

1. EINLEITUNG

Viren sind infektiöse Einheiten, die sich im Laufe der Evolution an ihre Wirtszellen angepasst haben und häufig gefährliche Pathogene darstellen, die gar nicht oder nur schwer therapierbar sind. Bis zum heutigen Tage konnten nur wenige Medikamente entwickelt werden, die analog zur Therapie von bakteriellen Infektionen mit Antibiotika die Replikation von Viren inhibieren. Aus diesem Grunde ist die Untersuchung viraler Replikationsmechanismen und die Entwicklung von Impfstoffen eine wichtige Voraussetzung für die Kontrolle von viralen Erkrankungen.

Das virale Genom besteht aus RNA oder DNA. Abhängig vom Virustyp kann die Nukleinsäure in Positiv- oder Negativorientierung als einzelsträngiges oder doppelsträngiges Molekül vorliegen, linear, ringförmig oder segmentiert sein. Einzelsträngige RNA- und DNA-Genome können dabei unterschiedliche Polarität aufweisen. Das Genom ist häufig mit viralen oder zellulären Proteinen komplexiert und wird dann als Nukleokapsid bezeichnet. Die Nukleinsäure kann aber auch direkt in das Kapsid verpackt sein oder mit Komponenten auf der Innenseite einer Hüllmembran assoziiert vorliegen.

Die taxonomische Klassifizierung der Viren nach ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) erfolgt anhand der Art und Form des Genoms, der Symmetriefform des Kapsids, dem Vorhandensein einer Membranhülle, der Anordnung der Gene innerhalb des Genoms, der Größe von Virion und Kapsid sowie der viralen Replikationsstrategie, die vom Virus verfolgt wird. Für die Eingruppierung von Viren sind weiterhin medizinische oder epidemiologische Merkmale wichtige Kriterien, sowie Wirtsorganismen und Übertragungswege.

Viren sind obligatorisch intrazelluläre Parasiten. Sie besitzen zumeist keine energiegewinnenden oder makromolekülbildenden Systeme und sind deshalb nicht in der Lage, autonom die Replikation ihres Genoms zu betreiben, d.h. sie sind auf sich teilende Wirtszellen angewiesen, die die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen. Die einzelnen Virusfamilien haben unterschiedliche Strategien hinsichtlich ihrer Genomreplikation entwickelt, wobei das Grundprinzip jedoch immer gleich ist. So kann der virale Replikationszyklus in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden.

Nach Anlagerung an zelluläre Rezeptoren und Eindringen in die Zielzelle erfolgt die Freisetzung der viralen Nukleinsäure im Zytoplasma oder Nukleus. Mit der Freisetzung des Virusgenoms ist die Initiation des viralen Replikationszyklus abgeschlossen und die Voraussetzung für die Einleitung der Replikation geschaffen. Die Replikation umfasst die virale Genexpression und Vermehrung des viralen Genoms. Aufgrund der enormen Vielfalt von Genomgröße, -struktur und -zusammensetzung der unterschiedlichen Virusfamilien und des breiten Spektrums permissiver Wirtszellen haben die Virusfamilien voneinander abweichende Strategien der Replikation entwickelt. Nach dem so genannten Baltimore Schema werden die Viren molekularbiologisch in sieben Hauptgruppen eingeteilt: Neben doppelsträngigen und einzelsträngigen DNA-Viren unterscheidet man solche, die als doppelsträngige DNA-Viren über RNA als Zwischenstufe in einer reversen Transkriptase katalysierten Reaktion replizieren. RNA-Viren können ebenfalls doppelsträngig oder einzelsträngig vorliegen. Generell ist für die Replikation aller RNA-Viren - mit Ausnahme der Retroviren - eine RNA-abhängige RNA-Polymerasefunktion essentiell: Während die Information der RNA-Viren in Plusstrangorientierung direkt dem zellulären Translationsapparat zugänglich gemacht werden kann, diese Polymerasefunktion also viral kodiert ist, müssen doppelsträngige und einzelsträngige RNA-Viren in Minusstrangorientierung erst von der RNA-abhängigen RNA-Polymerase im Viruspartikel umgeschrieben werden. Retroviren als einzelsträngige RNA-Viren in Plusstrangorientierung replizieren nach reverser Transkription über eine DNA-Zwischenstufe. Nach Vervielfältigung des Genoms und Beendigung der Replikation beginnt der Zusammenbau neuer Viruspartikel und deren Reifung. Das Freisetzen viraler Partikel am Ende des Replikationszyklus kann, muss aber nicht mit der Lyse der Wirtszelle einhergehen.

1.1 Circoviren

<i>Circoviridae</i>		
Genus	Genom	Vertreter
Circovirus	monopartit	<i>Porcines circovirus</i> Typ 1, Typ 2 <i>Beak and feather disease virus</i> <i>Pigeon/Columbid circovirus</i> <i>Goose circovirus</i> <i>Canary circovirus</i> <i>Duck circovirus</i> <i>Gull circovirus</i> <i>Finch circovirus</i>
Gyrovirus	monopartit	<i>Chicken anaemia virus</i>

Abb. 1.1. Taxonomie der *Circoviridae*

Circoviren sind durch ein einzelsträngiges zirkulär kovalent geschlossenes DNA-Genom in Plusstrangorientierung gekennzeichnet. Die Familie der *Circoviridae* (87) gliedert sich in zwei Genera, das Genus *Circovirus* und das Genus *Gyrovirus* (101). Als Vertreter des Genus *Circovirus* wurden das *Porcine circovirus* Typ 1 (PCV1, (97)) und Typ 2 (PCV2, (50)), das *Beak and feather disease virus* (BFDV, (5)), das *Pigeon* oder *Columbid circovirus* (CoCV/PiCV, (92)), das *Goose circovirus* (GoCV, (156)) und das *Canary circovirus* (CaCV, (123)) identifiziert, deren Genom Ambisensecharakter aufweist. Während das *Duck circovirus* (DuCV, (60)), das *Gull circovirus* (GuCV, (161)) und das *Finch circovirus* (FiCV, (138)) vorläufig dem Genus *Circovirus* zugeordnet werden, sind das erst kürzlich identifizierte *Raven circovirus* (RaCV, (143)) und das *Starling circovirus* (StCV, (70)) bisher nicht taxonomisch klassifiziert. Das Genom des *Chicken anaemia virus* (CAV, (72)), des bislang einzigen Mitglieds des Genus *Gyrovirus*, weist hingegen Negativstrangorientierung auf und ist abweichend organisiert, denn die Leserahmen sind überlappend angeordnet und werden monocistronisch transkribiert. Es bestehen Ähnlichkeiten mit dem *Torque teno virus* (TTV, (9, 64, 117)), dem *Torque teno mini virus* (TTMV, (144)) und dem *Small anellovirus* (SAV, (10)), allesamt Mitglieder des Genus *Anellovirus* (101). Bei den Anelloviren handelt es sich nicht, wie ursprünglich angenommen, um humane Circoviren, die Ähnlichkeiten sind lediglich auf einen kleinen Abschnitt des viralen Genoms beschränkt. Aufgrund der limitierten Sequenzhomologie und der abweichenden Transkriptionsstrategie ist dieses Genus

momentan keiner Virusfamilie zugeordnet. Mit Ausnahme von PCV1 sind alle circoviralen Infektionen mit Krankheiten assoziiert. Ähnlichkeiten im Hinblick auf das Replikationsprotein und den Replikationsorigin (7, 116) deuten auf einen gemeinsamen Replikationsmechanismus hin. Mit einem Durchmesser von 17-22 nm und einer Genomgröße von 2000-4000 Nukleotiden sind Circoviren die kleinsten bekannten Viren, die in der Lage sind, autonom in Säugerzellen zu replizieren. Nach Infektion der Zielzelle wird das einzelsträngige virale Genom in ein doppelsträngiges replikatives Intermediat - vermutlich katalysiert durch die Aktivität einer zellulären Polymerase - überführt. Als evolutionärer Ursprung von PCV wird der Wirtswechsel eines Nanovirus postuliert, welches nach Infektion eines Vertebraten aus einem Rekombinationsereignis mit einem einzelsträngigen RNA-Virus, vermutlich einem Calicivirus (146), hervorgegangen ist (40).

1.1.1 Porcine Circoviren

Die erstmalige Isolierung von PCV1 aus permanent infizierten PK15- (CCL-33) Zellen und damit seine erste Beschreibung als persistente Kontaminante dieser Zelllinie datiert aus dem Jahre 1974 (155). In seiner Morphologie den Picornaviren (141) sehr ähnlich, ergaben weitere Untersuchungen einen Durchmesser des Virions von $17 \pm 1,3$ nm und eine ikosaedrische, nicht umhüllte Struktur, die aus 12 pentameren Einheiten mit jeweils 60 Untereinheiten zusammengesetzt ist, mit einem Haupt-Kapsidpolypeptid von 28 kDa.

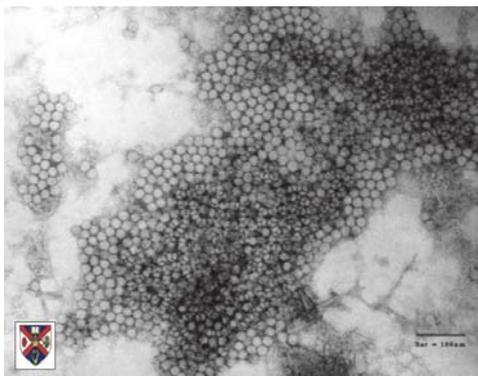


Abb. 1.2. Elektronenmikroskopische Aufnahme von PCV1-Partikeln.

*IVTVdB-The Universal Virus Database
Prof. Stewart McNulty, The Queen's University, Belfast*

Die Sequenz des Genoms von PCV1 mit 1759 Nukleotiden ist bestimmt (13, 102). Der natürliche Wirt von PCV1 ist das Schwein (*Sus scrofa*), wobei sich das Virus sowohl in primären als auch in permanent infizierten Zellkulturen vermehrt und zumindest in PK15-Zellen eine persistente Infektion verursacht (152, 155). Aufgrund seiner geringen Größe und

Kodierungskapazität kann PCV1 nicht mit einem kompletten, viruseigenen DNA-Replikationsapparat ausgestattet sein und ist somit auf das zelluläre Replikationssystem angewiesen, d.h. die benötigten Replikationsfaktoren müssen durch die Wirtszelle *in trans* zur Verfügung gestellt werden. So konnte Virusreplikation in synchronisierten Zellkulturen während der S-Phase des Zellzyklus, in der die für die DNA-Replikation erforderlichen Enzyme aktiv sind, nachgewiesen werden (154).

1.1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

In ca. 85% der Seren von untersuchten Schweinen ließen sich Antikörper gegen PCV nachweisen (153), wobei weder pathogene Effekte in experimentell infizierten Tieren noch cytopathische Effekte in Zellkultur beobachtet wurden (153). PCV1 gilt demzufolge als apathogen.

Zu Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde eine neue multifaktorielle Krankheit in einer Schweineherde in Kanada (Saskatchewan) beschrieben (24, 55, 108). Als Erreger dieser fortan als PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) bezeichneten Erkrankung, die mit einem erheblichen volkswirtschaftlichen Schaden einhergeht, wurde ein bis dato unbekanntes Circovirus identifiziert, PCV2 (50, 104, 106). Erkrankte Schweine zeigen Symptome wie Gewichtsverlust, Fieber, vergrößerte Lymphknoten, Durchfall, Abnahme der Lymphozytenzahl in den Lymphknoten, Atemnot, Blässe, Gelbsucht und eine milde Form von Konjunktivitis (56).

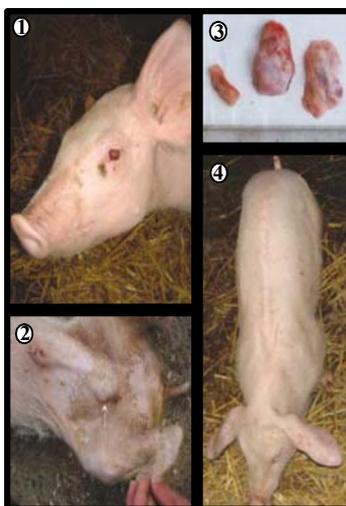


Abb. 1.3. PMWS, klinische Symptome. 1: PMWS-Schwein mit milder Konjunktivitis, 2: PMWS-Schwein mit vergrößerten Lymphknoten (weißer Pfeil), 3: normale und vergrößerte Lymphknoten, 4: PMWS-Schwein mit Gewichtsverlust und Blässe

Mikroskopische Läsionen, die mit einer PCV2-Infektion in unterschiedlichen Geweben assoziiert sind, umfassen interstitielle Pneumonie, Nephritis, Hepatitis, Myokarditis, Enteritis und Pankreatitis (1). Durch Infektion mit PCV2-Zellkulturisolaten konnten diese Läsionen in Schweinen nach Stimulierung des Immunsystems experimentell reproduziert werden (77). Die Ausprägung des klinischen Vollbilds von PMWS hingegen setzt vermutlich die Koinfektion mit anderen Agentien voraus. So ist über die gleichzeitige Infektion mit *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PPRSV), *Pseudorabies virus* (PRV) oder *Porcine parvovirus* (PPV) bei assoziiertem PMWS berichtet worden (1, 2). Darüber hinaus ist PMWS mit opportunistischen Infektionen assoziiert (15, 32, 115). Diese Beobachtung legt nahe, dass das Immunsystem in der Pathogenese von PMWS eine zentrale Rolle spielt. Neben der Identifikation als kausatives Agens von PMWS wird PCV2 im Zusammenhang mit PDNS (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome) diskutiert, der endgültige Beweis für diesen Zusammenhang steht jedoch noch aus (43, 103).

1.2 Xenotransplantation

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen ist immer noch ein großes Problem der Allotransplantation. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland 3508 Organe nach dem Tode gespendet, 553 Organe (489 Nieren, 64 Teil-Lebern) wurden nach einer Lebendspende transplantiert. Obwohl damit die Zahl der Transplantationen in den vergangenen Jahren weiter anstieg, ist der Bedarf nach wie vor wesentlich höher als das Angebot. Mehr als 12000 Menschen warten derzeit in Deutschland auf ein Organ (Deutsche Stiftung Organtransplantation).

Neben der Transplantation künstlicher Organe und dem *Tissue Engineering* stellt die Xenotransplantation eine mögliche Alternative dar, dem herrschenden Organmangel zu begegnen. Unter dem Begriff der Xenotransplantation ist die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden, einschließlich kompletter Organe oder Körperteile, zwischen verschiedenen Spezies zusammengefasst. Aufgrund einer physiologischen und anatomischen Verwandtschaft der Organe (54), hoher Wurfzahlen, kurzer Reproduktionszeiten und kostengünstiger Haltung gilt in erster Linie das Miniaturschwein als potentieller Spenderorganismus für den Menschen. Auf Ebene der Xenotransplantation von Zellverbänden sind bereits große Erfolge erzielt worden. So konnte durch die Transplantation porciner embryonaler Hirnzellen eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome bei Parkinson-Kranken verzeichnet werden (35). Des weiteren existieren extrakorporale Systeme mit porcinen Zellen, die mit Erfolg für die Überbrückung von lebensbedrohlichen Situationen bei Patienten mit akutem Nieren- oder Leberversagen eingesetzt wurden (120, 124). Dagegen ist ein Erfolg hinsichtlich einer Organ-Xenotransplantation bis zum heutigen Tage nicht absehbar. Bei den letzten Versuchen handelte es sich um die Verpflanzung eines Schweineherzens bzw. einer Schweineleber (89). Beide Rezipienten verstarben innerhalb von 24 h nach dem Eingriff an den Folgen einer hyperakuten Abstoßung.

Um der immunologisch bedingten Abstoßungsreaktionen des Transplantats Herr zu werden, erfolgen Xeno- und Allotransplantation unter stark immunsupprimierenden Bedingungen. Die Herausforderung auf dem Gebiet der Xenotransplantation besteht jedoch nicht nur darin, die körpereigene Abstoßung des Transplantats zu verhindern, sondern gleichermaßen die Übertragung potentieller Mikroorganismen auf den Empfänger zu verhindern. Natürliche Schutzbarrieren wie Haut und Schleimhäute werden durch eine Transplantation umgangen, die Erreger treten in direkten Kontakt mit Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Darüber

hinaus wäre im stark immunsupprimierten Rezipienten die Etablierung einer solchen Xenozoonose begünstigt. Die potentiellen Folgen werden besonders deutlich anhand der HIV- (*Human immunodeficiency virus*) assoziierten Erkrankung AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Durch einen Wirtswechsel des für seinen Wirt apathogenen SIV (*Simian immunodeficiency virus*) sind seit Beginn der Epidemie weltweit mehr als 25 Millionen Menschen gestorben (CDC, WHO).

Durch Antimykotika- bzw. Antibiotikagabe, Impfungen und eine spezifisch pathogenfreie (SPF) Haltung lassen sich Pilzkrankungen bzw. bakterielle Infektionen sowie eine Reihe von bekannten viralen Infektionen eliminieren. Gefahr droht dem Menschen in erster Linie durch entweder unbekannte Erreger oder Viren, welche nicht oder nur schwer aus einer Herde eliminiert werden können. Zu diesen zählen u.a. die porcinen endogenen Retroviren (PERV), welche integraler Bestandteil des porcinen Genoms sind und sich demzufolge nur durch aufwändige *knock out*-Verfahren eliminieren lassen. Obwohl eine Übertragung von PERV auf Menschen nach unmittelbarem Kontakt mit porcinem Gewebe oder Organen nicht nachgewiesen werden konnte (28, 61, 119), kann die Gefahr einer PERV-Infektion nicht ausgeschlossen werden (165). Darüber hinaus ist die Infektion von humanen Zellen durch PERV *in vitro* beschrieben (121, 139). Des Weiteren ist eine Risikoabschätzung derjenigen Viren im Kontext der Xenotransplantation erforderlich, die die Fähigkeit besitzen latent im Organismus zu persistieren und somit ohne Anzeichen einer Erkrankung des Organdonors übertragen werden können. Zu diesen Viren zählen in erster Linie die Herpesviren.

Bis zum heutigen Tage wurden fünf porcine Herpesviren identifiziert. Das *Pseudorabies virus* (PRV, (145)) als Vertreter der *Alphaherpesvirinae*, das *Porcine cytomegalovirus* (PCMV, (107)) und die porcinen lymphotropen Herpesviren Typ 1, 2 und 3 (PLHV 1, 2, 3) als Vertreter der *Gammaherpesvirinae* (23, 31). Neben diesen Viren stellen aber auch PCV1 und PCV2 eine potentielle Gefahr für den Rezipienten eines Xenotransplantats dar.

1.3 Suche nach humanen Circoviren

Obwohl in ersten Studien Seren von Maus und Schlachtvieh und auch von Menschen mit PCV reagierten (150), wurde ein humanes Circovirus bis zum heutigen Tage nicht gefunden (58). Die experimentelle Infektion verschiedener humaner Zelllinien mit PCV1 und PCV2 *in vitro* war nicht produktiv (59). Obwohl virale Genexpression und Replikation in einem Großteil der untersuchten Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Produktion

infektiöser Viruspartikel nicht beobachtet (59). Im Gegensatz zu PCV1 kann PCV2 ein größeres Spektrum an Zellen infizieren und löst dabei einen cytopathogenen Effekt (CPE) aus, der im Fall von PCV1 nicht beobachtet wurde (59) und der auf die virusinduzierte Induktion von Apoptose zurückzuführen ist (Hattermann K., persönliche Mitteilung). Die Risikoabschätzung der porcinen Circoviren im Kontext einer Xenotransplantation ist trotz dieser zunächst ermutigenden Befunde nicht abgeschlossen. So könnte die Kultivierung in humanen Zellen über einen längeren Zeitraum die Adaption zwischen Virus und Wirt begünstigen und damit in der Entstehung infektiöser Partikel resultieren. Neben weiteren Infektionsstudien, z.B. mit primären Zellen, ist ein tiefer greifendes Verständnis sowohl des viralen Infektionszyklus und der molekularen Funktionen von PCV1 und PCV2 im Hinblick auf eine mögliche Xenozoonose nach Xenotransplantation erforderlich.

1.4 Molekularbiologie von PCV

1.4.1 Genomorganisation

Neben dem einzelsträngigen viralen Genom lassen sich aus PCV-infizierten PK15-Zellen zwei Formen doppelsträngig zirkulärer DNA isolieren. Während die kovalent geschlossenen und superspiralisierten Moleküle in der Dichtegradientenzentrifugation als schwerere Bande sedimentieren (replikative Form II, RFII), entspricht die leichtere Bande den in einem Strang geöffneten, relaxierten Molekülformen (replikative Form I, RFI) (151). Beide Formen erwiesen sich in Transfektionsexperimenten als infektiös.

Das doppelsträngige replikative Intermediat von PCV1 mit 1759 Nukleotiden zeigte nach computergestützter Analyse sechs z.T. überlappende potentielle offene Leserahmen (26) mit einer Länge von jeweils mehr als 200 Nukleotiden, von denen jeweils drei auf dem viralen Plusstrang bzw. Minusstrang lokalisiert sind (95). Während der PCV1-Replikation in PK15-Zellen wurde die Synthese 12 virusspezifischer RNAs nachgewiesen, welche eine Cap- (Kapsidprotein) assoziierte, acht Rep- (Replikationsprotein) assoziierte und drei NS- (Nichtstrukturprotein) assoziierte RNAs umfassen (16, 97). Während der virale Plusstrang die Rep- und NS-assozierten Proteine kodiert, wird das Cap-Protein ausgehend vom Komplementärstrang synthetisiert (16, 21, 22, 93, 94, 98). Die Transkription der viralen DNA verläuft demnach bidirektional und das Genom von PCV1 weist Ambisensecharakter auf (s.o.).

Das Genom von PCV2 umfasst 1768 Nukleotide (34, 50, 104, 106). Neun spezifische RNAs, u.a. das Transkript für Rep und Cap, wurden in infizierten PK15-Zellen detektiert (21, 22).

PCV1 und PCV2 werden in unterschiedliche phylogenetische Cluster eingeordnet (90), die viralen Genome zeigen mit 68-76% aber einen hohen Grad an Homologie (90). Die Ursache der unterschiedlichen Pathogenität beider Viren konnte bislang nicht mit einer molekularen Determinante in Verbindung gebracht werden. Während die funktionelle Charakterisierung der von PCV1 kodierten Proteine in den vergangenen Jahren relativ weit vorangeschritten ist, liegen in dieser Hinsicht für PCV2 weitaus weniger Ergebnisse vor.

1.4.2 Das virale Kapsidprotein

Der zweitgrößte ORF (ORF1) beider PCV-Varianten ist auf dem viralen Minusstrang lokalisiert. Die Detektion des Produkts von ORF1 durch monoklonale Antikörper (98), die gegen aufgereinigte Virionen gerichtet sind, führte zu der Schlussfolgerung, dass dieser ORF für das virale Cap-Protein kodiert. Im Falle von PCV1 beginnt die Transkription mit Nukleotid 1238, wobei die ersten 119 Nukleotide (1238-1120) nicht translatiert werden. Diese Sequenz von 119 Nukleotiden wird durch einen Spleißvorgang, welcher der GT-AG-Regel folgt (127), unmittelbar an den Translationsstartpunkt des Exons 2 von ORF1 (Nukleotid 737) ligiert (98). Der *cap*-Promotor (P_{cap}) wurde innerhalb des *rep*-Gens kartiert und erstreckt sich von Position 1353-1168. Der basische N-Terminus des Cap-Proteins umfasst nukleäre und nukleoläre Lokalisationssignale (22, 86). Während die Lokalisation sowohl in transfizierten Zellen als auch in der Frühphase der Infektion auf die Nukleoli begrenzt ist, wird später im Infektionsverlauf eine Kolo-kalisation des Cap-Proteins mit Rep und Rep' im Nukleoplasma und Zytoplasma der Zielzelle beobachtet (36). Die Kolo-kalisation mit den Replikationsproteinen zu einem späten Zeitpunkt der Infektion lässt vermuten, dass Replikation und Verpackung des viralen Genoms im Nukleus und nicht im Zytoplasma der infizierten Zelle abläuft. Für viele virale Proteine ist eine nukleoläre Lokalisation beschrieben (65), vermutlich einhergehend mit einer Regulation des Zellzyklus. Auch das Cap-Protein von PCV könnte über Interaktion mit zellulären Proteinen in den Nukleoli die Wirtszelle in der S-Phase des Zellzyklus arretieren und die DNA-Synthesephase zum Vorteil des viralen Lebenszyklus modifizieren.

1.4.3 Die viralen Replikationsproteine

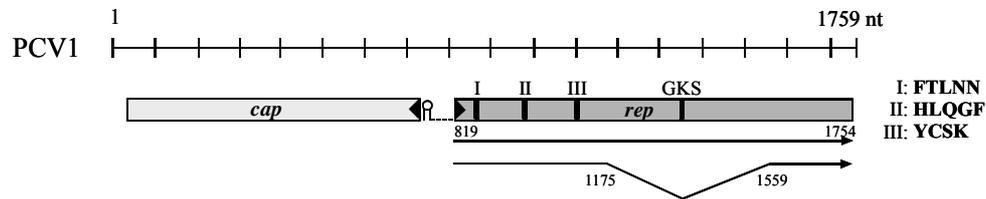


Abb. 1.4. Das *rep*- und *cap*-Gen von PCV1. Größe des *rep*- bzw. *cap*-Gens von PCV1 und Lage innerhalb des viralen Genoms ist gezeigt, Transkripte des *rep*-Gens mit Spleißdonor- und akzeptorstellen sind angegeben. Konservierte Motive innerhalb des *rep*-Gens sind durch schwarze Balken gekennzeichnet und in ihrer Aminosäuresequenz oberhalb und rechtsstehend angeführt.

Der größte ORF ist auf dem viralen Plusstrang lokalisiert und weist eine Homologie zwischen PCV1 und PCV2 von 85% der Nukleotide auf (96). Das *rep*-Gen kodiert das virale Replikationsprotein (95), mit einer Größe von 312 Aminosäuren und einer errechneten molekularen Masse von 35,6 kDa. Die Transkription des *rep*-Gens beginnt mit Nucleotid 767 \pm 10 Basenpaare. Ausgehend von diesem Transkript werden zwei Isoformen der Replikase gebildet: Das Herausspleißen eines 382 Nukleotide umfassenden Introns zwischen den Positionen 1175 und 1559 resultiert in der Synthese eines verkürzten Proteins, Rep'. Durch den Spleißvorgang wird das Replikationsprotein einerseits auf 168 Aminosäuren verkleinert, was einer errechneten molekularen Masse von ca. 19,2 kDa entspricht, andererseits weist der C-Terminus von Rep' gegenüber dem Rep-Protein aufgrund eines Leserahmenwechsels eine veränderte Sequenz der terminalen 48 Aminosäuren auf (94). In Analogie zu PCV1 kodiert das *rep*-Gen von PCV2 ebenfalls für zwei Replikationsproteine. Während die errechnete molekulare Masse des Rep-Proteins mit 35,7 kDa (314 Aminosäuren) bestimmt wurde, ist Rep' aufgrund des Herausspleißens eines 384 Nukleotide umfassenden Introns zum einen um 136 Aminosäuren verkleinert (20,2 kDa), zum anderen weist dessen C-Terminus eine abweichende Sequenz der terminalen 55 Aminosäuren auf.

Das Vorkommen des vollständigen und des gespleißten *rep*'-Transkripts konnte sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen über *Real Time PCR* demonstriert werden (94), wobei das Verhältnis der beiden Transkripte in infizierten PK15-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit variiert. Während 12 h nach Transfektion mit einem infektiösen Klon ähnliche Mengen beider Transkripte detektiert werden, ist 24 und 36 h nach Infektion das *rep*'-Transkript dominant (93).

Das Rep-Protein ist konserviert in allen Circoviren. Durch Sequenzvergleiche wurden vier konservierte Aminosäuremotive identifiziert (I-IV), die Bestandteil von Replikasen sind, die Replikation über den *rolling circle* Mechanismus (RCM) vermitteln (67). Neben den drei konservierten N-terminalen Motiven I (**F**¹⁶**TLNN**²⁰), II (**G**⁵⁰**RTAHLQGF**⁵⁸) und III (**Y**⁹³**CSK**⁹⁶**E**⁹⁷) umfasst der C-Terminus das konservierte Motiv **G**¹⁷¹-X-X-X-X-**G-K-T/S**¹⁷⁸ (Motif IV, GKS-Box), welches den P-loop der Phosphatbindungsstelle einer Reihe von NTP bindenden oder hydrolysierenden Proteinen spezifiziert (164).

Replikationsstudien verdeutlichten die Abhängigkeit der PCV-Replikation von der simultanen Expression beider Replikationsfaktoren, Rep und Rep' (94, 96). Untersuchungen der subzellulären Lokalisation in infizierten und transfizierten PK15-Zellen ergaben eine Kolo-kalisation beider Proteine im Nukleus. Im Gegensatz zum Cap-Protein sind Rep und Rep' nicht in den Nukleoli lokalisiert und die Lokalisation bleibt während des Infektionsverlaufs unverändert (36). Die Akkumulation der Replikationsproteine in definierten subnukleären Kompartimenten, wie sie für andere DNA-Viren beschrieben ist (126), wurde nicht beobachtet. Die Translokation der Replikationsproteine ist unabhängig von anderen viralen Faktoren (36) und wird durch drei Bereiche basischer Aminosäuren (fettgedruckt) innerhalb des N-Terminus des Rep-Proteins vermittelt, die Homologien zu konservierten Kernlokalisationssignalen (nuclear localisation signal, NLS) aufweisen:

K¹²**RWVFTLNNPSEEEKNKIRELP**³³ (NLS1)

K⁶³**KQTFNKVKWYFGARCHIEKAKGTD**⁸⁷ (NLS2) und

P¹⁰⁷**RNQGKRSDL**¹¹⁶ (NLS3).

Als essentiell für den Kernimport wurden NLS2 und der rechte Teil von NLS1 identifiziert, während NLS3 lediglich die Akkumulation von Rep und Rep' innerhalb des Nukleus verstärkt (36).

Während Rep die eigene Transkription reprimiert, weist Rep' diese Fähigkeit nicht auf. Für beide Proteine wurde die Bindung an doppelsträngige Originfragmente von PCV1 bzw. PCV2 *in vitro* nachgewiesen (142). Dabei sind die Proteine *in vitro* sowohl hinsichtlich der Bindung an Originfragmente als auch der Initiation der Replikation in PK15-Zellen zwischen PCV1 und PCV2 austauschbar (96). Basierend auf den Ergebnissen phylogenetischer Studien wird das Rep-Protein von PCV1/PCV2 als ein Resultat der Rekombination zwischen einem nanoviralen Protein und einem RNA-Bindeprotein, kodiert von einem Picorna-artigen Virus (40) oder einer Helikase prokaryotischen Ursprungs (111), betrachtet.

1.4.4 Der virale Replikationsorigin

Neben dem kodierenden Bereich weist das Genom von PCV eine intergenische, nicht kodierende Region auf, die den Replikationsorigin trägt, also die Stelle eines Replikons, an der die Vervielfältigung der genetischen Information initiiert wird.

Im Falle von PCV1 ist der Replikationsorigin auf einem 111 Basenpaare großen Fragment lokalisiert und erstreckt sich von Position 728-838 innerhalb des viralen Genoms (97). Damit

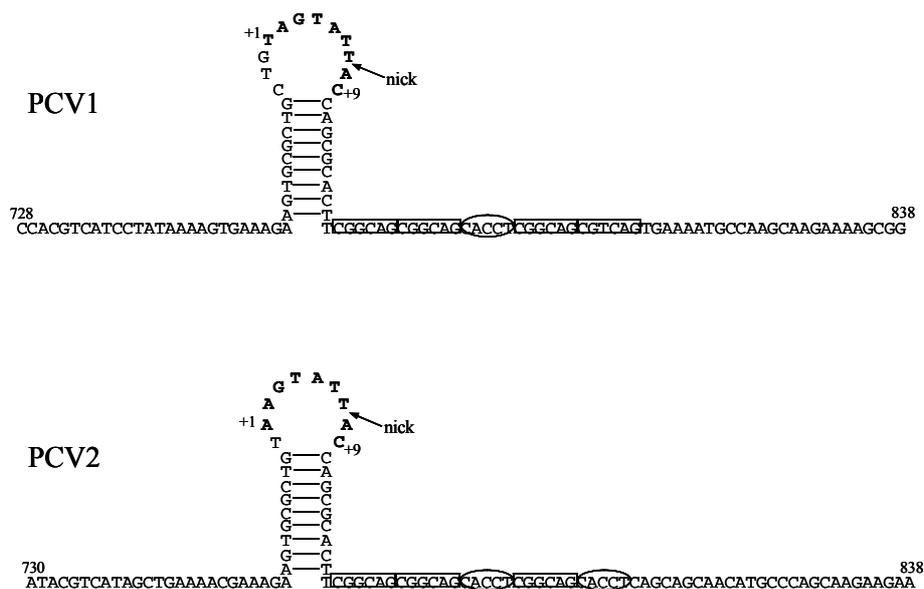


Abb. 1.5. Der Replikationsorigin von PCV. Der Replikationsorigin von PCV1 bzw. PCV2 ist in seiner Nukleotidsequenz und potentiellen Sekundärstruktur gezeigt. Der Bereich inverser Repetition ist als Haarnadelstruktur dargestellt, die Nonamersequenz in deren Bogenbereich in Fettdruck hervorgehoben. Die Hexamersequenzen sind von Rechtecken, die Pentamersequenzen von Ovalen umrahmt. Die Stelle der Restriktion der *Geminiviridae* und *Nanoviridae* ist mit einem Pfeil markiert.

liegt der Replikationsorigin zwischen den kodierenden Sequenzen für Rep und Cap und überlappt teilweise mit P_{rep} . Ein entsprechendes Fragment mit einer Größe von 324 Basenpaaren (Position 1635-195) wurde innerhalb des Genoms von PCV2 identifiziert (91), welches im Vergleich mit PCV1 eine Homologie von 79,5% der Nukleotide aufweist und dessen Funktion als *in cis* aktives Replikationselement kürzlich experimentell bestätigt werden konnte (96). Darüber hinaus wurden sowohl aus PCV1-infizierten Zellen als auch aus Virionen kleine subgenomische Partikel isoliert (151), welche zwar die Fähigkeit zur autonomen Replikation verloren haben, aber noch den Replikationsorigin tragen. Diese 5S DNAs repräsentieren in ihrer Sequenz eine definierte Region des Genoms von PCV1 (Blaess G., persönliche Mitteilung).

Der Replikationsorigin von PCV ist durch eine Reihe von charakteristischen Merkmalen gekennzeichnet: Die Sequenz 5'-AAGTGCCTG-3' weist eine zweizählige Symmetrie über beide DNA-Stränge auf, wodurch die Möglichkeit der Ausbildung einer Haarnadel- bzw. Kreuzstruktur gegeben ist, in deren einzelsträngigen Bogenbereich bei allen Vertretern der *Circoviridae* das hoch konservierte Nonamer 5'-T¹/AAGTATTAC⁹-3' lokalisiert ist (91, 97). Mutation der ersten beiden Nukleotide (T¹A zu C¹T) resultiert in einer Inhibierung der Replikation in PK15-Zellen (97). In weiteren Studien wurde dieses Element des Replikationsorigins von PCV1 und PCV2 hinsichtlich der DNA-Replikation und produktiven Infektion auf sechs essentielle Nukleotide innerhalb eines Oktamers (A¹xTAXTAC⁸) eingegrenzt (17, 19). Angrenzend an den Bereich inverser Repetition sind *downstream* Hexamer- (H, 5'-C¹GGCAG⁶-3') und Pentamersequenzen (P, 5'-C¹ACCT⁵-3') lokalisiert, unterscheiden sich aber in ihrer Anordnung in PCV1 und PCV2: Im Falle von PCV1 sind H1 und H2 direkt benachbart (H1/H2) und durch P1 von H3/H4 getrennt. Dabei enthält H4 einen Nukleotidaustausch von Guanin nach Thymin an Position drei (5'-C¹GTCAG⁶-3'). Im Falle von PCV2 ist H4 durch P2 ersetzt. Die für eine effektive Bindung der Replikationsproteine erforderliche minimale Bindesequenz (MBS, Minimal Binding Site) *in vitro* besteht aus dem rechten Schenkel der potentiellen Haarnadelstruktur und den angrenzenden Hexameren H1/H2. Lediglich im Falle von PCV1-Rep' sind allein die Hexamere H1/H2 ausreichend, um eine effektive Bindung zu gewährleisten (142). Eine alternative Bindung beider Proteine an die Hexamere H3/H4 in Anwesenheit des Bereichs inverser Repetition ist für PCV1-Rep/Rep' beschrieben (142). Sowohl die Bindung von Rep als auch von Rep' an doppelsträngige DNA-Fragmente *in vitro* hat die Ausbildung mehrerer Komplexe zur Folge, die sich in ihrer Retardierung im Polyacrylamidgel unterscheiden, was als unterschiedliche Stadien der Oligomerisierung beider Replikationsproteine interpretiert wird (142). Eine Interaktion mit einzelnen Elementen der potentiellen Haarnadelstruktur oder des gesamten Sekundärstrukturelements ohne Anwesenheit der Hexamere ist ebenso wenig bekannt wie eine Bindung von Rep und Rep' an einzelsträngige DNA-Fragmente.

1.4.5 Replikationsmechanismus von PCV

Als Merkmal von Replikasen, die Replikation über den RCM vermitteln, wurde die Bedeutung der konservierten Motive I-IV hinsichtlich der Replikation von PCV untersucht. Mutagenese eines jeden Motivs führt zur vollständigen Inhibierung der Replikationsaktivität des Rep-Proteins von PCV1 (94). Aus diesen Ergebnissen lässt sich auch für PCV1 eine

Replikation nach dem RCM ableiten, die der anderer prokaryotischer einzelsträngiger DNA-Replikons (45, 74), Transposons (88), Bakteriophagen (3) und einzelsträngiger DNA-Viren von Vögeln (5, 110) und Pflanzen (67, 81) ähnelt. Gemeinsamkeiten dieser Replikons, die über den RCM replizieren, sind bestimmte Signaturen des Replikationsproteins sowie der Zielsequenz, die in vielen Fällen eine bestimmte Sekundärstruktur, zum Beispiel eine Haarnadelstruktur, ausbilden kann (49, 57, 81, 83, 95, 112). Die *rolling circle* Replikation (RCR) erfolgt ausgehend von einem zirkulären Replikationsintermediat und macht sich diese Konformation zunutze, um den Erhalt der genetischen Information zu garantieren. Der genaue Mechanismus soll im Folgenden anhand der Synthese des Plusstrangs von ϕ X174 als Modell für die Leitstrangsynthese erläutert werden:

Nach Infektion und Konversion des viralen Einzelstranggenoms in ein doppelsträngiges Intermediat durch wirtseigene DNA-Polymerase- und Ligase-Funktionen, wird die Replikation durch die Primosom-unterstützte Bindung des viral kodierten GenA-Proteins an spezifische Sequenzen innerhalb des Replikationsorigins initiiert. Das GenA-Protein katalysiert daraufhin die Spaltung der Phosphodiesterbindung vor dem Nukleotid 4306 des Plusstrangs und wird dabei kovalent mit dessen Phosphatgruppe verknüpft. Nach Bindung in räumlicher Nähe zum GenA-Protein an den Minusstrang - mit Unterstützung des Primosoms, welches noch immer mit dem Plusstrang assoziiert ist - beginnt das virale Rep-Protein mit der Entwindung der Doppelhelix ausgehend vom 5'-Ende des Plusstrangs. Der verdrängte Plusstrang wird mit SSB (single-stranded DNA binding)-Proteinen komplexiert, was eine Reassoziaton beider Einzelstränge verhindert. Die Spaltung der Phosphodiesterbindung durch das GenA-Protein resultiert weiterhin in Generierung einer freien 3'-Hydroxygruppe, welche als Primer für die nachfolgende Elongation des Plusstrangs entlang der ringförmigen Minusstrangmatrize durch das zelluläre Pol-III-Holoenzym fungiert. Nach Beenden wenigstens einer vollständigen Syntheserunde führt das GenA-Protein erneut einen Einzelstrangbruch innerhalb des Replikationsorigins ein und bildet eine kovalente Verknüpfung mit dem 5'-Ende des neu synthetisierten Plusstrangs aus. Gleichzeitig wird die aus der zweiten Restriktion resultierende 3'-terminale Hydroxygruppe des alten Plusstrangs in einem nukleophilen Angriff mit dessen 5'-Phosphatende, welches mit dem GenA-Protein verbunden ist, verknüpft. Am Ende des Replikationszyklus steht die Verpackung der neu synthetisierten viralen Genome in Phagenpartikel.

1.5 Replikation verwandter Viren

1.5.1 Gemini- und Nanoviren

Die pflanzenpathogenen Gemini- und Nanoviren sind in ihrer Genomgröße und -struktur den Circoviren verwandt und zeigen darüber hinaus Ähnlichkeiten hinsichtlich der *in cis* und *in trans* aktiven Replikationselemente. Die Charakterisierung der molekularen Biologie dieser Viren ist weit vorangeschritten, was Rückschlüsse bezüglich des Infektions- bzw. Replikationszyklus der Circoviren erlaubt.

<i>Geminiviridae</i>		
Genus	Genom	Vertreter
Mastrevirus	monopartit	u.a. <i>Maize streak virus</i>
Curtovirus	monopartit	u.a. <i>Beet curly top virus</i>
Begomovirus	i. d. R. bipartit	u.a. <i>Bean golden mosaic virus</i>
Topocuvirus	monopartit	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>
<i>Nanoviridae</i>		
Genus	Genom	Vertreter
Nanovirus	i. d. R. multipartit	<i>Faba bean necrotic yellow virus</i> <i>Subterranean clover stunt virus</i> <i>Milk vetch dwarf virus</i> <i>Coconut foliar decay virus</i>
Babuvirus	multipartit	<i>Banana bunchy top virus</i>

Abb. 1.6. Taxonomie der *Geminiviridae* und *Nanoviridae*

Unter den pflanzenpathogenen Viren sind die *Gemini-* (62, 81, 135, 140) und *Nanoviridae* (12, 44, 130) die einzigen Vertreter mit einem einzelsträngigen zirkulär kovalent geschlossen DNA-Genom. Mit Ausnahme des *Coconut foliar decay virus* (CFDV) (130) besitzen Nanoviren ein multipartites Genom bestehend aus sechs bis elf zirkulären einzelsträngigen DNA-Molekülen mit einer Größe von jeweils ca. 1000 Basenpaaren (12, 14, 73, 134), welche in der Regel ein einziges Polypeptid kodieren. Geminiviren, benannt nach ihren Zwillingskapsiden, werden auf der Basis von Genomorganisation, Wirtsspektrum und Übertragungsvektor in die vier Genera *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus* und *Topocuvirus* eingeteilt (33). Sie besitzen ein monopartites oder bipartites DNA-Genom mit

einer Größe von 2500 bis 3000 Basenpaaren, die von quasi-isometrischen Kapsiden (~18-30 nm (47)) umschlossen sind.

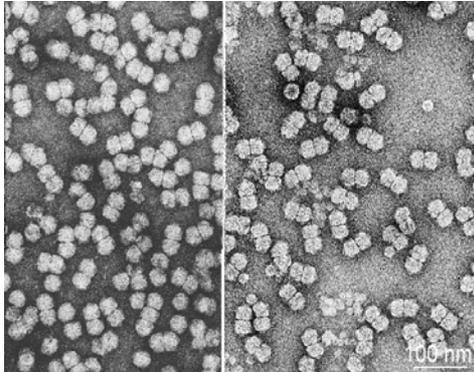


Abb. 1.7. Elektronenmikroskopische Aufnahme von TYLCV-Partikeln (links) und MSV-Partikeln (rechts).

IVTVdB-The Universal Virus Database
Prof. Stewart McNulty, The Queen's University, Belfast

Auch bei den Gemini- und Nanoviren trägt die nicht kodierende, intergenische Region den Replikationsorigin, der für die Initiation der Replikation essentielle und konservierte Sequenzen aufweist und in seiner doppelsträngigen Konformation (s.u.) als *dso* (double strand origin of replication) bezeichnet wird. Ein kurzer Bereich inverser Repetition, welcher eine potentielle Haarnadelstruktur ausbildet, flankiert das in allen Nano- und Geminiviren konservierte Nonamer 5'-T¹/CAA/GTATTAC⁹-3' (44, 46). Motive für die Interaktion mit den Replikationsenzymen sind *upstream* oder *downstream* angrenzend an den Bereich inverser Repetition lokalisiert.

Die virale Replikation vollzieht sich im Nukleus der infizierten Zelle nach dem RCM (s.o.). Das einleitende Ereignis stellt die Konversion der einzelsträngigen DNA in ein intermediäres doppelsträngiges Produkt dar (6, 71, 136).

Die eigentliche Initiation der RCR ist die strang- und sequenzspezifische Restriktion des Replikationsorigins durch die viralen Replikationsfaktoren. Anders als bei den Circoviren ist im Falle der Nanoviren nur ein einziges multifunktionales Replikationsprotein hinsichtlich der viralen Replikation essentiell. Die Erkennungssequenzen für die betreffenden Replikationsproteine unterscheiden sich zwischen den einzelnen Nano- und Geminiviren, der Bruch der Phosphodiesterbindung wird aber in allen Fällen zwischen Nukleotid sieben und acht des Plusstrangs innerhalb des konservierten Nonamers der potentiellen Haarnadelstruktur eingeführt (5'-T¹/CAA/GTATT¹AC⁹-3'). Das Replikationsprotein wird nachfolgend kovalent mit der Phosphatgruppe des Adenylatrests über eine Transesterifizierung verknüpft (63, 83, 149). Am Ende einer Syntheserunde katalysiert ein zweites Rep-Protein einen erneuten Einzelstrangbruch innerhalb des Nonamers des neu gebildeten Replikationsorigins, was in der Generation eines zirkulär kovalent geschlossenen Einzelstrangmoleküls resultiert (83).

Innerhalb des Replikationsorigins wurden angrenzend an den Bereich inverser Repetition eine Reihe iterativer Sequenzen identifiziert, die die spezifische Interaktion des jeweiligen Replikationsproteins mit dem *dso* vermitteln (39, 148). Durch Mutation konnten diese Sequenzwiederholungen innerhalb des Replikationsorigins als *in cis* aktive Elemente hinsichtlich der viralen Replikation charakterisiert werden (37, 38, 81). Zudem wurden der Ausbildung einer Haarnadelstruktur und dem Nonamer für die Replikation essentielle Bedeutung beigemessen (62, 71, 81, 84, 118, 129).

Das Rep-Protein der Geminiviren und Nanoviren weist keine Homologie zu anderen DNA-Polymerasen auf, ist aber mit Proteinen verwandt, die die Initiation der Replikation einzelsträngiger DNA-Plasmide katalysieren (67) und umfasst die konservierten Aminosäuremotive I-IV (42, 75, 76). Neben der Bindung an den *dso* (s.o.) zeigen die Enzyme eine sequenzspezifische Restriktions- und Ligationsaktivität gegenüber einzelsträngigen Oligonukleotiden *in vitro*, eine Voraussetzung für die Initiation und Termination der RCR innerhalb des konservierten Nonamers im Bogenbereich der Haarnadelstruktur (63, 83).

1.5.2 Parvoviren

Unter den humanpathogenen Viren ist die Familie der *Parvoviridae* die einzige mit einem linear einzelsträngigen DNA-Genom. Ihre Replikation wird über den Mechanismus des so genannten *rolling hairpin* vollzogen (8), eine lineare Variante der RCR (41, 75). Expression und Replikation des viralen Genoms sind in hohem Maße von Faktoren der Wirtszelle abhängig: Parvoviren infizieren entweder Zellen, die sich aktiv teilen, da sie ruhende Zellen nicht zur Teilung anzuregen vermögen, oder sie replizieren in der Anwesenheit von Helferviren. Die Rep-Proteine der Parvoviren, das NS1- und NS2-Protein, zeigen Ähnlichkeiten zu den Rep-Proteinen von PCV. Das NS1-Protein ist eine sequenzspezifische Endonuklease und fungiert außerdem als Transaktivator für die Aktivierung sowohl viruseigener als auch zellulärer Promotoren. Das NS2-Protein fungiert möglicherweise als Helikase und ist an der Strangverdrängung während der Genomreplikation beteiligt.

1.6 Zielsetzung

Hinsichtlich des Replikationsmechanismus von PCV bestehen bislang nur Vermutungen: Eine Abhängigkeit der Replikation von Faktoren der Wirtszelle wird postuliert. Durch Generierung des doppelsträngigen Replikationsintermediats - vermutlich durch eine Polymerase der Wirtszelle - wird die Voraussetzung für die Multiplikation des viralen Genoms geschaffen, welche dem Muster des *rolling circle* zu folgen scheint. Zudem ist bekannt, dass die Replikation von PCV in der S-Phase des Zellzyklus erfolgt.

Für ein detailliertes Bild des Replikationszyklus von PCV sollten in der vorliegenden Arbeit die *in cis* und *in trans* aktiven Elemente funktionell charakterisiert werden.

Dafür sollte insbesondere die Fähigkeit von Rep und Rep' zur Initiation und Termination der vermuteten *rolling circle* Replikation (RCR), d.h. zum Bruch der Phosphodiesterbindung und kovalenten Verknüpfung der viralen DNA innerhalb des Replikationsorigins und die Abhängigkeit von Kofaktoren wie ATP und bivalenten Kationen untersucht werden. Im Zusammenhang damit sollte die Fähigkeit des Rep-Proteins von PCV zur Hydrolyse von ATP und damit die Funktion der C-terminal lokalisierten GKS-Box bestimmt werden.

Die vier konservierten Sequenzen von Rep und Rep' sollten in Bezug auf ihre Bedeutung für die Initiation und Termination der Replikation untersucht werden. Dabei sollte das katalytische Zentrum für die Initiation der viralen Replikation durch Erzeugung von *loss of function*-Mutanten definiert werden. Über kovalente Verknüpfung mit der DNA nach der Restriktion einerseits und die Fähigkeit zur Oligomerisierung andererseits sollte das katalytische Zentrum der Rep-Proteine für die Termination definiert und damit die Beschreibung des Replikationsmechanismus erreicht werden.

Weiterhin sollte auf DNA-Ebene die Restriktionsstelle bestimmt und die Abhängigkeit der viralen Replikation von der Rekrutierung der Replikationsproteine über die Interaktion mit der MBS, die für synthetische Oligonukleotide *in vitro* beschrieben worden ist, über einen neu entwickelten Replikationsassay getestet werden. Dem Bereich inverser Repetition und dem Nonamer innerhalb des Replikationsorigins sollte sequenzspezifische und sekundärstrukturspezifische Bedeutung für die Replikation von PCV beigemessen werden.

Anhand der erarbeiteten Daten gelang es, ein Modell für die Replikation von PCV zu entwickeln, dem die RCR zugrunde liegt.