

4. ERGEBNISSE

4.1 Restriktionsaktivität der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV1

Voraussetzung für die *rolling circle* Replikation (RCR) ist die strang- und sequenzspezifische Restriktion innerhalb des Replikationsorigins. Mit Ausnahme von ColE1 (79, 137) wird in allen DNA-Replikons, welche über RCR replizieren, die Initiation durch ein Protein katalysiert, welches selbst auf dem Replikon kodiert ist. Durch Spaltung der Phosphodiesterbindung durch das Replikationsprotein wird über Generierung einer freien 3'-Hydroxygruppe die Voraussetzung für die nachfolgende DNA-Polymerisation entlang des intakten Matrizenstrangs geschaffen. Eine Ligationsaktivität der Replikationsproteine wird benötigt, um nach der Neusynthese die Verknüpfung zum nativen, zirkulär geschlossenen Genom zu garantieren. Beide Enzymaktivitäten sind eng mit konservierten Sequenzen innerhalb der *in trans* aktiven Replikationsproteine und des *in cis* aktiven Replikationsorigins verknüpft.

Das *rep*-Gen von PCV kodiert für die Replikationsproteine Rep und Rep', welche für die virale Replikation unabdingbar sind. Während der sequenzidentische N-Terminus beider Proteine drei konservierte Aminosäuremotive umfasst, typisch für Enzyme, welche Replikation über die RCR vermitteln, spezifiziert allein Rep eine C-terminal lokalisierte GKS-Box.

Der Replikationsorigin von PCV1 ist innerhalb der intergenischen Region des viralen Genoms lokalisiert (Position 728 bis 838) und durch unterschiedliche Sequenzmotive charakterisiert (Abb. 1.5). Ein Bereich inverser Repetition (5'-AAGTGCCTG-3') wird am 3'-Ende von vier Hexameren (H1-H4) der Sequenz 5'-CGGCAG-3' flankiert, lediglich Hexamer H4 enthält einen Austausch an Position 3 von Guanin zu Thymin (5'-CGTCAG-3'). Die Hexamere H1/H2 und H3/H4 sind durch ein Pentamer der Sequenz 5'-CACCT-3' getrennt. Aufgrund der Primärstruktur wird die Ausbildung einer Haarnadel mit dem konservierten Nonamer 5'-TAGTATTAC-3' in deren Bogenbereich postuliert.

Zur Untersuchung einer Restriktions- und Ligationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins *in vitro* wurden Rep und Rep' als His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und nachfolgend aufgereinigt.

4.1.1 Expression der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' als His-Fusionsproteine

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren sowie die Bezeichnung und Anwendungsbereiche der kodierten Fusionsproteine sind den Anhängen A.1 und A.2 zu entnehmen.

Die Expression der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' erfolgte ausgehend von dem bakteriellen und eukaryotischen Expressionsvektor pTriEx1.1-6HN, welcher die Expression rekombinanter Proteine mit N-terminalem Histidin-Epitop unter Kontrolle des T7-*lac*-Promotors gestattet.

Nach IPTG-induzierter heterologer Expression in *E. coli* wurden die His-Fusionsproteine über Ni-NTA-Agarose aus der löslichen Fraktion angereichert und in TE-Puffer umgepuffert. Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Expression wurden die Proteinpräparationen nachfolgend in der SDS-PAGE aufgetrennt und die apparente molekulare Masse der His-Fusionsproteine unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards bestimmt.

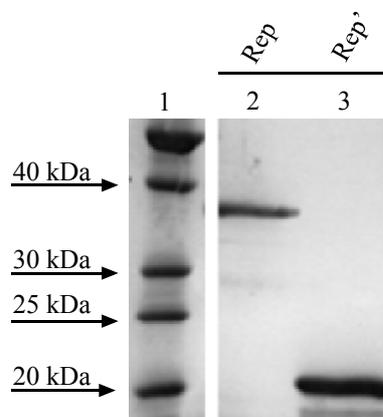


Abb. 4.1. Aufgereinigte His-Fusionsproteine Rep und Rep' von PCV1. PCV1-Fusionsproteine His-Rep (Spur 2) und His-Rep' (Spur 3) wurden in *E. coli* zur Expression gebracht und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aus der löslichen Bakterienfraktion angereichert. Die in TE umgepufferten Proteine wurden über SDS-PAGE fraktioniert und durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse erfolgte durch Vergleich mit dem BenchMark™ Größenstandard (Spur 1) über die angegebenen molekularen Massen.

Beide Proteine konnten nahezu bis zur Homogenität präpariert werden, die apparente molekulare Masse entsprach dabei der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten molekularen Masse von 36 kDa für His-Rep und 20 kDa für His-Rep' (Abb. 4.1, Spuren 2 und 3).

4.1.2 PCV1-Rep und -Rep' weisen eine spezifische Restriktionsaktivität gegenüber dem viralen Plusstrang auf

Um die Restriktionsaktivität der Replikationsproteine von PCV1 gegenüber dem viralen Replikationsorigin zu untersuchen, wurden die aufgereinigten His-Fusionsproteine Rep und Rep' *in vitro* mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden unter geeigneten Pufferbedingungen inkubiert. Die Oligonukleotide entsprachen dabei Fragmenten des Replikationsorigins von PCV1 und trugen eine Cy5-Markierung an den 5'-Enden (Anhang A.6).

Die Restriktionsaktivität der Replikationsproteine gegenüber Oligonukleotid F301, welches den Bereich inverser Repetition (in Abb. 4.2 angegeben als 10-12-10) und die angrenzenden Hexamere des viralen Plusstrangs umfasst (in Abb. 4.2 angegeben als 6-6-5-6-6), wurde sowohl für His-Rep als auch für His-Rep' durch die Ausbildung eines kleineren, im Gel weniger stark retardierten Produkts demonstriert (Abb. 4.2A, Spuren 3 und 4). Durch fehlende Restriktionsaktivität der Negativkontrolle gegenüber F301 (Abb. 4.2A, Spur 2) konnte die enzymatische Hydrolyse als Rep- bzw. Rep'-spezifische Aktivität nachgewiesen werden. Die Größenbestimmung des 5'-Schnittprodukts erfolgte durch Vergleich mit einem Oligonukleotid von 20 Nukleotiden Länge (F632, Abb. 4.2A, Spur 5). Gleiche Retardierung beider Moleküle lässt auf einen Bruch der Phosphodiesterbindung innerhalb der viralen DNA im Bogenbereich der potentiellen Haarnadelstruktur zwischen Nukleotid sieben und acht schließen.

Eine Restriktionsaktivität von Rep und Rep' gegenüber dem Cy5-markierten komplementären Minusstrang-Oligonukleotid B265 sowie dem Hybrid aus F301 und B265 wurde unter den angeführten Reaktionsbedingungen nicht beobachtet (Abb. 4.2B und C). In letzterem Fall wurden die Reaktionsansätze nach Inkubation mit Rep und Rep' zusätzlich einem Proteaseverdau unterzogen und nachfolgend über ein denaturierendes Harnstoffgel aufgetrennt (Abb. 4.2C). Dadurch sollte eine mögliche Retardierung des Schnittprodukts aufgrund einer Bindung der Replikase an den unter nativen Elektrophoresebedingungen eventuell nicht vollständig aufgelösten Doppelstrang ausgeschlossen werden.

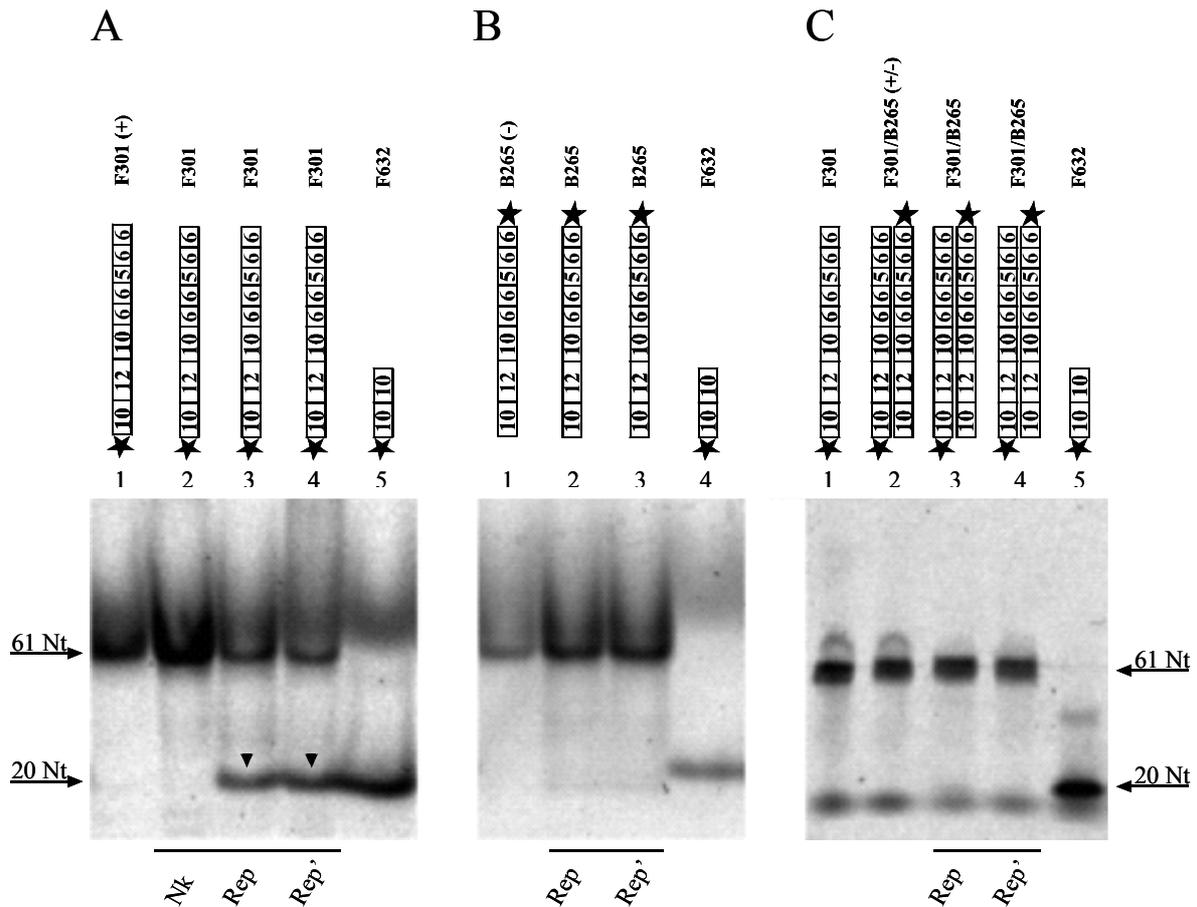


Abb. 4.2. PCV1-Rep und -Rep' schneiden Originfragmente von PCV1 innerhalb des konservierten Nonamers. Aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep oder His-Rep' (500 ng) wurde in Gegenwart von 0,5 pmol Oligonucleotid im Restriktionsassay *in vitro* inkubiert. Die Oligonucleotide repräsentierten die charakteristischen Sequenzmotive des viralen Plus- bzw. Minusstrangs von PCV1 mit Cy5-Markierung an den 5'-Enden und sind über den entsprechenden Gelspuren schematisch dargestellt. Restriktionsaktivität der Replikationsproteine gegenüber einzelsträngigen (A, Spuren 3 und 4; B, Spuren 2 und 3) und doppelsträngigen (C, Spuren 3 und 4) Substraten wurde untersucht. Als Negativkontrolle wurde präpariertes lösliches Bakterienlysat einer Transformation mit pTriEx-6HN verwendet (A, Spur 2). Reaktionsprodukte aus A und B wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT, Reaktionsprodukte aus C nach Proteinase K-Verdau unter denaturierenden Bedingungen bei 65°C fraktioniert und mit Oligonucleotidmarkern definierter Größe verglichen (A, Spuren 1, 2 und 5; B, Spuren 1 und 4; C, Spuren 1, 2 und 5). Positionen und Größen der Oligonucleotide sind vermerkt, Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

4.1.3 Einfluss von ATP auf die Restriktionsaktivität der Fusionsproteine His-Rep und His-Rep'

Im Gegensatz zu Rep' trägt das Rep-Protein eine C-terminal lokalisierte GKS-Box, welche die Fähigkeit des Enzyms zur Bindung und Hydrolyse von ATP impliziert (97). Die Bedeutung dieses Motivs hinsichtlich der viralen Replikation konnte in vorangegangenen

Studien demonstriert werden (94), was die generelle Funktionalität der GKS-Box und die Abhängigkeit der Replikation von ATP vermuten lässt.

Der Einfluss von ATP auf die Restriktionsaktivität der PCV1-Replikationsproteine *in vitro* sollte genauer definiert werden, wobei an dieser Stelle darauf hingewiesen werden muss, dass der unter 4.1.2 beschriebene Restriktionsassay nicht mit ATP supplementiert wurde.

Zu diesem Zweck wurden die Rep und Rep' His-Fusionsproteine mit dem Oligonukleotid F301 in Anwesenheit und Abwesenheit von ATP im Reaktionsansatz inkubiert.

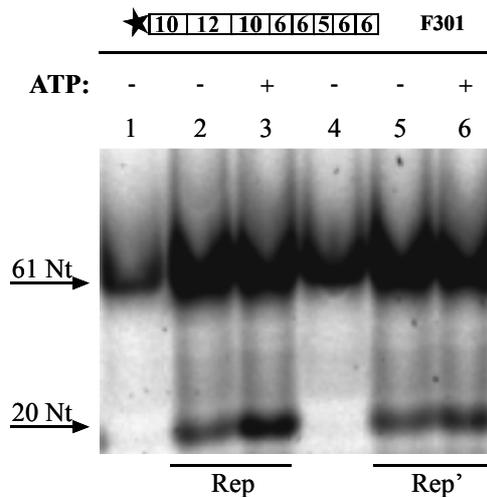


Abb. 4.3. Einfluss von ATP auf die Restriktionsaktivität von PCV1-Rep. Die Restriktionsaktivität des aufgereinigten PCV1-Fusionsproteins His-Rep (Spuren 2 und 3) oder His-Rep' (Spuren 5 und 6) gegenüber PCV1-Originfragmenten *in vitro* wurde im Restriktionsassay in Anwesenheit (Spuren 3 und 6) und Abwesenheit (Spuren 2 und 5) von ATP untersucht. Die Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT fraktioniert und verglichen mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe (Spuren 1 und 4). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Lediglich im Falle von Rep war in Gegenwart von ATP eine erhöhte Signalstärke des 5'-Schnittprodukts zu detektieren (Abb. 4.3, Spuren 3 und 6), was auf eine gesteigerte Umsetzung des Substrats aufgrund erhöhter Enzymaktivität zurückgeführt wurde. Die Anwesenheit von ATP ist demzufolge nicht essentiell für die Restriktion des Substrats, die Zugabe steigert aber die enzymatische Aktivität des Rep-Proteins. Eine Restriktionsaktivität von Rep und Rep' gegenüber dem Cy5-markierten komplementären Minusstrang-Oligonukleotid B265 sowie dem Hybrid F301/B265 wurde auch in Gegenwart von ATP nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Einfluss von bivalenten Kationen auf die Restriktionsaktivität der His-Fusionsproteine Rep und Rep'

In Analogie zu Metalloenzymen wurde im Falle der Replikasen der Gemini- und Nanoviren eine Abhängigkeit der Restriktion des viralen Replikationsorigins von der Anwesenheit bivalenter Kationen gezeigt. Es wird angenommen, dass die Koordination der beteiligten Ionen über konservierte Histidinreste innerhalb des Motivs II erfolgt (49, 76, 83).

Um die Abhängigkeit der Restriktionsaktivität der PCV1-Replikationsproteine von bivalenten Kationen zu untersuchen, wurden die aufgereinigten His-Fusionsproteine Rep und Rep' mit Oligonukleotid F301 in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} inkubiert.

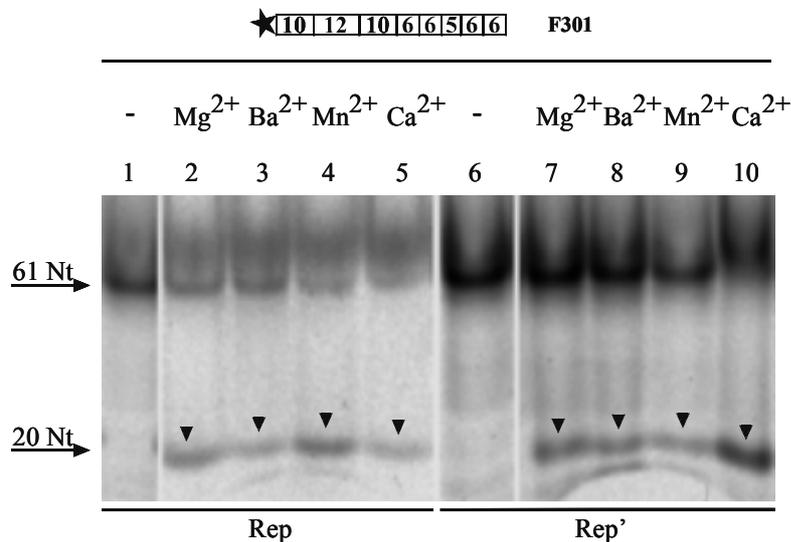


Abb. 4.4. Die Restriktionsaktivität von PCV1-Rep und -Rep' ist abhängig von bivalenten Kationen. Aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep (Spuren 1-5) oder His-Rep' (Spuren 6-10) wurde im Restriktionsassay *in vitro* ohne (Spuren 1 und 6) und mit (Spuren 2-5 und 7-10) Zusatz unterschiedlicher bivalenter Kationen in Gegenwart von Cy5-markiertem Oligonukleotid F301 inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT fraktioniert. Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Die Abwesenheit von Mg^{2+} im Reaktionsansatz resultierte in vollständiger Inhibition der Restriktionsaktivität sowohl des Rep- als auch des Rep'-Fusionsproteins (Abb. 4.4, Spuren 1 und 6). Das Ergebnis demonstriert die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität beider Proteine von Mg^{2+} . Weiterhin zeigte sich eine Rekonstitution der Enzymaktivität durch Zugabe bivalenter Kationen (Abb. 4.4, Spuren 2 und 7), wobei Mg^{2+} durch Ba^{2+} , Mn^{2+} oder Ca^{2+} substituiert werden konnte (Abb. 4.4, Spuren 3-5 und 8-10). Der Einsatz von anderen

Kationen als Mg^{2+} hatte keinen Einfluss auf die Restriktionsaktivität von Rep und Rep' gegenüber dem Cy5-markierten komplementären Minusstrang-Oligonukleotid B265 sowie dem Hybrid F301/B265 (Daten nicht gezeigt).

4.2 Einfluss der Sekundärstruktur und der Sequenz des Replikationsorigins von PCV1 auf die Restriktion durch die viralen Replikationsproteine Rep und Rep'

Um die Sequenzspezifität der Restriktion des viralen Replikationsorigins und den diesbezüglichen Einfluss einer potentiellen Haarnadelstruktur zu untersuchen, wurden PCV1-Rep und -Rep' *in vitro* als aufgereinigte His-Fusionsproteine (Kap. 4.1.1) mit mutierten und/oder verkürzten Cy5-markierten Oligonukleotiden (Anhang A.6) inkubiert.

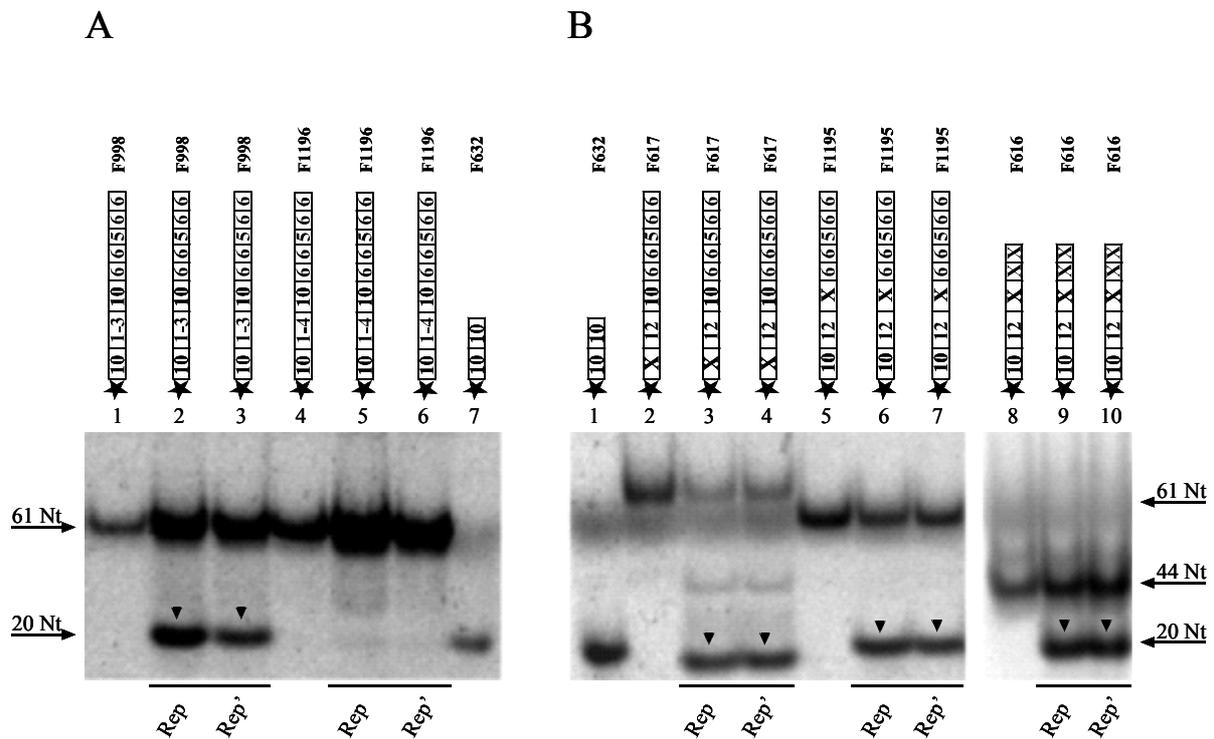


Abb. 4.5. Sequenzanforderung der PCV1-Rep und -Rep' vermittelten Restriktion. Aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep (A, Spuren 2 und 5; B, Spuren 3, 6 und 9) oder His-Rep' (A, Spuren 3 und 6; B, Spuren 4, 7 und 10) wurde mit Cy5-markierten Oligonukleotiden inkubiert, welche mutierten bzw. verkürzten Fragmenten des PCV1-Replikationsorigins in Plusstrangorientierung entsprachen. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT fraktioniert. Als Größenstandard dienten Oligonukleotide definierter Länge (A, Spuren 1, 4 und 7; B, Spuren 1, 2, 5 und 8). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Schnittprodukte sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert.

4.2.1 Einfluss der Nonamersequenz auf die Restriktion des Replikationsorigins

Durch Mutation des konservierten Nonamers sollte dessen Einfluss bezüglich der Restriktion des viralen Replikationsorigins durch Rep und Rep' definiert werden.

Während die Mutation der ersten drei Nukleotide von 5'-TAGTATTAC-3' nach 5'-CTCTATTAC-3' in F998 keinerlei Einfluss auf die Restriktion dieses Substrats durch die Replikationsproteine hatte (Abb. 4.5A, Spuren 2 und 3), resultierte eine Sequenzvariation der ersten vier Nukleotide (F1017, 5'-CTAGATTAC-3') in einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität von His-Rep und His-Rep' (Abb. 4.5A, Spuren 5 und 6). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass lediglich ein Teil des kanonischen Nonamers in seiner Sequenzspezifität für die Restriktion von PCV1-Originfragmenten *in vitro* benötigt wird.

4.2.2 Einfluss der potentiellen Haarnadelstruktur auf die Restriktion des Replikationsorigins

Im Folgenden wurde der Einfluss möglicher Sekundärstrukturen auf die Restriktion des viralen Replikationsorigins durch Rep und Rep' untersucht. Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide eingesetzt, welche aufgrund von Mutationen innerhalb des Bereichs inverser Repetition nicht zur Basenpaarung und damit zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur befähigt waren.

Eine Modifikation der Nukleotidsequenz allein *upstream* (F617) oder *downstream* (F1195) des Nonamers hatte keinen Einfluss auf die Restriktion der eingesetzten Substrate (Abb. 4.5B, Spuren 2-7). Die Ausbildung einer Haarnadelstruktur ist demzufolge keine notwendige Bedingung für die Restriktion *in vitro*.

Während bei Inkubation von F1195 mit Rep oder Rep' das Edukt und das 5'-Schnittprodukt annähernd die gleiche Intensität zeigten (Abb. 4.5B, Spuren 6 und 7), lag das Reaktionsgleichgewicht im Falle von F617 nahezu vollständig auf Seiten der Produktbildung (Abb. 4.5B, Spuren 3 und 4). Das unveränderte Originfragment F301 scheint nach Restriktion ebenfalls religiert zu werden (Abb. 4.2A, Spuren 3 und 4). Vermutlich inhibieren Mutationen *upstream* (F617) die Religation wesentlich stärker als Mutationen *downstream* (F1195) des Nonamers (142).

4.2.3 Einfluss der MBS-Sequenzen auf die Restriktion des Replikationsorigins

Die in einer früheren Studie für die *in vitro* Bindung von Rep und Rep' an ein Fragment des doppelsträngigen Replikationsorigins (*dso*) identifizierte minimale Bindesequenz (MBS, Minimal Binding Site) umfasst den rechten Schenkel der potentiellen Haarnadelstruktur und die angrenzenden Hexamere H1 und H2 (142).

Die Mutagenese dieser Nukleotidsequenzen hatte keinen Einfluss auf die Restriktionsaktivität von Rep und Rep', denn nach Inkubation der His-Fusionsproteine mit F616 (Anhang A.6) wurde weiterhin das 5'-Schnittprodukt detektiert (Ab. 4.5B, Spuren 9 und 10). Anders als für die Bindung an den *dso* scheint demzufolge die Restriktion des viralen Plusstrangs nicht von diesen Sequenzen abhängig zu sein. Basierend auf diesem Ergebnis kann auf unterschiedliche Sequenzanforderungen hinsichtlich der Erkennung doppelsträngiger und einzelsträngiger Oligonukleotide *in vitro* geschlossen werden: Die MBS ist für die Bindung von Rep und Rep' an doppelsträngige DNA essentiell, im Gegensatz dazu wird die Restriktion einzelsträngiger DNA-Moleküle vermutlich einzig über die letzten sechs Nukleotide des Nonamers vermittelt.

Zusammenfassung

- ▶ PCV1-Rep und -Rep' besitzen eine strang- und sequenzspezifische Restriktionsaktivität gegenüber einem Fragment des viralen Replikationsorigins *in vitro*.
- ▶ Der Bruch der Phosphodiesterbindung erfolgt im Bogenbereich der potentiellen Haarnadelstruktur zwischen Nukleotid sieben und acht.
- ▶ Die Rep/Rep'-immanente Restriktionsaktivität ist abhängig von der Anwesenheit bivalenter Kationen aber unabhängig von ATP.
 - ▶ Es besteht keine Restriktion hinsichtlich des obligaten zweiwertigen Kations.
 - ▶ Durch ATP-Zugabe ist eine gesteigerte Produktbildung im Falle des Rep-Proteins zu beobachten.
- ▶ Der Bereich der inversen Repetition und die angrenzenden Hexamere H1/H2 haben in ihrer Sequenz keinen Einfluss hinsichtlich der Restriktion.
- ▶ Die für die Restriktion essentielle Sequenzanforderung umfasst sechs Nukleotide am 3'-Ende des Nonamers.

4.3 Ligationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV1

Um die Ligationsaktivität der Replikationsproteine von PCV1 gegenüber dem viralen Replikationsorigin zu untersuchen, wurden Rep und Rep' *in vitro* als aufgereinigte His-Fusionsproteine (Kap. 4.1.1) mit einer äquimolaren Mischung Cy5-markierter und unmarkierter Oligonukleotide unter geeigneten Pufferbedingungen inkubiert. Die Oligonukleotide entsprachen dabei einem Fragment des Replikationsorigins von PCV1 in Plusstrangorientierung (Anhang A.6). Der Nachweis einer Rep/Rep'-immanenten Ligationsaktivität wurde durch Inkubation mit zwei Oligonukleotiden unterschiedlicher Größe untersucht, von denen lediglich eines fluoreszenzmarkiert war.

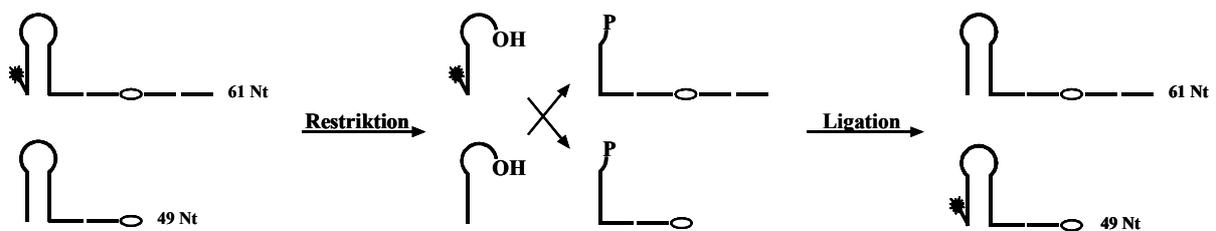


Abb. 4.6. Schematische Übersicht der über PCV1-Rep oder -Rep' vermittelten Ligationsreaktion.

Nach Restriktion der verwendeten Substrate wird Ligationsaktivität der Replikationsproteine anhand einer Verknüpfung des 5'-Schnittprodukts des markierten Oligonukleotids mit dem 3'-Schnittprodukt des unmarkierten Oligonukleotids beobachtet, dabei wird die Fluoreszenzmarkierung von einem Substrat auf das andere übertragen (Abb. 4.6).

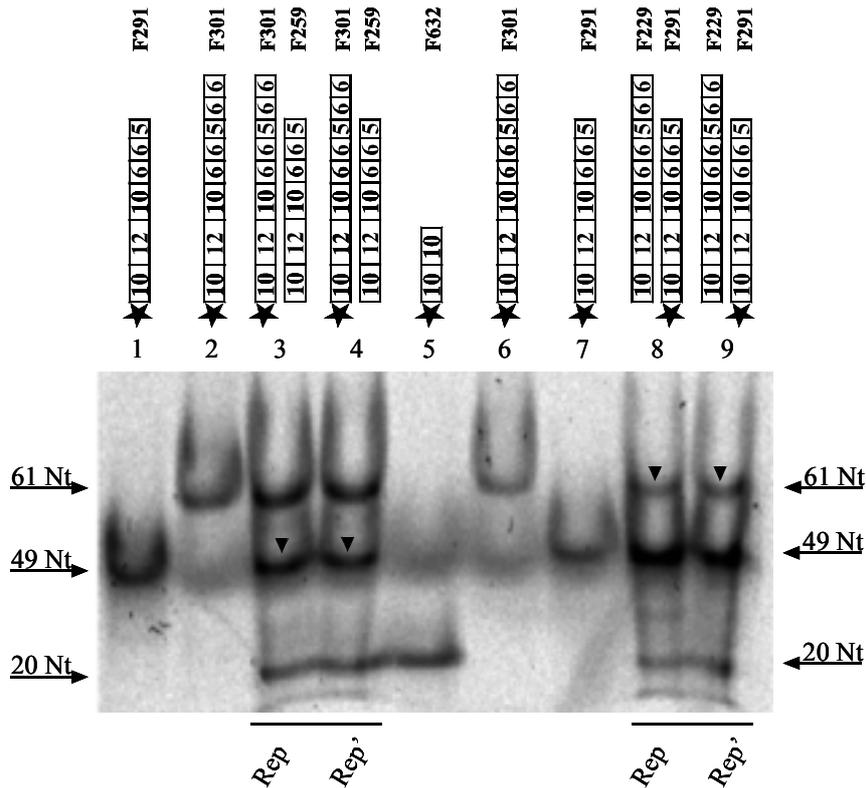


Abb. 4.7. PCV1-Rep und -Rep' besitzen Ligationsaktivität gegenüber PCV1-Originfragmenten. Eine äquimolare Mischung zweier Oligonukleotide, von denen lediglich eines Cy5-markiert war und die sich in der Anzahl der Hexamersequenzen unterschieden, wurde mit PCV1-Fusionsprotein His-Rep (Spuren 3 und 8) oder His-Rep' (Spuren 4 und 9) im Restriktions-/Ligationsassay inkubiert. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei 65°C fraktioniert, Oligonukleotide definierter Länge dienten als Größenstandard. (Spuren 1, 2, 5, 6 und 7). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind angegeben, die Ligationsprodukte mit schwarzen Pfeilspitzen markiert.

Während das Cy5-markierte 61mer F301 den Bereich inverser Repetition mit den angrenzenden Hexameren H1/H2 und H3/H4 umfasst, fehlen dem unmarkierten 49mer F259 die Hexamere H3 und H4. Nach Ligation der Schnittprodukte wurde ein weiteres Cy5-markiertes Oligonukleotid detektiert, welches in seiner Größe dem 49mer F291 entsprach (Abb. 4.7, Spuren 3 und 4). Umgekehrt ließ sich die Ligationsaktivität von His-Rep und His-Rep' durch den Transfer der Cy5-Markierung des 49mers auf das unmarkierte 61mer nachweisen (Abb. 4.7, Spuren 8 und 9). Neben dem jeweiligen Religationsprodukt wurde das nicht ligierte 5'-Schnittprodukt detektiert (Abb. 4.7, Spuren 3 und 4, 8 und 9). Diese Ergebnisse dokumentieren sowohl für Rep als auch für Rep' eine spezifische Nukleotidyltransferaseaktivität, welche in der Verknüpfung geeigneter Originfragmente *in vitro* resultiert. Die Katalyse verlief dabei unabhängig von der Anwesenheit bzw. Hydrolyse von ATP.

4.4 Einfluss von Sekundärstruktur und Sequenz des PCV1-Replikationsorigins auf die Ligation durch die viralen Replikationsproteine

Nachfolgend wurde die Abhängigkeit der Ligationsaktivität von Rep und Rep' von der Sequenzspezifität des Replikationsorigins sowie der Ausbildung einer Haarnadelstruktur untersucht. Zu diesem Zweck wurden Rep und Rep' *in vitro* als aufgereinigte His-Fusionsproteine (Kap. 4.1.1) mit einer äquimolaren Mischung Cy5-markierter und unmarkierter Oligonukleotide inkubiert. Die Oligonukleotide entsprachen dabei Fragmenten des Replikationsorigins von PCV1 in Plusstrangorientierung. Sie waren in ihrer Sequenz unverändert oder aber umfassten Modifikationen im Bereich der inversen Repetition (Anhang A.6).

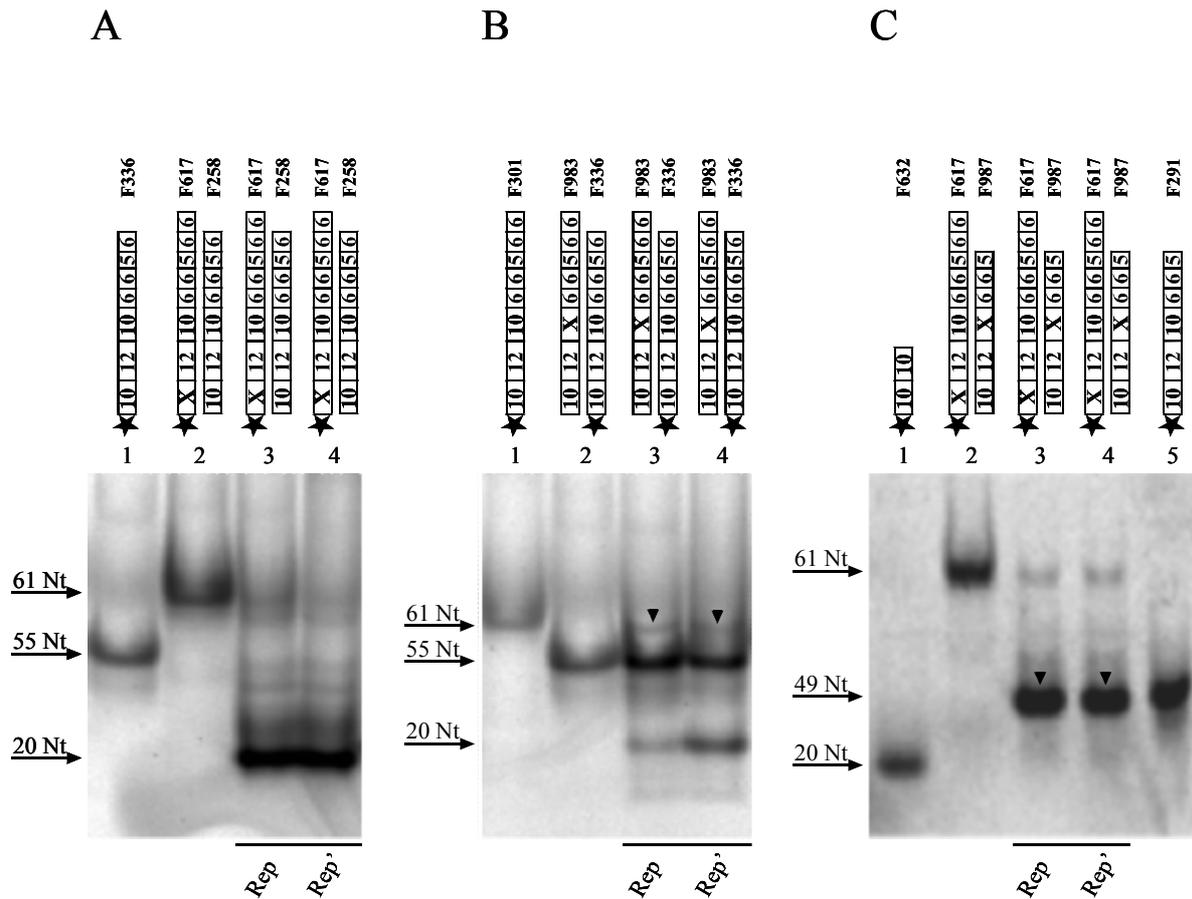


Abb. 4.8. Sequenzanforderung der durch PCV1-Rep und -Rep' vermittelten Ligation. Aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep (A, B und C, Spur 3) oder His-Rep' (A, B und C, Spur 4) wurde mit einer äquimolaren Mischung Cy5-markierter und unmarkierter Oligonukleotide inkubiert, die den verkürzten oder mutagenisierten Replikationsorigin von PCV1 in Plusstrangorientierung repräsentierten. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei 65°C fraktioniert und verglichen mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe (A und B, Spuren 1 und 2; C, Spuren 1, 2 und 5). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, rekombinante Ligationsprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Modifikation der Nukleotidsequenz *upstream* (F617) oder *downstream* (F983) des Nonamers hatte entweder einen vollständigen Verlust oder eine gravierende Einschränkung der Ligation der verwendeten Oligonukleotide durch His-Rep und His-Rep' zur Folge, sodass fast ausschließlich das 5'-Schnittprodukt detektiert wurde (Abb. 4.8A und B, Spuren 3 und 4). Die inhibierte Ligation der mutagenisierten Substrate demonstriert, dass Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition für die Reaktion eine wichtige Rolle spielt.

Zusätzlich zur Abhängigkeit vom Sekundärstrukturelement der Haarnadel wurde die Sequenzspezifität des Bereichs der inversen Repetition hinsichtlich der Ligation durch Rep und Rep' bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die His-Fusionsproteine mit den Substraten

F617 und F987 inkubiert. Innerhalb des unmarkierten 49mers F987 ist die Sequenz *downstream* des Nonamers in der Form verändert, dass sie zu der veränderten Nukleotidsequenz *upstream* des Nonamers in F617 komplementär ist, d.h. die Oligonukleotide F617 und F987 gestatten Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition. Darüber hinaus wäre in dem resultierenden Ligationsprodukt die Ausbildung einer potentiellen Haarnadelstruktur mit einer veränderten Sequenz ermöglicht. In Gegenwart von His-Rep und His-Rep' konnte Ligationsaktivität beider Replikationsproteine gegenüber den verwendeten Substraten durch Ausbildung des fluoreszenzmarkierten 49mers demonstriert werden (Abb. 4.8C, Spuren 3 und 4). Um zu demonstrieren, dass es sich in Abb. 7C tatsächlich um das Ligationsprodukt der Reaktion und nicht um das 5'-Schnittprodukt handelt, wurde zum Vergleich durch einen Oligonukleotidmarker (20 Nt) die Größe des 5'-Schnittprodukts kenntlich gemacht (Abb. 4.8C, Spur 1).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition erforderlich ist, um geschnittene Substrate *in vitro* durch PCV1-Rep und -Rep' zu ligieren, die Reaktion aber unabhängig von einer Sequenzspezifität in diesem Bereich verläuft. Ein 5'-Schnittprodukt nach Inkubation von Rep und Rep' mit F617 und F987 wurde nicht detektiert.

4.5 Die Ligation des PCV1-Replikationsorigins durch die Replikationsproteine ist abhängig von vorangegangener Restriktion

Eine Abhängigkeit der Ligation des Replikationsorigins von PCV1 durch die Replikationsproteine von vorangegangener Restriktion der verwendeten Substrate wurde durch Inkubation der His-Fusionsproteine Rep und Rep' (Kap. 4.1.1) mit Substraten *in vitro* demonstriert, welche in ihrer Sequenz und molekularen Charakteristik den Produkten der Restriktion des Oligonukleotids F301 entsprachen (Abb. 4.2A, Spuren 3 und 4; Anhang A.6). Das Cy5-markierte Oligonukleotid F632 entsprach dabei dem 5'-Schnittprodukt und F923 dem 5'-phosphorylierten 3'-Schnittprodukt der Restriktion des Oligonukleotids F301.

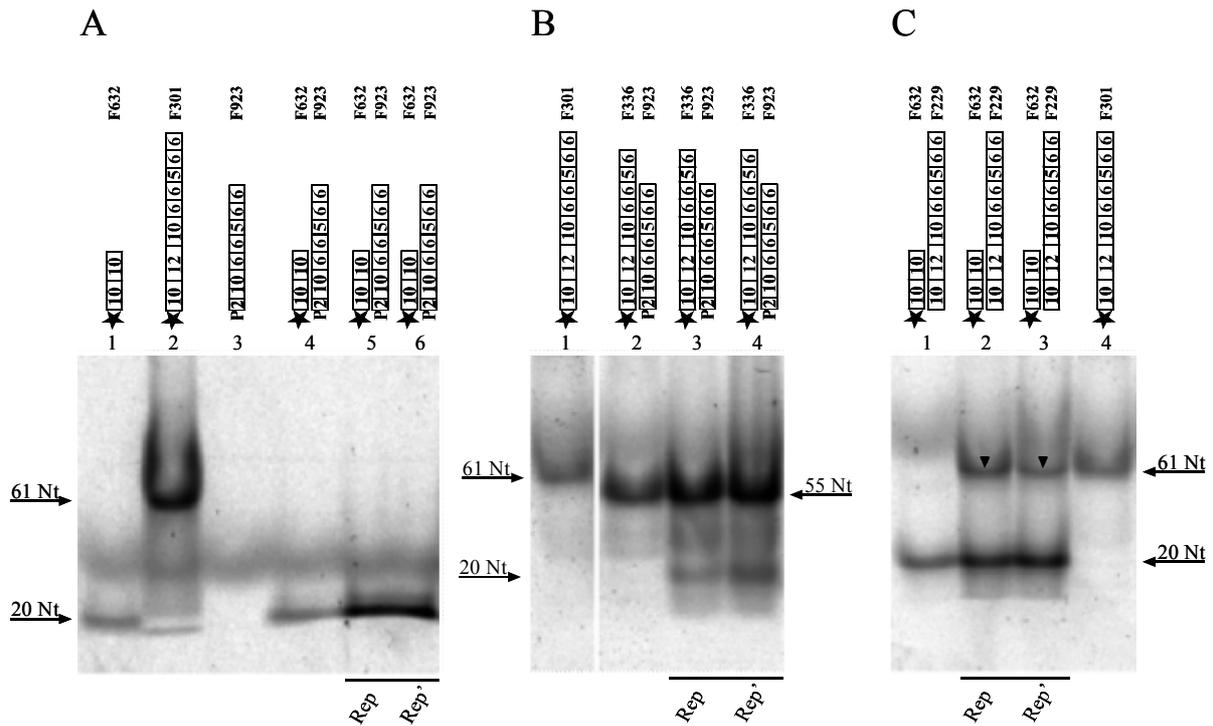


Abb. 4.9. Die durch PCV1-Rep und -Rep' vermittelte Ligation ist abhängig von vorangegangener Restriktion. Äquimolare Mischungen unterschiedlicher Oligonukleotide wurden mit PCV1-Fusionsprotein His-Rep (A, Spur 5; B, Spur 3; C, Spur 2) oder His-Rep' (A, Spur 6; B, Spur 4; C, Spur 3) im Restriktions-/Ligationsassay inkubiert: (A) Cy5-markiertes 5'-Schnittprodukt und phosphoryliertes 3'-Schnittprodukt der Restriktion des 61mers F301. (B) Phosphoryliertes 3'-Schnittprodukt der Restriktion des 61mers F301 und Cy5-markiertes 61mer F301. (C) Cy5-markiertes 5'-Schnittprodukt der Restriktion des 61mers F301 und unmarkiertes 61mer F229. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei 65°C fraktioniert und mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe verglichen (A, Spuren 1, 2 und 4; B, Spuren 1 und 2; C, Spuren 1 und 4). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Ligationsprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Nach Inkubation von F632 und F923 mit His-Rep bzw. His-Rep' wurde kein Ligationsprodukt der erwarteten Größe von 49 Nukleotiden nachgewiesen (Abb. 4.9A, Spuren 5 und 6). Da die synthetisch hergestellten Schnittprodukte nicht von Rep und Rep' ligiert wurden, ist anzunehmen, dass Restriktion des Substrats unmittelbare Voraussetzung für die nachfolgende Ligation ist.

Mit dem Einsatz des unmarkierten 61mers F229 und F632 wurde sowohl Restriktion als auch Ligation der verwendeten Substrate beobachtet. Neben dem 5'-Schnittprodukt wurde ein Produkt detektiert, welches in seiner Größe dem 61mer F301 entsprach (Abb. 4.9C, Spuren 2 und 3). Nach Inkubation mit dem Cy5-markierten 55mer F336, welches aus dem Bereich der inversen Repetition und den angrenzenden Hexameren H1, H2 und H3 zusammengesetzt ist, und F923 wurde lediglich das 5'-Schnittprodukt aber kein Ligationsprodukt detektiert (Abb. 4.9B, Spuren 3 und 4). Auf der Basis dieser Ergebnisse wird neben der Demonstration der

Abhängigkeit der Ligation von vorangegangener Restriktion eine Verknüpfung von Rep und Rep' nach Restriktion mit dem 5'-Phosphat des 3'-Schnittprodukts postuliert.

4.6 Nachweis der kovalenten Verknüpfung der PCV1-Replikationsproteine mit dem 5'-Ende des 3'-Schnittprodukts

Die Unabhängigkeit der *in vitro* Restriktions-/Ligationsreaktion von ATP wurde bereits gezeigt (Kap. 4.1.3 und 4.3). Eine Erklärung könnte die mögliche kovalente Verknüpfung der Replikase mit der DNA nach Restriktion liefern. Durch eine kovalente Verknüpfung bliebe die Bindungsenergie der Phosphodiesterbindung erhalten und könnte für die Katalyse der nachfolgenden Ligationsreaktion bereitgestellt werden. Die Ligationsreaktion verlief demzufolge unabhängig von ATP. Darüber hinaus würde durch Maskierung des 5'-Phosphats eine vorzeitige Religation inhibiert.

Die kovalente Verknüpfung der PCV1-Replikationsproteine mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs wurde durch Einsatz von Oligonukleotiden untersucht, welche im Bereich der inversen Repetition *upstream* des Nonamers mutagenisiert waren und eine Biotingruppe am 3'-Ende trugen (Anhang A.6). Die Variation der Nukleotidsequenz wurde eingeführt, um die Religation des geschnittenen Substrats zu unterdrücken. Die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf Seiten der 5'- und 3'-Schnittprodukte sollte die nachfolgende Detektion des Protein-DNA-Komplexes erleichtern.

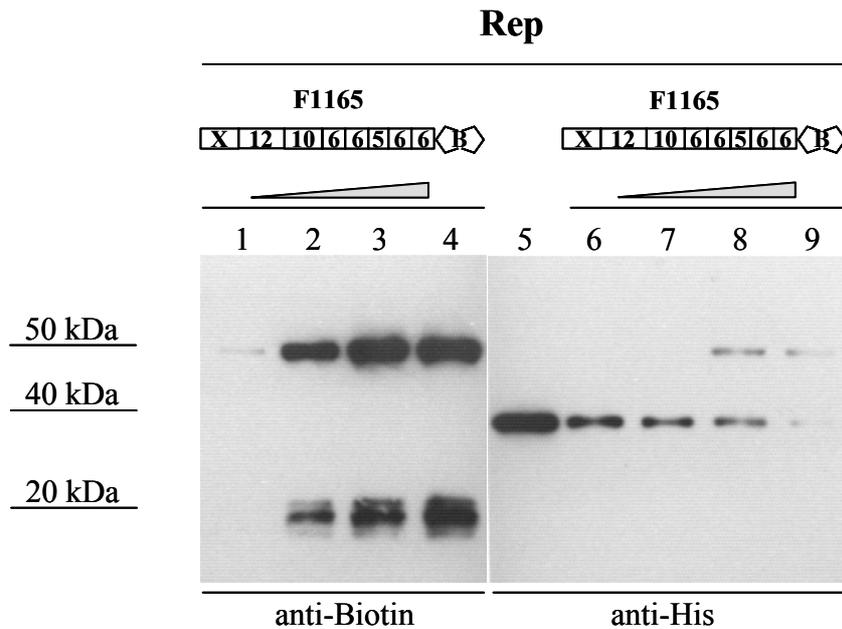


Abb. 4.10. PCV1-Rep ist nach Restriktion kovalent mit dem 5'-Phosphat des 3'-Schnittprodukts verknüpft. 1 µg aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep wurde allein (Spur 5) oder über einen vierstufigen Konzentrationsbereich mit Biotin-markiertem Oligonukleotid F1165 (0,5 pmol, Spuren 1 und 6; 10 pmol, Spuren 2 und 7; 50 pmol, Spuren 3 und 8; 100 pmol, Spuren 4 und 9) im Restriktionsassay inkubiert. Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE fraktioniert und nach Transfer auf PVDF-Membran mit anti-Biotin Antikörper (1:5000, Spuren 1-4) bzw. anti-His-Epitop Antikörper (1:2500, Spuren 5-9) detektiert. Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse erfolgte durch Vergleich mit einem Größenstandard über die angegebenen molekularen Massen.

Nach Inkubation von His-Rep (Kap. 4.1.1) mit dem 55mer F1165 über einen vierstufigen Konzentrationsbereich von 0,5 pmol-100 pmol wurde die kovalente Verknüpfung des Replikationsproteins mit dem 5'-Ende des 3'-Schnittprodukts beobachtet. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung der Reaktionsprodukte über SDS-PAGE im Western Blot. Die Visualisierung mit dem anti-Biotin Antikörper zeigte eine Retardierung des Oligonukleotids im Vergleich zu freiem Substrat, welche auf die kovalente Verknüpfung des Rep-Proteins zurückzuführen ist (Abb. 4.10, Spuren 1-4). Mit Hilfe eines Größenstandards konnte der Grad der Retardierung mit der berechneten molekularen Masse des Protein-DNA-Komplexes (46 kDa) korreliert werden. Mit dem anti-His-Epitop Antikörper wurde ein Komplex gleicher Größenordnung (46 kDa) detektiert (Abb. 4.10, Spuren 6-9), was auf die Masse des 3'-Schnittprodukts (10 kDa) nach kovalenter Verknüpfung mit His-Rep im Vergleich zu freiem Fusionsprotein (Abb. 4.10, Spur 5) zurückzuführen ist. Unabhängig vom verwendeten Antikörper geht eine zunehmende Substratkonzentration mit einer gesteigerten Bildung des Protein-DNA-Komplexes einher, welche im Falle des anti-Biotin Antikörpers ein Plateau bei 50 pmol erreicht. Während in Gegenwart von 0,5 bzw. 10 pmol F1165 die Replikationsproteine im Überschuss vorliegen, wird mit 50 bzw. 100 pmol das molare

Verhältnis auf Seiten des Oligonukleotids verschoben. Da einerseits ein Überangebot an Substrat vorhanden ist, andererseits die Rückreaktion, d.h. die Religation der Schnittprodukte, inhibiert ist, kann nachfolgend nahezu die gesamte Menge eingesetzten Enzyms als Protein-DNA-Komplex detektiert werden. Im Falle des anti-His-Epitop Antikörpers kann zudem eine gesteigerte Komplexbildung mit abnehmender Proteinkonzentration korreliert werden.

Wie hier für His-Rep von PCV1 gezeigt, wurde auch für His-Rep' die kovalente Verknüpfung mit dem 5'-Phosphat des 3'-Schnittprodukts demonstriert (Daten nicht gezeigt).

4.7 Die PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' sind als His-Fusionsproteine in PK15-Zellen funktionell

Um die Funktionalität der rekombinanten Fusionsproteine His-Rep und His-Rep' in PK15-Zellen zu demonstrieren, wurde ein Replikationsassay durchgeführt (96). Die Expression der His-Fusionsproteine ausgehend von dem Expressionsvektor pTriEx-6HN wird dabei über den eukaryotischen *chicken actin*-Promotor gewährleistet.

Plasmidale Replikationsaktivität in eukaryotischen Zellen ist abhängig von der Anwesenheit geeigneter *in cis* und *in trans* aktiver Kontrollelemente. Beide Elemente waren auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert. Plasmid pRL16 trug den *in cis* aktiven Replikationsorigin und das Reportergen *luciferase (luc)* unter Kontrolle des späten SV40-Promotors, während ausgehend von pTriEx-6HN-rep die *in trans* aktiven Replikationsproteine His-Rep und His-Rep' synthetisiert wurden. Die Untersuchung der Replikationsaktivität der rekombinanten Fusionsproteine basiert auf der quantitativen Erfassung der Luziferaseaktivität ausgehend von pRL16. Eine Rep/Rep'-vermittelte Replikation des Reportergenplasmids resultiert in erhöhter Kopienzahl des Reportergens, was letztendlich als erhöhte Luziferaseaktivität detektiert werden kann.

4.7.1 Konstruktion der Luziferase Reportergenplasmide

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Reportergenplasmide einschließlich der Sequenzvariationen des viralen Replikationsorigins sind den Anhängen A.3 und A.7 zu entnehmen.

Die Klonierung von pRL16 erfolgte über Amplifizierung des Replikationsorigins aus dem Plasmid pOP16 mit den Primern F436neu und B437, nachfolgendem Schneiden mit KpnI und XbaI und anschließender Ligation in den mit KpnI und NheI linearisierten Vektor pGL3-p. Die Konstruktion von pOP16 erfolgte über Amplifikation des Replikationsorigins aus dem Plasmid pSK140 (95) mit dem Primerpaar F356m/B358, nachfolgendem Schneiden mit BglII, EcoRI und BamHI und Insertion in den mit EcoRI und BamHI linearisierten Vektor pUC19. Die Konstrukte pRL16 und pOP16 wurden nachfolgend in der Sequenzierung auf den Einbau falscher Nukleotide untersucht.

4.7.2 His-Rep und His-Rep' vermitteln die Replikation von pRL16 in PK15-Zellen

Zur Bestimmung der Replikationsaktivität der PCV1-Proteine His-Rep/His-Rep' (pTriEx-6HN-rep) gegenüber dem viralen Replikationsorigin (pRL16) wurde in Kotransfektionsexperimenten die Reporterexpression in PK15-Zellen bestimmt und mit derjenigen Reporterexpression ausgehend von dem gleichen Replikon in Abwesenheit der Replikationsproteine (pTriEx-6HN) verglichen. Ein Anstieg der Luziferaseaktivität ist auf eine Steigerung der Kopienzahl des Reporterplasmids zurückzuführen, die sich in einer erhöhten Luziferaseaktivität widerspiegelt. Die Luziferaseexpression in Abwesenheit von Replikation wurde durch Kotransfektion von Plasmid pGL3-p mit pTriEx-6HN-rep bestimmt. pGL3-p kodiert die Luziferase unter Kontrolle des späten SV40-Promotors, trägt jedoch nicht den aktiven Replikationsorigin von PCV1.

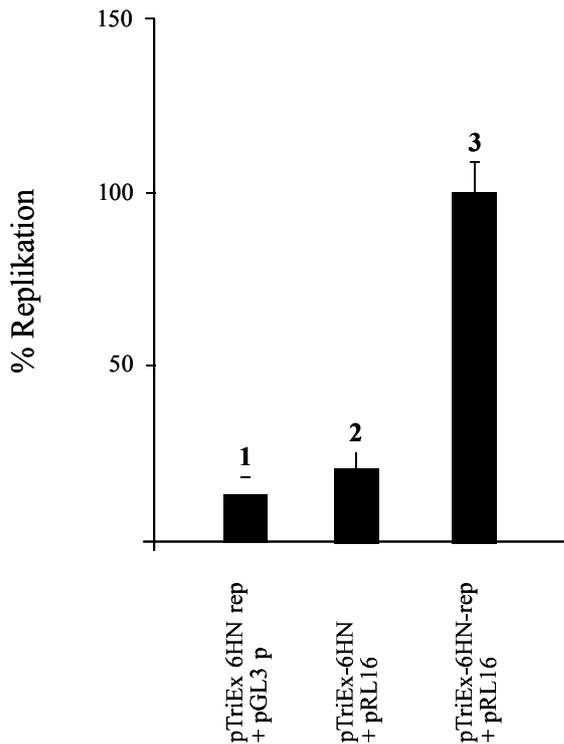


Abb. 4.11. Die PCV1-Fusionsproteine His-Rep und His-Rep' vermitteln die Replikation in PK15-Zellen. Die Fähigkeit der PCV1-Fusionsproteine His-Rep und His-Rep' (pTriEx-6HN-rep) *in trans* die Replikation von Plasmiden zu initiieren, welche den PCV1-Replikationsorigin tragen (pRL16), wurde in einem Luziferase basierten Replikationsassay untersucht (Balken 3) und mit der Replikationsrate des Replikons in Abwesenheit der Replikationsproteine (pTriEx-6HN) verglichen (Balken 2). Plasmid pGL3-p trägt das Reportergen ohne den viralen Replikationsorigin und repräsentiert die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine in Abwesenheit des *in cis* aktiven Elements (Balken 1).

Die Replikationsaktivität von His-Rep und His-Rep' (pTriEx-6HN-rep) gegenüber pRL16 wird durch einen mehr als vierfachen Anstieg der Reportergenexpression bezogen auf die Replikationsrate bei Abwesenheit der Replikationsproteine verdeutlicht (Abb. 4.11, Spuren 2 und 3). Die Funktionalität der rekombinanten Replikationsproteine konnte somit auch im Zellkultursystem demonstriert werden, d.h. die Replikationsaktivität von Rep und Rep' wird durch die N-terminale Polyhistidinsequenz nicht inhibiert.

Zusammenfassung

- ▶ PCV1-Rep und -Rep' besitzen eine strang- und sequenzspezifische Ligationsaktivität gegenüber einem Fragment des viralen Replikationsorigins *in vitro*.
- ▶ Die Rep/Rep'-immanente Ligationsaktivität ist unabhängig von der Anwesenheit bzw. Hydrolyse von ATP.
- ▶ Die Ligation durch Rep und Rep' ist abhängig von der Sequenzspezifität des Bereichs inverser Repetition.
- ▶ Die Rep/Rep'-immanente Ligationsaktivität ist an die vorangegangene Restriktion der verwendeten Substrate gekoppelt.
- ▶ Rep und Rep' sind nach Restriktion kovalent mit dem 5'-Phosphat des 3'-Schnittprodukts verknüpft.
- ▶ Die Fusionsproteine His-Rep und His-Rep' vermitteln die Replikation in PK15-Zellen, die Fusion mit dem His-Epitop inhibiert ihre Funktionalität nicht.

4.8 Restriktionsaktivität der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV2

PCV1 und PCV2 unterscheiden sich in ihrer Pathogenität. Die Ursache ist unbekannt und Experimente zu ihrer Aufklärung schlossen auch mögliche Differenzen hinsichtlich des Replikationsmechanismus mit ein. Demzufolge wurden auch die Replikationsproteine von PCV2 in Bezug auf die Initiation und Termination der viralen Replikation untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Austauschbarkeit der Replikationsproteine zwischen PCV1 und PCV2.

Der Replikationsursprung von PCV2 ist ebenfalls innerhalb der intergenischen Region des viralen Genoms lokalisiert (Position 730 bis 838) und durch die bekannten Sequenzmotive charakterisiert (Abb. 1.5). Ein Bereich inverser Repetition wird am 3'-Ende von Hexamer- und Pentamer-motiven flankiert, deren Anordnung aber von derjenigen innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 abweicht: Auf zwei Hexamere der Sequenz 5'-CGGCAG-3' (H1-H2) und ein Pentamer der Sequenz 5'-CACCT-3' (P1) folgen Hexamer H3 und Pentamer P2, Hexamer H4 fehlt.

In Analogie zu PCV1 erfolgte der Nachweis einer Restriktions- und Ligationsaktivität der PCV2-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des Replikationsorigins von PCV2 *in vitro* mit Hilfe bakteriell exprimierter und nachfolgend aufgereinigter His-Fusionsproteine.

4.8.1 Expression der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' als His-Fusionsproteine

Nach IPTG-induzierter Expression der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' in *E. coli* ausgehend von dem Expressionsvektor pTriEx.1.1-6HN wurde die apparente molekulare Masse der aufgereinigten His-Fusionsproteine nachfolgend in der SDS-PAGE bestimmt.

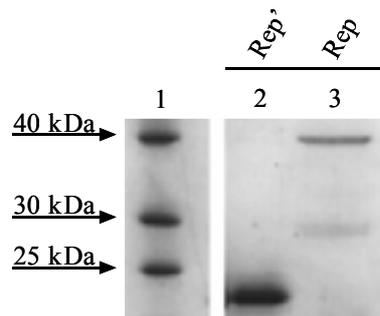


Abb. 4.12. Aufgereinigte Fusionsproteine His-Rep und His-Rep' von PCV2. PCV2-Fusionsproteine His-Rep (Spur 3) und His-Rep' (Spur 2) wurden in *E. coli* zur Expression gebracht und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aus der löslichen Bakterienfraktion angereichert. Die in TE umgepufferten Proteine wurden nachfolgend über SDS-PAGE fraktioniert und durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse erfolgte durch Vergleich mit den molekularen Massen des angegebenen Größenstandards (Spur 1).

Beide Proteine konnten nahezu bis zur Homogenität präpariert werden, die apparente molekulare Masse entsprach dabei der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten molekularen Masse von 36 kDa für His-Rep und 20 kDa für His-Rep' (Abb. 4.12, Spuren 2 und 3).

4.8.2 PCV2-Rep und -Rep' besitzen eine spezifische Restriktionsaktivität gegenüber dem viralen Plusstrang

Die Restriktionsaktivität der PCV2-Replikationsproteine gegenüber dem viralen Replikationsorigin wurde durch Inkubation von His-Rep und His-Rep' mit Cy5-markierten Oligonukleotiden (Anhang A.6) untersucht.

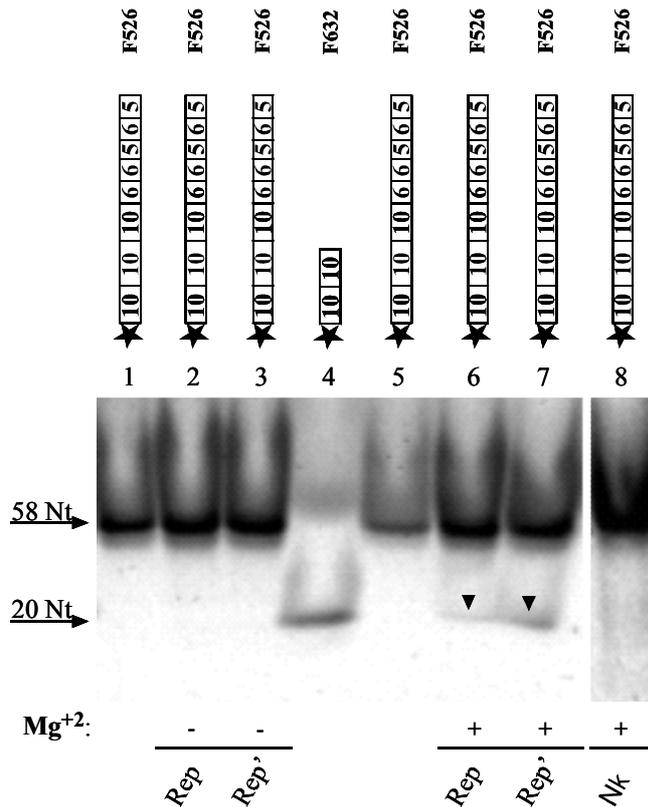


Abb. 4.13. PCV2-Rep und -Rep' besitzen eine strangspezifische Restriktionsaktivität gegenüber dem PCV2-Replikationsorigin. Cy5-markierte Oligonukleotide (0,5 pmol), welche die charakteristischen Sequenzen des PCV2-Replikationsorigins in Plusstrangorientierung umfassen, wurden mit 500 ng PCV2-Fusionsprotein His-Rep (Spuren 2 und 6) oder His-Rep' (Spuren 3 und 7) im Restriktionsassay *in vitro* inkubiert. Sofern nicht anders vermerkt, wurde die Reaktion mit Mg^{2+} supplementiert. Als Negativkontrolle wurde präpariertes lösliches Bakterienlysat einer Transformation mit pTriEx-6HN verwendet (Spur 8). Nach Fraktionierung über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT wurden die Reaktionsprodukte mit Oligonukleotidmarkern definierter Länge verglichen (Spuren 1, 4 und 5). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, die Schnittprodukte sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert.

Die Restriktionsaktivität der Replikationsproteine gegenüber dem Oligonukleotid F526, welches den Bereich inverser Repetition und die angrenzenden Hexamere und Pentamere des viralen Plusstrangs umfasst (in Abb. 4.13 angegeben als 10-10-10-6-6-5-6-5), wurde in Gegenwart von His-Rep und His-Rep' durch die Ausbildung eines kleineren, im Gel deshalb weniger stark retardierten Produkts verdeutlicht (Abb. 4.13, Spuren 6 und 7). Die Größenbestimmung des 5'-Schnittprodukts erfolgte durch Vergleich mit dem Oligonukleotidmarker F632 (Abb. 4.13, Spur 4), und ließ auf einen Bruch der Phosphodiesterbindung innerhalb des Bogenbereichs der potentiellen Haarnadelstruktur zwischen Nukleotid sieben und acht schließen. Da die Expression der His-Fusionsproteine ausgehend von dem gleichen Expressionsvektor und unter gleichen Expressionsbedingungen durchgeführt wurde, ist die Negativkontrolle (Abb. 4.13, Spur 8)

die gleiche wie die schon für His-Rep und His-Rep' von PCV1 gezeigte (vgl. Abb. 4.2A, Spur 2). Enzymaktivität von Rep und Rep' gegenüber Cy5-markierten komplementären Minusstrang-Oligonukleotiden sowie den doppelsträngigen Substraten wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Wie im Falle von PCV1 war die Restriktionsaktivität der PCV2-Replikationsproteine abhängig von der Anwesenheit bivalenter Kationen, wie durch Aktivitätsverlust in Abwesenheit von Mg^{2+} demonstriert wurde (Abb. 4.13, Spuren 2 und 3).

4.9 Ligationsaktivität der PCV2-Replikationsproteine gegenüber Fragmenten des viralen Replikationsorigins von PCV2

Wie schon für PCV1 wurde die Ligationsaktivität der PCV2-Replikationsproteine gegenüber dem viralen Replikationsorigin durch Inkubation der aufgereinigten His-Fusionsproteine Rep und Rep' (Kap. 4.8.1) mit einer äquimolaren Mischung fluoreszenzmarkierter und unmarkierter Oligonukleotide *in vitro* untersucht. Die Oligonukleotide entsprachen dabei einem Fragment des Replikationsorigins von PCV2 in Plusstrangorientierung (Anhang A.6). Inkubation des Cy5-markierten 58mers F526 und des unmarkierten 47mers F527 mit His-Rep oder His-Rep' resultierte in der Ausbildung eines Produkts, das in seinem Laufverhalten dem 47mer F1018 entsprach (Abb. 4.14, Spuren 3 und 4). Dieses Ergebnis demonstriert eine Nukleotidyltransferaseaktivität der PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep', die für die Verknüpfung geeigneter Originfragmente *in vitro* verantwortlich ist. Die Aktivität der PCV2-Replikationsproteine war in Übereinstimmung mit den Replikationsproteinen von PCV1 unabhängig von der Bindung bzw. Hydrolyse von ATP. Neben dem jeweiligen Religationsprodukt wurde das nicht ligierte 5'-Schnittprodukt detektiert (Abb. 4.14, Spuren 3 und 4).

gegenüber dem heterologen Replikationsorigin als notwendige Bedingung für die postulierte RCR *in vitro* bestätigt werden.

4.10.1 Die His-Fusionsproteine Rep/Rep' von PCV1 und PCV2 besitzen eine Restriktionsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin *in vitro*

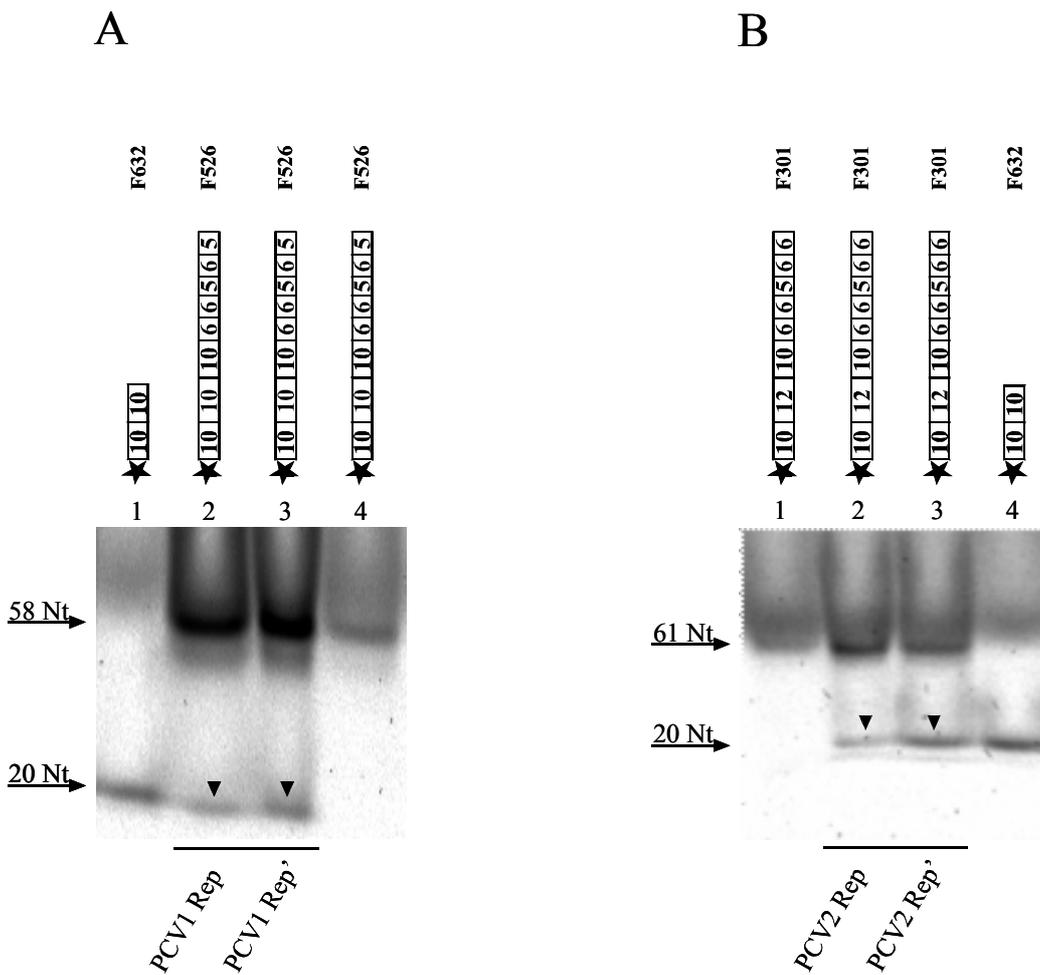


Abb. 4.15. Die PCV1- und PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' besitzen Restriktionsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin. Cy5-markierte Oligonukleotide, welche die konservierten Sequenzen des PCV2-Replikationsorigins repräsentierten, wurden mit PCV1-Fusionsprotein His-Rep (A, Spur 3) oder His-Rep' (A, Spur 4) inkubiert. Umgekehrt wurde das PCV2-Fusionsprotein His-Rep (B, Spur 2) oder His-Rep' (B, Spur 3) mit PCV1-Originfragmenten inkubiert. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT fraktioniert und verglichen mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe (A, Spuren 1 und 2; B, Spuren 1 und 4). Positionen sowie Größen der Oligonukleotide sind vermerkt und Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Die Restriktion von Oligonukleotiden, welche den Bereich inverser Repetition und die angrenzenden Hexamere und Pentamere des heterologen viralen Plusstrangs umfassen (F301 bzw. F526), durch His-Rep und His-Rep' (Kap. 4.1.1 und 4.8.1) hatte die Ausbildung eines kleineren, im Gel weniger stark retardierten Produkts zur Folge (Abb. 4.15A, Spuren 3 und 4; B, Spuren 2 und 3). Die Größenbestimmung des 5'-Schnittprodukts erfolgte durch Vergleich mit dem Oligonukleotidmarker F632 (Abb. 4.15A, Spur 1; B, Spur 4), der eine Größe von 20 Nukleotiden besitzt. Die gleiche Laufhöhe beider Moleküle lässt auf einen Bruch der Phosphodiesterbindung im Bogenbereich der potentiellen Haarnadelstruktur zwischen Nukleotid sieben und acht schließen.

4.10.2 Die His-Fusionsproteine Rep/Rep' von PCV1 und PCV2 besitzen eine Ligationsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin *in vitro*

Die Ligationsaktivität der Replikationsproteine wurde durch Einsatz einer äquimolaren Mischung fluoreszenzmarkierter und unmarkierter Oligonukleotide unterschiedlicher Größe untersucht, die den jeweilig heterologen viralen Replikationsorigin repräsentieren (F301 und F259 bzw. F526 und F527). Nach Inkubation mit His-Rep und His-Rep' (Kap. 4.1.1 und 4.8.1) kam es zur Ausbildung eines Produkts, welches in seiner Größe dem jeweils eingesetzten unmarkierten Substrat entsprach (Abb. 4.16A, Spuren 3 und 4; B, Spuren 2 und 3), d.h. die Fluoreszenzmarkierung wurde auf das unmarkierte Oligonukleotid übertragen.

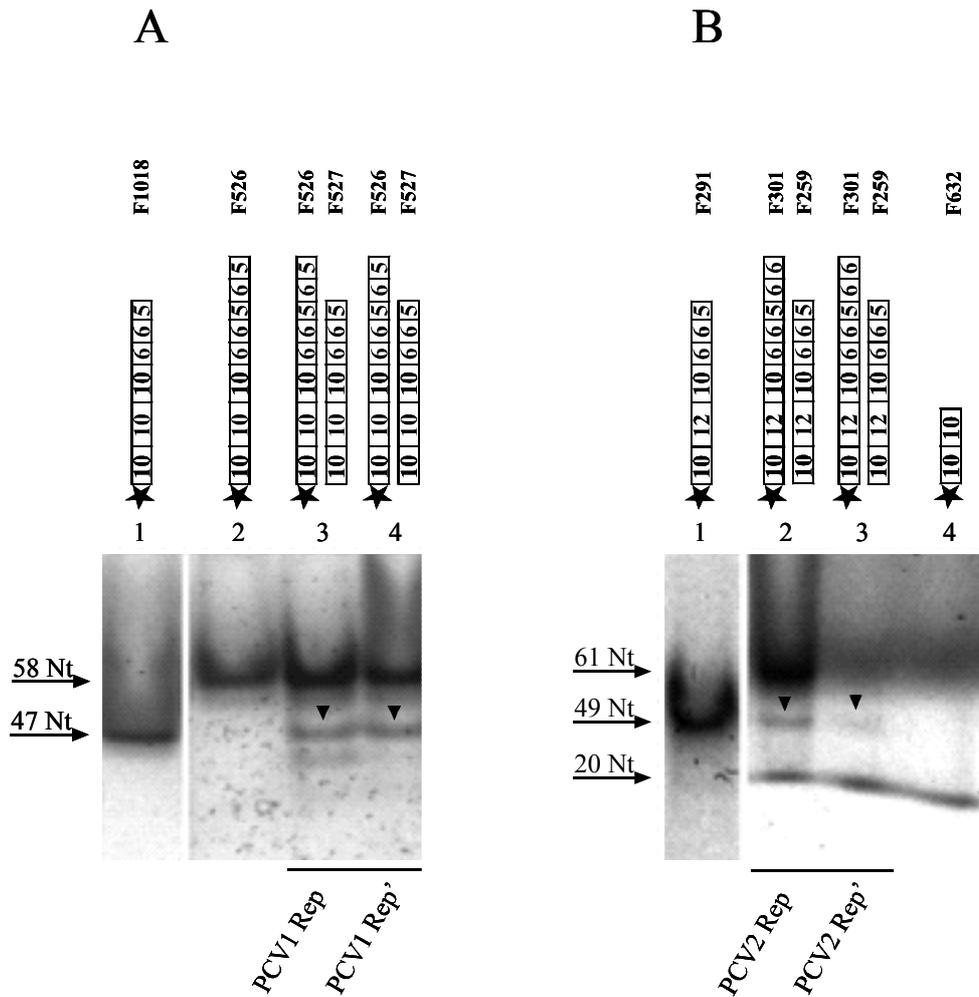


Abb. 4.16. PCV1- und PCV2-Replikationsproteine Rep und Rep' besitzen Ligationsaktivität gegenüber dem heterologen Replikationsorigin. Eine äquimolare Mischung zweier PCV2-Originfragmente wurde mit PCV1-Fusionsprotein His-Rep (A, Spur 3) oder His-Rep' (A, Spur 4) inkubiert. Umgekehrt wurde eine äquimolare Mischung zweier PCV1-Originfragmente mit PCV2-Fusionsprotein His-Rep (B, Spur 2) oder His-Rep' (B, Spur 3) inkubiert. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei 65°C fraktioniert. Als Größenstandard dienen Oligonukleotide definierter Länge (A, Spuren 1 und 2; B, Spuren 1 und 4), Ligationsprodukte sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert.

Zusammenfassung

- ▶ PCV2-Rep und -Rep' schneiden und ligieren Fragmente des viralen Replikationsorigins *in vitro*.
- ▶ Die Schnittstelle ist innerhalb des Nonamers zwischen Nukleotid sieben und acht lokalisiert
 - ▶ Die Rep/Rep'-immanente Restriktions- und Ligationsaktivität ist unabhängig von der Bindung bzw. Hydrolyse von ATP.
- ▶ PCV1/PCV2-Rep und -Rep' besitzen eine sequenzspezifische Restriktions- und Ligationsaktivität gegenüber Fragmenten des heterologen Replikationsorigins *in vitro*.

4.11 Analyse der konservierten Motive der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' im Hinblick auf die virale Replikation

Durch Sequenzvergleiche wurden vier konservierte Motive innerhalb der Aminosäuresequenz des Rep-Proteins von PCV identifiziert, welche Bestandteil der Replikasen aller bekannten Gemini-, Nano- und Circoviren sind (97). Neben einer C-terminal lokalisierten GKS-Box wurden N-terminal die Motive I, II und III identifiziert. Das Auftreten dieser Motive ist typisch für Replikasen, die Replikation über den *rolling circle* Mechanismus (RCM) vermitteln. Dem gespleißten Produkt des *rep*-Gens, Rep', fehlt als konserviertes Element einzig die GKS-Box. Die Bedeutung dieser vier Motive für die virale Replikation sollte im Folgenden mit Hilfe von Mutanten, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz in Motiv I, II, III bzw. der GKS-Box trugen, bestimmt werden. Diese Mutanten wurden hinsichtlich der Restriktion des viralen Plusstrangs und der ATP-Hydrolyse *in vitro* untersucht und im Hinblick auf die Initiation der DNA-Replikation in transfizierten Zellen getestet.

Name	Nukleotide		Aminosäuren	
	wt	Mutante	wt	Mutante
RepmutI	5'-TTCACCCTTAATAAT	5'-TT <u>A</u> ACCCTTAAG <u>A</u> AAT	F ¹⁶ TLN ¹⁹ N	<u>L</u> ¹⁶ TL <u>K</u> ¹⁹ N
RepmutII	5'-CACCTCCAGGGGTTT	5'-CACCTCC <u>C</u> GGGGTTT	HLQ ⁵⁶ GF	<u>H</u> L <u>P</u> ⁵⁶ GF
RepmutY93	5'-TACTGCAGTAAA	5'-T <u>I</u> CTGCAGTAAA	Y ⁹³ CSK	<u>F</u> ⁹³ CSK
RepmutP	5'-GGGAAGAGC	5'-GGGAG <u>G</u> GAT <u>C</u>	GK ¹⁷⁷ S ¹⁷⁸	<u>G</u> R ¹⁷⁷ <u>I</u> ¹⁷⁸

4.11.1 Aktivitäten der rekombinanten PCV1-Replikationsproteine Rep'mutI, RepmutII, RepmutY93 und RepmutP *in vitro*

Die Bedeutung der konservierten Motive I, II, III und der GKS-Box für die Funktion der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' *in vitro* wurde mit Hilfe bakteriell exprimierter und aufgereinigter His- und GST-Fusionproteine untersucht.

4.11.1.1 Expression der N-terminalen His- und GST-Fusionsproteine

Diejenigen Mutanten, die sich nicht in löslicher Form mit His-Epitop in *E. coli* exprimieren ließen, wurden als GST-Fusionsprotein zur Expression gebracht.

Die Expression der GST-Replikationsproteine erfolgte in *E. coli* nach Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-6P-1, der die Expression der Replikationsproteine als rekombinante Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Epitop unter Kontrolle des T7-*lac*-Promotors ermöglicht.

Nach IPTG-induzierter heterologer Expression der Replikationsproteine Rep, RepmutII und RepmutP in BL21-Zellen, Anreichern über Glutathion-Sepharose aus der löslichen Fraktion und Umpuffern in TE-Puffer, wurde die apparente molekulare Masse der GST-Fusionsproteine nachfolgend in der SDS-PAGE unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards bestimmt.

Die Expression der His-Replikationsproteine Rep'mutI und RepmutY93 erfolgte über den Expressionsvektor pTriEx1.1-6HN (Kap. 4.1.1). Da RepmutI weder als GST- noch als His-Fusionsprotein in löslicher Form exprimiert werden konnte, wurde die Funktion des konservierten Motivs I mit Hilfe der Mutante Rep'mutI untersucht.

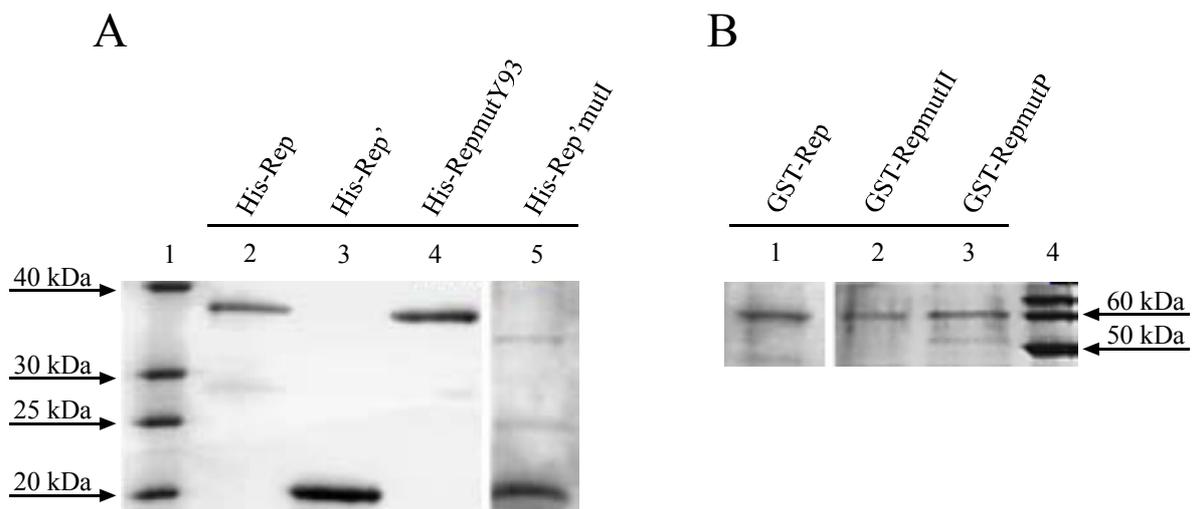


Abb. 4.17. Aufgereinigte Fusionsproteine Rep und Rep' von PCV1 mit unveränderter und veränderter Aminosäuresequenz. Nach Expression in *E. coli* wurden die PCV1-Fusionsproteine His-Rep, His-Rep', His-RepmutY93 und His-Rep'mutI (A, Spuren 2-5) mit Ni-NTA-Agarose, die PCV1-Fusionsproteine GST-Rep, GST-RepmutII und GST-RepmutP (B, Spuren 1-3) über Glutathion-Sepharose aus der löslichen Bakterienfraktion angereichert. Die in TE umgepufferten Proteine wurden nachfolgend über SDS-PAGE fraktioniert und durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Die apparente molekulare Masse wurde durch Vergleich mit einem Größenstandard (A, Spur 1; B, Spur 4) über die angegebenen molekularen Massen bestimmt.

Die apparente molekulare Masse der His- und GST-Fusionsproteine entsprach der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten molekularen Masse der rekombinanten Proteine von 20 kDa für His-Rep' und His-Rep'mutI, 36 kDa für His-Rep und His-RepmutY93 (Abb. 4.17 A, Spuren 2-5) und 66 kDa für GST-Rep, GST-RepmutII und GST-RepmutP (Abb. 4.17B, Spuren 1-3),.

4.11.1.2 Funktionalität der Rep-assoziierten GKS-Box und Analyse der Rep-Mutanten im Hinblick auf die ATP-Hydrolyse

Basierend auf Sequenzvergleichen wurde eine potentielle Helikasedomäne innerhalb des C-Terminus der beiden Replikationsproteine von PCV identifiziert (90), die Homologie zu Helikasen anderer einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA-Viren aufweist (76). Eine Helikaseaktivität ist grundsätzlich mit der Hydrolyse von ATP verbunden (160). Im Falle von PCV1-Rep war zwar eine gesteigerte Restriktionsaktivität *in vitro* in Anwesenheit von ATP zu beobachten (Abb. 4.3, Spur 3), aus diesen Daten kann jedoch nicht zwangsläufig auf die Befähigung des Proteins zur ATP-Hydrolyse geschlossen werden.

Um die Befähigung des Rep-Proteins von PCV zur ATP-Hydrolyse zu demonstrieren, wurde Rep *in vitro* als aufgereinigtes His-Fusionsprotein (Kap. 4.1.1 und 4.8.1) in Gegenwart von [γ - 32 P]ATP inkubiert. Nach Präzipitation des nicht umgesetzten Substrats mit Hilfe von Aktivkohle wurde der im Überstand befindliche Anteil an radioaktiv markiertem freiem Phosphat (P_i) als Maß für die ATP-Hydrolyse in einem Szintillationszähler bestimmt. Während His-Rep' nach Vergleich mit der Negativkontrolle (Abb. 4.18, Balken 1) keine ATPase-Aktivität zugeschrieben werden konnte (Abb. 4.18, Balken 4 und 10), ließ sich im Falle von His-Rep die Fähigkeit der ATP-Hydrolyse durch Messung einer mehr als 30fach (PCV1) bzw. 24fach (PCV2) erhöhten Menge radioaktiv markierten freien Phosphats im Überstand verifizieren (Abb. 4.18, Balken 2 und 8). Die enzymatische Aktivität war dabei abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} , was durch den vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität in Abwesenheit des bivalenten Kations demonstriert wurde (Abb. 4.18, Balken 3 und 9). Die Zugabe einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA dagegen hatte keinen Einfluss auf die ATP-Hydrolyse des Rep-Proteins (Daten nicht gezeigt).

Das rekombinante GST-Fusionsprotein RepmutP, welches Mutationen innerhalb der GKS-Box trägt, wies keinerlei ATPase-Aktivität auf (Abb. 4.18, Balken 7). Damit konnte die katalytische Aktivität von PCV1-Rep mit einer Funktionalität der C-terminal lokalisierten

GKS-Box korreliert werden. Eine Konservierung der ATPase-Aktivität trotz Mutation der Motive II und III wurde mit den Fusionsproteinen GST-RepmutII und His-RepmutY93 demonstriert, was eine Unabhängigkeit der enzymatischen ATP-Hydrolyse von diesen Sequenzen verdeutlicht (Abb. 4.18, Balken 5 und 6). Da es nicht möglich war, ausreichende Mengen der Mutante RepmutI als His- oder als GST-Fusionsprotein in löslicher Form zu exprimieren und der Mutante Rep'mutI die C-terminal lokalisierte GKS-Box fehlt, konnte die Bedeutung des konservierten Motivs I hinsichtlich der ATP-Hydrolyse nicht bestimmt werden.

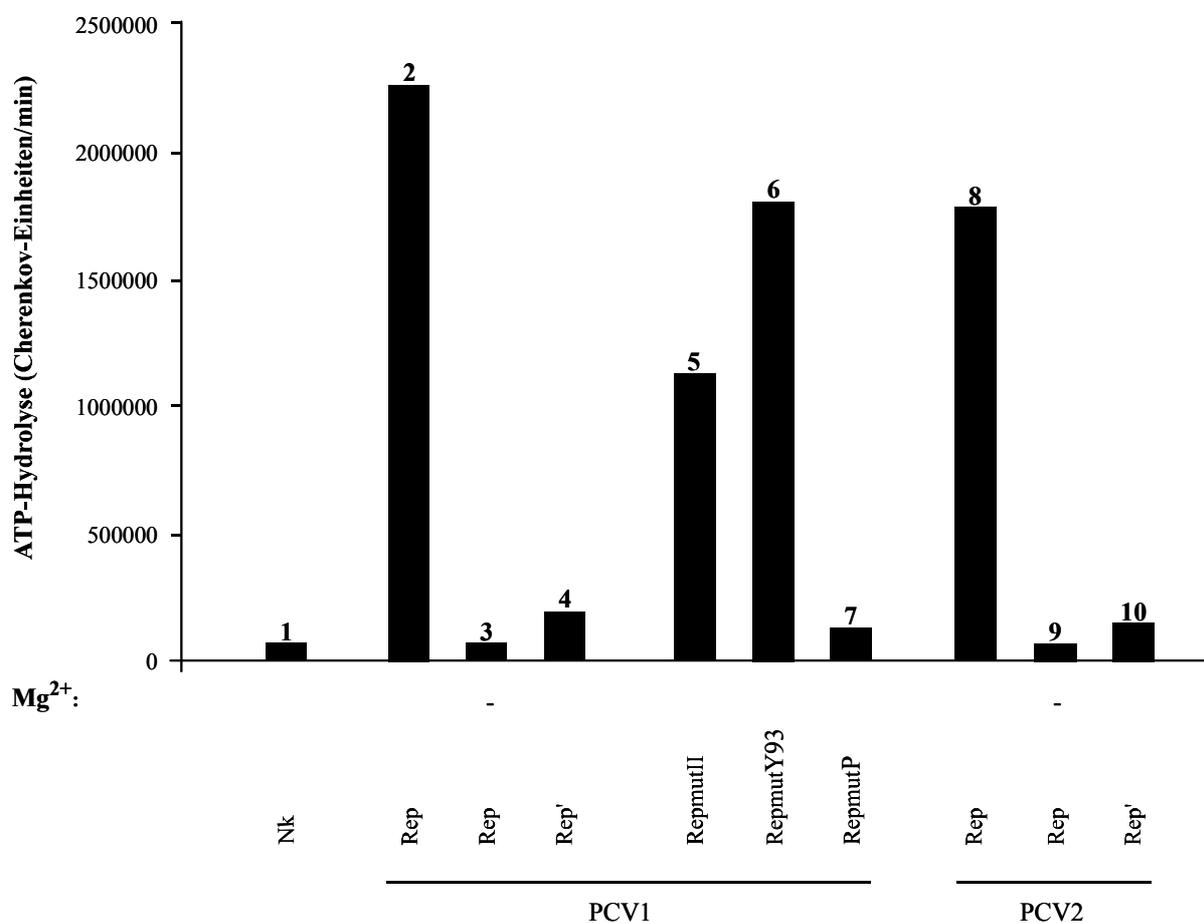


Abb. 4.18. ATPase-Assay. Das PCV1- und PCV2-Replikationsprotein His-Rep (Balken 2 und 3 bzw. 8 und 9) oder His-Rep' (Balken 4 und 10) sowie die PCV1-Mutante GST-RepmutII (Balken 5), His-RepmutY93 (Balken 6) oder GST-RepmutP (Balken 7) wurde in Gegenwart von [γ -³²P]ATP im ATPase-Assay *in vitro* inkubiert. Nicht umgesetztes [γ -³²P]ATP wurde präzipitiert und die Menge an radioaktiv markiertem freien Phosphat in einem Szintillationszähler bestimmt. Sofern nicht anders vermerkt, wurde die Reaktion mit Mg²⁺ supplementiert. Als Negativkontrolle wurde präpariertes lösliches Bakterienlysat einer Transformation mit pTriEx-6HN verwendet (Balken 1).

4.11.1.3 Analyse der Rep/Rep'-Mutanten im Hinblick auf die Restriktion des viralen Plusstrangs

Um den Einfluss der konservierten Motive I, II, III und der GKS-Box auf die Restriktionsaktivität der Replikationsproteine von PCV1 gegenüber dem viralen Replikationsorigin zu untersuchen, wurden Rep'mutI und RepmutY93 als aufgereinigte His-Fusionsproteine sowie RepmutII und RepmutP als aufgereinigte GST-Fusionsproteine *in vitro* mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden inkubiert. Die Oligonukleotide entsprachen dabei einem Fragment des Replikationsorigins von PCV1 mit den charakteristischen Sequenzmotiven und einer Cy5-Markierung am 5'-Ende (Anhang A.6). Der Einfluss von Motiv I auf die Restriktion konnte mit Hilfe der Mutante Rep'mutI untersucht werden, da sowohl für Rep als auch Rep' eine Restriktionsaktivität gegenüber dem viralen Plusstrang *in vitro* demonstriert worden war (Kap. 4.1.2).

Abbildung 4.19 zeigt die Restriktionsaktivität von His-Rep'mutI und GST-RepmutII (Spuren 5 und 9) im Vergleich zu His-Rep' und GST-Rep (Spuren 3 und 7) gegenüber dem Oligonukleotid F301. Während in Gegenwart von His-Rep' und GST-Rep die Restriktionsaktivität der Replikationsproteine durch die Ausbildung des 5'-Schnittprodukts deutlich wurde, war im Falle der Mutanten His-Rep'mutI und GST-RepmutII ein vollständiger Funktionsverlust zu konstatieren, d.h. den Motiven I und II muss eine essentielle Bedeutung hinsichtlich der Restriktion des viralen Plusstrangs *in vitro* beigemessen werden.

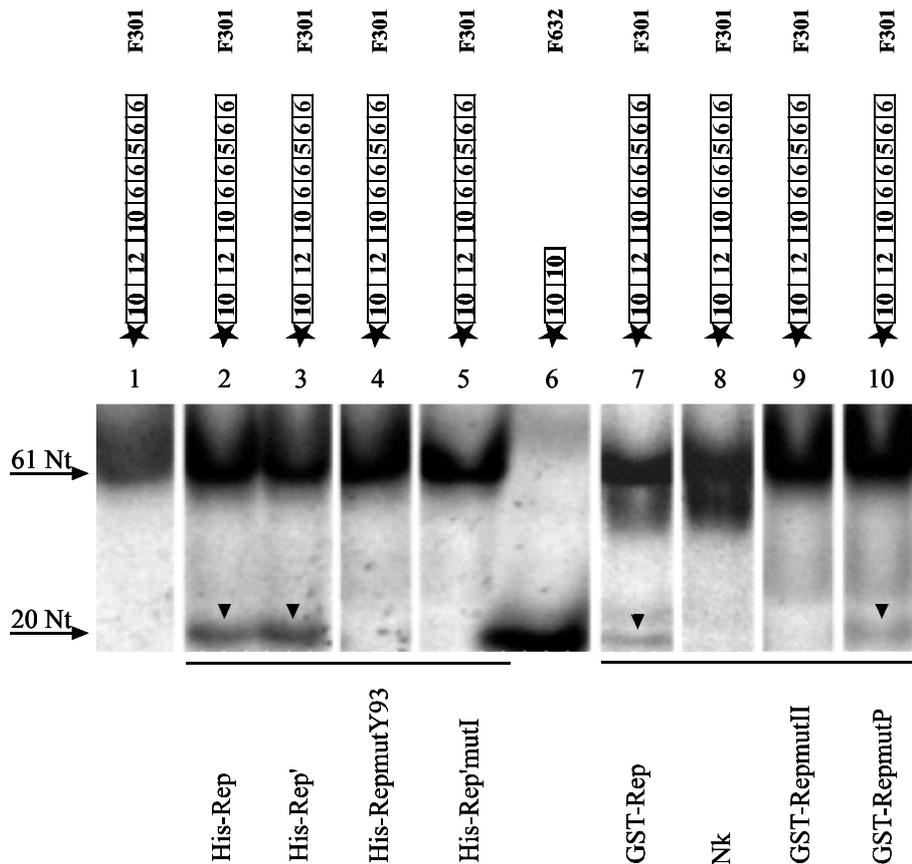


Abb. 4.19. Einfluss der konservierten Aminosäuresequenzen auf die Restriktionsaktivität der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep'. Jeweils 500 ng aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein His-Rep (Spur 2), His-Rep' (Spur 3), His-RepmutY93 (Spur 4) oder His-Rep'mutI (Spur 5) sowie aufgereinigtes PCV1-Fusionsprotein GST-Rep (Spur 7), GST-RepmutII (Spur 9) oder GST-RepmutP (Spur 10) wurden mit 0,5 pmol Cy5-markiertem PCV1-Originfragment F301 im Restriktionsassay *in vitro* inkubiert. Als Negativkontrolle der Restriktionsaktivität der präparierten GST-Fusionen wurde aufgereinigte Glutathion S-Transferase eingesetzt (Spur 8). Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidelektrophorese bei RT fraktioniert und verglichen mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe (Spuren 1 und 6). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

Im Falle von Enzymen, welche Replikation über RCR vermitteln, wird die strang- und sequenzspezifische Restriktion oftmals durch die Hydroxygruppe eines konservierten Tyrosinrests katalysiert (27, 67). In einer Transesterifizierung fungiert die OH-Gruppe des Tyrosinrests als das die Phosphodiesterbindung angreifende Nukleophil. Mittels des Austauschs von Tyrosin an Position 93 innerhalb des konservierten Motivs III des Rep-Proteins durch Phenylalanin sollte dessen Funktion hinsichtlich der Restriktion *in vitro* analysiert werden.

Nach Inkubation von F301 mit His-Rep wurde die Restriktionsaktivität durch die Ausbildung des 5'-Schnittprodukts nachgewiesen (Abb. 4.19, Spur 2). Die RepmutY93-Mutante hingegen zeigte keinerlei Restriktionsaktivität, was auf einen vollständigen Funktionsverlust hindeutet

(Abb. 4.19, Spur 4). Diese Ergebnisse belegen die essentielle Rolle von Tyrosin-93 hinsichtlich der Restriktion des Replikationsorigins und damit der Initiation der viralen DNA-Replikation.

Eine gesteigerte Restriktionsaktivität nach Supplementierung mit ATP sowie die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse wurde für PCV1-Rep demonstriert (Kap. 4.1.3 und 4.11.1.2). Eine grundsätzliche Relevanz der GKS-Box bezüglich der Restriktion des viralen Replikationsorigins sollte durch die Mutante RepmutP untersucht werden.

Die Mutation der GKS-Box in RepmutP führte zu einem vollständigen Funktionsverlust der Mutante im ATPase-Assay. Die Restriktionsaktivität der *loss of function*-Mutante RepmutP hingegen wurde durch die Ausbildung des 5'-Schnittprodukts im Restriktionsassay *in vitro* demonstriert (Abb. 4.19, Spur 10). Anders als bei His-Rep resultierte die Anwesenheit von ATP hier aber nicht in einem erhöhten Umsatz des Substrats (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der Negativkontrolle (Abb. 4.19, Spur 8) wurde die Spezifität der Restriktion auf die Anwesenheit von RepmutP im Reaktionsansatz zurückgeführt. Obwohl in Gegenwart von ATP verstärkt, ist demnach die katalytische Aktivität und Spezifität von PCV1-Rep gegenüber synthetischen Oligonukleotiden *in vitro* von der ATP-Bindung und -Hydrolyse unabhängig.

4.11.2 Analyse der Replikationsaktivität der rekombinanten PCV1-Replikationsproteine in transfizierten Zellen

Die Bedeutung der konservierten Motive I, II und III sowie der GKS-Box für die Replikation in PK15-Zellen wurde über den Luziferase basierten Replikationsassay untersucht.

Wie schon für die Bestimmung der Replikationsaktivität der nicht-mutagenisierten Proteine Rep und Rep' (Kap. 4.7) wurden PK15-Zellen mit verschiedenen Plasmiden kotransfiziert: Plasmid pRL16 trägt den *in cis* aktiven Replikationsorigin und zusätzlich das Reportergen Luziferase unter Kontrolle des späten SV40-Promotors (Anhang A.3 und A.7). Im Gegensatz dazu kodieren pORF4A (95), pTriEx-6HN-rep, pRep-mutI, pRep-mutII, pTriEx-6HN-repmutY93 und pRep-mutP für die *in trans* aktiven PCV1-Replikationsproteine und deren Varianten. Die Replikationsaktivität von RepmutI (pRep-mutI 94), RepmutII (pRep-mutII 94), RepmutY93 (pTriEx-6HN-repmutY93) und RepmutP (pRep-mutP 94) gegenüber dem viralen Replikationsorigin wurde durch Quantifizierung der Reportergenexpression bestimmt und mit der Expressionsrate in Abwesenheit der Replikationsenzyme (pSVL-SV40 und pTriEX-6HN) verglichen. Als Positivkontrollen dienten die Plasmide pORF4A oder pTriEx-

6HN-rep in Kotransfektion mit pRL16, als Negativkontrollen die Expressionsvektoren in Kotransfektion mit dem nicht replikationsaktiven Plasmid pGL3-p.

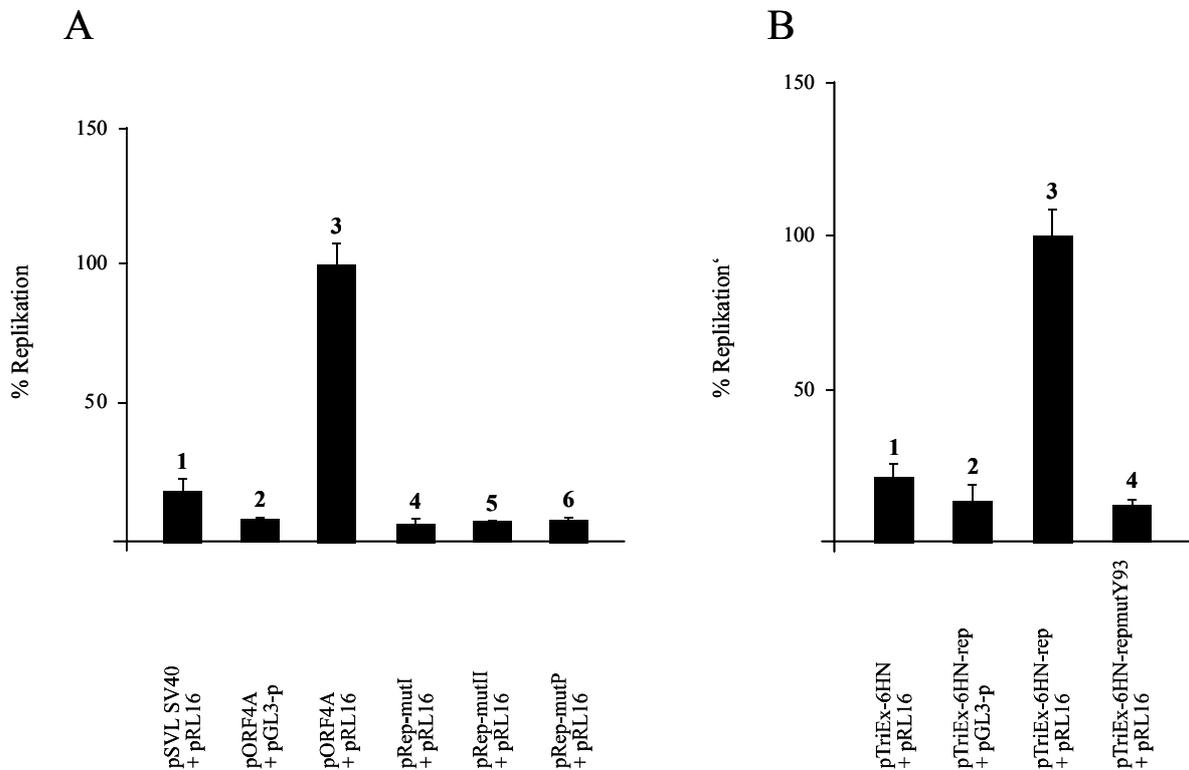


Abb. 4.20. Einfluss der konservierten Aminosäuresequenzen auf die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' in PK15-Zellen. Die Fähigkeit von PCV1-Rep/Rep' (pORF4A), -RepmutI (pRep-mutI), -RepmutII (pRep-mutII) und -RepmutP (pRep-mutP) sowie der PCV1-Fusionsproteine His-Rep/His-Rep' (pTriEx-6HN-rep) und His-RepmutY93 (pTriEx-6HN-repmutY93) *in trans* die Replikation von Plasmiden zu initiieren, welche den PCV1-Replikationsorigin tragen (pRL16), wurde in einem Luziferase basierten Replikationsassay untersucht (A, Balken 3, 4, 5 und 6; B, Balken 3 und 4) und mit der Replikationsrate des Replikons in Abwesenheit der Replikationsproteine (pSVL-SV40 und pTriEx-6HN) verglichen (A und B, Balken 1). Plasmid pGL3-p trägt das Reportergen ohne den viralen Replikationsorigin und repräsentiert die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine in Abwesenheit des *in cis* aktiven Elements (A und B, Balken 2).

Die Negativkontrollen, in denen jeweils entweder der *in cis* oder der *in trans* aktive Replikationsfaktor fehlte, wiesen erwartungsgemäß keine Replikation auf (Abb. 4.20A und B, Balken 1 und 2). In den Positivkontrollen (Replikationsorigin mit den Replikationsproteinen Rep und Rep') war ein mehr als 5facher (Abb. 4.20A, Balken 3) bzw. 4,5facher (Abb. 4.20B, Balken 3) Anstieg der Luziferaseaktivität zu verzeichnen. Weiterhin zeigte keine der eingesetzten Mutanten Replikationsaktivität gegenüber dem viralen Replikationsorigin (Abb. 4.20A, Balken 4-6; B, Balken 4). Die konservierten Motive I, II, III und die GKS-Box sind demnach für die Replikationsaktivität der Replikationsproteine von essentieller Bedeutung.

Zusammenfassung

ATP-Hydrolyse

- ▶ PCV-Rep besitzt die Fähigkeit der ATP-Hydrolyse *in vitro*.
- ▶ Die katalytische Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} , die Zugabe einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA beeinflusst die Aktivität hingegen nicht.
- ▶ Die ATP-Hydrolyse ist mit der Integrität der GKS-Box verbunden, aber unabhängig von den konservierten Motiven II und III.

Restriktion

- ▶ Die Restriktion des Replikationsorigins *in vitro* ist nicht von der Rep-spezifischen Bindung und Hydrolyse von ATP abhängig.
- ▶ Die Motive I, II und III sind für die Restriktion essentiell.
- ▶ Die OH-Gruppe des Tyrosin-93 ist vermutlich das angreifende Nukleophil, das die Phosphodiesterbindung spaltet.

Replikation in transfizierten Zellen

- ▶ Die konservierten Motive I, II, III und die GKS-Box sind essentiell hinsichtlich der Replikationsaktivität von PCV1-Rep/Rep' in PK15-Zellen.

4.12 Untersuchungen zur Termination und zum Mechanismus der PCV1-Replikation

Der Verlust der Restriktionsaktivität von RepmutY93 (Abb. 4.19, Spur 4) lässt vermuten, dass es sich bei Tyrosin-93 innerhalb des konservierten Motivs III um das katalytische Zentrum hinsichtlich der Initiation der Replikation von PCV1 handelt. Die Replikation muss durch die Einführung eines zweiten Einzelstrangbruchs und die Verknüpfung des neu synthetisierten Strangs terminiert werden, durch die kovalente Verknüpfung des Proteins mit der geschnittenen DNA nach Restriktion ist aber die zweite Katalyse des Einzelstrangbruchs als Voraussetzung für die Termination der viralen Replikation durch Tyrosin-93 nicht möglich. Einzelne Replikons haben unterschiedliche Strategien hinsichtlich der Initiation und Termination der Replikation entwickelt, die sich in der Art der beteiligten Aminosäuren sowie

im Oligomerisierungsgrad des Rep-Proteins unterscheiden. So liegt das katalytische Zentrum für die erforderliche zweite Restriktion entweder in räumlicher Nähe auf der gleichen Polypeptidkette oder es wird durch eine weitere Proteinuntereinheit in einem Rep-Dimer oder Oligomer höherer Ordnung zur Verfügung gestellt. So kämen auch im Fall von PCV1 für die Termination entweder benachbarte Aminosäurereste eines Rep-Monomers oder unterschiedliche Tyrosin-93-Reste in einem Dimer bzw. Oligomer in Frage. Um dieser Frage nachzugehen und den genauen Mechanismus der viralen Replikation auf Ebene der Initiation und Termination detaillierter beschreiben zu können, wurden PCV1-Rep und -Rep' hinsichtlich ihrer Befähigung zur Ausbildung homologer und heterologer Komplexe untersucht.

4.12.1 Befähigung der PCV1-Replikationsproteine sowie des PCV1-Kapsidproteins zur homologen und heterologen Interaktion in Hefezellen

Die Befähigung der Replikationsproteine von PCV1 zur homologen (Rep:Rep und Rep':Rep') bzw. heterologen (Rep:Rep') Interaktion wurde über den Two-Hybrid-Assay in Hefezellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Rep, Rep* und Rep' als Gal4-BD-Fusionsprotein bzw. Gal4-AD-Fusionsprotein in Hefezellen zur Expression gebracht. Lediglich über Interaktion beider Fusionsproteine nach Kotransformation der entsprechenden Plasmide werden BD- und AD-Domäne in räumliche Nähe gebracht. Diese Rekonstituierung des Gal4-Transkriptionsfaktors als unmittelbare Voraussetzung für das Wachstum der verwendeten Hefezellen des Stammes AH109 wurde anhand der Expression dreier Reportergene verifiziert. Die Expression von Rep, Rep* und Rep' sollte ausgehend von den Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7 gewährleistet werden, die die Expression der Replikationsproteine als Gal4-BD-Fusionsprotein (pGBKT7) bzw. als Gal4-AD-Fusionsprotein (pGADT7) unter Kontrolle des konstitutiven *adh1*-Promotors in Hefezellen gestatten.

4.12.1.1 *Rep*, *Rep** und *Rep'* bilden sowohl homologe als auch heterologe Komplexe in Hefezellen aus

Die Kotransformation der Plasmide erfolgte im *large scale* in einem molaren Verhältnis pGADT7:pGBKT7 von 1:2. Jeweils 300 µl eines Transformationsansatzes wurden direkt im Anschluss an die Transformation auf Selektionsmedium hoher Stringenz (-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal) ausplattiert und für sieben Tage im Brutraum bei 30°C inkubiert.

Interaktion	BD-Fusionsprotein	AD-Fusionsprotein
homolog		
BD-Rep:AD-Rep	pGBKT7-rep pGBKT7 pGBKT7-rep	pDADT7-rep pGADT7-rep pGADT7
BD-Rep':AD-Rep'	pGBKT7-rep' pGBKT7 pGBKT7-rep'	pGADT7-rep' pGADT7-rep' pGADT7
BD-Rep*:AD-Rep*	pGBKT7-rep* pGBKT7 pGBKT7-rep*	pGADT7-rep* pGADT7-rep* pGADT7
heterolog		
BD-Rep':AD-Rep*	pGBKT7-rep'	pGADT7-rep*
BD-Rep*:AD-Rep'	pGBKT7-rep*	pGADT7-rep'
positiv		
BD-p53:AD-SV40 T-Antigen	pGBKT7-53	pGADT7-T
negativ		
BD-Lamin C:AD-SV40 T-Antigen	pGBKT7-lam	pGADT7-T

Eine Aktivierung der Reportergene *his3*, *ade2* und *mell* (α -Galaktosidase) als Folge einer Interaktion der Replikationsproteine resultiert im Wachstum blauer Kolonien auf einem geeigneten Selektionsmedium. Das Maß für die Interaktion der PCV1-Proteine stellt somit die Anzahl blau gefärbter Kolonien im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen dar. Um eine Reportergenexpression einerseits über Autoaktivierung durch die Fusionsproteine, andererseits über Interaktion der Fusionsproteine mit der entsprechenden Gal4-Domäne auszuschließen, wurde zum Einen Plasmid pGBKT7 mit den AD-Rep/Rep*/Rep'-Expressionsplasmiden, zum Anderen Plasmid pGADT7 mit den BD-Rep/Rep*/Rep'-Expressionsplasmiden kotransformiert. Als Positivkontrolle dienten die Plasmide pGBKT7-53 und pGADT7-T, welche die Expression des murinen p53 und SV40 T-Antigens als Gal4-BD- bzw. Gal4-AD-Fusionsprotein gewährleisten und deren Interaktion im Yeast Two-Hybrid-Assay beschrieben ist (68, 85). Als Kontrolle hinsichtlich der Spezifität diente die Kotransformation von pGBKT7-Lam und pGADT7-T. Lamin C (pGBKT7-Lam) sollte nicht mit dem SV40 T-Antigen interagieren bzw. Komplexe ausbilden (4, 166).

In Abbildung 4.21 ist das Ergebnis der Untersuchungen hinsichtlich der homologen und heterologen Interaktion der Replikationsproteine Rep, Rep* und Rep' von PCV1 in Hefezellen gezeigt. Sowohl für Rep* als auch für Rep' wurde die Ausbildung homologer Komplexe demonstriert. Mit einer Kolonienzahl von ca. 135 ist die Interaktion von Rep' etwas stärker ausgeprägt als die von Rep* mit ca. 111 Kolonien. Beide Interaktionen sind in ihrer Stärke aber mit derjenigen der Proteine in der Positivkontrolle (ca. 122 Kolonien) vergleichbar. Rep* wurde anstelle von Rep untersucht, um dem Spleißen eukaryotischer Gene in Hefezellen Rechnung zu tragen und die Expression beider Spleißvarianten zu vermeiden. Da ausgehend von pGADT7-rep und pGBKT7-rep die Expression beider Replikationsproteine erfolgt, konnte in diesem Ansatz nicht zwischen homologen bzw. heterologen Komplexen beider Replikationsproteine unterschieden werden. Bei gemeinsamer Expression von Rep und Rep' war der Grad der Interaktion mit mehr als 300 Kolonien ca. dreimal so stark ausgeprägt wie bei Expression lediglich eines beider Replikationsproteine.

Weiterhin wurde die Ausbildung von heterologen Komplexen zwischen den Replikationsproteinen Rep* und Rep' nachgewiesen. Die Interaktion zwischen Rep* und Rep' war mit jeweils ca. 200 Kolonien ähnlich stark ausgeprägt, unabhängig davon, wie die Fusionsproteine miteinander kombiniert wurden (BD-Rep*/AD-Rep' bzw. BD-Rep'/AD-Rep*).

Im Gegensatz zur Wechselwirkung der Replikationsproteine untereinander war die Interaktion von Cap mit Rep (0 Kolonien), Rep' (0 Kolonien) oder Rep* (0 Kolonien) nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

In allen Fällen wurde die Reportergenexpression über Autoaktivierung durch BD-Rep/Rep*/Rep'/Cap (pGBKT7-rep/rep*/rep'/cap + pGADT7: 0 Kolonien) bzw. AD-Rep/Rep*/Rep' (pGBKT7 + pGADT7-rep/rep*/rep': 0 Kolonien) sowie über Interaktion der Fusionsproteine mit der entsprechenden Gal4-Domäne ausgeschlossen. Die Spezifität des Systems wurde über Kotransformation von pGBKT7-Lam und pGADT7-T (0 Kolonien) bestätigt.

Interaktion	Anzahl der Kolonien	Koloniefärbung
homolog		
BD-Rep:AD-Rep	300	blau
BD-Rep*:AD-Rep*	111	blau
BD-Rep':AD-Rep'	135	blau
heterolog		
BD-Rep*:AD-Rep'	200	blau
BD-Rep':AD-Rep*	200	blau
Positivkontrolle	122	blau
Negativkontrolle	0	

Abb. 4.21. PCV1 Rep und Rep' bilden homologe und heterologe Komplexe in Hefezellen aus. Die PCV1-Proteine Rep, Rep' und Rep* wurden über Kotransformation der entsprechenden Plasmide (pGADT7-rep/rep*/rep' und pGBKT7-rep/rep*/rep') als AD- und BD-Fusionsproteine in Hefezellen des Stammes AH109 zur Expression gebracht. Nach Ausstreichen der Transformationsansätze auf Selektionsmedium hoher Stringenz (-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-a-Gal) wurde eine Interaktion über Rekonstituierung des Gal4-Transkriptionsfaktors durch die Anzahl und die Färbung der Kolonien verifiziert. Als Negativkontrolle diente die Kotransformation von pGBKT7-Lam (BD-Lamin C) und pGADT7-T (AD-SV40 T-Antigen), als Positivkontrolle die Kotransformation von pGBKT7-53 (BD-mp53) und pGADT7-T (AD-SV40 T-Antigen).

4.12.2 Befähigung der PCV1-Replikationsproteine zur homologen und heterologen Interaktion in Bakterienlysaten

Um die Ergebnisse des Yeast Two-Hybrid-Assays (Kap. 4.12.1) zu bestätigen, wurde die Befähigung der Replikationsproteine von PCV1 zur homologen bzw. heterologen Interaktion in einem unabhängigen System untersucht. Zu diesem Zweck wurden Rep und Rep' als N-terminale His- bzw. FLAG-Fusionsproteine in *E. coli* zur Expression gebracht.

4.12.2.1 Expression der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' als FLAG-Fusionsproteine

Die Expression der FLAG-Replikationsproteine erfolgte über den bakteriellen Expressionsvektor pTriEx1.1, welcher die Expression der Replikationsproteine unter Kontrolle des T7-*lac*-Promotors ermöglicht. Das N-terminale FLAG-Epitop der rekombinanten Proteine wurde dabei über den verwendeten Primer F888 (Anhang A.1 und A.5) kloniert.

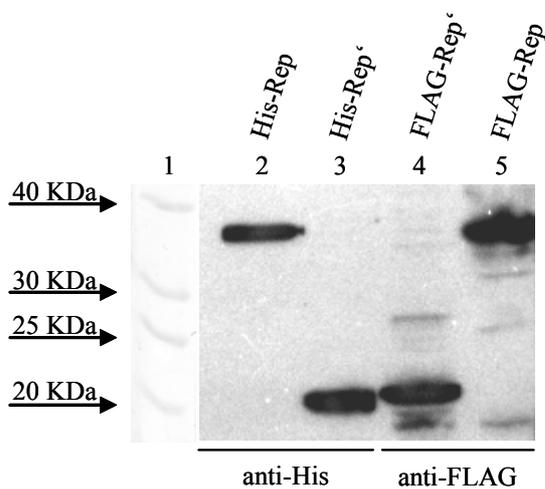


Abb. 4.22. His- und FLAG-Fusionsproteine Rep und Rep' von PCV1. PCV1-Fusionsproteine His-Rep (Spur 2) und His-Rep' (Spur 3) sowie FLAG-Rep' (Spur 4) und FLAG-Rep (Spur 5) wurden in *E. coli* zur Expression gebracht. Proteine des löslichen Bakterienlysats wurden nachfolgend über SDS-PAGE fraktioniert und nachfolgend im WB mit Hilfe von anti-His-Epitop (1:2500) bzw. anti-FLAG Antikörper detektiert. Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse erfolgte durch Vergleich mit einem Größenstandard (Spur 1) über die angegebenen molekularen Massen nach Coomassie-Färbung.

Nach IPTG-induzierter heterologer Expression der rekombinanten Replikationsproteine Rep, und Rep' von PCV1 in *E. coli* wurde die apparente molekulare Masse der FLAG-Fusionsproteine im löslichen Bakterienlysats nachfolgend im Immunoblot unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards bestimmt.

Die apparente molekulare Masse entsprach dabei der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten molekularen Masse von 20 kDa (FLAG-Rep') und 36 kDa (FLAG-Rep) der rekombinanten Proteine (Abb. 4.22, Spuren 4 und 5).

Die Expression der His-Fusionsproteine Rep und Rep' erfolgte ebenfalls über den Expressionsvektor pTriEx1.1-6HN (Kap. 4.1.1). Auch in diesem Fall wurde eine Größenbestimmung von His-Rep (36 kDa) und His-Rep' (20 kDa) durchgeführt (Abb. 4.22, Spuren 2 und 3).

Die Größenbestimmung der Fusionsproteine als Bestandteil des löslichen Bakterienlysats, d.h. ohne Aufreinigung, erlaubt neben der Kontrolle der Qualität der Expression auch die Quantifizierung, um nachfolgend gleiche Proteinmengen hinsichtlich der Detektion einer Interaktion (Kap. 4.12.2.2) einsetzen zu können.

4.12.2.2 *Rep und Rep' bilden homologe und heterologe Komplexe in Bakterienlysaten aus*

Nach Expression in *E. coli*, Präparation der löslichen Fraktion und Inkubation der His- und FLAG-Fusionsproteine wurde das FLAG-Fusionsprotein durch Zugabe von anti-FLAG Antikörper und Protein G-Sepharose präzipitiert. Die Kopräzipitation gebundener His-Fusionsproteine wurde anschließend über Detektion der auf PVDF-Membran immobilisierten Proteine mit einem anti-His Antikörper detektiert.

Interaktion	Präzipitation	Detektion
homolog		
FLAG-Rep:His-Rep	anti-FLAG/PGS	anti-His
FLAG-Rep':His-Rep'	anti-FLAG/PGS	anti-His
heterolog		
FLAG-Rep:His-Rep'	anti-FLAG/PGS	anti-His
FLAG-Rep':His-Rep	anti-FLAG/PGS	anti-His
Kopräzipitationskontrolle		
His-Rep	anti-FLAG/PGS	anti-His
His-Rep'	anti-FLAG/PGS	anti-His

In Abbildung 4.23 ist das Ergebnis der Untersuchungen hinsichtlich der Ausbildung homologer und heterologer Komplexe zwischen den Replikationsproteinen Rep und Rep' von PCV1 in Bakterienlysaten gezeigt.

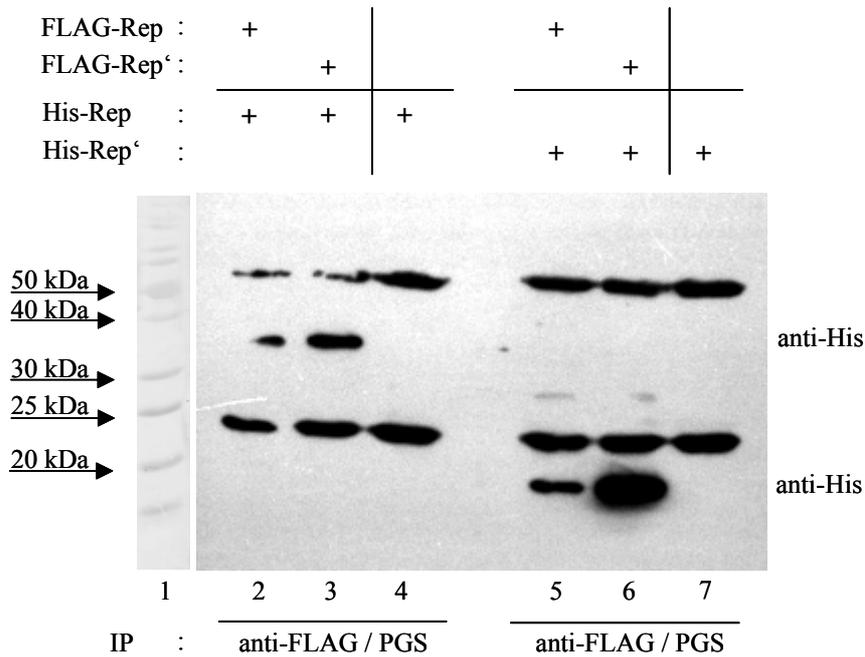


Abb. 4.23. Die PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' bilden homologe und heterologe Interaktionen in Bakterienlysaten aus. Jeweils 1,5 ml löslichen Bakterienlysats der in *E. coli* exprimierten His- und FLAG-Fusionsproteine von PCV1-Rep/Rep' wurden vereinigt und das jeweilige FLAG-Fusionsprotein mit anti-FLAG Antikörper (1:100) und Protein G-Sepharose (40 µl) präzipitiert. Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurde das kopräzipitierte His-Fusionsprotein im Western Blot mit anti-His Antikörper (1:2500) detektiert (Spuren 2 und 3, 5 und 6). Als Kontrolle der Koimmunopräzipitation diente das His-Fusionsprotein in Gegenwart von PBS (Spuren 4 und 7). Die apparente molekulare Masse wurde durch Vergleich mit einem Größenstandard (Spur 1) bestimmt.

Über Koimmunopräzipitation der jeweiligen His-Fusionsproteine wurde sowohl die homologe (Spuren 2 und 6) als auch die heterologe (Spuren 3 und 5) Interaktion der Replikationsproteine demonstriert.

Um eine unspezifische Präzipitation des His-Fusionsproteins über den anti-FLAG Antikörper bzw. die Protein G-Sepharose auszuschließen, wurde in der Kopräzipitationskontrolle bakteriell exprimiertes His-Fusionsprotein mit PBS anstelle des FLAG-Fusionsproteins inkubiert. Nach Zugabe von anti-FLAG Antikörper und Protein G-Sepharose wurde in keinem Fall die Präzipitation des His-Fusionsproteins nachgewiesen (Spuren 4 und 7).

Zusammenfassung

- ▶ Sowohl die Ausbildung von homologen als auch von heterologen Komplexen der PCV1-Replikationsproteine wurde in Hefezellen und in *E. coli* Bakterienlysaten demonstriert.
 - ▶ PCV1-Cap konstituiert keine heterologen Komplexe mit den PCV1-Replikationsproteinen Rep* und Rep' in Hefezellen
-

4.12.3 Untersuchungen zur Oligomerisierung der PCV1-Replikationsproteine in Bezug auf die Termination der viralen Replikation

Der Nachweis homologer und heterologer Komplexe der Replikationsproteine Rep und Rep' unterstützt die Hypothese, dass die zweite Restriktion, die die virale DNA-Replikation terminiert, durch das Tyrosin-93 einer zweiten Polypeptidkette erfolgen könnte. Demzufolge wäre die Protein-Protein-Interaktion eine Voraussetzung für die Termination der viralen Replikation. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Befähigung von Rep und Rep' zur Einführung eines zweiten Einzelstrangbruchs innerhalb des viralen Replikationsorigins untersucht.

Hierzu wurden PCV1-Rep und -Rep' *in vitro* als aufgereinigte His-Fusionsproteine (Kap. 4.1.1) mit dem am 3'-Ende mit Biotin markierten Oligonukleotid F1165 in einer ersten Restriktionsreaktion inkubiert (Kap. 4.6). Dabei wurde die Konzentration des Oligonukleotids bei konstanter Proteinkonzentration sukzessive gesteigert. Die Protein-DNA-Komplexe, deren Ausbildung bereits unter 4.6 beschrieben wurde, wurden nach Präzipitation über anti-Biotin Agarose in Gegenwart von F617 in einer zweiten Restriktionsreaktion (Kap. 4.1.2) inkubiert.

Die Befähigung von Rep und Rep' aus diesem Komplex heraus das neue Substrat zu schneiden, wurde durch die Detektion des 5'-Schnittprodukts verdeutlicht (Abb. 4.24, Spuren 3-6 und 8-11). Bei einem Substratüberschuss in Gegenwart von 50 pmol und 100 pmol F1165 in der ersten Restriktion (Kap. 4.6) konkurrierte das präzipitierte Biotin-markierte Oligonukleotid in der zweiten Restriktion mit dem Cy5-markierten Oligonukleotid F617, dementsprechend war die Produktbildung vergleichsweise eingeschränkt (Abb. 4.24, Spuren 5 und 6, 10 und 11). Der Überschuss an Fusionsprotein in der ersten Restriktion in Gegenwart

von 0,5 und 10 pmol F1165 (Kap. 4.6) hatte aufgrund erhöhter Sensitivität der Detektion eine starke Produktbildung in der zweiten Restriktion in Gegenwart von F617 zur Folge (Abb. 4.24, Spuren 3 und 4, 8 und 9). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass innerhalb des primären Komplexes, in dem Rep und Rep' kovalent an das 3'-Schnittprodukt gebunden sind, die Proteine die Fähigkeit zur Einführung eines weiteren Einzelstrangbruchs besitzen.

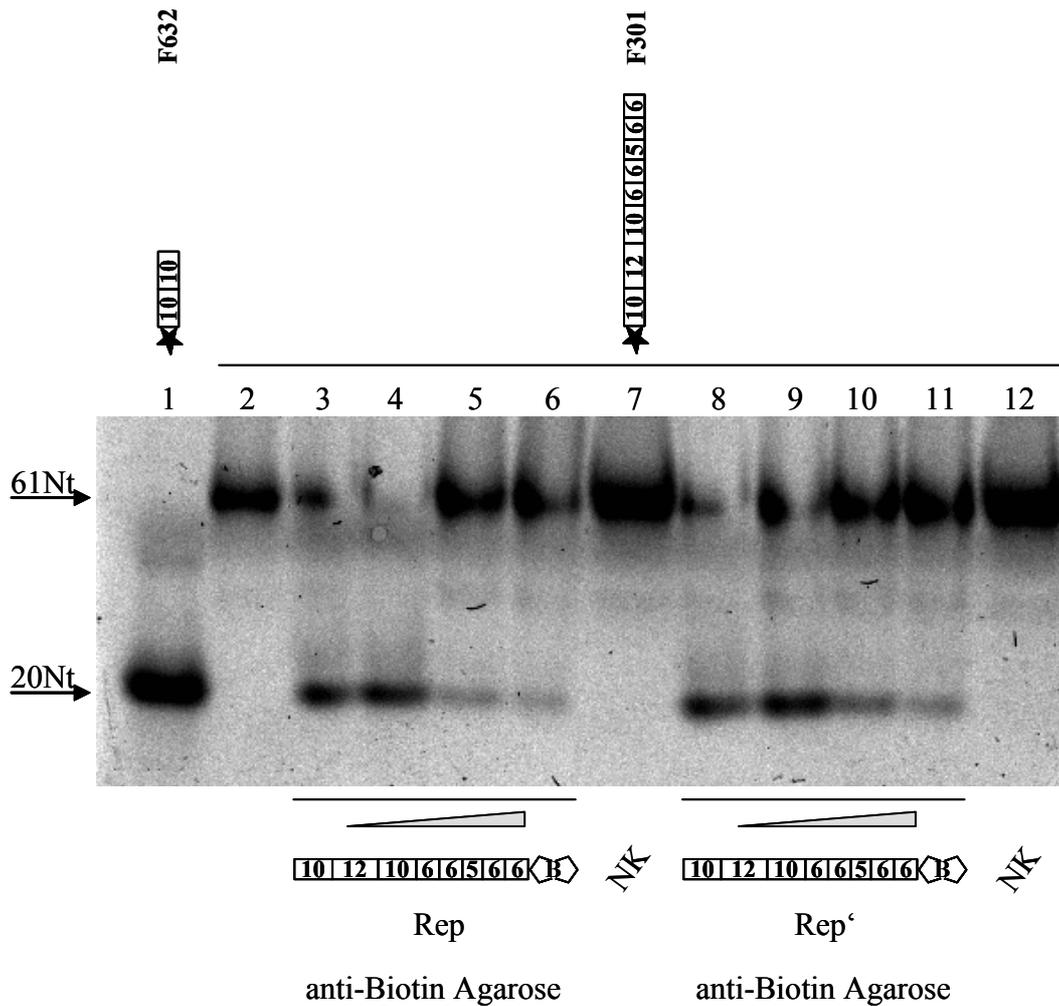


Abb. 4.24. Befähigung der PCV1-Replikationsproteine Rep und Rep' aus dem primären Protein-DNA-Komplex heraus zur zweiten Restriktion. Nach Restriktion von F617 wurden die Protein-DNA-Komplexe mit anti-Biotin Agarose (40 µl) präzipitiert und in Gegenwart von 0,5 pmol Oligonukleotid F301 im Restriktionsassay *in vitro* inkubiert (Spuren 3-6 und 8-11). Als Negativkontrolle diente Präzipitat nach Inkubation von His-Rep (Spur 7) oder His-Rep' (Spur 12) ohne die Gegenwart von F1165 in der ersten Restriktion. Reaktionsprodukte wurden über native Polyacrylamidgelelektrophorese bei RT fraktioniert und mit Oligonukleotidmarkern definierter Größe verglichen (Spuren 1 und 2). Positionen und Größen der Oligonukleotide sind vermerkt, Schnittprodukte markiert mit schwarzen Pfeilspitzen.

4.13 Bedeutung der konservierten Sequenzen innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 für die virale Replikation

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Restriktions- und Ligationsaktivität der PCV-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber dem viralen Plusstrang *in vitro* demonstriert und analysiert wurde, sollte abschließend der Einfluss konservierter Sequenzmotive innerhalb des viralen Replikationsorigins bestimmt werden. Im Folgenden werden Ergebnisse präsentiert, die einen Einfluss der Sequenz und Sekundärstruktur des Replikationsorigins von PCV1 auf die Replikation in transfizierten Zellen beschreiben und die mit dem bereits beschriebenen Replikationsassay erarbeitet wurden.

Zu diesem Zweck wurde Plasmid pORF4A (95), das für die *in trans* aktiven Replikationsproteine kodierte, verwendet, während pRL16 und seine Varianten (Anhang A.3 und A.7) das Reportergen unter Kontrolle des späten SV40-Promotors und darüber hinaus den unveränderten oder in seiner Sequenz modifizierten *in cis* aktiven Replikationsorigin trugen.

Eine Modifikation der Sequenz jeweils eines der vier Hexamere von 5'-CG(G/T)CAG-3' zu 5'-CCCGGG-3' wird repräsentiert durch pRL16-1 (H1), pRL16-2 (H2), pRL16-3 (H3) und pRL16-4 (H4). pRL16-12 und pRL16-34 hingegen umfassen die Mutation zweier benachbarter Motive (H1 und H2 bzw. H3 und H4). Mutationen im Bereich der inversen Repetition sind kodiert in den Plasmiden pRL17-1 mit Änderung der Sequenz *downstream* von 5'-CAGCGCACTT-3' zu 5'-TCCTGCAGCA-3' und pRL17-2 mit Änderung der Sequenz *upstream* des konservierten Nonamers von 5'-AAGTGCGCTG-3' zu 5'-GGCTGCAGAT-3'. In beiden Fällen ist die Basenpaarung innerhalb des Bereichs inverser Repetition und damit die Ausbildung einer Haarnadelstruktur aufgehoben. In pRL17-3 wurde der Bereich inverser Repetition sowohl *upstream* als auch *downstream* derart modifiziert (5'-TGCTGCAGGA...TCCTGCAGCA-3'), dass die Sequenzspezifität zwar aufgehoben, Basenpaarung und damit die Möglichkeit der Ausbildung einer Haarnadelstruktur weiterhin gegeben war. Die Konstruktion dieser Reportergenplasmide ist im Folgenden näher beschrieben.

4.13.1 Konstruktion der Luziferase Reportergenplasmide

Die Konstruktion der Reportergenplasmide pRL16-1, pRL16-2, pRL16-3 und pRL16-4 erfolgte über PCR aus den Plasmiden pOP16-1 und pOP16-2 mit dem Primerpaar

F436neu/B437, pOP16-3 mit dem Primerpaar F436neu/B444 und pOP16-4 mit dem Primerpaar F436neu/B445. Die Konstruktion von pRL16-12 und pRL16-34 erfolgte über PCR aus den Plasmiden pOP16-12 mit dem Primerpaar F436neu/B437 und pOP16-34 mit dem Primerpaar F436neu/B455. Über die mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen KpnI und XbaI wurden die PCR-Fragmente nachfolgend in den mit KpnI und NheI linearisierten Vektor pGL3-Promotor ligiert.

Die Konstruktion von pOP16, pOP16-1, pOP16-2, pOP16-3 und pOP16-4 erfolgte über Amplifikation des Replikationsorigins aus dem Plasmid pSK140 (95) mit den Primerpaaren F356m/B358 und F356/B360m (pOP16-1), F357m/B358 und F356/B361m (pOP16-2), F358m/B358 und F356/B362m (pOP16-3), F359m/B358 und F356/B363m (pOP16-4), nachfolgendem Schneiden mit BglII, EcoRI und BamHI und Ligation in den mit EcoRI und BamHI linearisierten Vektor pUC19. Die Konstruktion von pOP16-12 und pOP16-34 erfolgte über Amplifikation des Replikationsorigins aus den Plasmiden pRP16-1 und pRP16-3 (93) mit den Primerpaaren F382/B358 (pRP16-2) bzw. F383/B358 (pRP16-3). Über die mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen BglII und EcoRI wurden die PCR-Fragmente nachfolgend in die mit BglII und EcoRI linearisierten Plasmide pOP16-2 (F382/B358) und pOP16-4 (F383/B358) inseriert.

Für die Konstruktion von pRL17-1, pRL17-2 und pRL17-3 wurden jeweils zwei Hybridisierungsreaktionen mit synthetischen Oligonukleotiden in getrennten Ansätzen durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide bzw. die resultierenden Hybride werden nachfolgend für jeden der drei Reportergenplasmide aufgeführt. pRL17-1: F467/B468 und F469/B470, pRL17-2: F471/B472 und F473/B474, pRL17-3: F475/B476 und F477/B470. Die Hybride wurden sukzessive in den mit MscI und BglII linearisierten Vektor pRL16-34 (s.o.) ligiert.

Alle Konstrukte wurden in der Sequenzierung auf den Einbau fehlerhafter Nukleotide untersucht.

Die Replikationsaktivität von PCV1-Rep/Rep' (pORF4A) gegenüber dem modifizierten viralen Replikationsorigin (pRL16-Variante) wurde nach Kotransfektion in PK15-Zellen anhand der Messung der Reporterexpression bestimmt und mit der Luziferaseaktivität des jeweiligen Replikons in Abwesenheit der Replikationsenzyme verglichen. Die Erhöhung der Kopienzahl des Reportergenplasmids durch Replikation wird als Anstieg der Luziferaseaktivität verzeichnet. Als Negativkontrolle dienten die Plasmide pORF4A (Rep/Rep') und pGL3-p, letzteres kodiert zwar die Luziferase unter Kontrolle des späten

SV40-Promotors, trägt jedoch nicht den *in cis* aktiven Replikationsorigin. Die Luziferaseexpression ausgehend von pRL16 in Kotransfektion mit pORF4A war das Maß für die Aktivität der Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber einem in seiner Sequenz dem Wildtyp entsprechenden Replikationsorigin und diente als Positivkontrolle.

4.13.2 Die Hexamere H1 und H2 sind in ihrer spezifischen Sequenz essentiell für die virale Replikation in PK15-Zellen

Mit Hilfe des Replikationsassays (96) wurde die Bedeutung der Hexamere sowie des Bereichs inverser Repetition innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 in Bezug auf die virale Replikation in transfizierten PK15-Zellen demonstriert.

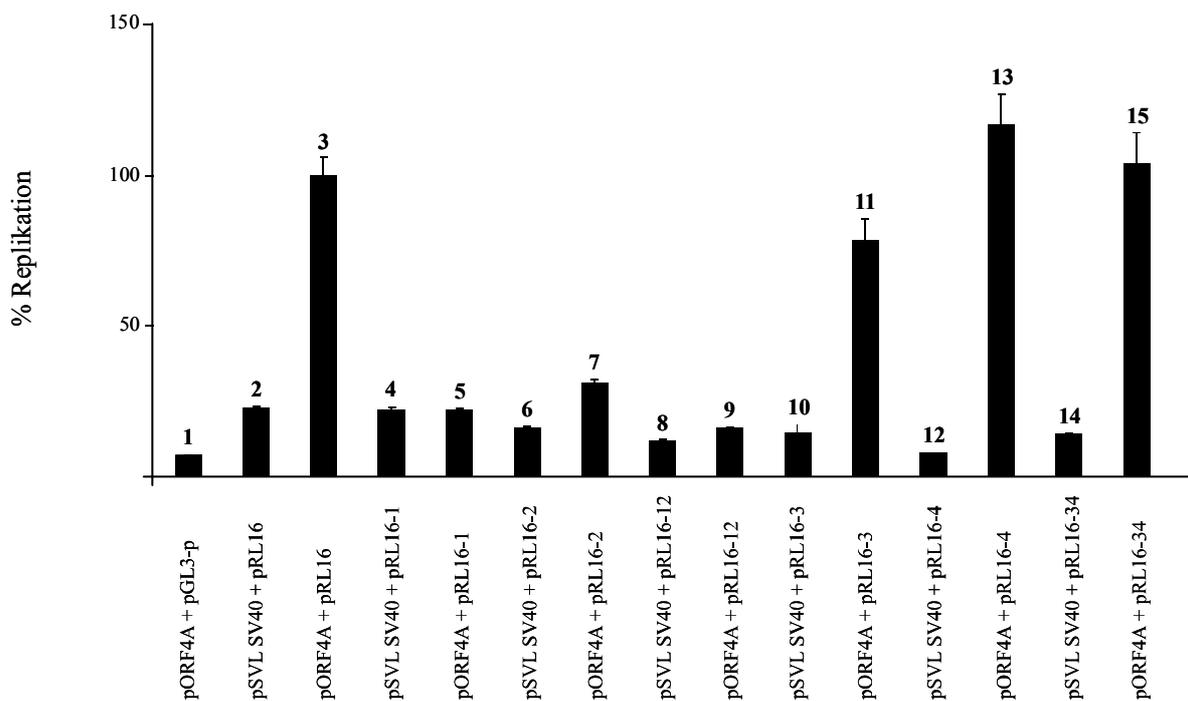


Abb. 4.25. Die iterativen Sequenzen innerhalb des PCV1-Replikationsorigins sind von unterschiedlicher Bedeutung für die virale Replikation in PK15-Zellen. Die Bedeutung der Hexamere H1-H4 des PCV1-Replikationsorigins für die virale Replikation wurde in einem Luziferase basierten Replikationsassay untersucht. Die Replikationsaktivität von PCV1-Rep/Rep' (pORF4A) wurde sowohl gegenüber dem unveränderten (pRL16) als auch dem in seinen Hexameren mutierten Replikationsorigin (pRL16-Derivate) bestimmt und mit der Replikationsrate des Replikons in Abwesenheit der Replikationsproteine (pSVL-SV40) verglichen (Balken 2-15). Plasmid pGL3-p trägt das Reportergen ohne den viralen Replikationsorigin und repräsentiert die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine in Abwesenheit des *in cis* aktiven Elements (Spur 1).

In Abbildung 4.25 ist der Einfluss der Hexamere H1, H2, H3, H4 innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 auf die Rep/Rep' vermittelte Replikation in PK15-Zellen gezeigt. Die durch die spezifische Aktivität von Rep und Rep' vermittelte Replikation von pRL16 wurde durch den Anstieg der Reporterexpression in Anwesenheit der Replikationsproteine (Balken 2 und 3) im Vergleich zur Negativkontrolle pGL3-p (Balken 1) verdeutlicht. Nach Mutation der Hexamere H1 oder H2 (Balken 4-7) bzw. der beiden aufeinanderfolgenden Hexamere H1 und H2 (Balken 8 und 9) war im Falle von pRL16-2 eine deutlich reduzierte Replikationsrate und für pRL16-1 und pRL16-12 ein kompletter Verlust der Replikation zu beobachten. Die Replikationsrate der Plasmide pRL16-3, pRL16-4 und pRL16-34 war hingegen der des unveränderten Replikationsorigins vergleichbar (Balken 10-15), denn weder durch Mutation der einzelnen Motive H3 oder H4 noch der beiden aufeinanderfolgenden Hexamere H3 und H4 wurde die Funktion des Replikationsorigins beeinflusst. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass (i) die Hexamere H1 und H2 für die Replikation essentiell sind, (ii) die Hexamere H1 und H2 für die virale Replikation ausreichend sind und (iii) die Funktion von H1/H2 nicht durch H3/H4 kompensiert werden kann.

4.13.3 Der Bereich der inversen Repetition ist in seiner spezifischen Sequenz essentiell für die virale Replikation in PK15-Zellen

Abbildung 4.26 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses des Bereichs inverser Repetition innerhalb des Replikationsorigins von PCV1 auf die Rep/Rep'-vermittelte Replikation in PK15-Zellen. Modifikation der Sequenz des Bereichs inverser Repetition hatte eine starke Einschränkung (pRL17-2) bzw. den kompletten Verlust der Replikationsaktivität (pRL17-1) zur Folge (Balken 4-7). Auch die Modifikation der Nukleotidsequenz unter Erhalt einer möglichen Basenpaarung und damit des Sekundärstrukturelements in Plasmid pRL17-3 resultierte nicht in einer Regeneration der Funktion des Replikationsorigins (Balken 8 und 9).

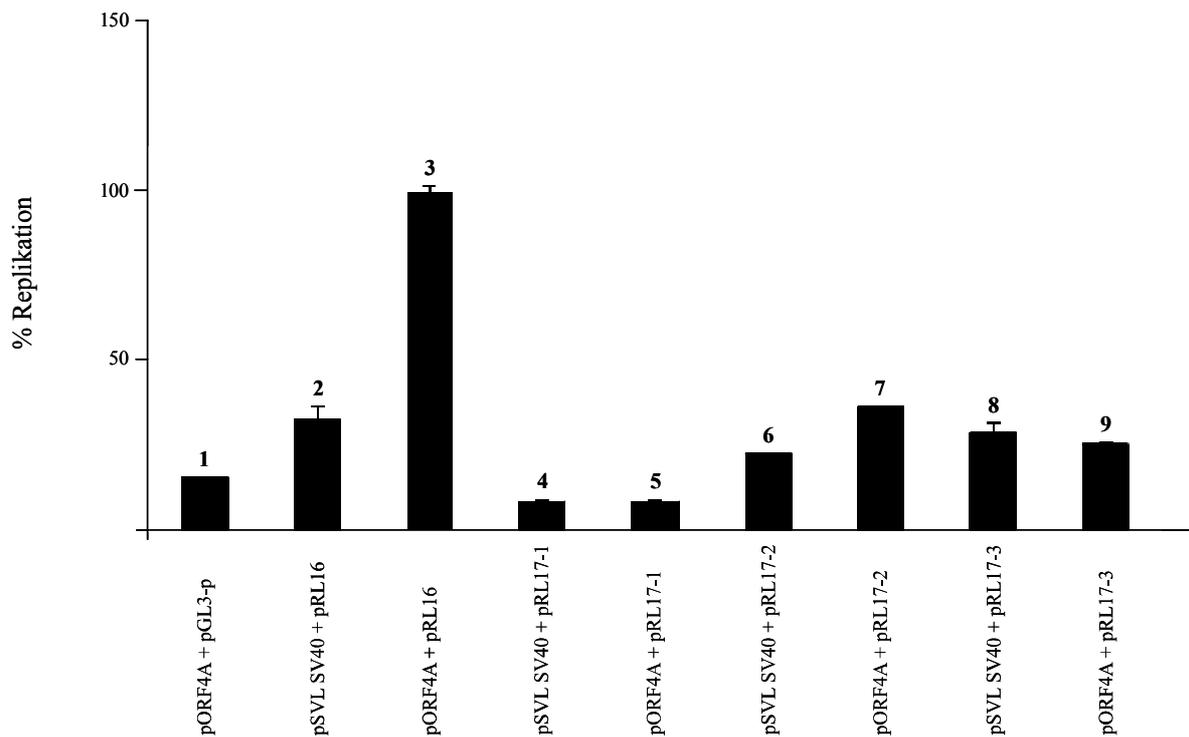


Abb. 4.26. Der Bereich inverser Repetition des PCV1-Replikationsorigins ist für die virale Replikation in PK15-Zellen von essentieller Bedeutung. Die Replikationsaktivität von PCV1-Rep/Rep' (pORF4A) wurde sowohl gegenüber dem unveränderten (pRL16) als auch dem im Bereich der inversen Repetition mutierten (pRL16-Derivate) Replikationsorigin über einen Luziferase basierten Replikationsassay bestimmt und mit der Replikationsrate des Replikons in Abwesenheit der Replikationsproteine (pSVL-SV40) verglichen (Balken 2-9). Plasmid pGL3-p trägt das Reportergen ohne den viralen Replikationsorigin und repräsentiert die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine in Abwesenheit des *in cis* aktiven Elements (Spur 1).

Zusammenfassung

- ▶ Die spezifische Sequenz der Hexamere H1 und H2 ist für die PCV1-Replikation in PK15-Zellen ausreichend
- ▶ Der Verlust der Hexamere H3 und H4 hat hinsichtlich der PCV1-Replikation in PK15-Zellen keine Auswirkung.
- ▶ Der Bereich inverser Repetition, der vermutlich zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur führt, ist in seiner Sequenzspezifität essentiell für die Funktionalität des viralen Replikationsorigins.