

ANHANG

A.1 Expressionsvektoren

Sofern nicht anders vermerkt, erfolgte die Klonierung mit den angegebenen Primerpaaren über PCR durch die High Fidelity Polymerase aus den angeführten Templates in das entsprechende Zielplasmid. Die Restriktionsschnittstellen wurden über die Primer eingeführt und sind Anhang A.5 zu entnehmen. Alle Konstrukte wurden im Anschluss in der Sequenzierung auf den Einbau fehlerhafter Nukleotide untersucht.

Konstrukt	Template	Primer Fragment	Zielplasmid
bakteriell			
PCV1			
pTriEx-6HN		Hybrid F524/B525	pTriEx1.1 EcoRV, SacI
pTriEx-6HN-rep	pORF4A	F245/B226	pTriEx-6HN
pTriEx-6HN-rep'	pAM4	F245/B226	pTriEx-6HN
pTriEx-6HN-repmutY93	pORF4A	F660/B274A ¹ F245/B661	pTriEx-6HN
pTriEx-6HN-rep'mutI	pTriEx-6HN-repmutI	SacI	pTriEx-6HN-rep'
pTriEx-6HN-repmutI	pRep-mutI	F245/B226	pTriEx-6HN
pTriEx-FLAG-rep	pORF4A	F888/B226 ²	pTriEx1.1
pTriEx-FLAG-rep'	pAM4	F888/B226 ²	pTriEx1.1
pGEX-rep	pORF4A	F225/B226	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-repmutII	pRep-mutII	F225/B226	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-repmutP	pRep-mutP	F225/B226	pGEX-6P-1

Konstrukt	Template	Primer Fragment	Zielplasmid
bakteriell			
PCV2			
pTriEx-6HN-rep(PCV2)	pSVL-rep	NspI/BamHI geglättet	pTriEx-6HN BglII, geglättet
pTriEx-6HN-rep'(PCV2)	pSVL-rep'	NspI/BamHI geglättet	pTriEx-6HN BglII, geglättet
<i>in vitro</i>/Hefe			
pGBKT7-rep	pORF4A	F621/B167	pGBKT7
pGBKT7-rep*	pAM9	F621/B167	pGBKT7
pGBKT7-rep'	pAM4	F621/B167	pGBKT7
pGADT7-rep	pORF4A	F621/B167	pGADT7
pGADT7-rep*	pAM9	F621/B167	pGADT7
pGADT7-rep'	pAM4	F621/B167	pGADT7

- 1: Über den Primer F660 wird ein Nukleotidaustausch von Adenin zu Thymin an Position 278 innerhalb des *rep*-Gens eingeführt, welcher in einem Aminosäureaustausch von Tyrosin-93 zu Phenylalanin-93 innerhalb des Rep Proteins resultiert.
- 2: Über den Primer F888 wird N-terminal die für das FLAG-Epitop (DYKDDDDK) kodierende Sequenz 5'-GACTACAAGGACGACGACACAAG-3' kloniert.

A.2 Fusionsproteine

Alle Expressionsvektoren, die resultierenden rekombinanten Fusionsproteine und deren Anwendungsbereich sind nachstehend aufgeführt.

Konstrukt	Fusionsprotein	Anwendung
PCV1		
pTriEx-6HN-rep	His-Rep	Replikation/Restriktion Ligation/ATP-Hydrolyse
pTriEx-6HN-rep'	His-Rep'	Replikation/Restriktion Ligation/ATP-Hydrolyse
pTriEx-6HN-repmutY93	His-RepmutY93	Replikation/Restriktion Ligation/ATP-Hydrolyse
pTriEx-6HN-rep'mutI	His-Rep'mutI	Restriktion
pGEX-rep	GST-Rep	Restriktion
pGEX-repmutII	GST-RepmutII	Restriktion/ATP-Hydrolyse
pGEX-repmutP	GST-RepmutP	Restriktion/ATP-Hydrolyse
pTriEx-FLAG-rep	FLAG-Rep	Interaktion
pTriEx-FLAG-rep'	FLAG-Rep'	Interaktion
pGBKT7-rep	c-Myc-Rep	Interaktion
pGBKT7-rep*	c-Myc-Rep*	Interaktion
pGBKT7-rep'	c-Myc-Rep'	Interaktion
pGADT7-rep	HA-Rep	Interaktion
pGADT7-rep*	HA-Rep*	Interaktion
pGADT7-rep'	HA-Rep'	Interaktion
PCV2		
pTriEx-6HN-rep (PCV2)	His-Rep	Restriktion/Ligation ATP-Hydrolyse
pTriEx-6HN-rep' (PCV2)	His-Rep'	Restriktion/Ligation ATP-Hydrolyse

A.3 Luziferase Reportergenplasmide

Die Nukleotidsequenz der konservierten Motive des PCV1-Replikationsorigins innerhalb des Reportergenplasmids pRL16 ist angegeben. Alle pRL16-Varianten einschließlich der kodierten Sequenzvariationen innerhalb des viralen Replikationsorigins sind nachstehend aufgeführt.

pRL16							
<i>upstream</i>	Nonamer	<i>downstream</i>	H1	H2	P1	H3	H4
5'-AAGTGCCTG CTG TAGTATTAC CAGCGCACTT CGGCAG CGGCAG CACCT CGGCAG CGTCAG-3'							
pRL16-Variante	Mutation	Sequenz					
pRL16-1	Hexamer 1	5'-CCCGGG-3'					
pRL16-2	Hexamer 2	5'-CCCGGG-3'					
pRL16-3	Hexamer 3	5'-CCCGGG-3'					
pRL16-4	Hexamer 4	5'-CCCGGG-3'					
pRL16-12	Hexamer 1/2	5'-CCCGGGCCCGGG-3'					
pRL16-34	Hexamer 3/4	5'-CCCGGGCCCGGG-3'					
pRL17-1	<i>downstream</i> des Nonamers	5'-TCCTGCAGCA-3'					
pRL17-2	<i>upstream</i> des Nonamers	5'-GGCTGCAGAT-3'					
pRL17-3	<i>upstream/downstream</i> des Nonamers	5'- TGCTGCAGGA... TCCTGCAGCA-3'					

A.4 Plasmide

Sämtliche Plasmide, welche innerhalb dieser Arbeit als Template für die Konstruktion sowohl der prokaryotischen und eukaryotischen Expressionsvektoren als auch der Luziferase Reportergenplasmide verwendet und nicht käuflich erworben wurden, sind nachfolgend näher beschrieben.

Plasmid	Insert
pORF4A	<i>rep</i> -Gen von PCV1 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pAM4	cDNA-Produkt des gespleißten <i>rep</i> ' Transkripts von PCV1 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pAM9	<i>rep</i> -Gen von PCV1 mit mutierten Spleißdonor- und akzeptorstellen unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pRep-mutI	<i>rep</i> -Gen von PCV1 mit Aminosäureaustausch von Phenylalanin-16 zu Leucin-16 und von Asparagin-19 zu Lysin-19 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pRep-mutII	<i>rep</i> -Gen von PCV1 mit Aminosäureaustausch von Glutamin-56 zu Prolin-56 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pRep-mutP	<i>rep</i> -Gen von PCV1 mit Aminosäureaustausch von Lysin-177 zu Arginin-177 und von Serin-178 zu Isoleucin-178 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pSVL- <i>rep</i>	<i>rep</i> -Gen von PCV2 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pSVL- <i>rep</i> '	cDNA-Produkt des gespleißten <i>rep</i> ' Transkripts von PCV2 unter Kontrolle des späten SV40-Promotors
pSK 140	PCV1-Genom in pUC19

A.5 Primer

Die Nukleotidsequenz der Primer, welche im Rahmen dieser Arbeit für die Konstruktion der Expressionsvektoren und Luziferase Reportergenplasmide verwendet wurden, sind nachfolgend angegeben. Restriktionsschnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben, Phosphorylierungen am 5'-Ende durch ein P gekennzeichnet.

Primer	
Name	Sequenz
F141	5'-CGGGATCCATTTTTATTTATTTAGAGGGTCTTTTAGGA-3'
B167	5'-CGGGATCCTTACGATGTGATAACAAAAAAGACTCAGT-3'
F225	5'-CGGGATCCCAAGCAAGAAAAGCGGCCCG-3'
B226	5'-GGAATTCGATGTGATAACAAAAAAGACTCAGT-3'
F245	5'-CGGGATCCAAGCAAGAAAAGCGGC-3'
B274A	5'-GGCGCGCCCGATGTGATAACAAAAAAGACTCAGT-3'
F356	5'-GGTGGTGGGACTCGGACTGCTTCACGAATTCTG CCAAATATGGTCTTCTCCG-3'
F356m	5'-GAAGATCTCGGCAGCACCTCGGCAG-3'
F357m	5'-GAAGATCTCACCTCGGCAGCGTCAG-3'
B358	5'-CGGGATCCTACCCTCTTCCAAACCTTCCTCT-3'
F358m	5'-GAAGATCTCGTCAGTGAAAATGCCAAG-3'
F359m	5'-GAAGATCTTGAAAATGCCAAGCAAGAAAAG-3'
B360m	5'-CTAGATCTAAGTGCGCTGGTAATAC-3'
B361m	5'-CTAGATCTCTGCCGAAGTGCGCTGG-3'
B362m	5'-CTAGATCTAGGTGCTGCCGCTGCCG-3'
B363m	5'-CTAGATCTCTGCCGAGGTGCTGCCGC-3'
F382	5'-GAAGATCTCCCGGGCACCTCGGCAGCGTCAGTG-3'
F383	5'-CTAGATCTCCCGGGAGGTGCTGCCGCTGCCGAAG-3'
F436neu	5'-GCTCTAGATGCCAAATATGGTCTTCTCCG-3'
B437	5'-GAGGTACCTTTCAGTACGCTGCCGAGG-3'
B444	5'-GAGGTACCTTTCAGTACGAGATCTAGG-3'
B445	5'-GAGGTACCTTTCAGATCTCTGCCGAGG-3'
B455	5'-GAGGTACCTTTCAGATCTCCCGGGAGG-3'
F467	5'-CCACGTCATCCTATAAAAGTGAAAGAAGTG-3'
B468	5'-P-CTGCAGGAGTAATACTACAGCAGCGCACTTCTTTCAGT TTTATAGGATGACGTGG-3'

Primer	
Name	Sequenz
F469	5'-P-CGCTGCTGTAGTATTACTCCTGCAGCACGGCAGCGGCA GCACCTCCCGGGA-3'
B470	5'-GATCTCCCGGGAGGTGCTGCCGCTGCCGTG-3'
F471	5'-CCACGTCATCCTATAAAAAGTGAAAGGGCTG-3'
B472	5'-P-GTGCCTGGTAATACTACAGATCTGCAGCCCTTTCCT TTTATAGGATGACGTGG-3'
F473	5'-P-CAGATCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCA GCACCTCCCGGGA-3'
B474	5'-GATCTCCCGGGAGGTGCTGCCGCTGCCGAA-3'
F475	5'-CCACGTCATCCTATAAAAAGTGAAAGTGCTG-3'
B476	5'-P-CTGCAGGAGTAATACTACAGTCCTGCAGCACTTTCCT TTTATAGGATGACGTGG-3'
F477	5'-P-CAGGACTGTAGTATTACTCCTGCAGCACGGCAGCGGCA GCACCTCCCGGGA-3'
F524	5'-TCATCATCATCACCATCACAGCAGCGGCGAGCT-3'
B525	5'-CGCCGCTGCTGTGATGGTGATGATGATGA-3'
F621	5'-GGAATTCCCAAGCAAGAAAAGCGGC-3'
B622	5'-GGAATTCACGTGGCCAAGGAGGCGTTA-3
F660	5'-AACTGCAGTAAAGAAGGCCACATA-3'
B661	5'-AACTGCAGAATTCTTTATTCTGCT-3'
F888	5'-CATGCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGCC AAGCAAGAAAAGCGGC-3'
3'AD Sequenzierungsprimer	5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3'
3' DNA-BD Sequenzierungsprimer	5'-TTTTCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC-3'
T7 Sequenzierungsprimer	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'
pGEX 3' Sequenzierungsprimer	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
pGEX 5' Sequenzierungsprimer	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
pGL3 3' Sequenzierungsprimer	5'-GACGATAGTCATTGCCCCGCG-3'
pGL3 5' Sequenzierungsprimer	5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3'
M13/pUC 3' Sequenzierungsprimer	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'
pUC 5' Sequenzierungsprimer	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

A.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, welche als Substrat im Restriktionsassay; Restriktions-/Ligationsassay und in der kovalenten Verknüpfung verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt. Eine Markierung mit Cy5 wird repräsentiert durch einen schwarzen Stern, der Bereich inverser Repetition innerhalb des viralen Replikationsorigins ist durch Fettdruck hervorgehoben, Sequenzvariationen sind mit einem X markiert bzw. in der Nukleotidsequenz unterstrichen.

Name	Schema	Nukleotidsequenz
PCV1		
F301	★ <u>10112110161651616</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F632	★ <u>10110</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATT
B265	<u>10112110161651616</u> ★	5'-Cy5-CTGACGCTGCCGAGGTGCTGCCGCTGCCGAAGTGCCTGGTAATACTACAGCAGCGCACTT
F998	★ <u>1011-3110161651616</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGCTA <u>TATTAC CAGCGCACTT</u> CGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F1196	★ <u>1011-4110161651616</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGCTAG <u>ATTAC CAGCGCACTT</u> CGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F617	★ <u>X112110161651616</u>	5'-Cy5- <u>GGCTGCAGAI</u> CTGTAGTATTAC <u>CAGCGCACTT</u> CGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F1195	★ <u>101121X161651616</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATTAC <u>TCCTGCAGCA</u> CGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F616	★ <u>101121X1X1X</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATTAC <u>TCCTGCAGCA</u> ACCGGGACCGGG
F291	★ <u>1011211016165</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCT
F259	<u>1011211016165</u>	5'-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCT5
F229	<u>10112110161651616</u>	5'-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F336	★ <u>101121101616516</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAG
F258	<u>101121101616516</u>	5'-AAGTGCCTGCTGTAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAG
F983	<u>101121X161651616</u>	5'-AAGTGCCTGCTGTAGTATTAC <u>TCCTGCAGCA</u> CGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG
F987	<u>101121X16165</u>	5'-AAGTGCCTGCTGTAGTATTAC <u>ATCTGCAGCC</u> CGGCAGCGGCAGCACCT
F923	P <u>210161651616</u>	5'-P-ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCGTCAG

Name	Schema	Nukleotidsequenz
PCV2		
F526	★ <u>1011011016165165</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGTAAAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCT
F1018	★ <u>1011011016165</u>	5'-Cy5-AAGTGCCTGTAAAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCT
F527	<u>1011011016165</u>	5'-AAGTGCCTGTAAAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCT

A.7 Vektorkarten











