

5. DISKUSSION

Porcine Circoviren (PCV) treten in zwei Varianten auf (PCV1 und PCV2), von denen bislang nur für PCV2 pathogene Eigenschaften beschrieben sind. PCV2 ist der Erreger des Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen, dessen komplexe Pathogenesemechanismen bislang nicht verstanden sind. Immunopathologische Befunde lassen darauf schließen, dass an PMWS erkrankte Schweine nicht in der Lage sind, eine wirkungsvolle Immunantwort aufzubauen. PCV1 dagegen ist apathogen. Die Tatsache, dass die Viren über ein kleines, hoch konserviertes Genom verfügen, lässt die Identifizierung von Faktoren möglich erscheinen, die die differentielle Pathogenese von PCV1 und PCV2 beeinflussen. Besondere Berücksichtigung in der hier vorliegenden Arbeit findet die Aufklärung des Replikationsmechanismus, der zum Einen Bedeutung für die Grundlagenforschung hat, zum Andern aber auch Ansätze für eine mögliche Therapie und Kontrolle von PCV-induzierten Erkrankungen bietet.

Ziel dieser Arbeit war es, den Replikationsmechanismus der porcinen Circoviren aufzuklären. Die *in cis* und *in trans* aktiven Elemente der PCV-Replikation sind bekannt: Der Replikationsursprung, der durch eine potentielle Haarnadelstruktur mit einem konservierten Nonamermotiv innerhalb des einzelsträngigen Bogenbereichs sowie eine Abfolge von Hexamer- und Pentamersequenzen charakterisiert ist, ist das *in cis* aktive Element. *In trans* agieren die beiden Replikationsproteine Rep und Rep'. Rep' stellt eine verkürzte Spleißvariante von Rep dar, die eine abweichende C-terminale Aminosäuresequenz aufweist. Aus diesem Grunde fehlt dem Rep'-Protein die GKS Box, eine Domäne, die vielfach eine zentrale Rolle hinsichtlich der dNTP-Bindung und Hydrolyse spielt. Die N-terminal lokalisierten konservierten Motive I, II und III wiederum, welche in allen Enzymen konserviert sind, die Replikation über den *rolling circle* Mechanismus (RCM) vermitteln, sind beiden PCV-Replikationsproteinen gemeinsam.

Unter einzelsträngigen DNA-Replikons, die über *rolling circle* Replikation (RCR) replizieren, sind Restriktion und Ligation der DNA von essentieller Bedeutung für die Multiplikation der genetischen Information. Nach Infektion wird die einzelsträngige DNA durch die Aktivität einer Polymerase der Wirtszelle in die replikative doppelsträngige Form überführt. Die RCR

wird nach sequenzspezifischer Bindung der Replikase an den doppelsträngigen Replikationsorigin (*dso*) durch die Katalyse eines Einzelstrangbruchs innerhalb des Plusstrangs initiiert. Die Replikase wird dabei häufig kovalent mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs verknüpft. Die Generierung eines einzelsträngigen Bogenbereichs als Bestandteil einer Haarnadel- bzw. Kreuzstruktur innerhalb des *dso* ist dabei vielfach unmittelbare Voraussetzung hinsichtlich der Restriktionsaktivität des jeweiligen Replikationsproteins. Während die aus der Initiation resultierende 3'-Hydroxygruppe als Primer für die nachfolgende Elongation-katalysiert durch eine zelluläre Polymerasefunktion-fungiert, wird die 5'-Phosphatgruppe durch den wachsenden Strang verdrängt. Nach Beenden einer vollständigen Syntheserunde wird der naszierende DNA-Strang erneut sequenzspezifisch innerhalb des neu gebildeten Replikationsorigins geschnitten, entweder katalysiert durch die gleiche Polypeptidkette oder aber eine weitere Untereinheit in einem Dimer bzw. Oligomer höherer Ordnung. Dabei wird das 5'-Phosphat der ersten Restriktion mit der neu generierten 3'-Hydroxygruppe verknüpft, was in der Freisetzung einzelsträngiger zirkulär geschlossener Genome resultiert.

Anders als im Falle der Nano- und Geminiviren sind zwei viral kodierte Proteine, Rep und Rep', für die Replikation von PCV essentiell. Für beide Replikationsproteine ist ein multifunktionseller Charakter dieser Enzyme beschrieben (90). Für beide Proteine konnte Bindung an den *dso* über eine äquivalente minimale Bindesequenz (MBS, Minimal Binding Site) sowie Kollokalisierung in infizierten und transfizierten Zellen demonstriert werden. Lediglich das Rep-Protein besitzt die Fähigkeit den eigenen Promotor negativ zu regulieren.

Eine Reihe konservierter Motive sowohl innerhalb der Aminosäuresequenz der Replikationsproteine als auch der Nukleotidsequenz des viralen Replikationsorigins lassen die genomische Multiplikation von PCV über RCR vermuten: Auf Aminosäureebene sind die Motive I, II und III der PCV-Replikationsproteine Rep und Rep' gemeinhin Bestandteile von Replikasen, die Replikation über RCR vermitteln (67). Eine C-terminal lokalisierte GKS-Box des Rep-Proteins spezifiziert den P-Loop der Phosphatbindungsstelle einer Reihe von NTP-bindenden oder hydrolysierenden Enzymen (163). Der Aktivitätsverlust der Replikationsproteine bei Mutagenese eines jeden dieser vier Motive demonstriert deren essentielle Bedeutung für die virale Replikation im DpnI-Assay (94). Auf Nukleotidebene verleiht ein Bereich inverser Repetition dem Replikationsorigin von PCV das Potential eine Haarnadelstruktur auszubilden. Im einzelsträngigen Bogenbereich einer solchen Sekundärstruktur wäre das in allen Gemini-, Nano- und Circoviren hoch konservierte Nonamer 5'-T/A¹AGTATTAC⁹-3' lokalisiert. In vorangegangenen Studien konnten die an

den Bereich inverser Repetition angrenzenden iterativen Sequenzen H1 (5'-C¹GGCAG⁶-3') und H2 (5'-C¹GGCAG⁶-3') als Bestandteil der MBS hinsichtlich der Bindung von Rep und Rep' an Teilfragmente des Replikationsorigins *in vitro* identifiziert werden (142).

Ziel dieser Arbeit war es, den Replikationsmechanismus von PCV aufzuklären.

5.1 Restriktion und Ligation des Replikationsorigins durch die PCV-Replikationsproteine Rep und Rep'

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Restriktion und Ligation des viralen Replikationsorigins durch die Replikationsproteine Rep und Rep' von PCV *in vitro* demonstriert. Die Ergebnisse zeigen, dass Rep und Rep' die RCR durch Bruch der Phosphodiesterbindung innerhalb des konservierten Nonamers initiieren. Mit mutierten und verkürzten Oligonukleotiden wurde der Einfluss der Sequenz und Sekundärstruktur des Replikationsorigins von PCV1 auf die Initiation der Replikation durch Rep und Rep' analysiert.

Während nach Sequenzvariation des gesamten Nonamers oder auch nur der ersten vier Nukleotide keine Restriktion der verwendeten Substrate mehr zu beobachten war, wurde die Katalyse durch Mutation der Nukleotide eins bis drei nicht beeinflusst. Demzufolge sind für die Restriktion von synthetischen Originfragmenten *in vitro* nur die letzten sechs Nukleotide 5'-T⁴ATTAC⁹-3' des Nonamers in ihrer Sequenz maßgeblich. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie demonstriert, dass die sechs aufgeführten Nukleotide (in Fettdruck hervorgehoben) innerhalb des Oktamers 5'-A²xT**A**xT**A**C⁹-3' für die virale Replikation von PCV in PK15-Zellen essentiell sind (17, 19). Es ist nachfolgenden Studien vorbehalten, zu klären, ob möglicherweise auch einzelne Nukleotide innerhalb des Hexamers 5'-T⁴ATTAC⁹-3' variabel sind bzw. deren Verlust durch die Nukleotide eins bis drei (5'-T¹AG³-3') kompensiert werden kann, um eine effiziente Restriktion *in vitro* zu gewährleisten.

Eine Abhängigkeit der Restriktion *in vitro* von den Sequenzen *upstream* und *downstream* des Nonamers, welche die Schenkel einer potentiellen Haarnadelstruktur bilden, wurde nicht beobachtet. Innerhalb der verwendeten Substrate war über die eingeführten Sequenzvariationen die Ausbildung einer Haarnadelstruktur aufgrund fehlender Basenpaarung inhibiert. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Restriktion des Replikationsorigins *in vitro* nicht von diesem Sekundärstrukturelement abhängig ist.

Der Bereich *downstream* des Nonamers ist Bestandteil der MBS von Rep und Rep'. Diese Sequenz wurde für die *in vitro* Bindung von PCV-Rep und -Rep' an doppelsträngige Oligonukleotide identifiziert (142), sie stellt andererseits keine unmittelbare Voraussetzung hinsichtlich der Restriktion einzelsträngiger Substrate *in vitro* dar, denn eine Veränderung der Nukleotidsequenz *downstream* des Nonamers und der angrenzenden Hexamere H1 und H2 resultierte nicht in einer Inhibition der Restriktion durch die PCV-Replikationsproteine. Die Restriktion einzelsträngiger Originfragmente ist demnach unabhängig von der spezifischen Sequenz dieser Elemente. Diese Tatsache steht im Einklang mit Ergebnissen, die für die PCV1-Replikation in PK15-Zellen publiziert worden sind und die eine Interaktion der Replikationsproteine mit dem Replikationsorigin über das Nonamer postulieren (18, 20). Die Rep/Rep'-katalysierte Restriktion des Replikationsorigins *in vitro* nach Mutation des gesamten Bereichs inverser Repetition bestätigt diese Studien.

Vergleiche der Intensitäten des Edukts und Produkts offenbarten einen Unterschied hinsichtlich des Reaktionsgleichgewichts. Während bei Änderung der Nukleotidsequenz *downstream* des Nonamers die Restriktion des Substrats und die Religation der Schnittprodukte im Gleichgewicht standen, lag im Falle von Mutationen *upstream* des Nonamers das Gleichgewicht auf der Seite des 5'-Schnittprodukts. Dass in letzterem Falle die Religation aufgrund der Sequenzvariation in einem höheren Masse eingeschränkt ist, belegen Untersuchungen bezüglich des Einflusses dieser Sequenzen auf die Ligation (s.u.).

Unabhängig von der spezifischen Sequenz der Hexamere H1 und H2 wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung von PCV1-Rep und -Rep' an einzelsträngige Originfragmente demonstriert (Daten nicht gezeigt). Neben der *in vitro* Bindung des *dso* über die MBS (142) ist damit auch die Interaktion mit einzelsträngiger DNA *in vitro* (als Voraussetzung für die Restriktion) gezeigt.

Darüber hinaus wurde die Bedeutung der Hexamere H1 und H2 für die Replikation von PCV1 in PK15-Zellen untersucht. Durch Mutation beider oder auch nur eines der Hexamere wurde die Aktivität des *in cis* aktiven Replikationsorigins nahezu vollständig inhibiert. Eine Kompensation durch die Hexamere H3/H4, die in Bezug auf die Bindung an einzelsträngige Originfragmente *in vitro* demonstriert wurde (142), trat nicht auf. Diese Daten bestätigen die Bindungsstudien für Rep und Rep' *in vitro*, welche eine Interaktion der Replikationsproteine mit der replikativen Form von PCV über die MBS, einschließlich der Hexamere H1/H2, demonstrieren. Die Ergebnisse implizieren weiterhin, dass sowohl die Bindung an den *dso* als

auch an das einzelsträngige Nonamer zwei Ereignisse innerhalb des viralen Replikationszyklus darstellen, die über unterschiedliche Sequenzelemente vermittelt werden. Im Gegensatz zur Restriktion wird die Ligation *in vitro* durch Sequenzvariationen innerhalb des Bereichs inverser Repetition entscheidend beeinflusst. Während nach Mutationen *downstream* des Nonamers die Ligation nahezu vollständig inhibiert war, konnte nach Mutationen *upstream* des Nonamers keinerlei Ligationsprodukt mehr detektiert werden. Wie bereits erwähnt (s.o.) wird durch diese Untersuchungen zur Ligation bestätigt, dass im Falle von Oligonukleotiden mit Mutationen *upstream* des Nonamers die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts nach Restriktion ursächlich auf die inhibierte Religation der Schnittprodukte zurückzuführen ist. Weiterhin wurde durch Mutationen, die die Spezifität der Nukleotidsequenz *upstream* und *downstream* des Nonamers unter Gewährleistung einer möglichen Basenpaarung aufhoben, die Ligationsaktivität vollständig wiederhergestellt. Diese Ergebnisse belegen, dass hinsichtlich der Ligation einzelsträngiger Originfragmente *in vitro* die Basenpaarung der verwendeten Substrate die Voraussetzung ist, um eine effiziente Katalyse zu gewährleisten. Dabei wird vermutlich über Basenpaarung die für die Ligation notwendige räumliche Nähe beider DNA-Stränge geschaffen. Darüber hinaus steht die Basenpaarung im Hinblick auf die Termination der viralen Replikation in Zusammenhang mit der Ausbildung einer potentiellen Haarnadelstruktur als Voraussetzung für die Katalyse des zweiten Einzelstrangbruchs im Bereich des Nonamers. Aufgrund des beobachteten Unterschieds bezüglich des Reaktionsgleichgewichts sowohl der Restriktion als auch der Ligation ist dem Bereich *upstream* des Nonamers in seiner spezifischen Sequenz hinsichtlich der Termination der viralen Replikation eine größere Bedeutung beizumessen.

Nach Infektion der Zielzelle wird das PCV-Genom vermutlich durch eine zelluläre Polymerase in die replikative doppelsträngige Form überführt. Die RCR *in vivo* wird also innerhalb des *dso* initiiert. Eine Restriktion doppelsträngiger Originfragmente *in vitro* wurde allerdings nicht beobachtet, was die Ausbildung eines einzelsträngigen Bereichs innerhalb des *dso* impliziert. Durch Formation einer Haarnadelstruktur wird vermutlich der für die Initiation der RCR innerhalb des *dso* erforderliche einzelsträngige Bereich zur Verfügung gestellt. Dieses Sekundärstrukturelement konnte unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen *in vitro* nicht ausgebildet bzw. stabilisiert werden.

Superhelikale DNA-Strukturen sind oft im Bereich von DNA-Replikationsorigins, Promotoren und an Stellen der DNA-Rekombination lokalisiert. Innerhalb bakterieller

Promotorbereiche wird über derartige Topologieveränderungen die Bindung der RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren sowie der Übergang von geschlossenen zu offenen Promotorkomplexen ermöglicht. Um die Sequenzspezifität der viralen Replikation in transient transfizierten Zellen zu untersuchen, muss also die Generierung zirkulär kovalent geschlossener Plasmide gewährleistet sein, um das Auftreten superhelikaler Spannungen zu garantieren, andernfalls würde Transkription des Reportergens im Luziferase basierten Replikationsassay nicht auftreten. Die Generierung zirkulär kovalent geschlossener Plasmide kann jedoch einzig durch die Rep/Rep'-katalysierte Termination der viralen Replikation gewährleistet werden, deren Abhängigkeit von einer Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition *in vitro* in dieser Arbeit demonstriert werden konnte. Die Kodierung des Terminationssignals durch den Replikationsorigin ist ein generelles Charakteristikum derjenigen Replikons, die über RCR replizieren (66). So wurde für die Termination der Plusstrangsynthese des Phagen ϕ 1 u.a. der Einfluss der Nukleotidsequenz *upstream* des Palindroms gezeigt (29). Da hinsichtlich der Ligation einzelszträngiger Originfragmente *in vitro* Mutationen *downstream* besser kompensiert wurden als Mutationen *upstream* des Nonamers, scheint die Spezifität beider Sequenzen auch für die Termination der PCV-Replikation von Bedeutung zu sein. Jegliche Einflussnahme, etwa um nach Mutation über fehlende Basenpaarung die Bedeutung einer Haarnadelstruktur für die Replikation in transfizierten Zellen zu analysieren, ist demzufolge auch ein Eingriff in die Termination der viralen Replikation: Plasmide, die den mutierten viralen Replikationsorigin trugen, der in der Ausbildung einer Haarnadelstruktur inhibiert war, zeigten keine Replikationsaktivität in Gegenwart der Replikationsproteine Rep und Rep'. Einerseits ist in beiden Fällen die Ausbildung einer Haarnadelstruktur inhibiert, was die Relevanz dieses Sekundärstrukturelements für die PCV-Replikation verdeutlicht, andererseits interferieren die gleichen Sequenzvariationen mit dem Signal für die Termination. War die Sequenzspezifität nicht aber die Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition aufgehoben, war ebenfalls keine Replikationsaktivität des entsprechenden Plasmids messbar. Aus diesem Ergebnis lässt sich die Lokalisation eines möglichen Terminationssignals innerhalb dieses Bereichs allerdings nicht ableiten. Denn selbst wenn das Terminationssignal nicht innerhalb dieses Bereichs lokalisiert wäre, so wäre schon durch Mutation der MBS-Sequenz *downstream* des Nonamers die Bindung der Replikationsproteine an den Replikationsorigin und damit die Replikation inhibiert.

Die Ergebnisse der *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass die Initiation der viralen DNA-Replikation von der Ausbildung einer Haarnadelstruktur und die Termination von

spezifischen Sequenzen *upstream* und *downstream* des Nonamers abhängt. Für die Replikation ist der erfolgreiche Ablauf aller Einzelschritte erforderlich, welche sich in ihren Sequenzanforderungen überschneiden. Der Einfluss des Bereichs inverser Repetition auf die Initiation und Termination der viralen Replikation in Zellkultur könnte in einem neuen Testsystem bestimmt werden. In dieser Hinsicht gibt es Überlegungen, Plasmide zu konstruieren, welche zwei Replikationsorigins tragen, von denen jeweils nur einer in der Sequenz *upstream* oder *downstream* des Nonamers mutiert ist. Über die Größe der entstehenden Produkte sollen Rückschlüsse auf die Initiation bzw. Termination der PCV-Replikation in diesem System geschlossen werden.

Der Replikationsorigin von PCV1 und PCV2 ist mit einer Homologie von 79,5% der Nukleotide hoch konserviert. Neben einer Restriktions- und Ligationsaktivität gegenüber dem eigenen Replikationsorigin wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine katalytische Aktivität der PCV1-Replikationsproteine gegenüber Originfragmenten von PCV2 *in vitro* demonstriert. Beide PCV-Varianten werden von PCV1-Rep und -Rep' zwischen den Nukleotiden sieben und acht innerhalb des konservierten Nonamers 5'-T¹AG/ATATT↓AC⁹-3' des viralen Plusstrangs geschnitten. Die gleichen Ergebnisse wurden für die Replikationsproteine von PCV2 erzielt und bestätigen die Austauschbarkeit der Replikationsfaktoren Rep und Rep' beider Viren hinsichtlich der Replikation in PK15-Zellen (96) auf der Basis ihrer molekularen Funktionen *in vitro*. In diesem Zusammenhang lässt die weitreichende Übereinstimmung des viralen Replikationsorigins auf Ebene der Nukleotidsequenz einen ähnlichen Einfluss der konservierten Sequenzen beider Viren auf die Initiation und Termination der viralen Replikation vermuten. Vorangegangene Studien, welche identische minimale Sequenzanforderungen für eine effiziente Interaktion der Proteine mit dem Replikationsorigin demonstrieren (142), bekräftigen diese Vermutung.

5.2 Funktion der konservierten Sequenzen innerhalb der Replikationsproteine im Hinblick auf die virale Replikation

Die Abhängigkeit der viralen Replikation von den konservierten Aminosäuremotiven I (F¹⁶TLNN²⁰), II (H⁵⁴LQGF⁵⁸) und III (Y⁹³CSKE⁹⁷) und der C-terminal lokalisierten GKS-Box (G¹⁷⁶-X-X-X-X-G-K/S¹⁸²) des Rep-Proteins wurde bereits beschrieben (94). Mutanten, welche eine Variation der Aminosäuresequenz in den Motiven I und II trugen, zeigten darüber

hinaus keine Restriktionsaktivität gegenüber einzelsträngigen Originfragmenten *in vitro*. Um zu garantieren, dass die Mutagenese nicht zu einem weitreichenden Funktionsverlust geführt hatte, wurde die grundsätzliche Funktionalität beider *loss of function*-Mutanten durch die Katalyse der ATP-Hydrolyse demonstriert. In Korrelation mit dem vollständigen Verlust der Replikationsaktivität der mutagenisierten Replikationsproteine in PK15-Zellen wurde auf diese Weise die Beteiligung der Motive I und II an der Initiation des viralen Replikationszyklus verdeutlicht. Während in Analogie zu Metalloenzymen über die Rolle von Motiv II als Koordinationsstelle von bivalenten Kationen spekuliert wird, welche für die Restriktion einzelsträngiger Originfragmente essentiell sind, ist die Funktion von Motiv I innerhalb des viralen Replikationszyklus bislang ungeklärt.

Unter Enzymen, welche die Replikation über RCR vermitteln, wird der strang- und sequenzspezifische Bruch der Phosphodiesterbindung zumeist durch den nukleophilen Angriff eines konservierten Tyrosinrests katalysiert (27, 67). In einer Transesterifizierung fungiert dessen OH-Gruppe als das die Phosphodiesterbindung angreifende Nukleophil und wird nachfolgend mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs kovalent verknüpft. Im Gegensatz zur Hydrolyse ist die Transesterifizierung mit der Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung und somit mit dem Erhalt der Bindungsenergie verbunden. Eine nachfolgende Ligationsreaktion kann daher unabhängig von ATP erfolgen. Darüber hinaus wird durch Maskierung des 5'-Phosphats eine vorzeitige Religation und damit ein Abbruch der DNA-Synthese inhibiert. So sind Tyrosin-103 des *Tomato yellow leaf curl virus* und Tyrosin-79 des *Faba bean necrotic yellows virus* Rep-Proteins als die aktiven Aminosäuren beschrieben, welche die Restriktion des viralen Replikationsorigins katalysieren (82, 149). Beide Replikationsproteine werden nachfolgend über einen Tyrosylester mit dem 3'-Schnittprodukt kovalent verknüpft. Wie im Falle der Transposon-kodierten $\gamma\delta$ Resolvase kann alternativ zu einem Tyrosinrest die Initiation der Replikation auch durch einen konservierten Serinrest katalysiert werden (109, 128). Die nachfolgende kovalente Verknüpfung des Proteins mit der DNA wird als Phosphoserin etabliert. Das N-terminal lokalisierte konservierte Motiv III (Y⁹³CS⁹⁵KE) der Replikationsproteine von PCV umfasst sowohl einen Tyrosinrest an Position 93 als auch einen Serinrest an Position 95. Der Austausch von Tyrosin-93 des Rep-Proteins von PCV1 zu Phenylalanin resultierte in einem Aktivitätsverlust sowohl hinsichtlich der Katalyse des Einzelstrangbruchs als auch der Replikation in PK15-Zellen. Das konservierte Motiv III ist demnach essentiell für die Initiation der viralen Replikation. Das Tyrosin-93 fungiert dabei als katalytisches Zentrum, dessen nukleophiler Angriff in dem Bruch der Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden sieben und acht

innerhalb des konservierten Nonamers resultiert. Die Änderung des Tyrosin zu Phenylalanin hatte keinen Einfluss auf die Bindung der Mutante an doppelsträngige Originfragmente sowie die Hydrolyse von ATP in einem ATPase-Assay *in vitro*. Diese Ergebnisse demonstrieren einerseits die Unabhängigkeit der Restriktion einzelsträngiger Oligonukleotide von der Bindung an den *dso*, ein erster Beleg dafür, dass Interaktion über die MBS und Restriktion des einzelsträngigen Nonamers aufeinanderfolgende Ereignisse innerhalb des viralen Replikationszyklus repräsentieren könnten (s.o.) und nicht zwangsläufig von ein und demselben Rep-Monomer bzw. Oligomer katalysiert werden müssen. So wäre eine erste Interaktion des Replikationsproteins mit dem Replikationsorigin über die MBS und die resultierende Induktion bzw. Stabilisation einer Haarnadelstruktur als Voraussetzung für die Bindung eines zweiten Rep-Proteins innerhalb des einzelsträngigen Bogenbereichs mit anschließender Restriktion des Nonamers denkbar (105). Andererseits sind sie Beleg für die grundsätzliche Funktionalität des mutanten Rep-Proteins, d.h. der Verlust der Restriktionsaktivität ist nicht auf eine fehlerhafte Tertiärstruktur zurückzuführen. Weiterhin konnte die kovalente Verknüpfung des Proteins mit dem 5'-Phosphat des 3'-Schnittprodukts demonstriert werden, welche über einen Tyrosylester etabliert wird. Die Ausbildung dieser kovalenten Verknüpfung erklärt die Unabhängigkeit der Rep/Rep'-katalysierten Restriktion einzelsträngiger Originfragmente *in vitro* von ATP, obwohl in Anwesenheit dieses Kofaktors eine verstärkte Produktbildung im Falle des Rep-Proteins beobachtet wurde. Im Falle des Rep'-Proteins war kein Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins gegenüber einzelsträngigen Originfragmenten *in vitro* zu verzeichnen. Aufgrund dieser Ergebnisse - und aufgrund der Tatsache, dass das Rep'-Protein aufgrund des Spleißvorgangs keine GKS-Box spezifiziert - wird eine Beteiligung der C-terminal lokalisierten GKS-Box des Rep-Proteins an einer gesteigerten Substratumsetzung bei Zugabe von ATP postuliert. So wäre beispielsweise eine verstärkte Substrataffinität aufgrund einer Konformationsänderung des Rep-Proteins nach ATP-Bindung bzw. Hydrolyse denkbar. Die Bedeutung der GKS-Box für die Restriktion einzelsträngiger Originfragmente *in vitro* bzw. die PCV-Replikation in transfizierten Zellen wurde mit Hilfe der Mutante RepmutP genauer charakterisiert. Im Vergleich zum Wildtyp war nach Änderung der Aminosäuresequenz an Position 177 von Lysin zu Arginin und an Position 178 von Serin zu Isoleucin nahezu keine verminderte katalytische Aktivität des mutanten Rep-Proteins *in vitro* zu verzeichnen. Durch dieses Ergebnis kann ein Einfluss der GKS-Box auf die Restriktion einzelsträngiger Originfragmente *in vitro* ausgeschlossen werden. Die grundsätzliche Funktionalität der GKS-Box, d.h. die ATPase-Aktivität des Rep-Proteins wurde in dieser Studie erstmalig nachgewiesen. Während die Wildtyp Rep-Proteine

von PCV die Befähigung zur Hydrolyse von ATP besitzen, war nach Mutation der GKS-Box keine katalytische Aktivität mehr zu verzeichnen. Ein möglicher Einfluss der Motive I-III auf die ATP-Hydrolyse wurde durch den Aktivitätsnachweis der entsprechenden Mutanten im ATPase-Assay ausgeschlossen. Im Zusammenhang mit der inhibierten Replikationsaktivität von RepmutP in PK15-Zellen bestätigt das Ergebnis die Abhängigkeit der PCV-Replikation von der ATP-Hydrolyse. Darüber hinaus konnte die Funktion innerhalb des viralen Replikationszyklus eingegrenzt werden, da die spezifische Rep/Rep'-katalysierte Restriktion des viralen Replikationsorigins weder von der ATP-Bindung noch -Hydrolyse abhängig ist. Im Falle des Rep-Proteins des *Tomato yellow leaf curl virus*, eines Geminivirus, dessen Replikation ebenfalls im Zusammenhang mit der Hydrolyse von ATP steht, wurde über eine mögliche Helikasefunktion des Proteins spekuliert (81). Generell werden die geminiviralen Rep-Proteine einer großen Gruppe potentieller Helikasen zugeordnet (42). DNA-Helikasen sind molekulare „Motoren“, welche die Energie der NTP-Hydrolyse nutzbar machen, um energetisch stabile DNA-Hybride aufzutrennen (99, 159). Basierend auf Sequenzvergleichen wurde bereits eine potentielle Helikasedomäne innerhalb des C-Terminus der Rep-Proteine von PCV identifiziert (90), die Homologien zu Helikasen einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA-Viren aufweist (76). Auf dieser Basis wird auch für PCV-Rep eine Helikaseaktivität im Kontext des viralen Replikationszyklus vermutet. Nach Bindung über die MBS an den *dso* könnte Rep durch seine Helikaseaktivität das lokale Aufschmelzen des Doppelstrangs induzieren und damit die Ausbildung einer Haarnadelstruktur im Bereich der inversen Repetition erleichtern bzw. ermöglichen. Durch Bindung und Restriktion des einzelsträngigen Nonamers im Bogenbereich dieser Haarnadelstruktur würde nachfolgend die Initiation der RCR induziert werden. *In vitro* ist eine Helikaseaktivität des Rep-Proteins vermutlich durch die Topologie und Länge der verwendeten Oligonukleotide inhibiert. Eine Erklärung dafür, dass die Restriktion doppelsträngiger Originfragmente *in vitro* auch in Gegenwart von ATP nicht beobachtet wurde und weiterhin die Zugabe doppelsträngiger DNA nicht in gesteigerter ATP-Hydrolyse des Rep-Proteins resultierte.

5.3 Katalytischer Mechanismus der Initiation und Termination der viralen Replikation

Eine superhelikale DNA-Struktur stellt eine wichtige Voraussetzung für die Initiation der Replikation dar (30), z.B. hinsichtlich der Bindung der Replikase an den Replikationsorigin. Nach erster Restriktion ist die DNA relaxiert und infolgedessen für die Termination der viralen Replikation ein anderer Mechanismus anzunehmen, beispielsweise über eine zweite Restriktionsaktivität des nach der ersten Restriktion kovalent mit der DNA verknüpften Enzyms gegenüber dem Replikationsorigin. Auf diese Weise wäre zusätzlich zum Einfluss der Basenpaarung im Bereich der inversen Repetition die räumliche Nähe der DNA-Enden im Hinblick auf die Zirkularisierung gewährleistet. Das aktive Zentrum für die Katalyse des zweiten Bruchs der Phosphodiesterbindung ist dabei entweder auf der gleichen Polypeptidkette oder aber auf einem weiteren Rep/Rep'-Monomer als Bestandteil eines Dimers oder Oligomers höherer Ordnung lokalisiert. Die Befähigung der PCV-Replikationsproteine Rep und Rep' zur Ausbildung homologer und heterologer Komplexe wurde in dieser Arbeit erstmalig demonstriert. Je nach chemischer Struktur der beteiligten Aminosäure sind zwei unterschiedliche katalytische Mechanismen der Initiation und Termination denkbar.

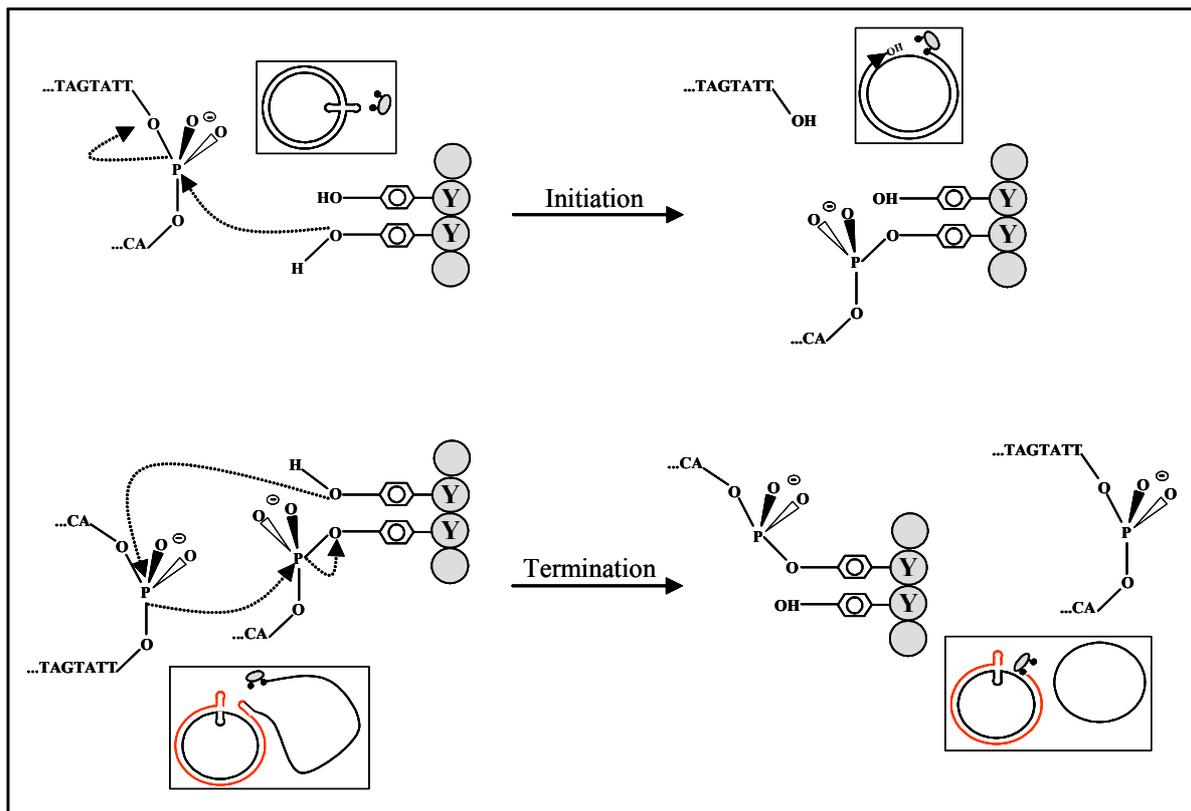


Abb. 5.1. Katalytischer Mechanismus der Initiation und Termination der Replikation am Beispiel des ϕ X174-Rep-Proteins. Verändert nach Van Mansfeld et al., 1986.

Im Fall der Beteiligung zweier Tyrosinreste (alternativ zweier Serinreste) - sei es auf der gleichen Polypeptidkette (53) oder als Bestandteil eines Oligomers (147) - würde das Replikationsprotein über alternierende Tyrosinreste (bzw. Serinreste) nach Termination der viralen Replikation mit der DNA verknüpft bleiben. Basierend auf dem Modell für die Katalyse des ϕ X174-Rep-Proteins ((131, 162) Abb. 5.1) fungiert nach einem nukleophilen Angriff durch den ersten Tyrosinrest die neu gebildete 3'-Hydroxygruppe als Primer für die nachfolgende DNA-Synthese, während das Enzym kovalent mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs verknüpft wird. Nach einer Syntheserunde induziert die Hydroxygruppe des zweiten Tyrosinrests durch einen erneuten nukleophilen Angriff innerhalb des neu synthetisierten Replikationsorigins zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungen. Das Ergebnis ist ein zirkuläres einzelsträngiges DNA-Molekül und die kovalente Verknüpfung des Replikationsproteins mit dem neuen 5'-Ende über einen weiteren Tyrosylester. Die freie 3'-Hydroxygruppe des neu synthetisierten DNA-Moleküls steht erneut als Primer für die Initiation einer weiteren Replikationsrunde zur Verfügung (nicht gezeigt).

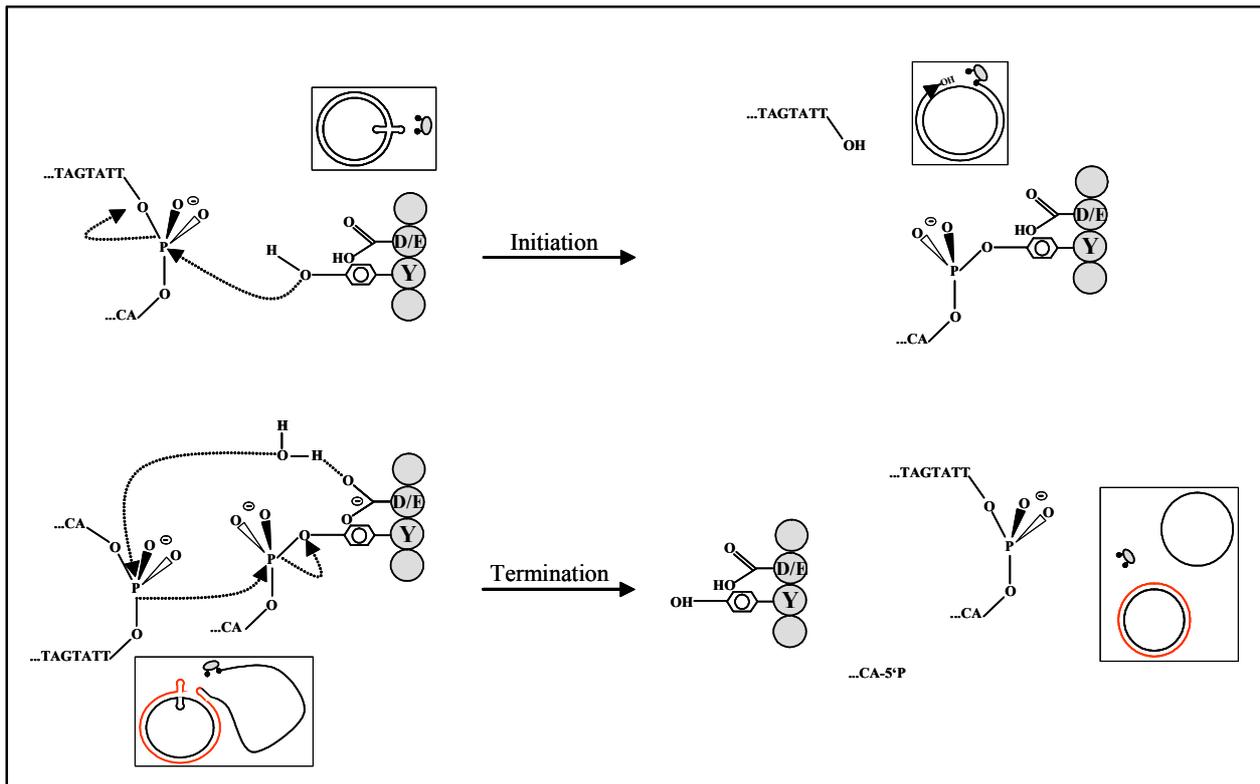


Abb. 5.2. Katalytischer Mechanismus der Initiierung und Termination der Replikation am Beispiel des pC194-RepA-Proteins. Verändert nach Noiro-Gros et al., 1994.

Folgt die Reaktion dem Modell des pC194-RepA-Proteins (114), liefere die Initiierung der Replikation in ganz ähnlicher Weise ab, die enzymatische Katalyse würde sich jedoch auf der Ebene der Termination unterscheiden (Abb. 5.2). In diesem Fall ist das angreifende Nucleophil für die Termination ein Wassermolekül. Die γ -Carboxygruppe eines Aspartat- oder Glutamatrests vermittelt dabei durch Abspaltung eines Protons die Formation des reaktiven Hydroxidions, eine Basenkatalyse wie sie auch für RNase H postuliert wird (114). Die Generierung zirkulärer einzelsträngiger Plusstranggenome (113) resultiert in der Freisetzung des Replikationsproteins und der Regeneration des *dso*. Eine freie 3'-Hydroxygruppe für die Initiierung einer weiteren Replikationsrunde steht nach diesem Mechanismus nicht zur Verfügung.

Das Motiv III 5'-YCSKE-3' der circoviralen Replikationsproteine, welches auch innerhalb der Rep-Proteine der Geminiviren konserviert ist (5'-DVKXYXXKD-3' oder 5'-YXXKD/E/N-3'), könnte die Termination der viralen Replikation sowohl über das Serin-95 als auch über Glutamat-97 in einem diskontinuierlichen Replikationsmodus katalysieren. Aufgrund der kovalenten Verknüpfung des Proteins mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs nach Restriktion vermutlich über einen Tyrosylester ist das Tyrosin-93 hinsichtlich

der zweiten Katalyse blockiert. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Oligomerisierung der Replikationsproteine für die Katalyse der zweiten Restriktion und damit der Termination der viralen Replikation durch Tyrosin-93 als Bestandteil eines weiteren Rep/Rep'-Moleküls wahrscheinlich. Der Frage, ob die Formation homologer und heterologer Komplexe der Replikationsproteine ursächlich mit der Termination der viralen Replikation in Verbindung gebracht werden kann bzw. der Identifizierung des aktiven Zentrums wird in weiterführenden Studien nachgegangen.

5.4 Modell der Rep/Rep'-katalysierten RCR von PCV

Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gelang es, das bestehende Modell der PCV-Replikation weiterzuentwickeln (Abb. 5.3). Das erweiterte Modell soll im Folgenden dargestellt werden.

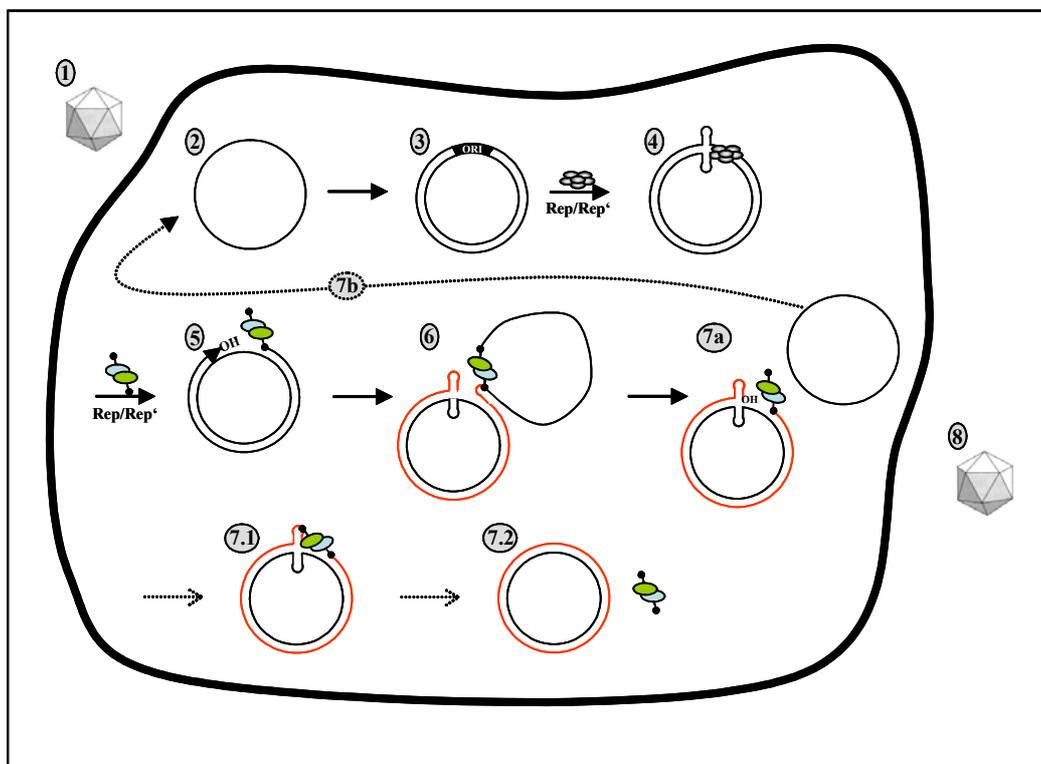


Abb. 5.3. Modell der PCV-Replikation

Nach Infektion der Zielzelle [1] wird das einzelsträngige virale Genom [2] durch die Aktivität einer zellulären Polymerase in seine doppelsträngige replikative Form überführt [3]. Ebenfalls mit Hilfe der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie sowie der Aktivität des zellulären Spleißosoms erfolgt die Expression der viral kodierten Replikationsproteine Rep und Rep'. Die Bindung eines Rep-Oligomers an die Hexamere H1 und H2 innerhalb des *dso* [4] bewirkt die Repression des *rep*-Promotors (P_{rep}) und demzufolge die Inhibition der Expression von Rep und Rep'. Durch eine intrinsische Helikaseaktivität des Rep-Proteins wird die Ausbildung einer Haarnadelstruktur induziert, in dessen Bogenbereich das einzelsträngige Nonamer 5'-TAGTATTAC-3' lokalisiert ist [4]. Ein weiteres Rep/Rep'-Molekül bzw. ein homolog oder heterolog zusammengesetzter Komplex aus den Replikationsproteinen bindet an das Nonamer des viralen Plusstrangs. Das konservierte Tyrosin-93 innerhalb Motiv III initiiert nachfolgend die RCR durch den strang- und sequenzspezifischen Bruch der Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden sieben und acht des Nonamers [5]. Auf Nukleotidebene sind neben sechs Nukleotiden am 3'-Ende des Nonamers die Sequenzen *upstream* und *downstream* in ihrer Spezifität für die Bindung und Restriktion des Einzelstrangs von Bedeutung. Auf Seiten der *in trans* aktiven Replikationsfaktoren Rep und Rep' konnte die Unabhängigkeit der Replikation von der C-terminal lokalisierten GKS-Box des Rep-Proteins demonstriert werden. Im Gegensatz dazu ist neben Tyrosin-93 in Motiv III die Integrität der Motive I und II für die Restriktion des viralen Plusstrangs essentiell. Motiv II koordiniert dabei das bivalente Kation, welches als Kofaktor für die Enzymaktivität essentiell ist. Die Rolle der Motive I, II und III innerhalb des viralen Replikationszyklus steht direkt mit der Initiation der Replikation in Verbindung. Die Funktion der GKS-Box dagegen ist wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Helikaseaktivität des Rep-Proteins zu betrachten. Nach der Initiation der Replikation wird das Replikationsprotein kovalent über einen Tyrosylester mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen DNA-Strangs verknüpft, um einerseits die Bindungsenergie für die mit der Termination der Replikation einhergehende Ligationsreaktion zu konservieren, andererseits eine Religation und damit den vorzeitigen Abbruch der Replikation zu verhindern [5]. Die neu generierte 3'-Hydroxygruppe fungiert als Primer für die nachfolgende Elongation des Plusstrangs entlang der ringförmigen Minusstrangmatrize durch die Aktivität einer Polymerase der Wirtszelle [5]. Nach Beenden einer Syntheserunde erfolgt die Termination der Replikation durch einen weiteren Einzelstrangbruch innerhalb des Nonamers des Replikationsorigins des neu synthetisierten Plusstrangs [6] und die nachfolgende Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung des Replikationsproteins bzw. Komplexes mit dessen 5'-Ende [7a]. Gleichzeitig wird die aus

dieser zweiten Restriktion resultierende neue freie 3'-Hydroxygruppe in einem nukleophilen Angriff auf das 5'-Phosphatende der ersten Restriktion, welches immer noch mit dem Replikationsprotein verbunden ist, übertragen, was in der Freisetzung zirkulär kovalent geschlossener Plusstranggenome resultiert [7a]. Die naszenten viralen Genome werden über eine zelluläre Polymeraseaktivität in die replikative doppelsträngige Form überführt und stehen erneut für die Initiation der Replikation [7b] oder alternativ für die Assemblierung infektiöser Viruspartikel zur Verfügung [8]. Es wird vermutet, dass es sich bei der katalytisch aktiven Aminosäure hinsichtlich der Termination der viralen Replikation um einen weiteren Tyrosinrest an Position 93 handelt, der auf einer zweiten Polypeptidkette in einem Rep-Dimer oder Oligomer höherer Ordnung lokalisiert ist. Die zweite Restriktion resultiert somit ebenfalls in einer Verknüpfung mit dem 5'-Phosphat des geschnittenen Strangs über einen Tyrosylester. Die neu generierte 3'-Hydroxygruppe [7a] steht als Primer für eine weitere Replikationsrunde entlang der ringförmigen Minusstrangmatrize zur Verfügung (nicht gezeigt). Nach Beendigung der Replikationsphase und Verpackung der viralen DNA erfolgt die Freisetzung der Viruspartikel [8].

Alternativ ist nach zweiter Restriktion und Freisetzung des naszenten Plusstranggenoms [7a] eine Verknüpfung der neu generierten 3'-Hydroxygruppe mit dem 5'-Phosphat, welches mit dem Replikationskomplex assoziiert ist, denkbar [7.1]. Dies hätte einerseits die Regeneration des *dso* andererseits die Freisetzung des Replikationskomplexes zur Folge [7.2].