

**Charakterisierung der Replikationsfaktoren des porcinen Circovirus
in Bezug auf Initiation und Termination
der viralen Replikation**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tobias Steinfeldt
aus Kiel

September 2006

1. Gutachter: PD. Dr. Annette Mankertz
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 15/12/2006

INHALTSVERZEICHNIS

1.EINLEITUNG	1
1.1 Circoviren	3
1.1.1 Porcine Circoviren	4
1.1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese	5
1.2 Xenotransplantation	7
1.3 Suche nach humanen Circoviren	8
1.4 Molekularbiologie von PCV	10
1.4.1 Genomorganisation	10
1.4.2 Das virale Kapsidprotein	11
1.4.3 Die viralen Replikationsproteine	12
1.4.4 Der virale Replikationsorigin	14
1.4.5 Replikationsmechanismus von PCV	15
1.5 Replikation verwandter Viren	17
1.5.1 Gemini- und Nanoviren	17
1.5.2 Parvoviren	19
1.6 Zielsetzung	20
2. MATERIALIEN	21
2.1 Bezugsquellennachweis	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Enzyme	24
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Proteinstandard	24
2.1.6 Nukleinsäuren	25
2.1.7 Vektoren	25
2.1.8 Oligonukleotide und Primer	26
2.1.9 Zelllinien, Bakterienstämme, Hefestämme	26
2.1.10 Reagenziensätze	27
2.1.11 Filter, Membranen, Säulen	27

2.1.12	Kunststoffartikel	28
2.1.13	Glaswaren	28
2.1.14	Weitere Verbrauchsmaterialien	28
2.1.15	Antibiotika	29
2.2	Nährmedien und Lösungen	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	<i>E. coli</i>	30
2.2.3	Yeast Two-Hybrid	30
2.2.4	semi solid Protokoll	31
2.3	Puffer- und Gebrauchslösungen	32
2.3.1	Agarosegelelektrophorese	32
2.3.2	Fluorometer	33
2.3.4	SDS-PAGE	33
2.3.5	PAGE	34
2.3.6	Western Blot	34
2.3.7	Yeast Two-Hybrid	35
2.3.8	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	36
3.	METHODEN	37
3.1	DNA-Rekombinationstechniken	37
3.1.1	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	37
3.1.2	Ligation von DNA-Fragmenten	37
3.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
3.1.4	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
3.1.5	Erzeugung glatter DNA-Enden nach Restriktionsverdau	39
3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.3	Agarosegelelektrophorese	40
3.4	Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten	41
3.4.1	Isolierung aus Agarosegelen	41
3.4.2	Aufreinigung über Silikagelmembranen	42
3.4.3	Alkoholfällung	42
3.4.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	43
3.5	DNA-Transfer in Bakterien	43
3.5.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen	43
3.5.2	Transformation elektrokompeter Bakterienzellen	44

3.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	44
3.7 Präparation von Plasmid-DNA	45
3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Minilysaten	45
3.7.2 Präparation von Plasmid-DNA über Silikagelmembranen	45
3.7.3 Präparation von Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulen	46
3.8 Verfielfältigung von Plasmid-cDNA-Bibliotheken	47
3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
3.9.1 Konzentrationsbestimmung über Agarosegelelektrophorese	48
3.9.2 Fluorometrische Bestimmung	48
3.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren	49
3.11 Native und Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	50
3.12 Replikationsassay	52
3.13 DNA-Transfer in eukaryotische Zellen	53
3.14 Immuno-/Western Blot	55
3.14.1 Immunologische Detektion membrangebundener Proteine	55
3.14.2 Färbung membrangebundener Proteine	56
3.15 Detektion fluoreszenzmarkierter DNA	56
3.16 Hybridisierung von Nukleinsäuren	56
3.17 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	57
3.18 Yeast Two-Hybrid: MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3	57
3.18.1 Transformation kompetenter Hefezellen	58
3.18.2 Herstellung kompetenter Hefezellen	59
3.19 Immunopräzipitation	60
3.20 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	61
3.21 Aufreinigung der bakteriell exprimierten Fusionsproteine	63
3.21.1 Aufschluss der Zellen und Präparation der löslichen Fraktion	63
3.21.2 Aufreinigung der His- und GST-Fusionsproteine	63
3.21.3 Umpuffern der aufgereinigten Proteinlösungen	64
3.22 Restriktionsassay und Restriktions-/Ligationsassay	64

3.23	Kovalente Verknüpfung von Rep und Rep' mit dem 5'-Ende des 3'-Schnittprodukts	65
3.24	Zellkultur	66
3.25	ATPase-Assay	67
4. ERGEBNISSE		68
4.1	Restriktionsaktivität der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV1	68
4.1.1	Expression der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' als His-Fusionsproteine	69
4.1.2	PCV1-Rep und -Rep' weisen eine spezifische Restriktionsaktivität gegenüber dem viralen Plusstrang auf	70
4.1.3	Einfluss von ATP auf die Restriktionsaktivität der Fusionsproteine His-Rep und His-Rep'	71
4.1.4	Einfluss von bivalenten Kationen auf die Restriktionsaktivität der His-Fusionsproteine Rep und Rep'	73
4.2	Einfluss der Sekundärstruktur und der Sequenz des Replikationsorigins von PCV1 auf die Restriktion durch die viralen Replikationsproteine Rep und Rep'	74
4.2.1	Einfluss der Nonamersequenz auf die Restriktion des Replikationsorigins	74
4.2.1	Einfluss der Nonamersequenz auf die Restriktion des Replikationsorigins	75
4.2.2	Einfluss der potentiellen Haarnadelstruktur auf die Restriktion des Replikationsorigins	75
4.2.3	Einfluss der MBS-Sequenzen auf die Restriktion des Replikationsorigins	76
4.3	Ligationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV1	77
4.4	Einfluss von Sekundärstruktur und Sequenz des PCV1-Replikationsorigins auf die Ligation durch die viralen Replikationsproteine	79
4.5	Die Ligation des PCV1-Replikationsorigins durch die Replikationsproteine ist abhängig von vorangegangener Restriktion	81
4.6	Nachweis der kovalenten Verknüpfung der PCV1-Replikationsproteine mit dem 5'-Ende des 3'-Schnittprodukts	83
4.7	Die PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' sind als His-Fusionsproteine in PK15-Zellen funktionell	85
4.7.1	Konstruktion der Luziferase Reportergenplasmide	85
4.7.2	His-Rep und His-Rep' vermitteln die Replikation von pRL16 in PK15-Zellen	86
4.8	Restriktionsaktivität der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV2	88

4.8.1	Expression der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' als His-Fusionsproteine	89
4.8.2	PCV2-Rep und -Rep' besitzen eine spezifische Restriktionsaktivität gegenüber dem viralen Plusstrang	89
4.9	Ligationsaktivität der PCV2-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV2	91
4.10	Die Replikationsproteine von PCV1 und PCV2 sind hinsichtlich der Restriktion und Ligation des viralen Replikationsorigins austauschbar	92
4.10.1	Die His-Fusionsproteine Rep/Rep' von PCV1 und PCV2 besitzen eine Restriktionsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin <i>in vitro</i>	93
4.10.2	Die His-Fusionsproteine Rep/Rep' von PCV1 und PCV2 besitzen eine Ligationsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin <i>in vitro</i>	94
4.11	Analyse der konservierten Motive der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' im Hinblick auf die virale Replikation	96
4.11.1	Aktivitäten der rekombinanten PCV1-Replikationsproteine Rep'mutI, RepmutII, RepmutY93 und RepmutP <i>in vitro</i>	96
4.11.1.1	Expression der N-terminalen His- und GST-Fusionsproteine	97
4.11.1.2	Funktionalität der Rep-assoziierten GKS-Box und Analyse der Rep-Mutanten im Hinblick auf die ATP-Hydrolyse	98
4.11.1.3	Analyse der Rep/Rep'-Mutanten im Hinblick auf die Restriktion des viralen Plusstrangs	100
4.11.2	Analyse der Replikationsaktivität der rekombinanten PCV1-Replikationsproteine in transfizierten Zellen	102
4.12	Untersuchungen zur Termination und zum genauen Mechanismus der PCV1-Replikation	104
4.12.1	Befähigung der PCV1-Replikationsproteine sowie des PCV1-Kapsidproteins zur homologen und heterologen Interaktion in Hefezellen	105
4.12.1.1	Rep, Rep* und Rep' bilden sowohl homologe als auch heterologe Komplexe in Hefezellen aus	106
4.12.2	Befähigung der PCV1-Replikationsproteine zur homologen und heterologen Interaktion in Bakterienlysaten	109
4.12.2.1	Expression der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' als FLAG-Fusionsproteine	109
4.12.2.2	Rep und Rep' bilden homologe und heterologe Komplexe in Bakterienlysaten aus	111
4.12.3	Untersuchungen zur Oligomerisierung der PCV1-Replikationsproteine in Bezug auf die Termination der viralen Replikation	113
4.13	Bedeutung der konservierten Sequenzen innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 für die virale Replikation	115
4.13.1	Konstruktion der Luziferase Reportergenplasmide	115

4.13.2	Die Hexamere H1 und H2 sind in ihrer spezifischen Sequenz essentiell für die virale Replikation in PK15-Zellen	117
4.13.3	Der Bereich der inversen Repetition ist in seiner spezifischen Sequenz essentiell für die virale Replikation in PK15-Zellen	118
5. DISKUSSION		120
5.1	Restriktion und Ligation des Replikationsorigins durch die PCV-Replikationsproteine Rep und Rep'	122
5.2	Funktion der konservierten Sequenzen innerhalb der Replikationsproteine im Hinblick auf die virale Replikation	126
5.3	Katalytischer Mechanismus der Initiation und Termination der viralen Replikation	130
5.4	Modell der Rep/Rep'-katalysierten RCR von PCV	133
6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY		136
7. LITERATURVERZEICHNIS		140
PUBLIKATIONSLISTE		149
DANKSAGUNG		150
LEBENS LAUF		151
ANHANG		152
A.1	Expressionsvektoren	152
A.2	Fusionsproteine	154
A.3	Luziferase Reportergenplasmide	155
A.4	Plasmide	156

A.5 Primer	157
A.6 Oligonukleotide	159
A.7 Vektorkarten	161