1059 in drei Abschnitte untergliedert, zwei α-helixreiche zwischen 168 und 670 bzw. 921 und 1059 und einen α-Helices- und β-Faltblatt-haltigen zwischen 670 und 921.
Dargestellt ist schematisch eine Auswahl der exprimierbaren Trunkierungsfragmente des nativen N-Terminus **(B)** sowie der erwarteten Endonuklease-Domäne **(C)**. Die Definition der Trunkierungsgrenzen erfolgte unter Einhaltung von Sekundärstrukturelementen. Die Fragmente wurden mit N-terminalem His_6-Tag in *E. coli* exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie auf Löslichkeit getestet. Alle dargestellten Fragmente konnten exprimiert werden. Grüne Färbung zeigt Löslichkeit an, rote Färbung zeigt Unlöslichkeit an.

3.1.4 Optimierung der CCHFV-Endonuklease nach N- und C-terminaler Trunkierung

Durch Löslichkeitsscreening wurde ein Fragment mit den Grenzen 587 und 895 identifiziert. Dieses enthält damit auch das von Devignot *et al.* postulierte katalytische Aspartat D693 [51]. Das Fragment hat ein Molekulargewicht von 35,5 kDa und zu diesem Zeitpunkt wurde postuliert, dass es höchstwahrscheinlich die Endonuklease-Domäne enthält. Das Fragment wird in folgenden Kapiteln als CCHFV-Endonuklease bezeichnet.

Das Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung dieses Proteins mittels Röntgenkristallographie, was die Kristallisierbarkeit des Proteins erfordert. Die Wahrscheinlichkeit zur Kristallisation wird als umso höher angesehen, je weniger flexible Bereiche das Protein enthält. Aus dem Löslichkeitsscreening war bekannt, dass eine N-terminale Verkürzung um die Länge einer vorhergesagten α-Helix (21 Aminosäuren) die Löslichkeit aufhebt.

Einen Hinweis auf flexible Bereiche im N- und C-Terminus kann die schrittweise Trunkierung weniger Aminosäuren liefern. Solange durch die Trunkierung kein wichtiges Strukturelement, sondern nur flexible Bereiche zwischen Strukturelementen bzw. Domänen entfernt werden, sollte die Löslichkeit des Proteins erhalten bleiben.

Dabei zeigte sich, dass bereits die Trunkierung dreier Aminosäuren am N- oder C-Terminus die Löslichkeit des Proteins vollständig aufhebt. Tabelle 3 im Anhang zeigt die Grenzen der N- und C-terminal verkürzten Fragmente.

Aus diesem Ergebnis wurde geschlussfolgert, dass der N- und C-Terminus über keine flexiblen Reste verfügen, sondern die terminalen Aminosäuren für die strukturelle Integrität der gesamten Domäne notwendig sind. Diese Beobachtung bestätigte damit die anhand der Sekundärstrukturvorhersage ermittelten α-Helices am N- und C-Terminus des Proteins. Die Grenzen der CCHFV-Endonuklease schienen damit richtig identifiziert zu sein.

3.2 Optimierung der Expression und Reinigung der CCHFV-Endonuklease

Weitere experimentelle Zielstellung war die Gewinnung der CCHFV-Endonuklease in hoher Konzentration mit hoher Reinheit.

Zur Expression wurde der Expressionswirt *E. coli* BL21 genutzt. Das Protein wurde nach erfolgreichem *Scale-up* in 3 L TB-Medium über Nacht exprimiert. Es trägt am N-Terminus einen His_6-Tag, sodass als erster Reinigungsschritt die Nickel-Affinitätschromatographie (Methode 2.2.5) angewendet wurde.

Die Abbildung 7 zeigt das finalisierte Reinigungsprotokoll. Der Abbildungsteil C zeigt die SDS-PAGE-Analyse einer Elutionsfraktion der Nickel-Affinitätschromatographie. Im Bereich der Laufhöhe zwischen 35 kDa und 40 kDa befindet sich eine prominente Bande, die dem Endonuklease-Protein zugeordnet wird. Daneben koeluieren eine Vielzahl an Nebenprodukten der Expression mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Das Vorkommen dieser Proteine war bei anderen Expressionschargen reproduzierbar.

Zur Kristallisation wurde neben einer hohen Ausbeute vor allem eine hohe Reinheit des Proteins benötigt.

Zur Optimierung der Reinheit der CCHFV-Endonuklease wurden zunächst die Expressionsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Expressionszeit nach der Induktion mit IPTG variiert. Dies ergab keinen Unterschied, auch der Wechsel des Expressionswirtes auf *E. coli* Rosetta (DE3) erhöht die Ausbeute und die Reinheit des durch Nickel-Affinitätschromatographie erhaltenen Proteins nicht.

Da seitens der Expression keine Optimierung zu erzielen war, wurde versucht, das Verfahren der Nickel-Affinitätschromatographie bezüglich Bindung und Elution des Proteins zu optimieren.

Die Bindung des Proteins an das Säulenmaterial (Ni-NTA) nahm bereits mit Erhöhung der Imidazolkonzentration von 10 mM auf 25 mM im Bindungspuffer ab, was die Ausbeute verringerte und die Reinheit nicht erhöhte. Weiterhin wurde versucht, das Protein nach der Bindung mit schrittweise ansteigender Imidazol-Konzentration zu eluieren. Dabei zeigte sich, dass das Protein bereits bei 50 mM Imidazol mit den Nebenprodukten zu koeluieren begann. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Bindungsaffinität des His_6-getaggten Proteins nur geringfügig höher als die der Nebenprodukte aus *E. coli* ist. Diese Schlussfolgerung wurde gestützt durch die

Beobachtung, dass eine geringere Menge an Ni-NTA nicht die Menge und Intensität der Nebenbanden relativ zur CCHFV-Endonuklease verringern konnte.

Die Reinheit des Proteins ließ sich mittels Nickel-Affinitätschromatographie durch Variation der Bindungs- und Elutionsbedingungen nicht optimieren. Daher wurde im nächsten Schritt eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Das Protein hat einen mittels Protparam berechneten isoelektrischen Punkt von 5,2.

Bei einem pH-Wert von 7,5 ist das Protein aufgrund des niedrigen isoelektrischen Punktes negativ geladen, vorrausgesetzt, die Aminosäuren sind an der Oberfläche des Proteins exponiert. Aufgrund fehlender struktureller Informationen über das Protein ist jedoch der durch Protparam kalkulierte pI-Wert der einzige Anhaltspunkt für die Abschätzung der Säure-Base-Eigenschaften.

Zur weiteren Reinigung wurde die Anionenaustauschchromatographie mit einer Source 15Q-Säule genutzt. Die Elutionsfraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie wurden vereint, bis zu einer Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt, auf die Source 15Q-Säule geladen und mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert.

Im Durchfluss der Source 15Q-Säule befand sich kein Protein. Die CCHFV-Endonuklease sowie die Nebenprodukte binden unter den gewählten Bedingungen (Leitfähigkeit und pH-Wert) an das Säulenmaterial.

Bereits ab einer NaCl-Konzentration von ca. 130 mM zeigte sich ein starker Anstieg des UV-Signals, die zugehörigen Fraktionen zeigten im SDS-Polyacrylamidgel eine prominente Bande, die der CCHFV-Endonuklease zugeordnet wurde. Die Bindungsaffinität des Proteins ist folglich sehr gering. Zudem zeigte sich bei geringfügig erhöhter Leitfähigkeit Koelution des Proteins mit den Nebenprodukten aus *E. coli*. Die Bindungaffinität der *E. coli*-Nebenprodukte ist folglich nur geringfügig höher als die der CCHFV-Endonuklease.

Eine Separation des Proteins von den Nebenprodukten gelang durch Einführung eines Stufengradienten im Elutionsprofil der Anionenaustausch-chromatographie mit konstanter Elution bei einer Leitfähigkeit von 15 mS/cm über 20 mL. Das zugehörige Chromatogramm zeigt Abbildung 7 A. Die verbesserte Reinheit zeigt das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 7 D.

Das Chromatogramm zeigt einen prominenten Peak bei einer Leitfähigkeit von 13 mS/cm. Erst durch weitere Erhöhung der Leitfähigkeit wurden die

Nebenprodukte eluiert. Die Methode der Anionenaustausch-Chromatographie wurde erfolgreich genutzt, um die Reinheit der CCHFV-Endonuklease zu erhöhen.

Das Protein besitzt hinter dem His_6-Tag eine 3C-Spaltungssequenz. Zur Entfernung des His_6-Tags wurde das Protein mit 3C-Protease über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei allen Chargen der Reinigung war die proteolytische Abspaltung des His_6-Tags sehr ineffizient. Zur vollständigen Abspaltung des His_6-Tags wurde das Protein für vier Tage bei 20 °C inkubiert. Die Stabilität des Proteins für diesen Zeitraum wurde mittels SDS-PAGE bestätigt.

Die 3C-Protease ist mit einem N-terminalen GST-Tag fusioniert, sodass zu deren Entfernung die Bindung an Glutathion-Sepharose genutzt werden konnte.

Zur Beurteilung der Oligomerisierung sowie zur Überführung in einen Kristallisations-Startpuffer wurde das Protein anschließend mittels Größenausschlusschromatographie von möglichen Oligomeren getrennt. Zur Anwendung kam eine Superdex 200-Säule. Abbildung 7 B zeigt das Chromatogramm mit einem prominenten Peak bei einem Elutionsvolumen von 86 mL, das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 7 E bestätigt die hohe Reinheit der erhaltenen Fraktionen.

Zur Beurteilung der Oligomerisierung wurde ein Größenstandard bestehend aus sieben Proteinen herangezogen. Die Elutionmaxima der den Molekulargewichten 29 kDa, 44 kDa und 75 kDa entsprechenden Referenzproteine sind als gestrichelte Linien im Chromatogramm dargestellt. Mit einem Elutionsvolumen von 86 mL liegt das 35,5 kDa große Protein zwischen den Größenstandards für 29 kDa und 42 kDa, es eluiert also als Monomer (vgl. Abbildung 29, Anhang).

Die erhaltenen Fraktionen konnten bis zu einer Proteinkonzentration von 15 mg/mL mit beginnender Präzipitation eingeengt werden. Die Ausbeute betrug ca. 1 mg pro L Zellkultur.

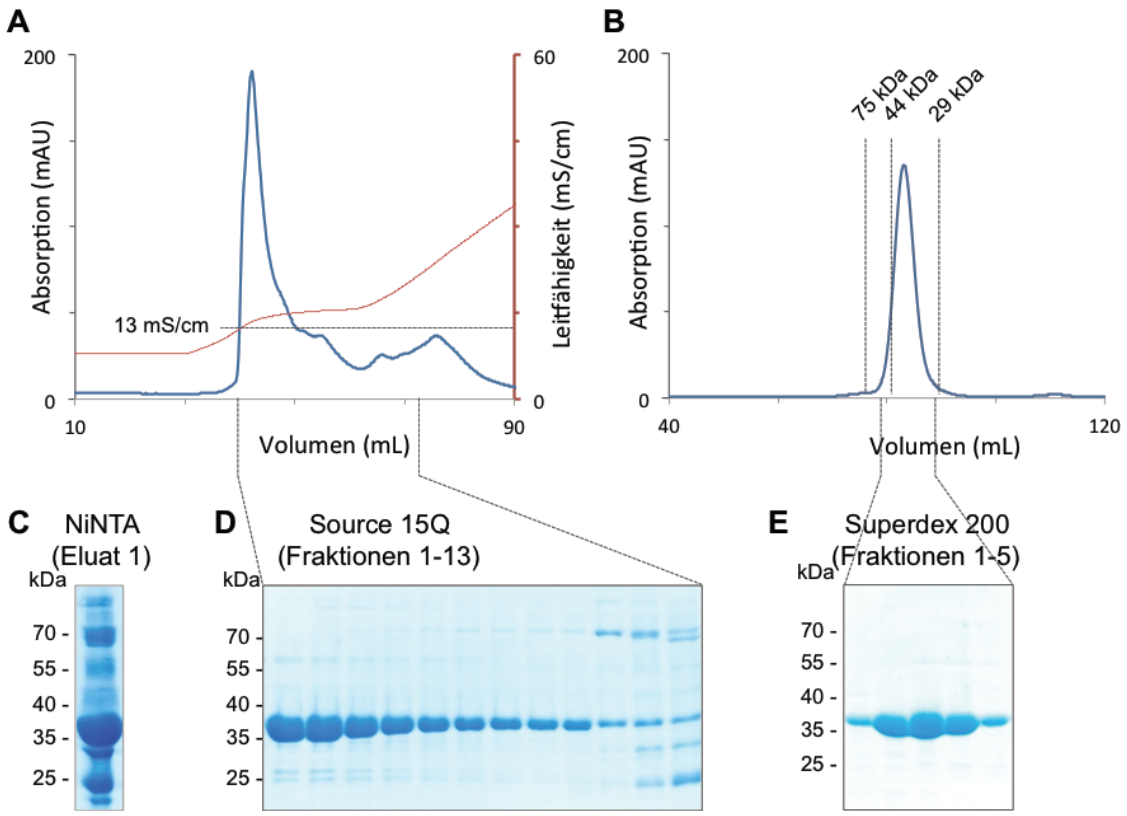


Abbildung 7: Reinigung des CCHFV-Endonuklease CC_05

Die CCHFV-Endonuklease wurde mit N-terminalem His_6-Tag und 3C-Spaltungssequenz in *E. coli* BL21 in 3 L TB-Medium mit 0,5 mM IPTG bei 17 °C über 16 h exprimiert. Nach dem Resuspendieren und Sonifizieren der Zellen in Lysispuffer (80 mM NaH_2PO_4, pH 6,8, 1 M NaCl, 5% Glycerol, 10 mM Imidazol, 0,1 mM PMSF) wurde das native Protein durch Nickel-Affinitätschromatographie aus dem Überstand der Zentrifugation isoliert. Die Elution erfolgte in Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol **(C)**. Die vereinigten Eluate wurden mit einem Verdünnungspuffer (20 mM Tris, pH 7,5, 2,5% Glycerol) auf eine elektrische Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt. **(A)** Die weitere Reinigung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie an einer Source 15Q-Säule (Säulenvolumen 10 mL). Die Säule wurde mit dem Puffer AE-01 (20 mM Tris, 80 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,5) äquilibriert und mit den verdünnten Eluaten beladen. Die CCHFV-Endonuklease wurde durch konstante Elution für 2 Säulenvolumen bei 10 % Puffer AE-02 (20 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl, 5% Glycerol), entsprechend 15 mS/cm von den Nebenprodukten getrennt. Abbildung A zeigt das Chromatogramm und Abbildung **(D)** das zugehörige SDS-Polyacrylamidgel. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 200 Säule weiter getrennt **(B)**. Die gestrichelten Linien zeigen die Elutionsmaxima eines Größenstandards mit entsprechenden Molekulargewichten (vgl. Abbildung 29, Anhang). **(E)** zeigt das SDS-Polyacrylamidgel der erhaltenen Fraktionen.

3.3 Untersuchungen zur Domänenstruktur der CCHFV-Endonuklease

3.3.1 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse ist ein bewährtes Verfahren, um die Domänenstruktur eines Proteins zu untersuchen und ein für die Kristallisation optimiertes Protein zu erhalten. Dies ist beispielsweise für die LACV-Endonuklease gelungen. Hier wurde nach Verdau mit Subtilisin ein geringfügig verkürztes Fragment erhalten, das erfolgreich kristallisiert und zur Strukturauflösung genutzt werden konnte [49].

Es wurde davon ausgegangen, dass globuläre Domänen weniger proteasezugänglich sind als flexible, ungefaltete Bereiche und damit einer höheren Konzentration einer Protease eher standhalten.

Die CCHFV-Endonuklease wurde seriellen Verdünnungsreihen vier verschiedener Proteasen bei 20 °C für 1 h ausgesetzt. Die Proteasen wurden anschließend mit 0,1 mM PMSF inhibiert und durch Erhitzen in SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C inaktiviert.

Abbildung 8 zeigt das bei der limiterten Proteolyse mit vier verschiedenen Proteasen entstehende Fragmentierungsmuster. Dabei fällt auf, dass bei keiner Protease ein Fragment entsteht, das nur geringfügig kleiner ist als das Protein. Stattdessen entsteht bei allen Proteasen ein Muster aus zwei charakteristischen Fragmenten, einem im Bereich zwischen 10 kDa und 15 kDa und einem zwischen 15 kDa und 25 kDa.

Die Laufhöhen und die Stabilitäten der jeweiligen Fragmente unterschieden sich bei den Proteasen und sind beim Trypsin-Verdau am stabilsten. Bei niedrigen Trypsin-Konzentrationen entsteht zunächst ein intermediäres Fragment, das mit dem Erscheinen des kleinen Fragments wieder verschwindet.

Zum Vergleich der Fragmente wurde der Trypsin-Verdau auch mit einem His_6-getaggten Protein durchgeführt (vgl. Abbildung 9). Dabei fiel auf, dass das kleinere Fragment gegenüber dem nicht His_6-getaggten Protein ein höheres Molekulargewicht hat, während das größere Fragment bei beiden gleich groß ist. Das kleinere Fragment 2 muss also den His_6-Tag enthalten und wird damit einem N-terminalen Fragment zugeordnet. Das höhere Molekulargewicht zeigt sich auch für das zunächst entstehende Fragment 1 (vgl. Abbildung 9 B). Durch Massenspektrometrie wurde in dem größeren Fragment der C-Terminus und in dem kleineren Fragment der N-

Terminus des Proteins identifiziert. Dies wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

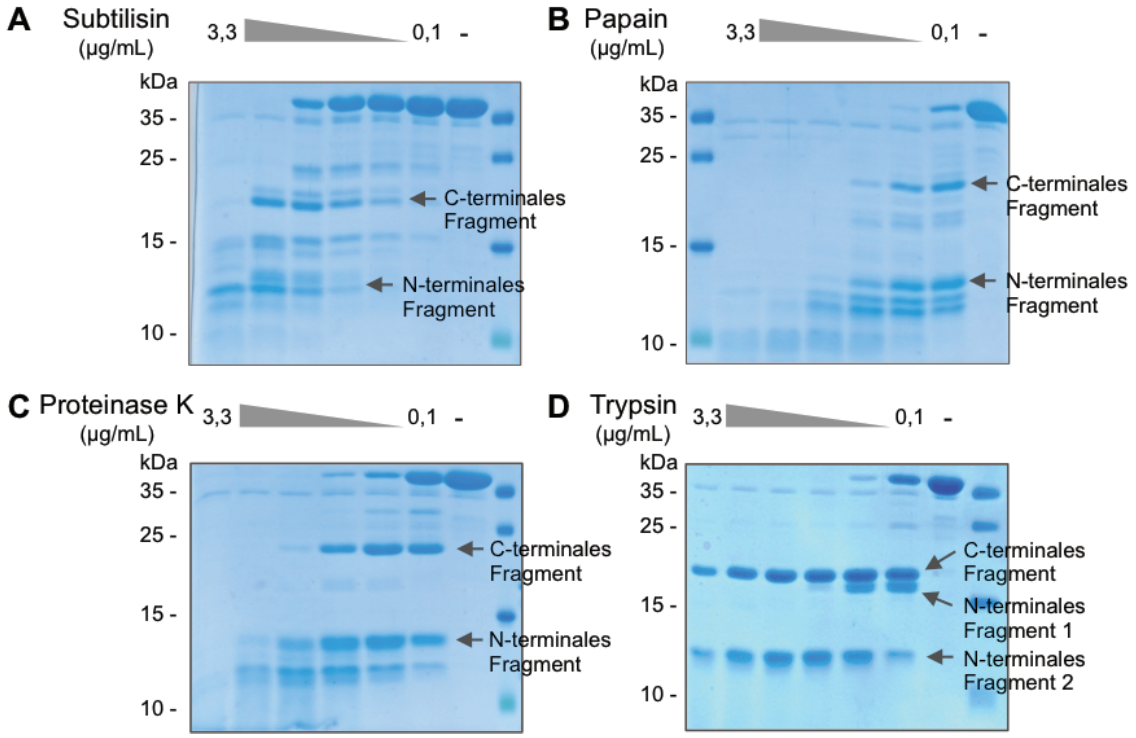


Abbildung 8: Limitierte Proteolyse der CCHFV-Endonuklease mit vier Proteasen

Die CCHFV-Endonuklease (0,1 mg/mL) wurde in 15 µL Assaypuffer (Tris 20 mM, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glycerol) mit sechs gleichen Verdünnungen vier verschiedener Proteasen zwischen 0,1 und 3,3 µg/mL für 1 h bei 20 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von PMSF 5 µL SDS-Probenpuffer und Erhitzen für 5 min bei 95 °C gestoppt. Die erhaltenen Proteinfragmente wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert **(A-D).** In allen Gelen zeigen sich im Fragmentierungsmuster zwei besonders deutliche Banden. Diese sind jeweils mit einem Pfeil markiert. Die Zuordnung der Banden erfolgte basierend auf massenspektrometrischer Sequenzierung.

3.3.2 Massenspektrometrische Sequenzierung der erhaltenen Fragmente

Aus dem Fragmentierungsmuster der limitierten Proteolyse wurde geschlussfolgert, dass die CCHFV-Endonuklease aus zwei Domänen besteht, die über einen proteasezugänglichen Linker miteinander verbunden sind. Die massenspektrometrische Untersuchung der erhaltenen Fragmente sollte dazu dienen, die Grenzen der einzelnen Domänen zu identifizieren.

Für das unverdaute Protein zeigt sich eine Sequenzabdeckung von 58%. Dabei ist besonders zu erwähnen, dass sowohl der native N-Terminus als auch der native C-Terminus abgedeckt wurden. Die Rohdaten sind in Abbildung 27 im Anhang aufgeführt.

Im größeren Fragment wurde ein Peptid detektiert, das dem C-Terminus zuzuordnen ist und mit der Aminosäure S895 endet. Das auf der Sequenz erste detektierte Peptid beginnt an der Position K734. Damit reicht das Proteinfragment von der Aminosäure K734 bis S895 und enthält 161 Aminosäuren. Innerhalb dieses Bereiches beträgt die Sequenzabdeckung 40%. Die molare Masse des gesamten Fragmentes liegt gemäß Protparam bei 18,7 kDa, was mit der Laufhöhe auf dem SDS-Polyacylamidgel korreliert.

Für das kleinere Fragment ist die Sequenzabdeckung deutlich geringer. Es wurde nur ein N-terminales Peptid aus 13 Aminosäuren detektiert, das den N-Terminus der CCHFV-Endonuklease beginnend ab Aminosäure I587 enthält. Zusätzlich enthält das Peptid N-terminal Glycin und Prolin, was den Rest der 3C-Spaltungssequenz zur Abspaltung des His_6-Tags darstellt.

Die C-terminale Grenze des N-terminalen Fragmentes konnte nicht identifiziert werden.

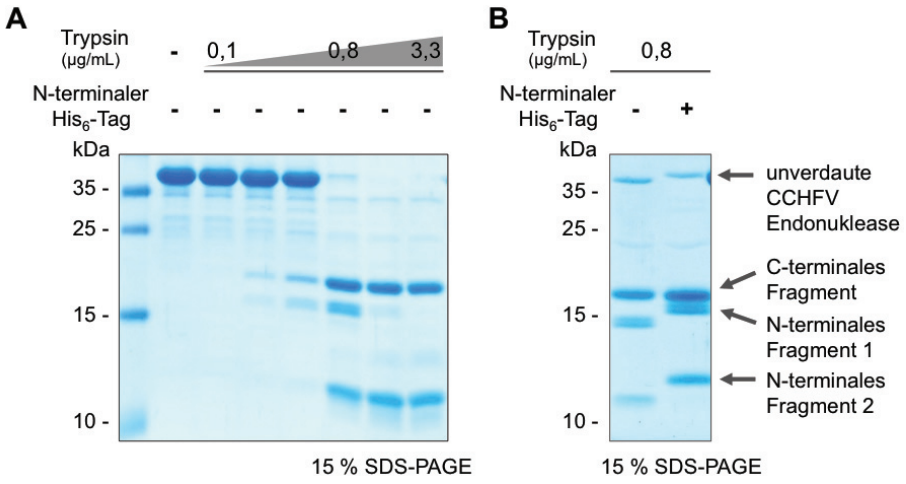


Abbildung 9: Limitierte Proteolyse der CCHFV-Endonuklease mit Trypsin und Charakterisierung der erhaltenen Fragmente

Die CCHFV-Endonuklease (0,1 mg/mL) wurde in 15 µL Puffer (Tris 20 mM, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glycerol) mit sechs Verdünnungen von Trypsin zwischen 0,1 und 3,3 µg/mL bei 4 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µL SDS-Probenpuffer und Erhitzen für 5 min bei 95 °C gestoppt. (A) Die erhaltenen Proteinfragmente wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. (B) Der Versuch wurd sowohl mit His_6-getaggtem Protein als auch mit nicht His_6-getaggtem Protein bei einer Konzentration von 0,8 µg/mL durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt das höhere Molekulargewicht der N-terminalen Fragmente 1 und 2 nach Verdau des His_6-getaggten Proteins.

Aus der Detektion eines N-terminalen Peptides wurde jedoch geschlussfolgert, dass das gesamte Fragment eindeutig dem N-Terminus des Proteins zuzuordnen ist.

Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte, dass das größere Fragment der limitierten Proteolyse dem C-Terminus des Proteins CC_05 zugeordnet werden kann. Da das Fragment mit der Aminosäure K734 beginnt, kann es nicht das für die Metallionenbindung benötigte Aspartat in Position D693 enthalten. Folglich enthält das Fragment nicht das vollständige, strukturell intakte aktive Zentrum der Endonuklease und kommt zur alleinigen Expression nicht infrage.

Aus der Beobachtung ist zu schlussfolgern, dass neben dem N-terminalen Fragment und dem C-terminalen Fragment ein zusätzliches Fragment herausgeschnitten wird, das auf dem SDS-Polyacrylamidgel nicht erscheint. Eine Koexpression der Fragmente kam daher nicht infrage. Dieser Bereich liegt innerhalb der Endonuklease-Domäne in der Nähe des aktiven Zentrums und scheint aus der Domäne für eine Protease zugänglich herauszustehen. Demgegenüber scheinen N- und C-Terminus des Protein sehr rigide und nicht proteasezugänglich zu sein.

3.3.3 Nachweis der Interaktion des N- und C-terminalen Proteolysefragments

Aus den atomaren Strukturen der bereits bekannten bunyaviralen Endonukleasen weiß man, dass die α-Helices des N-Terminus großflächig mit α-Helices des C-Terminus der Domäne interagieren. Es stellte sich die Frage, ob dies auch für die CCHFV-Endonuklease zutrifft. In diesem Fall wäre zu postulieren, dass die durch Trypsin-Verdau entstandenen Fragmente einen Komplex bilden und möglicherweise über den His_6-Tag am N-terminalen Fragment von einer Ni-NTA koeluiert werden können. Das nach etabliertem Protokoll für 1 h bei 20 °C mit 0,8 µg/mL Trypsin behandelte Protein wurde mit Ni-NTA inkubiert und gründlich mit Waschpuffer gespült, um überschüssiges Trypsin zu entfernen. Die Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abbildung 10 A).

Die Koelution beider Proteinfragmente war ein erster Nachweis der Interaktion dieser Fragmente und beweist die Hypothese, dass beide Fragmente einen stabilen Komplex bilden. Zum weiteren Nachweis diente Größenausschlusschromatographie. Das zugehörige Chromatogramm im Vergleich zum unbehandelten Protein zeigt die Abbildung 10 B. Beide Fragmente des Trypsin-behandelten Proteins eluierten gemeinsam von der Säule, jedoch etwas später als das unbehandelte Protein. Das veränderte Laufverhalten lässt auf eine kleinere und/oder kompaktere Form des Komplexes schließen.

Unter der Annahme, dass die Interaktion der Fragmente über die N- und C-terminalen α-Helices vermittelt wird, war die Koelution beider Fragmente ein erster Hinweis auf strukturelle Homologie der CCHFV-Endonuklease zu verwandten bunyaviralen Endonukleasen.

Das unbehandelte Protein wird fortwährend als Referenz bezeichnet. Das mit Trypsin behandelte Protein dient als Vergleich.

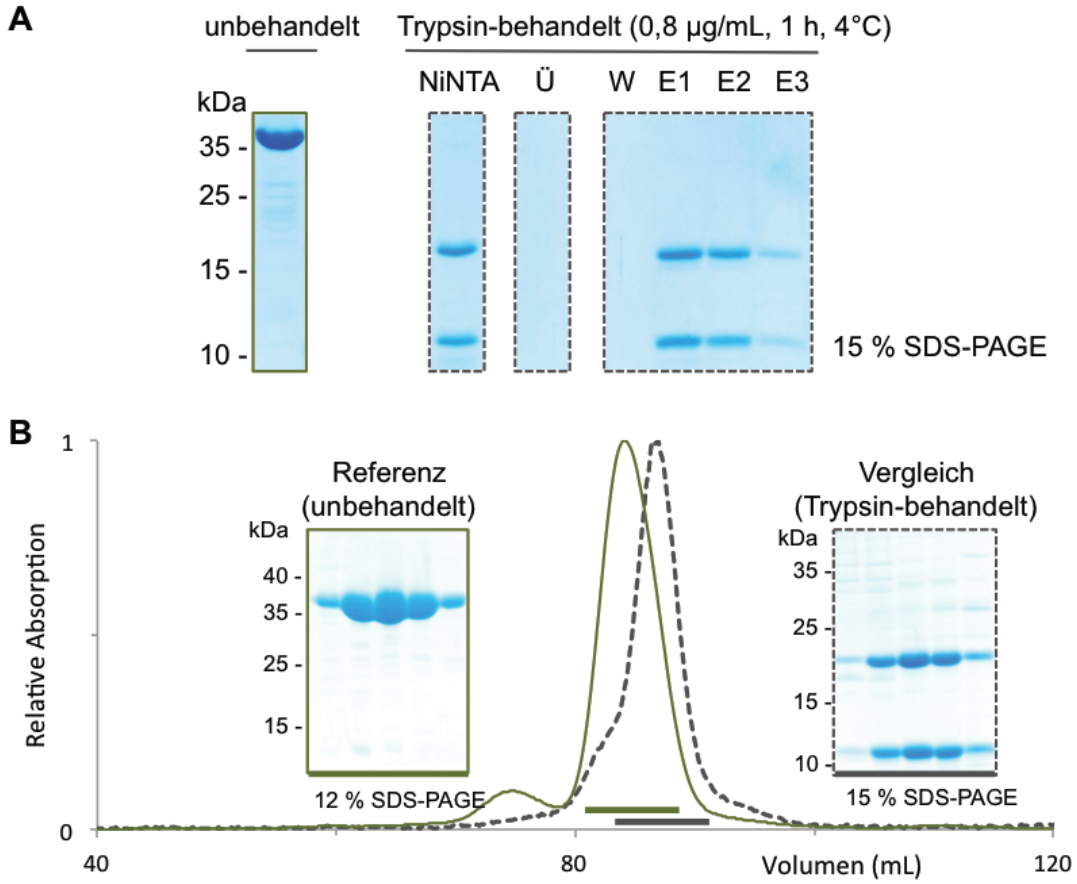


Abbildung 10: Nachweis der Interaktion der durch Trypsin-Behandlung aus der CCHFV-Endonuklease erhaltenen Fragmente

Die CCHFV-Endonuklease wurde aus 4,5 L *E. coli*-Expression gereinigt und dient als „unbehandelte" Referenz. Die Hälfte des erhaltenen Proteins wurde für 1 h bei 20 °C mit 0,8 µg/mL Trypsin behandelt und dient als „Trypsin-behandelter" Vergleich. **(A)** Grün eingerahmt ist das unbehandelte Referenzprotein. Das nach Trypsin-Behandlung erhaltene Vergleichsprotein (grauer Rahmen) wurde mit Ni-NTA inkubiert. Ü zeigt den Überstand, W die vereinigten Waschschritte und E1 bis E3 die Eluate mit 250 mM Imidazol. **(B)** Die erhaltenen Eluate wurden auf 2 mL eingeengt, mittels Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 200-Säule getrennt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die graue, gestrichelte Linie zeigt das erhaltene Absorptionssignal, grau umrahmt ist das SDS-Polyacrylamidgel der erhaltenen Fraktionen. Die grüne Linie zeigt das Absorptionssignal des Referenzproteins, grün umrahmt ist das SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen unter dem Absorptionsmaximum.

3.3.4 Nachweis des strukturell intakten, aktiven Zentrums

Die durch Trypsin-Verdau erhaltenen Fragmente bilden einen stabilen Komplex. Dieser Komplex ist kleiner als das unverdaute Protein, was mit dem Herausscheiden eines Fragmentes in der Nähe des aktiven Zentrums assoziiert wird. Von diesem Fragment wird angenommen, dass es eine proteasezugängliche Insertion bildet, die aus der Domäne heraussteht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Fragmente dem N- und C-Terminus des Proteins entsprechen. Vergleicht man die Größe der entstandenen Fragmente mit der Proteinsequenz, scheint der Bereich zu fehlen, der essentielle Aminosäuren des aktiven Zentrums enthält. Deshalb sollte gezeigt werden, ob das Trypsin-behandelte Protein noch das aktive Zentrum enthält.

Als Indikator für die Präsenz des aktiven Zentrums wurde die Bindung von katalytisch relevanten Metallionen herangezogen. Die Stabilisierung des Trypsin-verdauten Komplexes durch 10 mM Manganchlorid wurde im Vergleich zur Stabilisierung des nicht Trypsin-verdauten Proteins mittels Thermofluor-Assay gemessen. Abbildung 11 A zeigt den ähnlichen Verlauf der Schmelzkurven. Der Zusatz von Manganchlorid führte bei beiden zu einer Verschiebung der Denaturierungstemperatur um etwa 6 °C. Als Negativkontrolle wurde das Experiment mit der Mutante D693A wiederholt. Die Denaturierungskurven zeigen auch hier eine ähnliche Denaturierungstemperatur für das Protein und den Komplex. Der Zusatz von Manganchlorid führt jedoch zu keiner Verschiebung der Denaturierungstemperatur.

Mit diesem Experiment konnte die Präsenz des Aspartat-Restes und ein strukturell intaktes, aktives Zentrum im Komplex des Trypsin-Verdaus eindeutig nachgewiesen werden.

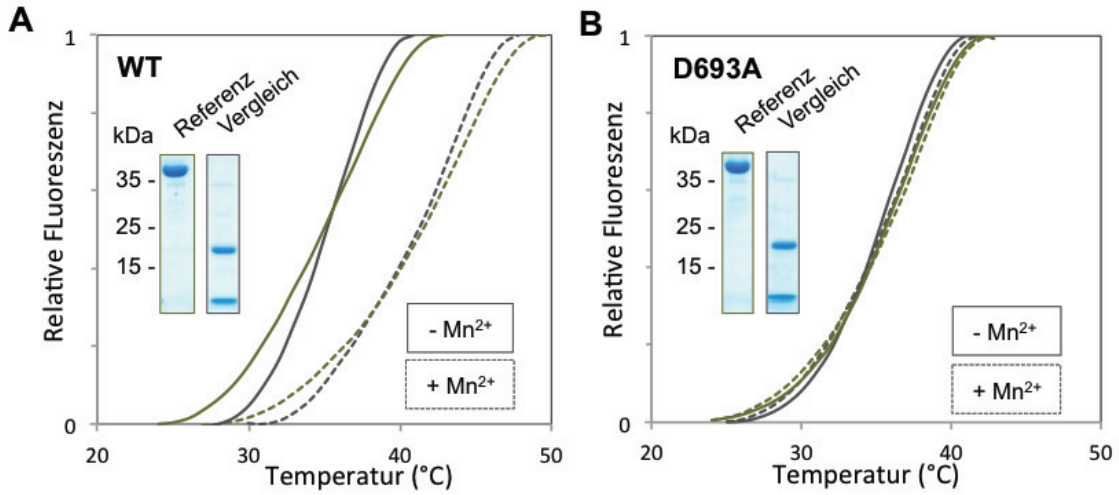


Abbildung 11: Nachweis des strukturell intakten, aktiven Zentrums im Komplex aus N- und C-terminalem Fragment nach Trypsin-Behandlung

(A) Die thermische Stabilisierung von 0,1 mg/mL des unbehandelten Referenzproteins (grüne Linie) durch 10 mM $MnCl_2$ (grün gestrichelte Linie) wurde mit der von 0,1 mg/mL des für eine 1 h bei 20 °C mit 1,7 µg/mL Trypsin behandelten Vergleichsproteins (grau gestrichelte Linie) mittels Thermofluor-Assay verglichen. **(B)** Die Trypsin-Behandlung und der Thermofluor-Assay wurden wie in (A) mit der Mutante D693A wiederholt. Der vollständige Verdau wurde jeweils durch SDS-PAGE bestätigt.

3.4 SAXS-Strukturen des CCHFV-Endonuklease

Das identifizierte Endonuklease-Protein ist ein artifizielles Fragment des CCHFV L-Proteins. Die gute Löslichkeit des Proteins und dessen Fähigkeit zur Bindung von Metallionen lässt auf ein strukturell intaktes aktives Zentrum schließen. Auch die bei Endonukleasen verwandter Viren beobachtete Interaktion zwischen N- und C-terminalen α-Helices scheint bei der CCHFV-Endonuklease vorhanden zu sein.

Mithilfe der Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) sollte die Struktur des Trypsin-behandelten Proteins (Vergleich) ermittelt und mit der des unbehandelten Proteins (Referenz) verglichen werden. Beim Zutreffen der Hypothese, wonach die N- und C-terminalen α-Helices ein stabiles α-Helixbündel bilden, wäre zu erwarten, dass die SAXS-Strukturen des Vergleichs- und Referenzproteins große Übereinstimmungen zeigen.

Zusätzlich sollte die Methode zum Nachweis der Monodispersität der Proteine dienen und damit eine Qualitätskontrolle für die Eignung zur Kristallisation sein.

3.4.1 Auswertung und Vergleich der Streudaten

Die CCHFV-Endonuklease wurde zur Messung nach etabliertem Protokoll frisch exprimiert und gereinigt und heißt im weiteren Verlauf „Referenzprotein“. Die Hälfte des Referenzproteins wurde der Behandlung mit 0,8 µg/mL Trypsin bei 20 °C für 1 h unterzogen. Der erhaltene Komplex wurde mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie isoliert und gereinigt und heißt im weiteren Verlauf „Vergleichsprotein“. Abbildung 10 B zeigt die SDS-Polyacrylamidgele der durch Größenausschlusschromatographie erhaltenen Eluate von Vergleich und Referenz. Die jeweiligen Eluate werden vereinigt und eingeengt.

Die Aufnahme der SAXS-Daten erfolgt gemäß Methode 2.2.13. Abbildung 12 zeigt die Auswertung der SAXS-Daten sowie die Strukturen beider Proteine.

Die Intensität I(s) der Streuung als Funktion des Streuvektors s ist für beide Proteine im Abbildungsteil A logarithmisch dargestellt. Die erhaltene Streukurve des Referenzproteins ähnelt derjenigen des Vergleichsproteins.

Aus der Streuintensität bei kleinen Streuwinkeln wurden mittels Guinier-Analyse die Gyrationsradien R_g ermittelt. Die Streudaten beider Proteine zeigen in der Guinier-Auftragung einen linearen Verlauf, was auf monodisperses Protein schließen lässt. Aus der linearen Regression der Streudaten ergibt sich ein Gyrationsradius von R_g = 26,7 Å für das Referenzprotein und ein etwas kleinerer R_g = 26,1 Å für das Vergleichsprotein.

Der geringere Gyrationsradius bestätigt, dass sich das Referenzprotein in Größe und Dichteverteilung geringfügig vom Vergleichsprotein unterscheidet.

Mittels GNOM erfolgte die Transformation der Streudaten in eine P(r)-Verteilung, die die Häufigkeit aller Abstände zweier Punkte des Moleküls als Häufigkeitsverteilung darstellt. Die P(r)-Verteilung eignet sich gut für einen ersten Vergleich der Formen des Referenzproteins und des Vergleichsproteins (vgl. Abbildung 12 B).

Die Kurve des Referenzproteins verläuft asymmetrisch. Der Anstieg der Kurve ist im Bereich kleiner Abstände steiler als der Abfall der Kurve im Bereich höherer Abstände. Diese Asymmetrie in der P(r)-Verteilung lässt darauf schließen, dass das Protein eine längliche Form hat.

Die P(r)-Verteilung des Vergleichsproteins ähnelt dem des Referenzproteins sehr stark. Auch hier zeigt sich die Asymmetrie. Die D_{max}-Werte betragen bei beiden 90 Å.

Geringfügige Unterschiede zeigen sich in der Verteilung höherer Abstände. Die Kurve des Vergleichsproteins ist im Bereich höherer Abstände linksverschoben, woraus hervorgeht, dass das Protein schmaler ist. Der mittels P(r)-Verteilung bestimmte Gyrationsradius liegt für das Referenzprotein bei R_g = 27,2 Å, für das Vergleichsprotein bei R_g = 26,6 Å. Der Unterschied in den Gyrationsradien um eine Differenz von 0,6 Å zeigt gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Guinier-Analyse.

3.4.2 Ab-initio Strukturmodellierung

Aus den prozessierten Streudaten wurden die SAXS-Strukturen beider Proteine berechnet (vgl. Abbildung 12 C und 12 D). Die SAXS-Strukturen ähneln sich sehr, sie präsentieren sich in der Draufsicht als längliche, flache Form mit einem verdickten mittleren Teil und einer Längenausdehnung von D_{max} = 90 Å. In der Seitenansicht ist eine leichte Wölbung ersichtlich.

Unterschiede zwischen beiden Strukturen zeigen sich im mittleren Teil. Er ist bei der SAXS-Struktur des Vergleichsproteins weniger verdickt als bei dem Referenzprotein. Das jeweils obere und untere Ende zeigt in beiden Darstellungen jedoch vergleichbare Formen und Ausdehnungen.

Im Ergebnisteil 3.3 wurde nachgewiesen, dass im Bereich des Restes K734 der Aminosäuresequenz ein Fragment durch Trypsin herausgeschnitten wird. Dieser Bereich wird mit der geringeren Verdickung der SAXS-Struktur des mit Trypsin behandelten Proteins in Zusammenhang gebracht. Aus der Beobachtung wird geschlussfolgert, dass dieser auf der Primärsequenz zentral liegende Abschnitt auch in der Struktur zentral angeordnet ist.

Die SAXS-Analyse zeigt die zuvor vermutete strukturelle Integrität des nach Trypsin-Verdau erhaltenen Komplexes. Die nachgewiesene Spaltung durch Trypsin führt nicht dazu, dass die Fragmente sich in wässriger Lösung voneinander lösen oder flexibel aneinander hängen. Die Fragmente bilden stattdessen einen stabilen Komplex, dessen errechnetes Strukturmodell nur geringfügig von dem des unverdauten Proteins abweicht.

Diese Ergebnisse belegen erneut eine stabile Interaktion des N-Terminus der CCHFV-Endonuklease mit dessen C-Terminus.

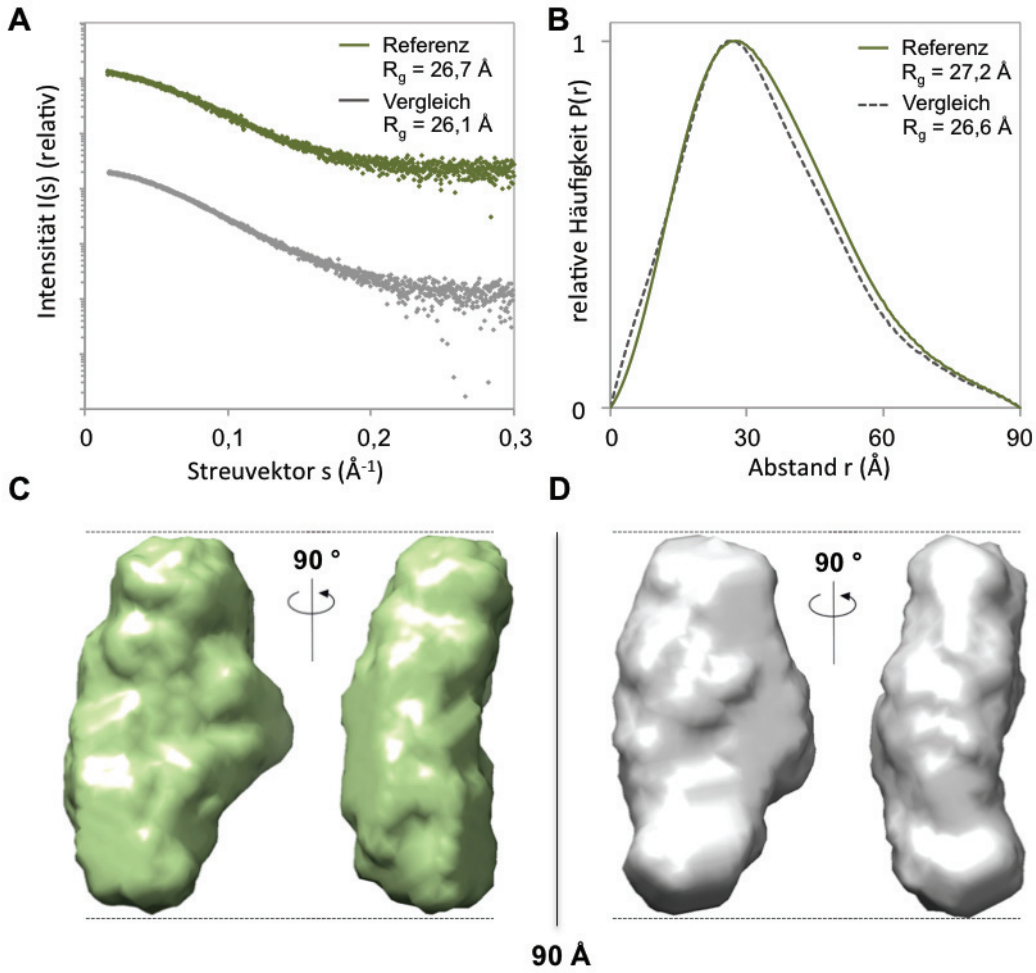


Abbildung 12: Vergleich der SAXS-Daten und –Strukturen der unbehandelten und Trypsin-behandelten CCHFV-Endonuklease

Die Abbildung zeigt vergleichend die Ergebnisse der SAXS-Analyse der unbehandelten (Referenz, grün) sowie der Trypsin-behandelten (Vergleich, grau) CCHFV-Endonuklease. Die in Abbildung 10 B gezeigten Fraktionen der Gelfiltrationen wurden jeweils vereinigt und eingeengt. Das unbehandelte Protein wurde bei den Konzentrationen 0,7 mg/mL, 1,7 mg/mL und 4,2 mg/mL gemessen. Das Trypsin-behandelte Protein wird bei 0,9 mg/mL, 2,2 mg/mL und 2,5 mg/mL gemessen. Die Messungen erfolgten am EMBL Hamburg an der P12 Beamline. **(A)** Für jedes Protein wurden die drei erhaltenen Streukurven mittels PRIMUS überlagert und vereint. Die Intensitäten I(s) sind als Funktion des Streuvektors s dargestellt, die Gyrationsradien R_g sind mittels Guinier-Analyse ermittelt. **(B)** Mittels GNOM wurden aus den Streukurven die P(r)-Verteilungen bei D_{max} = 90 Å und die Gyrationsradien R_g ermittelt. Die Kurven wurden mittels Excel normiert und überlagert dargestellt (grün – Referenz, grau gestrichelt – Vergleich). Mittels GASBOR wurden 30 Modelle berechnet, mittels DAMSEL und DAMAVER verglichen und gemittelt. Die Oberflächen der Modelle des unbehandelten Proteins (Referenz, grün) sind in **(C)** dargestellt, die des Trypsin-behandelten Proteins (Vergleich, grau) in **(D)**. Die Darstellung der Modelle erfolgte mit UCSF Chimera. Beide Modelle sind in der Draufsicht sowie in der Seitenansicht dargestellt.

3.5 Endonukleasen verwandter Nairoviren

Anhand der bisherigen experimentellen Beobachtungen kann die Endonuklease des CCHFV als globuläre Domäne zwischen den Positionen 587 und 895 des L-Proteins postuliert werden. Das in *E. coli* exprimierte Protein konnte durch ein vierstufiges Reinigungsprotokoll in hoher Reinheit erhalten werden. Das Protein ist in wässiger Lösung monodispers und bis zu einer Konzentration von 15 mg/mL stabil. Es scheint deshalb für Kristallisationsansätze sehr gut geeignet zu sein. Um die Chance zum Kristallisieren einer nairoviralen Endonuklease zu erhöhen, wurden analog zum CCHFV die Endonuklease-Domänen fünf weiterer nairoviraler L-Proteine identifiziert.

3.5.1 Identifizierung der Endonukleasen ausgewählter nairoviraler L-Proteine

Die für das CCHFV L-Protein identifizierte Endonuklease-Domäne wurde anhand der Sequenz und der Sekundärstrukturvorhersage in nairoviralen L-Proteinen miteinander verglichen. Abbildung 13 zeigt die identifizierten Domänengrenzen sechs nairoviraler L-Proteine und eine graphische Darstellung des Grades an Sequenzkonservierung (> 40% Sequenzidentität).

Die identifizierten Grenzen der Endonuklease-Domänen der untersuchten Nairoviren sind nicht identisch, sondern unterscheiden sich in ihrer Position auf den jeweiligen L-Proteinen. Die identifizierten Domänen zeigen unterschiedliche Längen und damit unterschiedliche Molekulargewichte. In Abbildung 13 sind die Endonuklease-Domänen von oben nach unten mit abnehmendem Molekulargewicht geordnet. Die Endonuklease-Domäne des Dugbe-Virus (DUGV) ist mit 45,7 kDa die Größte, die des Erve-Virus (EREV) mit 32,0 kDa die Kleinste.

Der Aspartat-Rest aus dem katalytischen Motiv der Endonuklease (D693 bei CCHFV) ist konserviert und befindet sich in allen Endonukleasen in Position 106 relativ zum Beginn der Domäne.

Die N-terminalen 172 Aminosäuren und die C-terminalen 99 Aminosäuren sind konserviert, während sich in der Mitte der Sequenz unkonservierte Insertionen variabler Längen befinden. Für die DUGV-Endonuklease ist diese Insertion mit 130 Aminosäuren am längsten, für die EREV-Endonuklease mit 7 Aminosäuren am kürzesten. Die gestrichelte Linie verdeutlicht, dass die Insertionen nicht maßstabsgetreu dargestellt sind. Die Variabilität in diesem Bereich ist der Grund für die unterschiedlichen Molekulargewichte der Proteine.

3.5.2 Löslichkeit und Thermostabilität ausgewählter Endonukleasen

Die Klonierung und Expression von fünf identifizierten Endonukleasen erfolgte mit N-terminalem His_6-Tag. Der Löslichkeitsscreen erfolgt nach Methode 2.2.7. Alle Proteine wurden löslich exprimiert. Die Ausbeuten der Expressionen waren jedoch unterschiedlich hoch: die Ausbeute war für die EREV-Endonuklease am höchsten. Für die Endonukleasen des Dugbe-Virus (DUGV) und des Tofla-Virus (TOFV) war sie auch nach Optimierungsversuchen derart niedrig, dass diese Proteine nicht weiter verfolgt wurden.

Abbildung 13 B zeigt für die vier ausgewählten nairoviralen Endonukleasen von CCHFV, EREV, Nairobi-Sheep-Disease-Virus (NSDV) und Hazara-Virus (HAZV) das Ergebnis der Größenausschlusschromatographie der final gereinigten Proteine. Das jeweilige Molekulargewicht der Endonukleasen spiegelt sich im Elutionsvolumen wider. Alle Proteine eluieren als Monomere, keines der Proteine zeigt Aggregation.

Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Laufhöhen der gereinigten Endonukleasen. Das optimierte Reinigungsprotokoll wird im folgenden Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

Abbildung 14 zeigt die mittels Thermofluor-Assay bestimmten Denaturierungstemperaturen der vier nairoviralen Endonukleasen. Dargestellt ist für jedes Protein die Denaturierungstemperatur nach Zugabe von 4 mM $MnCl_2$, 4 mM $MgCl_2$ und 4 mM $CaCl_2$ im Vergleich zu 4 mM EDTA. Alle Proteine zeigen eine vergleichbare Zunahme an thermischer Stabilität. Die größte Stabilisierung wurde mit Manganionen detektiert ($\Delta T_m \approx 6$ °C), eine etwas schwächere Stabilisierung mit Magnesiumionen und Calciumionen ($\Delta T_m \approx 4{,}5$ °C)

Aus der gegenüber der CCHFV-Endonuklease gleichartigen Bindung von zweiwertigen Metallionen wird die Präsenz eines strukturell intakten, aktiven Zentrums und nativer Konformation der Proteine geschlussfolgert. Scheinbar beeinflussen also die variablen Insertionen nicht die Struktur des aktiven Zentrums. Fraglich ist jedoch, welche Rolle sie dann für die Struktur des Proteins spielen.

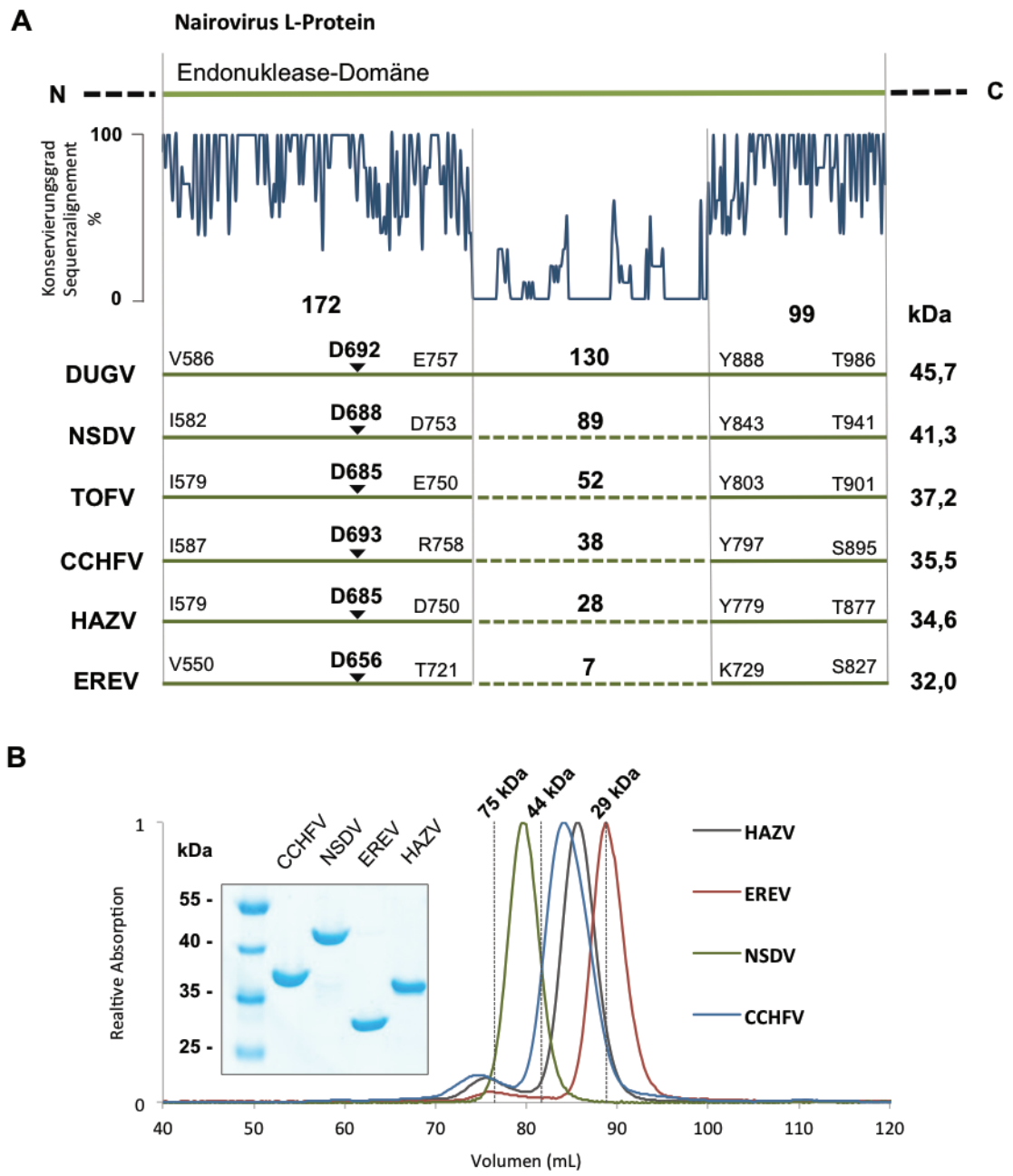


Abbildung 13: Identifizierung und Größenvergleich ausgewählter nairoviraler Endonukleasen

(A) Schematische Darstellung des Sequenzvergleichs der Endonuklease-Domänen sechs nairoviraler L-Proteine, berechnet mit PRALINE [95]. Der in blau dargestellte Konservierungsgrad ergibt sich aus dem Konservierungsgrad jeder einzelnen Aminosäure und ist in Bezug zur Länge der DUGV-Endonuklease dargestellt. Maßstabsgerechte Sequenzabschnitte sind als durchgezogene Linie, nicht-maßstabsgerechte als gestrichelte Linie dargestellt. Die Zahlen über den Sequenzabschnitten zeigen die Anzahl der Aminosäuren des Sequenzabschnittes. Die Definition konservierter Abschnitte erfolgt durch PRALINE ab einem Konservierungsgrad größer als 40%. Rechts neben den Sequenzabschnitten ist das theoretische Molekulargewicht der Endonuklease-Domänen angegeben.
(B) Größenausschlusschromatogramme der in *E. coli* exprimierten und gereinigten Endonukleasen vier nairovialer L-Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Die gestrichelten Linien zeigen die Elutionsvolumen von Referenzproteinen als Größenmarker. Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt die unterschiedlichen Molekulargewichte der gereinigten Proteine.

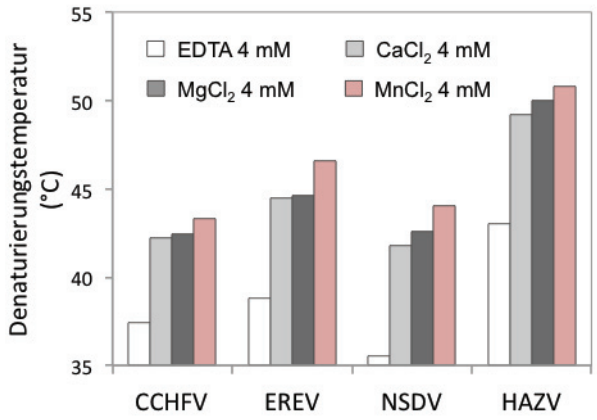


Abbildung 14: Thermostabilisierung ausgewählter nairoviraler Endonukleasen durch zweiwertige Metallionen

Die thermische Stabilisierung von 3 µM der entsprechenden Endonuklease in 25 µL Assaypuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,5) wird mittels Thermofluor-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt für vier nairovirale Endonukleasen die thermische Stabilisierung in Anwesenheit von 4 mM $MnCl_2$, 4 mM $MgCl_2$ oder 4 mM $CaCl_2$ im Vergleich zur Kontrolle mit 4 mM EDTA.

3.5.3 Reinigungsoptimierung der EREV-, HAZV- und NSDV-Endonukleasen

Die Endonukleasen der Viren EREV, HAZV und NSDV zeigen geringfügig unterschiedliche physikochemische Eigenschaften, weshalb die Reinigungsprotokolle jeweils neu optimiert werden mussten.

Die Proteine wurden inital analog der CCHFV-Endonuklease mit N-terminalem His_6-Tag exprimiert. Die Proteine konnten mittels Nickel-Affinitätschromatographie aus dem *E. coli*-Zelllysat isoliert werden. Die Bindungsaffinität aller Proteine zur Ni-NTA ist vergleichbar mit der CCHFV-Endonuklease. In allen Imidazol-Eluaten lagen Verunreinigungen vor, was auf die schwache Bindungsaffinität des His_6-getaggten Proteins im Vergleich zu Nebenprodukten aus *E. coli* hindeutet. Dies wurde im Abschnitt 3.2 bereits für CCHFV beschrieben.

Die vorhergesagten isoelektrischen Punkte sind für die Endonukleasen des HAZV und NSDV vergleichbar mit CCHFV, was sich in vergleichbarem Elutionsverhalten in der etablierten Anionenaustauschchromatographie widerspiegelte.

Der vorhergesagte isoelektrische Punkt der EREV-Endonuklease liegt mit 6,3 deutlich höher. Die Bindungsaffinität an die Source Q-Matrix war deutlich geringer und dieses Material kann nicht genutzt werden, um das Protein reproduzierbar von Nebenprodukten zu trennen. Das Protein zeigt bei einem pH-Wert von 7,5 zudem schwache Bindung an einen Kationenaustauscher, die durch einen Citrat-Puffer mit

dem pH-Wert 6,0 erhöht werden konnte. Die Stabilität des Proteins bei diesem pH-Wert wurde zuvor mittels Thermofluor-Assay nachgewiesen. Die Bindungsaffinität an eine Heparin-Säule war gegenüber dem Kationenaustauscher höher, sodass als zweiter Reinigungsschritt die Kationenaustauschschromatographie mit einer HiTrap-Heparinsäule etabliert wurde. Die HAZV- und NSDV-Endonuklease zeigten keine Bindung an die Heparin-Säule.

Bei der Abspaltung des His_6-Tags zeigten sich Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit. Der His_6-Tag der HAZV-Endonuklease konnte auch nach 4 Tagen bei 20 °C nicht abgespalten werden. Demgegenüber gelang die Abspaltung bei der EREV- und NSDV-Endonuklease bei 4 °C über Nacht quantitativ. Die bessere Zugänglichkeit der 3C-Spaltungssequenz eröffnete die Möglichkeit, beide Endonukleasen mit einem Fusionsprotein zu exprimieren. Dies ermöglichte eine alternative Reinigungsmethode. Die Proteine wurden in ein pOPIN-J-Plasmid zur Expression mit N-terminalem GST-Tag kloniert. Die Ausbeute und Löslichkeit des mittels Glutathion-Affinitätchromatographie isolierten Fusionsproteins GST und der EREV-Endonuklease war sehr gut, für NSDV war sie deutlich niedriger.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch das optimierte Reinigungsprotokoll der EREV-Endonuklease. Nach der Bindung an die Glutathion-Sepharose wurde das GST-Fusionsprotein durch Koinkubation mit 3C-Protease vom GST-Tag abgespalten. Diese Spaltung verlief bereits nach 4 h bei 20 °C quantitativ. Im Durchfluss der Glutathion-Matrix befand sich nur das Protein. Die GST-3C-Protease sowie freies GST verblieben an die Glutathion-Matrix gebunden (vgl. Abbildung 15 C)

Durch SDS-PAGE-Analyse ließen sich noch wenige Nebenprodukte detektieren. Diese konnten durch Kationenaustauschchromatographie entfernt werden (vgl. Abbildung 15 A und 15 D). Das Chromatogramm der Superdex 200-Säule bestätigt, dass das Protein als Monomer vorliegt, das zugehörige SDS-Polyacrylamidgel bestätigt die hohe erzielte Reinheit.

Durch die Fusion mit GST-Tag konnte bereits im ersten Schritt die Reinheit des Proteins gegenüber dem His_6-getaggten Protein deutlich erhöht werden.

Die EREV-Endonuklease konnte gegenüber den anderen Endonukleasen in höchster Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Die Ausbeute war für die NSDV-Endonuklease am geringsten. Die Ausbeute der HAZV-Endonuklease war vergleichbar mit der CCHFV-Endonuklease, jedoch konnte hier der His_6-Tag nicht entfernt werden.

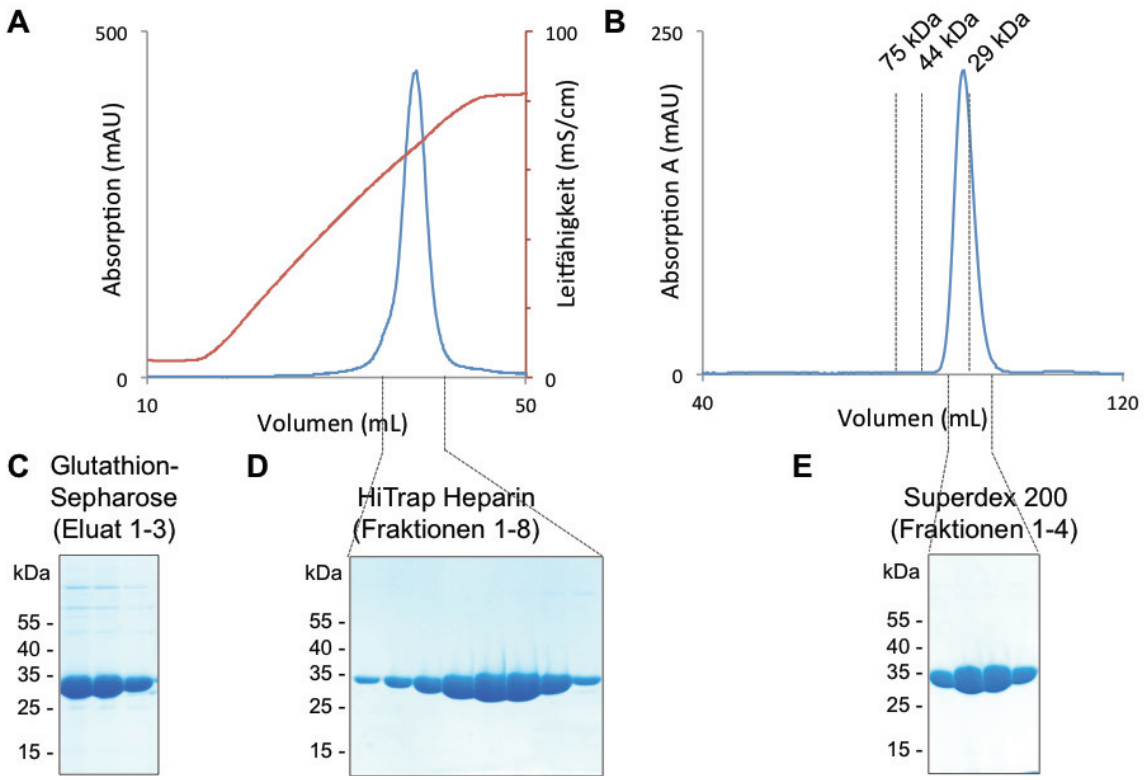


Abbildung 15: Reinigung der EREV-Endonuklease

Die EREV-Endonuklease wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* in 3 L TB-Medium exprimiert. Nach dem Resuspendieren und Sonifizieren der Zellen in Lysispuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF) wurde das native Protein durch Glutathion-Affinitätschromatographie aus dem Überstand der Zentrifugation isoliert. Der GST-Tag wurde durch Koinkubation mit GST-getagger 3C-Protease für 4 h bei 20 °C abgespalten **(C)**. Das Protein wurde durch Kationenaustauschchromatographie an einer HiTrap Heparin-Säule mit konstantem NaCl-Gradienten weiter gereinigt **(A, D)**. Mittels Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 200-Säule konnte das Protein als Monomer erhalten werden **(B)**. Die hohe Reinheit wurde durch SDS-PAGE bestätigt **(E)**

3.5.4 SAXS-Strukturen der EREV- und NSDV-Endonukleasen

Die Endonukleasen des EREV und NSDV konnten für strukturbiologische Untersuchungen in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden.
Die Berechnung und Interpretation der SAXS-Struktur der CCHFV-Endonuklease wurde in Abschnitt 3.4 beschrieben. Um die Position des variablen Bereiches in der Mitte der Domäne zu identifizieren, wurden die SAXS-Strukturen der EREV- und NSDV-Endonukleasen wie unter Kapitel 2.2.13 beschrieben berechnet. Die NSDV-Endonuklease besitzt in diesem Bereich 82 Aminosäuren mehr als die EREV-Endonuklease, die CCHFV-Endonuklease liegt mit 31 Resten mehr etwa in der Mitte.
Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der SAXS-Messung. Dargestellt sind die Intensität I(s) als Funktion des Streuvektors s (A), die Abstandsverteilungsfunktion P(r) (B) und die *ab-initio* mittels GASBOR modellierten SAXS-Strukturen für die EREV-, NSDV- und CCHFV-Endonuklease in der Draufsicht (C) sowie in der Seitenansicht (D). Schon die mittels Guinier-Analyse errechneten Gyrationsradien von R_g = 29,3 Å für NSDV und R_g = 22,2 Å für EREV spiegeln die erwarteten Größenunterschiede wider. Dies wird auch in den P(r)-Verteilungen deutlich: Die Unterschiede in den Gyrationsradien stimmen mit der Guinier-Analyse überein. Der Gyrationsradius der CCHFV-Endonuklease liegt mit R_g = 26,7 Å erwartungsgemäß zwischen den beiden Endonukleasen. Die maximale Längenausdehnung D_{max} beträgt für EREV D_{max} = 73 Å und für CCHFV und NSDV D_{max} = 90 Å. Auch wenn die groben Formen der Verteilungskurven vergleichbar sind, zeigt sich eine erhöhte Häufigkeit größerer Abstände, je größer das Protein ist. Die NSDV-Endonuklease scheint also nicht einfach eine maßstäbliche Vergrößerung der EREV-Endonuklease zu sein, sondern ist in eine Richtung verlängert. Diese Beobachtungen wurden anhand der *ab-initio*-Strukturen bestätigt: In der Draufsicht präsentieren sich die GASBOR-Modelle als längliche Strukturen mit einem leicht verdickten mittleren Teil. In der um 90° gedrehten Seitenansicht zeigt sich eine leichte Wölbung beider Strukturen. Wie schon am Gyrationsradius deutlich wurde, ist die NSDV-Endonuklease größer als die CCHFV-Endonuklease. Die EREV-Endonuklease ist am kleinsten. Im unteren Teil der NSDV-Endonuklease zeigt sich sowohl in der Draufsicht als auch in der Seitenansicht eine Verdickung, die bei CCHFV sehr viel kleiner und bei EREV nicht vorhanden ist.

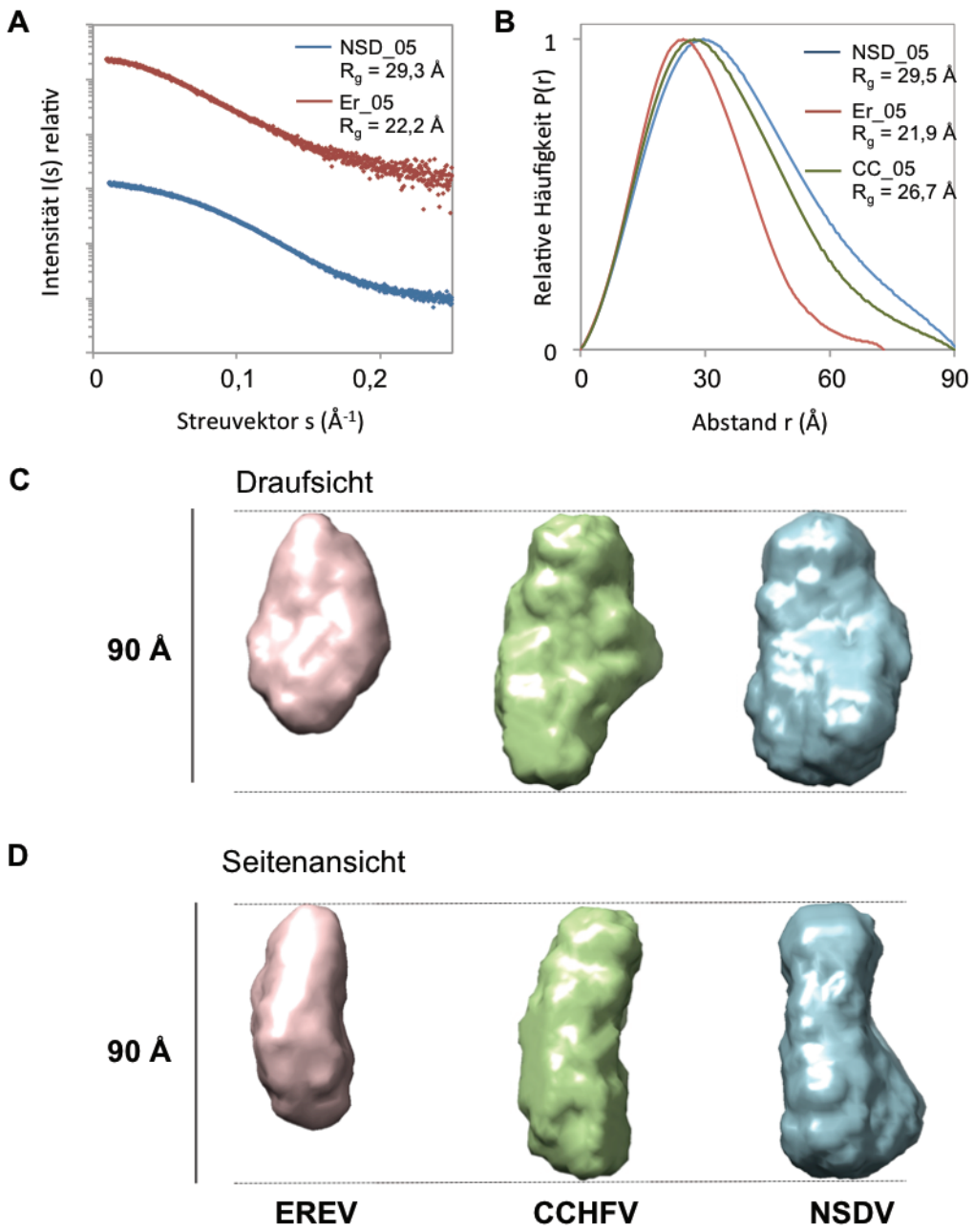


Abbildung 16: Vergleich der Streudaten und SAXS-Strukturen der nairoviralen Endonuklease-Domänen von EREV, CCHFV und NSDV

Die Abbildung zeigt vergleichend die Ergebnisse der SAXS-Analyse der Endonukleasen von EREV und NSDV sowie im Vergleich CCHFV. Die Proteine wurden entweder als GST-Fusionsprotein (EREV) oder als His_6-getaggtes Protein (NSDV) in *E. coli* exprimiert und nach etabliertem Protokoll gereinigt. Die Messungen erfolgten am EMBL Hamburg an der P12 Beamline bei drei Konzentrationen **(A)**. Für jedes Protein wurden die drei erhaltenen Streukurven mittels PRIMUS überlagert und vereint. Die Intensitäten sind als Funktion des Streuvektors s dargestellt, die Gyrationsradien R_g wurden mittels Guinier-Analyse ermittelt. **(B)** Mittels PRIMUS wurde aus den Streukurven die P(r)-Verteilung mit D_{max} = 90 Å ermittelt. Die Kurven wurden mittels Excel normiert und überlagert dargestellt (rot – EREV, blau – NSDV, grün – CCHFV). Mittels GASBOR wurden 30 Modelle berechnet, mittels DAMSEL und DAMAVER verglichen und gemittelt. Die Oberflächen der DAMFILT-Modelle wurden mit UCSF Chimera visualisiert und sind in der Draufsicht **(C)** und in der Seitenansicht **(D)** dargestellt (rot – EREV, blau – NSDV, grün – CCHFV).

3.6 Kristallisationsversuche

Hauptziel der Arbeit war die Gewinnung von Proteinkristallen zur röntgendiffraktometrischen Aufklärung der Struktur der CCHFV-Endonuklease.

Zur Erweiterung der Screeningbedingungen wurden zusätzlich die Endonuklease-Domänen des EREV und HAZV für Kristallisationsversuche herangezogen. Alle Proteine konnten in hoher Reinheit produziert werden. Die Bindung von Manganionen wurde mittels Thermofluor-Assay nachgewiesen und bestätigt zusammen mit der SAXS-Analyse die Präsenz des strukturell intakten, aktiven Zentrums sowie die native Konformation der Proteine. Die N-und C-Termini sind Teile einer rigiden Struktur, die durch limitierte Proteolyse nicht angegriffen wird. Die Domäne hat in ihrem Zentrum proteasezugängliche Loops. Die SAXS-Analyse zeigt jedoch, dass die Domäne in ihrer Gesamtheit wenig flexibel ist. Die Proteine wurden daher zur Kristallisation verwendet.

Basierend auf Thermofluor-Assays wurde ermittelt, dass die Proteine in Anwesenheit hoher Konzentrationen an NaCl und niedriger pH-Werte (Citrat, pH 5,5) die höchste Stabilität besitzen. Die initialen Kristallansätze wurden daher in diesem Startpuffer angesetzt. Um einen möglichen komplexierenden Effekt des Citrates auf Metallionen auszuschließen wurde auch die Puffersubstanz Bis-Tris verwendet.

In den Kristallansätzen zeigten sich deutliche Phasenseparation und teilweise Bildung von Mikrokristallen, die sich sandartig auf dem Grund der Tropfen absetzten.

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene Konzentrationen an $MnCl_2$ sowie verschiedene Konzentrationen des Inhibitors DPBA hinzugesetzt. Zusätzlich wurde Trypsin in hohen Verdünnungen den Tropfen hinzugesetzt, um den möglicherweise störenden Loop im zentralen Teil der Domäne zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde auch der nach der Trypsin-Behandlung entstehende Komplex gereinigt und für Kristallisationsansätze verwendet.

Unter keiner der getesteten Bedingungen gelang die Kristallisation einer nairoviralen Endonuklease.

3.7 Biochemische Charakterisierung der RVFV *Cap-Snatching*-Endonuklease

3.7.1 Expression und Reinigung der RVFV-Endonuklease

Das katalytische PD-E/D-K-Motiv der RVFV-Endonuklease konnte durch Sequenzvergleiche im N-Terminus des L-Proteins identifiziert werden. Durch vorhergehende Arbeiten wurde ein lösliches N-terminales Fragment des L-Proteins identifiziert, das an der Position 256 endet. Das Fragment konnte nur in geringer Menge erhalten werden, zeigte Aggregation und ist deshalb für strukturbiologische Untersuchungen nicht geeignet. Durch C-terminale Trunkierungen sollte ein optimiertes Fragment erhalten werden.

Basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen mittels JPred 4.0 wurden acht C-terminale Positionen zwischen den Positionen 174 und 387 identifiziert. Die entsprechenden Gene wurden in pOPIN-F-Plasmide zur Expression mit N-terminalem His_6-Tag kloniert. Die Löslichkeit der Fragmente wurde gemäß Methode 2.2.7 getestet.

Keines der getesteten Fragmente konnte mit hoher Ausbeute hergestellt werden. Deshalb wurden weitere Trunkierungsfragmente kloniert und exprimiert, die sich von dem ursprünglichen Fragment nur um wenige Aminosäuren unterscheiden. Im Ergebnis wurde die Position D248 als optimale C-terminale Grenze der Domäne identifiziert.

Das Protein wurde mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das Protein eluierte als Monomer. Die Reinheit des erhaltenen Proteins ist geringer als die der nairoviralen Endonukleasen (vgl. Abbildung 17 B), Konzentrationen über 3 mg/mL konnten wegen beginnender Präzipitatbildung nicht erreicht werden.

Die Expression und Reinigung konnte sowohl durch andere Affinitäts-Tags (MBP oder GST) als auch durch Variation des Reinigungsprotokolls nicht optimiert werden. Die zur biochemischen Charakterisierung genutzten Mutanten D111A und H79A wurden in Analogie gereinigt und zeigten dementsprechend vergleichbare Reinheit.

Im Rahmen der Masterarbeit von Veronika Brinschwitz wurde versucht, ein äquivalentes Fragment der SFTS-Endonuklease zu exprimieren [106]. Dies gelang jedoch nicht. Ein größeres Fragment konnte mit sehr geringer Ausbeute und Reinheit erhalten werden.

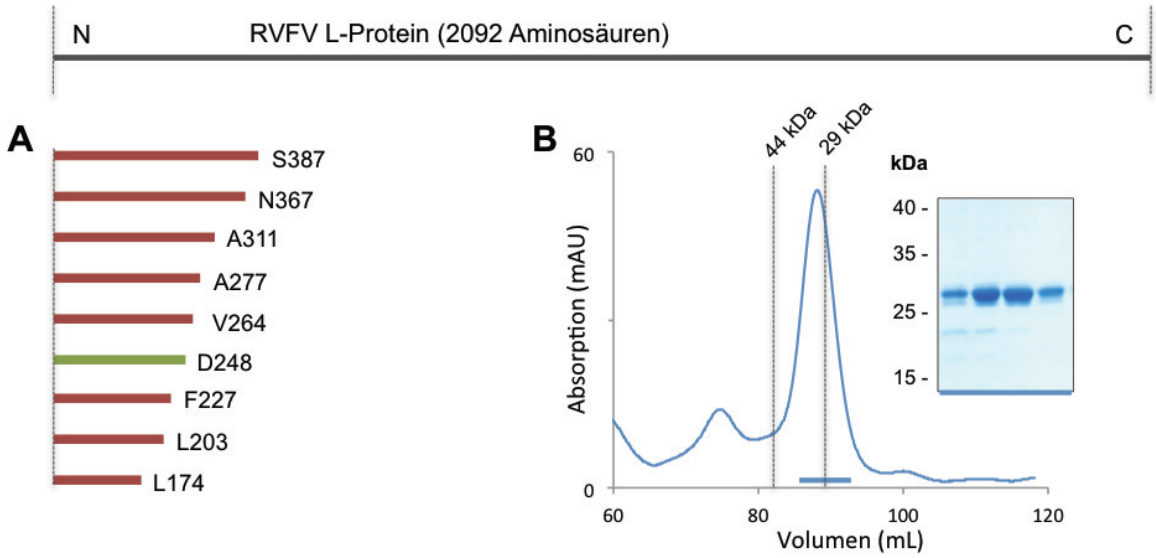


Abbildung 17: Identifizierung und Reinigung der löslichen RVFV-Endonuklease

Die RVFV-Endonuklease wurde durch Sequenzvergleich am N-Terminus des L-Proteins identifiziert. **(A)** Dargestellt ist eine Auswahl der in *E. coli* exprimierten Fragmente, Grünfärbung zeigt Löslichkeit und Rotfärbung zeigt Unlöslichkeit. Das Fragment mit dem C-Terminus in Position D248 wird *E. coli* in 3 L TB-Medium exprimiert. Nach dem Resuspendieren und Sonifizieren der Zellen in Lysispuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF) wird das native Protein durch Nickel-Affinitätschromatographie aus dem Überstand der Zentrifugation isoliert. Die weitere Reinigung erfolgt durch Größenausschlusschromatographie. **(B)** Dargestellt ist das Chromatogramm einer Superdex 200-Säule und das SDS-Polyacrylamidgel der erhaltenen Fraktionen.

3.7.2 Endonuklease-Aktivität und Substratspezifität der RVFV-Endonuklease

Das isolierte Protein wurde mit einem gelbasierten Endonuklease-Assay mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsubstraten gemäß Methode 2.2.11 auf Nukleaseaktivität getestet.

Es wurden jeweils kurze, einzel- und doppelsträngige RNA- und DNA-Substrate einer Länge von 27 Nukleotiden getestet.

Die Menge an Substrat und Produkt nach 60 Minuten und 37 °C wurde durch denaturierende PAGE analysiert. Dabei wurde die Nuklease-Reaktion des Wildtyp-Proteins mit und ohne Manganionen und der Mutante D111A mit Manganionen verglichen (vgl. Abbildung 19). Im oberen Teil des Gels sind die Banden der Substrate zu erkennen, die RNA-Substrate laufen erwartungsgemäß höher als die Banden der DNA-Substrate. Sowohl das Wildtyp-Protein ohne Manganionen, als auch die D111A-Mutanten mit Manganionen zeigten wie erwartet keinen Abbau.

Das Wildtyp-Protein zeigt in Anwesenheit von Manganionen vollständigen Abbau des einzelsträngigen RNA-Substrates. Im unteren Teil des Gels ist klar die Produktbande zu erkennen. Eine schwache Produktbande zeigt sich auch bei allen anderen

Substraten, die Aktivität ist jedoch sehr gering und im Vergleich zu ssRNA vernachlässigbar.
Dieser Phänotyp entspricht denen der bisher bekannten bunyaviralen Endonukleasen.

3.7.3 Identifizierung eines Histidin-Restes im aktiven Zentrum

Für die RVFV-Endonuklease konnte eine den verwandten bunyaviralen Endonukleasen ähnelnde Substrat-Spezifität nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass die RVFV-Endonuklease damit als His(+)-Endonuklease zu klassifizieren ist. Im Folgenden sollte das Protein auf Präsenz eines für His(+)-Endonukleasen charakteristischen Histidin-Restes untersucht werden.
Anhand eines Sequenzvergleichs mit verwandten Phenuiviren ließ sich ein konservierter Histidin-Rest in Position H79 identifizieren (vgl. Abbildung 18). Dieser Rest zeigt im Sequenzvergleich Übereinstimmung mit dem Histidin-Rest H36 der ANDV-Endonuklease sowie mit dem Histidin-Rest H34 der LACV-Endonuklease und liegt im Bereich einer vorhergesagten α-Helix (vgl. Abbildung 18 C). Zum Nachweis, dass dieser Rest an der Koordination von Manganionen im aktiven Zentrum beteiligt ist, wurde die thermische Stabilisierung der Mutante H79A durch Metallionen im Vergleich zum Wildtyp-Protein untersucht.
Die Mutante zeigt mit $\Delta T_m = 2$ °C deutlich verminderte Stabilisierung durch 2 mM $MnCl_2$ als das Wildtyp-Protein (9 °C), was ein erster Nachweis der Zugehörigkeit zu His(+)-Endonukleasen ist.
Zum weiteren Nachweis der funktionalen Relevanz des Histidin-Restes wurde die Endonuklease-Aktivität des Wildtyps mit der Aktivität der Mutante H79A verglichen. Dazu kam ein zeitlich aufgelöster Ribonuklease-Assay mit einem FRET-basierten Substrat zum Einsatz (Methode 2.2.12). Die Aktivität des Enzyms wurde anhand der Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Abbildung 19 B zeigt den Fluoreszenzverlauf des Wildtyps im Vergleich zur Mutante H79A anhand eines exemplarischen Experimentes. Die Fluoreszenzintensität der Mutante H79A blieb vergleichbar niedrig, wie die der Mutante D111A. Diese Beobachtung bestätigt die Relevanz des Histidinrestes sowohl für die Bindung von Manganionen als auch für die Aktivität und ist ein weiterer Beweis für die Klassifizierung der RVFV-Endonuklease als His(+)-Endonuklease.

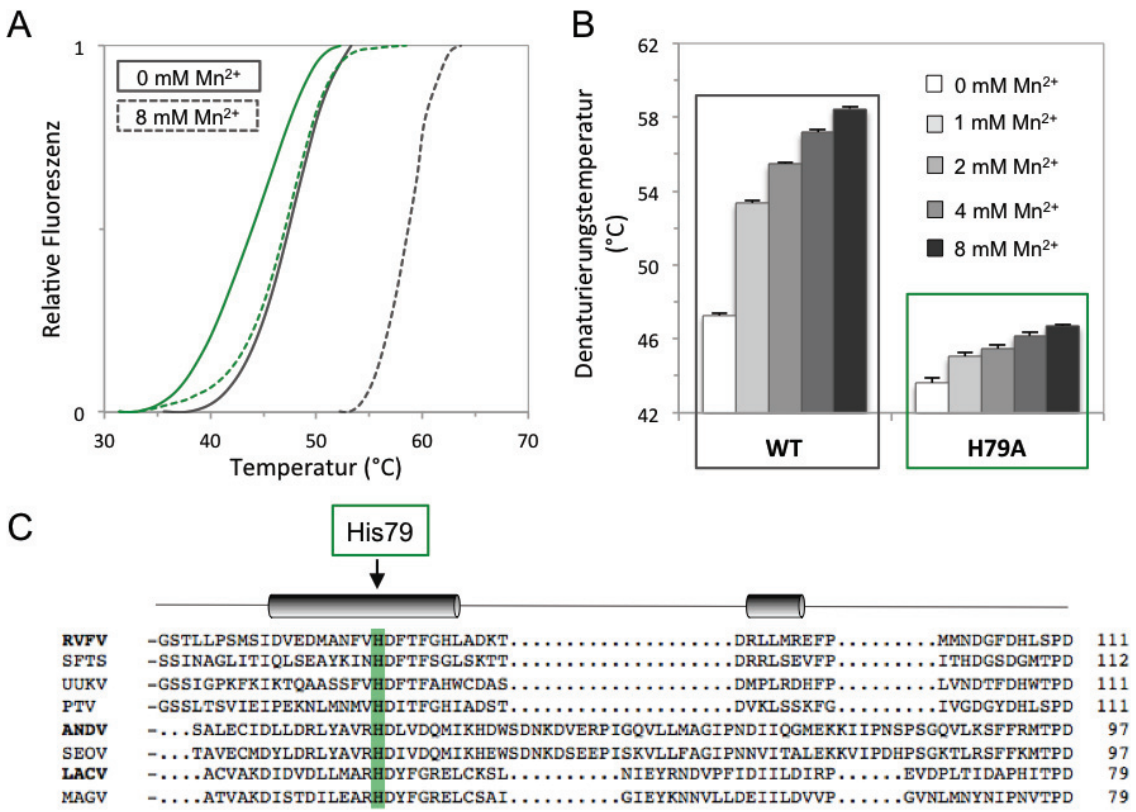


Abbildung 18: Thermische Stabilisierung des Wildtyps und der H79A-Mutante der RVFV-Endonuklease in Anwesenheit von Manganionen

Durch einen Sekundärstrukturvergleich der RVFV-Endonuklease mit drei phenuiviralen, zwei peribunyaviralen und zwei hantaviralen Endonukleasen wurde der Histidinrest H79 identifiziert und durch ortspezifische Mutagenese des Endonuklease-Gensegments zu Alanin mutiert. Die Klonierung, Expression und Reinigung der mutierten Endonuklease erfolgte analog zum Wildtyp-Protein. Die thermische Stabilisierung von 3 µM des entsprechenden Proteins in 25 µL Assaypuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerol) mit verschiedenen Konzentrationen an $MnCl_2$ zwischen 1 mM und 8 mM wurde mittels Thermofluor-Assay bestimmt. Die Fluoreszenzzunahme ist normiert gegen den Temperaturgradienten aufgetragen. Abbildung **(A)** zeigt die Kurven des WT (grau) im Vergleich zur H79A-Mutante (grün) ohne $MnCl_2$-Zusatz (durchgezogene Linie) und mit Zusatz von 8 mM $MnCl_2$ (gestrichelte Linie). Abbildung **(B)** zeigt für die Mutante H79A und das Wildtyp-Protein die Zunahme der Denaturierungstemperaturen als Säulendiagramm bei 4 $MnCl_2$-Konzentrationen im Vergleich zur $MnCl_2$-freien Kontrolle. Abbildung **(C)** zeigt einen Ausschnitt des sekundärstrukturbasierten Sequenzvergleiche zwischen den Resten 60 und 111 (bzgl. der RVFV-Sequenz). Übereinstimmungen der Sekundärstrukturvorhersage mit kristallographisch ermittelten α-Helices sind schematisch durch graue Zylinder dargestellt.

3.7.4 Untersuchung des Einflusses experimenteller Inhibitoren

Gemäß der Arbeitshypothese, dass eine strukturelle Homologie zwischen allen His(+)-Endonuklease vorliegt, wurde eine Inhibition durch für andere Endonukleasen bekannte Inhibitoren erwartet. Die RVFV-Endonukleaseaktivität wurde in Anwesenheit von 2 mM Manganionen und verschiedenen Konzentrationen zweier experimenteller Endonuklease-Inhibitoren mittels FRET-Assay ermittelt. Die Anfangsgeschwindigkeiten (initiale Reaktionsgeschwindigkeiten v_0) wurden aus drei unabhängigen Experimenten für jede Inhibitorkonzentration ermittelt und als Vergleichsparameter für die Enzymaktivität genutzt. Abbildung 19 C zeigt ein Säulendiagramm, bei dem Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bei den einzelnen Konzentrationen der Inhibitoren dargestellt sind.

Beide Inhibitoren zeigen eine ähnliche konzentrationsabhängige Verminderung der Anfangsgeschwindigkeit. 100 µM der Inhibitoren reduzieren die Anfangsgeschwindigkeit auf 7% des Wildtyps. Eine Konzentration von 6,25 µM DPBA reduziert die Geschwindigkeit auf 50%, 6,25 µM PA-30 auf 34% des Wildtyps.

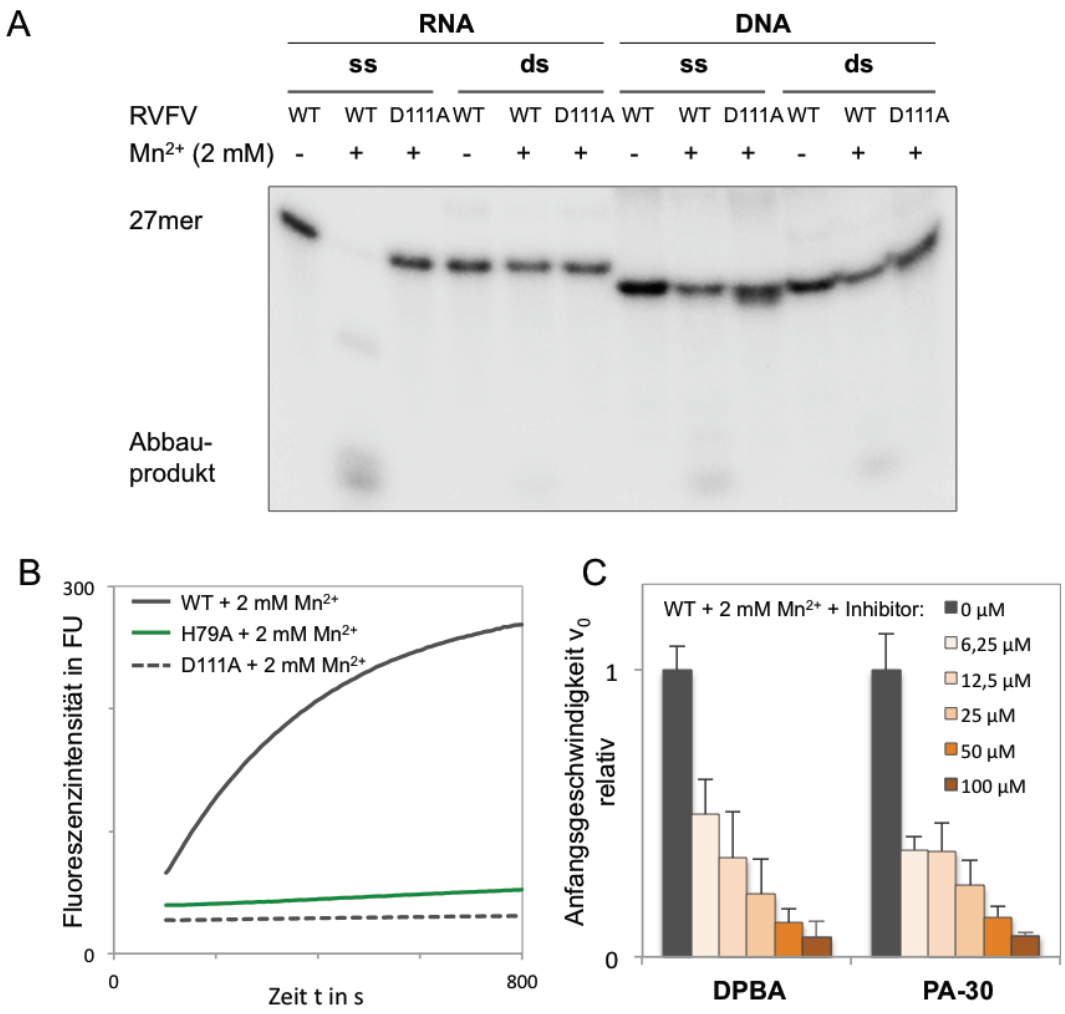


Abbildung 19: Charakterisierung der Endonuklease-Aktivität der RVFV-Endonuklease

Die RVFV-Endonuklease (Wildtyp, D111A- oder H79A-Mutante) wurde in *E. coli* exprimiert und jeweils durch Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. **(A)** 1 µM Protein (WT oder D111A) wurde in 20 µL Assay-Puffer (Tris 50 mM, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerol) mit 0,1 µM einzel- oder doppelsträngigem 27mer RNA oder DNA-Substrate (5'GA^{U}/$_{T}$GA^{U}/$_{T}$GC^{U}/$_{T}$A^{U}/$_{T}$CACCGCGC^{U}/$_{T}$CG^{U}/$_{T}$CG^{U}/$_{T}$C-3') bei 30 °C für 1 h mit oder ohne 2 mM $MnCl_2$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 2x Probenpuffers (95 % Formamid, 18 mM EDTA, 0,025% SDS, Xylencyanol, Bromphenolblau) gestoppt, die Oligonukleotide wurden durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und anschließende Eiskühlung für 5 min denaturiert und linearisiert. Die Separation der Oligonukleotide erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese (7 M Harnstoff, 20% Polyacrylamid, 90 mM Tris-HCl, 80 mM Natriumborat, 2 mM EDTA, 0,1% APS, 0,01% TEMED). Die erhaltenen Banden wurden autoradiographisch mit einem Typhoon FLA 7000 Scanner visualisiert.
Für einen FRET-basierten Endonuklease-Assay wurde 1 µM der RVFV-Endonuklease (WT, D111A und H79A) in 20 µL Assaypuffer in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ mit 0,1 µM eines 12mer polyA FRET-Ribonukleotides (6-FAM-5'AAAAAAAAAAAA-3'BHQ-1) im LightCycler 480 bei 37 °C inkubiert und die Zunahme der Fluoreszenz zwischen 465 und 510 nm über 15 min gemessen. **(B)** Die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit ist exemplarisch für eine Messung für den WT (grau) im Vergleich zur D111A- (grau gestrichelt) und H79A-Mutante (grün) dargestellt. **(C)** Der Einfluss der experimentellen Endonuklease-Inhibitoren DPBA und PA-30 wurde aus den initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v_0 ermittelt. Die v_0-Werte vondrei unabhängigen Messungen wurden gemittelt und in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration als Säulendiagramm mit Standardabweichungen dargestellt.

3.8 Untersuchungen zur Ribonuklease-Aktivität bunyaviraler Endonukleasen

3.8.1 Vergleichende Untersuchung der Aktivität der RVFV-Endonuklease

Für die RVFV-Endonuklease als Vertreter der Familie *Phenuiviridae* wurde eine Manganionen-abhängige Ribonuklease-Aktivität nachgewiesen. Diese Aktivität ist spezifisch für einzelsträngige RNA (ssRNA), jedoch nicht sequenzspezifisch. Die D111A-Mutation führte zu Defizienz der Ribonuklease-Aktivität. Die H79A-Mutation führt zu Verlust der Aktivität und zu verminderter Bindung von Manganionen, wodurch eine Klassifizierung als His(+)-Endonukleasen erfolgte. Zur vergleichenden Betrachtung mit His(+)-Endonukleasen anderer Bunyaviren wurde die ANDV-Endonuklease als Vertreter der Familie *Hantaviridae* und die LACV-Endonuklease als Vertreter der *Peribunyaviridae* herangezogen. Die Klonierung, Expression und Reinigung der Endonuklease-Proteine sowie der aktivitätsdefizienten Aspartat-Mutanten D79A und D97A erfolgt gemäß Fernandez-Garcia *et al.* und Reguera *et al.* [49,70],[49].

Es wurde der Abbau verschiedener RNA-Substrate durch 1 µM LACV- und ANDV-Endonukleasen im Vergleich zur RVFV-Endonuklease gemäß Methode 2.2.11 getestet. Die RNA-Substrate unterschieden sich hinsichtlich Sequenz und Sekundärstruktur. Die Wildtyp-Proteine wurden entweder mit 2 mM $MnCl_2$, 2 mM $MgCl_2$ oder 2 mM $CaCl_2$, die Aktivitätsmutanten D79A, D97A und D111A mit 2 mM $MnCl_2$ für 60 min bei 30 °C inkubiert und mittels denaturierender Gelelektrophorese getrennt (vgl. Abbildung 20 A).

In Abhängigkeit des Substrates und des Metallions zeigen sich in Abbildung 20 A für die RVFV-Endonuklease spezifische Degradierungsmuster, die denen der ANDV- und LACV-Endonuklease ähneln.

Keines der Substrate wurde durch die aktivitätsdefiziente Aspartat-Mutante abgebaut, die Koinkubation mit $MnCl_2$ führte bei allen Endonukleasen mit einzelsträngigem, unstrukturiertem RNA-Substrat zu vollständigem Abbau der Substratbande. In den Gelbanden zeigte sich ausschließlich eine deutliche Produktbande. Dieser Effekt war auch mit $CaCl_2$ zu beobachten. $MgCl_2$ führte bei ANDV zu einem leichten Abbau des Substrats, RVFV und LACV hingegen zeigten keinen Abbau der Substrate mit $MgCl_2$.

Im Unterschied zu den unstrukturierten, einzelsträngigen RNA-Substraten war der Abbau der strukturierten RNA-Substrate unvollständig und es sind mehr Zwischenprodukte in den Gelbanden erkennbar. Das doppelsträngige RNA-Substrat wurde durch keines der Endonuklease-Proteine abgebaut.
Zusammenfassend wurde beobachtet, dass der Substratabbau durch die RVFV-Endonuklease in Bezug auf Sekundärstruktur- und Metallionenpräferenz dem Substratabbau durch die LACV- und ANDV- Endonuklease ähnelt. Im Ergebnis dieser Untersuchung kann damit eine funktionale Homologie der RVFV Endonuklease zu His(+)-Endonukleasen postuliert werden.

3.8.2 Vergleichende Untersuchung der Aktivität nairoviraler Endonukleasen

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur *Cap-Snatching*-Endonuklease von CCHFV lassen darauf schließen, dass Nairoviren auf ihrem L-Protein eine den verwandten bunyaviralen Familien strukturell homologe Endonuklease besitzen. Die Endonukleasen der L-Proteine des CCHFV, EREV und NSDV konnten löslich exprimiert und gereinigt werden.
Für die Endonukleasen der Nairoviren CCHFV, EREV und NSDV wird analog dem RVFV funktionale Homologie zu verwandten Bunyaviren und daher ein ähnlicher Nuklease-Phänotyp angenommen.
Gemäß der Arbeitshypothese, dass auch alle nairoviralen Endonukleasen Manganionen-abhängig einzelsträngige RNA abbauen, wurden in einem gelbasierten Endonuklease-Assay 1 µM des entsprechenden Proteins analog der RVFV-Endonuklease auf Abbau von 0,1 µM eines einzel- und doppelsträngigen RNA- und DNA-Substrates getestet (vgl. 3.7.2). Im Ergebnis zeigte sich jedoch, dass keines der Substrate durch die nairoviralen Endonukleasen abgebaut wurde. Zur Identifizierung möglicher Sekundärstruktur- oder Sequenzpräferenz seitens des Substrates oder Präferenzen seitens des gebundenen Ions wurden anschließend verschiedene RNA-Substrate getestet und als zusätzliche Kontrolle die His(-)-Endonuklease des LCMV mitgeführt. Die Expression und Reinigung der LCMV-Endnuklease erfolgte gemäß Morin *et al.*[107].
Abbildung 20 B zeigt die radiographisch ausgewerteten Gele für fünf verschiedene Substrate. Die Reaktionen wurden zusammen mit den LACV-, ANDV-, LCMV- und

RVFV-Endonukleasen mit identischem Puffer angesetzt, sodass die Gele in Abbildung 20 A als Positivkontrolle gelten.

Keine der nairoviralen Endonukleasen zeigte einen Abbau der Substrate. Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Endonuklease-Aktivität unter den getesteten Bedingungen nicht derjenigen verwandter bunyaviraler Endonukleasen entspricht.

Um die mangelnde Endonuklease-Aktivität der nairoviralen Proteine reproduzierbar nachzuweisen, wurden verschiedene Parameter varriiert: eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 4 µM und der Manganionen-Konzentration auf 10 mM konnte keinen Abbau der Substrate erzielen. Unter der Annahme, dass zur Aktivität eines Enzyms zunächst die Bindung des Substrates notwendig ist, wurden die Pufferbedingungen dahingehend verändert, dass eine stärkere Bindung des RNA-Substrates an das Protein zu erwarten wäre. Auch eine Verringerung des pH-Wertes auf pH = 5,5 und eine stufenweise Verringerung der NaCl-Konzentration führte nicht zu detektierbarer Nukleaseaktivität. Zur Untersuchung einer Sequenz- oder Sekundärstrukturspezifität wurde ein *in-vitro*-Transkript (IVT) mit einer Länge von ca. 470 Nuleotiden erzeugt, das eine hohe Sequenzvariabilität und verschiedene Sekundärstruktur enthält (vgl. Abbildung 21). Ein Abbau des Substrates wurde für die LACV-, ANDV- und RVFV-Endonukleasen in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ nachgewiesen, die CCHFV- und EREV-Endonukleasen zeigten auch an diesem Substrat keine Aktivität.

Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte Ribonuklease-Aktivität für die nairoviralen Enonukleasen nachgewiesen werden. Die Proteine verhielten sich wie die LCMV-Endonuklease, für die ebenfalls keine Aktivität unter den vorliegenden Bedingungen zu sehen war.

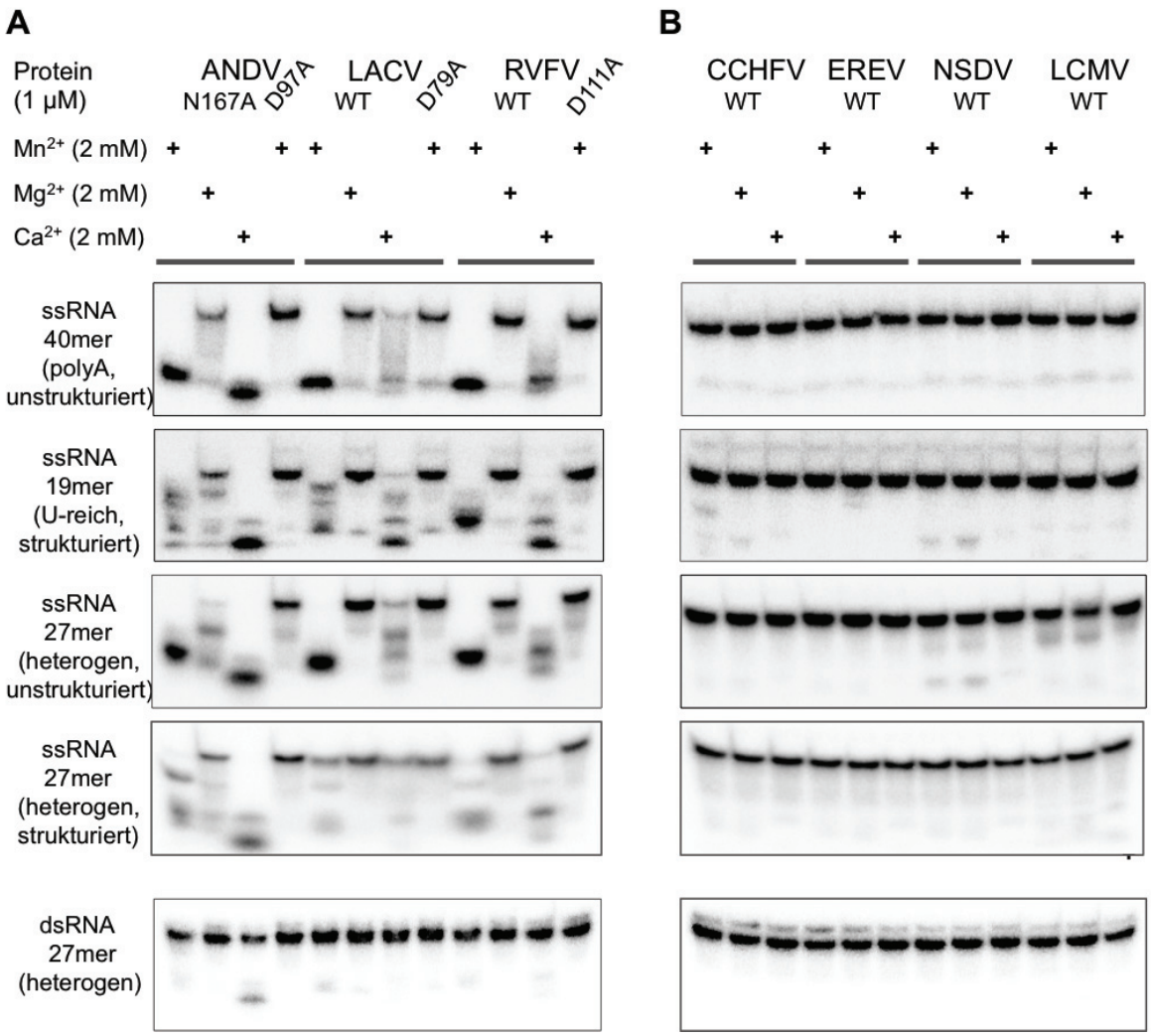


Abbildung 20: Vergleichende Untersuchung der Nuklease-Aktivität ausgewählter bunya- und arenaviraler Endonukleasen

1 µM des jeweiligen Proteins wurde mit 0,1 µM 5'^{32}P-markiertem, einzel- oder doppelsträngigem RNA-Substrat in Assay-Puffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl und 5% Glycerol, pH 7,5) in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, oder 2 mM $CaCl_2$ in 20 µL für 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 2x Probenpuffers (95 % Formamid, 18 mM EDTA, 0,025% SDS, Xylencyanol, Bromphenolblau) gestoppt, die Substrate wurden durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und anschließende Eiskühlung für 5 min denaturiert und linearisiert. Die Separation der Reaktionsprodukte erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese (7 M Harnstoff, 20% Polyacrylamid, 90 mM Tris-HCl, 80 mM Natriumborat, 2 mM EDTA, 0,1% APS, 0,01% TEMED). Die erhaltenen Banden wurden mit einem Typhoon Scanner FLA 7000 visualisiert. **(A)** zeigt den Abbau der Substrate durch die ANDV- und LACV-Endonukleasen im Vergleich zu RVFV. **(B)** zeigt den Abbau der Substrate durch die LCMV-Endonuklease im Vergleich zu CCHFV, EREV und NSDV.

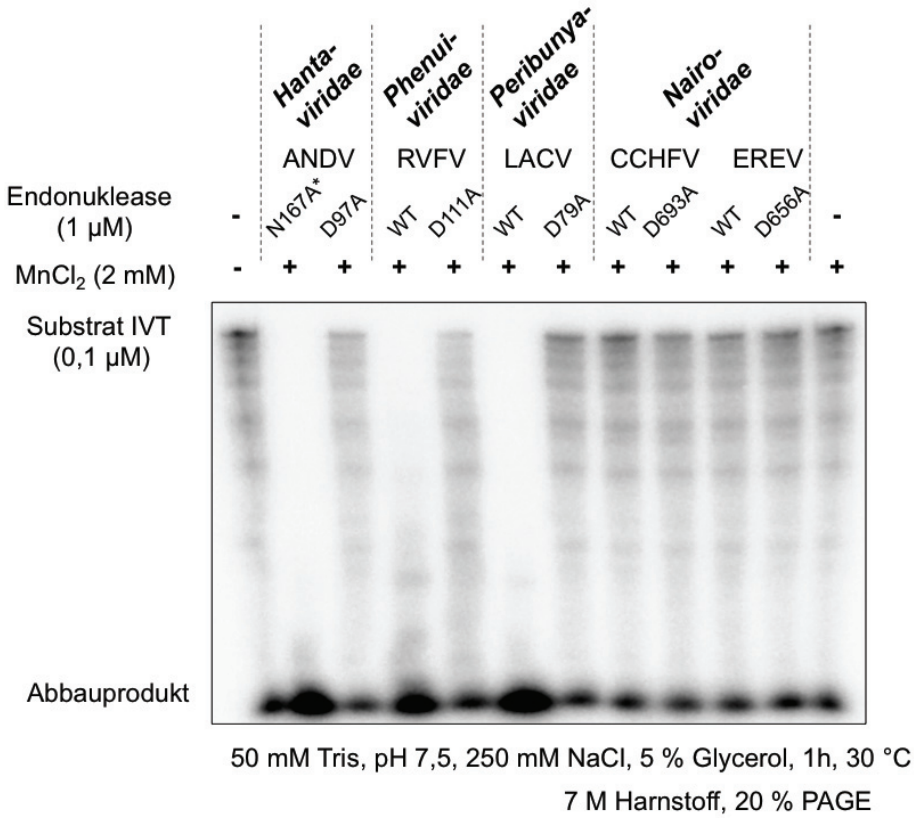


Abbildung 21: Abbau eines heterogenen RNA-Substrats durch fünf bunyavirale Endonukleasen

1 µM des jeweiligen Proteins wurde mit 0,1 µM ^{32}P-markiertem, *in-vitro* transkribiertem RNA-Substrates in Assaypuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl und 5% Glycerol, pH 7,5) in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ in 20 µL für 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 2x Probenpuffers (95 % Formamid, 18 mM EDTA, 0,025 % SDS, Xylencyanol, Bromphenolblau) gestoppt, die Substrate wurden durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und anschließende Eiskühlung für 5 min denaturiert und linearisiert. Die Separation der Reaktionsprodukte erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese (7 M Harnstoff, 5 % Polyacylamid, 90 mM Tris-HCl, 80 mM Natriumborat, 2 mM EDTA, 0,1 % APS, 0,01 % TEMED). Die erhaltenen Banden wurden autogradiographisch mit einem Typhoon Scanner FLA 7000 visualisiert.

* Die Mutante N167A der ANDV-Endonuklease wird als Wildtyp-Äquivalent eingesetzt [70].

3.9 Charakterisierung des aktiven Zentrums der CCHFV-Endonuklease

3.9.1 Identifizierung potenziell Metallion-koordinierender Aminosäurereste

Durch gelbasierte Endonuklease-Assays konnte nachgewiesen werden, dass keine der drei getesteten nairoviralen Endonukleasen eine RNase-Aktivität besitzt, die mit verwandten bunyaviralen Endonukleasen vergleichbar ist. In dieser Hinsicht ähneln die nairoviralen Endonukleasen der arenaviralen Endonuklease des LCMV. Die fehlende oder extrem niedrige enzymatische Aktivität arenaviraler Endonukleasen konnte durch Reguera *et al.* durch das Fehlen eines Histidin-Rests im aktiven Zentrum in Zusammenhang gebracht werden [71]. Die in biochemischen Assays enzymatisch aktiven bunyaviralen Endonukleasen verfügen in ihrem aktiven Zentrum über einen Histidin-Rest, der an der Koordination eines der Metallionen beteiligt ist. Dies ist bei arenaviralen Endonukleasen nicht der Fall, dort sind ausschließlich saure Aminosäurereste an der Metallionbindung beteiligt, weshalb Reguera *et al.* eine Klassifizierung in His(+)- und His(-)- Endonukleasen postulierte .

Da sich die nairoviralen Endonukleasen in Bezug auf die enzymatische Aktivität phänotypisch wie eine His(-)-Endonuklease verhalten, wird zur Bestätigung dieses Phänotyps nach Metallion-koordinierenden Aminosäuren gesucht.

Strukturelles Merkmal einer His(-)-Endonuklease ist die Koordination eines der Metallionen im aktiven Zentrum durch eine Glutamat-Seitenkette. Dieses Glutamat liegt bei allen strukturell analysierten, arenaviralen Endonukleasen auf der Primärsequenz vor dem katalytischen PD-E/D-K-Motiv. Es koordiniert im aktiven Zentrum der arenaviralen Endonukleasen das zweite Manganion (vgl. Abbildung 4).

Der Glutamat-Rest kann innerhalb der Arenaviren durch einen Sequenzvergleich identifiziert werden und befindet sich bei der LCMV-Endonuklease in Position E51. Die geringe Sequenzkonservierung zwischen Arena- und Nairoviren ermöglicht keine eindeutige Identifizierung eines dem E51 äquivalenten Glutamats in der Endonukleasesequenz des CCHFV. Anhand eines Sequenzvergleichs der CCHFV-Endonuklease mit anderen nairoviralen Endonukleasen wurden vor dem PD-E/D-K-Motiv fünf konservierte Aspartate bzw. Glutamate und zwei konservierte Histidine identifiziert (vgl. Abbildung 22 D). Nur anhand des Sequenzvergleichs konnte also keine eindeutige Zuordnung zu His(+)- oder His(-)-Endonukleasen getroffen werden.

3.9.2 Alanin-Mutagenese ausgewählter Aminosäurereste

Zur Identifizierung derjenigen Aminosäurereste, die an der Koordination der Metallionen im aktiven Zentrum der CCHFV-Endonuklease beteiligt sind, wurden die unter Kapitel 3.9.1 identifizierten Reste einzeln durch ortsspezifische Mutagenese zu Alanin mutiert. Die Mutanten wurden analog dem Wildtyp-Protein exprimiert und gereingt. Alle Proteine konnten löslich und stabil exprimiert werden.

Zur Charakterisierung der Metallionenbindung wurde die thermische Stabilisierung jeder Mutante bei ansteigenden Manganionen-Konzentrationen gemessen. Bei der Alanin-Mutation einer für die Metallionenbindung relevanten Aminosäure wäre eine eingeschränkte Temperaturstabilisierung zu erwarten.

Abbildung 22 C zeigt die Denaturierungstemperaturen der sieben ausgewählten Alaninmutanten bei fünf Manganionen-Konzentrationen zwischen 0 mM und 32 mM im Vergleich zum Wildtyp.

Die CCHFV-Endonuklease zeigt einen stufenweisen Anstieg der Denaturierungsstemperatur bei ansteigenden $MnCl_2$-Konzentrationen. Die Denaturierungstemperatur in Abwesenheit von $MnCl_2$ liegt bei T_m = 37 °C, der Zusatz von 32 mM $MnCl_2$ erhöht die Denaturierungstemperatur auf T_m = 44 °C, was einer thermischen Stabilisierung von 7 °C entspricht. Die Denaturierungstemperaturen der Mutanten H626A, H632A, D657A, D672A und D679A gleichen bei allen $MnCl_2$-Konzentrationen denen des Wildtyps bzw. weichen nur geringfügig ab. Die zugehörigen Denaturierungskurven zeigt Abbildung 22 B.

In Abbildung 22 C zeigen sich für die Mutanten E642A und E656A deutliche Unterschiede in den Denaturierungstemperaturen gegenüber dem Wildtyp. Die zugehörigen Schmelzkurven sind in Abbildung 22 A dargestellt. Die Denaturierungstemperatur der Mutante E642A in Abwesenheit von Manganionen ist mit T_m = 34,5 °C geringer als die Denaturierungstemperatur des Wildtyps. Die Denaturierungstemperatur der Mutante E656A ist vergleichbar mit der des Wildtyps. Der Zusatz von 32 mM Manganionen führt bei der Mutante E642A zu einer Stabilisierung von ca. ΔT_m = 2 °C, die gleiche Konzentration an Manganionen bewirkt bei der Mutante E656A eine Stabilisierung von ΔT_m = 4 °C. Die Stabilisierung durch Manganionen ist bei beiden Mutanten gegenüber dem Wildtyp eingeschränkt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Reste E642 und E656 an der Koordination von Manganionen im aktiven Zentrum der CCHFV Endonuklease beteiligt sind.

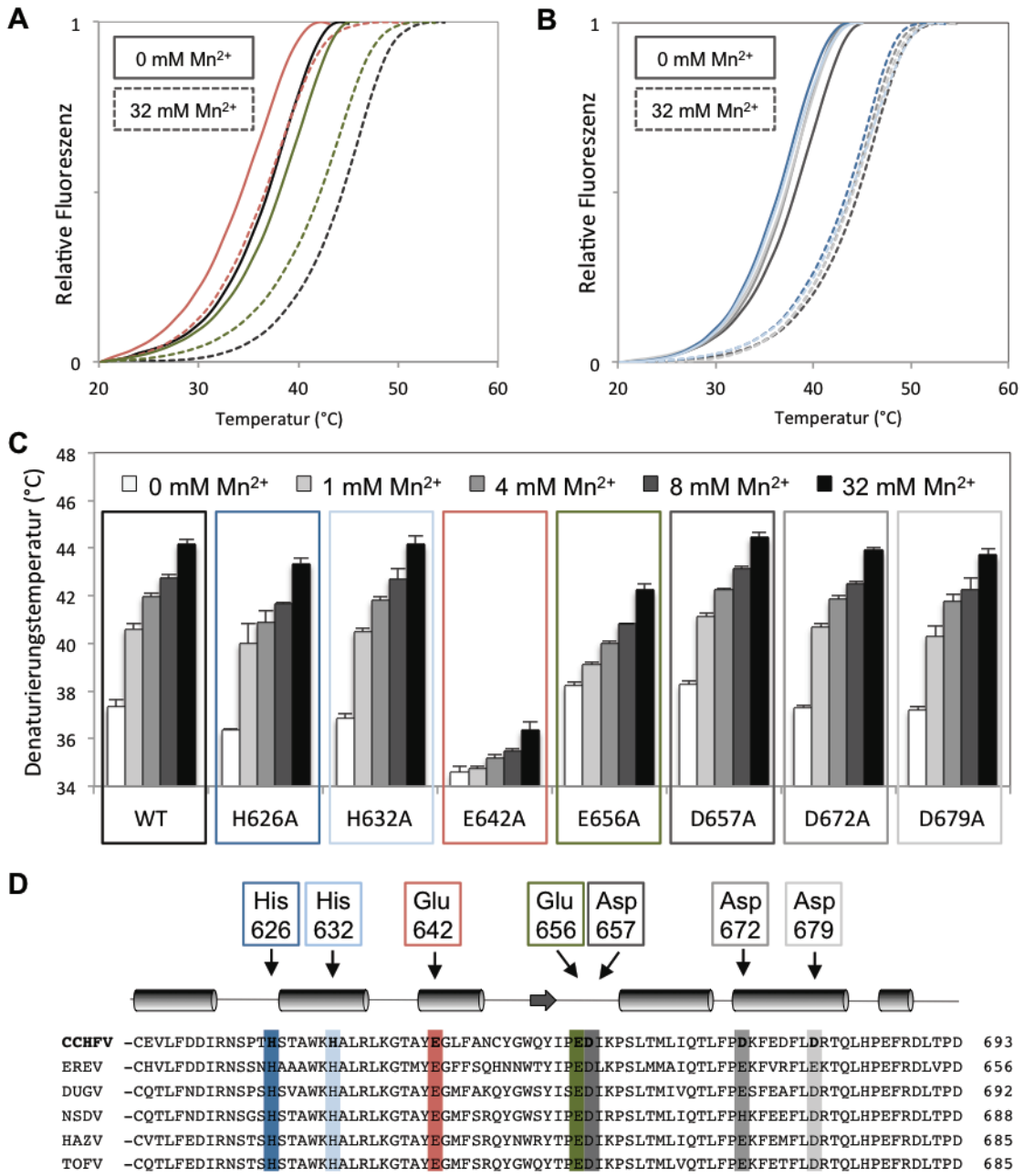


Abbildung 22: Thermische Stabilisierung ausgewählter Alanin-Mutanten N-terminaler Aminosäurereste der CCHFV-Endonuklease durch Manganionen

Es wurden durch Sequenzvergleich im N-terminalen Teil der CCHFV-Endonuklease zwei innerhalb der Nairoviren konservierte Histidin- und fünf Aspartat- bzw. Glutamat-Reste identifiziert. Die Reste wurden durch ortspezifische Mutagenese des Endonuklease-Gensegments zu Alanin mutiert. Die Klonierung, Expression und Reinigung der mutierten Proteine erfolgte analog dem Wildtyp der CCHFV-Endonuklease. Die thermische Stabilisierung von 3 µM des entsprechenden Proteins in 25 µL Assaypuffer mit verschiedenen Konzentrationen an $MnCl_2$ (1 mM bis 32 mM) wurde mittels Thermofluor-Assay bestimmt. **(A)** zeigt die Kurven des WT (schwarz) im Vergleich zur E642A- (rot) und E656A-Mutante (grün) ohne $MnCl_2$-Zusatz (durchgezogene Linie) und mit Zusatz von 32 mM $MnCl_2$ (gestrichelte Linie). **(B)** zeigt die Mutanten H626A, H632A, D657A, und D679A (verschiedene Blau- und Grautöne). **(C)** zeigt Zunahme der thermischen Stabilität aller sieben Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bei 4 $MnCl_2$-Konzentrationen im Vergleich zur $MnCl_2$-freien Kontrolle. **(D)** zeigt den Sequenzvergleich der nairoviralen Endonukleasen sowie schematisch die mittels PRALINE [95] vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Die mutierten Reste sind farblich markiert.

Die Histidin-Mutanten H626A und H632A verhielten sich wie der Wildtyp.
Zur Bestätigung der Relevanz des Restes E656A wurde die Manganbindung von 100 µM der CCHFV-Endonuklease-Mutante E656A im Vergleich zu 100 µM des Wildtyps mittels isothermer Titrationskalorimetrie (Methode 2.2.10) gemessen. Die Messdaten zeigt Abbildung 28 im Anhang. Das Wildtyp-Protein zeigt eine endotherme Bindung von Manganionen, die bei der Mutante nicht nachweisbar ist. Die Methode bestätigt, dass der Rest E656 an der Koordination von Manganionen beteiligt ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen des Thermofluor-Assays überein.

3.9.3 Vergleichende Untersuchung der Bindung experimenteller Inhibitoren

Für die Endonuklease des RVFV wurde die Inhibition der Ribonuklease-Aktivität durch zwei experimentelle Endonuklease-Inhibitoren nachgewiesen. Für die Endonuklease des CCHFV wurde keine Ribonuklease-Aktvität nachgewiesen, was dem Phänotyp einer arenaviralen Endonuklease entspricht. Zum weiteren Belegen der Hypothese struktureller Homologie wurde die Bindung von DPBA an das Wildtyp-Protein sowie die Mutanten E642A und E656A mittels Thermofluor-Assay bestimmt. Abbildung 23 zeigt die thermischen Stabilisierungen im Vergleich zur LCMV- und RVFV-Endonuklease sowie den entsprechenden Mutanten, die die Zugehörigkeit zu His(+)- und His(-)-Endonukleasen ausmachen.
Die Stabilität der CCHFV-Endonuklease ist mit ca. 37 °C um 2,5 °C höher als die der Mutante E642A. Die analoge Mutante E51A der LCMV-Endonuklease hingegen ist mit 43 °C um 3 °C stabiler als der LCMV-Wildtyp. Das RVFV Wildtyp-Protein ist mit 47 °C das Stabilste von allen gemessenen, die Mutante H79A ist mit 45,5 °C geringfügig weniger stabil. Der Zusatz von 200 µM DPBA erhöht die Stabilität der CCHFV-Endonuklease um 9,5 °C, die Stabilität der Mutante um ca. 2 °C, was einem Anteil von ca. 20% des Wildtyps entspricht. Die LCMV- und RVFV-Endonukleasen wurden durch 200 µM DPBA jeweils um 15 °C stabilisiert. Die Stabilisierungen der jeweiligen Mutanten E51A und H79A zeigen Übereinstimmung und liegen mit jeweils 3,3 °C bei ca. 20% des Wildtyps.
Zusätzlich zum DPBA wurde die Bindung des Inbititors PA-30 an die CCHFV-Endonuklease bestimmt. PA-30 interferiert mit der Fluoreszenzdetektion und konnte mittels Thermofluor-Assay nicht untersucht werden. Die nach Bindung des Inhibitors erhöhte Denaturierungstemperatur wurde durch Nachweis der Menge an löslichem

Protein mittels SDS-PAGE analysiert. Der Versuch wurde für den Inhibitor DPBA zum Vergleich ebenfalls durchgeführt.

Die Abbildung 24 zeigt, dass beide Inhibitoren die thermische Stabilität des Proteins, gemessen an der Menge an löslichem Protein, erhöhen, was als Indikator für die Bindung der Inhibitoren angesehen wird.

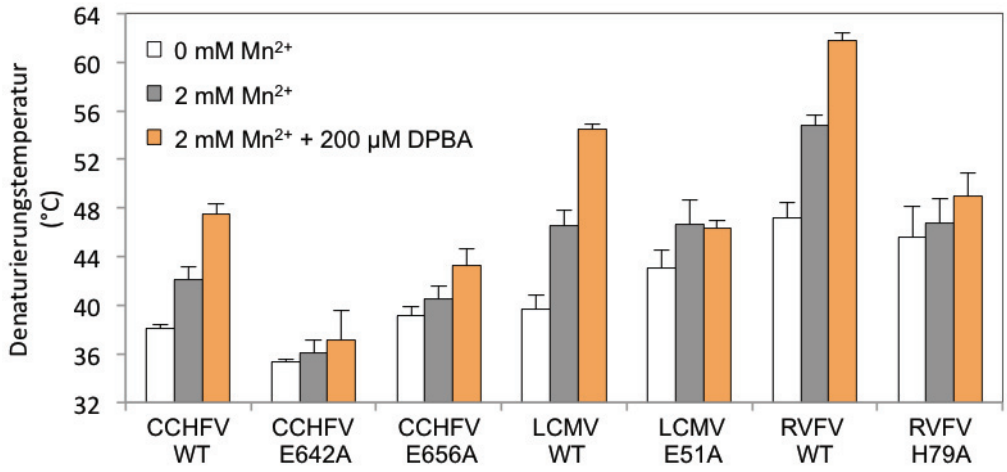


Abbildung 23: Vergleich der thermischen Stabilisierung dreier Endonukleasen sowie ausgewählter Mutanten durch Manganionen und DPBA

Die thermische Stabilisierung von 3 µM des entsprechenden Proteins in 25 µL Assaypuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 % Glycerol) mit verschiedenen Konzentrationen an $MnCl_2$ zwischen 1 mM und 32 mM wurde mittels Thermofluor-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt die Denaturierungstemperaturen der Endonukleasen des CCHFV, LCMV und RVFV sowie die der Mutanten E642A und E656A (CCHFV), E51A (LCMV) und H79A (RVFV).

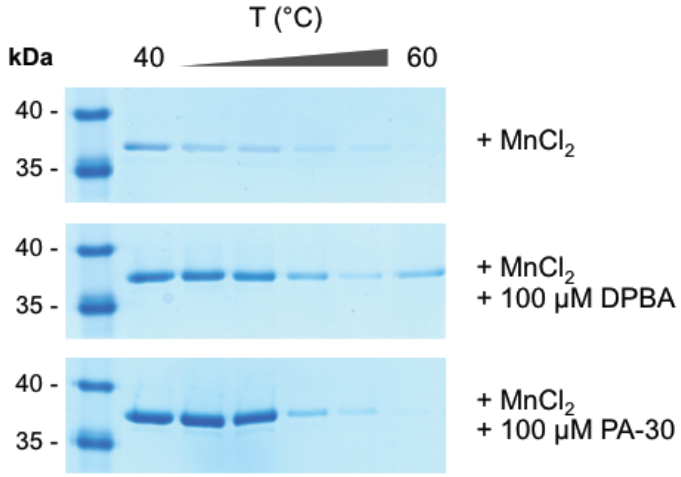


Abbildung 24: Vergleich der thermischen Stabilisierung der CCHFV-Endonuklease durch die Endonuklease-Inihibitoren DPBA und PA-30

Die thermische Stabilisierung von 3 µM der CCHFV-Endonuklease durch 100 µM DPBA und 100 µM PA-30 in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ wurde in 25 µL Assaypuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5% Glycerol) anhand der Löslichkeit bei verschiedenen Temperaturen zwischen 40 °C und 60 °C gemessen. Die Proteine wurden für 15 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert.
Die Abbildung zeigt die jeweilige Proteinmenge im Überstand.

3.10 Topologie-Modell der CCHFV-Endonuklease

Aufgrund der geringen Sequenzkonservierung der nairoviralen Endonukleasen zu anderen bunyaviralen Endonukleasen ist eine Vorhersage der dreidimensionalen Struktur nur anhand der Primärsequenz nicht möglich. Die neuen biochemischen Daten in Kombination mit einem sekundärstrukturbasierten Sequenzvergleich erlauben die Vorhersage eines Topologie-Modells für die CCHFV Endonuklease. Die Vorhersage der Sekundärstruktur der CCHFV Endonuklease erfolgte unabhängig voneinander mit den bioinformatischen Vorhersageprogrammen JPred 4.0, APSSP2, PredictProtein und PRALINE [94,95,99,100]. Mit dem Programm PROMALS [96] wurden sekundärstrukturbasierte Vergleiche der CCHFV Endonuklease-Sequenz gegen die Kristallstrukturen der LCMV-Endonuklease (5ltf.pdb), der ANDV-Endonuklease (5hsb.pdb) und der LACV-Endonuklease (2xi5.pdb) durchgeführt. Der Sequenzvergleich wurde manuell unter Verwendung der erhaltenen Sekundärstrukturvorhersagen für die CCHFV Endonuklease und den Sekundärstrukturelementen der Kristallstrukturen für die anderen Proteine erstellt (vgl. Abbildung 25 A).

Die Farbgebung in Abbildung 25 B korreliert mit den Strukturelementen der in Abbildung 18 B dargestellten Kristallstrukturen der LCMV-, LACV- und ANDV-Endonuklease. Grün gefärbt ist der N- und C-Terminus, der in der Struktur ein α-Helixbündel bildet. Orange gefärbt sind die β-Faltblätter, die das aktive Zentrum bilden sowie diejenige α-Helix die in allen Strukturen das aktive Zentrum gegenüber dem grünen Helixbündel flankiert. In gelb ist die variable Loop-Region dargestellt, die das Helixbündel mit dem aktiven Zentrum verbindet. Durchgezogene Linien zeigen Sekundärstrukturelemente in Kristallstrukturen an, gestrichelte Linien vorhergesagte Sekundärstrukturelemente. Mit einem Rahmen markiert sind die an der Metallionenkoordination im aktiven Zentrum beteiligten Reste.

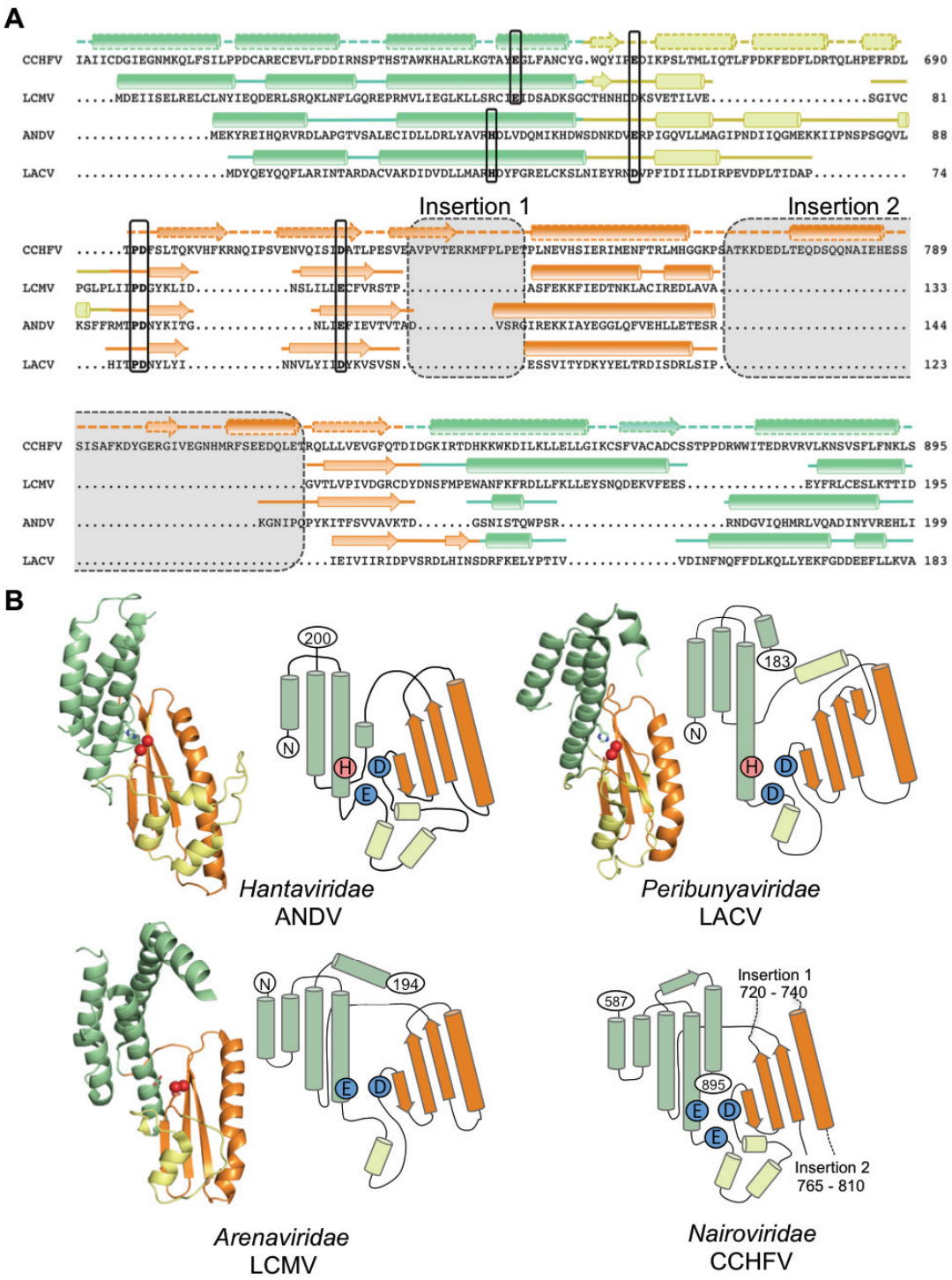


Abbildung 25: Sekundärstrukturbasierter Sequenzvergleich und Topologiemodell der CCHFV-Endonuklease

Die Abbildung zeigt den sekundärstrukturbasierten Sequenzvergleich und die Proteintopologie zweier His(+)-Endonukleasen (ANDV, LACV), einer His(-)-Endonuklease (LCMV) und der CCHFV-Endonuklease. **(A)** Die Darstellung zeigt schematisch die Sekundärstrukturelemente des CCHFV (vorhersagebasiert) sowie der Kristallstrukturen des LCMV (5ltf.pdb), ANDV (5hsb.pdb) und LACV (2xi5.pdb). Bindungsrelevante Aminosäurereste sind fett hervorgehoben und eingerahmt. Die identifizierten Insertionen 1 und 2 sind umrahmt. Die Farbgebung steht in Analogie zur Kristallstruktur und dem Topologiemodell in Abbildung B. **(B)** Dargestellt ist das postulierte Topologie-Modell der CCHFV-Endonuklease (unten rechts) im Vergleich zu Kristallstrukturen und Topologie-Modellen zweier His(+)- und einer His(-)-Endonuklease. Die für die Metallionbindung relevanten negativ geladenen Aminosäurereste sind blau markiert, Histidinreste sind rot markiert.

4. DISKUSSION

Die Endonuklease ist eine Metallion-abhängige Ribonuklease-Domäne und wurde 2009 erstmalig bei Influenzaviren in der PA-Untereinheit des Polymerasekomplexes durch Yuan *et al.* beschrieben [108]. Influenzaviren gehören zusammen mit den Arenaviren und den Familien der Ordnung *Bunyavirales* in die Klasse der segmentierten Negativstrang-RNA-Viren. Die Transkription der viralen Gene erfolgt für alle Vertreter dieser Klasse durch einen spezifischen *Cap-Snatching*-Mechanismus, der für den Polymerasekomplex des Influenza-Virus strukturell und funktionell aufgeklärt wurde [65,66]. Neben der Endonuklease in der PA-Untereinheit ist dafür eine *Cap*-Bindungsaktivität in der PB2-Untereinheit des Komplexes notwendig.

Die L-Proteine der Bunyaviren sind dem Polymerasekomplex des Influenza-Virus funktionell homolog. Sie werden anhand der RdRP-Domäne in verwandtschaftliche Beziehung gestellt. Dabei wird deutlich, dass die bunyaviralen Familien *Phenuiviridae* und *Nairoviridae* am weitesten von den anderen Bunyaviren entfernt sind. Dies wurde durch Li *et al.* anhand eines Sequenzvergleichs der RdRP-Domänen gezeigt [109].

Das katalytische Motiv der Endonuklease kann in den L-Proteinen der meisten Bunyaviren durch Sequenzvergleiche identifiziert werden. Die atomaren Strukturen der Endonuklease-Domänen einzelner Vertreter der Familien *Hantaviridae* und *Peribunyaviridae* belegen trotz sehr geringer Sequenzkonservierung strukturelle Homologie zur Endonuklease der Influenza-Viren sowie Arenaviren [49,70,71].

In dieser Arbeit werden erste strukturelle und biochemische Daten zu bisher uncharakterisierten Endonukleasen der bunyaviralen Familien *Phenuiviridae* und *Nairoviridae* präsentiert. Die Ergebnisse werden vor dem Hintergrund der strukturellen und funktionellen Homologie zu verwandten Endonukleasen und der Eignung als Angriffspunkt für neue, antivirale Wirkstoffe diskutiert.

4.1 Die RVFV-Endonuklease sitzt im verlängerten N-Terminus des L-Proteins und zeigt Aktivität *in-vitro*

Die Endonuklease des RVFV konnte im Rahmen dieser Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Bunyaviren im N-Terminus des L-Proteins identifiziert werden. Der N-Terminus ist gegenüber verwandten Bunyaviren grundsätzlich verschieden in seiner Sequenz und der Sekundärstrukturvorhersage, weshalb Strukturaufklärung der Endonuklease des RVFV von besonderem Interesse war.

Ein 248 Aminosäuren umfassendes Fragment des L-Proteins konnte löslich exprimiert und charakterisiert werden (vgl. Abbildung 17). Das Protein zeigte in Abhängigkeit von Manganionen spezifische Nukleaseaktivität an einzelsträngiger RNA (vgl. Abbildung 19), was eine Gemeinsamkeit mit den Endonukleasen von Hantaviren, Peribunyaviren und Influenzaviren ist [49,70,71,110]. Durch Sequenzvergleiche konnte das katalytische PD-E/D-K-Motiv identifiziert werden. Die Aktivität des Proteins konnte durch Alanin-Mutation des ersten Aspartats (katalytisches Aspartat) in Position 111 vollständig aufgehoben werden. Dies stimmt mit den Arbeiten von Klemm et al. überein, die für diese Mutation anhand eines VLP-Assays Transkriptionsdefizienz des L-Proteins nachgewiesen haben [56].

Im Gegensatz zu verwandten Bunyaviren verhielt sich die Endonuklease bei der Expression und Reinigung problematisch: Das Protein konnte nicht vollständig von Nebenprodukten getrennt werden und zeigte bei höheren Konzentrationen Aggregation. Ein Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen zeigte, dass innerhalb der ersten 70 Reste des L-Proteins (vor der Endonuklease-Domäne) eine Insertion von β-Faltblättern liegt, die bei verwandten Bunyaviren nicht vorkommen. Zamoto-Niikura *et al.* postulieren, dass der N-Terminus mit anderen Teilen des L-Proteins in Wechselwirkung treten kann [111]. Möglicherweise befinden sich im Bereich der β-Faltblätter Oberflächen zur Interaktion mit anderen Proteinen, die die Stabilität des isolierten Proteins einschränken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein aufgrund zu geringer Reinheit und Stabilität nicht weiter strukturell charakterisiert. CD-Spektroskopie oder Trunkierungsversuche im N-Terminus könnten in weiterführenden Arbeiten Aufschluss über strukturelle Besonderheiten liefern.

Die Erkenntnisse zur Aktivität belegen jedoch eindeutig, dass die identifizierte Domäne einer Endonuklease zuzuordnen ist.

4.2 Die RVFV-Endonuklease ist eine His(+)-Endonuklease

Als nächstes wurde versucht, weitere Gemeinsamkeiten zwischen den bereits bekannten, viralen Endonukleasen und der RVFV-Endonuklease zu identifizieren.
Die in der Literatur beschriebenen His(+)-Endonukleasen verfügen über einen Histidin-Rest im aktiven Zentrum, der an der Koordination des ersten Manganions beteiligt ist. Diese Koordination wurde für verschiedene Proteine kristallographisch in der Kristallstruktur sowie biochemisch nachgewiesen. In der Literatur sind verschiedene Histidin-Mutanten beschrieben. Die Mutanten zeigen gegenüber den Wildtypen unterschiedliche Stabilitäten und unterschiedliche Bindungen von Manganionen. Bei der La Crosse-Endonuklease (*Peribunyaviridae*) erhöht die Mutation H34K die thermische Stabilität des Proteins gegenüber dem Wildtyp-Protein. Die Mutante H36A scheint jedoch bei der Hantaan-Endonuklease (*Hantaviridae*) die thermische Stabilitität gegenüber dem Wildtyp-Protein leicht zu verringern [71]. Die Mutante H41A der Influenza-Endonuklease (*Orthomyxoviridae*) konnte nur zu etwa 5% des Wildtyps exprimiert werden. Die Autoren Crepin *et al.* zeigen mittels CD-Spektroskopie, dass die Struktur des Proteins durch die Mutation H41A destabilisiert und entfaltet wird [112].
Die H79A-Mutante der RVFV-Endonuklease konnte in gleicher Ausbeute wie das Wildtyp-Protein exprimiert werden und zeigte analog zur Hantaan-Endonuklease nur geringfügig verminderte, thermische Stabilität gegenüber dem Wildtyp (vgl. Abbildung 22).
Die Frage war, ob die RVFV-Endonuklease auch in die durch Reguera *et al.* vorgenommene Klassifizierung in His(+)- und His(-)-Endonukleasen passt, was anhand der H79A-Mutante eindeutig gezeigt werden konnte. In Analogie zu allen in der Literatur beschriebenen Endonukleasen zeigt die Mutante H79A der RVFV-Endonuklease deutlich verminderte Stabilisierung durch Manganionen (Abbildung 18). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Mutation die Nukleaseaktivität des Proteins auf ein Minimum reduziert (vgl. Abbildung 19). Diese Beobachtungen belegen die gegenüber verwandten Endonukleasen ähnliche Anordnung des Histidin-Rests im aktiven Zentrum. Die RVFV-Endonuklease wurde dadurch eindeutig als His(+)-Endonuklease identifiziert und zeigt trotz kaum vorhandener Sequenzkonservierung strukturelle und funktionelle Homologie zu verwandten Bunyaviren.

4.3 Die CCHFV-Endonuklease sitzt im verlängerten N-Terminus des L-Proteins und bindet Manganionen

Das Krim-Kongo-Virus als prominentester Vertreter der Familie *Nairoviridae* gehört zwar ähnlich wie RVFV in die Ordnung *Bunyavirales*, verfügt jedoch über Besonderheiten in der Größe und Domänenstruktur des L-Proteins. Bemerkenswert ist, dass die zu erwartende Endonuklease sich nicht am N-Terminus des Proteins befindet, sondern in einem Abstand von etwa 600 Aminosäuren vom nativen N-Terminus.

Am N-Terminus aller nairoviralen L-Proteine befindet sich eine OTU-Domäne, die mit der Unterdrückung der Immunantwort des Wirts assoziiert ist [50]. Den ersten Hinweis auf die Relevanz des *Cap-Snatching*-Mechanismus bei Nairoviren lieferte Jin *et al.* 1993 anhand nicht-viraler Sequenzen am 5'-Ende der mRNA des DUGV S-Segmentes [113]. Für das L-Protein der Nairoviren wird analog zum L-Protein der Bunyaviren die Funktion der Transkription des viralen Genoms durch den *Cap-Snatching*-Mechanismus angenommen. Das aktive Zentrum wurde durch Morin *et al.* anhand eines Sequenzvergleichs in Position D693 postuliert, was Devignot *et al.* experimentell belegen konnten [51,107]. In diesem Bereich ist die Sequenz gegenüber den L-Proteinen verwandter Bunyaviren jedoch nicht konserviert, sodass die Kenntnis der Domänengrenze verwandter Endonukleasen des ANDV, LACV und HNTV nicht zur Identifizierung der Domäne genutzt werden kann [49,70,71].

Die Endonuklease-Domäne des CCHFV L-Proteins wurde im Rahmen dieser Arbeit als lösliches Protein erhalten (vgl. Abbildung 6). Nach Optimierung des Reinigungsprotokolls konnte das Protein in hoher Reinheit monodispers hergestellt werden. Das Protein bindet zweiwertige Metallionen und präsentiert sich in wässriger Lösung als nativ gefaltetes, globuläres Monomer (vgl. Abbildung 7 und 12). Die Stabilisierung durch zweiwertige Metallionen und experimenteller Endonuklease-Inhibitoren ist eine Gemeinsamkeit mit der RVFV-Endonuklease (vgl. Abbildung 23).

Die experimentell gezeigte, strikte Begrenzung der Endonuklease-Domäne findet sich auch in den Endonuklease-Domänen des LACV L-Proteins sowie des Influenza-Polymerase-Komplexes wieder [32,65]. Beide Strukturen zeigen, dass die Endonuklease als separate Domäne aus dem Protein heraussteht (vgl. Abbildung 2). Die Grenzen der nairoviralen Endonuklease sind damit höchstwahrscheinlich richtig

identifiziert worden. Dafür spricht, dass sowohl verkürzte als auch verlängerte Expressionsfragmente unlöslich waren. Möglicherweise steht auch die Endonuklease der Nairoviren als separate Domäne aus dem L-Protein heraus, was mit der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums im Rahmen des *Cap-Snatching*-Mechanismus zu erklären wäre.

Die Domäne bindet im aktiven Zentrum Manganionen, was sowohl durch Thermofluor-Assays als auch durch ITC bestätigt wurde (vgl. Abbildung 14 und 28). Beide Methoden belegen die Präsenz eines strukturell intakten, aktiven Zentrums der CCHFV-Endonuklease, zeigen jedoch eine gegenüber der Endonuklease des LCMV verminderte Bindung.

Ferron *et al.* postulieren, dass die CCHFV-Endonuklease eine His(+)-Endonuklease ist [114]. Das isolierte Protein müsste dementsprechend eine im Assay nachweisbare Ribonuklease-Aktivität haben. Amroun *et al.* zeigen einen Sequenzvergleich und postulieren, dass der Histidin-Rest in Position 632 dem Histidin-Rest H79 des RVFV homolog ist [46].

Entgegen der Erwartung konnte in dieser Arbeit keine Bedingung identifiziert werden, in der die CCHFV-Endonuklease Ribonuklease-Aktivität zeigt (vgl. Abbildung 20 und 21). Dies ist ein deutlicher Unterschied gegenüber allen bekannten bunyaviralen Endonukleasen und stellt deren Verwandschaft zu anderen bunyaviralen Endonukleasen infrage.

4.4 Die CCHFV-Endonuklease ist eine His(-)-Endonuklease

Die nicht nachweisbare Ribonuklease-Aktivität des isolierten Endonuklease-Proteins ist bisher nur von arenaviralen Endonukleasen bekannt. Die in der Literatur publizierten Daten zur Aktivität arenaviraler Endonukleasen sind nicht einheitlich. Die Autoren Morin *et al.,* Saez-Ayala *et al.* und Wallat *et al.* postulieren anhand zeit- und konzentrationsabhängiger Assays nachweisbare Aktivität zweier isolierter arenaviraler Endonukleasen [107,115,116]. Demgegenüber konnte durch Reguera *et al.* belegt werden, dass die Aktivität der Lassa-Endonuklease gegenüber den bunyaviralen Endonukleasen um ein Vielfaches geringer ist [49]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Endonuklease-Aktivitäten daher vergleichend untersucht. Die LCMV-Endonuklease zeigte erwartungsgemäß keine Aktivität, was sich mit den nairoviralen Endonukleasen deckt (vgl. Abbildung 20 und 21).

Anhand der RVFV-Endonuklease (*Phenuiviridae*) konnte die Klassifizierung in His(+)-Endonukleasen und His(-)-Endonukleasen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die CCHFV-Endonuklease in diese Klassifizierung passt und weitere Merkmale einer His(-)-Endonuklease aufweist.

Zu diesem Zeck wurde die Metallionen-Bindung verschiedener Mutanten anhand der thermischen Stabilisierung durch Manganionen untersucht. In der Literatur ist für die E51A-Mutante der Lassa-Endonuklease verminderte Bindung von Manganionen beschrieben [71]. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit für die Mutante E51A der LCMV-Endonuklease reproduziert werden. Die gegenüber dem Wildtyp verminderte Stabilisierung der Mutante E51A durch Manganionen und DPBA ist eine Gemeinsamkeit mit der E642A-Mutante der CCHFV-Endonuklease (Abbildung 22 und 23). Dieses Ergebnis zeigt, dass die entsprechenden Glutamat-Reste einander homolog sind.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass der durch Amroun *et al.* postulierte Histidin-Rest in Position 632 nicht an der Bindung von Manganionen im aktiven Zentrum beteiligt ist. Die fehlende Relevanz dieses Restes wird dadurch untersützt, dass der Rest nicht in allen Nairoviren konserviert ist [117].

Die Untersuchungen belegen die Klassifizierung der CCHFV-Endonuklease als His(-)-Endonuklease und zeigen für dieses Protein erstmalig eine nähere Verwandtschaft zur Endonuklease der Arenaviren. Interessanterweise deckt sich dies mit der RdRP-basierten Phylogenie durch Vieth *et al.* und Li *et al.* [48,109]. Die Autoren beschreiben basierend auf der RdRP-Domäne eine nähere Verwandtschaft zwischen Nairoviren und Arenaviren.

Die Koordination der Manganionen zeigt jedoch auch einen Unterschied gegenüber der arenaviralen Endonuklease. In den Strukturen aller bekannten Endonukleasen gibt es negativ geladene Reste auf einem variablen Loop, der die N-terminalen α-Helices mit dem aktiven Zentrum verbindet (vgl. Abbildung 4, grüner Loop). Bei Bunyaviren und Orthomyxoviren sind diese Reste an der Manganionen-Koordination im aktiven Zentrum beteiligt. Dies wurde für Hantaviren und Peribunyaviren anhand der Mutanten E54G (Hantaan-Virus), D52A (La Crosse-Virus) und E80A (Influenza-Virus) gezeigt [49,71,112]. Die Mutanten zeigen im Thermofluor-Assay verminderte Stabilisierung durch Manganionen. Für die E54G-Mutante des Hantaan-Virus und die D52A-Mutante des La Crosse-Virus wurde dies mittels ITC bestätigt [71].

Bei Arenaviren sind die äquivalenten Reste nicht an der Koordination von Metallionen beteiligt. Für die D66A-Mutante der Lassa-Endonuklease konnte im Thermofluor-Assay keine verminderte Stabilisierung durch Manganionen gezeigt werden, was ebenfalls durch ITC und Replicon-Daten bestätigt wurde [71].
Aufgrund der Klassifizierung der CCHFV-Endonuklease als His(-)-Endonuklease wäre also zu erwarten, dass neben dem Glutamat E642 keine weitere Aminosäure vor dem katalytischen Motiv an der Koordination von Metallionen beteiligt ist.
Interessanterweise zeigt jedoch auch die Mutante E656A verringerte Stabilisierung durch Manganionen im Thermofluor-Assay. Die verminderte Bindung von Manganionen durch die Mutante E656A wurde durch ITC bestätigt (vgl. Abbildung 28, Anhang). Der Rest muss also an der Koordination der Ionen im aktiven Zentrum beteiligt sein, was wiederum kein typisches Merkmal der His(-)-Endonukleasen ist. Zum Vergleich wurde die Bindung von Manganionen analog der Lassa Endonuklease für LCMV mittels ITC nachgewiesen [71] (vgl. Abbildung 28).
Die ITC-Daten bestätigen die Bindung von Manganionen im aktiven Zentrum der CCHFV-Endonuklease und validieren die Eignung des Thermofluor-Assays zur Charakterisierung von Bindungsmutanten.
Die Koordination der Metallionen im aktiven Zentrum deutet darauf hin, dass die CCHFV-Endonuklease Merkmale der arenaviralen Endonuklease mit Merkmalen der bunyaviralen Endonuklease verbindet. Die fehlende Beteiligung eines Histidin-Rests im aktiven Zentrum wurde eindeutig nachgewiesen und steht höchstwahrscheinlich mit der nicht nachweisbaren Ribonuklease-Aktivität in Zusammenhang.

4.5 Die proteasezugängliche Insertion 1 ragt aus dem aktiven Zentrum der CCHFV-Endonuklease heraus

Die als löslich und stabil identifizierte CCHFV-Endonuklease hat eine Länge von 309 Aminosäuren und ist damit etwa um das 1,5-fache größer, als die bereits bekannten Endonukleasen verwandter Bunyaviren. Bekannte Endonuklease-Domänen von L-Proteinen aus Arena-, Bunya- und Orthomyxoviren präsentierten sich jedoch als proteasestabile, kristallisierbare Domänen mit einer sehr vergleichbaren Länge von ca. 200 Aminosäuren. Die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Endonuklease-Domänen aller L-Proteine einander strukturell homolog sind. Wie erklären sich dann die zusätzlichen Aminosäuren?

Für die Struktur des größeren Fragmentes der CCHFV-Endonuklease sind drei Hypothesen denkbar:

(1) Das Protein beherbergt im zentralen Bereich der Sequenz eine ca. 200 Aminosäuren umfassende, strukturhomologe Endonuklease-Domäne. Die verbleibenden 100 Aminosäuren wären dann als zusätzliche strukturelle Elemente N- und/oder C-terminal um das globuläre Zentrum angeordnet.

(2) Die ersten ca. 200 Reste bilden eine Struktur, die den beschriebenen Strukturen anderer Endonukleasen sehr ähnlich ist. C-terminal schließt sich eine zweite Domäne an, was dem Protein eine hantelförmige Struktur gibt.

(3) Die gesamten 309 Reste bilden eine etwas größere, strukturhomologe Domäne, wobei die zusätzlichen 100 Aminosäurereste auf mehrere möglicherweise flexible Insertionen aufgeteilt sind.

Limitierte Proteolyse in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse konnte zeigen, dass die CCHFV-Endonuklease aus zwei stabilen Fragmenten von 10 - 15 kDa und 15 - 25 kDa besteht (vgl. Abbildung 8). Dabei enthält das kleinere Fragment den N-Terminus und das größere Fragment den C-Terminus. Hypothese 3 scheint demnach zuzutreffen und das Protein hätte eine proteasezugängliche Insertion in der Nähe des aktiven Zentrums.

Die Interaktion des N- und C-terminalen Proteolysefragments wurde durch Koelution beider Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie und mittels Nickel-Affinitätschromatographie nachgewiesen. Die Fragmente bilden folglich einen stabilen Komplex (vgl. Abbildung 10). Ein weiterer experimenteller Hinweis für eine Interaktion zwischen N- und C-terminalen Resten ist, dass durch die Trunkierung weniger Aminosäuren die Löslichkeit der gesamten Domäne aufgehoben wurde. Augrund der hohen Sequenzkonservierung sowie übereinstimmenden Vorhersagen von α-Helices im N- und C-Terminus innerhalb der nairoviralen Endonukleasen ist es wahrscheinlich, dass auch in der CCHFV-Endonuklease ein Bündel aus α-Helices vorliegt, das aus Resten des N- und C-Terminus gebildet wird.

Durch Verdünnungsreihen mit Protease wurde deutlich, dass initial ein größeres N-terminales Fragment entsteht, dessen Molekulargewicht nur geringfügig unter dem des C-terminalen Fragments liegt (vgl. Abbildung 9). Dieses N-terminale Fragment ist jedoch nicht sehr stabil und wird langsam an dessen C-Terminus weiter zu einem kleineren Fragment von 10 - 15 kDa abgebaut. Aus dem Komplex wird also zwischen dem N- und dem C-terminalen Fragment ein drittes Fragment herausgeschnitten, das

initial Bestandteil des N-terminalen Fragmentes war. Das aktive Zentrum der Endonuklease kann aufgrund der Größe der Fragmente nicht in den beiden großen N- und C-terminalen Fragmenten liegen. Interessanterweise ist der Komplex aus diesen beiden Fragmenten genau wie das intakte Protein in der Lage, Metallionen zu binden (vgl. Abbildung 11). Der Komplex bildet trotz mehrerer Spaltungsereignisse nach wie vor ein strukturell intaktes, aktives Zentrum. Die katalytischen Reste des PD-E/D-K Motivs müssen also vorhanden sein. Dies ist nur durch die Gegenwart mindestens eines zusätzlichen, kleinen Fragments zu erklären.

Die Position der proteasezugänglichen Insertion 1 sowie des postulierten dritten Fragmentes zeigt schematisch die Abbildung 26.

Zusammenfassend ist die CCHFV-Endonuklease nicht so kompakt gefaltet, wie andere bereits beschriebene Endonuklease-Domänen. Die LACV-Endonuklease wurde durch Papain-Behandlung als proteasestabile Domäne mit einer Länge von 183 Aminosäuren identifiziert [49]. Die LCMV-Endonuklease wurde als Subtilisin-stabile Domäne mit einer Länge von 197 Aminosäuren identifiziert [107]. Hara *et al.* beschreiben bereits 2006, dass durch die Behandlung der PA-Untereinheit des Influenza Polymerasekomplexes mit Trypsin die Endonuklease ebenfalls am N-Terminus als proteasestabile Domäne mit einer Länge von 212 Aminosäuren identifiziert werden kann [118]. Dias *et al.* gelang 2009 die Kristallisation eines Fragments aus 209 Aminosäuren [110].

Bei einem nachweislich strukturell intakten, aktiven Zentrum sowie dem postulierten starken Zusammenhalt der Domäne über ein α-Helixbündel, sollte sich die Struktur des Proteins durch die Trypsin-Behandlung nicht stark verändern. Der Beweis dieser Hypothese gelang in der vorliegenden Arbeit durch SAXS-Analyse. Die SAXS-Strukturen belegen, dass das Protein trotz der Behandlung durch Trypsin in seiner Form und nativen Konformation nahezu unverändert bleibt. Die Struktur des Trypsin-behandelten Proteins ist gegenüber dem unbehandelten Protein etwas schlanker, hat jedoch die gleiche Längenausdehnung (vgl. Abbildung 12).

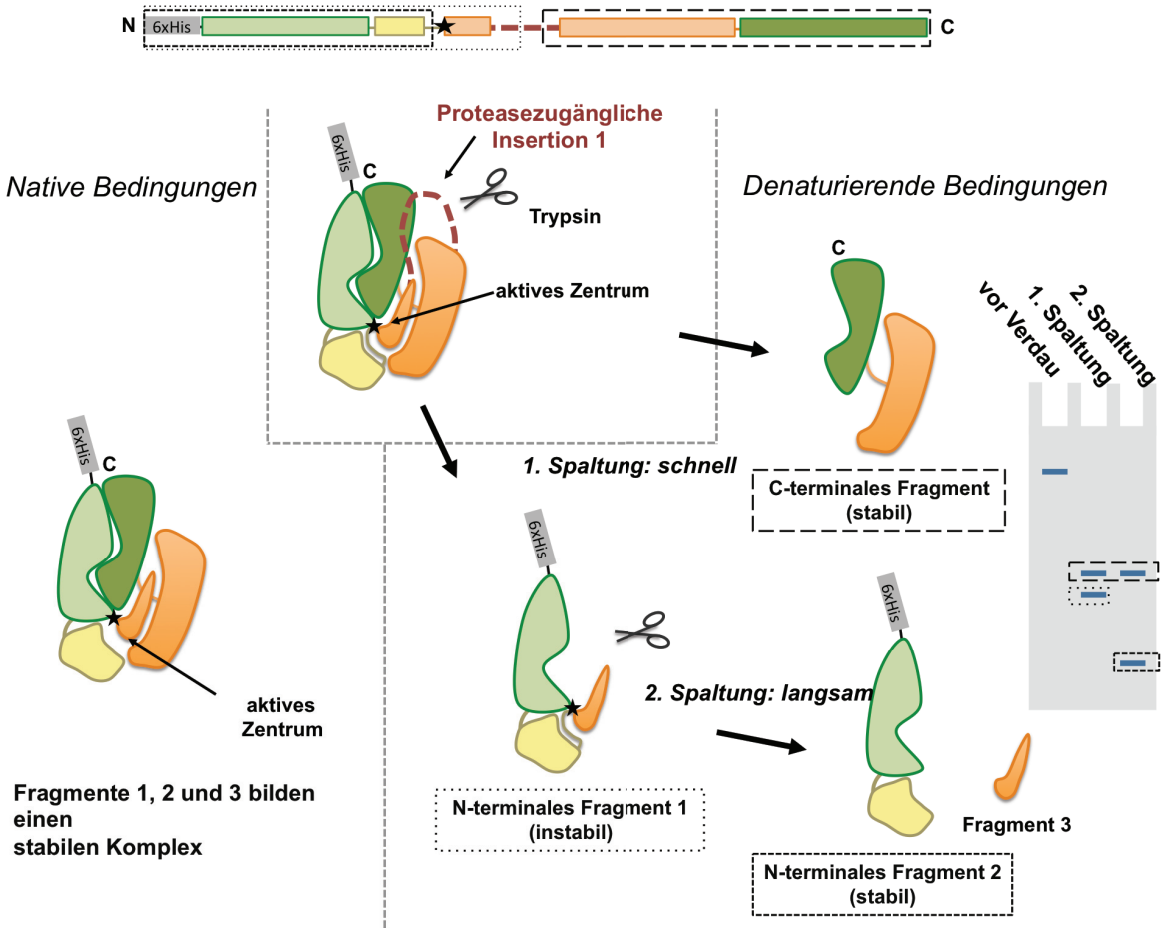


Abbildung 26: Schematische Darstellung der limitierten Proteolyse der CCHFV Endonuklease

Das Protein wird im ersten Schritt an der proteasezugänglichen Insertion 1 schnell in zwei ca. gleich große Fragmente gespalten. Das C-terminale Fragment ist stabil, das N-terminale Fragment ist C-terminal instabil und wird im zweiten Schritt weiter abgebaut, wobei ein drittes Fragment entsteht. Die drei Fragmente bilden in wässriger Lösung einen stabilen Komplex. Die Farbgebung der Segmente ist analog zu Abbildung 25.

4.6 Die längenvariable Insertion 2 liegt außerhalb des aktiven Zentrums

Durch Sequenzvergleiche mit den L-Proteinen verwandter Nairoviren ließen sich homologe Endonuklease-Domänen identifizieren und ebenfalls löslich exprimieren. Bemerkenswert sind gegenüber den Endonukleasen der verwandten bunyaviralen Familien verschieden lange, unkonservierte Abschnitte im zentralen Teil der Sequenz (vgl. Abbildung 13). Bei der CCHFV-Endonuklease beginnt dieser Bereich ab der Position 758 und zeigt innerhalb verschiedener Stämme ebenfalls variable interne Abschnitte.

Einige Informationen über diese Sequenzbereiche sind bereits in der Literatur beschrieben: Die erhöhte Variabilität der Sequenzen innerhalb verschiedener CCHFV-

Stämme wurde erstmals durch Meissner *et al.* 2005 beschrieben. Hier jedoch nicht im Zusammenhang mit der Aufklärung der Funktion und Struktur der Endonuklease, sondern im Hinblick auf mögliche diagnostische Unterscheidungen der Viren anhand dieses Sequenzbereiches [119]. Die Autoren beschreiben für verschiedene CCHFV-Stämme erhöhte Sequenzvariabilität auf dem L-Protein im Bereich zwischen den Positionen 762 und 810 und postulieren, dass deren Bedeutung durch Strukturaufklärung zu untersuchen sei. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Untersuchung auf eine Vielzahl nairoviraler Sequenzen ausgeweitet und gezeigt, dass dieser Sequenzabschnitt in allen Nairoviren längen- und sequenzvariabel ist und von konservierten Sequenzabschnitten flankiert wird (vgl. Abbildung 12). Dieser Bereich wird zum Teil der Insertion 2 in Abbildung 25 zugeordnet.

Die zu exprimierenden Proteine wurden so ausgewählt, dass sie möglichst unterschiedlich lange, unkonservierten Abschnitte abdecken, um deren biochemische Bedeutung und Strukturrelevanz vergleichend mit der CCHFV-Endonuklease zu untersuchen. Die Strukturmodelle stimmen in großen Teilen überein, unterscheiden sich jedoch in einer Richtung durch die Längen- und Breitenausdehnung (vgl. Abbildung 16). Im Vergleich zum EREV ist bei NSDV und CCHFV eine Verlängerung der Domäne zu beobachten, die dem variablen, unkonservierten Sequenzabschnitt zugeordnet wurde.

Aus den Strukturen wird geschlussfolgert, dass die Proteine im Bereich der aktiven Zentren strukturell homolog sind und die unkonservierten Sequenzabschnitte als Insertion außerhalb des aktiven Zentrums liegen.

Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, dass alle Endonukleasen vergleichbare Stabilisierung durch zweiwertige Metallionen zeigen (vgl. Abbildung 14). Die unkonservierten Abschnitte innerhalb der nairoviralen Endonukleasen scheinen für die Struktur des aktiven Zentrums nicht von Relevanz zu sein.

4.7 Die CCHFV-Endonuklease ist zu verwandten Bunyaviren strukturhomolog und um die Insertionen 1 und 2 vergrößert

Basierend auf den Ergebnissen der biochemischen Assays und SAXS-Strukturmodelle wurde ein Topologie-Modell der CCHFV-Endonuklease postuliert (Abbildung 25). Die Evidenz für ein Helixbündel aus N- und C-terminalen α-Helices wird als Grundlage dafür angesehen, dass die Struktur der Endonuklease denen der verwandten Endonukleasen homolog ist. Das Topologie-Modell wurde anhand von Sekundärstruktur-basiertem Sequenzvergleich zwischen CCHFV, ANDV, LACV und LCMV erstellt [49,70,115]. Dabei werden die Sekundärstrukturelemente aus den Kristallstrukturen bzw. für CCHFV die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente betrachtet. Anhand der so bestimmten Topologie der CCHFV-Endonuklease konnte die Position von Insertionen definiert werden:

Insertion 1 (ca. 20 Reste) wird durch den Bereich definiert, der zugänglich für Proteasen ist und folglich aus der Domäne herausragen muss. Sie liegt vor einer vorhergesagten α-Helix und enthält den Rest K734, der massenspektrometrisch als Spaltungsstelle für Trypsin identifiziert wurde. Dies steht im Kontrast zu allen anderen Endonuklease-Domänen. Hier wurde ein vergleichbarer, proteasezugänglicher Loop nicht identifiziert. Zwischen diesem Bereich und dem katalytischen Aspartat sind zwei β-Faltblätter vorhergesagt, genau wie in den bekannten Kristallstrukturen. Der Aspartat-Rest D718 wurde durch Devignot *et al.* in einem zellbasierten VLP-Assay als transkriptionsrelevant identifiziert [51]. Tatsächlich liegt dieser Rest auf dem zweiten β-Faltblatt, wie auch die Glutamat- bzw. Aspartat-Reste des PD-E/D-K-Motivs in allen anderen Endonukleasen. Ein biochemischer Nachweis der Metallionenbindung wurde nicht erbracht, dies könnte jedoch nachfolgend untersucht werden.

Die Bedeutung dieser Insertion für die Funktion der Endonuklease bleibt ungeklärt. Interessanterweise ist dieser Bereich in allen nairoviralen Endonukleasen konserviert. Auffällig ist, dass in diesem Bereich viele Proline liegen, was wiederum ein typisches Merkmal eines unstrukturierten Sequenzabschnittes ist. Möglichweise wird die Insertion 1 im nativen L-Protein zur Stabilisierung zusätzlicher Domänen benötigt oder übernimmt eine regulatorische Funktion der Endonuklease. Im Hinblick auf strukturelle Untersuchungen könnte versucht werden, den Bereich der Insertion durch einen verkürzten Linker zu ersetzen und ein somit erhaltenes Protein

auf Kristallisationsfähigkeit zu testen. Im Hinblick auf funktionelle Untersuchungen könnte in einem VLP-basierten Assay der Einfluss von Mutationen in diesem Bereich auf die Funktionsfähigkeit des gesamten L-Proteins untersucht werden.

Insertion 2 besteht aus dem unkonservierten Sequenzabschnitt, der bei allen nairoviralen Endonukleasen übereinstimmend nach einer langen α-Helix beginnt. Diese α-Helix liegt bei CCHFV zwischen den Resten 741 bis 762 und wird derjenigen α-Helix als homolog angesehen, die in den Kristallstrukturen Teil des aktiven Zentrums ist. Diese entspricht bei der ANDV-Endonuklease α-Helix αd [70]. Auf den unkonservierten Bereich folgt ein vorhergesagtes β-Faltblatt, beginnend bei Rest 797 in CCHFV. Zur Insertion 2 werden jedoch weitere Reste gezählt bis zum Beginn eines weiteren vorhergesagten β-Faltblatts, das auch bei anderen Endonukleasen vorhanden ist und mit β2 ein paralleles β-Faltblatt bildet. Dieses wird als Teil des aktiven Zentrums angesehen. Im Vergleich mit der ANDV-Endonuklease ist es dem β-Faltblatt βc homolog.

Bis auf diese beiden Insertionen stimmen die für CCHFV-Endonuklease vorhergesagten Sekundärstrukturelemente sehr gut mit den Kristallstrukturelementen der anderen Endonukleasen überein (vgl. Abbildung 25). Gut erkennbar ist auch die Überlagerung der Histidin-Reste der His(+)-Endonuklease des LACV und des ANDV. Ebenfalls erkennbar ist die Überlagerung des Aspartates E51 der LCMV-Endonuklease mit dem Aspartat E642 der CCHFV-Endonuklease, für den durch Mutagenese die Beteiligung an der Manganionen-Bindung nachgewiesen wurde. Alle vier Reste liegen übereinstimmend auf einer α-Helix im N-terminalen Teil des Helixbündels (grün). Zwischen den N-terminalen α-Helices und dem Beginn des aktiven Zentrums (β-Faltblätter in orange) liegt eine variable Loop-Region, diese ist zum Vergleich in Abbildung 2 in grün dargestellt. In dieser Region überlagern konservierte Aspartat-Reste bzw. Glutamat-Reste mit dem Rest E656 der CCHFV-Endonuklease. Die Mutation dieses Restes zeigte ebenfalls verminderte Manganionen-Bindung der CCHFV-Endonuklease (Abbildung 22, 23 und 28).

Zusammenfassend zeigt das Topologie-Modell Übereinstimmung mit den Endonukleasen verwandter Negativstrang-RNA-Viren. Das Modell unterscheidet sich durch die beiden beschriebenen Insertionen.

4.8 Das aktive Zentrum der Endonukleasen kann durch Inhibitoren blockiert werden

Anhand der Influenza-Endonuklease wurden verschiedene Inhibitorklassen identifiziert, deren Gemeinsamkeit ein Pharmakophor ist, der im aktiven Zentrum des Enzyms Metallionen komplexiert. Die Komplexierung wird durch Carbonyl- und/oder Hydroxylgruppen vermittelt. Darüberhinaus haben die Inhibitoren unterschiedliche aromatische oder aliphatische Seitenketten sowie teilweise weitere funktionelle Gruppen. Über die Seitenketten und funktionellen Gruppen wird die Bindung in die Bindetaschen neben dem aktiven Zentrum der Endonuklease-Domäne erhöht bzw. die Löslichkeitseigenschaften der Inhibitoren verbessert [74].

Der Inbibitor DPBA ist ein Prototyp eines Inhibitors mit dem Metallion-koordinierenden 2,4-Dioxocarboxylat-Pharmakophor. Neben der Endonuklease des Influenza-Virus wurde DPBA auch mit der LACV und LCMV-Endonuklease kokristallisiert und an der Koordination beteiligte Aminosäuren ermittelt [49,73,115]. Zusätzlich wurde die LCMV-Endonuklease mit dem Inhibitor L742001 kokristallisiert, der über einen ähnlichen Pharmakophor verfügt. Auch dieser Inhibitor wurde bereits für Influenza beschrieben [120].

In den Kristallstrukturen der LACV-Endonuklease (*Peribunyaviridae*) und der Influenza-Endonuklease (*Orthomyxoviridae*) koordinieren die Inhibitoren neben den Metallionen auch direkt den Histidin-Rest in der α-Helix sowie den Aspartat-Rest im variablen Loop [49].

Interessanterweise konnten Saez-Ayala *et al.* in der Kristallstruktur der LCMV-Endonuklease mit L742001 zeigen, dass der Rest D66 im variablen Loop über ein Wassermolekül ebenfalls den Inhibitor koordiniert [115].

In der Literatur zeigt sich also, dass die aktiven Zentren unabhängig von der Zuordnung zu His(+)- oder His(-)-Endonukleasen die Inhibitoren binden und es neben den Metallionen weitere Interaktionpartner im aktiven Zentrum gibt. Diese Bindungspartner könnten zu einer Selektivität der Inhibitoren für die viralen Endonukleasen beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der thermischen Stabilisierung gezeigt werden, dass die Endonukleasen des Rifttalfieber-Virus und des Krim-Kongo-Virus ebenfalls den Inhibitor DPBA im aktiven Zentrum binden (vgl. Abbildung 23). Für RVFV wurde zusätzlich die Inhibition der Endonuklease nachgewiesen, die für beide

getesteten Inhibitoren gleich ist (vgl. Abbildung 19). Die Inhibition der RVFV-Endonuklease durch DPBA ist vergleichbar mit der ANDV-Endonuklease [70].
Die Bindung des Inhibitors DPBA ist bei Mutationen von Aminosäuren vermindert, die im aktiven Zentrum Metallionen koordinieren (vgl. Abbildung 23). Dies belegt zum einen, dass auch im aktiven Zentrum der CCHFV-Endonuklease die Bindung der Inhibitoren über zwei Metallionen vermittelt wird. Zum anderen könnte es auch ein Hinweis sein, dass für die Koordination weitere Aminosäurereste benötigt werden. Ein genauer Bindungsmodus wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt. Die Bindung zweier verschiedener Substanzklassen zeigt jedoch, dass das aktive Zentrum eine ähnliche Struktur annehmen muss, wie bei den bereits beschriebenen Endonukleasen.

4.9 Ausblick: Die Endonukleasen eignen sich als therapeutisches Target

In dieser Arbeit wurden mit verschiedenen biochemischen Methoden die *Cap-Snatching*-Endonukleasen in den L-Proteinen zweier verschiedener Bunyaviren charakterisiert. Die Endonuklease wurde im Hinblick auf die Entwicklung von Inhibitoren am intensivsten für das Influenza-Virus studiert. Für die Endonuklease in der PA-Untereinheit des Polymerase-Komplexes wurde nachgewiesen, dass sich das isolierte Protein biochemisch vergleichbar verhält, wie im Kontext des gesamten Polymerase-Komplexes [118]. Die Affinität zum Substrat scheint zwar im Kontext des gesamten Polymerasekomplexes höher zu sein, dies wird jedoch mit der Nähe zur *Cap*-Bindungsdomäne PB2 begründet [121,122].
Die jüngste Zulassung des Inhibitorprodrugs Baloxavirmarboxil (*Xofluza*™) in Japan bestätigt die Eignung der Endonuklease als therapeutisches Target [79].
Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse erweitern das biochemische Verständis der bunyaviralen Endonukleasen und belegen strukturelle und funktionelle Homologie zur *Cap-Snatching*-Endonuklease der Influenza-Viren. Die identifizierten Proteine beherbergen damit ein aussichtsreiches therapeutisches Target und ebnen den Weg für das High-Throughput-Screening (HTS) von Inhibitoren oder die Optimierung bereits bekannter Leitstrukturen, was in der pharmazeutischen Industrie Grundlage für die Entwicklung neuartiger Medikamente ist. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung geeigneter biochemischer Assays mit

rekombinanten Proteinen von großer Bedeutuung. Neben der Influenza-Endonuklease ist die HIV-Integrase mit den Inhibitoren Raltegravir (*Isentress*®) und Dolutegravir (*Tivicay*®) ein prominentes Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung und Zulassung antiviraler Wirkstoffe auf der Basis biochemischer Assays. Trotz der nicht vollständig aufgeklärten Kristallstruktur der HIV-Integrase konnte u. a. durch ein Fragment-Screening mithilfe rekombinanter Proteine die chemische Struktur der Inhibitoren optimiert werden [123–125].

Analog dazu könnte die in dieser Arbeit identifizierte RVFV-Endonuklease basierend auf dem FRET-Assay zum Screening nach Inhibitoren anhand der Aktivität genutzt werden. Da bereits eine Vielzahl experimenteller Endonuklease-Inhibitoren beschrieben sind, könnte der Assay auch verwendet werden, um die Eignung dieser Substanzen schnell und effektiv zu testen bzw. zu optimieren.

Die CCHFV-Endonuklease zeigt *in-vitro* keine Aktivität, das Protein eignet sich jedoch für Bindungsassays im High-Throughput-Format. Für die Influenza-Endonuklease ist ein Bindungsassay beschrieben, der auf Fluoreszenzpolarisation beruht [126]. Ein solcher Assay wäre aussichtsreich, um vergleichbar zum RVFV die Eignung bereits bekannter Inhibitoren zu testen. In der Literatur ist auch ein Beispiel beschrieben, bei dem die Autoren mittels Thermofluor-Assay nach Inhibitoren für ein Target-protein screenen, was wiederum die Eignung dieser Methode zur Charakterisierung von Bindungen unterstreicht [127].

Die Kenntnis der Kristallstruktur der CCHFV-Endonuklease wäre ein weiterer Fortschritt und würde ein Computer-basiertes Wirkstoffdesign ermöglichen [128].

Zudem könnte im Rahmen eines Fragment-Screenings getestet werden, ob kleine Molekülfragmente von Inhibitoren in der Nähe des aktiven Zentrums gezielt weitere Bindetaschen besetzen und damit die Bindung eines Inhibitors optimieren. Weitere Versuche sollten daher angestellt werden, um die CCHFV-Endonuklease – möglicherweise auch im Kontext des nativen L-Proteins – mittels Kristallographie oder Kryo-Elektronenmikroskopie zu lösen.

Die vorliegende Arbeit liefert die Grundlage für biochemische Assays zur Erforschung von Viren der höchsten biologischen Schutzstufe und vereinfacht die weitere Forschung an vernachlässigten Tropenkrankheiten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Elliott, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 673–685, doi:10.1038/nrmicro3332.
2. Smithburn, K. C.; Haddow, A. J.; Mahaffy, A. F. A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1946**, *26*, 189–208, doi:10.4269/ajtmh.1946.s1-26.189.
3. Fenner, F. The Classification and Nomenclature of Viruses. *J. Gen. Virol.* **1975**, *31*, 463–470.
4. Adams, M. J.; Lefkowitz, E. J.; King, A. M. Q.; Harrach, B.; Harrison, R. L.; Knowles, N. J.; Kropinski, A. M.; Krupovic, M.; Kuhn, J. H.; Mushegian, A. R.; Nibert, M.; Sabanadzovic, S.; Sanfaçon, H.; Siddell, S. G.; Simmonds, P.; Varsani, A.; Zerbini, F. M.; Gorbalenya, A. E.; Davison, A. J. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2505–2538, doi:10.1007/s00705-017-3358-5.
5. Guterres, A.; Carvalho, R.; Oliveira, D.; Fernandes, J.; Regina, E.; Lemos, S. De; Guerra, C. Infection , Genetics and Evolution New bunya-like viruses : Highlighting their relations. *MEEGID* **2017**, *49*, 164–173, doi:10.1016/j.meegid.2017.01.019.
6. Pappu, H. R.; Jones, R. A. C.; Jain, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* **2009**, *141*, 219–236, doi:10.1016/j.virusres.2009.01.009.
7. Gowen, B. B.; Hickerson, B. T. Hemorrhagic fever of bunyavirus etiology: disease models and progress towards new therapies. *J. Microbiol.* **2017**, *55*, 183–195, doi:10.1007/s12275-017-7029-8.
8. Papa, A.; Mirazimi, A.; Köksal, I.; Estrada-Pena, A.; Feldmann, H. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* **2015**, *64*, 137–143, doi:10.1016/j.jcv.2014.08.029.
9. World Health Organization WHO | List of blueprint priority pathogens Available online: http://www.who.int/csr/research-and-development/list_of_pathogens/en/.
10. Nanyingi, M. O.; Munyua, P.; Kiama, S. G.; Muchemi, G. M.; Thumbi, S. M.; Bitek, A. O.; Bett, B.; Muriithi, R. M.; Njenga, M. K. A systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931–2014. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2015**, *5*, 1–12, doi:10.3402/iee.v5.28024.
11. Kenawy, M. A.; Abdel-Hamid, Y. M.; Beier, J. C. Rift Valley Fever in Egypt and other African countries: Historical review, recent outbreaks and possibility of disease occurrence in Egypt. *Acta Trop.* **2018**, *181*, 40–49, doi:10.1016/j.actatropica.2018.01.015.
12. Yu, X.-J.; Liang, M.-F.; Zhang, S.-Y.; Liu, J.; Li, J.-D.; Sun, Y.-L. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. **2011**, *364*, 1523–1532.
13. Silvas, J. A.; Aguilar, P. V. The emergence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 992–996, doi:10.4269/ajtmh.16-0967.
14. Métras, R.; Porphyre, T.; Pfeiffer, D. U.; Kemp, A.; Thompson, P. N.; Collins, L. M.; White, R. G. Exploratory Space-Time Analyses of Rift Valley Fever in South Africa in 2008-2011. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, 1–8,

doi:10.1371/journal.pntd.0001808.
15. Shabani, S. S.; Ezekiel, M. J.; Mohamed, M.; Moshiro, C. S. Knowledge, attitudes and practices on Rift Valley fever among agro pastoral communities in Kongwa and Kilombero districts, Tanzania. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 1–9, doi:10.1186/s12879-015-1099-1.
16. Drake, J. M.; Hassan, A. N.; Beier, J. C. A statistical model of Rift Valley fever activity in Egypt. *J. Vector Ecol.* **2013**, *38*, 251–259, doi:10.1111/j.1948-7134.2013.12038.x.
17. Bird, B. H.; Ksiazek, T. G. Zoonosis Update Rift Valley fever virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *234*, 883–893, doi:10.2460/javma.234.7.883.
18. Ergönül, Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.* **2006**, *6*, 203–214, doi:10.1016/S1473-3099(06)70435-2.
19. Bente, D. A.; Forrester, N. L.; Watts, D. M.; McAuley, A. J.; Whitehouse, C. A.; Bray, M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 159–189, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006.
20. Maltezou, H. C.; Papa, A. CrimeaneCongo hemorrhagic fever: Risk for emergence of new endemic foci in Europe? *Travel Med. Infect. Dis.* **2010**, *8*, 139–143, doi:10.1016/j.tmaid.2010.04.008.
21. Sun, S.; Dai, X.; Aishan, M.; Wang, X.; Meng, W.; Feng, C.; Zhang, F.; Hang, C.; Hu, Z.; Zhang, Y. Epidemiology and phylogenetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjiang, China. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2536–2543, doi:10.1128/JCM.00265-09.
22. Negredo, A.; de la Calle-Prieto, F.; Palencia-Herrejón, E.; Mora-Rillo, M.; Astray-Mochales, J.; Sánchez-Seco, M. P.; Bermejo Lopez, E.; Menárguez, J.; Fernández-Cruz, A.; Sánchez-Artola, B.; Keough-Delgado, E.; Ramírez de Arellano, E.; Lasala, F.; Milla, J.; Fraile, J. L.; Ordobás Gavín, M.; Martinez de la Gándara, A.; López Perez, L.; Diaz-Diaz, D.; López-García, M. A.; Delgado-Jimenez, P.; Martín-Quirós, A.; Trigo, E.; Figueira, J. C.; Manzanares, J.; Rodriguez-Baena, E.; Garcia-Comas, L.; Rodríguez-Fraga, O.; García-Arenzana, N.; Fernández-Díaz, M. V.; Cornejo, V. M.; Emmerich, P.; Schmidt-Chanasit, J.; Arribas, J. R. Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 154–161, doi:10.1056/NEJMoa1615162.
23. Leblebicioglu, H.; Ozaras, R.; Irmak, H.; Sencan, I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Res.* **2016**, *126*, 21–34, doi:10.1016/j.antiviral.2015.12.003.
24. Papa, A.; Velo, E.; Kadiaj, P.; Tsioka, K.; Kontana, A.; Kota, M.; Bino, S. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from livestock in Albania. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *54*, 496–500, doi:10.1016/j.meegid.2017.08.017.
25. Messina, J. P.; Pigott, D. M.; Golding, N.; Duda, K. A.; Brownstein, J. S.; Weiss, D. J.; Gibson, H.; Robinson, T. P.; Gilbert, M.; William Wint, G. R.; Nuttall, P. A.; Gething, P. W.; Myers, M. F.; George, D. B.; Hay, S. I. The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *109*, 503–513, doi:10.1093/trstmh/trv050.
26. Överby, A. K.; Pettersson, R. F.; Grunewald, K. Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 3–7.
27. Albornoz, A.; Hoffmann, A. B.; Lozach, P. Y.; Tischler, N. D. Early bunyavirus-host cell interactions. *Viruses* **2016**, *8*, 1–21, doi:10.3390/v8050143.
28. Cifuentes-Muñoz, N.; Salazar-Quiroz, N.; Tischler, N. D. Hantavirus Gn and Gc

envelope glycoproteins: Key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses* **2014**, *6*, 1801–1822, doi:10.3390/v6041801.
29. Bowden, T. A.; Bitto, D.; McLees, A.; Yeromonahos, C.; Elliott, R. M.; Huiskonen, J. T. Orthobunyavirus Ultrastructure and the Curious Tripodal Glycoprotein Spike. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, 5–14, doi:10.1371/journal.ppat.1003374.
30. Huiskonen, J. T.; Overby, A. K.; Weber, F.; Grunewald, K. Electron Cryo-Microscopy and Single-Particle Averaging of Rift Valley Fever Virus: Evidence for GN-GC Glycoprotein Heterodimers. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3762–3769, doi:10.1128/JVI.02483-08.
31. Barr, J. N.; Wertz, G. W. Bunyamwera Bunyavirus RNA Synthesis Requires Cooperation of 3´ - and 5´-Terminal Sequences. *J. Virol.* **2004**, *78*, 1129–1138, doi:10.1128/JVI.78.3.1129.
32. Gerlach, P.; Malet, H.; Cusack, S.; Reguera, J. Structural insights into bunyavirus replication and its regulation by the vRNA promoter. *Cell* **2015**, *161*, 1267–1279, doi:10.1016/j.cell.2015.05.006.
33. Overby, A. K.; Pettersson, R. F.; Neve, E. P. A. The Glycoprotein Cytoplasmic Tail of Uukuniemi Virus (Bunyaviridae) Interacts with Ribonucleoproteins and Is Critical for Genome Packaging. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3198–3205, doi:10.1128/JVI.02655-06.
34. Guo, Y.; Wang, W.; Ji, W.; Deng, M.; Sun, Y.; Zhou, H.; Yang, C.; Deng, F.; Wang, H.; Hu, Z.; Lou, Z.; Rao, Z. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 5046–5051, doi:10.1073/pnas.1200808109.
35. Raymond, D. D.; Piper, M. E.; Gerrard, S. R.; Smith, J. L. Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 11769–11774, doi:10.1073/pnas.1001760107.
36. Reguera, J.; Cusack, S.; Kolakofsky, D. Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *5*, 7–15, doi:10.1016/j.coviro.2014.01.003.
37. Barnwal, B.; Karlberg, H.; Mirazimi, A.; Tan, Y.-J. The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 582–592, doi:10.1074/jbc.M115.667436.
38. Ikegami, T.; Peters, C. J.; Makino, S. Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs Promotes Viral RNA Replication and Transcription in a Minigenome System. **2005**, *79*, 5606–5615, doi:10.1128/JVI.79.9.5606.
39. Billecocq, A.; Spiegel, M.; Vialat, P.; Kohl, A.; Weber, F. NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Blocks Interferon Production by Inhibiting Host Gene Transcription. **2004**, *78*, 9798–9806, doi:10.1128/JVI.78.18.9798.
40. Won, S.; Ikegami, T.; Peters, C. J.; Makino, S. NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis. *J. Virol.* **2007**, *81*, 13335–13345, doi:10.1128/JVI.01238-07.
41. Shi, X.; Kohl, A.; Leonard, V. H. J.; Li, P.; McLees, A.; Elliott, R. M. Requirement of the N-Terminal Region of Orthobunyavirus Nonstructural Protein NSm for Virus Assembly and Morphogenesis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8089–8099, doi:10.1128/JVI.00579-06.
42. Simon, M.; Johansson, C.; Mirazimi, A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesteroldependent. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 210–215, doi:10.1099/vir.0.006387-0.

43. Harmon, B.; Schudel, B. R.; Maar, D.; Kozina, C.; Ikegami, T.; Tseng, C.-T. K.; Negrete, O. A. Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12954–12970, doi:10.1128/JVI.02242-12.
44. Barr, J. N. Bunyavirus mRNA synthesis is coupled to translation to prevent premature transcription termination. *Rna* **2007**, *13*, 731–736, doi:10.1261/rna.436607.
45. Salanueva, I. J.; Novoa, R. R.; Cabezas, P.; López-Iglesias, C.; Carrascosa, J. L.; Elliott, R. M.; Risco, C. Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J. Virol.* **2003**, *77*, 1368–81, doi:10.1128/JVI.77.2.1368-1381.2003.
46. Amroun, A.; Priet, S.; de Lamballerie, X.; Quérat, G. Bunyaviridae RdRps: structure, motifs, and RNA synthesis machinery. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 753–778, doi:10.1080/1040841X.2017.1307805.
47. Muller, R.; Poch, O.; Delarue, M.; Bishop, D. H. L.; Bouloy, M. Rift Valley fever virus L-segment - correction of the sequence and possible functional-role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 1345–1352, doi:10.1099/0022-1317-75-6-1345.
48. Vieth, S.; Torda, A. E.; Asper, M.; Schmitz, H.; Günther, S. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* **2004**, *318*, 153–168, doi:10.1016/j.virol.2003.09.009.
49. Reguera, J.; Weber, F.; Cusack, S. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, 1–14, doi:10.1371/journal.ppat.1001101.
50. Bergeron, E.; Albarino, C. G.; Khristova, M. L.; Nichol, S. T. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *J. Virol.* **2010**, *84*, 216–226, doi:10.1128/JVI.01859-09.
51. Devignot, S.; Bergeron, E.; Nichol, S.; Mirazimi, A.; Weber, F. A Virus-Like Particle System Identifies the Endonuclease Domain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 5957–5967, doi:10.1128/JVI.03691-14.
52. O'Reilly, E. K.; Kao, C. C. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **1998**, *252*, 287–303, doi:10.1006/viro.1998.9463.
53. Das, K.; Arnold, E. Negative-Strand RNA Virus L Proteins: One Machine, Many Activities. *Cell* **2015**, *162*, 239–241, doi:10.1016/j.cell.2015.06.063.
54. Lehmann, M.; Pahlmann, M.; Jérôme, H.; Lelke, M.; Günther, S. Role of the C Terminus of Lassa Virus L Protein in Viral mRNA Synthesis. *J. Virol.* **2014**, *88*, 8713–8717, doi:10.1128/JVI.00652-14.
55. Rosenthal, M.; Gogrefe, N.; Vogel, D.; Reguera, J.; Reindl, S.; Rauschenberger, B.; Cusack, S.; Gu, S. Structural insights into reptarenavirus cap- snatching machinery. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, 1–24.
56. Klemm, C.; Reguera, J.; Cusack, S.; Zielecki, F.; Kochs, G. Systems To Establish Bunyavirus Genome Replication in the Absence of Transcription. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8205–8212, doi:10.1128/JVI.00371-13.
57. Soares-Weiser, K.; Thomas, S.; Thomson, G.; Garner, P. Ribavirin for Crimean-Congo hemorrhagic fever: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*

2010, *10*, 207, doi:10.1186/1471-2334-10-207.
58. Oestereich, L.; Rieger, T.; Neumann, M.; Bernreuther, C.; Lehmann, M.; Krasemann, S.; Wurr, S.; Emmerich, P.; Lamballerie, X. De Evaluation of Antiviral Efficacy of Ribavirin , Arbidol , and T-705 (Favipiravir) in a Mouse Model for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–15, doi:10.1371/journal.pntd.0002804.
59. Safronetz, D.; Haddock, E.; Feldmann, F.; Ebihara, H.; Feldmann, H. In vitro and in vivo activity of Ribavirin against Andes virus infection. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0023560.
60. Reed, C.; Lin, K.; Wilhelmsen, C.; Friedrich, B.; Nalca, A.; Keeney, A.; Donnelly, G.; Shamblin, J.; Hensley, L. E.; Olinger, G.; Smith, D. R. Aerosol Exposure to Rift Valley Fever Virus Causes Earlier and More Severe Neuropathology in the Murine Model, which Has Important Implications for Therapeutic Development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, 1–15, doi:10.1371/journal.pntd.0002156.
61. Gowen, B. B.; Westover, J. B.; Miao, J.; Van Wettere, A. J.; Rigas, J. D.; Hickerson, B. T.; Jung, K.-H.; Li, R.; Conrad, B. L.; Nielson, S.; Furuta, Y.; Wang, Z. Modeling Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Golden Syrian Hamsters: Importance of STAT2 in Preventing Disease and Effective Treatment with Favipiravir. *J. Virol.* **2017**, *91*, 1–12, doi:10.1128/JVI.01942-16.
62. Rusnak, J. M. Experience with Ribavirin for Treatment and Postexposure Prophylaxis of Hemorrhagic Fever Viruses : Crimean Congo Hemorrhagic Fever , Lassa Fever , and Hantaviruses. *Appl. Biosaf.* **2011**, *16*, 67–87, doi:10.1177/153567601101600203.
63. Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* **2014**, *508*, 402–405, doi:10.1038/nature13027.
64. Plotch, S. J.; Bouloy, M.; Ulmanen, I.; Krug, R. M. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **1981**, *23*, 847–858, doi:10.1016/0092-8674(81)90449-9.
65. Pflug, A.; Guilligay, D.; Reich, S.; Cusack, S. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature* **2014**, *516*, 355–360, doi:10.1038/nature14008.
66. Reich, S.; Guilligay, D.; Pflug, A.; Malet, H.; Berger, I.; Crepin, T.; Hart, D.; Lunardi, T.; Nanao, M.; Ruigrok, R. W. H.; Cusack, S. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature* **2014**, *516*, 361–366, doi:10.1038/nature14009.
67. Guilligay, D.; Tarendeau, F.; Resa-Infante, P.; Coloma, R.; Crepin, T.; Sehr, P.; Lewis, J.; Ruigrok, R. W. H.; Ortin, J.; Hart, D. J.; Cusack, S. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 500–506, doi:10.1038/nsmb.1421.
68. Pflug, A.; Lukarska, M.; Resa-Infante, P.; Reich, S.; Cusack, S. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res.* **2017**, *234*, 103–117, doi:10.1016/j.virusres.2017.01.013.
69. Raju, R.; Kolakofsky, D. Translational requirement of La Crosse virus S-mRNA synthesis: in vivo studies. *J. Virol.* **1987**, *61*, 96–103.

70. Fernández-García, Y.; Reguera, J.; Busch, C.; Witte, G.; Sánchez-Ramos, O.; Betzel, C.; Cusack, S.; Günther, S.; Reindl, S. Atomic Structure and Biochemical Characterization of an RNA Endonuclease in the N Terminus of Andes Virus L Protein. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, 1–18, doi:10.1371/journal.ppat.1005635.
71. Reguera, J.; Gerlach, P.; Rosenthal, M.; Gaudon, S.; Coscia, F.; Günther, S.; Cusack, S. Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, 1–24, doi:10.1371/journal.ppat.1005636.
72. Ju, H.; Zhang, J.; Huang, B.; Kang, D.; Huang, B.; Liu, X.; Zhan, P. Inhibitors of Influenza Virus Polymerase Acidic (PA) Endonuclease: Contemporary Developments and Perspectives. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3533–3551, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01227.
73. Kowalinski, E.; Zubieta, C.; Wolkerstorfer, A.; Szolar, O. H. J.; Ruigrok, R. W. H.; Cusack, S. Structural Analysis of Specific Metal Chelating Inhibitor Binding to the Endonuclease Domain of Influenza pH1N1 (2009) Polymerase. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, 1–14, doi:10.1371/journal.ppat.1002831.
74. DuBois, R. M.; Slavish, P. J.; Baughman, B. M.; Yun, M.-K.; Bao, J.; Webby, R. J.; Webb, T. R.; White, S. W. Structural and Biochemical Basis for Development of Influenza Virus Inhibitors Targeting the PA Endonuclease. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, 1–13, doi:10.1371/journal.ppat.1002830.
75. Yuan, S.; Chu, H.; Singh, K.; Zhao, H.; Zhang, K.; Kao, R. Y. T. A novel small-molecule inhibitor of influenza A virus acts by suppressing PA endonuclease activity of the viral polymerase. *Sci. Rep.* **2016**, 1–12, doi:10.1038/srep22880.
76. Yuan, S.; Chu, H.; Zhang, K.; Ye, J.; Singh, K.; Kao, R. Y. T.; Chow, B. K. C.; Zhou, J.; Zheng, B. J. A novel small-molecule compound disrupts influenza A virus PB2 cap-binding and inhibits viral replication. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2489–2497, doi:10.1093/jac/dkw194.
77. Byrn, R. A.; Jones, S. M.; Bennett, H. B.; Bral, C.; Clark, M. P.; Jacobs, M. D.; Kwong, A. D.; Ledeboer, M. W.; Leeman, J. R.; McNeil, C. F.; Murcko, M. A.; Nezami, A.; Perola, E.; Rijnbrand, R.; Saxena, K.; Tsai, A. W.; Zhou, Y.; Charifson, P. S. Preclinical activity of VX-787, a first-in-class, orally bioavailable inhibitor of the influenza virus polymerase PB2 subunit. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1569–1582, doi:10.1128/AAC.04623-14.
78. Koszalka, P.; Tilmanis, D.; Hurt, A. C. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. *Influenza Other Respi. Viruses* **2017**, *11*, 240–246, doi:10.1111/irv.12446.
79. Isao, Teshirogi (Shionogi & Co., L. . XOFLUZA TM (Baloxavir Marboxil) Tablets 10mg / 20mg Approved for the Treatment of Influenza Types A and B in Japan Available online: http://www.shionogi.co.jp/en/company/news/2018/pmrltj0000003nx1-att/e180223.pdf.
80. Gottesman, S. Proteases and their targets in Escherichia coli. *Annu. Rev. Genet.* **1996**, *30*, 465–506, doi:10.1146/annurev.genet.30.1.465.
81. Berrow, N. S.; Alderton, D.; Sainsbury, S.; Nettleship, J.; Assenberg, R.; Rahman, N.; Stuart, D. I.; Owens, R. J. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1–12, doi:10.1093/nar/gkm047.
82. Baneyx, F.; Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1399–1407, doi:10.1038/nbt1029.
83. Smith, D. B.; Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in

Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **1988**, *67*, 31–40, doi:10.1016/0378-1119(88)90005-4.
84. Kapust, R. B.; Waugh, D. S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1668–1674, doi:10.1110/ps.8.8.1668.
85. Fox, J. D.; Waugh, D. S. Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *205*, 99–117, doi:10.1385/1592593011.
86. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **1958**, *181*, 662–666, doi:10.1038/181662a0.
87. Guinier, A. La diffraction des rayons X aux tres petits angles: applications a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann. Phys. (Paris).* 1939, *12*, 161–237.
88. Kratky, O.; Porod, G. Diffuse small-angle scattering of x-rays in colloid systems. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 35–70, doi:10.1016/0095-8522(49)90032-X.
89. Mertens, H. D. T.; Svergun, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 128–141, doi:10.1016/j.jsb.2010.06.012.
90. Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2879–2886, doi:10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
91. Svergun, D. I.; Petoukhov, M. V.; Koch, M. H. J. Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2946–2953, doi:10.1016/S0006-3495(01)76260-1.
92. Franke, D.; Petoukhov, M. V.; Konarev, P. V.; Panjkovich, A.; Tuukkanen, A.; Mertens, H. D. T.; Kikhney, A. G.; Hajizadeh, N. R.; Franklin, J. M.; Jeffries, C. M.; Svergun, D. I. ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **2017**, *50*, 1212–1225, doi:10.1107/S1600576717007786.
93. Kozlowski, L. P.; Bujnicki, J. M. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 1, doi:10.1186/1471-2105-13-111.
94. Drozdetskiy, A.; Cole, C.; Procter, J.; Barton, G. J. JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W389–W394, doi:10.1093/nar/gkv332.
95. Simossis, V. A.; Heringa, J. PRALINE: A multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W289–W294, doi:10.1093/nar/gki390.
96. Pei, J.; Kim, B. H.; Grishin, N. V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2295–2300, doi:10.1093/nar/gkn072.
97. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; 2005; pp. 571–607 ISBN 978-1-58829-343-5.
98. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605–1612, doi:10.1002/jcc.20084.
99. Rost, B.; Liu, J. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3300–

3304, doi:10.1093/nar/gkg508.
100. Raghava, G. P. S. APSSP2 : A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning Available online: http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/.
101. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
102. Boivin, S.; Kozak, S.; Rasmussen, G.; Nemtanu, I. M.; Vieira, V.; Meijers, R. An integrated pipeline for sample preparation and characterization at the EMBL@PETRA3 synchrotron facilities. *Methods* **2016**, *95*, 70–77, doi:10.1016/j.ymeth.2015.08.003.
103. Blanchet, C. E.; Spilotros, A.; Schwemmer, F.; Graewert, M. A.; Kikhney, A.; Jeffries, C. M.; Franke, D.; Mark, D.; Zengerle, R.; Cipriani, F.; Fiedler, S.; Roessle, M.; Svergun, D. I. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 431–443, doi:10.1107/S160057671500254X.
104. Honig, J. E.; Osborne, J. C.; Nichol, S. T. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology* **2004**, *321*, 29–35, doi:10.1016/j.virol.2003.09.042.
105. Kinsella, E.; Martin, S. G.; Grolla, A.; Czub, M.; Feldmann, H.; Flick, R. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology* **2004**, *321*, 23–28, doi:10.1016/j.virol.2003.09.046.
106. Brinschwitz, V. Expression and purification of the SFTS virus L protein and its fragments, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2017.
107. Morin, B.; Coutard, B.; Lelke, M.; Ferron, F.; Kerber, R.; Jamal, S.; Frangeul, A.; Baronti, C.; Charrel, R.; de Lamballerie, X.; Vonrhein, C.; Lescar, J.; Bricogne, G.; Günther, S.; Canard, B. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, 1–12, doi:10.1371/journal.ppat.1001038.
108. Yuan, P.; Bartlam, M.; Lou, Z.; Chen, S.; Zhou, J.; He, X.; Lv, Z.; Ge, R.; Li, X.; Deng, T.; Fodor, E.; Rao, Z.; Liu, Y. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA N reveals an endonuclease active site. *Nature* **2009**, *458*, 909–913, doi:10.1038/nature07720.
109. Li, C. X.; Shi, M.; Tian, J. H.; Lin, X. D.; Kang, Y. J.; Chen, L. J.; Qin, X. C.; Xu, J.; Holmes, E. C.; Zhang, Y. Z. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife* **2015**, *2015*, 1–26, doi:10.7554/eLife.05378.
110. Dias, A.; Bouvier, D.; Crépin, T.; McCarthy, A. A.; Hart, D. J.; Baudin, F.; Cusack, S.; Ruigrok, R. W. H. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **2009**, *458*, 914–918, doi:10.1038/nature07745.
111. Zamoto-Niikura, A.; Terasaki, K.; Ikegami, T.; Peters, C. J.; Makino, S. Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12779–89, doi:10.1128/JVI.01310-09.
112. Crepin, T.; Dias, A.; Palencia, A.; Swale, C.; Cusack, S.; Ruigrok, R. W. H. Mutational and Metal Binding Analysis of the Endonuclease Domain of the Influenza Virus Polymerase PA Subunit. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9096–9104, doi:10.1128/JVI.00995-10.
113. Jin, H.; Elliott, R. M. Non-viral sequences at the 5' ends of Dugbe nairovirus S mRNAs. *J. Gen. Virol.* **1993**, *74*, 2293–2297, doi:10.1099/0022-1317-74-10-2293.

114. Ferron, F.; Weber, F.; de la Torre, J. C.; Reguera, J. Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. *Virus Res.* **2017**, *234*, 118–134, doi:10.1016/j.virusres.2017.01.018.
115. Saez-Ayala, M.; Yekwa, E. L.; Carcelli, M.; Canard, B.; Alvarez, K.; Ferron, F. Crystal structures of Lymphocytic choriomeningitis virus endonuclease domain complexed with diketo-acid ligands. *IUCrJ* **2018**, *5*, 223–235, doi:10.1107/S2052252518001021.
116. Wallat, G. D.; Huang, Q.; Wang, W.; Dong, H.; Ly, H.; Liang, Y.; Dong, C. High-resolution structure of the N-terminal endonuclease domain of the Lassa virus L polymerase in complex with magnesium ions. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0087577.
117. Kuhn, J. H.; Wiley, M. R.; Rodriguez, S. E.; Bào, Y.; Prieto, K.; Travassos da Rosa, A. P. A.; Guzman, H.; Savji, N.; Ladner, J. T.; Tesh, R. B.; Wada, J.; Jahrling, P. B.; Bente, D. A.; Palacios, G. Genomic characterization of the genus nairovirus (Family Bunyaviridae). *Viruses* **2016**, *8*, 1–27, doi:10.3390/v8060164.
118. Hara, K.; Schmidt, F. I.; Crow, M.; Brownlee, G. G. Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza A Virus RNA Polymerase Play a Critical Role in Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA Promoter Binding. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7789–7798, doi:10.1128/JVI.00600-06.
119. Meissner, J. D.; Seregin, S. S.; Seregin, S. V.; Yakimenko, N. V.; Vyshemirskii, O. I.; Netesov, S. V.; Petrov, V. S. Complete L segment coding-region sequences of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains from the Russian Federation and Tajikistan. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 465–475, doi:10.1007/s00705-005-0648-0.
120. Song, M.; Kumar, G.; Shadrick, W. R.; Zhou, W.; Jeevan, T.; Li, Z.; Slavish, P. J. Identification and characterization of influenza variants resistant to a viral endonuclease inhibitor. **2016**, *113*, 3669–3674, doi:10.1073/pnas.1519772113.
121. Stevaert, A.; Naesens, L. The Influenza Virus Polymerase Complex: An Update on its Structure, Functions, and Significance for Antiviral Drug Design. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 1127–1173, doi:10.1002/med.
122. Noble, E.; Cox, A.; Deval, J.; Kim, B. Endonuclease substrate selectivity characterized with full-length PA of influenza A virus polymerase. *Virology* **2012**, *433*, 27–34, doi:10.1016/j.virol.2012.07.008.
123. Bailly, F.; Cotelle, P. The preclinical discovery and development of dolutegravir for the treatment of HIV. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 1243–1253, doi:10.1517/17460441.2015.1064896.
124. Surtees, R.; Dowall, S. D.; Shaw, A.; Armstrong, S.; Hewson, R.; Carroll, M. W.; Mankouri, J. Heat Shock Protein 70 Family Members Interact with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus Nucleocapsid Proteins and Perform a Functional Role in the Nairovirus Replication Cycle. *J. Virol.* **2016**, *90*, 9305–9316, doi:10.1128/JVI.00661-16.Editor.
125. Langley, D. R.; Samanta, H. K.; Lin, Z.; Walker, M. A.; Krystal, M. R.; Dicker, I. B. The Terminal (Catalytic) Adenosine of the HIV LTR Controls the Kinetics of Binding and Dissociation of HIV Integrase Strand Transfer Inhibitors. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13481–13488.
126. Baughman, B. M.; Jake Slavish, P.; Dubois, R. M.; Boyd, V. A.; White, S. W.; Webb, T. R. Identification of influenza endonuclease inhibitors using a novel fluorescence polarization assay. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 526–534,

doi:10.1021/cb200439z.
127. de Araujo, E. D.; Manaswiyoungkul, P.; Israelian, J.; Park, J.; Yuen, K.; Farhangi, S.; Berger-Becvar, A.; Abu-Jazar, L.; Gunning, P. T. High-throughput thermofluor-based assays for inhibitor screening of STAT SH2 domains. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 159–167, doi:10.1016/j.jpba.2017.04.052.
128. Bauman, J. D.; Patel, D.; Baker, S. F.; Vijayan, R. S. K.; Xiang, A.; Parhi, A. K.; Martínez-Sobrido, L.; Lavoie, E. J.; Das, K.; Arnold, E. Crystallographic fragment screening and structure-based optimization yields a new class of influenza endonuclease inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2501–2508, doi:10.1021/cb400400j.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des bunyaviralen Virions (A) und der Gensegmente (B) anhand der Familie *Peribunyaviridae* 5
Abbildung 2: Strukturen des LACV L-Proteins und des Influenza-Polymerasekomplexes 9
Abbildung 3: Der *Cap-Snatching*-Mechanismus bei Influenza-Viren 13
Abbildung 4: Vergleich Kristallstrukturen der LASV- und LACV-Endonukleasen 14
Abbildung 5: Streuintensität I(s) und P(r)-Verteilungen theoretischer geometrischer Formen 22
Abbildung 6: Identifizierung löslicher Trunkierungsfragmente des N-Terminus und der Endonuklease des CCHFV L-Proteins anhand bioinformatischer Vorhersageprogramme 48
Abbildung 7: Reinigung des CCHFV-Endonuklease CC_05 53
Abbildung 8: Limitierte Proteolyse der CCHFV-Endonuklease mit vier Proteasen 55
Abbildung 9: Limitierte Proteolyse der CCHFV-Endonuklease mit Trypsin und Charakterisierung der erhaltenen Fragmente 56
Abbildung 10: Nachweis der Interaktion der durch Trypsinbehandlung aus der CCHFV-Endonuklease erhaltenen Fragmente 58
Abbildung 11: Nachweis des strukturell intakten, aktiven Zentrums im Komplex aus N- und C-terminalem Fragment nach Trypsinbehandlung 60
Abbildung 12: Vergleich der SAXS-Daten und –Strukturen der unbehandelten und Trypsin-behandelten CCHFV-Endonuklease 63
Abbildung 13: Identifizierung und Größenvergleich ausgewählter nairoviraler Endonukleasen 66
Abbildung 14: Thermostabilisierung ausgewählter nairoviraler Endonukleasen durch zweiwertige Metallionen 67
Abbildung 15: Reinigung der EREV-Endonuklease 69
Abbildung 16: Vergleich der Streudaten und SAXS-Strukturen der nairoviralen Endonuklease-Domänen von EREV, CCHFV und NSDV 71
Abbildung 17: Identifizierung und Reinigung der löslichen RVFV-Endonuklease 74
Abbildung 18: Thermische Stabilisierung des Wildtyps und der H79A-Mutante der RVFV-Endonuklease in Anwesenheit von Manganionen 76
Abbildung 19: Charakterisierung der Endonuklease-Aktivität der RVFV-Endonuklease 78
Abbildung 20: Vergleichende Untersuchung der Nuklease-Aktivität ausgewählter bunya- und arenaviraler Endonukleasen 82
Abbildung 21: Abbau eines heterogenen RNA-Substrats durch fünf bunyavirale Endonukleasen 83
Abbildung 22: Thermische Stabilisierung ausgewählter Alanin-Mutanten N-terminaler Aminosäurereste der CCHFV-Endonuklease durch Manganionen 86
Abbildung 23: Vergleich der thermischen Stabilisierung dreier Endonukleasen sowie ausgewählter Mutanten durch Manganionen und DPBA 88
Abbildung 24: Vergleich der thermischen Stabilisierung der CCHFV-Endonuklease durch die Endonuklease-Inihibitoren DPBA und PA-30 88
Abbildung 25: Sekundärstrukturbasierter Sequenzvergleich und Topologiemodell der CCHFV- Endonuklease 90

Abbildung 26: Schematische Darstellung der limitierten Proteolyse der CCHFV Endonuklease 100
Abbildung 27: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen 126
Abbildung 28: Nachweis der Bindung von Manganionen an die CCHFV- und LCMV-Endonuklease mittels Isothermer Titrationskalorimetrie 127
Abbildung 29: Kalibration der HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 129

ANHANG

DNA-Oligonukleotide (L-Protein Klonierungsprimer)

Alle DNA-Oligonukleotide sind in 5'-3'-Odientierung angegeben.

RVFV Endonuklease Trunkierungsfragmente

eL1_popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATGGATTCTATATTATCA
eLΔ_S174_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTAAGACCATACACCATGCCG
eLΔ_L203_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTACAAGGTCCTTAGCTCATC
eLΔ_S227_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTAGGAGGAGACCATGGCTAG
eLΔ_D248_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTAGTCAAACATTTCTCTGCTGAAGGGT
eLΔ_N277_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTAATTGATGAGTTTCTCTTGAGAA
eLΔ_A311_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTATGCTCTATACTGATTTAAGGCTC
eLΔ_N367_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTAGTTTGCAGAGGTGACCACTT
eLΔ_S387_rev	ATGGTCTAGAAAGCTTTACGAAAGAGCAAACTCAAG
eLΔ_F239_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTAAAACACAGATTCTGTCACTAACA
eLΔ_E245_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTATTCTCTGCTGAAGG
eLΔ_F247_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTAAAACATTTCTCTGCTGAAGGG
eLΔ_R249_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTACCTGTCAAACATTTCTCTGC
eLΔ_R251_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTATCTAAACCTGTCAAACATTTCTCT
eLΔ_S253_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTAGGAGGATCTAAACCTGTCA
eLΔ_E258_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTACTCTGAATCGGGAGG
eLΔ_V264_popF-	ATGGTCTAGAAAGCTTTACACTATCCTCGTGATATACTC

CCHFV N-terminale Trunkierungsfragmente

N1popE_forw	AGGAGATATACCATGGACTTCTTGAGAAACCTTGA
N2popE_forw	AGGAGATATACCATGGACTTCTTGAGAAACCTTGA
N3popE_forw	AGGAGATATACCATGTTAAGTTTGGTGGATAAGG
C1popE_rev	GTGATGGTGATGTTTTCTAGAGAATTCCTGC
C2popE_rev	GTGATGGTGATGTTTGAATGTTGACAGCATGACACC
C3popE_rev	GTGATGGTGATGTTTGAAGCAGTTCTGCAGCTTG
C4popE_rev	GTGATGGTGATGTTTCAATGTATTAAGCCCGAGAAG

C5popE_rev	GTGATGGTGATGTTTTTGTAGAGCATACAATCTCT
C6popE_rev	GTGATGGAGATGTTTAAACAGAGTCTGTATCAACATGG
C7popE_rev	GTGATGGTGATGTTTTGTAAGTTGTAGGTTATAAGC
CC_popF_L_N1+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGACTTCTTGAGAAACCT
CC_popF_L_N2+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGACCTTAAGTTTGGTGG

CCHFV Endonuklease Trunkierungsfragmente

CC_popF_L_E513+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGAATTTATCATATCTGAG
CC_popF_L_M526+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATGAAATTCATTAGCACCT
CC_popF_L_N543+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGAATGTCCTTTCCTATGCAC
CC_popF_L_E563+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGAAGACATCTCACAGCTC
CC_popF_L_I587+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATAGCCATAATTTGTGATGG
CC_popF_L_D608+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGATTGTGCAAGAGAGT
CC_popF_L_A629+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGCTTGGAAGCATGCTCT
CC_popF_L_S895-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAAGAGAGTTTGTTGAAGAGGAAGCTG
CC_popF_L_A921-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATGCCTTTAGGTAACTCCTTACC
CC_popF_L_L946-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAAAGTATATGCTCTTTCATCTTTTCCC
CC_popF_L_E968-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATTCGACTAGTCCTTTGCGC
CC_popF_L_T998-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATGTCCGCTCGAACTCGTCA
CC_popF_L_C7-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATGTAAGTTGTAGGTTATAAGCAAGCAG

CC_05 Trunkierungsfragmente

CC_1Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATTTGTGATGGCAT
CC_2Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGATGGCATAGA
CC_3Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGAGGGCAACATGAA
CC_4Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATGAAACAGTTGTTTTCTATATT
CC_5Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGTTGTTTTCTATATTGCCTCCAG
CC_6Δ05+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATATTGCCTCCAGA
CC_05Δ1-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAGTTGAAGAGGAAGCTGACTGA
CC_05Δ2-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAGAAGCTGACTGAGTTCTTTAAGACT
CC_05Δ3-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATGAGTTCTTTAAGACTCGCAC
CC_05Δ4-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATAAGACTCGCACTCTGTCCT
CC_05Δ5-	CTGGTCTAGAAAGCTTTACACTCTGTCCTCCGTTATCCA
CC_05Δ6-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATCCTAGTAACTCTAACAGCTTC

Nairovirale Endonuklease Trunkierungsfragmente

Er_05popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAGCTTAACTTACTAAATAAATG
Er_05popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGTGGCAATTATCTG
Ha_05popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAGGTCAGACAACTGAAGAGATGG
Ha_05popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATTGCTCTCATCTGC
To_05popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAAGTCAAGCAGCTGAAGAGGTG
To_05popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATTGCCCTCATCTGTGATAGG
Dug_05popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGGTAGCCATAATT
Dug_05popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTAGGTCAGTTTTGAAAACA
NSD_05popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATTGCAATAATAT
NSD_05popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTATGTGAGGCTGCTAAAC

Mutagenese

CC_L_D693A_fwd	GATCTAACTCCTGCCTTCTCGCTTACA
CC_L_D693A_rev	TGTAAGCGAGAAGGCAGGAGTTAGATC
CC_L_H632A+	AGCACAGCTTGGAAGGCTGCTCTTCGACTG
CC_L_H632A-	CAGTCGAAGAGCAGCCTTCCAAGCTGTGCT
CC_H626A+	AATTCTCCAACGGCCAGCACAGCTTGG
CC_H626A-	CCAAGCTGTGCTGGCCGTTGGAGAATT
CC_E612A+	TGTGCAAGAGCGTGTGAGGTCCTC
CC_E612A-	GAGGACCTCACACGCTCTTGCACA
CC_D619A+	GTCCTCTTTGATGCCATAAGAAATTCT
CC_D619A-	AGAATTTCTTATGGCATCAAAGAGGAC
CC_E642A+	GGGACCGCATACGCAGGTCTGTTTGCA
CC_E642A-	TGCAAACAGACCTGCGTATGCGGTCCC
CC_E656A+	CAGTATATCCCTGCGGATATCAAACCA
CC_E656A-	TGGTTTGATATCCGCAGGGATATACTG
CC_D657A+	TATATCCCTGAGGCTATCAAACCAAGT
CC_D657A-	ACTTGGTTTGATAGCCTCAGGGATATA
CC_D672A+	ACTCTGTTTCCTGCCAAGTTTGAGGAC
CC_D672A-	GTCCTCAAACTTGGCAGGAAACAGAGT
CC_E675A+	CCTGACAAGTTTGCGGACTTCTTGGAC
CC_E675A-	GTCCAAGAAGTCCGCAAACTTGTCAGG
CC_D676A+	GACAAGTTTGAGGCCTTCTTGGACCGA

CC_D676A-	TCGGTCCAAGAAGGCCTCAAACTTGTC
CC_D679A+	GAGGACTTCTTGGCCCGAACCCAGTTG
CC_D679A-	CAACTGGGTTCGGGCCAAGAAGTCCTC
CC_H684A+	CGAACCCAGTTGGCCCCAGAGTTCAGA
CC_H684A-	TCTGAACTCTGGGGCCAACTGGGTTCG
Dug05_D692A+	GATCTCACCCCTGCCTATGCTCTAACT
Dug05_D692A-	AGTTAGAGCATAGGCAGGGGTGAGATC
NSD05_D688A+	GATCTGACACCTGCCTTTGCCTTAACT
NSD05_D688A-	AGTTAAGGCAAAGGCAGGTGTCAGATC
To_L_D685A+	GACCTAACTCCTGCTTATGCATTAACA
To_L_D685A-	TGTTAATGCATAAGCAGGAGTTAGGTC
Er05_D656A+	GACCTTGTGCCAGCCTTTCTTATAACTCAA
Er05_D656A-	TTGAGTTATAAGAAAGGCTGGCACAAGGTC
Ha05_D685A+	GGATCTTACACCAGCCTACGCACTAACAC
Ha05_D685A-	GTGTTAGTGCGTAGGCTGGTGTAAGATCC
RVFV_H79A+	GCCAATTTTGTTGCCGATTTCACCTTT
RVFV_H79A-	AAAGGTGAAATCGGCAACAAAATTGGC
RVFV D111A+	CATTTGAGCCCTGCCATGATCATTAAA
RVFV D111A-	TTTAATGATCATGGCAGGGCTCAAATG
LCMV_E51A+	TCACGCTGCATTGCAATAGACAGTGCA
LCMV_E51A-	TGCACTGTCTATTGCAATGCAGCGTGA
LACV180_popF+	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGATGGACTATCA
LACV180_popF-	CTGGTCTAGAAAGCTTTACAATAGGAATTCTTCA
LACV180_D79A+	CATATTACCCCAGCCAATTATCTATATATA
LACV180_D79A-	TATATATAGATAATTGGCTGGGGTAATATG
LACV_V129I_K136R+	ATAGTTATCATCCGTATAGACCCTGTAAGTAGGGATTTGCAT
LACV_V129I_K136R-	ATGCAAATCCCTACTTACAGGGTCTATACGGATGATAACTAT

CCHFV L-Gen Fusionsprimer

Y4813A_rev	GTTGCCAAGAACCTTGTACACTTTCTTTCCGGACAAAGCTG
Y4813B1B2_forw	AAGGTTCTTGGCAACCTAGGGAATGAGCTGCTGTA
Y4813B1B2_rev	GGTGATAAGCTGGCCTGTGGGATACTTTATACAGTCGATGCC
Y4813B3_forw	GGCCAGCTTATCACCCATGGAAGAGTGAGTGCAAAACATAAC
Y4183B3_rev	CCTACTTTTGCTTGAGCTGTAGGACCTCCTGTCTGATACTTC
Y4813B4_forw	TCAAGCAAAAGTAGGATCCGAAGTATTTTCGGAAGGTACAATT
Y4813B4_rev	CCACTTGGTATTATCACCCGAGATGCAAATAACTTTGT
Y4813C_forw	GATAATACCAAGTGGGGCCCGATACACTGCTGC

Sequenzierprimer

pOPIN-E/F_fwd	GGATCGGACCGAAATTAATACG
pOPIN-E/F_rev	CATATGTCCTTCCGAGTGAGA
pOPIN-M_fwd	TTTCTGGTATGCCGTGCGTACT
pOPIN-J-fwd	CCTTTGCAGGGCTGGCAAGCC

Tabelle 1: Trunkierungsfragmente im N-Terminus des CCHFV L-Proteins

Konstrukt	N-Terminus	C-Terminus	MW (kDa)	pI	Expression	Löslichkeit
N1C1	1	S301	34,2	5,1	-	-
N1C2	1	G329	37,2	5,3	+	-
N1C3	1	F423	47,7	6,6	+	-
N1C4	1	L482	54,5	6,1	+	+
N1C5	**1**	**L579**	**65,6**	**6,7**	**+**	**++**
N1C6	1	F670	75,9	6,0	+	-
N1C7	1	T1059	120,3	5,7	-	-
N2C4	T168	L482	35,4	8,8	-	-
N2C5	T168	L579	46,4	9,1	+	-
N2C6	T168	F670	56,8	8,1	+	-
N3C7	E278	T1059	88,9	6,3	-	-

Tabelle 2: Trunkierungsfragmente der CCHFV-Endonuklease

Konstrukt	N-Terminus	C-Terminus	MW (kDa)	pI	Expression	Löslichkeit
CC_01	E513	S895	43,9	5,2	+	-
CC_02	M526	S895	42,3	5,2	+	-
CC_03	N543	S895	40,5	5,0	+	-
CC_04	E563	S895	38,3	4,9	+	-
CC_05	**I587**	**S895**	**35,5**	**5,1**	**+**	**++**
CC_06	D608	S895	33,2	5,2	+	-
CC_07	A629	S895	30,8	5,4	+	-
CC_08	E563	A921	41,0	5,1	+	-
CC_09	I587	A921	38,3	5,3	+	-
CC_10	E563	L946	43,9	5,1	+	-
CC_11	I587	L946	41,1	5,4	+	-
CC_12	E563	E968	46,3	5,2	+	-
CC_13	I587	E968	43,5	5,5	+	-
CC_14	E563	T998	49,7	5,1	+	-
CC_15	I587	T998	46,9	5,3	+	-
CC_16	E563	T1059	56,7	5,2	+	-
CC_17	I587	T1059	53,9	5,4	+	-

Tabelle 3: N- und C-terminale CC_05-Verkürzungsfragmente der CCHFV Endonuklease

Konstrukt	N-Terminus	C-Terminus	Verkürzung N-terminal	Verkürzung C-terminal	Löslichkeit
CC_1Δ05	I590	S895	-3		-
CC_2Δ05	D592	S895	-5		-
CC_3Δ05	E595	S895	-8		-
CC_4Δ05	M598	S895	-11		-
CC_5Δ05	L601	S895	-14		-
CC_6Δ05	I604	S895	-17		-
CC_05	**I587**	**S895**	**-**	**-**	**++**
CC_05Δ1	I587	N892		-3	-
CC_05Δ2	I587	F889		-6	-
CC_05Δ3	I587	S886		-9	-
CC_05Δ4	I587	L883		-12	-
CC_05Δ5	I587	V880		-15	-
CC_05Δ6	I587	G854		-41	-

Tabelle 4: Trunkierungsfragmente des RVFV L-Proteins

Konstrukt	N-Terminus	C-Terminus	MW (kDa)	pI	Expression	Löslichkeit
eLΔ_S174	1	S174	19,7	5,1	+	-
eLΔ_L203	1	L203	23,2	4,7	+	-
eLΔ_S227	1	S227	25,8	4,6	+	-
eLΔ_F247	1	F247	28,2	4,6	+	+
eLΔ_D248	**1**	**D248**	**28,3**	**4,6**	**+**	**++**
eLΔ_R249	1	R249	28,5	4,6	+	+
eLΔ_R251	1	R251	28,8	4,7	+	+
eLΔ_S253	1	S253	29,0	4,7	+	+
eLΔ_E258	1	E258	29,5	4,6	+	+
eLΔ_V264	1	V264	30,2	4,7	+	-
eLΔ_N277	1	N277	31,7	4,7	+	-
eLΔ_A311	1	A311	35,5	4,8	+	-
eLΔ_N367	1	N367	41,9	4,8	+	-
eLΔ_S387	1	S387	44,2	4,7	+	-

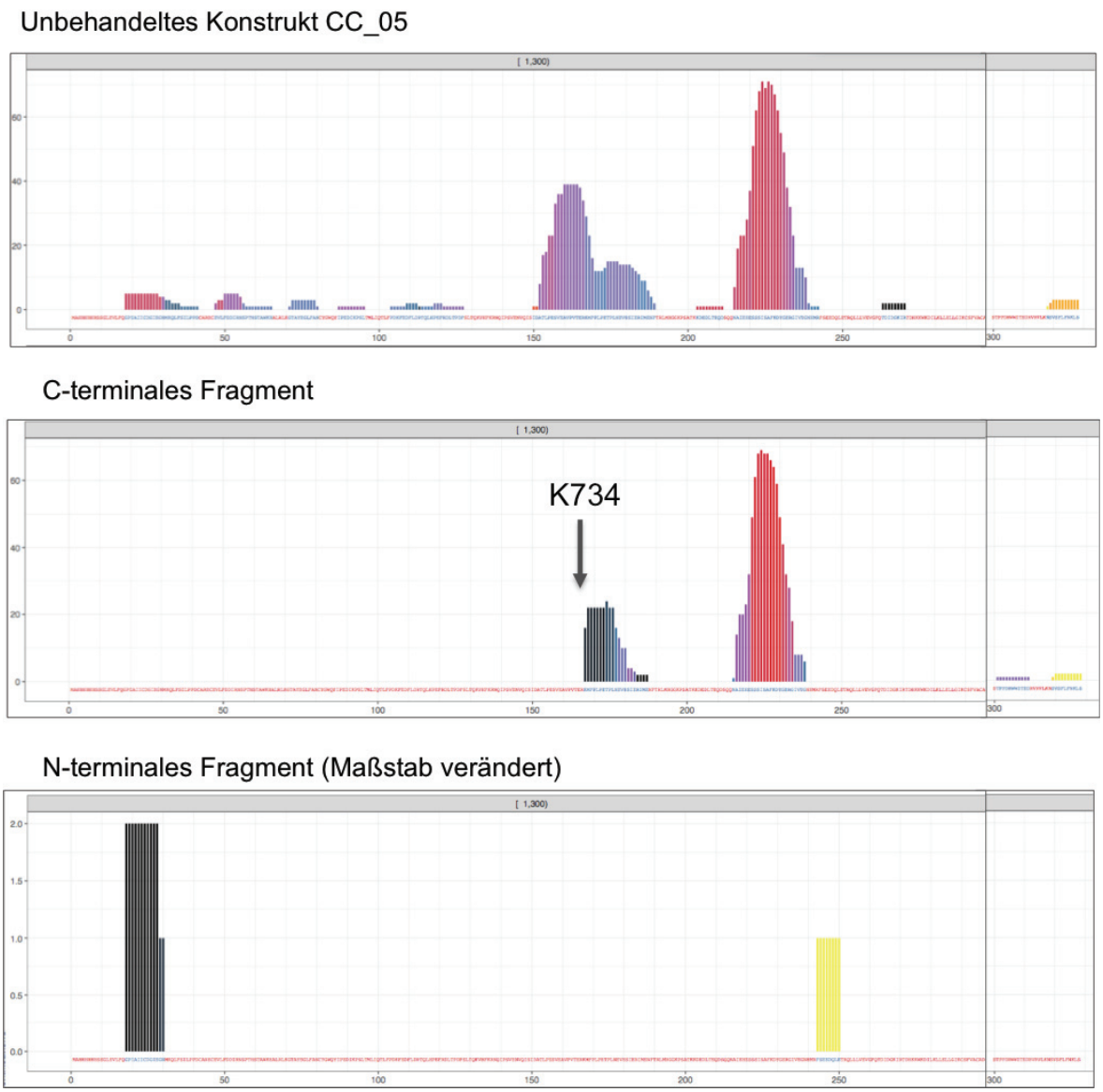


Abbildung 27: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Die Abbildung zeigt die Rohdaten der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung der bei limitierter Proteolyse aus dem Protein CC_05 entstandenen Fragmente 1 und 2.
Die aus dem Gel ausgeschnittenen Fragmente wurden tryptisch verdaut und mittels LTQ Orbitrap Velos Pro-Massenspektrometer am EMBL in Heidelberg analysiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl der detektierten Peptide der Proteinsequenz. Peptide, die nur einfach detektiert wurden, wurden vernachlässigt.

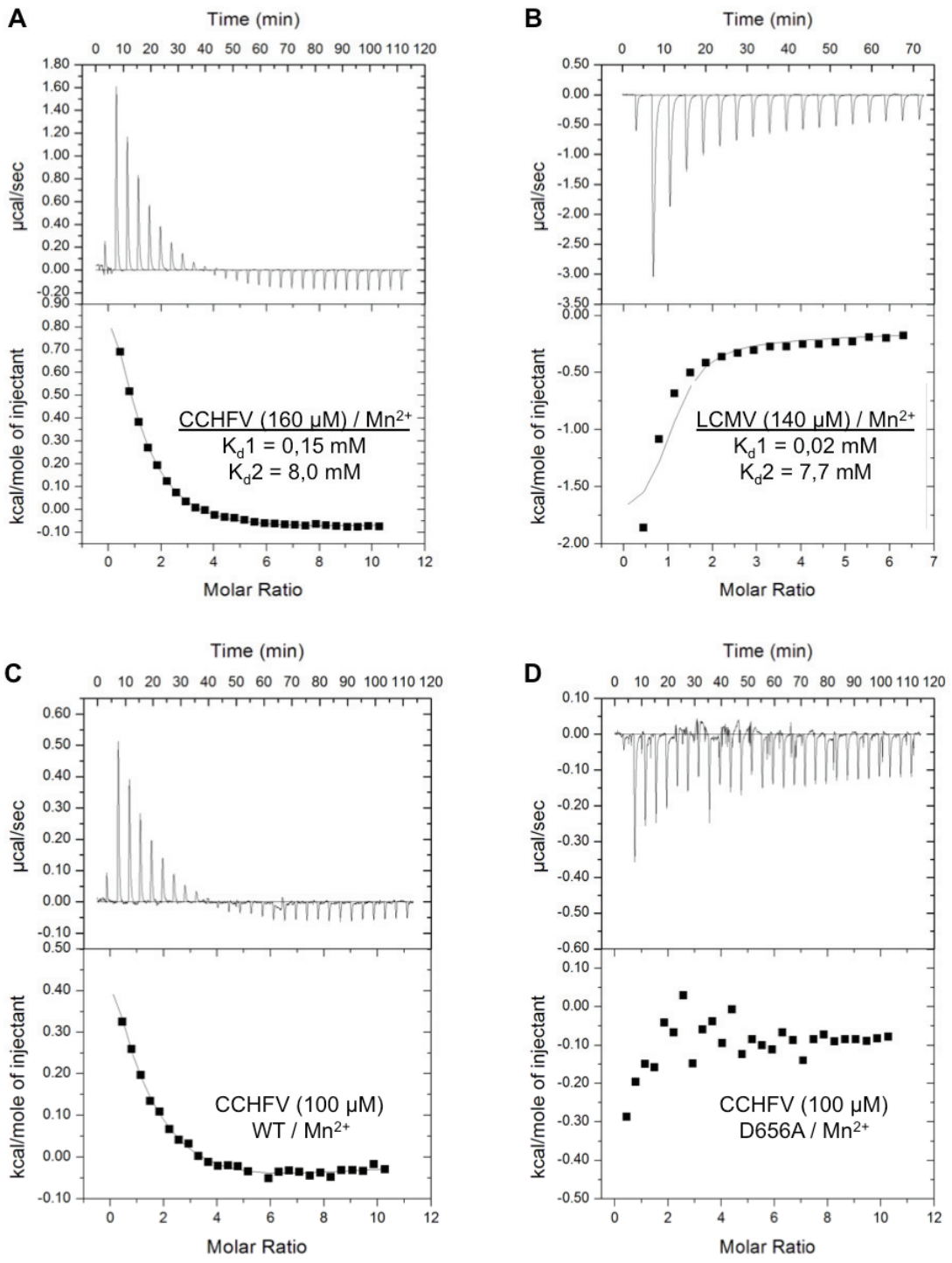
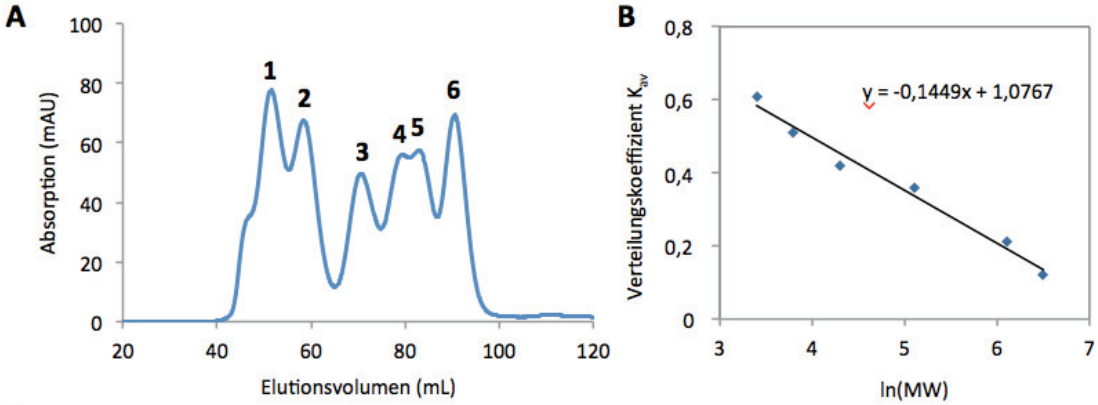


Abbildung 28: Nachweis der Bindung von Manganionen an die CCHFV- und LCMV-Endonuklease mittels Isothermer Titrationskalorimetrie

Die Wärmeabsorption bzw. –abgabe bei der Titration der Endonuklease-Proteine wird in einem VP-ITC Kalorimeter durch Titration mit Manganionen in einem Volumen von 1469 µL gemessen (oberer Graph). Die Bindungsisothermen werden durch Integration der Signale mit der Software Origin 7.0 erhalten (unterer Graph).
160 µM gereinigte CCHFV-Endonuklease **(A)** oder 140 µM LCMV-Endonuklease **(B)** wird mit Injektionen von jew. 15 µL $MnCl_2$-Lösung titriert (A: 8 mM, B: 7 mM).
(C) 100 µM CCHFV-Endonuklease werden mit 5 mM $MnCl_2$-Lösung titriert. Die Abbildung zeigt die Wärmeänderung und Bindungsisothermen für das Wildtyp-Protein, sowie in **(D)** analog für 100 µM der Mutante E656A.

Tabelle 5: Auflistung der Proteine und Kristallansätze

Konstrukt	Konzentration mg/mL	Startpuffer	Additiv	Screen
CC_05	10	BisTris 20 mM, NaCl 1000 mM, Glycerol 5%, pH 5,5	-	JCSG Plus Morpheus
	15	BisTris 20 mM NaCl 1000 mM Glycerol 5%, pH 5,5		JCSG Plus PEG I PEG II Clear Strategy HD I Clear Strategy HD II
	11	Citrat 50 mM NaCl 100 mM, pH 6,0	$MnCl_2$ 5 mM DPBA 200 µM	PACT JCSG Plus
CC_05 +Trypsin	9	Tris 20 mM NaCl 200 mM Glycerol 5 % pH 7,5	-	JCSG Plus Morpheus Nucleix PACT
Er_05	12	Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Glycerol 5%	-	JCSG Plus PEG I PEG II Clear Strategy HD I Clear Strategy HD II
	13	Citrat 50 mM NaCl 100 mM, pH 6,0		JCSG Plus PACT Hampton Additive
	13	Tris 20 mM NaCl 200 mM Glycerol 5% pH 7,5	$MnCl_2$ 5 mM	JCSG Plus PACT
	12	Tris 20 mM NaCl 500 mM Glycerol 5% pH 7,5	-	PACT (3 verschiedene Mischungsverhältnisse)
	12	Tris 20 mM NaCl 200 mM Glycerol 5%, pH 7,5	$MnCl_2$ 2 mM DPBA 200 µM	Nucleix Clear Strategy HD I Clear Strategy HD II
			$MnCl_2$ 2 mM DPBA 400 µM	JCSG I – IV Morpheus
Ha_05	9		$MnCl_2$ 5 mM	JCSG Plus PACT



C

	Referenzprotein	MW (kDa)	Elutionsvolumen (mL)	ln(MW)	K_{av}
1	Thyreoglobulin	669	51	6,5	0,12
2	Ferritin	440	58	6,1	0,21
3	Aldolase	158	70	5,1	0,36
4	Conalbumin	75	79	4,3	0,42
5	Ovalbumin	44	82	3,8	0,51
6	Carboanhydrase	29	90	3,4	0,61

Abbildung 29: Kalibration der HiLoad 16/60 Superdex 200 pg

Die Superdex 200-Säule wurde mit Referenzproteinen aus den *Gel Filtration Calibration Kits HMW und LMW* (GE Healthcare) im Gelfiltrationspuffer (20 mM Tris 200 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 7,5) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 mL/min kalibriert. **(A)** Die Elutionsvolumen V_e der Proteine wurden aus dem Chromatogramm abgelesen, Die Identität der Proteine wurde mittels SDS-PAGE bestätigt. Die Bestimmung des Aussschlussvolumens erfolgte durch Dr. Maria Rosenthal mit Dextranblau und beträgt V_0 = 42 mL. Das Säulenvolumen beträgt V_c = 120 mL. **(C)** Der Verteilungskoeffizient K_{av} des jeweiligen Proteins errechnet sich aus dem Elutionsvolumen V_e, dem Säulenvolumen V_c und dem Ausschlussvolumen V_0 zu $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$ **(B)** Das Diagramm zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem natürlichen Logarithmus des Molekulargewichts und dem Verteilungskoeffizinenten des Proteins.
Die Geradengleichung der Regressionsgerade sowie die Formel zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten diente zur Berechnung des erwarteten Elutionsvolumens für jedes Protein.

LEBENSLAUF

Name:	Tobias Holm, geb. am 07.03.1990 in Teterow
Nationalität:	deutsch
10/2014 – heute	**Doktorarbeit** bei Prof. Dr. med. Stephan Günther Abteilung Virologie Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin *„Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des bunyaviralen L-Proteins“*
01/2014 – heute	Angestellter Apotheker, Vita-Apotheke, Hamburg
12/2013	**Approbation** als Apotheker
05/2013 – 11/2013	Pharmaziepraktikant, Marquards Apotheke, Hamburg
10/2012 – 04/2013	**Diplomarbeit** bei Prof. Dr. med. Bernhard H. Rauch Institut für Allgemeine Pharmakologie, Greifswald *„Einfluss Pim1 und SphK1 assoziierter Signalwege auf das Migrationsverhalten von Gliobastomzellen“*
10/2008 – 09/2012	**Studium der Pharmazie**, Universität Greifswald 3. Staatsexamen: 12/2013 2. Staatsexamen: 09/2012 1. Staatsexamen: 09/2010
09/2006 – 07/2008	**Abitur**, Europaschule Gymnasium Teterow
09/2016	iNEXT Research Grant
09/2016	EMBO Practical Course „Protein Expression, Purification and Characterization“, EMBL, Hamburg

VERÖFFENTLICHUNGEN

Zur Publikation im Journal of Virology eingereicht.

Tobias Holm, Carola Busch, Silke Olschewski, Stephan Günther, Sophia Reindl: *Biochemical and structural studies on the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus cap-snatching endonuclease*.

VERSICHERUNG AN EIDES STATT

Ich, Tobias Holm, wohnhaft in: Grovestraße 29, 22083 Hamburg

versichere an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die ich wörtlich dem Sinne nach aus Veröffentlichungen entnommen habe, als solche kenntlich gemacht habe, mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient habe.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

Die Strafbarkeit einer falschen eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, namentlich die Strafandrohung gemäß § 156 StGB bis zu drei Jahren Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei vorsätzlicher Begehung der Tat bzw. gemäß § 161 Abs. 1 StGB bis zu einem Jahr Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei fahrlässiger Begehung.

Hamburg, den _____ _____

Tobias Holm

DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stephan Günther für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg. Zudem danke ich für die Möglichkeit, im Rahmen des EMLab-Einsatzes während des Ebola-Ausbruchs 2015 in Guinea tätig zu sein.
Prof. Dr. Andreas Dotzauer danke ich für die Hilfsbereitschaft und Begutachtung meiner Arbeit seitens der Universität Bremen.

Mein besonderer Dank gilt Sophia Reindl für die zielführende fachliche und persönliche Betreuung. Sehr zu schätzen wusste ich deine strukturierte Denkweise und die Möglichkeit, in vielen Diskussionen eigene wissenschaftliche Ideen einzubringen.
In diesem Sinne danke ich auch Maria Rosenthal für viele hilfreiche, fachliche Hinweise und die Mitbetreuung meiner Arbeit.
Mein herzlicher Dank gilt Carola für die praktische Unterstützung und viele Ideen zur Optimierung von Versuchen.

Dominik, Silke, Yaiza und Nadja danke ich für viele fachliche Diskussionen und Ideen und eine freundschaftliche und humorvolle Zusammenarbeit. Darüberhinaus möchte ich mich auch für die Zusammenarbeit mit der gesamten Abteilung für Virologie bedanken.

Maria Garcia Alai, Janina Hinrichs und Ioana Maria Nemtanu danke ich für die Unterstützung bei der Kristallisation und Charakterisierung von Proteinen am EMBL.
Melissa Graewert danke ich für die Unterstützung bei den SAXS-Messungen
Silke Olschewski und Veronika Brinschwitz danke ich für die Unterstützung im Rahmen von Praktika und Masterarbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, allen Freunden und Corinne für die verständnisvolle Unterstützung während der Promotion.