

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unter DNA-Replikons, welche über *rolling circle* Replikation (RCR) replizieren, stellen die Bindung an den doppelsträngigen Replikationsorigin (*dso*) und die Einführung eines strang- und sequenzspezifischen Einzelstrangbruchs essentielle Stufen für den Ablauf der Replikation dar. Während die aus dem Einzelstrangbruch resultierende 3'-Hydroxygruppe als Primer für die nachfolgende DNA-Synthese fungiert, wird die 5'-Phosphatgruppe durch den neu synthetisierten DNA-Strang verdrängt. Nach einer Syntheserunde und zweiter Restriktion innerhalb des regenerierten Replikationsorigins werden die Enden des neu synthetisierten DNA-Moleküls zum zirkulär geschlossenen Genom verknüpft. Aufgrund konservierter Motive sowohl innerhalb der Aminosäuresequenz der Replikationsproteine als auch der Nukleotidsequenz des viralen Replikationsorigins wird die Replikation auch der porcinen Circoviren Typ 1 und Typ 2 (PCV1 und PCV2) über RCR postuliert.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Restriktions- und Ligationsaktivität der PCV-Replikationsproteine Rep und Rep' gegenüber dem viralen Replikationsorigin *in vitro* demonstriert. Beide Enzyme schneiden den viralen Plusstrang zwischen den Nukleotiden sieben und acht innerhalb des konservierten Nonamers 5'-T¹AGTATTAC⁹-3' und werden nachfolgend kovalent mit dem 3'-Schnittprodukt verknüpft. Für die Einführung des Einzelstrangbruchs wurden das Nonamer und der Bereich inverser Repetition als essentielle Sequenzanforderung identifiziert, wohingegen die Ausbildung einer Haarnadelstruktur keine Voraussetzung für die Restriktion *in vitro* darstellt. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Rep und Rep' einzelsträngige Originfragmente *in vitro* ligieren, was eine Funktion von PCV-Rep/Rep' hinsichtlich der Termination der viralen Replikation wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Ligation ist abhängig von vorangegangener Restriktion und räumlicher Nähe der Substrate. Letzteres wird über Basenpaarung über den Bereich der inversen Repetition gewährleistet.

Mit Hilfe von Mutanten der Rep-Proteine wurde die Abhängigkeit der Restriktion von der Integrität der Aminosäuremotive I, II und III verdeutlicht und Tyrosin-93 als das katalytische Zentrum der Reaktion identifiziert. Die GKS-Box wurde erstmals als Voraussetzung für die ATP-Hydrolyse des Rep-Proteins nachgewiesen, diese konservierte Sequenz hat aber keinen Einfluss auf die Restriktion des Replikationsorigins durch Rep und Rep'.

Durch den Nachweis homologer sowie heterologer Interaktion der Replikationsproteine Rep und Rep' steht zu vermuten, dass die Termination der Replikation durch Tyrosin-93 als Bestandteil eines Rep/Rep'-Dimers oder Oligomers höherer Ordnung und nicht durch eine zweite aktive Aminosäure auf dem selben Monomer katalysiert wird.

Über einen Replikationsassay wurde die Bedeutung der konservierten Motive innerhalb der Replikationsproteine und des Replikationsorigins für die virale Replikation in PK15-Zellen demonstriert. Weiterhin wurde die Rekrutierung von PCV-Rep/Rep' an den *dso* über Interaktion mit den Hexameren H1 und H2 bestätigt. Die Ausbildung einer Haarnadelstruktur als Voraussetzung für die Initiation innerhalb des einzelsträngigen Bogenbereichs sowie eine Abhängigkeit der Termination von der Sequenzspezifität *upstream* des Nonamers wird vermutet.