OPEN ACCESS Freely available online

PLoS PATHOGENS

Zn 2+ Hamuje koronawirusa i Arterivirus aktywność polimerazy RNA *In vitro* i cynk Jonofory Blok replikacja tych wirusów w hodowlach komórkowych

Aartjan JW te Velthuis 1, Sjoerd JE van den Worm 1, Amy C. Sims 2, Ralph S. Baric 2, Eric J. Snijder 1 *,

Martijn van Hemert J. 1 *

1 Laboratorium Wirusologii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii Medycznej, Centrum Chorób Zakaźnych, Leiden University Medical Center, Leiden, Holandia

2 Wydziały Epidemiologii i Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Północnej Karoliny w Chapel Hill, Chapel Hill, Karolina Północna, Stany Zjednoczone Ameryki

Abstrakcyjny

Zwiększanie wewnątrzkomórkowego Zn 2+ Stężenie cynkiem-jonoforami jak pirytion (PT) może efektywnie osłabiają replikację wielu wirusów, w tym wirusa polio RNA i wirus grypy. Dla niektórych wirusów efekt ten został przypisany do ingerencji wirusa przetwarzanie poliproteiny. W badaniu tym wykazać, że połączenie Zn 2+ i PT w niskich stężeniach (2 m M Zn 2+ i 2 m M PT) hamuje replikację koronawirusa SARS-CoV (SARS) oraz wirus zapalenia tętnicy koni (EAV) w hodowli komórkowej. Synteza RNA z tych dwóch odległych, związanych nidoviruses jest katalizowana przez polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp), który to enzym rdzeń wielobiałkowym ich replikacji i transkrypcji kompleksu (RTC). Stosując test aktywności dla RTCs izolowanego z komórek zainfekowanych SARS-CoV i EAV, **eliminując w ten sposób potrzebę PT transportowania Zn 2+**

w poprzek błony plazmowej-pokazujemy, że Zn 2+ skutecznie hamuje aktywność syntezy RNA z RTCs obu wirusów. Enzymatyczne Badania wykorzystujące rekombinacji RdRps (SARS-CoV nsp12 i dodana nsp9) oczyszczone z E coli Następnie ujawniono, że Zn 2+ bezpośrednio hamował in vitro Działalność obu polimerazy nidovirus. Dokładniej, Zn 2+ Stwierdzono, że blok etap inicjacji syntezy RNA EAV, podczas gdy w przypadku wydłużenia SARS CoV RdRp zahamowany i szablon wiązanie zmniejszone. Przez chelatowania Zn 2+ z MgEDTA hamujący wpływ kationu dwuwartościowego może zostać odwrócone, co stanowi nową dla celów eksperymentalnych in vitro Badania molekularne szczegóły nidovirus replikacji i transkrypcji.

Cytat: Te Velthuis AJW, van den Worm ona Sims AC, Baric RS, Snijder EJ i wsp. (2010), Zn 2+ Hamuje koronawirusa i Arterivirus aktywność polimerazy RNA In vitro i cynk Jonofory Blok replikacja tych wirusów w hodowlach komórkowych. PLoS Pathog 6 (11): e1001176. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176

Redaktor: Raul Andino, University of California San Francisco, Stany Zjednoczone Ameryki

Odebrane 17 maja 2010; Przyjęty 01 października 2010; Opublikowany 04 listopada 2010

Prawo autorskie: 2010 Te Velthuis et al. To jest artykuł open-access rozpowszechniany na warunkach licencji Creative Commons Attribution, który pozwala nieograniczone użycie, dystrybucja i powielanie w dowolnej postaci, pod warunkiem oryginalnego autora i źródła są zapisywane.

finansowanie: Ta praca została wsparta przez Holenderskiej Organizacji Badań Naukowych (NWO) z dotacji z Rady Nauk Chemicznych (NWO-CW przyznać 700.55.002 oraz 700.57.301) i dotacji NWO Toptalent (021.001.037). Fundatorów miał żadnej roli w projekcie badania, zbierania i analizy danych, decyzję o opublikowaniu, lub przygotowania manuskryptu.

Konkurowanie Zainteresowania: Autorzy deklarują, że nie istnieją sprzeczne interesy.

* E-mail: ejsnijder@lumc.nl (ES); mjvan_hemert@lumc.nl (MJvH)

Wprowadzenie

Jony cynku są zaangażowane w wiele różnych procesów komórkowych, które okazały się istotne dla prawidłowego fałdowania i aktywności różnych enzymów **komórkowych i czynniki transkrypcyjne. Zn 2+ Prawdopodobnie ważnym kofaktorem** licznych białek wirusowych, jak również. Niemniej jednak, wewnątrzkomórkowe **stężenie wolnego Zn 2+ utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie, przez metalotionein, prawdopodobnie ze względu na fakt, że Zn 2+ może służyć jako drugi** przekaźnik wewnątrzkomórkowego i może wywołać apoptozę lub spadek syntezy białka w podwyższonych stężeniach [1,2,3]. Co ciekawe, w badaniach na hodowlach **komórkowych o wysokiej Zn 2+ Stężenia i dodanie związków, które stymulują komórkową import Zn 2+, takie jak hinokitol (Hk), pirolidyny ditiokarbaminian (PDTC) i pirytionianu** (PT), stwierdzono, że hamują replikację wielu wirusów, w tym RNA wirusa grypy [4], wirusowi syncytium nabłonka oddechowego, [5], a kilka Pikornawirusy [6,7, 8,9,10,11]. Chociaż te poprzednie badania dostarczyły niewiele mechanistyczny informacji, **sugeruje to, że wewnątrzkomórkowe Zn 2+ Poziomy wpłynąć wspólny krok w cyklu** replikacji tych wirusów.

W hodowli komórek, PT stymuluje Zn 2+ wychwytu w ciągu kilku minut i hamuje replikację wirusa RNA, przez mechanizm, który został przebadany tylko w rozsądnym szczegółowo na Pikornawirusy [11,12].

In vitro Badania z oczyszczonych rinowirusów i polio proteazy 3C wykazały, że aktywność proteazy hamowana przez Zn 2+ [13,14], która jest zgodna z hamowaniem przetwarzanie poliproteiny przez jony cynku, które zaobserwowano w komórkach zakażonych wirusem ludzkiego wirusa nieżytu nosa i wirus Coxsackie B3 [11]. Replikacja segmentowego ujemnej nici RNA wirusów, takich jak wirus grypy, **natomiast nie zależy od przetwarzanie polibiałek i efekt PDTC pośredniczy Zn 2+ importu** zatem hipotezę, wynika z hamowania wirusowej RNA-zależnej polimerazy RNA **(RdRp) i kofaktorów komórkowych [4]. Ponadto, działanie hamujące Zn 2+ na** aktywność oczyszczonych RdRps Rinowirusy z wirusa zapalenia wątroby typu C i stwierdzono, nie badane w szczegóły [15,16].

Szczegóły dotyczące wpływu jonów cynku są obecnie w dużej mierze nieznane dla nidoviruses. Ta duża grupa dodatniej nici RNA (+ RNA) wirusów zawiera istotne patogeny człowieka i zwierząt, takie jak ciężki ostry koronawirusa oddechowego zespołu (SARS-CoV), inne koronawirusy ludzkie, w arteriwirusów wirus zapalenia tętnic koni (EAV), oraz rozrodczo i wirusa zespołu oddechowego świń (PRRSV) [17-18]. Wspólne pochodzenie od nidoviruses znajduje odzwierciedlenie w ich podobnej strategii organizacji genomu i ekspresji, a także w ochronie wielu kluczowych funkcji enzymatycznych w ich

Autor Podsumowanie

Pozytywna nici RNA (+) RNA wirusy obejmują wiele ważnych czynników chorobotwórczych. Są rozwinęły różne strategie do replikacji, ale są ujednolicone na fakt, że zależna od RNA polimeraza RNA (RdRp) działa jako enzym rdzeń ich urządzeń syntezy RNA. RdRp powszechnie się w kompleksie replikacji związane z błoną, który jest zmontowany z wirusowego RNA i białka wirusa, lub gospodarza. Biorąc pod uwagę ich kluczową funkcję w cyklu replikacji wirusa, RdRps są kluczowymi celami dla badań przeciwwirusowego. **Zwiększona wewnątrzkomórkowe Zn 2+ Stężenia są znane skutecznie** pogarszające ich replikację wielu wirusów RNA, na przykład poprzez zakłócanie prawidłowej proteolityczną obróbkę wirusowych poliprotein. Tutaj nie tylko pokazać, że Corona- i arterivirus replikacji może być hamowany **przez wzrost Zn 2+ poziomach, ale również wykorzystywać zarówno izolowane** kompleksy replikacji i oczyszczone zrekombinowane RdRps zademonstrować, że efekt ten może być oparty na bezpośrednim hamowaniu nidovirus RdRps. Połączenie protokołów opisanych tutaj będą przydatne do badań nad funkcją nidoviral kompleksów enzymatycznych przyszłości.

duże replikazy poliprotein [19]. Cechą charakterystyczną koronowej i arterivirus cyklu **replikacyjnego jest transkrypcja 5 9- i 3 9-** koterminalne zagnieżdżony zestaw subgenomowych (sg) z których mRNA genów wirusowych białek strukturalnych i pomocnicze są wyrażone [20,21].

Analogiczny do Pikornawirusy [13,22], jony cynku, jak wykazano, hamuje pewne proteolitycznych w przetwarzanie polibiałek replikazy koronawirusa w zakażonych komórkach i systemów bezkomórkowych [23,24]. W badaniu tym donoszą, że **pirytion cynku jonofor (PT) w kombinacji z Zn 2+ jest silnym inhibitorem replikacji** koronawirusa SARS-CoV (SARS) oraz wirus zapalenia tętnicy koni (EAV) w hodowli komórkowej. Aby ocenić, czy - oprócz ewentualnego wpływu na obróbkę **proteolityczną - podjednostki nidovirus RTC i syntezy RNA bezpośrednio wpływa Zn 2+, zatrudnialiśmy in vitro Systemy syntezy SARS-CoV i dodana RNA, które są oparte** na błonie związane RTCs wyizolowanych z zainfekowanych komórek (określanym **tutaj jako testach RTC) [25,26]. Dodatkowo użyliśmy in vitro Oznaczenia RdRp** rekombinowane bezpośrednio zbadać wpływ jonów cynku na RdRps SARS-CoV i EAV [27,28].

Korzystanie z tych niezależnych in vitro podejść, byliśmy w stanie wykazać, że Zn 2+ upośledza nidovirus bezpośrednio syntezy RNA, ponieważ wykazywał silny efekt **hamujący w obu testach RTC i RdRp. Co ciekawe, Zn 2 + - hamowaniem może być odwrócone przez dodanie cynku 2+ chelatorem (MgEDTA). Dlatego zastosowano ten związek, aby zatrzymać i ponownie uruchomić in vitro**

RNA syntezy aktywność woli. Ten wygodny narzędzie pozostawiono na badanie różnych mechanistyczne aspekty syntezy arteri- RNA koronawirusa, a bardziej szczegółowo. Dodatkowo, hamowanie cynkowego pośredniczą syntezy nidovirus RNA opisany tutaj może stanowić interesującą podstawą do dalszego zbadania użycia cynkowo-jonoforami w terapii przeciwwirusowej.

wyniki

Pirytion cynku i hamują replikację nidovirus in vivo

Jony cynku są zaangażowane w wiele różnych procesów komórkowych, ale **stężenie wolnego Zn 2+ utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie, metalotionein [1]. Zn 2+ i związki, które stymulują import Zn 2+ do komórek, takich jak Pt, uprzednio** hamują replikację wielu Pikornawirusy, w tym rinowirusów, wirusa pryszczycy i jamy ustnej, wirus Coxsackie, wirus Mengo i hodowli komórek [-6,7,8,9,10,11]. Aby **określić, czy Zn 2+ ma**

Podobny efekt na nidoviruses, badaliśmy wpływ PT i Zn 2+ replikację EAV i SARS-CoV w komórkach Vero E6, z użyciem wirusów reporterowe, które wyrażają Zielone białka fluorescencyjne (GFP), czyli dodana-GFP [29], SARS CoV-GFP [30]. Dodana-GFP koduje N-końcowy fuzję wirusa GFP do niestrukturalnego białka nsp2 (2), jeden z produktów rozkładu z polibiałek replikazy, a tym samym dostarcza bezpośredniego odczytu dla translacji genu replikazy. W SARS-CoV-GFP reporterowy zachodzi ekspresja mRNA z sg 7, w wyniku zastąpienia dwóch dodatkowych genów kodujących białka ORF (7a i 7b), które nie są niezbędne do replikacji w hodowlach komórkowych.

Najpierw oceniano cytotoksyczność różnych stężeniach PT (0-32 m M) w obecności 0 do 8 m MZnOAc 2. Leczenie PT stężenia 32 m M w kombinacji z 4 m MZnOAc 2 nie zmniejszały żywotności komórek zakażonych wirusem, po 18 h (Fig. 1A), mierzona kolorymetrycznych MTS (3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo) -5 (3-karboksymetoksyfenylo) -2- (**4-sulfofenylo) -2H-tetrazoliowy) Test żywotności. Ponieważ podwyższone Zn 2+ stężenia hamują tłumaczenie komórkową również stosowane znakowanie metabolicznych z 35 S-metioniny, aby ocenić wpływ PT i Zn 2+ od syntezy białka komórkowego. Inkubacja komórek Vero E6 przez 18 h przy kombinacje PT i Zn 2+ wspomniano powyżej, a następnie przez 2 h** metabolicznego oznakowania, nie wykazały zmian w całkowitej syntezy białek **komórkowych, gdy stężenie ZnOAc 2 była 4 m M (dane nie pokazane).**

Korzystanie z tych niecytotoksyczna warunków my następnie testowano efekt PT i **ZnOAc 2 na dodana-GFP i SARS-CoV-GFP replikacji. W tym celu, komórki Vero E6 na** płytkach z 96 studzienkami zakażono przy wielokrotności infekcji (MOI) równym 4. **Jedną godzinę po zakażeniu (pi H) pomiędzy 0 i 32 m M Pt i 0, 1 lub 2 m M ZnOAc 2 dodaje** się do pożywki hodowlanej. W 17 godzin po zakażeniu, w punkcie czasowym, w którym ekspresja GFP w nietraktowanych zakażonych komórek osiąga swoje maksimum dla obydwu wirusów, komórki utrwalano i GFP fluorescencję ilościowo.

Ekspresja genu reporterowego zarówno SARS-CoV-GFP i GFP-EAV już znacząco hamowany, w sposób zależny od dawki, przez dodanie tylko PT (fig. 1B i **C). Efekt ten był znacznie zwiększona, gdy 2 m M Zn 2+ dodano do pożywki. Okazało się, że dodanie ZnOAc 2 sam również zmniejszenie replikacji wirusa, ale tylko na poziomach, które były zbliżone do stężenia 50% cytotoksyczności (CC 50) z ZnOAc 2 Komórki Vero-E6 (70 m K, dane nie pokazane). Jest to prawdopodobnie ze względu na słabą rozpuszczalność Zn 2+ w pożywce zawierającej fosforany i nieefektywnego wychwytu Zn 2+ przez komórki przy braku cynku-jonoforów. Połączenie 2 m M PT i 2 m M ZnOAc 2 Spowodowało to 98 6 1% do 85 6 3% redukcji sygnału GFP w GFP-EAV i SARS-CoV-GFP, odpowiednio. Nie zaobserwowano cytotoksyczności dla tej kombinacji PT i ZnOAc 2 stężeniach. Z krzywych dawka-odpowiedź na fig. 1, CC 50 wartość 82 m M obliczono dla punktów w obecności 2 m Roztwór cynku. Stężenie półmaksymalnego hamowania (IC 50) 1,4 m M i 0,5 m M i indeksy selektywności 59 i 164 zostały obliczone dla SARS-CoV i EAV,** odpowiednio.

Zn 2+ odwracalnie hamuje aktywność syntezy RNA z izolowanych RTCs nidovirus

Wcześniej opracowane testy do badania in vitro RNAsynthesizing aktywność RTCs wyizolowanych z komórek zakażonych SARS-CoV i EAV [25,26]. W tych **testach RTC [za- 32 P] CMP uwzględnić zarówno genomowego (replikacji) i SG mRNA** (transkrypcja) (fig. 2). Pozwoliło to na monitorowanie syntezy samych wirusowych cząsteczek RNA, które mogą być wykrywane przez hybrydyzację z RNA z komórek nidovirus wirusem. Zaletą tych testów jest to, że aktywność nie zależy od syntezy białek kontynuowane i to, że pozwala nam badać syntezy wirusowego RNA

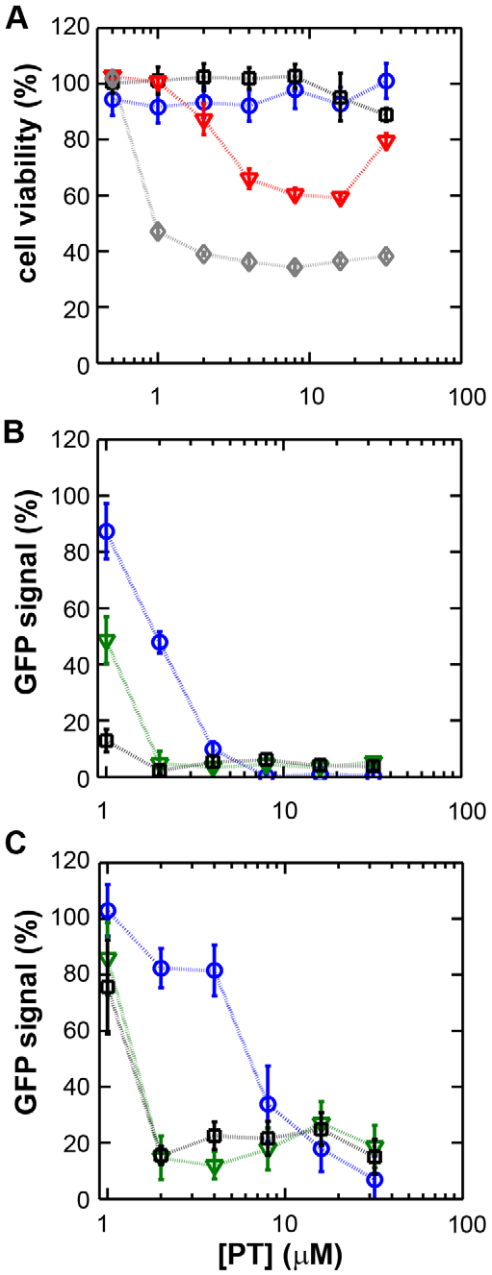


Figura 1. jonofor pirytion cynku hamuje nidovirus replikacji w hodowlach komórkowych. (ZA) Cytotoksyczność PT w komórkach Vero E6 w nieobecności (niebieski kółka) albo w obecności 2 (czarne kwadraty), 4 (red trójkąty) lub 8 m M (szare romby) ZnOAc 2 określona przez test MTS po 18 godzinach wystawienia na działanie. (B) Krzywe dawka-odpowiedź przedstawiające wpływ PT i Zn 2+ na fluorescencji GFP w komórkach Vero E6 zakażonych EAV szczepu reporterowego GFP ekspresję co 17 h pi dane znormalizowano ekspresji GFP w zakażonych hodowli kontrolnych nie poddanych obróbce (100%). Różne Zn 2+ stężenia dodane do pożywki 0 (niebieski kółka), 1 (zieleń), trójkąty lub 2 m M ZnOAc 2 (czarne kwadraty). (DO) Wpływ PT i Zn 2+ na fluorescencji GFP w komórkach Vero E6 zakażone SARS-CoV szczepu reporterowego GFP ekspresję co 17 h pi dane znormalizowano ekspresji GFP w komórkach zakażonych nieleczonych kontrolnych (100%). Kolory różnych Zn 2+ stężenia, jak na fig. 1B. Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe (n = 4). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g001

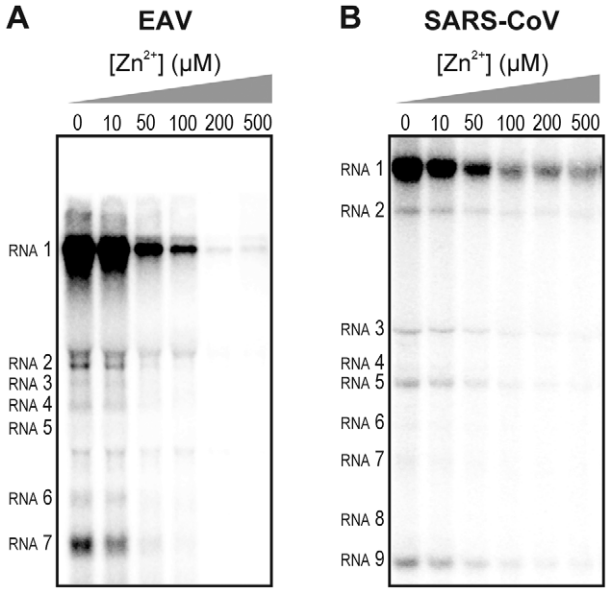


Figura 2. Hamowanie *in vitro* RNA z izolowanych aktywność syntezy RTCs przez Zn 2+. Wbudowanie [za- 32 P] CMP do wirusowego RNA przez EAV (ZA) i SARS-CoV (B) RTC próbach w obecności różnych Zn 2+

Stężenia, jak wskazano powyżej, każdy tor. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g002

niezależnie od innych aspektów cyklu replikacji wirusa [26]. W celu zbadania, czy efekt hamujący PT i jonów cynku na nidovirus replikacji w hodowlach komórkowych znajduje odzwierciedlenie w bezpośrednim działaniem Zn 2+ na syntezę wirusowego RNA, zbadaliśmy wpływ Zn 2+ Dodatek na działalności RTC. Dla obu EAV (fig. 2A) i SARS-CoV (fig. 2B), zmniejszenie dawki, zależne od ilości RNA zsyntetyzowane obserwowana przy ZnOAc 2 był obecny. Dla obydwu wirusów, zmniejszenie więcej niż 50% całkowitego RNA syntezy zaobserwowano przy Zn 2+ Stężenie 50 m M, a mniej niż 5% aktywności pozostawały na Zn 2+ Stężenie 500 m M. Zarówno syntezy genomu i produkcja mRNA SG były w równym stopniu.

Aby sprawdzić, czy hamowanie aktywności RTC przez Zn 2+ było odwracalne reakcje RTC rozpoczęto w obecności lub nieobecności 500 m M Zn 2+. Po 30 minutach, reakcje te podzielono na dwie porcje i magnezu nasycony EDTA (MgEDTA) dodano w jednej z probówek, do końcowego stężenia 1 mM (Fig. 3A). Użyliśmy MgEDTA jako Zn 2+ chelator w nich in vitro Testy, ponieważ specyficznie Chelaty Zn 2+ podczas zwalniania Mg 2+, dzięki wyższej stałej trwałości kompleksu ZnEDTA. Nieskompleksowanego EDTA hamowały aktywność RTC wszystkich reakcji (dane nie przedstawione), najprawdopodobniej przez chelatowanie Mg 2+ że ma zasadnicze znaczenie dla aktywności RdRp [27,28], a MgEDTA nie miał wpływu na reakcje kontrolne bez Zn 2+ (Fig. 3B, porównaj pasmo 1 i 2). Jak pokazano na fig. 2, działanie dodana RTC, który był hamowany przez Zn 2+ (Fig. 3B i C, ścieżka 3) może być przywrócony przez dodanie MgEDTA (Fig. 3B, ścieżka 4) do poziomu obserwowanego dla reakcji kontrolnych bez Zn 2+

(Fig. 3B, ścieżka 1). W stosunku do nietraktowanej próby kontrolnej, test dodana RTC wytwarza w przybliżeniu 30% mniej RNA, którego budowa jest zgodna z 30% krótszy czas reakcji po dodaniu MgEDTA (100 w porównaniu do 70 minut dla ścieżki 1 i 4, odpowiednio). Nieoczekiwanie, testy SARS CoV RTC, które zostały kolejno uzupełnia się Zn 2+ i MgEDTA włączone nieco [za- 32 P] CMP w porównaniu z nietraktowanymi reakcji kontrolnych (fig 3C. Porównać ścieżka 1 i 4). Efekt ten nie był spowodowany chelatowania Zn 2+ obecna w supernatancie po jądrowego (PNS) komórek SARS CoV zakażonych, jak wzrost ten nie zaobserwowano, gdy MgEDTA dodano do reakcji kontrolnej bez dodatkowego Zn 2+ (Fig. 3C, ścieżka 2).

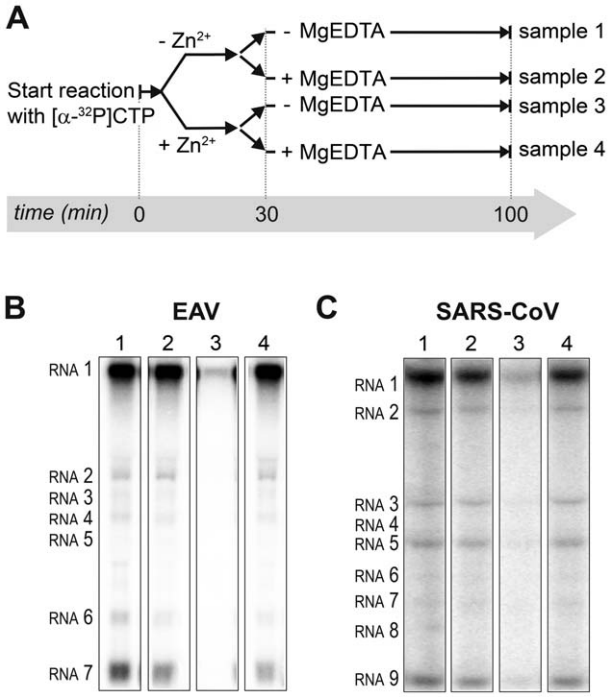
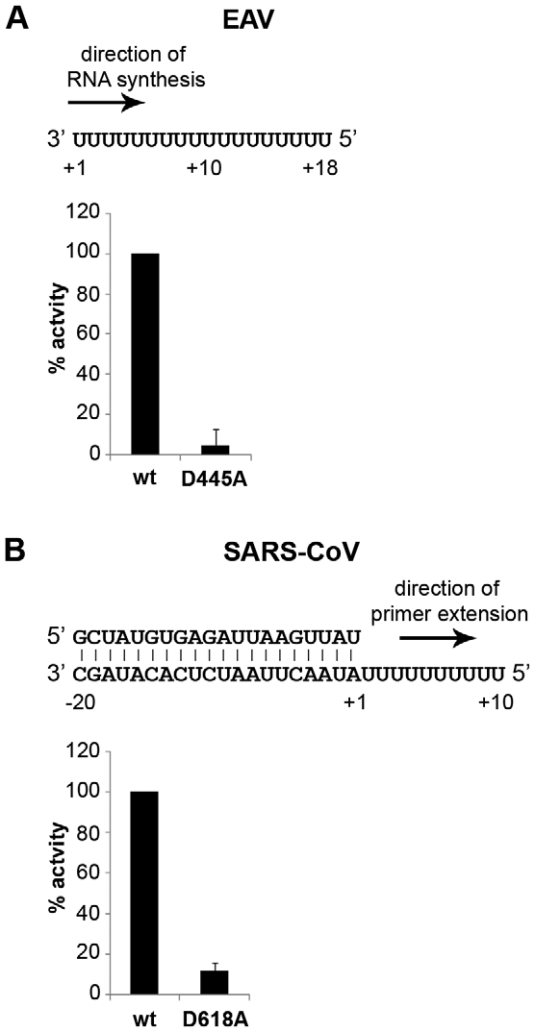


Figura 3. Hamowanie aktywności nidovirus RTC przez Zn 2+ można odwrócić przez chelatowanie. (ZA) Schematyczne przedstawienie in vitro
Próby z wyizolowanym RTCs, które zapoczątkowane zostały w [za- 32 P], CTP, albo przy braku (próba 1 i 2) lub w obecności 500 m M Zn 2+. Po inkubacji przez 30 minut w temperaturze 30 u C zarówno leczone i Zn 2 + - Traktowane próbki podzielono na dwie porcje, i 1 mM Zn 2+ Chelator MgEDTA dodano do próbek 2 i 4. Wszystkie reakcje inkubowano przez kolejne 70 minut przed zakończeniem. (B) Analiza produktów RNA zsyntetyzowane w testach z EAV RTCs. Liczby nad torami odnoszą się do numerów próbek opisanych w punkcie (a). (DO) In vitro

Test aktywności SARS-CoV RTCs. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g003



Rysunek 4. EAV i SARS-CoV testach RdRp enzymem typu dzikiego i mutantów miejscu aktywnym. (ZA) Polimeraza EAV była niezdolna do wydłużania startera i wymagał Free 3 9 koniec poli (U) reszty zainicjować. Nukleotydów włączając aktywność enzymu typu dzikiego i mutanta D445A nsp9 na 18-mer poli (U) wzór potwierdza specyficzność naszym teście. (B) SARS-CoV nsp12 testach RdRp przeprowadzono z dupleksu RNA z 5 9 U 10 Zwis jako szablon. Wykres pokazuje pasek nukleotyd włączenie działania typu dzikiego i D618A nsp12. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (n = 3). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g004

Jony cynku wpływa na aktywność in vitro rekombinacji RdRps nidovirus

W celu ustalenia, czy hamowanie aktywności RTC może być spowodowane bezpośrednim działaniem Zn 2+ na działalności nidovirus RdRp, przetestowaliśmy działanie Zn 2+ na aktywność oczyszczonych rekombinowanych RdRps SARS-CoV (nsp12) i dodana (nsp9) przy użyciu wcześniej opracowanych testach RdRp [27,28]. Przy użyciu 18-mer polyU szablon The dodana RdRp włączone [za- 32 P] AMP do produktów RNA do 18 nukleotydów długości (fig. 4A). inicjacja była de novo, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, a obecności konserwowanej pętli poprzedzające w sekwencji nsp9 [28]. W przeciwieństwie do nsp9 EAV RdRp The in vitro Aktywność SARS CoV RdRp nsp12 - starterowy, który nie ma pętli - okazała się być ściśle zależna od startera. [27] W ten sposób, w celu zbadania aktywności RdRp SARS-CoV nsp12 podkładową szablon polyU użyto (fig. 4B), co pozwala nam próbce [za- 32 P] AMP włączenia, jak opisano wcześniej [27]. Jako kontrolę specyficzności, zastosowano opisany wcześniej SARS-CoV nsp12 mutanta D618A [27], który zawiera asparaginian alaniną w motyw A miejsca aktywnego RdRp i EAV nsp9D445A,

w którym zaprojektowane asparaginianu alaniną w odpowiednim miejscu EAV nsp9 [28,31]. Oba zmutowane RdRps wykazały znacznie zmniejszone [za- 32 P] AMP włączenie w naszych testach (Fig. 4), co potwierdza, że ponownie znakowane produkty RNA pochodzący z działalności nidovirus RdRp.

Dodanie ZnOAc 2 Testy z RdRp HCV w wyniku silnego, dosedependent hamowanie aktywności enzymatycznej zarówno EAV i

Enzym SARS CoV (fig. 5A i B, odpowiednio), podobnie do tego, co zaobserwowano w badaniach RTC. W rzeczywistości, w porównaniu z innymi jonami metali dwuwartościowych takiej współpracy 2+ i Ca 2+, które zwykle wiążą się z aminokwasów łańcuchami bocznymi zawierającymi atomy tlenu, zamiast grupy siarkowe, Zn 2+

jest najbardziej skuteczny inhibitor aktywności SARS CoV nsp12 RdRp Company (fig. S1). Aby sprawdzić, czy podobnie jak w teście RTC hamowanie RdRp przez jony cynku odwracalny Testy z RdRp preinkubowano 6 mM Zn 2+, stężenie, które konsekwentnie dał

, 95% hamowania. Po upływie 30 minut, 8 mM MgEDTA dodano zarówno do kontroli reakcji i reakcję zahamowano ZnOAc 2,
i próbki inkubowano przez kolejne 30 minut (fig. 5C). Jak pokazano na fig. 5D, hamowanie aktywności dodana RdRp przez Zn 2+ może zostać odwrócony przez chelatowania Zn 2+ (Figura 5D.; porównaj ścieżki 3 i 4). Ilość produktu zsyntetyzowane konsekwentnie 60 6 5% tego zsyntetyzowanego w reakcji kontrolnej 60 min (Fig 5D;. Porównaj ścieżki 1 i 4), które mieści się w granicach oczekiwanego zakresu z uwagi na krótszy

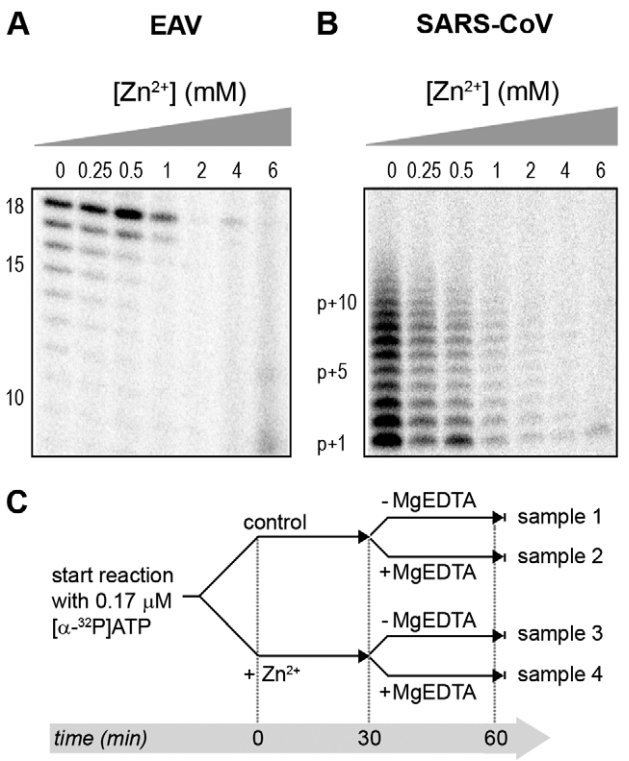


Figura 5. Aktywność RdRps EAV i SARS-CoV w sposób odwracalny hamuje Zn 2+. Aktywność oczyszczonego RdRp EAV nsp9 (ZA)
i SARS-CoV nsp12 (B) w obecności różnych Zn 2+ stężeń, jak podano powyżej pasów. (DO) Schematyczne przedstawienie doświadczeniu w celu zbadania, czy Zn 2 + - hamowaniem aktywności RdRp może być reversedwithMgEDTA. Reakcje RdRp, nie leczonych kontroli (próbki 1 i 2), lub reakcje **zawierającego 6 mM Zn 2+ (Próbki 3 i 4) inkubowano przez 30 min. zarówno Zn 2 + - zawierające i** kontrolne próbki podzielono na dwie porcje i 6 mM MgEDTA dodano do próbki 2 i 4. Wszystkie reakcje inkubowano przez 30 min, po czym zakończono. Produkty reakcji w testach z RdRp **dodana nsp9 i SARS-CoV nsp12 przedstawiono w (RE) i (MI), odpowiednio. Liczby nad torami** odnoszą się do numerów próbek opisanych w (C). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g005

czas reakcji. Hamowanie SARS CoV RdRp również była odwracalna. Podczas **30-minutowej inkubacji po dodaniu MgEDTA SARS-CoV nsp12 włączone 40 6 5%** znacznika włączone w standardową 60 minutach reakcji (fig. 5E). Ta była nieznacznie niższa niż oczekiwana wydajność i może być spowodowane przez **elevatedMg 2+ stężeniu, które okazało się być poniżej optymalnej aktywności nsp12 [27] i wyników uwalniania Mg 2+ od MgEDTA na chelatowania Zn 2+.**

Różnica efekt Zn 2+ w inicjacji i elongacji etapie syntezy nidovirus RNA

Dla EAV blisko kontroli testach RdRp wykazała mniej wyraźny efekt Zn 2+ na wytwarzanie pełnej długości 18-nt produkty niż w syntezie związków pośrednich **reakcji mniejszych (fig. 5A). Sugeruje to, że Zn 2+ swoiście hamował etap inicjacji** syntezy RNA EAV. W celu zbadania tej hipotezy, zastosowano test RTC inkubowano przez 30 minut z nieznakowanego CTP (inicjacja), po czym mieszaninę reakcyjną **podzielono na dwie części. Następnie, [za- 32 P] CTP został dodany do dwóch rur (impuls), 500 m M Zn 2+ dodano do jednej z rur, a pobierano próbki w różnych** punktach czasowych w czasie reakcji (Fig. 6A). Fig. 6B przedstawia, że w obecności **Zn 2+ [za- 32 P] cmp przeważnie włączyć do powstających cząsteczek RNA, które były już po fazie inicjowania w chwili, Zn 2+ Dodano do mieszaniny reakcyjnej. nie wystąpił** nowy inicjujące wskazano przez rozmaz krótkich produktów znakowanych, stopniowo przesuwana w górę do położenia pełnej długości genomu RNA. Sugeruje **to, że Zn 2+**

nie wpływają na wydłużenie fazy dodana syntezy RNA i że specyficznie hamuje inicjacji. To wyjaśnia również stosunkowo słabą intensywność sygnału pasma **mniejszych SG (mRNA na przykład, porównanie względnej zmiany sygnału RNA2 do RNA7) wytwarza się w obecności Zn 2+, od wielu zdarzeń inicjacyjne są wymagane w** tych krótkich cząsteczek w celu otrzymania intensywności sygnału podobne do **wyników uzyskiwanych w jednym przypadku inicjacji na długim genomowego RNA na przykład, 16 razy więcej w przypadku RNA7. W przeciwieństwie do EAV, efekt Zn 2+ na** RNA syntezy SARSCoV RTCs nie ogranicza się do inicjacji, ale wydaje się osłabiać **etap wydłużenia jak również biorąc pod uwagę, że oprócz Zn 2+**

całkowicie blokowało dalszy wbudowywanie [za- 32 P] CMP gdy dodaje się 40 minut po rozpoczęciu reakcji (Fig. 6C).

W testach RdRp, krótkie szablony wykorzystywane robione to technicznie niemożliwe do zrobienia eksperymenty podobne do tych wykonywanych z pełną **RTCs. Jednak wcześniej zauważył, że przy niskich stężeniach [za- 32 P] ATP (0,17 m Aktywność** M), SARS CoV nsp12 RdRp było ograniczone do dodawania tylko jednego nukleotydu startera [27]. Dodana nsp9 produkowane głównie bardzo krótki (2-3 NT długości) nieudane produkty RNA i tylko część pełnej długości produktu, co jest **wspólne dla de novo inicjujące RdRps [28]. To pozwoliło nam osobno zbadania wpływu Zn 2+ w inicjacji i elongacji przeprowadzając eksperyment, w którym impuls o niskim stężeniu [za- 32 P] ATP następnie Chase w obecności 50 m M nieznakowanego** ATP, które wzrosły processivity i pozwala na badanie wydłużeniu (fig. 7 A i C), jak opisano wcześniej [27]. Wyniki tych eksperymentów były zgodne z wynikami uzyskanymi z izolowanych RTCs. EAV, dla inicjacji syntezy dinukleotydu a **całkowicie zahamowany przez obecność 6 mM Zn 2+ (Uzupełniający fig. S2A), ilość** produktów pośrednich reakcji krótszy niż 18 NT zmniejszyła się z czasem, podczas gdy produkty z szablonów, na których RdRp już zainicjowane zostało wydłużone do pełnej długości 18-nt cząsteczek (Fig. 7B, prawy panel). Jest to zgodne z obserwacją, że dodana RdRp pozostała zdolna wysunąć syntetycznego dinukleotydu **APA trójek nukleotydów w obecności Zn 2+ (Miejski Rys. S2B). Prawdopodobnie ze** względu na brak reinicjacji w reakcjach przedstawionych na Fig. 7B, niski **processivity z EAV RdRp i konkurencji podłoża pomiędzy pozostałymi [za- 32 P] ATP i,** 200-krotnego nadmiaru nieznakowanego ATP, różnice między 5 i 30 min punktów **czasowych były niewielkie. W przypadku braku Zn 2+, RdRp nadal zainicjować jak** wskazano drabiny mniejszych rozmiarach cząsteczek RNA poniżej produkt o pełnej długości (Fig. 7B, lewy panel) oraz w czasie przebieg pokazany na fig. Supplemental **S2A. Natomiast dodatek Zn 2+ reakcji SARS CoV RdRp blokuje również wydłużenie,** ponieważ

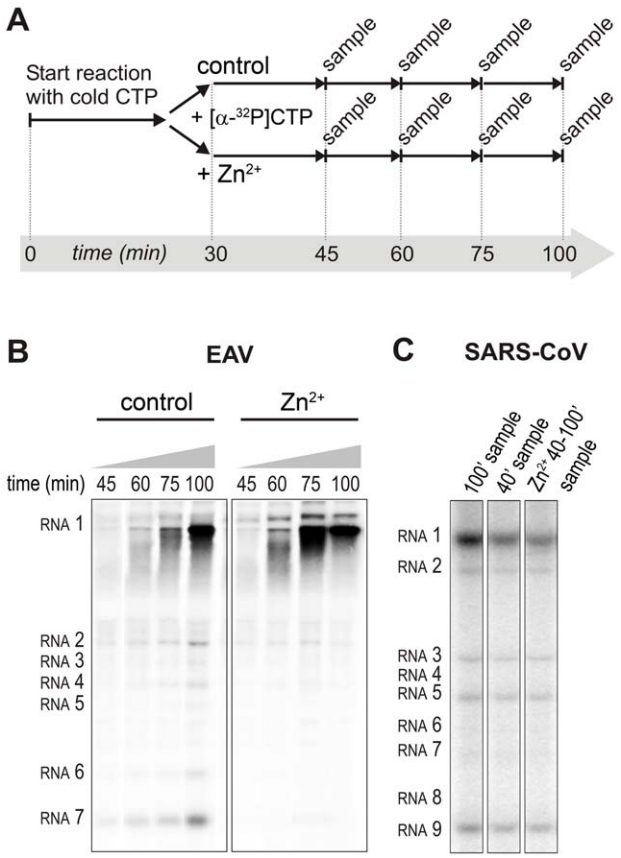


Figura 6 Wpływ cynku 2+ w inicjacji i elongacji w *in vitro*
Próby z wyizolowanym EAV i SARS-CoV RTCs. (ZA) Na in vitro RTC Test z wyizolowanym RTCs EAV pozostawiono do zainicjowania niewyznakowanym NTPs (inicjacja). Po 30 min, [za- 32 P], dodawano CTP (impuls), mieszaninę reakcyjną podzielono na dwie równe objętości i Zn 2+ dodano do końcowego stężenia 0,5 mM do jednej z rur. Na wskazanych punktach czasowych pobierano **próbki oraz wprowadzenie [za- 32 P] CMP do wirusowego RNA była analizowana. (B) Znakowany** radioaktywnie dodana RNA zsyntetyzowane w punktach czasowych wskazanych powyżej **pasów, w obecności i przy braku cynku 2+. (DO) Znakowany radioaktywnie RNA syntetyzowane** przez pojedyncze SARS CoV RTCs w reakcji zakończony po 100 (ścieżka 1) i 40 (ścieżka 2) **min. Produkty reakcji w reakcji na które 500 m M Zn 2+ Dodano po 40 minutach i została** zakończona w czasie t = 100 przedstawiono na ścieżce 3. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g006

Rozszerzenie radioznakowanego startera, jak obserwuje się w przypadku braku Zn 2+ (Na fig. 7D, lewy panel), nie występuje (w fig. 7D, prawy panel).

Cynk wpływa na SARS-CoV RdRp szablon wiążący

Aby ocenić, czy Zn 2+ wpływa na oddziaływanie rekombinowanego nsp12 SARS CoV z szablonem zastosowaliśmy w naszych testach, przeprowadzono testy zmiany **electromobility (EMSA), w obecności i przy braku cynku 2+ (Fig. 8A). Do pomiaru** powinowactwa wiązania RdRp do matrycy, że określona część związanego matrycy w różnych stężeniach białka i obserwuje się 3-4 krotne zmniejszenie wiązania RNA **przy Zn 2+ obecny był w tym teście (fig. 8B). Mamy również ocenić, czy pre-inkubacja RdRp lub RNA z Zn 2+ był wymóg ten spadek powinowactwa wiązania, ale nie** stwierdzono istotnej różnicy eksperymentach nie obejmujących takiej wstępnej inkubacji (dane nie przedstawione).

Wiązania nie zaobserwowano, gdy RNA podobny test wiązania prowadzono oczyszczonym EAV RdRp. Podobnie nsp9 nie wiązania RNA w rozwijanym **eksperymentów Talon-perełek, His 6**
Tagged nsp9 i radioaktywnie EAV genomowego RNA lub różne Szablony krótkiego RNA, podczas gdy w tym polyU to było wykryć wiązanie z białkiem kontrolnym (SARS-CoV nsp8, która wykazała RNA i DNA, aktywność wiązania [32]), za pomocą tego testu. obecnie pozostaje ono jasne, dlaczego nie jesteśmy w stanie wykryć wiązanie rekombinowanego nsp9 EAV na matrycy RNA.

Dyskusja

Chociaż badano wiele związków, które, zarejestrowanych obecnie środki przeciwwirusowe nadal brakuje do skutecznego leczenia SARS i inne choroby związane z nidovirus, [33]. RdRps są odpowiednie cele dla leków przeciwwirusowych rozwoju, ponieważ ich działalność jest ściśle wirusów i mogą zostać zablokowane bez poważnego wpływu na kluczowe funkcje komórkowe. Kilka inhibitorów rozwinięte przeciw np polimerazy wirusa ludzkiego niedoboru odporności (HIV) i wirus zapalenia wątroby typu C są obecnie stosowane w leczeniu przeciwwirusowym i prób klinicznych [34,35,36]. W związku z tym postęp wiedzy cząsteczkowej nidovirus RdRps i większe kompleksy enzymatyczne, które są częścią, a także do wykorzystania potencjału **ostatnio opracowane in vitro Testy RdRp [25,26,27,28] może ostatecznie pomóc w** rozwoju skutecznych strategii przeciwwirusowych.

Jony cynku i cynk-jonofory, takich jak Pt i PDTC, zostały uprzednio opisane jako silne inhibitory różnych wirusów RNA. Dlatego badano, czy PT stymulowane import jonów cynku w komórkach również hamował replikację nidoviruses w hodowli komórkowej. Korzystanie z ekspresją GFP EAV i SARS-CoV [29,30], okazało się, że **kombinacja 2 m M PT i 2 m M Zn 2+**

skutecznie hamował replikację, choć nie powoduje wykrywalny cytotoksyczności (fig. **1). Hamowanie replikacji przez PT i Zn 2+ przy podobnych stężeniach (2-10 m M)** wcześniej obserwowane od kilku Pikornawirusy takie jak rinowirusy, foot-and-mouth wirus choroby Coxsackie i wirus Mengo [-6,7,8,9,10,11].

Działanie hamujące Zn 2+ replikację Pikornawirusy wydaje się być wynikiem zakłóceń w wirusowego przetwarzanie poliproteiny. Zakażeń wirusem zapalenia **wątroby typu koronawirusa myszy (MHV), Zn 2+ również zakłócać kilka podziałów polibiałek replikazy [24], aczkolwiek w znacznie wyższym stężeniu (100 m M Zn 2+) niż** stosowane w naszych badaniach. Od utraty przetwarzanie replikazy pośrednio wpływa na syntezę RNA wirusa w zainfekowanej komórce zastosowano dwie ostatnio **opracowane in vitro testów w celu zbadania, czy Zn 2+**

ma również wpływ na syntezę RNA nidovirus bezpośrednio. Nasz in vitro Badania wykazały silny hamujący wpływ jonów cynku na aktywność RNAsynthesizing z izolowanych EAV i SARS CoVRTCs. Testy z rekombinowanych enzymów stwierdzono później, że jest to prawdopodobnie spowodowane bezpośrednim hamowaniu funkcji RdRp. Efekt hamujący może być odwrócona przez chelatowanie jonów cynku, które zawiera interesujący eksperymentalne (włączony / wyłączony) podejście do badania **syntezy nidovirus RNA. Dodatek Zn 2+ po rozpoczęciu EAV syntezę RNA miał niewielki lub** żaden wpływ na NTP stosowania w cząsteczkach, których sposób syntezy został już **rozpoczęty w nieobecności Zn 2+**

(Fig. 6 i 7), co wskazuje, że Zn 2+ nie wpływa na wydłużenie i nie zwiększa częstości zakończenia, jak poprzednio znalezionych dla Mn 2+ [25]. W związku z tym, Zn 2+ Wydaje się, że specyficzny inhibitor fazy dodana inicjacji syntezy RNA. W przeciwieństwie do **tego, Zn 2+ Aktywność hamował SARS CoV RdRp także podczas etapu wydłużania** syntezy RNA, prawdopodobnie poprzez bezpośredni wpływ na wiązanie szablon (fig. 8). W koronawirusów, jony cynku, zatem wydaje się, hamują zarówno odpowiednie proteolityczne przetwarzanie polibiałek replikazy [23,24] i aktywność w tym badaniu (RdRp). W przeciwieństwie do prób RTC milimoli zamiast mikromolowych stężeń **ZnOAc 2 wymagane były prawie całkowite zahamowanie wbudowywania** nukleotydów, w testach RdRp.

Zostało również ustalone, że polimeraza DNA i RNA użyć triadę konserwowanych reszt asparaginianowej motywach A i C wiążą

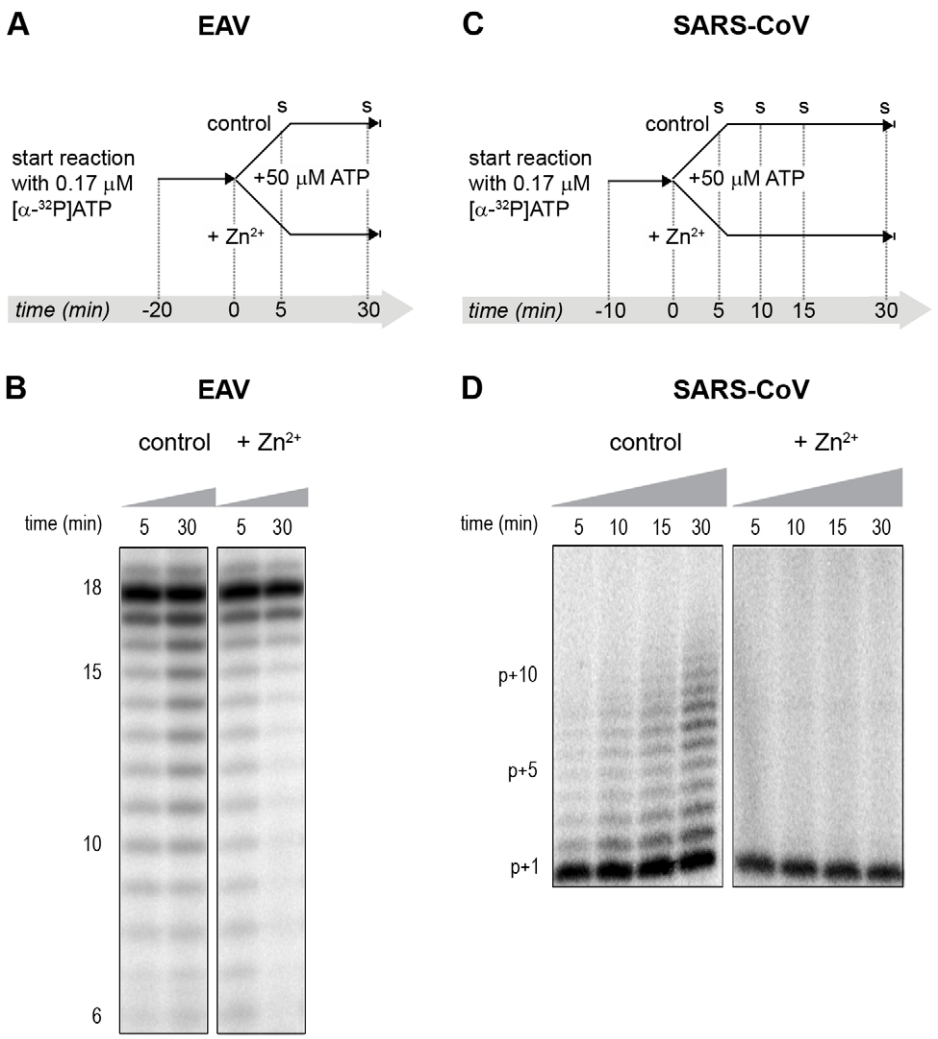


Figura 7. Wpływ Zn 2+ w inicjacji i elongacji aktywności oczyszczonej EAV i SARS-CoV RdRps. (ZA) Reakcja dodana RdRp rozpoczęto w obecności [za- 32 P] ATP w warunkach, które nie pozwalają na wydłużenie, to znaczy, Niskie stężenie ATP. Po upływie 20 minut, mieszaninę reakcyjną podzielono na dwie równe objętości i Zn 2+ dodano do jednej z rur. Łańcuch z 50 m M nieznakowanego ATP, co pozwala na wydłużenie, zostało przeprowadzone w obu reakcjach i pobrano próbki po 5 i 30 min. (B) Produkty reakcji dodana RdRp nagromadzone w obecności i przy braku cynku 2+

(Wskazane powyżej pasy) po 5 i 30 min Chase z nieznakowanego ATP. Długość produktów reakcji w NT wskazuje obok żelu. (DO) Reakcję SARS-CoV RdRp rozpoczęto w obecności 0,17 m M [za- 32 P] ATP, co ogranicza wydłużenie. Po upływie 10 minut, mieszaninę reakcyjną podzielono na dwie równe objętości i Zn 2+ dodano do jednej z rur. Łańcuch z 50 m M nieznakowanego ATP przeprowadza się w obu reakcjach i próbki pobierano po 5, 10, 15 i 30 minut. (RE) Produkty reakcji SARS CoV RdRp uformowane w pościg czas wskazany powyżej pasów, w obecności i przy braku cynku 2+. Długość produktów reakcji w NT wskazuje obok żelu (p ma długość startera). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g007

dwuwartościowych jonów metali, takich jak Mg 2+, który następnie koordynować przychodzące nukleotydów podczas reakcji polimeryzacji [37,38]. mg 2+ jest jon metalu dwuwartościowego, które jest wymagane dla in vitro

Aktywność pojedyncze SARS-CoV i EAV RTCs i rekombinowane RdRps **[25,26,27,28], przy czym de novo inicjowanie EAV nsp9 jest przede Mn 2 + - zależny. Zn 2+ nie może zastąpić Mg 2+ lub Mn 2+ jako kofaktora, ponieważ nie była zdolna do** podtrzymywania aktywności polimerazy nidovirus RTCs i RdRps w nieobecności Mg 2+ **(** dane nie przedstawione), a także opisanej dla RdRp polio [39]. Ponadto, hamowanie **aktywności nidovirus RdRp przez Zn 2+ obserwowano nawet przy niskich stężeniach, w obecności więcej niż 25-krotny nadmiar Mg 2+, sugerując, że albo powinowactwa miejsca aktywnego Zn 2+ jest znacznie wyższa lub że Zn 2+ nie konkurować o Mg 2 + -** wiążące wiąże się z innym (cynku) swoistej wobec miejsca wiązania białka.

Specyficzne domeny białkowe lub kieszenie zawierające jony cynkowe mogą być zaangażowane w oddziaływaniach białko-białko, białko-RNA / DNA oddziaływania lub zmiany konformacyjne w strukturze enzymu. Cynk domeny wiążące składają się zwykle z co najmniej trzy konserwowane cysteiny i / lub reszty histydyny w odcinku , 10-30 aminokwasów, takich jak w motywy palca cynkowego i metaloproteinaz [2,40,41]. Jednak w RdRps niewiele jest precedensów w obecności cynku kieszenie wiążące, takie jak te określone w strukturze krystalicznej denga RdRp [42]. Analiza sekwencji nsp9 EAV sekwencji aminokwasowej wykazała, że brak plamy bogate w konserwowanych cystein i / lub histydyny. W przeciwieństwie, kontrola SARS-CoV nsp12 sekwencji aminokwasowej wykazała, dwóch takich plastrów, tj H295-C301-C306H309-C310 i C799-C813-H810-H816. Struktura kryształu dla nsp12 jest obecnie niedostępny, ale przewiduje się, że struktura oznacza C-końcowe dwa trzecie enzym został opublikowany [31]. Co ciekawe, w tym modelu, C799, **H810, H816 i C813 są w układzie przestrzennym przypominającej Zn 2+**

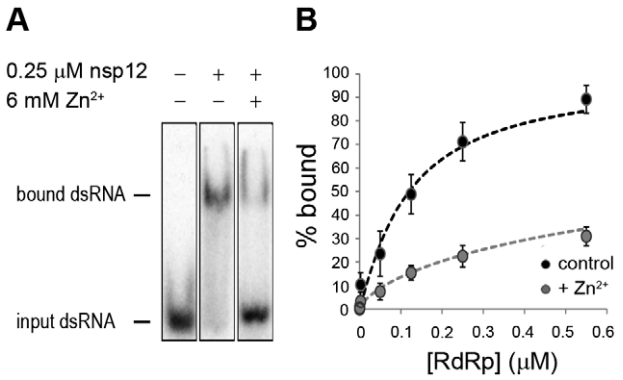


Figura 8. Wpływ cynku 2+ na szablonie SARS-CoV nsp12 wiążące. (ZA) Test zmiany ruchliwości elektroforetycznej znakowaną dsRNA i nsp12 w obecności i przy braku cynku 2+ (wskazano powyżej, pasy). Stanowisko niezwiązanych i nsp12 związanego RNA w żelu zaznaczono po **lewej stronie panelu. (B) Określenie nsp12 powinowactwo do RNA w obecności i przy braku cynku 2+. Stałą ilość RNA inkubowano z rosnącą ilością nsp12. Ujawniło 3-4 krotne zmniejszenie** ilości związanego RNA w obecności jonów cynku (szary) w stosunku do procentowej zawartości związanego RNA w nieobecności jonów cynku (czarny). Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (n = 3). doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176.g008

koordynujące pozostałości w kieszeni wiązania Zn2 cynku znajduje się w motyw E z RdRp wirusa dengi (patrz Fig. Supplemental S3). Oczywiście, dogłębnej analizy nidovirus RdRps, na przykład za pomocą analizy strukturalnej i późniejszych badań ukierunkowanych mutacji wspomnianych cysteiny i histydyny, konieczne jest, aby **zapewnić dodatkową wskazówkę i podstawę konstrukcyjną dla Zn 2 + - indukowane** hamujący wpływ na aktywność RdRp opisanych w tym badaniu. Badania te mogą **być jednak skomplikowane, gdy Zn 2+ wiązania okazuje się być bardzo przemijające i** nie wykrywalna z obecnie dostępnych metod.

Podsumowując, kombinacja jonów cynku i cynk-jonofor PT skutecznie hamuje nidovirus replikacji w hodowlach komórkowych. Stanowi to podstawę do interesujący dalszych badań nad zastosowaniem zincionophores jak związki przeciwwirusowe, chociaż działanie systemowe muszą być uważane [43,44], a rozpuszczalny w wodzie cynku jonofor mogą być bardziej odpowiednie, ze względu na wyraźny brak toksyczności ogólnoustrojowej taki związek w stężeniach, które są skuteczne wobec nowotworu w modelu heteroprzeszczepu **myszy [45]. W warunkach in vitro Odwracalne hamowanie przez Zn RdRp 2+ również** dostarczyły nam wygodne narzędzie badawcze w celu uzyskania lepszego wglądu do informacji molekularnych (nido) syntezy RNA wirusowego, a ujawniła nowe mechanistycznych różnic pomiędzy RdRps SARS-CoV i EAV.

Materiały i metody

Komórki i wirusy

komórki Vero E6 hodowano i zakażone SARS-CoV (szczep Frankfurt. 1; nr dostępu AY291315) lub SARS CoV-GFP, jak opisano wcześniej [46]. Wszystkie zabiegi polegające na żywo SARSCoV przeprowadzono w 3 poziom bezpieczeństwa biologicznego obiektu w Leiden University Medical Center. Komórki BHK-21 lub Vero E6 hodowano i zakażono EAV (szczep Bucyrus;. nr dostępu NC_002532) lub dodana-GFP [29], jak to opisano w innym miejscu. [25]

Wpływ jonów cynku na nidovirus replikacji w hodowlach komórkowych

Jeden dzień przed zakażeniem, komórki Vero E6 wysiano na przezroczystej lub czarny (niską fluorescencję) 96-dołkowych klastrów w ilości 10000 komórek na studzienkę. Następnego dnia, komórki zakażone SARS-CoV-GFP lub EAV-GFP z MOI wynoszącym 4, i 1 h pi inokulum **usunięte i 100 m L pożywki zawierającej 2% płodowej surowicy cielęcej (FCS) dodano do każdego dołka. W niektórych doświadczeniach 0-32 m M pirytionianu (Sigma) w uzupełnieniu do 0-2 m M ZnOAc 2. Zainfekowane komórki utrwalano w 17 godzin po** zakażeniu przez odessanie pożywki i dodanie 3% paraformaldehydzie w PBS. Po przemyciu PBS, ekspresja GFP ilościowo przez pomiar fluorescencji na czytniku płytki **LB940Mithras (Berthold) przy 485 nm. W celu określenia toksyczności ZnOAc 2 i PT, komórki eksponowano na 0-32 m M PT i 0-8 m M ZnOAc 2. Po 18 h inkubacji, określano żywotność komórek za pomocą Miano 96 AQ MTS (Promega). EC 50 i CC 50 Wartości** obliczone Graphpad Prism 5 przy użyciu modelu regresji nieliniowej.

matryce RNA i oligonukleotydy

RNA oligonukleotydów SAV557R (5 9- GCUAUGUGAGAUUAAGUUAU-3 9) SAV481R (5 9- UUUUUUUUUUAUAACUUAAUCUCACAUAGC-3 9) i poli (U) 18 (5 9- UUUUUUUUUUUUUUUUUU- 9) zakupiono z firmy Eurogentec, oczyszcza się z 7 M mocznik / 15% PAGE i odsolono przez NAP-10 kolumn (GE Healthcare). Hybrydyzować RNA dupleksu SAV557R / SAV481R oligonukleotydy zmieszano w stosunkach równomolowych w buforze do hybrydyzacji (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA), **denaturowano przez podgrzanie do 90 ° C u C i pozostawiono do powolnego** ochłodzenia do temperatury pokojowej, po czym oczyszcza się z 15% niedenaturujących PAGE.

In vitro Synteza RNA wirusa Test z wyizolowanym RTCs

SARS-CoV i EAVRTCs wyizolowano z zakażonych komórek i analizowano pod **kątem aktywności in vitro jak opisano wcześniej [25,26]. Aby ocenić wpływ Zn 2+, 1 m litrami ZnOAc 2 Roztwór dodano do normy 28- m Reakcje I, w wyniku ostatecznej Zn 2+ Stężenie 10-500 m M. Gdy Zn 2+ musiały być chelatowane w trakcie reakcji magnezu nasycony EDTA (MgEDTA) dodano do końcowego stężenia 1 mM. Po izolacji RNA, który 32 P** znakowane produkty reakcji rozdzielono w 1% denaturującym (SARS-CoV) lub 1,5% **żele (EAV) agarozowym formaldehydu. Wbudowanie [za- 32 P] CMP do wirusowego** RNA określono ilościowo przez phosphorimaging wysuszonych żelów stosując skaner Typhoon (GE Healthcare) i oprogramowania ImageQuant TL 7 (GE Healthcare).

Ekspresja i oczyszczanie nidovirus RdRps

SARS CoV nsp12 i dodana nsp9 oczyszczano zasadniczo jak opisano gdzie **indziej [27,28], ale z modyfikacjami do nsp9. W skrócie, E coli BL21 (DE3) z plazmidu** pDEST14-nsp9-CH hodowano w pożywce autoindukcję ZYM, 5052 [47], w ciągu 6 **godzin w temperaturze 37 ° C u C i dalsze 16 godzin w temperaturze 20 u C. Po lizie w** buforze A (20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, i

0,05% Tween-20), supernatant nakładano na kolumnę HisTrap (GE Healthcare). Przeprowadzono elucję gradientem 20-250 mM imidazolu w buforze A. Frakcje zawierające nsp9, dalej oczyszcza się przez filtrację żelową w 20 mM HEPES, 300 mM NaCl i 0,1% Tween-20 w kolumnie Superdex 200 (GE Healthcare) , Frakcje zawierające nsp9-CH łączono, dializowano wobec 1000 objętości buforu B (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM DTT i 50% glicerol) i przechowywano w temperaturze

2 20 u C. RdRps z D618A (SARS-CoV) lub D445A (EAV) mutacji otrzymano na drodze miejscowo ukierunkowanej mutagenezy typu dzikiego (WT) plazmid **pDEST14-nsp9-CH [28] i oligonukleotydu 5 9- TACTGCCTTGAAACA GCC CTGGAGAGTTGTGAT-3** 9
i 5 9- ATCACAACTCTCCAG GGC TGTTTCAAGGCAGTA
- 3 9, i plazmid pASK3-UB-nsp12-chis 6 oligonukleotydami 5 9- CCTTATGGGTTGGGCTTATCCAAAATG 9 i 5 9-

CACATTTTGGATA AGC CCAACCCATAAGGA-3 9, jak opisano w innym miejscu. [27]
Zmutowane białka oczyszczano równolegle do enzymów wagowych.

Testy z RdRp oczyszczonych enzymów

Standardowe warunki reakcji dla testu z 0,1 RdRp m M oczyszczonych nsp12 SARS CoV opisano gdzie indziej [27]. W celu zbadania wpływu Zn 2+ W tym teście, 0,5 m l serii rozcieńczeń 0-80 mMZnOAc 2 dodano do 5 m Mieszaninę reakcyjną l, uzyskując końcowy Zn 2+ stężenia 0-8 mM. Test dodana RdRp zawierającą 1 m M nsp9 1 m M szablonu RNA poli (U) 18, 0.17 m M [za- 32 P] ATP (0,5 m C / m l; Perkin-Elmer), 50 mg MATP 20 mMTrisHCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MnCl 2, 4 mM MgOAc 2, 5% glicerolu, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT i 0,5 jednostki RNaseOUT. ZnOAc 2 Dodano do mieszaniny reakcyjnej w celu uzyskania końcowego stężenia 0-6 mM. Do chelatowania Zn 2+ podczas reakcji, MgEDTA dodano do końcowego stężenia 8 mm. Reakcję zatrzymano po 1 godzinie i analizowano jak opisano [27].

Test zmiany ruchliwości elektroforetycznej SARS-CoV nsp12

SARS CoV RdRp inkubowano z 0,2 nM 5 9 32 P znakowanej SAV557R / SAV481R dupleks RNA, przez 10 minut w temperaturze 30 u C albo w obecności lub nieobecności 6 mM ZnOAc 2. Mieszaniny reakcyjne analizowano, jak opisano wcześniej [27].

Informacja wspieranie

Figura S1 Wpływ różnych kationów dwuwartościowych na aktywność RdRp SARS-CoV nsp12. Oczyszczony rekombinowany nsp12 SARSCoV inkubowano z biernego matrycy, ATP i [za- 32 P] ATP w obecności albo 6 mM Mg 2+ Tylko (ścieżka 1), a wraz ze wzrostem stężenia metalu dwuwartościowego drugi (M 2+) w szczególności: 2-6 mM Ca 2+ (pasma 2-4), 2-6 mm Co 2+ (pasa 5-7) 2-6 mM Zn 2+ (pasa 8-10) lub 2-6 mM Mn 2+ (pasa 11-13). Najsilniejsze hamowanie zaobserwowano Zn 2+. Aby uzyskać więcej informacji na temat testu nsp12 RdRp SARS-CoV, zobacz tekst główny.
Można znaleźć w: DOI: 10.1371 / journal.ppat.1001176.s001 (1,55 MB TIF)

Figura S2 Wpływ cynku 2+ na aktywność wydłużania dinukleotydów EAV nsp9. Oczyszczony rekombinowany nsp9 dodana inkubowano z U 18 Szablon w obecności [za- 32 P] ATP, ATP, 4 mM Mg 2+, 1 mM Mn 2+, i 1 m M APA. (ZA) Mieszaniny reakcyjne zostały podzielone na dwie porcje, z których jedną z dodatkiem 6 mM Zn 2+, i próbki pobierano w punktach czasowych (minuty) wskazanych powyżej pasów. W przypadku braku Zn 2+, EAV nsp9 inicjuje de novo i wytwarza di- i trójek nukleotydów oznaczoną A2 i A3, odpowiednio. Nieswoisty zespół, związana z aktywnością RdRp między A2 i A3 jest oznaczony gwiazdką. W obecności 6 mM Zn 2+, Syntezę dinukleotydów i trójek nukleotydów została zablokowana. (B) Podczas wykonywania testu opisanego w (a) w nieobecności Zn 2+, produkt o pełnej długości 18 nukleotydów osad. Ten produkt nie jest zaobserwowano, gdy test przeprowadza się w obecności 6 mM Zn 2+, ale nsp9 zdolny do wydłużania startera dostarczonego dinukleotydu apa tri- (APA * Pa) i tetranukleotydów ((ApA * Pa-Pa) produktu (gwiazdka wskazuje radioaktywnie fosforany). Z uwagi na brak 5 9 trifosforan grupy te produkty reakcji znacznie wolniej migrują przez 20% akrylamid i 7 M mocznik żelu stosowanych do analizy. Zobacz główny tekst dla dodatkowych szczegółów eksperymentalnych na teście RdRp EAV nsp9.

Można znaleźć w: DOI: 10.1371 / journal.ppat.1001176.s002 (2,16 MB TIF)

Figura S3 Przypuszczalne reszty wiążące cynk w przewidywanej struktury SARS-CoV nsp12 i wobec struktury domeny RdRp wirus Dengue zawierającym cynk. (ZA) Dopasowanie sekwencji koronawirusa RdRps wykazujących zachowania czterech możliwych pozostałości cynku wiążące kwasy aminowe (C799-C813-H810-H816 w SARS-CoV, oznaczone gwiazdką) do C-końcowego regionu koronawirusa nsp12. Czarne cieniowanie oznacza pełną ochronę wśród koronawirusy. Koronawirusa sekwencje RdRp dostosowano mięśni 3.6. Wyrównanych Sekwencje i numery akcesyjne NCBI są następujące: mysiego wirusa zapalenia wątroby typu szczepu A59 (MHV_A59; NP_068668), ludzki CoV 229E (HCoV_229E; NP_068668), zakaźny wirus zapalenia oskrzeli szczep Beaudette (IBV_B; P0C6Y1), bydlęcy koronawirus (BCoV; NP_742138.1), kociego koronawirusa (FeCoV; YP_239353.1) i szczep SARS CoV Frankfurt 1 (SARS_Fr1; AAP33696). (B) Struktura krystaliczna domeny RdRp wirus Dengue pokazujący umiejscowienie czterech reszt cysteiny i histydyny, które tworzą Zn 2+ -kieszeni wiązania Zn2 usytuowany blisko motyw E (przedstawione na czerwono). Drugi Zn 2 + - kieszeni wiążącej (Zn1) i dwa jony cynku określone w strukturze kryształu są oznaczone na niebiesko-szarej. (DO) Przewiduje się trójwymiarową strukturę model SARS-CoV nsp12 (Xu et al, Nuci Acids Res. 31: 7117-7130).., W oparciu o kod PDB 1O5S, wykonane z Swiss-PdbViewer 4.01 Pov-Ray 3.6. Położenia konserwowanych reszt cysteiny i histydyny wskazano w panelu A (C799-C813, H810-H816) w pobliżu motyw E (przedstawionego na kolor czerwony), RdRp pozostałości w miejscu aktywnym (D618, D760 i D761) są wskazane. Układ przestrzenny cysteiny i histydyny w tym modelu uderzająco podobny do pozycjonowania metalu reszt jonowych, koordynujących wiązania Zn-kieszeni Zn2 w domenie RdRp wirusa Dengue (patrz Tablica B). Można znaleźć w: DOI: 10.1371 / journal.ppat.1001176.s003 (0,86 MB TIF)

Autorskie Wkłady

Pomyślany i zaprojektowany eksperymenty: AJWtV SHEvdW Ejs MJvH. Przeprowadzono eksperymenty: AJWtV SHEvdW MJvH. Przeanalizowali dane: AJWtV SHEvdW ACS RSB Ejs MJvH. Przyczyniły odczynniki / materiały / narzędzia analityczne: ACS RSB. Napisał papieru: AJWtV Ejs MJvH.

Bibliografia

1. Łazarczyk M, Favre, M (2008) Role Zn 2+ Jony w interakcjach gospodarza wirusa. J Virol 82: 11486-11494.
2. Frederickson CJ, Ko JY, Bush AI (2005) Neurobiologia cynku w zdrowiu i chorobie. Nat Rev Neurosci 6: 449-462.
3. Alirezaei M Nairn AC Głowiński J Premont J Marin P (1999) syntezy białka CYNKU hamuje w neuronach: Potencjał ROL fosforylacji inicjacji translacji czynnika 2a. J Biol Chem 274: 32433-32438.
4. Uchide N Ohyama K Bessho T Yuan B Yamakawa T (2002), wpływ środków przeciwutleniających na apoptozę indukowaną przez zakażenie wirusem grypy: hamowanie replikacji wirusowej transkrypcji genu i pirolidyną ditiokarbaminianu. Antiviral Res 56: 207-217.
5. Suara RO JEJ Crowe (2004) Wpływ soli cynku podczas replikacji wirusa syncytium nabłonka oddechowego. Agencje Antimicrob Chemother 48: 783-790.
6. Gaudernak E Seipelt J Triendl A Grassauer A Kuechler PL (2002), działanie przeciwwirusowe pirolidyny ditiokarbaminian na ludzkich rinowirusów. J Virol 76: 6004-6015.
7. Si X McManus BM Zhang J Yuan J, Cheung C., i in. (2005) Pirolidyno- ditiokarbaminian Zmniejsza Coxsackie B3 replikacji poprzez hamowanie ubikwityny-proteasom. J Virol 79: 8014-8023.
8. Korant BD Kauer JC Butterworth BE (1974) cynk jonów hamowania replikacji rinowirusa. Nature 248: 588-590.
9. Polatnick J Bachrach HL (1978) Wpływ cynku i innych środków chemicznych na footand pryszczycy, chorobie replikacji wirusa. Agencje Antimicrob Chemother 13: 731-734.
10. Lanke K Krenn BM Melchers WJG, Seipelt J, Van Kuppeveld FJM (2007), PDTC hamuje pikornawirus poliproteinę przetwarzania i RNA do replikacji przez transportowanie jonów cynku w komórkach. J Gen Virol 88: 1206/17.
11. Krenn BM Gaudernak E Holzer B Lanke K Van Kuppeveld FJM, i in. (2009) Aktywność antywirusowa cynk Jonofory Pirytionian i hinokitiol przeciwko pikornawirus infekcje. J Virol 83: 58-64.
12. Zalewski PD Forbes IJ, Betts WH (1993) Korelacja apoptozy z zmianę wewnątrzkomórkowego nietrwałego Zn (II) w Zinquin [(2-metylo-8-p-toluenesulphonamide6-quinolyloxy) octowy], nowy specyficzna sonda fluorescencyjna Zn (II). J., 296: 403-408.
13. Baum EZ Bebernitz GA, Palant O Mueller T Plotch SJ (1991) Oczyszczanie właściwości i mutageneza proteazy wirusa polio 3C. Virology 165: 140-150.
14. Cordingley MG Rejestracja RB Callahan PL, Garsky VM Colonno RJ (1989) rozkład małych peptydów in vitro ludzkiego rinowirusa 14 proteaza 3C ekspresji w Escherichia coli. J Virol 63: 5037-5045.

15. Ferrari E Wright-J Minogue Fang JW, Baroudy BM Lau JY i in. (1999) Characterization rozpuszczalnego wirusa zapalenia wątroby typu C RNA-zależnej polimerazy RNA, wyrażone w E. coli. J Virol 73: 1649/54.

16. Hung M Gibbs CS Tsiang M (2002) Biochemiczna charakterystyka rinowirus RNA-zależnej polimerazy RNA. Antiviral Res 56: 99-114.

17. Perlman S Netland J (2009) Koronawirusy po SARS: zmiana replikacji i patogenezy. Nat Rev Micro 7: 439-450.

18. Gorbalenya AE Enjuanes L Ziebuhr J Snijder EJ (2006) Nidovirales: ewolucja największy genom wirusa RNA. Virus Res 117: 17-37.

19. Snijder EJ, Bredenbeek PJ Dobbe JC Thiel V Ziebuhr J. i in. (2003) i konserwowane Unikalne cechy genomu i proteomu SARS-koronawirus, wczesnym split-off z grupy koronawirus 2 linii. J Mol Biol 331: 991-1004.

20. Pasternak AO, Spaan WJ, Snijder EJ (2006) Nidovirus transkrypcja: jak sens ...? J Gen Virol 80: 1403/21.

21. Sawicki SG Sawicki DL Siddell SG (2007) Współczesne poglądy koronawirusa transkrypcji. J Virol 81: 20-29.

22. Butterworth BE Korant BD (1974) Charakterystyka duża pikornawirusów polipeptydy wytwarza się w obecności jonów cynku. J Virol 14: 282-291.

23. Denison MR S Perlman (1986) Tłumaczenie i przetwarzania zapalenia wątroby myszy wirionów wirusów RNA w układzie bezkomórkowym. J Virol 60: 12-18.

24. Denison MR, Zoltick PW, Hughes SA Giangreco B, Olson AL, et al. (1992) wewnątrzkomórkowego przetwarzania N-końca białka ORF 1a koronawirusa MHV A59 wymaga wielu zdarzenia proteolityczne. Virology 189: 274-284.

25. van Hemert MJ, de Wilde Ach, Gorbalenya AE, Snijder EJ (2008) In vitro RNA syntetyzowania Aktywny wyizolowanego Arterivirus Replication / transkrypcja Complex jest zależny od czynnika przyjmującego. J Biol Chem 283: 16525-16536.

26. van Hemert MJ van den ślimakowe ona Knoops K Mommaas AM Gorbalenya AE i in. (2008) koronawirusa SARS Replikacja / Transkrypcja kompleksy Membrane-Protected i Need czynnikiem Host na aktywność in vitro. PLoS Pathog 4: e1000054.

27. Te Velthuis AJ Arnold JJ Cameron CE van den ślimakowe SH Snijder EJ (2009) aktywność polimerazy RNA koronawirusa SARS nsp12 znaczy zależna od startera. Kwasy nukleinowe Res 38: 203-214.

28. Beerens N Selisko B Ricagno S Imbert że van der Zanden L, et al. (2007), De Novo rozpoczynania syntezy RNA przez Arterivirus RNA-zależnej polimerazy RNA. J Virol 81: 8384-8395.

29. van den Born E, posthuma CC, Knoops K, Snijder EJ (2007) zakaźnego wirusa rekombinowanego tętnic koni wyrażającego białko zielonej fluorescencji z jego genu replikazy. J Gen Virol 88: 1196/05.

30. Sims AC Burkett SE Yount B, ogórki RJ (2008) do replikacji SARS-CoV i patogeneza w modelu in vitro ludzkich przewodzącego nabłonku dróg oddechowych. Virus Res 133: 33-44.

31. Xu X, Liu T Weiss S, Arnold E Sarafianos SG, i wsp. (2003) Molecular model koronawirusa SARS polimerazy: wpływ na funkcje biochemiczne i opracowywania leków. Kwasy nukleinowe Res 31: 7117-7130.

32. Zhai Y Sun K, Li X Pang H, Xu X, i in. (2005) Wgląd transkrypcji SARS-CoV i replikacji struktury hexadecamer nsp7-nsp8. Nat Struct Mol Biol 12: 980-986.

33. Stockman LJ, Bellamy R, Garner P (2006) SARS: Systematyczny przegląd efektów leczenia. PLoS Med 3: e343.

34. Thompson A, Patel K Tillman H McHutchison JG (2009), bezpośrednio działających środków przeciwwirusowych do leczenia pacjentów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C: Kliniczne zmiana opracowanie rozwiązania głównych wyzwań w przyszłości. J Hepatol 50: 184-194.

35. De Clercq E (2004) przeciwwirusowe i strategie przeciwwirusowe. Nat Rev Microbiol 2: 704-720.

36. Thompson AJV, McHutchison JG (2009) Antiviral odporność i specyficznie ukierunkowane leczenie HCV (STAT-C). J. Viral Hepat 16: 377-387.

37. W Yang Lee JY, Nowotny M (2006) łączenia i rozłączania Kwasy nukleinowe: TwoMg2 + jon Katalizy i podłoża Specyfika. Mol Celi 22: 5-13.

38. Castro C Smidansky E Maksimchuk KR Arnold JJ Korneeva VS, i wsp. (2007), dwa transfery protonowej stanu przejściowego dla nukleotydylotransferazy przenoszenia katalizowanej od RNA, jak i DNA-zależnej polimerazy RNA, jak i DNA. Proc Natl Acad Sci USA 104: 4267-4272.

39. Arnold JJ, Ghosh SK, Cameron CE (1999), wirus polio zależna od RNA polimeraza RNA (3Dpol). Dwuwartościowy kation modulacja podkładu, szablon i nukleotydów wyboru. J Biol Chem 274: 37060-37069.

40. Iuchi S (2001) Trzy klasy białek palca C2H2 cynku. Celi Mol Life Sci 58: 625-635.

41. Gomis-Ruth XF (2009) architektura domeny katalitycznej metzincin metaloproteinaz. J Biol Chem 284: 15353-15357.

42. Yap TL Xu, T, Chen YL, Malet H Egloff MP, et al. (2007) struktury krystalicznej wirus dengi RNA-zależnej polimerazy RNA, w domenie katalitycznej Rozdzielczość 1,85-angstremów. J Virol 81: 4753-4765.

43. Winek CL Buehler EV (1966) dożylne toksyczność pirydynotionu cynku i kilka soli cynku. Toxicol Appl Pharmacol 9: 296-273.

44. Snyder DR de Jesus CP Towfighi J Jacoby RO, Wedig JH (1979) stany neurologiczne, mikroskopowe i enzym-histochemiczne oceny toksyczności pirytionu cynku. Food Cosmet Toxicol 17: 651-660.

45. Magda D Lecane P, Wang Z, Hu W, Thiemann P. i in. (2008), synteza i właściwości przeciwnowotworowe, rozpuszczalnych w wodzie jonoforami cynku. Cancer Res 68: 5318-5325.

46. Snijder EJ, Van der Meer Y Zevenhoven-Dobbe Onderwater JJM J, Van der Meulen J, et al. (2006) i Pochodzenie Ultrastruktura błonie skojarzony z Severe Acute Respiratory Syndrome koronawirusa Replication Complex. J Virol 80: 5927-5940.

47. Studier F (2005) produkcja białka przez auto-indukcji w dużej gęstości kultur drżenie. Protein Expr Purif 41: 207-234.