Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Expressionsanalyse viraler Fusionsproteine sowie Studien zur Infektion mit rekombinanten Genomen des porcinen Circovirus

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin

> vorgelegt von Rifat Çaliskan aus Trabzon

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Tschöpe

Korreferent: Prof. Dr. H. Zeichhardt

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin

Disputation am: 03. Februar 2009

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α-Gal	alpha-Galaktosidase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
dq	Basenpaare
BBTV	Banana Bunchy Top Virus
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	heziehungsweise
ca	zirka
	Capary Circovirus
Cap PCV	Kansidnrotein
	Chicken Angemia Virus
	Cocoput Foliar Docay Virus
	cocondi i onal Decay vilus
CDINA om	Zontimotor
	Keblendiovid
	Komenuloxiu
	Dideeevuribeeukleesidtripheephete
	Didesoxynbonukieosidinphosphale
UNTPS d b	
	Dimethylformamid
D-MEM	Duibecco's Modifizierung von Eagle's Medium
DMSO	
DNA	Desoxyribonukleidsaure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DsRed	Red Fluorescent Protein
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
FBNYV	Faba Bean Necroic Yellows Virus
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GoCV	Goose Cirocvirus
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H1, H2, H3, H4	Hexamer
IPTG	Isopropy-β-Ithiogalaktosid
k	Kilo
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
M	Mol/Liter
mA	Milliampere
MCS	multiple Konjerungsstelle
	multiple Nonierungsstelle

μgMikrogrammMgCl2MagnesiumchloridMgSO4MagnesiumsulfatMinMinute(n)mlMilliliterμgMikrogrammμlMikroliter	
MgCl2MagnesiumchloridMgSO4MagnesiumsulfatMinMinute(n)mlMilliliterµgMikrogrammµlMikroliter	
MgSO₄MagnesiumsulfatMinMinute(n)mlMilliliterµgMikrogrammµlMikrolitermMMillimel/Liter	
MinMinute(n)mlMilliliterμgMikrogrammμlMikrolitermMMillimel/Liter	
ml Milliliter µg Mikrogramm µl Mikroliter	
μg Mikrogramm μl Mikroliter	
μl Mikroliter	
mM Millimel/Liter	
mDNA measanger DNA (Deten DNA)	
MVDV Milk vetch Dwart virus	
NaCl Natriumchlorid	
NaHCO ₃ Natriumhydrogenkabonat	
NaOH Natriumhydroxid	
Na ₂ HPO ₄ Dinatriumhydrogenphophat	
ng Nanogramm	
NLS Nukleäres Lokalisationssignal	
nm Nanometer	
nMol Nanomol	
Nt Nukleotide	
NTP Ribonukleosidtriphosphat(e)	
OD ontische Dichte	
OH Hydroxy	
DACE Delyzen/lamidgelelektronhoroso	
PROE Folyaci ylamilugelelekii opholese DREDV Deittaaina Baak and Easthar Diagaaa Virua	
PDFDV Psillacine beak and realiner Disease virus	
PBS Phosphat geputterte Salziosung	
PCR Polymerase Kettenreaktion	
PCV Porcines Circovirus	
PiCV Pigeon Circovirus	
PK15 porcine kidney cell line	
pmol Pikomol	
PMWS Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome	
Pos. Position	
PPRS Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom	e
PPRSV Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom	ie
Virus	
PPV Porcine Parvovirus	
PVDF Polyvinylidendifluorid	
P1 P2 Pentamer	
Pen PCV Penlikase	
RI Raumemperatur	
Subterranean Clover Stunt Virus	
SDS Natriumdodecylsulfat	
s.o. siehe oben	
SPF spezifisch pathogenfrei	
S-Phase Synthesephase	
ssDNA Einzelsträngige Desoxyribonukleidsäure	
s.u. siehe unten	

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat, EDTA
TE	Tris, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tween	Polysorbat 20
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

Abkür	zungsverzeichnis	3
Inhalt	sverzeichnis	6
1. Ein	leitung	9
1.1	Aspekte der Xenotransplantion	9
1.2	Porcine Circoviren	11
1.3	Genomorganisation von PCV	13
1.4	Das rep-Gen von PCV	14
1.5	Das cap-Gen von PCV	18
1.6	Zielsetzung	19
2. Mat	erial	20
2.1	Geräte	20
2.2	Chemikalien	21
2.3	Enzyme	21
2.3	 Restrictionsenzyme Putfor für Postriktionsenzyme und PCP 	21
2	3.3 Sonstige Enzyme	22
2.4	Antikörper	22
2.5	Kulturmedien	23
2.6	Puffer und Lösungen	23
2.7	DNA	25
2. 2.	7.1 DNA Marker	25
2.8	Bakterienstämme Plasmide und Zelllinien	27
2.8	8.1 Bakterienstämme	27
2.8	8.2 Plasmide	27
2.0	Vite	27
2.9	Rits	21 27
2.10	Software	27
2.11 2 Mot	bodon	28
	DNA Spaltung durch Destriktionsen den uklassen	2 3
3.1 2.2	A source sold later house	29
3.2 3.2	2.1 Analytische Agarosegelelektrophorese	30 31
3.2	2.2 Präparative Agarosegelelektrophorese	31
3.3	PCR	31
3.4	DNA-Aufreinigung	33
3.5	Dephosphorylierung	33
3.6	DNA-Ligationen	34
3.7	Einfügen von Punktmutationen	34
3.8	Kompetenzbehandlung von Bakterien zur Aufnahme von DNA	36

	3.9 Irai	sformation in kompetente Zellen	.37
	3.10 Isol	erung von Plasmid-DNA	37
	3.10.1	Minipräparationen	37
	3.10.2	Maxipräparationen	- 38
	3.11 DN	A-Konzentrationsbestimmung am Fluorometer	39
	3.12 Seq	lenzierung	39
	3.13 Etha	nolfällung von DNA	41
	3.14 Anz	ucht eukarvontischer Zelllinien	.41
	2 15 7.11		41
	3.15 Zell	zanlung nach Eosiniarbung	•41
	3.16 Irai	Istektion von DNA in eukaryontische Zellinien	•42
	3.17 Anz	ucht von Bakterien	43
	3.18 Exp Stämmen	ression von Cap-spezifischer GST-Fusionsproteine und Derivaten in E.coli BL 21	43
	3.19 SDS	-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
	3.19.1 0	Jelherstellung	45
	3.19.2 F	robenbehandlung und Durchführung der Elektrophorese	46
	3.19.3 (delfärbung	47
	3.20 Prot	ein Blotting	47
	3.20.1 F	ärbung membrangebundener Proteine	48
	3.20.2 I	mmunologischer Nachweis membrangebunder Proteine	48
	3.21 Fluor	eszensproteine EGFP und DsRed	49
4	Ergebn	isse	52
	-		
	1 1 Protei	novprossion	52
	4.1 Protei	nexpression	52
	4.1 Protei 4.1.1 K 4.1.2 K	nexpression onierung des <i>cap</i> -Gens von PCV1 und PCV2 in den Expressionsvektor pGEX 6P-1	52 52 54
	4.1 Protei 4.1.1 Ki 4.1.2 Ki 4.1.3 Ki	nexpression onierung des <i>cap</i> -Gens von PCV1 und PCV2 in den Expressionsvektor pGEX 6P-1 onierung eines Teilfragmentes des <i>cap</i> -Gens von PCV1 in den Vektor pGEX 6P-1 onierung von Teilfragmenten des <i>cap</i> -Gens von PCV2 in den Vektor pGEX- 6P-1	52 52 54 56
	4.1 Protei 4.1.1 Ki 4.1.2 Ki 4.1.3 Ki 4.1.4 Ex	nexpression onierung des <i>cap</i> -Gens von PCV1 und PCV2 in den Expressionsvektor pGEX 6P-1	52 52 54 54 56 EX-
	4.1 Protei 4.1.1 Ki 4.1.2 Ki 4.1.3 Ki 4.1.4 Ex Cap2Δ(nexpression onierung des <i>cap</i> -Gens von PCV1 und PCV2 in den Expressionsvektor pGEX 6P-1	52 52 54 54 56 EX- 59
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 	nexpression	- 52 - 52 - 54 - 56 - 56 - 59 - 63
	 4.1 Protei 4.1.1 Ki 4.1.2 Ki 4.1.3 Ki 4.1.4 Ex Cap2∆(4.2 Konst 4.2.1 Ko 	nexpression	52 52 54 56 EX- 59 63 65
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KO 4.2.1 KO 	nexpression	52 52 54 56 EX- 59 63 65 65
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KG 4.2.1 C 4.2.1 2 	nexpression	52 52 54 56 EX- 59 63 65 65 65
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 K 4.2.1.1 4.2.1.2 4.2.1.3 	nexpression	52 52 54 56 EX- 59 63 65 65 66 67 67
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Excap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KO 4.2.1 KO 4.2.1.2 J 4.2.1.3 J 4.2.1.4 J 4.2.1.5 J 	nexpression	52 52 54 56 3 65 65 65 66 67 67 69
	 4.1 Protei 4.1.1 Kl 4.1.2 Kl 4.1.3 Kl 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 Kl 4.2.1.2 l 4.2.1.3 l 4.2.1.4 l 4.2.1.5 l 4.2.2 Tr 	nexpression	52 52 54 56 EX- 59 63 65 65 66 67 67 67 70
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Excap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KG 4.2.1 KG 4.2.1.2 J 4.2.1.2 J 4.2.1.4 J 4.2.2 Tr 4.3.1 Sub: 	nexpression	52 52 54 56 3X- 59 63 65 65 66 67 67 67 70 72
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KJ 4.2.1 KJ 4.2.1.2 J 4.2.1.3 J 4.2.1.4 J 4.2.2 Tr 4.3.1 Subs 4.3.1.1 J 	nexpression	52 52 54 56 32 59 63 65 65 66 67 67 67 67 70 72 72
	 4.1 Protei 4.1.1 Kl 4.1.2 Kl 4.1.3 Kl 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 Kl 4.2.1.2 I 4.2.1.2 I 4.2.1.4 I 4.2.1 Kl 4.2.1.5 II 4.2.1 Kl 4.2.1 Kl 4.2.1.5 II 4.2.1 Kl 4.3.1 Kl 4.3.1 Kl 4.3.1 Kl 4.3.1 Kl 4.3.1 Kl 	nexpression	52 52 54 56 3X- 59 63 65 65 66 67 67 67 70 72 72 73
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2A(4.2 Konst 4.2.1 KI 4.2.1.3 I 4.2.1.4 I 4.2.1.5 I 4.2.1 SII 4.2.1 SII 4.3.1 SUB 4.3.1.2 I 4.3.1.3 I 	nexpression	52 52 54 56 33 65 66 67 67 67 67 70 72 72 73 74
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2∆(4.2 Konst 4.2.1 K 4.2.1 X 4.3.1 X 4.3.1 X 4.3.1 X 4.3.1 X 	nexpression	52 52 54 56 3 65 65 66 67 67 69 70 72 72 73 74 75
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KJ 4.2.1 KJ 4.2.1 ZJ 4.3.1 ZJ 4.3.1 ZJ 4.3.1 ZJ 4.3.1 ZJ 4.3.1 ZJ 4.3.1 ZJ 	nexpression	52 52 54 56 59 63 65 65 66 67 67 67 70 72 72 73 74 75 76
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KI 4.2.1 XI 4.2.1.2 I 4.2.1.2 I 4.2.1.4 I 4.2.1.5 II 4.2.2 Tr 4.3.1 Sub 4.3.1.1 I 4.3.1.2 I 4.3.1.3 I 4.3.1.4 I 4.3.1.5 I 4.3.1.6 I 4.2.1.7 I 	nexpression	$\begin{array}{c} 52\\ 52\\ 54\\ 56\\ 3X-\\ 59\\ 65\\ 66\\ 67\\ 67\\ 69\\ 70\\ 72\\ 73\\ 74\\ 75\\ 76\\ 77\\ 70\\ \end{array}$
	 4.1 Protei 4.1.1 Kl 4.1.2 Kl 4.1.3 Kl 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 Kl 4.2.1 Kl 4.2.1.2 L 4.2.1.3 L 4.2.1.4 L 4.2.1 Sl 4.2.1 Sl 4.2.1 Sl 4.2.1 Sl 4.2.1 Sl 4.3.1 Sl <li< td=""><td>nexpression</td><td>$\begin{array}{c} 52\\ 52\\ 54\\ 56\\ 3\\ 65\\ 65\\ 66\\ 67\\ 67\\ 69\\ 70\\ 72\\ 73\\ 74\\ 75\\ 76\\ 77\\ 79\\ 80\\ \end{array}$</td></li<>	nexpression	$\begin{array}{c} 52\\ 52\\ 54\\ 56\\ 3\\ 65\\ 65\\ 66\\ 67\\ 67\\ 69\\ 70\\ 72\\ 73\\ 74\\ 75\\ 76\\ 77\\ 79\\ 80\\ \end{array}$
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2A(4.2 Konst 4.2.1 K 4.3.1 K 	nexpression	52 52 54 56 3 65 65 66 67 67 70 72 73 74 75 76 77 80 81
	 4.1 Protei 4.1.1 KJ 4.1.2 KJ 4.1.3 KJ 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KJ 4.2.1 KJ 4.2.1 ZJ 4.3.1 ZJ 	nexpression	52 52 54 56 65 65 65 65 66 67 67 69 70 72 73 74 75 76 77 79 80 81 82
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 KI 4.2.1.2 I 4.2.1.2 I 4.2.1.2 I 4.2.1.4 I 4.2.1.5 II 4.2.1 KI 4.2.1.5 II 4.2.1 KI 4.3.1 KI<td>nexpression</td><td>$\begin{array}{c} 52\\ 52\\ 54\\ 56\\ 65\\ 65\\ 66\\ 67\\ 69\\ 70\\ 72\\ 73\\ 74\\ 75\\ 76\\ 77\\ 80\\ 81\\ 82\\ 82\\ \end{array}$</td>	nexpression	$\begin{array}{c} 52\\ 52\\ 54\\ 56\\ 65\\ 65\\ 66\\ 67\\ 69\\ 70\\ 72\\ 73\\ 74\\ 75\\ 76\\ 77\\ 80\\ 81\\ 82\\ 82\\ \end{array}$
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2A(4.2 Konst 4.2.1 K 4.2.1.2 I 4.2.1.3 I 4.2.1.4 I 4.2.1.5 I 4.2.1 KI 4.2.1.5 I 4.2.1.7 I 4.3.1 Sub 4.3.1.1 I 4.3.1.2 I 4.3.1.3 I 4.3.1.4 I 4.3.1.5 I 4.3.1.6 I 4.3.1.7 I 4.3.1.8 I 4.3.1.9 I 4.3.2 L 4.3.2 I 4.3.2 I 	nexpression	52 52 54 56 57 63 65 65 66 67 67 70 72 73 74 75 76 77 80 81 82 82 82
	 4.1 Protei 4.1.1 KI 4.1.2 KI 4.1.3 KI 4.1.4 Ex Cap2Δ(4.2 Konst 4.2.1 Ki 4.3.1 Ki 4.	nexpression	52 52 54 56 57 65 65 65 65 66 67 67 69 70 72 73 74 75 76 77 80 81 82 82 82 84 85

5. Diskussion87	7
5.1 Expression des Cap-Proteins von PCV1 und PCV287	7
5.2 Konstruktion rekombinanter Genome und subzelluläre Lokalisation der viralen Proteine 89)
5.3 Subzelluläre Lokalisation viraler Proteine9	l
6. Zusammenfassung94	ŀ
7. Summary96	5
8. Literaturverzeichnis98	3
Abbildungsverzeichnis106	5
Tabellenverzeichnis106	5
Danksagung107	7
Lebenslauf108	3
Publikation109)
Selbstständigkeitserklärung110)

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen von Untersuchungen zur Risikoabschätzung von porcinen Viren in Bezug auf die Xenotransplantation angefertigt.

1.1 Aspekte der Xenotransplantion

Nieren-, Herz-, Leber- und Lungentransplantation sind aufgrund ihrer positiven Ergebnisse zu etablierten klinischen Therapieverfahren geworden. Mit zunehmendem Erfolg der Transplantation, entwickelt sich der Mangel an Spenderorganen zu einem zentralen Problem der Transplantationsmedizin. Dies führt dazu, dass nicht alle Patienten, denen durch ein Transplantat geholfen werden könnte, auch wirklich transplantiert werden.



Durchgeführte Transplantationen sowie tatsächlicher Bedarf 2006

Abbildung 1.1: Bedarf und durchgeführte Transplantationen

Darstellung der durchgeführten Transplantationen in Deutschland im Vergleich zum tatsächlichen Organbedarf im Jahre 2006. Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO)

Es ist bekannt, dass eine alleinige Erhöhung der Spendebereitschaft der Bevölkerung die Differenz zwischen dem Bedarf an Spenderorganen und der tatsächlichen Anzahl der zur Verfügung stehenden Spenderorgane nicht lösen kann (Niemann, 1999; Perico *et al.*, 2002).

Eine mögliche Lösung dieser Problematik – Schließen der stetig wachsende Lücke zwischen dem Bedarf und den verfügbaren Spenderorganen - könnte die Xeno-

transplantation darstellen, das heißt die Übertragung von tierischen Organen, Geweben oder Zellen für die Transplantation beim Menschen (Boneva *et al.*, 2001; Perico *et al.*, 2002).

Unter Berücksichtigung ethischer, ökonomischer und physiologischer Aspekte bietet sich das Schwein als potenzieller Spender an (Platt & Lin, 1998; Niemann, 1999; Denner, 2000; Boneva *et al.*, 2001; Perico *et al.*, 2002).

Aus medizinischer Sicht müssen auf dem Weg zur erfolgreichen Xenotransplantion drei Hauptprobleme gelöst werden: Die Verhinderung der Abstoßungsreaktion des Transplantats, die Funktionsfähigkeit des Transplantats inklusive der Erfüllung der physiologischen Ansprüche einer anderen Spezies und die Gefährdung des Empfängers und seiner Umwelt durch die Übertragung endogener Erreger zusammen mit dem Xenotransplantat, also die Verhinderung von Xenozoonosen (Bach, 1998; Niemann, 1999; Boneva *et al.*, 2001; Perico *et al.*, 2002).

Es ist bekannt, dass zwischen den Spezies physiologische Unterschiede und Inkompatibilitäten hinsichtlich der Organfunktionen bestehen. Diese sind so gravierend, dass die Substitution des Patienten nach der Xenotransplantation unerlässlich erscheint (Platt & Lin, 1998; Platt, 1999; Goddard *et al.*, 2000; Soin *et al.*, 2000; Perico *et al.*, 2002). Umfang, Dauer und Praktikabilität der Substitution sind bislang nicht geklärt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das bisher noch nicht im ausreichenden Maße geklärte Risiko der Übertragung bisher bekannter und unbekannter endogener bzw. exogener Erreger durch das Transplantat auf den Empfänger und weitere Patienten (Michaels, 1997; Fishman, 1998; Chapman *et al.*, 1999; Niemann, 1999; Denner, 2000; Goddard *et al.*, 2000; Soin *et al.*, 2000; Boneva *et al.*, 2001; Perico *et al.*, 2002).

Die Notwendigkeit einer begleitenden immunsuppressiven Behandlung zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion, die Ausbildung direkter Zell-zu-Zell Kontakte, sowie der Zugang zum vaskulären System üben Einfluss auf das Übertragungsrisiko möglicher pathogener Erreger aus und erhöhen die Gefahr der Entwicklung von Xenozoonosen.

Durch Haltung spezifisch pathogenfreier Schweine (SPF-Haltung, specified pathogen free) und begleitender Maßnahmen können bekannte Mikroorganismen eliminiert werden. Plazentagängige Erreger sind hiervon ausgenommen.

Zu den potenziell gefährlichen Viren des Schweins, welche im Rahmen der Xenotransplantation auf den Menschen übertragen werden können, gehören neben

den porcinen endogenen Retroviren auch die porcinen Circoviren und die porcinen Herpesviren (Niemann, 1999; Denner, 2000; Yoo & Giulivi, 2000; Boneva *et al.*, 2001; Perico *et al.*, 2002).

Porcine Circoviren sind plazentagängig. Übliche Methoden der SPF-Haltung, die auf eine Verhinderung von Erregerübertragung zielen, greifen nur eingeschränkt (Denner, 2000).

Zur Risikoabschätzung von porcinen Circoviren in Bezug auf die Xenotransplantation ist ein besseres Verständnis der Molekularbiologie unabdingbar. Die vorliegende Arbeit wurde vor diesem Hintergrund angefertigt.

1.2 Porcine Circoviren

Das Porcine Circovirus Typ 1 (PCV1) wurde erstmalig 1974 im Robert Koch Institut als Kontaminante der Schweinenierenzelllinie PK-15 (ATCC-CCI 33) mit picornavirus-ähnlicher Morphologie isoliert (Tischer *et al.*, 1974).

Weitere Untersuchungen zeigten ein isometrisches, nicht umhülltes Virus von 17 nm

Durchmesser (Tischer I *et al.*, 1982), bestehend aus einer einzelsträngigen, geschlossenen Plus-Strang DNA mit einer Länge von 1759 Nukleotiden (Buhk, 1985; Meehan *et al.*, 1997).

Abbildung 1.2: PCV im Elektronenmikroskop. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Porcinen Circoviren im Größenvergleich mit dem Tabakmosaikvirus. Die Abbildung wurde von Dr. Gelderblom, Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt.

PCV gehört zur Familie der *Circoviridae* (McNulty et al., 2000), welche ausschließlich Vertebraten infizieren und sich in zwei Genera, das Genus *Circovirus* und das Genus *Gyrovirus* unterteilen. Zum Genus Circovirus zählen neben PCV1 und PCV2 das Psittacine Beak and Feather Disease Virus (PBFDV) (Ritchie *et al.*, 1989; Bassami *et al.*, 1998), das Pigeon Circovirus (PiCV, auch CoCV) (Mankertz *et al.*, 2000b), das Duck Circovirus (Hattermann *et al.*, 2003), das Canary Circovirus (CaCV) (Phenix *et al.*, 2001) sowie das Goose Circovirus (GoCV) (Todd *et al.*, 2001).

Das Chicken Anaemia Virus (CAV) (Todd *et al.*, 1990) wird aufgrund seiner von den oben erwähnten Viren abweichenden Genomorganisation und einer unterschiedlichen Transkriptionsstrategie dem Genus Gyrovirus zugeordnet.

PCV2 ist der Erreger des Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms (PMWS) (Allan *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000a), einer neuen Erkrankung, die bei Schweinen mangelnde Gewichtszunahme, Dyspnoe, interstitielle Pneumonie, Hepatitis, Nephritis sowie Lymphozytendepletion in den lymphatischen Organen auslöst. Die Gesamtmortalität kann je nach Farm bis zu 40% betragen, und hat dadurch erhebliche wirtschaftliche Einbußen in der Schweineproduktion zur Folge haben (Allan & Ellis, 2000).

Auch pflanzliche ssDNA Viren sind bekannt: Coconut Foliar Decay Virus (Rohde *et al.*, 1990; Harding *et al.*, 1993), Banana Bunchy Top Virus (Harding *et al.*, 1993), Subterranean Clover Stunt Virus (Boevink *et al.*, 1995), 1995), Faba Bean Necrotic Yellows Virus (Katul *et al.*, 1997) sowie Milk Vetch Dwarf Virus (Sano *et al.*, 1998).

Wie die Vertreter der *Circoviridae* besteht ihr Genom aus einzelsträngiger, zirkulär geschlossener DNA, die Virionen weisen kleine sphärische, nicht-umhüllte Kapside auf. Sie werden in der Familie der *Nanoviridae* zusammengefasst. Circoviren weisen zudem starke Ähnlichkeiten zur Familie der ebenfalls pflanzenpathogenen *Geminiviridae* (Palmer *et al.*, 1998) auf. Mit Ausnahme von PCV1 sind alle erwähnten Viren pathogen.

Der natürliche Wirt von PCV ist das Schwein. Epidemiologische Untersuchungen an Schlachtvieh in Deutschland zeigten, dass PCV eine Seroprävalenz von 77-95% besitzt (Tischer *et al.*, 1986). Ähnlich hohe Durchseuchungsraten für PCV wurden auch bei Untersuchungen im Ausland vorgefunden (Dulac & Afshar, 1989; Edwards & Sands, 1994).

Untersuchunggen mittels indirekter Immunfluoreszenz bzw. PCV2-spezifischen ELISA hinsichtlich der Epidemiologie von PCV2 aus Kanada, Großbritannien und Frankreich zeigen, dass PCV2-spezifische Antikörper ubiquitär verbreitet sind (Allan & Ellis, 2000). Retrospektive serologische Untersuchungen aus Kanada zeigen, dass die Zahl der PCV2-positiven Sera höher ist als für PCV1 (Magar *et al.*, 2000).

Die Virusvermehrung von PCV1 ist sowohl in primären als auch in permanenten Schweine-Zelllinien möglich; in PS-Zellen (Schweinenierenepithel) wird eine persistente Infektion initiiert (Tischer *et al.*, 1974; Tischer I *et al.*, 1982). Infektionsstudien an Zellkulturen zeigen keine zytopathogenen Effekte, in künstlich infizierten Tieren werden keine Krankheitsbilder beobachtet. Daher wird PCV1 als apathogen eingestuft.

PCV2 dagegen ist pathogen. Klinische Symptome, makroskopische und mikroskopische Läsionen des PMWS wurden nach experimenteller Inokulation mit PCV2 beobachtet (Allan *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999; Bolin *et al.*, 2001).

Experimentelle Infektionsstudien an PCV2 infizierten Schweinen zur Reproduktion von PMWS zeigen uneinheitliche Ergebnisse, die von fehlender klinischer Symptomatik zu PMWS-typischen mikroskopischen Veränderungen der Lymphorgane bis zum PMWS Vollbild führten (Allan *et al.*, 1999) (Balasch *et al.*, 1999). Die Ausbildung typischer klinischer PMWS-Symptome bei experimentell infizierten Schweinen erfolgte nur bei aktiviertem Immunsystem - entweder durch Koinfektion mit dem *Porcinen Parvovirus* (PPV) (Kim *et al.*, 2003) oder durch die Verabreichung eines immunaktivierenden Agens (Hämocyanin der Napfschnecke *Diodora aspera*, keyhole limpet hemocyanine, KLH) (Krakowka *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2001).

Bei 20% bis 60% der an PMWS erkrankten Schweine konnten natürliche Koinfektionen von PCV2 mit dem *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) nachgewiesen werden (Allan *et al.*, 2000) (Segales *et al.*, 2002).

Zusammenfassend ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass PMWS eine multifaktorielle Erkrankung ist, an dem neben PCV2 weitere Kofaktoren wie Ernährung, Immunstatus, Managementbedingungen und Impfschemata involviert sind (Ellis *et al.*, 2000). Die Diagnostik einer PCV2 Infektion basiert derzeit neben der Klinik und der Pathologie auf dem Virus- oder Antigennachweis per Immunhistochemie (McNeilly *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 1999) und der *in situ* Hybridisierung lymphatischer Gewebe (Choi & Chae, 1999; McNeilly *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 1999). PCR basierte Nachweismethoden sind ebenfalls bekannt (Morozov *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1999; Mankertz *et al.*, 2000a).

1.3 Genomorganisation von PCV

Das Genom von PCV1 besitzt eine Größe von 1759 Nukleotiden, PCV2 weist 1768 bzw. 1769 Nukleotide auf. Beide Genome sind komplett sequenziert (Buhk, 1985;

Meehan et al., 1998). Vergleiche zwischen beiden Viren auf Nukleotidebene liefern eine Sequenzhomologie von 70%. Die Homologie einzelner Leserahmen variiert 56-85%. Computeranalysen liefern dabei zwischen elf potenzielle offene Leserahmen (open reading frame, ORF) für beide PCV Typen. Sowohl der virale Plus-Strang als auch der komplementäre Minus-Strang kodieren für Proteine. Es konnten bei Genexpressions-untersuchungen bei PCV1 drei mRNA Transkripte nachgewiesen werden, zwei Produkte des viralen Minus-Stranges, ein Produkt des viralen Plus-Stranges (Mankertz et al., 1998b; Mankertz & Hillenbrand, 2002). PCV gehört aufgrund der bidirektionalen Transkription zur Gruppe der ambisenseorganisierten Viren.

PCV ist bislang das kleinste bekannte Virus, welches autonom in mammalen Zellen replizieren kann. Die Genomstruktur ist sehr kompakt aufgebaut. Eine intergenische Region, welches den Replikationsursprung enthält, wird flankiert vom *rep*- und *cap*-Gen.

1.4 Das *rep*-Gen von PCV

Das *rep*-Gen stellt den größten Leserahmen der PCV dar. Es befindet sich auf dem viralen Plusstrang und kodiert für die Replikationsproteine (Mankertz *et al.*, 1998a), welche in allen Circoviren hochkonserviert sind. Rep weist Homologien zu Replikationsproteinen von Nano- und Geminiviren auf.

Der Transkriptionsstartpunkt für die *rep*-Transkripte von PVC1 wurde mittels Nuklease S1 mapping auf Position (Pos.) 767 (\pm 10 nt) bestimmt (Mankertz *et al.*, 1998b). Der Promoter von *rep* von PCV1 befindet sich in der intergenischen Region (nt 640-796) und überlappt mit dem Replikationsursprung von PCV1.

Die Transkription von *rep* von PCV1 führt zur Bildung von zwei Isoformen der Replikase: Das Rep Protein entspricht mit 312 AS (AS) und 35.6 kDa, dem Volllängenprodukt, ein differenziell gespleißtes Produkt kodiert für die verkürzte Variante Rep' mit 168 AS (19.2 kDa). Durch einen Spleißvorgang, bei der ein 383nt Ianges Intron zwischen Pos. 1175 und 1559 entfernt wird, kommt es zum Leserahmenwechsel und somit zu einer abweichenden Sequenz der letzten 48 AS (siehe Abbildung 1.3). Durch Sequenzvergleiche konnten drei konservierte Motive identifiziert werden, die Kennzeichen von Replikasen sind, die Replikation im Rolling Circle Mechanismus vermitteln. Zusätzlich tritt ein dNTP-Bindungsmotiv auf. Deletion oder Mutagenese dieser vier Motiven hat eine Inaktivierung der Replikationsaktivität des Rep Proteins zur Folge (Mankertz & Hillenbrand, 2001). Beide Genprodukte sind für die Replikation essenziell. Rep und Rep' binden an Doppelstrang DNA-Fragmente, die den Replikationsursprung enthalten. Die minimale Erkennungs- und Bindungsstelle für die beiden Replikaseformen beider Circoviren wurde für den rechten Schenkel der Haarnadelstruktur und die beiden ersten Hexamere kartiert. Beide Replikaseformen führen *in vitro* im Bereich des Replikationsursprunges einen Einzelstrangbruch ein und können diesen wieder schließen (Steinfeldt *et al.*, 2001; Mankertz *et al.*, 2003; Steinfeldt *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass der Rep Promoter durch Rep negativ reguliert wird, wohingegen Rep' keinen Einfluss ausübt. Dies erfolgt u. a. durch Bindung von Rep an Hexamer H1/H2 (s.u.).



В

Abbildung 1.3: Das rep-Gen und seine beiden Transkripte

Das *rep*-Gen und seine beiden Transkripte von PCV1 (Å) und PCV2 (B); I-III konservierte Motive, die typisch für Replikasen des Rolling-Circle Typs sind. P entspricht der dNTP-Bindungsstelle. Durch den Spleißvorgang erfolgt ein Wechsel des Leserahmens, die dNTP-Bindungsstelle entfällt in der Rep' Variante (siehe Erläuterungen im Text).



PCV1



В

Abbildung 1.4: Genomorganisation von PCV1 bzw. PCV2

Genomorganisation von PCV1 (A) bzw. PCV2 (B) mit vergrößerter Darstellung des Replikationsursprungs. Das konservierte Nonamer der Haarnadelstruktur ist grau hervorgehoben, die Hexamere, die als minimale Bindungsstelle für die *rep*-Genprodukte dienen, sind eingerahmt sowie die Pentamere eingekreist (nach Hattermann, 2003)

Durch eine Transkriptkartierung wurden für PCV2 zwei analoge *rep*-Transkripte identifiziert, deren Translation zur Synthese von zwei Genprodukten führt: Das Rep-Protein von PCV2 hat eine Größe von 314 AS (37,5 kDa) und entspricht dem Volllängenprodukt des Hauptleserahmens *rep*. Rep' entsteht ebenfalls durch differenzielles Spleißen zwischen Pos. 1187 und Pos. 1571, und umfasst demzufolge nur 178 AS (20.2 kDa). Durch den Leserahmenwechsel kommt es zur Sequenzänderung der letzten 57 Aminosäuren. Beide Proteine sind für die Replikation von PCV2 essenziell.

Bei der Transkriptionsanalyse von PCV2 werden neun virale RNAs detektiert. Drei Haupt-RNAs wurden im Northern Blot nachgewiesen, die übrigen, mittels PCR. Die Replikationsproteine *rep* und *rep' werden* durch eine 1000 nt große bzw. eine 600 nt große RNA repräsentiert. Die sechs weiteren RNAs weisen Größen um 280nt auf (Cheung, 2003).

Das PCV2 rep mRNA beginnt an Pos. 822 und wird an Pos. 1766 terminiert und kann durch Standard PCR Methoden detektiert werden. Es ist ein Vorläufertranskript für Rep' und die weiteren Transkripte Rep', Rep3a, Rep3b und Rep3c (Cheung, 2003). PCV1 Rep wurde nur durch real-time PCR nachgewiesen (Mankertz & Hillenbrand, 2001). Die Transkripte Rep3a, Rep3b und Rep3c werden durch alternatives Spleißen des rep-Transkriptes gebildet. Sie sind für die Virusreplikation in Zellkulturen nicht essenziell und ihre Funktion bisher nicht bekannt. Den weiteren Transkripten NSO, NS514 und NS672 konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden (Cheung, 2003).

Der Replikationsursprung von PCV2 ist auf ein 324bp großes DNA-Fragment (nt 1635-195) eingegrenzt. (Mankertz *et al.*, 2003). Der Replikationsursprung von PCV1 ist auf ein 111bp großes DNA Fragment (nt 728-838) eingegrenzt (Mankertz *et al.*, 1997).

Im Bereich des Replikationsursprungs zwischen den Hauptleserahmen *rep* und *cap* befindet sich eine potenzielle Haarnadelstruktur mit einem konservierten Nonanukleotidmotiv (5'-TAGTATTAC-3' für PCV1) an der Spitze (Abbildung 1.4 A). Mutation an Nonamer Position 1 und 2 führen zum Verlust der Replikationsaktivität. Die Haarnadelstruktur mit dem konservierten Nonamer tritt ebenfalls bei allen anderen Circoviren, Nanoviren und Geminiviren auf. Einzige Ausnahme ist das Chicken Anaemia Virus, welches nur das Nonamer enthält. Der Haarnadelstruktur benachbart folgt dreimal das Hexamermotiv [5'-CGGCAG-3' (nt 785-813)]. Hexamer 4 besitzt an Position 3 einen Nukleotidaustausch (5'-CGTCAG-3'). Die Hexamer 1

und 2 (H1/H2) sowie 3 und 4 (H3/H4) sind jeweils direkt benachbart; Zwischen H1:H2 und H3:H4 befinden sich 5 Nukleotide (Pentamer). Die Hexamere konnten als Bindungsstellen der Replikationsproteine Rep und Rep' identifiziert werden (Steinfeldt *et al.*, 2001). PCV2 besitzt wie PCV1 ein Haarnadelmotiv (Abbildung 1.4 B), das Nonamer unterscheidet sich am 1. Nukleotid (5'-AAGTATTAC-3'). Für die den Circoviren verwandten Geminiviren konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation am Nonamer initiiert und terminiert wird. Dies erfolgt durch Einführen eines Einzelstrangbruches zwischen Nukleotidposition 7 und 8 des Motivs (Stanley, 1995). Gleiche Beobachtungen wurden auch für PCV1 und PCV2 gemacht (Steinfeldt et al., 2006).

1.5 Das *cap*-Gen von PCV

Das *cap*-Gen auf dem viralen Minus-Strang kodiert für das Kapsidprotein (Mankertz *et al.*, 1998a; Nawagitgul *et al.*, 2000) und stellt mit 699 bp sowohl in PCV1 als auch PCV2 den zweitgrößten offenen Leserahmen.

Die Produkte vom *cap*-Gen von PCV1 und PCV2 haben eine berechnete Größe von 233 AS bzw. 27,8 kDa. Beide Proteine enthalten eine Glykolysierungsstelle (Hamel *et al.*, 1998).

Sequenzvergleiche von *cap* von PCV1 Stämmen zeigen auf Nukleotidebene Homologien von 97 – 99% und auf Aminosäureebene von 94 – 98%. Für PCV2 betragen diese Homologien auf Nukleotidebene 91 – 100% und auf Aminosäureebene 90 – 100%. Zwischen dem *cap*-Gen von PCV1 und PCV2 bestehen auf der Nukleotidebene Homologien von 65 – 67% und auf Aminosäureebene von 63 – 68%. Sequenzanalysen zeigen N-terminal eine hohe Anzahl an basischen AS (Arginin und Lysin). Dies wird als Hinweis auf DNA-Bindungsaktivität gewertet (Fenaux *et al.*, 2000).

Der Promoter für das *cap*-Gen von PCV1 befindet sich innerhalb des *rep*-Gens zwischen Pos. 1328-1252. Der Transkriptionsstart des Cap-Proteins von PCV1 befindet sich an Nukleotidposition 1238. Das Transkript enthält eine aus 119 Nukleotiden bestehende Leadersequenz (1238-1120), welches an das Exon 2 des *cap*-Gen Transkripts bei Pos. 737 in unmittelbarer Nähe zum ATG angefügt wird (Mankertz & Hillenbrand, 2002).

Der Transkriptionsstart für das Kapsidprotein von PCV2 ist für Pos. 469 kartiert, die Terminierung erfolgt an Pos. 1005 und analog zur Transkription in PCV1 befindet sich die Spleißposition der Leadersequenz bei Pos. 361 bzw. 1737. Bezüglich PCV2 konnte RNA der Größe 950nt, 750nt und 450nt nachgewiesen werden. Dabei überwog das Kapsidprotein RNA der Größe 950nt (Cheung & Bolin, 2002).

Das Cap-Protein von PCV ist die am stärksten immunogene Komponente.

Immundominante Epitope des Kapsidproteins von PCV2 befinden sich im Bereich der AS 47 bis 84, 165 bis 200 sowie auf den letzten vier Positionen (Mahe *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2001; Lekcharoensuk *et al.*, 2004). Diese Informationen sind für die Erzeugung eines rekombinanten Impfstoffes von besonderer Bedeutung.

1.6 Zielsetzung

Die Ziele dieser Dissertation bestanden in der Analyse der subzellulären Lokalisation der beiden Hauptgenprodukte Rep und Cap von PCV1 und PCV2 und sollte durch die Erzeugung von fluoreszierenden Fusionsproteinen geklärt werden. Einer sich im Vorversuch abzeichnenden möglichen Kolokalisation von Rep und Cap sollte nachgegangen werden.

Als Grundlage für eine Immunisierung zur Erzeugung von polyklonalen Antiseren gegen das Cap Protein und die spätere Entwicklung von diagnostischen Tests sollte die Expression des Kapsidproteins von PCV1 und PCV2 durchgeführt werden.

Schließlich sollten rekombinante Viren, welche das grün-fluoreszierende Protein (EGFP) fusioniert an Cap bzw. Rep von PVC1 enthalten, konstruiert werden. Diese rekombinanten Viren sollten in Infektionsstudien eingesetzt werden und weitere Rückschlüsse bezüglich der Synthese viraler Proteine sowie der viralen Genomreplikation ermöglichen.

2. Material

2.1	Geräte	
	ABI PPRISM™ 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Foster City USA
	Amersham Pharmacia	
	Hoefer Mighty Small SE 245 Dual	Gelgießapparatur
	Gel Caster	
	Hoefer Mighty Small Vertical U. SE260	Elektrophoreseapparatur
	Biometra	
	Fast Blot 34	Blotter
	Rocking Platform	Wipptisch
	Bio-Rad	
	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Blotter
	Branson Sonifier 450	Ultraschallgerät
	Braun Certomat U	Schüttler
	Heraeus Instruments	
	Varifuge 3.0R	Ultrazentrifuge
	Minifuge RF	Ultrazentrifuge
	Biofuge Stratos	Ultrazentrifuge
	Biofuge fresco	Tischzentrifuge
	Hoefer TK100	Fluorometer
	Hoefer Scientific Instruments PS500X	Spannungs- / Stromquelle
	Intas digit-store duo	Fotodokumentationsanlage
	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Zeiss, Jena
	Mitsubishi video copy processor P90	Drucker
	Perkin Elmer Cycler	
	Gene Amp PCR System 2400	Cycler
	Gene Amp PCR System 9700	Cycler
	Sigma 3k30	Ultrazentrifuge
	Sorvall RC5C Plus	Ultrazentrifuge
	GSA	Rotor
	SS34	Rotor
	HB6	Rotor
	Speed Vac Concentrator (Savant)	Zentrifuge

2.2	Chemikalien	
	Life Technologies (Gibco-BRL), Ammoniumpersulfat	Gaithersburg , USA
	Fötales Kälber Serum	
	Geneticin (G 418 Sulphate)	
	IPTG	
	TBE 10x	
	TEMED	
	X-Gal	
	Acrylamid	Amresco, Ohio, USA
	ATP	
	Agarose LE	Boehringer Mannheim
	Ampicillin	Sigma, USA
	Bacto-Agar	Difco, Detroit
	Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit
	Bacto-Trypton	Difco, Detroit
	BSA	New England BioLabs Inc.
	Bromphenolblau	Serva
	EDTA	Merck, Darmstadt
	Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
	Glutathion Sepharose [®] 4B	Amersham pharmacia biotech
	Kanamycin	Sigma, USA
	2-Mercaptoethanol	Serva
	MgCl ₂	Merck, Darmstadt
	MOPS	Sigma, USA
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
	Tween 20	Merck, Darmstadt
	D+ Sucrose	Biomol, Hamburg

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsenzyme

Acc I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
BamH I	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Bcl I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.

Bgl I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Bgl II	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
BstX I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
EcorR I	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.
EcoR V	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Hae II	12000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Hinc II	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Hind III	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Kpn I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Msc I	3000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Sac II	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Sca I	10000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Xho I	20000 U / ml	New England BioLabs Inc.

2.3.2 Puffer für Restriktionsenzyme und PCR

NEB 1	New England BioLabs Inc.
NEB 2	New England BioLabs Inc.
NEB 3	New England BioLabs Inc.
NEB 4	New England BioLabs Inc.
BamH I Puffer	New England BioLabs Inc.
EcoR I Puffer	New England BioLabs Inc.
10x PCR Puffer	Perkin Elmer
100x BSA gereinigt	New England BioLabs Inc.

2.3.3 Sonstige Enzyme

T ₄ -DNA Ligase	400000 U / n	New England BioLabs Inc.
T ₄ -DNA Polymerase	3000 U / ml	New England BioLabs Inc.
Ampli Taq Gold DNA Po	ymerase	Applied Biosystems, USA
Trypsin		Difco, Detroit
PreScission [™] Protease		Amersham pharmacia biotech

2.4 Antikörper

Anti-Goat IgG, alkaline phosphatase conjugate Anti-GST Antibody Sigma, USA

Amersham pharmacia biotech

2.5 Kulturmedien

	DMEM Medium		DME	M-Pulv	er für 10 l
			37	g	NaHCO ₃
			0.2	g	Penicillin G
			0.2	g	Streptomycinsulfat
	a	ad	10	I	bidestilliertes Wasser
					pH Einstellung auf 7.2 mit HCl
	LB Medium		10	g / I	Bacto Trypton
			5	g / I	Bacto Yeast Extrakt
			10	g / I	NaCl
					pH Einstellung mit NaOH auf 7.5
	SOB		20	g/l	Bacto Trypton
			5	g / I	Bacto Yeast Extrakt
			0.58	g / I	NaCl
			0.19	g / I	KCI
					pH Einstellung mit NaOH auf 7.0,
					autoklavieren, Hinzufügen von:
			10	mМ	MgCl ₂
			10	mΜ	MgSO ₄
	SOC		20	mМ	Glucose in SOB
					in 200ml SOB-Medium
	TY-Flüssigmedium		10	g / I	Bacto Trypton
			5	g / I	Bacto Yeast Extrakt
			5	g / I	NaCl
					pH Einstellung mit NaOH auf 7.5
	TY-Agar		17	g / I	Bacto-Agar im TY-Flüssigmedium
2.6	Puffer und Lösungen	l			
	AP-Puffer		0,1	М	Tris-HCI
			0,1	М	NaCl

	2,5	mМ	MgCl ₂
	0,05	%	Tween 20, pH 7,4
AP-Blockpuffer	3	%	BSA in AP-Puffer
Ethidiumbromid-Lösung	10	g /l	Ethidiumbromid
G418-Lösung	1	mg/m	l Geneticin (G 418 Sulphate)
		in DN	IEM gelöst
Ladepuffer	70	Teile	70% Sucrose
	5	Teile	Bromphenolblau-Lösung,
			gesättigt in H ₂ O
PBS-Puffer	140	mM	NaCl
	2	mΜ	KCI
	10	mΜ	$Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$
	2	mΜ	KH ₂ PO ₄
	45		Trie Deret all 0.2
2 X TBE-Puller	45 4		EDTA
	I	mivi	EDTA
TE-Puffer	10	mМ	Tris-HCl. pH 8.3
	0.1	mМ	EDTA
TEN-Puffer	10	mМ	Tris-HCI
	20	mМ	EDTA
	150	mМ	NaCl
TNE-Puffer	100	mМ	Tris-HCl, pH 7,4
	10	mМ	EDTA
	2	М	NaCl
Trypsin-Lösung	0.25	%	Trypsin
	3	mΜ	EDTA
		in PB	S

P1	50	mΜ	Tris-HCI, pH 8.0
	10	mМ	EDTA
	100	µg/ml	RNase A
P2	200	mМ	NaOH
	1	%	SDS
D 2	2	NA	Kaliumaaatat al.I.E.O
P3	3	IVI	Kallumacetat, pH 5.0
QBT	50	mМ	MOPS, pH 7.0
	750	mМ	NaCl
	15	%	Ethanol
	0.15	%	Triton X-100
QC	50	mМ	MOPS, pH 7.0
	1	Μ	NaCl
	15	%	Ethanol
QF	10	mΜ	Tris-HCl, pH 8.0
	1.25	Μ	NaCl
	15	%	Ethanol
EB	10	mМ	Tris-HCl, pH 8.5

2.7 DNA

2.7.1 DNA Marker λ / Hind III-Fragmente: New England BioLabs Inc. 23130 / 9416 / 6557 / 4361 / 2322 / 2027 bp φX174 / Hae III-Fragmente : New England BioLabs Inc. 1353 / 1078 / 872 / 603 / 310 / 281 / 271 / 234 / 194 / 118 / 72 bp

2.7.2 Primer

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgelistet. Des Weiteren ist die Schmelztemperatur angegeben.

F 137	GAAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCRGT	71.9⁰C
B 138	GAAGATCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	69.5°C
F 139	GCGCTGATCAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	75.1°C
B 140	GCGCTGATCATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	73.0°C
F 141	CGGGATCCATTTTTATTTATTTAGAGGGTCTTTTAGGA	66.2°C
B 142	CCGCTCGAGGATGACGTGGCCAAGGAGGC	75.2°C
F 147	GGTGGTGGGACTCGGACTGCTTCACTGTAAAACGACG	78 6°C
MutA	GCCAGTGAATTC	
B 148	TATGACCATGATTACGCCAAGCTT	59 3°C
MutB		00.0 0
149 Bcl I	CCATATAAAATAAATGATCAAGTCTTTTTTGTTA	58.6°C
150 Bal II	AATGGTTTTTATTTAGATCTATTTAGAGGGTCTT	61 0°C
B 157	CGGGATCCATTACGATGTGATAACAAAAAAGACTCAG	68.3°C
E 158	GGAATTCATTTTATTTATTTAGAGGGTCTTTTAGGA	62.8°C
R 159	CGGGATCCATGACGTGGCCAAGGAGGC	72.6°C
E 166	GGAATTCGCAGCGTCAGTGAAAATGCC	66 5°C
B 167		68 3°C
F 172	GGAATTCTTTAGGGTTTAAGTGGGGGGGGTCTTTAAG	68 3ºC
B 173	CGGATCCATGACGTATCCAAGGAGGCGTTTC	70.8°C
B 180		65 2°C
E 187		62 1ºC
R 188		62.4 C
E 180		58 10C
R 100		56 QOC
B 101		50.9°C
B 102		72.80
M 201		63.6°C
F 202	CCCCTACCTCCCCCATCTCAACCTCTCACC	70 000
R 202		67 QOC
E 203		72 100
F 204		60 50C
F 205		71 000
F 200		71.0°C
F 207		74.1°C
F 200		67.40C
F 209		67.4°C
B 210		69.5°C
F 211		69.4°C
B 212		76.1°C
F 227	CGGGATCCTTTAGGGTTTAAGTGGGGGGGGTCTTTAAG	/1./°C
B 228	CCGCTCGAGTATGACGTATCCAAGGAGGCGTTTC	73.1°C
F 243	CCGCTCGAGTTAGGGTTTAAGTGGGGGGGTCTTTA	71.9°C
B 244	CGGGATCCCAGGGTGACAGGGGAGTGGG	>75°C
F 273 A	GGAATTCTCCAAGCAAGAAAAGCGGC	64.8°C
B 273 B	GGAATTCTACGTGGCCAAGGAGGCGTTAC	69.5⁰C
F 274 B	GGAATTCTCCAAGCAAGAAAAGCGGC	64.8⁰C
Primer B	GGTGGTGGGACTCGGACTGCTTCAC	>60°C

2.8 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

2.8.1 Bakterienstämme

E. coli	DH5αF´	(Hanahan, 1983)			
	F´/ endA1 hsdR17 (rk⁻kk⁺) supE44 thi1-1 recA1 gyrA (Nal՛)				
	relA1∆				
	(laclZYA-argF) U169 deoR (థ80dlac∆ (lacZ) M15)				
	BL21	(Studier, 1990)			
	F^{-} ompT gal [dcm] [lon] hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)				

2.8.2 Plasmide

pEGFP-C2	Km ^r	Clontech
pGEX-6P-1	Ap ^r	Amersham pharmacia biotech
pSVL40	Ap ^r	Amersham pharmacia biotech
pSK 140	Ap ^r	
pSK 144	Ap ^r	
pIC2	Ap ^r	K. Hattermann,
		unveröffentlicht 1999
pUC19	Ap ^r	Yanisch-Perron et al. 1985

2.8.3 Zelllinien

PS (permanente Schweinenierenzelllinie, PK2a Subzelllinie) PSM (persistent mit PCV infizierte PS-Zelllinie)

2.9 Kits

QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep 8 Miniprep Kit	QIAGEN
Expand [™] High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim
Multicolor Detection Set	Boehringer Mannheim

2.10 Proteinmarker

Mark12™ Wide Range Protein StandardNovex, San Diego, USASigmaMarker High Molecular Weight RangeSigma, Missouri, USASigmaMarker Low Molecular Weight RangeSigma, Missouri, USA

2.11 Software

ABI Prism[™] DNA Sequencing Analysis Auto Assembler[™] Factura[™] MacVector 6.5[™] Applied Biosystems,USA Applied Biosystems,USA Applied Biosystems,USA Accelrys, GB

3. Methoden

3.1 DNA Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen repräsentieren eine Gruppe bakterieller Enzyme, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu spalten. Die Erkennungssequenz variiert, abhängig vom Enzym, zwischen 4 und 8 Basenpaaren. Die meisten Restriktionsendonukleasen erkennen palindromische DNA-Sequenzen. Anwendung in der Molekularbiologie finden Typ II Restriktionsendonukleasen, welche im Gegensatz zu Typ I und III nur reine Endonukleaseaktivitäten zeigen. Typ I und III Restriktionsendonukleasen weisen zusätzlich Untereinheiten mit Methylierungsaktivität auf.

Restriktionsenzymatisch behandelte DNA liefert einen Satz genau definierbarer Fragmente, die nach der Größe elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt werden können. Die entstehenden Restriktionsfragmente besitzen entsprechend der eingesetzten Enzyme kohäsive (sticky) oder glatte (blunt) Enden.

Restriktionsverdaus wurden zur Analyse isolierter DNA sowie zur Gewinnung von Fragmenten zur Klonierung durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge variierte in analytischen Ansätzen zwischen 100 ng - 500 ng und war abhängig von der Fragmentgröße und -anzahl. In präparativen Ansätzen wurden bis zu 15 µg DNA eingesetzt.

Salz-, Puffer- und Temperaturbedingungen waren jeweils enzymabhängig und richteten sich nach den Herstellerangaben (*New England Biolabs*). Bei Restriktionsansätzen mit zwei verschiedenen Enzymen wurden Salz- und Pufferbedingungen gewählt, in denen beide Enzyme Aktivität zeigten. In Fällen, wo dies nicht möglich war, schloss sich dem ersten Ansatz ein Reinigungsschritt mittels Minisäule an (Kap. 3.4). Anschließend erfolgte der Restriktionsansatz mit dem zweiten Enzym.

Die notwendige Enzymmenge richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge und der Aktivitätsangabe des Herstellers für das entsprechende Enzym. In der Regel kam die doppelte Menge an Restriktionsenzym zum Einsatz, die rechnerisch nötig gewesen wäre.

Aufgrund der Glycerinkonzentration im Lagerungspuffer der Enzyme wurde dabei geachtet, dass dabei die eingesetzte Menge an Enzym weniger als 1/10 des Gesamtansatzes betrug. Die Inkubationszeiten variierten abhängig vom analytischen oder präparativen Ansatz zwischen 1 – 20 Stunden.

Abgeschlossene Restriktionsverdaus wurden gelelektrophoretisch analysiert. Alle präparativen Ansätze, die nachfolgend für Ligationen herangezogen werden sollten, wurden einem erneuten Reinigungsschritt mittels Minisäule unterzogen (Kap. 3.4).

3.2 Agarosegelelektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man Verfahren, die die Eigenschaft geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zu wandern, zur Trennung biologischer Moleküle ausnutzen.

Agarosegele bestehen aus Polysaccharidketten mit Doppelhelixstrukturen und zeichnen sich durch hohe chemische Stabilität aus. Aufgrund der dadurch bedingten Porenstruktur wirken sie wie Molekularsiebe. Durch Verändern der Agarosekonzentration erreicht man unterschiedliche Auftrennungsprofile der DNA.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist neben der Kettenlänge auch von der Konformation abhängig. Größere Moleküle wandern langsamer als kleinere durch das Gel, zirkuläre langsamer als lineare Moleküle.

Abhängig von der gewünschten Agarosekonzentration wurden 0.7 g - 2 g Agarose LE bzw. für größere Fragmente Agarose MP pro 100 ml 2xTBE unter Erhitzen über dem Bunsenbrenner gelöst und nach Abkühlen auf 60°C im Wasserbad in horizontale Gelkammern gegossen. Nach Erstarren wurde Elektrophoresepuffer (2xTBE) in die Gelapparatur gegossen und die Platzhalter für die Gelkammern entfernt.

In der Regel wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0.7% und 2% verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 2xTBE, welchem Ethidiumbromid in der Endkonzentration 400 μ g/ml zugesetzt wurde. Den Proben wurde 1/5 Ladepuffer vor dem Auftragen auf das Gel hinzugefügt. Die angelegte Spannung betrug bis zu 5 V/cm Elektrodenabstand.

Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuren. Bei direkter Betrachtung mit UV-Licht (312 nm) rufen die DNA-Ethidiumbromidkomplexe fluoreszierende Banden hervor. Durch Beobachtung mittels einer UV-Handlampe bzw. infolge des Farbmarkers Bromphenolblau im Ladepuffer konnte die notwendige Laufzeit bestimmt werden.

Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm fotografiert und das Bild ausgedruckt. Durch Vergleich der Fragmentbanden mit DNA-Größenstandards ($\lambda\downarrow$ Hind III, ϕ X174 \downarrow Hae III), die in bekannter Konzentration mit aufgetragen wurden konnten Aussagen zu Resultaten der Elektrophorese getätigt bzw. Konzentrationen abgeschätzt werden.

3.2.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Restriktionsanalyse rekombinanter Klone und DNA-Konzentrationsbestimmung aus Mini- und Maxipräparationen wurden analytische Agarosegele in Konzentrationen zwischen 0.7 und 2.0 % verwendet.

3.2.2 Präparative Agarosegelelektrophorese

Präparative Agarosegelelektrophoresen wurden zur Isolierung von Fragmenten durchgeführt. Nach Auftrennung der DNA-Banden, wurden diese auf dem Transilluminator unter zu Hilfenahme von UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und entsprechend dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll weiterverarbeitet.

Die Tatsache, dass DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen an eine Glasmatrix bindet, liegt dieser Anwendung zugrunde (Vogelstein & Gillespie, 1979). Die DNA-Bindung zeigt weiterhin eine Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei pH-Werten bis zu 7.5 beträgt die Absorptionsrate der 95%. Dies kann zur Extraktion von DNA-Fragmenten zwischen 70bp - 10kb benutzt werden.

Im Einzelnen sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

Nach Abwiegen des ausgeschnittenen Gelstückes wird das Gel mit dem dreifachen Volumen Puffer QG pro 100 mg 1% Agarosegel versetzt. Bei 50°C wird unter zwischenzeitlichem Mischen zum Auflösen des Geles inkubiert. Anschließend wird pro 100 mg Agarosegel 100 µl Isopropanol in das Eppendorfgefäß dazugegeben. Nach Mischen der Probe wird die Lösung in QIAquick Säulen (Qiagen) überführt und 1 Minute bei 13000 UpM in einer Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Durch nachfolgende Waschschritte mit 750 µl Puffer PE werden die Salze ebenfalls bei 13000 UpM über 1 Minute ausgewaschen. Eine weitere Minute Zentrifugation bei 13000 UpM schließt sich an. Im letzten Schritt wird die DNA durch Gabe von 50µl EB Puffer auf die Säule und nachfolgender Zentrifugation bei 13000 UpM über 1 Minute

3.3 PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um eine Methode zur selektiven Amplifikation definierter DNA Abschnitte, welche man durch die Auswahl an synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primer) festlegen kann. Die Primer werden so gewählt, dass sie jeweils komplementär homolog zum Plusstrang des einen Ende und zum Minusstrang des anderen Ende der zu amplifizierenden DNA-Region sind, d. h., sie entsprechen dem 5'- bzw. 3'terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segmentes.

Als weitere Komponenten benötigt man ausreichende Mengen an Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP), eine spezielle, wärmebeständige DNA-Polymerase und PCR Puffer.

Der Verdopplungszyklus besteht aus drei Temperaturabschnitten mit genau abgestimmter Länge.

Zunächst erfolgt die Überführung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen in einzelsträngige DNA (Denaturierung). Nach dieser Hitzedenaturierung können die Primer bei der anschließenden Abkühlung mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu vermehrenden DNA-Abschnittes hybridisieren (Annealing). Die optimale Anlagerungstemperatur ist variabel und hängt von der Länge und Sequenz der Primer ab (40-60°C). In der nachfolgenden Phase der DNA-Synthese (Primerextension) bei 72°C erfolgt die Verlängerung beider Primer an ihren 3' OH-Enden durch die Taq-DNA Polymerase, die bei 72°C ihr Temperaturoptimum hat.

Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Zyklen (25-40x) erreicht man eine exponentielle Anreicherung des gewünschten DNA-Abschnittes.

Zwei zusätzliche Schritte werden jeweils nur einmal durchgeführt: Eine vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA bei 94°C zu Beginn der Zyklen und eine Phase zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen bei 72°C am Ende der Zyklen.

Die gesamte Reaktion läuft im PCR ThermoCycler ab.

Die PCR im Vorfeld von Klonierungen zur Gewinnung von DNA Amplifikaten aus dem *cap* und *rep*-Bereich von PCV1 und PCV2 zur Anwendung. Die eingesetzten Primer enthielten am 5'-Ende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen mit deren Hilfe das Amplifikat gerichtet in die Vektoren kloniert wurde.

Die eingesetzte Menge an Template-DNA betrug zwischen 100 pg und 18 ng. Zur Optimierung der PCR wurden 25 µl Ansätze bei 3 verschiedenen Temperaturen (52°C, 55°C und 58°C), mit 3 verschiedenen Endkonzentrationen an Magnesiumchlorid (0.5 mM, 2 mM und 5 mM) durchgeführt und jeweils 5.0 µl des Produkts gelelektrophoretisch analysiert. Anschließend wurde die PCR mit 100 µl Ansätzen unter Berücksichtigung der optimierenden Faktoren wiederholt. Die so erhaltenen Amplifikate wurden mittels Minisäulen (QIAquick PCR Purification Kit, siehe Abschnitt 3.4) aufgereinigt und standen für nachfolgende Behandlung mit Restriktionsenzymen zur Verfügung.

3.4 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA aus Restriktionsverdaus und amplifizierter PCR Fragmenten wurde das QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Das zugrundeliegende Prinzip entspricht dem im Abschnitt 3.2.2 dargestellten. In Anwesenheit von chaotropen Salzen bindet DNA an eine Glasmatrix (Vogelstein & Gillespie, 1979). Nach dem Auswaschen von Kontaminationen wird durch Verändern der Salzkonzentration und des pH-Wertes die Trennung der DNA von der Matrix erreicht und die DNA in ein Sammelgefäß eluiert. Hierdurch ist eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 10 kbp möglich.

Nach Gabe der 5-fachen Volumenmenge an Puffer PB zu 1 Volumen Verdau bzw. PCR Amplifikat und Durchmischen wird das Gesamtvolumen in eine Minisäule (QIAquick column) überführt, welche die DNA bindende Matrix enthält. Anschließend wird die DNA durch eine Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge bei 13000 UpM und 4°C über 30 Sekunden bis 1 Minute die DNA an die Säule gebunden. Der Durchfluss wird verworfen. 750 µl ethanolhaltiger Puffer PE werden im nächsten Schritt zwecks Waschen auf die Säule gegeben und wiederholt über 30 Sekunden bis 1 Minute bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen. Eine weitere Zentrifugation über 30 Sekunden bis 1 Minute schließt sich an (13000 UpM, 4°C). Der restliche Durchfluss wird verworfen. Die Minisäule wird in ein neues Eppendorfgefäß platziert. Durch Gabe von 50 µl EB Puffer und anschließender Zentrifugation (30-60 Sekunden, 13000 UpM, 4°C) wird die DNA eluiert und steht für weitere Reaktionen (Ligation, Verdau) zur Verfügung.

3.5 Dephosphorylierung

Die Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors wurde durch den Einsatz an alkalischer Phosphatase verhindert. Dieses Enzym entfernt die für eine Selbstligation notwendige 5'-Phosphatgruppe. Da DNA-Fragmente auf eine 5'-Phosphatgruppe bei der Bindung angewiesen sind und diese bei Ligationen mit dem dephosphorylierten Vektor nur durch das Insert zur Verfügung gestellt werden können, wird die Ligationseffizienz gesteigert. Gereinigte restringierte Vektor-DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen an 10x CIP-Dephosphorylierungspuffer und 10 Units alkalischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs) 1h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die DNA mit Minisäulen aufgereinigt (Kapitel 3.4) und konnte für nachfolgende Ligationen eingesetzt werden.

3.6 DNA-Ligationen

Die Verknüpfung zwischen den zu klonierenden DNA-Fragmenten und den jeweiligen Plasmidvektoren erfolgte mithilfe der T₄-DNA Ligase. Dieses Enzym ist in der Lage sowohl kohäsive, als auch stumpfe Enden zu ligieren. Die doppelsträngigen kohäsiven Enden müssen in der Sequenz komplementär sein. Die T₄-DNA Ligase bewirkt die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der freien OH-Gruppen am 3'- Ende der einen DNA-Kette und der Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen.

Für die Effizienz der Ligation spielt das Verhältnis Vektor zu Insert eine entscheidende Rolle. Die Berechnung der benötigten Menge an Insert kann nach folgender Formel ermittelt werden:

(bp Insert / bp Vektor) x 100 ng = X ng Insert

Bei dieser Formel wird von einem Vektor zu Insert-Verhältnis von 1:1 ausgegangen. Sie ist daher primär für die Ligation kohäsiver Enden brauchbar.

Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 10 μ l bei 16°C über Nacht. Neben 1/10 Endvolumen 10x T₄-Ligase-Puffer und 1.0 μ l T₄-DNA-Ligase (*New England Biolabs*) enthielten die Ansätze zwischen 100-400 ng Vektor DNA. Bei kohäsiven Enden wurde Insert-DNA im molaren Verhältnis (Vektor zu Insert) 1:1 und H₂O bidest ad 10 μ l hinzugefügt. Bei Ligationen mit stumpfen Enden wurde mit einem Überschuss an Insert-DNA gearbeitet. Hier wurde ein Verhältnis 1:3-1:5 (Vektor zu Insert) eingesetzt.

3.7 Einfügen von Punktmutationen

Bei der Konstruktion rekombinanter Viren war es notwendig, Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die intergenischen Region einzubauen. Hierfür wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Kemler und Huber (Stappert *et al.*, 1992) angewandt. Prinzipiell besteht die Vorgehensweise aus zwei Schritten.

Im ersten Schritt wird an denaturierte Doppelstrang-DNA neben dem Primer A mit der gewünschten Mutation der Primer B-Tag bestehend aus einer zusätzlichen zur DNA nicht komplementären 5'-Tag-Sequenz und der eigentlichen zur DNA komplementären Primersequenz angelagert (siehe Abb. 3.1).



Abbildung 3.1: Einfügen von Punktmutationen nach Kemmler und Huber (Erläuterungen im Text)

Durch Gabe von dNTP, Synthese Puffer, T₄-DNA Ligase, T₄-DNA Polymerase und ATP wird der DNA-Gegenstrang synthetisiert, welcher die gewünschte Mutation trägt. Im zweiten Schritt wird der Abschnitt mit der Mutation durch zwei weitere Primer, wovon einer komplementär zum 5' Ende des Primers B-Tag ist, und einem weiteren Primer C mittels der Polymerase Kettenreaktion (Abschnitt 3.3) amplifiziert. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Mutagenese Primer 150 bzw. 201Mut werden als vorbereitender Schritt in einem Volumenansatz von 10 µl mittels T₄-Polynukleotidkinase phosphoryliert:

- 1.0 µl Mutagenese Primer (100 mM) Primer 150 bzw. 201Mut
- 1.0 µl 10x Kinase Puffer
- 1.0 µl 10mM ATP
- 6.8 µl H₂O bidest.
- 0.2 µl Polynukleotidkinase (10 U / µl)

In einem Ansatz von 18.5 μ I werden Vektor-DNA (100-130 ng), Hybridisierungspuffer (entspricht Puffer M von Boehringer) sowie H₂O bidest. im Thermocycler über 3 Minuten auf 95°C erwärmt und im Anschluss auf Eis gelagert. 1.0 μ I Primer 147 (0.1 μ M) sowie 0.5 μ I Mutagenese Primer 150 bzw. 201Mut werden zugegeben. Es folgen 3 Minuten bei 65°C im Thermocycler. Anschließend wird der Reaktionsansatz 40 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Ablauf dieser Zeit werden dem Reaktionsansatz 3.0 µl dNTP (jeweils 10 mM), 1.5 µl ATP (20 mM), 1.5 µl 10x Puffer L (Boehringer , entspricht Synthesepuffer), 0.3 µl T₄-DNA Polymerase, 0.25 µl T₄-DNA Ligase (4U/µl) sowie 3.45 µl H₂O bidest. zugegeben. Der gesamte Reaktionsansatz wird im Thermocyler bei 37°C über 90 Minuten inkubiert. Die Amplifizierung erfolgt durch PCR mit 5.0 µl Produkt aus Hybridisierung und erster Synthese sowie 2.5 µl Primer 148 und 2.5 µl Primer B. Zusätzlich werden benötigt 5.0 µl 10xPCR Puffer, 4.0 µl MgCl₂ (25 mM), 1.0 µl Taq Gold sowie 29.0 µl H₂O bidest.

Die PCR wird mit folgender Programmierung durchgeführt:

6:00	Minuten	95°C		
1:00	Minuten	95°C	I	
1:00	Minuten	60°C	I	x 25
2:30	Minuten	72°C	I	
7:00	Minuten	72°C		
	∞	4°C.		

Das Amplifikat wird aufgereinigt und mittels Restriktionsverdau auf eine erfolgreiche Mutagenese hin überprüft.

3.8 Kompetenzbehandlung von Bakterien zur Aufnahme von DNA

Bevor Bakterien DNA aufnehmen können (Transformation), müssen Sie einer Behandlung unterzogen werden, bei dem die Zellwände der Bakterien durchlässig gemacht werden (transformationskompetent). Neben der Kalziumchlorid-Methode findet bei *E.coli* Bakterien häufig auch die DMSO-Methode nach Hanahan (1983) Anwendung (Mandel & Higa, 1970; Cohen *et al.*, 1972; Hanahan, 1983). Die DMSO-Methode führt zu einer höheren Transformationskompetenz. Darüber hinaus können die DMSO behandelten Zellen bis zu 6 Monate bei –80°C gelagert werden.

Hierfür wurden 5 ml LB Medium mit DH5α-Zellen bzw. *E.coli* BL21-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (200 UpM) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml SOB Medium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 0.5 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C (unter Schütteln bei 200 UpM) bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Diese wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 588 nm bestimmt.
Für DH5 α - und BL21-Zellen entspricht diese Wachstumsphase einer optischen Dichte von OD₅₈₈=1.2.

Nach Überführen der Kultur in vorgekühlte 50 ml Greiner Röhrchen schloss sich eine Zentrifugation in einer Minifuge 2 bei 4°C und 2500 UpM für 12 Minuten an. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml eiskaltem Puffer FSB resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Eine erneute Zentrifugation mit den oben erwähnten Parametern folgte. Nach Aufnahme des Pellets in 3 ml eisgekühltem Puffer FSB wurden 105 μ I DMSO zugefügt und durch langsames Schwenken gemischt. Eine weitere Inkubation auf Eis über 15 Minuten schloss sich an. Nach erneuter Gabe von 105 μ I DMSO wurden die nun kompetenten Zellen in 200 μ I Aliquots eingefroren bzw. sofort verwendet werden.

3.9 Transformation in kompetente Zellen

Unter Transformation wird die Aufnahme von DNA in kompetente Bakterien verstanden.

200 µl kompetente Zellen wurden nach Auftauen 10 Minuten auf Eis inkubiert und in vorgekühlte 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Nach Zugabe von bis zu 200 ng DNA in die Röhrchen wurde auf einem Vortex gemischt. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung im Wasserbad bei 42°C über 90 Sekunden. Anschließend wurden 4 ml SOC Medium hinzugegeben und die Kulturen zwecks phänotypischer Expression im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Ausplattierung des Transformationsgemisches (100-500 µl) erfolgte auf antibiotikahaltigen TY-Agarplatten. Je nach den verwendeten Plasmiden enthielten die Agarplatten 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 37°C.

3.10 Isolierung von Plasmid-DNA

3.10.1 Minipräparationen

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid kam das QIAprep 8 Plasmid Kit Protokoll der Firma Qiagen, Hilden, zur Anwendung. Grundlage dieser Methode ist eine modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979), eine anschließende Adsorption der DNA an Silicagelmembran bei hoher Salzkonzentration (Vogelstein & Gillespie, 1979) sowie die Elution der DNA bei niedriger Salzkonzentration.

Hierfür wurden Einzelkolonien aus Transformationen vorwiegend in 5 ml LB- oder in TY-Medium, unter Zugabe des entsprechendem Antibiotikums über Nacht bei 37°C angezogen. 1.5 ml der Kulturen wurden in Eppendorfgefäße überführt und in einer Tischkühlzentrifuge abzentrifugiert (13000 UpM, 4°C, 3 Minuten, Heraeus fresco). Die Bakterien wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Gabe von 250 µl Puffer P2 und Inkubation der Bakteriensuspensionen für 5 Minuten unter mehrmaligem leichtem Mischen wurde die Lyse und die Freisetzung der Plasmid-DNA herbeigeführt. Die Zugabe von 500 µl Puffer N3 neutralisierte das Zelllysat und bewirkte gleichzeitig die Einstellung auf eine hohe Salzkonzentration, welche für die nachfolgende Bindung der Plasmid-DNA an die Silicagelmembran notwendig war. Die Überstände wurden nach Zentrifugation (13000 UpM, 4°C, 30 Minuten, Heraeus) abgenommen und direkt auf Qiaprep 8 Säulen gegeben, die an eine Vakuumkammer (QIAvac 6S) angeschlossen waren. Nach Anlegen eines Vakuums mittels einer Wasserstrahlpumpe erfolgte der Durchfluss des Überstandes. Während die Plasmid-DNA an die Membran bindet, werden RNA, zelluläre Proteine und restliche Zellkomponenten mit diesem Schritt ausgewaschen. Zwei aufeinanderfolgende Waschschritte mit je 1 ml Puffer PE folgte die Elution der DNA durch Zugabe von 100 µl Puffer EB bzw. durch H₂O bidest. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde über Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.2) und Restriktionsverdau (Kapitel 3.1) analysiert und bei 4°C gelagert werden.

3.10.2 Maxipräparationen

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen (>20 µg) wurde das Qiagen Maxi Plasmid Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Mittels dieser Anwendung ist die unkomplizierte Isolierung und Aufreinigung von Plasmid DNA mit guten Ausbeuten und hohem Reinheitsgrad möglich.

Methodisch basiert die Isolierung der Plasmid-DNA auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Adsorption der DNA findet jedoch im Gegensatz zur Minipräparation (Kapitel 3.9.1) an Anionenaustauscher-Säulen bei niedrigen Salzkonzentrationen und geringem pH-Wert statt. Durch Kochsalz Puffer wird die DNA eluiert.

Die Präparation erfolgte ausgehend aus 100-400 ml Kulturen, die am Vortag mit 1.5 ml Übernachtkulturen angeimpft wurden. Nach Zentrifugation (20000 x g, 4°C, 15 Minuten, GSA, Sorvall) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Lysepuffer P2 versetzt, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 zugesetzt,

erneut vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Eine weitere Zentrifugation (20000 x g, 4°C, 30 Minuten SS34, Sorvall) schloss sich an. Der Überstand wurde über einen Filter auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen, die vorher mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert wurde. Nach Durchfließen des Überstandes wurde zweimal mit 30 ml QC Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit 15 ml QF Puffer die DNA eluiert, durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation (11000 UpM, 4°C, 30 Minuten, HB6, Sorvall) präzipitiert. Dem Waschen mit 70% Ethanol und der Zentrifugation (13000 UpM, 4°C, 15 Minuten) folgte das Trocknen des DNA Pellets bei Raumtemperatur für 10 Minuten, bevor die DNA in 200-350 μ l Puffer EB bzw. in H₂O bidest. aufgenommen wurde.

3.11 DNA-Konzentrationsbestimmung am Fluorometer

Die Bestimmung der Konzentration von erfolgte mithilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes (Hoechst 33258) im Fluorometer (TK 100, Fa. Hofer). Der fluoreszierende Farbstoff bindet selektiv an DNA. Durch Konformationsänderung wird nach Anregung Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Mit dem Fluorometer können in Abhängigkeit von der gewählten Messlösung DNA-Konzentrationen zwischen 10 und 2000 ng/µl bestimmt werden (Messlösung A für DNA-Proben bis 500 ng/µl oder Messlösung B für DNA-Proben bis 2000 ng/µl). Nach Kalibrierung mit Kalbsthymus-DNA Standard (Standard A 120 ng/µl bzw. Standard B 1200 ng/µl wurden die Messungen in Kristallküvetten (Fa. Sarstedt) mit einem Arbeitsvolumen von 2 ml durchgeführt. Pro Messung wurden 2 µl DNA-Probe bzw. DNA-Standard und 2 ml Messlösung eingesetzt. Die Konzentration der DNA-Lösung konnte dann in ng/µl direkt am Gerät abgelesen werden.

3.12 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden zur Überprüfung von Klonierungen nach einer modifizierten Form des Kettenabbruchverfahrens durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Diese Methode beruht auf der Ermittlung von DNA-Sequenzen durch kontrolliertes Abbrechen der Synthese von DNA-Strängen.

Doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen denaturiert, sodass ein sequenzspezifischer Primer angelagert werden kann. Ausgehend von diesem synthetisch hergestellten Oligonukleotid baut die DNA-Polymerase 2',3'-Didesoxy-ribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) und Ribonukleosidtriphosphate (dNTPs) am 3'-OH-Ende. Der Kettenabbruch wird durch den Einsatz von 2',3'-Didesoxyribo-

nukleosidtriphosphaten (ddNTPs) im Reaktionsgemisch erreicht. Diesen fehlt die 3'-OH-Gruppe, sodass die DNA-Polymerase keine weitere dNTPs bzw. ddNTPs in die synthetisierte Kette einbauen kann.

Durch die limitierte Zugabe an ddNTPs entstehen so Fragmente verschiedener Länge, die alle am 3'-Ende ein ddNTP aufweisen. Die ddNTPs sind je nach Base mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente in denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgt eine Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen über Laserabtastung. Emittierte Farbsignale werden über Filter mit vier verschiedenen Wellenlängen in Photomultiplier geleitet. Unter zu Hilfenahme eines Computers werden die erhaltenen Daten in entsprechende Nukleotidsequenzen übersetzt und als Computerdateien für die weitere Analyse zur Verfügung gestellt.

Zur Anwendung kam der ABI PRISM[™]Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Hierdurch ist der Sequenzierungsansatz mit allen vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs in einem Reaktionsgefäß mit nachfolgender gelelektrophoretischer Auftrennung des Ansatzes in einer Spur eines Polyacrylamidgels oder in der Kapillarelektrophorese möglich.

In einem Sequenzierungsansatz mit einem Reaktionsvolumen von 10.0 μ l kamen 200.0 ng DNA, 1.0 μ l 10 μ M Primer, 4.0 μ l Premix und ad H₂O bidest. zum Einsatz. Neben Reaktionspuffer enthielt der Premix, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und die AmpliTaq DNA-Polymerase FS.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden im Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 bzw. 9700 (Perkin Elmer) nach folgendem Temperaturprofil in 25 Zyklen durchgeführt:

- 1) 98°C für 2:30 Minuten Vordenaturierung der DNA
- 2) 98°C für 20 Sekunden Denaturierung der DNA
- 3) 55°C für 15 Sekunden Primerhybridisierung
- 4) 60°C für 4 Minuten Kettenverlängerung

Nach Reaktionsende wurde die DNA mit Ethanol gefällt (Kap. 3.12) und die getrockneten Pellets bis zur weiteren Verarbeitung in den Sequenzier-Automaten 373A oder PRISM[™]310 bei -20°C aufbewahrt.

Die Auftrennung der Proben und die weitere computertechnische Verarbeitung bis zur Verfügungsstellung der Sequenzdateien nahm Herrn S. Pociuli als Serviceleistung des Robert Koch-Instituts vor.

3.13 Ethanolfällung von DNA

Nukleinsäuren aggregieren in Gegenwart monovalenter Kationen (0.1-0.5 M). Bei Zugabe von Alkohol kommt es zur Ausfällung der DNA. Die DNA-Proben wurden mit 250 µl 100% Ethanol, 10 µl Natriumacetatlösung (3 M, pH 4.8) und 1 µl Dextranblau in ein Eppendorfgefäß vereinigt und gemischt. Dextranblau erleichtert dabei das Auffinden des Präzipitates. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge (15000 UpM, 4°C, Heraeus biofuge stratos, 30 Minuten) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut in einer Kühlzentrifuge (15000 UpM, 4°C, Heraeus biofuge stratos, 20 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet für 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C.

3.14 Anzucht eukaryontischer Zelllinien

Für die Transfektionsversuche wurde die permanente Schweinenierenzelllinie PS (nicht-infiziert mit PCV) verwendet. Die Haltung der Zellen erfolgte in 75 cm² großen Zellkulturflaschen (Falcon) im begasbaren CO₂-Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ unter Verwendung von 25 ml D-MEM, dem 5% (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugefügt wurde. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen umgesetzt. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen mit Trypsinlösung kurz gewaschen und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Ablösen der adhärenten Zellen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 – 1:20 umgesetzt bzw. auf mehrere Kulturgefäße verteilt.

Bei transient transfizierten Zellen, bei denen eine Integration der zugeführten DNA in das Genom durch Rekombination erwünscht war, enthielt das Zellkulturmedium Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml. Zunächst wurde Kulturmedium ohne fötales Kälberserum mit dem Antibiotikum gemischt und steril in das Kulturmedium abfiltriert. Anschließend wurde fötales Kälberserum in einer Konzentration von 5% (v/v) hinzugefügt.

3.15 Zellzählung nach Eosinfärbung

Zellzahlbestimmungen wurden vor Transfektionen durchgeführt, um eine definierte Menge Zellen einzusetzen. Trypsinierte Zellen wurden in 2-10 ml Medium aufgenommen. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge Eosin-Lösung (0.1% Eosin, 0.2% Natriumazid; PBS) versetzt und unter dem Lichtmikroskop (Leitz) bei 125-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Die Gesamtzellzahl konnte nach Auszählung zweier diagonal liegender, großer 4x4 Felder wie folgt ermittelt werden:

(Zellzahl Quadrant 1 + Zellzahl Quadrant 2) / 2 x 5 x 10⁴ = Zellzahl / ml Zellzahl / ml x Gesamtvolumen = Gesamtzellzahl

3.16 Transfektion von DNA in eukaryontische Zelllinien

Das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Hierfür stehen verschiedene Transfektionsmethoden zur Verfügung, u. a. :

- DEAE-Dextran-Methode
- Calciumphosphat-Methode
- Elektroporation
- Liposomen-Methode
- Retroviral-vermittelte Methode
- Mikroinjektion.

Zur Anwendung kam in dieser Arbeit eine weitere Methode, welche auf den Einsatz von aktivierten Dendrimeren basiert. Dendrimere sind synthetisch hergestellte verzweigte sphärische Moleküle, die ausgehend von einem Kernmolekül nach außen gerichtete Verzweigungen besitzen und in geladenen Aminogruppen enden. Die Aktivierung der Dendrimere wird durch die Entfernung tertiärer Amine vollzogen. DNA und aktivierte Dendrimere bilden kompakte Strukturen aus, die durch die Interaktion der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren mit den positiv geladenen Aminogruppen der Dendrimere zustande kommen. Der so entstehende DNA-Dendrimer-Komplex ist positiv geladen. Hierdurch ist eine Anlagerung an die negativ geladene Oberfläche der Zellwand möglich. Durch unspezifische Endozytose der Zellen wird nachfolgend der Transfektionskomplex in die Zelle aufgenommen. Der Abbau in den Lysosomen durch lysosomale Nuklease wird durch die Puffereigenschaft der aktivierten Dendrimere verhindert, sodass ein effizienter Transport in den Zellkern möglich ist.

Als aktiviertes Dendrimer wurde SuperFect Reagenz der Firma Qiagen verwendet. Hiermit ist sowohl eine transiente als auch stabile Transfektion durchführbar. Vor Transfektionen wurden die Zellen gezählt und im Verhältnis von 1:20 in Zellkulturschalen (60 mm Schalen) umgesetzt.

PS-Zellen wurden am Vortag der geplanten Transfektion nach Ermittlung der Zellzahl/ml in 60 mm Schalen ausplattiert und anschließend im begasbaren Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion betrug die Konfluenz der Zellen zwischen 40-60%.

Vorbereitend für die Transfektion wurde ein DNA-Medium (ohne FKS)-Gemisch mit einem Endvolumen von 200 µl in Eppendorfgefäßen hergestellt. Die DNA Menge betrug durchschnittlich 5-8 µg. 40 µl Transfektionsreagenz Superfect wurden hinzugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen.

Nach Zugabe von 1000 µl FKS-haltiges Zellmedium zur Transfektionsmischung wurde die gesamte Lösung auf die entsprechenden Zellschalen verteilt. Eine Inkubationsphase für 3 Stunden schloss sich im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ an. Die Transfektionsmischung wurde anschließend abgesaugt, die Zellen einmalig mit 4 ml PBS gewaschen, 5 ml Medium (FKS-haltig) dazugegeben und im Inkubator für 24 h bis 72 h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

3.17 Anzucht von Bakterien

Einzelkolonien aus Transformationen wurden vorwiegend in 5 ml LB-Medium, gelegentlich auch in TY-Medium, unter entsprechendem Selektionsdruck über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler angezogen.

3.18 Expression von Cap-spezifischer GST-Fusionsproteine und Derivaten in *E.coli* BL 21 Stämmen

Die Expression Cap-spezifischer rekombinanter GST-Fusionsproteine und Derivaten erfolgte im kommerziell erhältlichen Glutathion-S-Transferase (GST) Genfusionssystem pGEX von Pharmacia. Mit Hilfe dieses System können Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert, gereinigt und detektiert werden.

Das System besteht aus drei Komponenten: pGEX Plasmidvektoren, GST-Reinigungssäulen und GST-Detektionssystem.

Die pGEX Vektoren besitzen einen tac-Promoter für IPTG-induzierbare Überexpression. Das lac I^q-Gen ermöglicht den Gebrauch in allen *E.coli* Stämmen. Neben sechs Schnittstellen in der Multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) besitzt der Vektor vor der MCS-Region eine Erkennungssequenz für eine spezifische PreScission Protease (Pharmacia). Die Vektoren tragen das Ampicillinresistenzgen.

Die inserierten Gene werden als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase aus Schistosoma japonicum exprimiert (Smith & Johnson, 1988). Eine Reinigung des GST-Fusionsproteins kann über Glutathion-Affinitätschromatographie erfolgen.

Nach Transformation mit Plasmid-DNA wurden zunächst Bakterienkulturen in 5 ml LB-Medium (ggf. mit 2% Glucose Endkonzentration) bzw. in TY-Medium, unter entsprechendem selektiven Druck über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler angezogen. Danach wurden 50 ml Medium (LB mit / ohne 2% Glucose bzw. TY) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 1 ml Übernachtkulturen beimpft und das Wachstum bei 30°C bzw. 37°C unter kontinuierlichem Schütteln anhand der optischen Dichte verfolgt. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0.6-0.8 bei 588 nm wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 0.1 mM bis 1 mM induziert. Die optische Dichte wurde stündlich jeweils über den gesamten Induktionszeitraum gemessen.



Abbildung 3.2: pGEX-6P1 (aus Pharmacia Biotech)

	Glutathion S-Transferaseregion	
	tac promoter -10	205-211
	tac promoter -35	183-188
	lac operator	217-237
	Ribosome binding site for GST	244
	Start Codon (ATG) for GST	258
	Coding region for PreScission proteas cleavage	918-938
	Multiple cloning site	945-981
	B-lactamase (Amp [′]) Gene region	
	Promoter -10	1345-1350
	Promoter -35	1322-1327
	Start codon (ATG)	1392
	Stop codon (TGA)	2250
	lac I ^q gene region	
	Start codon (GTG)	3334
	Stop codon (TGA)	4413
	Plasmid replilcation region	
	Site of replication initiation	3010
	Region necessary for replication	2317-3013
-		

Tabelle 3.1: Übersicht Eigenschaften pGEX-6P1 Vektor (aus Pharmacia Biotech)

3.19 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten getrennten Proteine. Dabei ist die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle proportional dem Molekulargewicht. Die Eigenladung der Polypeptide wird durch Bindung von SDS neutralisiert, im elektrischen Feld ist daher eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts möglich.

Analytische Elektrophoresen wurden als vertikale Plattenelektrophoresen im diskontinuierlichen System durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Elektrophoresen wurden mit vertikalen Minigelen (10x10,5 cm) der Mighty Small SE 260 Serie oder mit Gelen (8x7 cm) der Serie SE 245 durchgeführt.

Auf das Trenngel wurde vor der Polymerisierung ein etwa 20 mm hohes Sammelgel gegossen, in das ein Kammerspacer (Taschenschablone) zur Ausbildung von 10 Taschen (Volumen 20 µl) eingesetzt wurde.

3.19.1 Gelherstellung

Die Gelherstellung erfolgte unter Zuhilfenahme des Hoefer Mighty Small SE245 Dual Gel Caster Systems (Amersham Pharmacia biotech). Hiermit können jeweils zwei Gele in einem Durchgang gegossen werden. Vor dem Gießen des Gels wurden jeweils eine Metall- und eine Glasplatte mit Ethanol gereinigt, mit Spacern zusammengelegt und im Gelgießstand befestigt.

Die Lösungen für das Trenngel wurden entsprechend dem Pipettierschema (ohne Ammoniumperoxodisulfat, TEMED und SDS) zusammengegeben und entgast.

Nach Zugabe von TEMED, Ammoniumperoxidsulfat (APS) sowie SDS wurde das Trenngel zwischen die Metall-Glasplatte gegossen und mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet.

Nach erfolgter Polymerisation wurde das Butanol gründlich mit H₂O bidest. entfernt. Die Herstellung des Sammelgels erfolgte entsprechend. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und ein entsprechender Taschenformer eingesetzt.

Der Taschenformer wurden nach Polymerisationsende entfernt, die Taschen gründlich mit H_2O bidest. gespült und in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt.

Im Trenngel wurden Acrylamid-Konzentrationen von 10% verwendet, das Sammelgel wurde 5%-ig hergestellt.

 Tabelle 3.2: Pipettierschema

	Trenngel	Sammelgel
	10 %	5 %
Acrylamid / Bisacrylamid (40 % w/v)	7,5 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
H ₂ O bidest.	14,4 ml	14,5 ml
SDS (10 % w/v)	0,3 ml	0,3 ml
TEMED	0,04 ml	0,04 ml
Ammoniumpersulfat (10 % w/v)	0,12 ml	0,12 ml

3.19.2 Probenbehandlung und Durchführung der Elektrophorese

Vor Durchführung der Elektrophorese wurden die Proben aus den Expressionsversuchen erneut in TE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Gabe von TritonX 100 (Endkonzentration 1%) zum Aufschluss der Zellen. Nachfolgend wurde zwecks Scheren der DNA eine Ultraschallbehandlung mittels

Branson Sonifier 450 durchgeführt (Timer: 1-2 Minuten, Duty Cycle: 10-30%, Output Control: Stufe 1-3). In Abhängigkeit der Probenkonsistenz wurden Timer, Duty Cycle sowie Output Control Stufe variiert. Durch eine nachfolgende Zentrifugation wurden die lösliche und unlösliche Fraktion voneinander getrennt (13000 UpM, 4°C, 2 Minuten, Heraeus fresco). Die lösliche Fraktion wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die unlösliche Fraktion in gleichem Volumen TE-Puffer erneut resuspendiert.

Die Proben wurden mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, 3 Minuten bei 95°C im Wasserbad gekocht und bis zum Auftragen der Proben auf Eis gelagert.

Mittels Hamiltonspritze erfolgte der Probenauftrag. Der Proteinstandards Mark12[™] Wide Range Protein Standard (2,5 kDa bis 200 kDa, Novex, Frankfurt) wurde zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt. Die Stromstärke bei der Elektrophorese betrug im Sammelgel 15 mA und im Trenngel 30 mA pro Gel .

Die Elektrophorese dauerte bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreichte.

3.19.3 Gelfärbung

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gele gegebenenfalls zwecks Visualisierung der Proteinbanden mittels Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einem Horizontalschüttler (Braun, Melsungen) inkubiert und mittels der Photodokumentationsanlage fotografiert.

3.20 Protein Blotting

Nach Abschluss der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese erfolgte der elektrophoretische Transfer der getrennten Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran (PVDF, Immobilon[™]-P, Millipore, Eschborn). Der Transfer erfolgte in einer horizontalen, semi-trockenen Transferkammer (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BIO-RAD bzw. Fast Blot 34, Biometra).

Zunächst wurden Blottingmembran und sechs Lagen Filterpapier auf Gelgröße zurechtgeschnitten (Schleicher & Schuell, Dassel). Die PVDF-Blottingmembran wurde einige Sekunden mit 100% Methanol benetzt, kurz mit H₂O bidest. gewaschen und in Transferpuffer überführt. Der zum Transfer vorgesehene Abschnitt des Gels wurde ausgeschnitten und 10-20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Zusammenbau des Blot-Sandwiches erfolgte luftblasenfrei:

Die Elektrodenplatten der Blottingapparatur wurden gleichmäßig mit H₂O bidest. benetzt, drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Filterpapier wurde auf die anodische Metall- bzw. Graphitplatte gelegt, darüber wurden Blottingmembran, Gel und drei weitere mit Transferpuffer getränkte Filterpapierschichten luftblasenfrei positioniert. Die obere Elektrodenplatte wurde aufgesetzt und an die Stromquelle angeschlossen.

Der Proteintransfer erfolgte bei Stromstärken von 3 mA/cm² Gelfläche über einen Zeitraum von 45-60 Minuten.

3.20.1 Färbung membrangebundener Proteine

Mit Hilfe von Färbereagenzien kann die Effizienz des Proteintransfers überprüft werden.

Reversible Färbung der Blotmembran erfolgte mittels Ponceau S (0,1% w/v in 1% v/v Essigsäure) über 1 Minute, die Entfärbung in H₂O bidest. Irreversible Färbung der Proteinmarker wurde mit Amidoschwarz 10 B (0,2% w/v in H₂O bidest) über 3 min durchgeführt, die Entfärbung wiederum in H₂O bidest.

3.20.2 Immunologischer Nachweis membrangebunder Proteine

unspezifischer überschüssiger Proteinbindungsstellen nach Zur Absättigung Proteintransfer wurde die Blotmembran im AP-Blockpuffer unter leichtem Schütteln 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung des Erst-Antikörpers an eines der transferierten Proteine. Hierfür wurde der Erst-Antikörper (Anti-GST, Amersham Pharmacia) 1:2000 in AP-Blockpuffer verdünnt, mit der Blotmembran luftblasenfrei in eine Folie eingeschweißt und auf einem Wipptisch (Rocking Platform, Biometra) geschüttelt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Nach Waschen mit AP-Puffer über 3x15 Minuten wurde die Blotmembran mit dem gegen den Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper (Anti-Goat-Antikörper, 1:5000 in AP-Blockpuffer) analog dem vorhergehenden Schritt 60 Minuten inkubiert und auf einem Wipptisch geschüttelt (Rocking Platform, Biometra). Anschließend wurde die Membran 3 x für je 15 Minuten mit AP-Puffer (pH 7,4) gewaschen, mit 40 ml AP-Detektionspuffer (pH 9,4) äquilibriert. In 10 ml AP-Detektionspuffer wurde 1 Tablette Farbsubstrat (Multicolor Detection Set, AP Substrattabletten "Rot") gelöst und mit der Membran inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach Sichtbarwerden der Banden mit H₂O bidest. gestoppt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet.

3.21 Fluoreszensproteine EGFP und DsRed

Die Vektoren pEGFP-C2 und pDsRed-C finden u. a. Verwendung als Reporter für die Genexpression in lebenden Tieren, als Fusionsprotein oder als Indikator für Protein-Protein-Wechselwirkung durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (Miyawaki *et al.*, 1997; Miyawaki, 2003). Der häufigste Einsatz betrifft die Anwendung als Fusionsprotein u. a. zur Visualisierung von Proteinen und deren subzellulärer Lokalisation sowie die Doppelfärbung durch Verwendung von Proteinen die in unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren wie die EGFP Varianten bzw. das DsRed Protein.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Verwendung als Fluoreszenzmarker ist, dass EGFP bzw. DsRed keinen signifikanten Einfluss auf die Proteineigenschaften ausübt. Das Plasmid pEGFP-C2 enthält eine optimierte EGFP Variante, die dem Kodongebrauch eukaryonter Zellen angepasst ist. Expression sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Zellen und die Belichtung mit blauem bzw. UV-Licht führt zu Emission von grüner Fluoreszenz. Die Fluoreszenz ist speziesunabhängig und benötigt keine weiteren Kofaktoren. EGFP Belichtung mit blauem – Licht führt zu einer 4-35fach höheren Fluoreszenz als in Wildtyp EGFP (Clontech Manual). Die maximalen Exzitations- und Emissionspeaks liegen bei 488 nm bzw. bei 507 nm. EGFP setzt sich aus 238 AS zusammen und hat ein Molekulargewicht von 27kDa. Aus Versuchen mit Deletionsmutanten ist bekannt, das die AS 7-229 für die Fluoreszenz benötigt werden. Das Fluoreszenz erzeugende Chromophor besteht aus einem zyklischen Tripeptid, welches aus den AS an Pos. 65-67 (Ser-Tyr-Gly) besteht (Li et al., 1997). Die Kristallstruktur von EGFP zeigt eine Fassstruktur (β -can) aus elf antiparallel angeordneten β -Faltblättern, welche im Innern eine α -Helixstruktur einschließt, die das Chromophor enthält.



Abbildung 3.2: Plasmid pEGFP-C2

Das Plasmid pDsRed1-C1 exprimiert ein optimierte DsRed Variante. DsRed hat seine Exzitations- und Emissionsmaxima bei 558 nm bzw. 583 nm und wurde ursprünglich bei der Suche nach Alternativen des EGFP entdeckt. DsRed setzt sich aus 225 AS zusammen, hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. Trotz einer Homologie auf Aminosäureebene zu EGFP von lediglich 26-30%, besitzen beide Proteine ähnliche Strukturen. DsRed Monomere formen ebenfalls eine Fassstruktur mit 11 β -Faltblättern, in deren Mitte eine α -helicale Proteinsequenz mit dem Chromophor lokalisiert ist (Wall *et al.*, 2000; Yarbrough *et al.*, 2001). Das Fluoreszenz erzeugende Chromophor besteht aus einem zyklischen Tripeptid, welches aus den AS an Pos. 66-68 (Gln-Tyr-Gly) besteht (Baird *et al.*, 2000). DsRed kommt allerdings im Gegensatz zu EGFP als Tetramer vor.



Abbildung 3.3: Plasmid pDsRed-C1

4. Ergebnisse

4.1 Proteinexpression

4.1.1 Klonierung des *cap*-Gens von PCV1 und PCV2 in den Expressionsvektor pGEX 6P-1

Das Kapsidprotein von PCV1 und PCV2 sollte als Fusionsprotein exprimiert werden um als Grundlage für eine Immunisierung sowie die spätere Entwicklung von diagnostischen Tests zu dienen.

Das *cap*-Gen von PCV1 wurde mit den Primern F158 (Pos. 31-60) und B159 (Pos. 736-718) mittels PCR amplifiziert (Hybridisierungstemperatur 58°C, 25 Zyklen). Primer F158 besitzt am 5'-Ende eine *EcoR* I, Primer B159 am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle. Als Template diente das Plasmid pSK144, welches das an Pos. 1101 durch Pst I linearisierte Genom von PCV1 enthält. Das Plasmid wurde zuvor mit *EcoR* I geschnitten.



Abbildung 4.2: Plasmid pSK-144

Das Amplifikat wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt, mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten und anschließend erneut aufgereinigt. Der Expressionsvektor pGEX-6P 1 wurde mit *BamH* I und *EcoR* I linearisiert und anschließend mittels

QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Vektor und Amplifikat wurden ligiert. *E.coli* DH-5α wurde mit dem Ligationsprodukt transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA eines positiven Klons wurde isoliert (siehe Kapitel 3.4). Erfolgreiche Insertion des gewünschten DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau überprüft (mit *BamH* I und *EcoR* I sowie *Hinc* II und *Msc* I). Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung mittels der Primer F187 (Pos. 262-284) und Primer B188 (Pos. 472-450) sowie Primer 65 (Pos. 298-277) und Primer 67 (Pos. 587-564), um den korrekten Einbau des Leserahmens zu überprüfen und den Einbau fehlerhafter Nukleotide durch die PCR-Reaktion auszuschließen. Der resultierende Klon wurde mit pGEX-Cap1 bezeichnet.



Abbildung 4.3: Plasmid pGEX-Cap1

Analog hierzu erfolgte die Amplifikation von *cap* von PCV2 mit dem Primerpaar B173 (Pos. 738-715) und B192 (Pos. 738-715) mittels PCR (Annealingtemperatur 58°C, 25 Zyklen). Primer B173 wies einen *BamH* I-Sequenzzusatz (sog. "Tag"), Primer B192 ein *Xho* I-Tag auf. Als Template diente pIC2 (enthält das gesamte Genom von

PCV2). Amplifikat und Vektor wurden mit *BamH* I und *Xho* I verdaut, aufgereinigt, ligiert, in kompetente Bakterien transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Unter selektivem Druck wurden Einzelkolonien in 5 ml LB Medium bebrütet und die Plasmid-DNA isoliert. Positive Klone wurden durch Kontrollverdau mit *BamH* I und *Xho* I sowie *EcoR* I ermittelt. Durch Sequenzierung mit den Primern F189 (Pos. 224-248) und B190 (Pos. 455-430) konnte der korrekte Leserahmen des Amplifikats nachgewiesen werden. Der resultierende Klon wurde mit pGEX-Cap2 benannt.





4.1.2 Klonierung eines Teilfragmentes des *cap*-Gens von PCV1 in den Vektor pGEX 6P-1

Aufgrund computergestützterer Analysen eines Codon-Preference Blots wurde der 3'-Bereich des *cap*-Genabschnittes (Pos. 427-34) mittels der Primer F209 (Pos. 35-64, sense) und B210 (Pos. 427-405, antisense) durch PCR (Hybridisierungstemperatur 52°C, 25 Zyklen) amplifiziert. Primer F209 besitzt einen *Xho* I-

Sequenzzusatz, Primer B210 einen *BamH* I-Sequenzzusatz am 5'-Ende. Als Template diente pSK144, welches mit *EcoR* I linearisiert war.

Das Amplifikat wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt, mit *BamH* I und *Xho* I geschnitten und anschließend erneut aufgereinigt. Der Expressionsvektor pGEX-6P-1 wurde mit *BamH* I/*Xho* I geschnitten, anschließend mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Vektor und Amplifikat wurden ligiert. *E.coli* DH-5 α wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA eines positiven Klons wurde isoliert (siehe Kapitel 3.4) und mittels mehrerer Kontrollrestriktionsverdaus analysiert (mit *BamH* I und *Xho* I sowie *BstX* 1). Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Der resultierende Klon wurde als pGEX-Cap1 Δ bezeichnet.



Abbildung 4.5: Plasmid pGEX-Cap1∆

4.1.3 Klonierung von Teilfragmenten des *cap*-Gens von PCV2 in den Vektor pGEX-6P-1

Eine computergestützte Analyse mittels Codon-Preference Blot zeigte unterschiedliche Kodonpräferenzen für einzelne Genabschnitte des *cap*-Gens. Um eine gute Expressionsrate zu erreichen erfolgte die Konstruktion von Teilfragmenten des *cap*-Gens von PCV2 aus dem vorderen, mittleren und hinteren Genbereich in den Expressionsvektor pGEX 6P-1.

Der vordere Genabschnitt wurde mittels der Primer F172 (Pos. 36-61) und B173 (Pos. 738-715), der mittlere Genabschnitt mittels der Primer F211 (Pos. 193-217) und B212 (Pos. 702-686) sowie der hintere Genabschnitt mittels der Primer F243 (Pos. 37-61) und B244 (Pos. 402-383) durch PCR (Hybridisierungstemperatur jeweils 58°C, 25 Zyklen) amplifiziert. Primer F172 besitzt einen *EcoR* I-Sequenzzusatz am 5'-Ende, die Primer B173, B212 und B244 besitzen am 5'-Ende einen *BamH* I-Sequenzzusatz. Die Primer F211 und F243 weisen am 5'-Ende einen *Xho* I-Sequenzzusatz auf.

Als Template diente das Plasmid pIC2, das das gesamte Genom von PCV2 enthält. Amplifikat und Vektor wurden mit *BamH* I und *EcoR* I bzw. *Xho* I verdaut, aufgereinigt, ligiert, in kompetente Bakterien transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Unter selektivem Druck wurden Einzelkolonien in 5 ml LB Medium bebrütet und die Plasmid-DNA isoliert. Positive Klone wurden durch Kontrollverdau mit *BamH* I und *EcoR* I bzw. *Xho* I überprüft. Weitere Kontrollverdaus folgten: mit *Bgl* I und *Msc* I für die Ligation mit dem PCR Produkt aus den Primern F172/B173, mit *Msc* I für die Ligation mit dem PCR Produkt aus den Primern F211/B212 und mit *BacH* I und *Pst* I für die Ligation mit dem PCR Produkt aus den Primern F243/B244.

Die resultierenden Klone wurden mit pGEX-Cap 2Δ *(430-738), pGEX-Cap 2Δ (193-702) und pGEX-Cap 2Δ (37-402) bezeichnet.

Das Plasmid pGEX-Cap $2\Delta^*(430-738)$ enthält ein Fragment Pos. 430-738 des *cap*-Gens, analog hierzu enthält das Plasmid pGEX-Cap $2\Delta(193-702)$ ein Fragment Pos. 193-702 des *cap*-Gens. Das Plasmid pGEX-Cap $2\Delta(37-402)$ hingegen enthält ein Fragment Pos. 37-402 des *cap*-Gens.



Abbildung 4.6: Plasmid pGEX-Cap2∆*(430-738)



Abbildung 4.7: Plasmid pGEX-Cap2∆(193-702)



Abbildung 4.8: Plasmid pGEX-Cap2Δ(37-402)



Abbildung 4.9: Übersicht über die konstruierten pGEX-Cap-Plasmide

4.1.4 Expression von pGEX-Cap1, pGEX-Cap1 Δ (34-427), pGEX-Cap2, pGEX-Cap2 Δ *(430-738), pGEX-Cap2 Δ (193-702) und pGEX-Cap2 Δ (37-402)

Vor der eigentlichen Proteinexpression wurden in Vorversuchen Wachstumskurven der transformierten Bakterien erstellt. Die Plasmide wurden in *E.coli* DH5 α transformiert, ausplattiert und in Vorkulturen von 5 ml in TY-Medium unter selektivem Druck bei 37°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml TY-Medium mit 100 µl der Vorkulturen angeimpft und kultiviert. Initial sowie im stündlichen Abstand (bis 6 Stunden) erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte. Bei einer optischen Dichte zwischen 0.6-0.8 erfolgte die Induktion mittels IPTG in einer Zielkonzentration von 0.1 mM. Nach Induktion betrug die Wachstumsdauer bis zum Erreichen des steady state 3,5 Stunden (siehe Abb. 4.8 und 4.9).





Abbildung 4.8: Wachstumskurve pGEX-6P1, pGEX-Cap1 sowie pGEX-Cap1Delta



(pGEX-Cap2Delta*, pGEX-Cap2(402-37) sowie pGEX-Cap2(702-193)



Abbildung 4.9: Wachstumskurve pGEX-Cap2 und Derivate

Für die Expressionsversuche wurden die Plasmide in *E.coli* DH5 α transformiert, ausplattiert und in Vorkulturen von 5 ml in TY-Medium (5% Glukose) unter selektivem Druck bei 37°C inkubiert.

Zur Expression wurden 5, 10 und 20 ml TY-Medium mit 50 µl, 100 µl und 200 µl der Vorkulturen angeimpft und bis zur erforderlichen optische Dichte von 0.6-0.8 kultiviert. Nach Erreichen dieses Wertes erfolgte die Induktion der Expression mittels 0.1mM IPTG. Nach Induktion betrug die Wachstumsdauer zwischen 2 und 3 Stunden. Stündlich erfolgte die Abnahme von 1.0 ml Bakterienkultur, welche sofort zentrifugiert und zur Durchführung einer SDS-Polyacrylamidgelektrophorese bzw. eines Western Blots weiterverarbeitet wurden.

Die berechnete Größe des Fusionsproteins aus GST und Cap entspricht ca. 54 kDa (26 kDa für GST und 28 kDa für *cap*).

Sowohl in der Färbung mit Coomassie-Blue (nicht gezeigt), als auch nach Proteintransfer auf Membran und spezifischer Färbung mit einem Anti-GST Antikörper zeigten sich drei Hauptbanden. Die größere Bande entsprach einem Protein einer Größe von ca. 36 kDa, die weiteren waren mit ca. 34 kDa bzw. 32 kDa kleiner. Zudem konnte eine Bande von 26 kDa nachgewiesen werden, die der Größe des GST-Proteins entsprach.



Abbildung 4.10: SDS Elektrophorese

In der Abbildung dargestellt sind die Expressionsprodukte von Cap(PCV1) und Cap(PCV2) bzw. der entsprechenden Deletionskonstrukte. Marker (Spur 1), pGEX-6P1 (Spur 2), pGEX-Cap1 (Spur 3), pGEX-Cap1 Δ (34-427) (Spur 4), pGEX-Cap2 (Spur 5), pGEX-Cap2 Δ *(430-738) (Spur 6), pGEX-Cap2 Δ (27-402) (Spur 7), pGEX-Cap2 Δ (193-702) (Spur 8).

Die Tatsache, dass keine Banden der erwarteten Größe beobachtet wurden, deutet darauf hin, dass die Expression nicht gelang oder die zu exprimierenden Proteine durch Proteolyse abgebaut wurden. Um letzteren Prozess zu unterdrücken, wurden die Versuche bei einer niedrigeren Temperatur (30°C) wiederholt, was das Ergebnis nicht beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Gleichartige Versuche mit dem Plasmid pGEX-Cap2 führten ebenfalls zum Nachweis von Expressionsprodukten der Größe von 33 kDa sowie von 30 kDa. Auch hier zeigte sich eine Bande auf Höhe des GST-Proteins.

Um die Proteinexpression zu verbessern, wurde der proteasedefiziente *E.coli* Stamm BL21 eingesetzt. Auch dies führte nicht zum Erfolg, denn sowohl bei 30°C als auch bei 37°C wurden Proteinbanden der berechneten Größe nicht beobachtet. Es waren überwiegend Expressionsprodukte einer Größe von ca. 30 bis 36 kDa nachweisbar.

Eine Veränderung des Kulturmediums (höhere Glukosekonzentration) lieferte vergleichbare Resultate. Eine Auftrennung in lösliche sowie unlösliche Zellfraktionen

mit nachfolgender Analyse der Proteinexpression zeigte ebenfalls keine Veränderung bezüglich des Bandenmusters.

Da nun die Annahme überprüft werden musste, dass das Protein nicht zur Expression kommt, wurde eine Computeranalyse der Codonpräferenz des *cap*-Gens in Bezug auf die Expression in *E. coli* durchgeführt. Die Analyse zeigte sowohl in N-terminalen Bereich des *cap*-Gens von PCV1 als auch von PCV2 eine ungünstige Codonzusammensetzung (siehe Abbildung 4.11). Das wies daraufhin, dass das Auftreten selten verwendeter Codons die Ursache für die schlechte Expression von Cap sein konnte, indem diese die Translationrate verlangsamten und dadurch die Proteinexpression verminderten.



Abbildung 4.11: Codon Preference Plots von Cap1 sowie Cap2, die mit Hilfe des Programms "MacVector 6.5" erzeugt wurden.

Es wurden daher Expressionsplasmide mit Teilfragmenten des *cap* Gens konstruiert, deren Codonzusammensetzung per Computeranalyse eine günstigere Translation und effizientere Proteinexpression erwarten ließ. Die Klonierung der Expressionsplasmide ist in Abschnitt 4.1.2 sowie 4.1.3 dargestellt.

Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über die erwartete Größe der Fusionsproteine.

Plasmid	Erwartete Größe des
	Fusionsprotein in kDa
pGEX-Cap1	ca. 55kDa
pGEX-Cap1∆(427-34)	ca. 43,7 kDa
pGEX-Cap2	ca. 55 kDa
pGEX-Cap2∆*	ca. 40 kDa
pGEX-Cap2∆(702-193)	ca. 48 kDa
pGEX-Cap2∆(402-37)	ca. 42 kDa

Tabelle 4.2: Größenübersicht Fusionsproteine

Trotz der Klonierung von Fragmenten, die eine günstige Codonverwendung für die Expression in *E.coli* aufweisen, wurde für die Expressionsplasmide pGEX-Cap $2\Delta^*(430-738)$ und pGEX-Cap $2\Delta(37-402)$ bei 30°C als auch bei 37°C, sowohl in den löslichen als auch in den unlöslichen Fraktionen keine Proteinbanden der erwarteten Größe detektiert.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren in den unlöslichen Fraktionen der Zellen, die mit den Plasmiden pGEX-Cap1 Δ (34-427) und pGEX-Cap2 Δ (193-702) transformiert waren, Proteinbanden einer Größe von 42 kDa für pGEX-Cap1 Δ (34-427) und von 45 kDa für pGEX-Cap2 Δ (193-702) nachweisbar. Dies entspricht dem Molekulargewicht der erwarteten Fusionsproteine. Damit gelang erstmalig die Expression von Fragmenten des Cap-Proteins in *E.coli* Zellen. In den löslichen Fraktionen waren keine Proteinbanden nachweisbar.

4.2 Konstruktion rekombinanter Virusgenome sowie subzelluläre Lokalisation

Um die Lokalisation PCV-kodierter Proteine im Rahmen des viralen Infektionszyklus zu untersuchen, wurden zwei rekombinante Virusvarianten hergestellt, die jeweils am C-Terminus des *rep*-Gens bzw. des *cap*-Gens die Information für ein fluoreszierendes Protein tragen. Die wurde durch eine Fusion der beiden Leserahmen erreicht.

Hierfür sollte zunächst durch *site directed mutagenesis* eine Bgl II-Schnittstelle jeweils an den C-Terminus des *rep*-Gens bzw. des *cap*-Gens eingefügt werden. In einem weiteren Schritt wurde durch Insertion in diese Schnittstelle die EGFP-Sequenz an den C-Terminus des entsprechenden Gens fusioniert.

Zur Konstruktion der rekombinanten Virusgenome wurde ein Plasmid verwendet, welches das gesamte PCV1 Genom trägt. Das Genom von PCV1 war über eine einzelne *Pst* I-Schnittstelle (Plasmid pSK144) bzw. über die *Hinc* II-Schnittstelle (Plasmid pSK140) linearisiert.



Abbildung 4.12: Plasmid pSK-144.

Das gesamte PCV1-Genom ist durch eine Pst I-Schnittstelle in das Plasmid integriert.



Abbildung 4.13: Plasmid pSK-140.

Das gesamte PCV1-Genom ist durch eine Hinc II-Schnittstelle in das Plasmid integriert.

4.2.1 Konstruktion rekombinanter Virusgenome

4.2.1.1 Vorbereitung zur Mutagenese

Das Plasmid pSK144 wurde mit *Kpn* I und *Msc* I geschnitten (Fragmentgröße 798 bp und 3641 bp), das kleinere Fragment wurde über eine Gelextraktion isoliert. Es entspricht der Pos. 1689-727 in PCV1 und enthält die intergenische Region zwischen 3'-Regionen des *rep* und *cap*-Gens und die für die C-terminale Region beider Proteine codierende Region. Als Vektor wurde pUC19 gewählt. Dieses Plasmid wurde mit *Kpn* I und *Hinc* II geschnitten (resultierende Fragmentgrößen 2668 bp und 19 bp), das größere Fragment aufgereinigt, und mit dem 798 bp Fragment aus dem Verdau des Plasmid pSK144 mit *Kpn* I/*Msc* I ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die rekombinante DNA wurde isoliert und mittels mehrerer Kontrollrestriktionsverdaus analysiert (mit *BstX* I, *Kpn* I, *EcoR* I sowie *Hinc* II).

Das resultierende Plasmid wurde pUC-Rekombinant genannt und besteht aus dem mit *Kpn* I und *Hinc* II geschnittenen pUC19 Vektor, in den das PCV1 Fragment 1689-727 inseriert ist (siehe Abb. 4.14a).



Abbildung 4.14a: Konstruktion pUC 19 Rekombinant



Abbildung 4.14b: Konstruktion pUC 19 Rekombinant

4.2.1.2 Mutagenese

Das Plasmid pUC-Rekombinant war Ausgangspunkt der *site directed Mutagenesis*. Primer 150Bgl II und Primer M201 wurden mit T₄-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Im ersten Schritt erfolgte am Vektor am Plsamid pUC-Rekombinant mittels der Primer F147mutA (bindet u. a. an Pos. 378-401 am pUC19 bzw. an Pos. 2634-2657 am pUC-Rekombinant) und Primer 150 Bgl II bzw. M201 die Synthese des mutierten Erststranges, der die zusätzliche *Bgl* II site am C-Terminus des *cap*- bzw. *rep*-Gens trug.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Amplifikation des mutagenisierten Abschnittes mittels PCR (Hybridisierungstemperatur 60°C, 30 Zyklen) unter Einsatz von Primer B148mutB (entspricht Pos. 470-447 am pUC19 bzw. Pos. 16-39 am pUC-Rekombinant) sowie Primer B-Tag (Teilsequenz aus Primer F147mutA). Durch Restriktionsverdau mittels Bgl II und Agaroseelektrophorese der Produkte wurde die erfolgreiche Mutagenese, d.h. die Einführung der *Bgl* II-Schnittstelle an der jeweils vorgesehenen Pos. Nachgewiesen (siehe Abb. 4.14b).

4.2.1.3 Konstruktion der Zwischenkonstrukte pRVC0 bzw. pRVR0

Die PCR-Amplifikate (PCR Mutagenese mit Primer 150 Bgl II bzw. PCR Primer M201) wurden mit QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt, mit *Kpn* I und *BstX* I geschnitten und anschließend erneut aufgereinigt.

Die Plasmide pSK144 (Fragmentgrößen 4041 bp und 399 bp) und pSK140 (4025 bp und 399 bp) wurden ebenfalls mit *Kpn* I und *BstX* I geschnitten und die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Über Gelextraktion wurden die Fragmente der Größe 4041 bp bzw. 4025 bp extrahiert und danach mit den verdauten Amplifikaten ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation in DH5 α -Zellen, das Ausplattieren auf TY-Agarplatten und die Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB-Medium. Die DNA der Transformanten wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse mit *Bgl* II analysiert. Die resultierenden Klone wurden mit pRVC0 (PCR150H2) bzw. pRVR0 (PCR Mut201) bezeichnet.

Das Plasmid pRVC0 unterscheidet sich von pSK144 durch eine *Bgl* II site an PCV1 Pos. 34-40, das Plasmid pRVR0 von pSK140 durch eine *Bgl* II site an PCV1 Pos. 1751-1756.

4.2.1.4 Insertion von EGFP an C-Terminus des cap- und rep-Gen

Das *enhanced green Fluorescent Protein* (EGFP) wurde als PCR-Amplifikat in das Plasmid pRVC0 (Primer F137 und B138, Hybridisierungstemperatur 58°C, 25 Zyklen) eingeführt. Das Plasmid pEGFP-C2 diente als Template. Die verwendeten Primer trugen an ihrem 5'-Ende einen *Bgl* II-Sequenzzusatz. Das Amplifikat wurde aufgereinigt, einem *Bgl* II Restriktionsverdau unterzogen, erneut aufgereinigt und mit dem Plasmid pRVC0, welches ebenfalls mit *Bgl* II linearisiert wurde, ligiert.

Analog hierzu erfolgte die Insertion des EGFP in das Plasmid pRVR0. Die Amplifikation von EGFP erfolgte in diesem Fall mittels der Primer F139 und B140, welche am 5'-Ende einen *Bcl* I-Sequenzzusatz besitzen (Hybridisierungstemperatur 58°C, 25 Zyklen, Template pEGFP-C2). Das Amplifikat wurde aufgereinigt, mit *Bcl* I geschnitten, und erneut aufgereinigt und mit dem Plasmid pRVR0, welches zuvor mit *Bgl* II linearisiert wurde, ligiert.

Die Ligationsprodukte wurden in DH5α-Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse analysiert. Durch Sequenzierung mit den Primern #180 bzw. #210 für die Klonierung von pRVC0 sowie Primer #242 für die Klonierung von pRVR0 wurden die Klone auf die Insertion des EGFP-Gens im korrekten Leserahmen überprüft. Die so erzeugten Plasmide wurden als pRVC1 bzw. pRVR1 bezeichnet. Das Plasmid pRVC1 enthält ein rekombinantes PCV1 Genom mit der Sequenz des EGFP-Proteins, die über eine *Bgl* II-Schnittstelle C-terminal an das Capsidgen fusioniert wurde. Das Plasmid pRVR1 enthält ein rekombinantes PCV1 Genom mit EGFP Sequenz an das C-terminale Replikasegen über eine *Bgl* II-Schnittstelle (siehe Abbildung 4.15).



Abbildung 4.15: Konstruktion von pRVC0 bzw. pRVR0

4.2.1.5 Erzeugung der rekombinanten Viren pRVC2 und pRVR2

Da das rekombinante Virusgenom im Vektor inseriert ist, musste es im letzten Schritt ausgeschnitten und religiert werden.

Durch Restriktionsverdau mit *Pst* I bei pRVC1 bzw. mit *Hinc* II I bei pRVR1 und anschließender Ligation wurden die rekombinanten Virusgenome pRVC2 und pRVR2 erzeugt.



Abbildung 4.16: Konstruktion pRVC1, pRVC2, pRVR1 bzw. pRVR2

4.2.2 Transfektion mit pRVC2 bzw. pRVR2 und subzelluläre Lokalisation von pRVC2 bzw. pRVR2

Die rekombinanten Viren wurden in PCV-freie PS-Zellen transfiziert und im weiteren Verlauf mit einem konfokalen Mikroskop untersucht, um das Auftreten von Fusionsproteinen im zeitlichen Verlauf zu dokumentieren sowie deren subzelluläre Lokalisation festzustellen.

Für die Transfektion in die Zellen wurde das Transfektionsreagenz Superfect der Firma Qiagen verwendet (siehe Kapitel 3.16).

Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden am konfokalen Laserscan-Lichtmikroskop (Fa. Zeiss) beurteilt. Negativ- sowie Positivkontrollen wurden mitgeführt. Das rekombinante Virus pRVC2 zeigte nach Transfektion in PS-Zellen die Bildung eines fluoreszierenden Fusionsproteins (Abb. 4.17). Die Lokalisation des Cap:EGFP Fusionsproteins wurde 24 h nach Transfektion in den Nukleoli beobachtet (Abb. 4.17A). 48 und 72 h nach Transfektion zeigten die Mehrzahl der Zellen ein Fluoreszenzsignal im gesamten Nukleus, Signale in den Nukleoli waren nur noch vereinzelt zu beobachten (Abb. 4.17 B, C).

Mit dem Überstand von Zellen, die mit dem rekombinanten Virus pRVC2 transfiziert waren, wurden PS Zellen infiziert, die jedoch keine Fluoreszenzsignale zeigten.

Damit wurde die Infektiosität der rekombinanten PCV-Variante pRVC2 nicht nachgewiesen. (Abb. 4.17 D). Dieses Ergebnis zeigt, dass nach Transfektion von von PS-Zellen mit dem rekombinanten Genom von pRVC2 keine biologisch aktiven Viruspartikel gebildet werden.



П

Abbildung 4.17: Infektion mit pRVC2 nach 24, 48 sowie 72 Stunden

PRVC2 infizierte Zellen nach 24 (A), 48 (B) und 72 (C) Stunden zeigen Fluoreszenzsignale, initial in den Nukleoli, im weiteren im gesamten Nukleus und nur noch vereinzelt in den Nukleoli. (D) zeigt PS-Zellen, die mit Überstand von pRVC2 transfizierten Zellen transfiziert wurden (keine Fluoreszenz).

Im Gegensatz zur Variante Cap:EGFP in pRVC2 zeigten PS-Zellen nach Transfektion mit dem rekombinanten Virusgenom pRVR2, indem das Rep Protein durch eine Rep:EGFP Fusion ersetzt wurde nach 24, 48 sowie 72 h keine Fluoreszenzsignale (Abb. 4.18 A, B, C). Diese Beobachtung spricht dafür, das das Fusionsprotein nicht exprimiert wird oder sofort abgebaut wird.

Wie durch das Vorergebnis bereits angedeutet, zeigte sich auch nach Transfektion von PS-Zellen mit Überstand von pRVR2 transfezierten Zellen keine Fluoreszenzsignale. Analog zum rekombinanten Virus pRVC2 ist auch beim rekombinanten Virus pRVR2 davon auszugehen, dass keine biologisch aktiven Viruspartikel gebildet werden können (Abb. 4.18 D), im Gegensatz zum Ersteren kommt es aber bei pRVR2 nach Transfektion nicht zu einer Expression des Fusionsproteins.



D

Abbildung 4.18: Infektion mit pRVR2 nach 24, 48 sowie 72 Stunden

pRVR2 transfizierte PS-Zellen zeigen nach 24 (A), 48 (B) sowie 72 (C) kein Fluoreszenz. In (D) sind PS-Zellen zu sehen, die mit dem Überstand von pRVR2-transfizierter PS-Zellen infiziert wurden. Diese zeigen auch keine Fluoreszenz.

4.3.1 Subzelluläre Lokalisation PCV-kodierter Proteine

Um die subzelluläre Lokalisation der *rep*-Genprodukte sowie des *cap*-Genprodukts der PCV zu untersuchen, wurden die *rep*-Genprodukte Rep und Rep' und das *cap*-Gen von PCV1 sowie das *cap*-Gen von PCV2 in den Vektor pEGFP-C2 bzw. in den Vektor pDsRed1-C kloniert, wobei das Fluoreszenzprotein dieses Mal jeweils an den N-Terminus der viralen Proteine fusioniert wurde.

4.3.1.1 Konstruktion von Plasmid pEGFP-Cap1

Der Vektor pEGFP-C2 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *BamH* I und *Xho* I geschnitten, der Verdau im Agarosegel analysiert und mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Sequenz für das Kapsidprotein aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F141 (enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle, 5'-CGGGATCC-3') sowie B142 (enthält am 5'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle 5'-CCGCTGGAG-3') mittels PCR (Template pSK144) amplifiziert. Nachfolgend erfolgte ein Restriktionsverdau mit *BamH* I und *Xho* I, das Amplifikat wurde aufgereinigt und
als Insert in den Vektor pEGFP-C2 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion durch *BamH* I und *Xho* I analysiert, sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmens sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde pEGFP-Cap1 (siehe Abb. 4.19) genannt und enthält das Fusionsprotein EGFP:Cap(PCV1).



Abbildung 4.19: Konstruktion des Plasmids pEGFP-Cap1

4.3.1.2 Konstruktion von Plasmid pEGFP-Cap2

Analog zur Klonierung von pEGFP-Cap1 wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Xho* I geschnitten und aufgereinigt.

Das Kapsidgen aus PCV2 wurde mit dem Primerpaar F227 (enthält am 5'-Ende einen *BamH* I-Sequenzzusatz, 5'-CG*GGATCC*-3') und Primer B228 (enthält am 5'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle, 5'-CCG**CTCGAG**-3') mittels PCR vom Template pIC2 amplifiziert, mit *BamH* I und *Xho* I restringiert, aufgereinigt und mit dem geschnittenen Vektor pEGFP-C2 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde pEGFP-Cap2 genannt und enthält ein *cap*-Gen, das an den C-Terminus des EGFP-Gens fusioniert ist (Abb. 4.20).





4.3.1.3 Konstruktion von Plasmid pDsRed-cap 1

Der Vektor pDsRed-C1 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *Xho* I und *EcoR* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt. Das Kapsidprotein aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F209 (*Xho* I-Schnittstelle am 5'-Ende, 5'-CCG*CTCGAG*-3') sowie B273B (enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G*GAATTC*-3') mittels PCR (Template pSK144, Hybridisierungstemperatur 55°C, 25 Zyklen) amplifiziert, mit *Xho* I und *EcoR* I einem Restriktionsverdau unterzogen. Das Insert wurde aufgereinigt und mit dem Vektor pDsRed-C1 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert,

auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion (*BamH I* und *EcoR I*) analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde pDsRed-Cap1 genannt und enthält ein *cap*-Gen, das an den C-Terminus des DsRed-Gens fusioniert ist (Abb. 4.21).





4.3.1.4 Konstruktion von Plasmid pEGFP-rep

Der Vektor pEGFP-C2 wurde an der an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt.

Das Replikationsprotein aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F166 (*EcoR* I-Schnittstelle am 5'-Ende, 5'-G**GAATTC**-3') sowie B167 (enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle 5'-CG**GGATCC**-3') mittels PCR anhand des Templates pORF4 amplifiziert, mit *EcoR* I und *BamH* I einem Restriktionsverdau unterzogen, aufgereinigt sowie als Insert mit dem Vektor pEGFP-C2 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion (*BamH* I und *Xho* I, *Hinc* II und *Xho* I sowie *Sac* II und *EcoR* I) analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmens mit den Primern B167 und B180 sequenziert.

Das resultierende Plasmid wurde pEGFP-rep genannt. Es enthält das Replikationsgen aus PCV1, dass an den C-Terminus des EGFP-Gens fusioniert ist und kodiert sowohl für EGFP:Rep als auch für EGFP:Rep' (Abb. 4.22).



Abbildung 4.22: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep

4.3.1.5 Konstruktion von Plasmid pEGFP-rep'

Der Vektor pEGFP-C2 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt. Das *rep*-Gen aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F166 (enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G*GAATTC*-3') sowie B167 (enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle 5'-CG*GGATCC*-3') mittels PCR amplifiziert. Als Template diente das

Plamid pAM4, das die cDNA-Sequenz für *rep*' enthält. Das PCR Produkt wurde mit *EcoR* I und *BamH* I einem Restriktionsverdau unterzogen, aufgereinigt und als Insert in den Vektor pEGFP-C2 eingesetzt. Die Ligationsprodukte wurden in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion durch *BamH* I und *Xho* I, *Hinc* II und *Xho* I sowie *Sca* I und *EcoR* I analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen mit den Primern B167 und B180 sequenziert.

Das resultierende Plasmid wurde pEGFP-rep' genannt. Es enthält das mutagenisierte Replikationsprotein von PCV1 fusioniert an den C-Terminus des EGFP-Proteins (Abb. 4.23).



Abbildung 4.23: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep'

4.3.1.6 Konstruktion von Plasmid pEGFP-rep*

Der Vektor pEGFP-C2 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt.

Das Replikationprotein aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F166 (enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G**GAATTC**-3') sowie B167 (enthält am 5'-Ende eine BamH I-Schnittstelle 5'-CG**GGATCC**-3') mittels PCR vom Template pAM9 abgenomen. pAM9 enthält eine modifizierte Variante des *rep*-Gens, Rep' wird durch Mutagenese der Spleißdonorstellen nicht synthetisiert. Das Amplifikat wurde mit *EcoR* I und *BamH* I verdaut, aufgereinigt und als Insert mit dem Vektor pEGFP-C2 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktion durch *BamH* I und *Xho* I, *Hinc* II und *Xho* I sowie *Sac* II und *EcoR* I analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen mit den Primern B167 und B180 sequenziert.

Das resultierende Plasmid wurde pEGFP-rep* genannt. Am C-Terminus ist an EGFP das *rep* Protein aus PCV1 fusioniert, welches aufgrund einer Mutagenisierung am Plasmid pAM9 nur Rep codiert (Abb. 4.24).



Abbildung 4.24: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep*

4.3.1.7 Konstruktion von Plasmid pDsRed –rep

Der Vektor pDsRed-C1 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt.

Das Replikationsprotein aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F274b (Pos. 822-839 von PCV1, enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G**GAATTC**-3') sowie B167 (Pos. 1753-22 von PCV1, Komplementärstrang, enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle 5'-CG**GGATCC**-3') mittels PCR (Template pORF4 [enthält Sequenz für *rep*], Hybrdisierungstemperatur 55°C, 25 Zyklen) amplifiziert, mit *EcoR* I und *BamH* I einem Restriktionsverdau unterzogen, aufgereinigt sowie als Insert mit dem Vektor pDsRed-C1 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse (*BamH* I/*EcoR* I) analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen sequenziert.

Das resultierende Plasmid wurde pDsRed-rep genannt. Es enthält das Replikationsgen aus PCV1, das an den C-Terminus des EGFP-Gens fusioniert ist und kodiert demzufolge sowohl für DsRed:Rep als auch für DsRed:Rep' (Abb. 4.25).



Abbildung 4.25: Konstruktion des Plasmids pDsRed-rep

4.3.1.8 Konstruktion von Plasmid pDsRed -rep'

Der Vektor pDsRed-C1 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt.

Das rep-Gen aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F274b (Pos. 822-839 von PCV1, enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G**GAATTC**-3') sowie B167 (Pos. 1753-22 von PCV1, Komplementärstrang, enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle 5'-CG**GGATCC**-3') mittels PCR amplifiziert. Als Template diente das Plasmid pAM4, das die cDNA-Sequenz für *rep*' enthält, (Hybdridisierungstemperatur 55°C, 25 Zyklen). Das PCR-Produkt wurde mit *EcoR* I und *BamH* I einem Restriktionsverdau unterzogen, aufgereinigt sowie als Insert mit dem Vektor pDsRed-C1 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse (*BamH* I und *EcoR* I) analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beide Leserahmen sequenziert.

Das resultierende Plasmid wurde pDsRed-rep' genannt. Es enthält die cDNA Sequenz des differentiellen Spleißproduktes Rep' von PCV1 fusioniert an den C-Terminus des EGFP-Protein (Abb. 4.26).





4.3.1.9 Konstruktion von Plasmid pDsRed -rep*

Der Vektor pDsRed-C1 wurde an der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoR* I und *BamH* I geschnitten, im Agarosegel elektrophoretisch analysiert und aufgereinigt.

Rep aus PCV1 wurde mit dem Primerpaar F274b (enthält am 5'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle, 5'-G**GAATTC**-3') sowie B167 (enthält am 5'-Ende eine *BamH* I-Schnittstelle 5'-CG**GGATCC**-3') mittels PCR amplifiziert. Als Template diente pAM9. Dieses Plasmid kodiert eine modifizierte Variante des *rep*-Gens, die nur das Volllängenprodukt Rep zur Expression bringt. Das Produkt wurde mit *EcoR* I und *BamH* I einem Restriktionsverdau unterzogen, aufgereinigt und mit dem Vektor pDsRed-C1 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, auf TY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anzucht von Einzelkolonien aus der Transformation unter selektivem Druck in 5 ml LB Medium. Die DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse (*BamH* I und *EcoR* I) analysiert sowie zur Überprüfung der korrekten Fusion der beiden Leserahmen sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde pDsRed-rep* genannt. Am C-Terminus ist an DsRed das Rep* Protein aus PCV1 fusioniert, es exprimiert ein Fusionsprotein aus DsRed und Rep (Abb. 4.27).



Abbildung 4.27: Konstruktion des Plasmids pDsRed-rep*

4.3.2 Lokalisation der hergestellten Fusionsproteine

Die Plasmide wurden in virusfreie PS-Zellen transfiziert (siehe Kap. 3.16). Nach 24 h wurden die Zellen mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (Fa. Zeiss) untersucht und die räumliche Verteilung der Fluoreszenzproteine bestimmt.

4.3.2.1 Lokalisation von pEGFP-Cap1, pDsRed-Cap1, pEGFP-Cap2 sowie pEGFP-C2

24 h nach Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-Cap1 wurde Fluoreszenz im Bereich der Nucleoli unter Aussparung des übrigen Nukleus beobachtet (Abb. 4.28 A). Die Transfektion mit pDsRed-Cap1 zeigte das gleiche Verteilungsmuster (Abb. 4.28 B). Auch für das Fusionsprotein EGFP:Cap(PCV2) zeigte sich 24 Stunden nach Transfektion ein Fluoreszenzsignal im Bereich der Nucleoli unter Aussparung des übrigen Zellkerns.

Das Plasmid pEGFP-C2, das als Kontrolle diente, zeigte dagegen eine Fluoreszenz in der ganzen Zelle.



Abbildung 4.28: Fluoreszenzmuster der Plasmide pEGFP-Cap1 (A), pDsRed-Cap1 (B), pEGFP-Cap2 (C) sowie pEGFP-C2 (D).

4.3.2.2 Lokalisation von pEGFP-rep, pDsRed-rep, pEGFP-rep', pDsRed-rep', pEGFP-rep* und pDsRed-rep*

Nach Transfektion des Plasmids pEGFP-rep kam es zur Fluoreszenz im Bereich des Nukleus unter Aussparung der Nukleoli (Abb. 4.29 A, B). Zwischen den Plasmiden pEGFP-rep und pDsRed-rep war kein Unterschied festzustellen. Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-rep', pEGFP-rep* und pDsRed-rep* beobachtet (Abb. 4.29 C bzw Abb. 4.30).









С

Abbildung 4.29: Fluoreszenzmuster der Plasmide pEGFP-rep (A, B), pEGFP-rep' (C) sowie pEGFPrep* (D).

Alle drei Plasmide zeigen Fluoreszenz aus dem Nukleusbereich unter Aussparung der Nukleoli (Vergleiche Abb. 4.30).

4.3.3 Untersuchung zur Kolokalisationen

Es wurden Doppeltransfektionen vor dem Hintergrund der gegenseitigen Beeinflussung der subzellulären Lokalisation durchgeführt.

Die Transfektion mit pDsRed-rep' und pEGFP-rep* zeigte eine Kolokalisation von Rep und Rep'-Protein im Nukleus der transfizierten Zellen. Die Bereiche der Nukleoli waren ausgespart (Abb. 4.30 A).

Bei der Doppeltransfektion mit pDsRed-cap1 und pEGFP-rep* veränderte sich die Lokalisation der untersuchten kotransfizierten Proteine nicht im Vergleich zum Ergebnis der separat transfizierten Plasmide. Es zeigte sich wiederum eine Akkumulation des Cap-Proteins in den Nukleoli sowie eine davon räumlich getrennte Akkumulation des Rep*-Proteins im Nukleoplasma (Abb. 4.30 B).

Bei der Doppeltransfektion mit den Plasmiden pDsRed-rep' und pEGFP-cap1 bzw. pDsRed-cap1 mit pEGFP-rep zeigte sich der gleiche Befund (Abb. 4.30 C und D).



Abbildung 4.30: Kolokalisation der Plasmide pDsRed-rep' und pEGFP-rep*, pDsRed-cap1 und pEGFP-rep*, pDsRed-rep' und pEGFP-cap1 sowie pDsRed-cap1 und pEGFP-rep

5. Diskussion

5.1 Expression des Cap-Proteins von PCV1 und PCV2

Cap bildet mit 699bp bzw. 233 AS sowohl in PCV1 als auch PCV2 den zweitgrößten offenen Leserahmen und kodiert für das Hauptstrukturprotein der PCV, das Kapsidprotein (Mankertz *et al.*, 1998a; Nawagitgul *et al.*, 2000).

Die Expression von Cap(PCV1) bzw. Cap(PCV2) erfolgte vor dem Hintergrund der nachfolgend durchgeführten Antikörperproduktion (Finsterbusch *et al.*, 2005). Die Expression des Kapsidproteins sollte auch als Vorarbeit zu strukturellen Untersuchungen bezüglich des Viruszusammenbaus dienen. Im Rahmen von Bindungsstudien sollten nachfolgend mögliche Rezeptoren identifiziert werden.

Zudem sollte rekombinant hergestelltes Cap-Protein sowohl für diagnostische Zwecke als auch zur Erzeugung einer Vakzine zum Schutz gegen PCV-assoziierte Erkrankung dienen. Die letztgenannten Punkte waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Die *cap*-Gene von PCV1 und PCV2 zeigen die größten Abweichungen, wenn die einzelnen Komponenten der viralen Genome miteinander verglichen werden. Die dadurch bedingten Sequenzunterschiede des Kapsidproteins werden auch als potenzielle Determinante der unterschiedlichen Pathogenität von PCV1 bzw. PCV2 diskutiert. Deshalb sollte die Expression von Cap von PCV1 und PCV2 als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Mutiertes Kapsidprotein kann zu einem unterschiedlichen Tropismus führen (Mankertz *et al.*, 2000a).

Zu diesem Zweck wurden die *cap*-Leserahmen von PCV1 und PCV2 in ein prokaryontisches GST-Expressionssystem kloniert. Dabei wurde das Kapsidprotein mit seinem N-Terminus an das GST-Protein fusioniert. Das GST-Expressionssystem ist einfach und vielseitig, eine effiziente Aufreinigung muss aber häufig unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden und konformationsabhängige Untersuchungen sind danach nicht mehr möglich. Ferner fehlen bei der Expression im prokaryontischen System posttranslationale Modifikationen der Proteine.

Die Expression von Cap-Volllängenprodukten war nicht möglich. Die Veränderung bezüglich der Wachstumstemperatur (30°C bzw. 37°C), Variation der Zusammensetzung des Nährmediums und die Benutzung des Protease-defizienten *E.coli* Stamm BL21 brachte keine Verbesserung. Als ursächlich hierfür wurde die Kodonzusammensetzung von *cap* aus PCV1 und PCV2 angenommen, die nicht auf die Expression in *E.coli* abgestimmt ist, denn es ist bekannt, dass das Vorhandensein von Kodons, die in *E.coli* selten verwendet werden, die Expression von Proteinen in diesem System beeinträchtigen kann (Kurland & Gallant, 1996).

Daher erfolgte eine computergestützte Analyse der Kodonzusammensetzung von cap. Die Auswertung zeigte Abschnitte mit einer für die Expression in E.coli erfolgte Kodonpräferenz. die ungünstigeren Es daher Konstruktion von Teilfragmenten von cap von PCV1 und PCV2 als GST-Fusionsproteine. Es wurden Genabschnitte ausgewählt, die eine günstige Kodonzusammensetzung für die Expression in E.coli aufwiesen. Durch diese Manipulation wurde die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus dem C-terminalen cap-Genabschnitt von PCV1 und dem GST Protein möglich, das mittels Coomassie Färbung bzw. Western Blot mit GST-Antikörpern nachgewiesen wurde. Die Expression eines gleichartigen Fusionsproteins aus dem mittleren Abschnitt von Cap von PCV2 und GST gelang ebenfalls. Der C-terminale Bereich des Kapsidproteins (AS Position 104 bis 233) wurde nach Expression aufgereinigt und diente als Antigen für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers (Finsterbusch et al., 2005).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichten Liu et al., dass die Expression von Cap (PCV2) mit den Expressionsplasmiden pGEX-5X-3 bzw. pET-15b, die zur Bildung eines GST-Fusionsproteins bzw. 6xHis-Proteins führen, als Volllängenprodukt trotz Variation der Temperatur, der Gabe von Protease-Inhibitoren und des Wechsels auf ein proteasedefizienten *E.coli* Stamm nicht möglich war.

Die Expression des Gesamtproteins gelang aber in *E.coli* als Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein.

Nawagitgul et al. gelang die Expression von Cap (PCV2) in einem baculovirusbasierten Expressionsystem. Nach Aufreinigung des rekombinanten Expressionsproteins wurde die Bildung von Virus-artigen Partikeln beobachtet. Die Größe der Partikel betrug ca. 17 nm und stimmte damit mit der Größe der PCV2 Virionen überein. Durch diese Untersuchung wurde erstmalig der Nachweis erbracht, dass *cap* von PCV2 für das Hauptstrukturprotein der PCV kodiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein auf rekombinantem Kapsidprotein basierender ELISA-Test zum Nachweis von PCV2-spezifischen Antikörpern entwickelt.

Eine Analyse des Kapsidproteins aus PCV2 Stämmen zeigt drei Regionen mit AS-Heterogenitäten an, von denen zwei immunreaktive dominante Areale aufweisen (AS 59-80, 121-136 und 180-191) (Larochelle *et al.*, 2002). Durch eine Pepscan Analyse konnten Mahé et. al. zeigen, dass Anti-PCV2 Serum aus SPF- und konventionell gezüchteten Schweinen spezifisch gegen drei immunreaktive Abschnitte von *cap* von PCV2 reagiert: Peptide zwischen AS 65-87, 113-139 und 193-207 (Mahe *et al.*, 2000). Lekcharoensuk et. al. identifizierten immundominante Epitope des Kapsidproteins von PCV2 im Bereich der AS 47-84, 165-200 sowie 229-233 (Lekcharoensuk *et al.*, 2004).

Ein Hyperimmunserum gegen *Cap* von PCV2 zeigte keine Kreuzreaktion mit PCV1 infizierten Zellen. Dagegen konnte in der gleichen Arbeit demonstriert werden, dass *Rep* von PCV1 und PCV2 eine gemeinsame antigene Determinante auf Aminosäureposition 185-211 besitzen. Hierdurch konnte die Kreuzreaktivität von Serum aus PCV2 infizierten Tieren gegen PCV1 erklärt werden. In der oben erwähnten Arbeit wurden PCV-typ-spezifische Epitope erstmals kartiert.

5.2 Konstruktion rekombinanter Genome und subzelluläre Lokalisation der viralen Proteine

Um Orte viraler Aktivität in infizierten Zellen identifizieren zu können, wurden zwei rekombinante Viren konstruiert, welche das fluoreszierende Protein EGFP exprimieren sollten.

Das Einführen eines Reportergens in Viren ist eine anerkannte Methode zur Identifikation von Bereichen viraler Aktivität in *vivo* und in *vitro*. So wurde das *lacZ*-Gen von *E.coli* in Herpesviren eingesetzt (Spaete & Mocarski, 1985, 1987; Ho & Mocarski, 1988; Manning & Mocarski, 1988; Henry *et al.*, 2000). EGFP emittiert unter physiologischen Bedingungen grün fluoreszierendes Licht in Zellkulturzellen und auch in Tieren. EGFP ist in einem weiten pH-Bereich stabil, ebenfalls bei Einsatz von Detergenzien und reduzierenden Faktoren. Diese Eigenschaften ist vorteilhaft gegenüber Nachweismethoden mit anderen Reportergene, wie z. B. das β -Gal Protein, welches die Zugabe von toxischen chromophoren Substraten und anderen Agentien benötigt, die Zellen und Virus inaktivieren.

Die Konstrukte sollten nach Möglichkeit dem Wildtypen des Virus funktionell ähnlich sein, d.h. Replikationsaktivität zeigen bzw. infektiös sein. Die Insertion von EGFP erfolgte demzufolge in die intergenische Region jeweils an das Ende des *cap* und *rep*-Gens, da zu vermuten stand, dass eine Insertion an dieser Stelle am wenigsten in die genetische Information eingreifen sollte. Die EGFP-Geninsertion im richtigen Leserahmen wurde mittels PCR bestätigt. Durch Western Blot Analyse mit einem EGFP-Antikörper wurde die Expression des EGFP-Proteins nachgewiesen.

Nach Transfektion der beiden rekombinanten Viren in PS Zellen zeigte das rekombinante Virusgenom PRVC2, das die EGFP-cap Fusion trug, die Bildung eines

fluoreszierenden Proteins, welches nach 24 h in den Nukleoli lokalisiert boebachtet wurde. Nach 48 h und 72 h wurde die Fluoreszenz im gesamten Nukleus und nur noch vereinzelt in den Nukleoli beobachtet. Der Überstand wurde auf Infektiösität untersucht, biologisch aktive Viruspartikel wurden nach Überimpfung nicht nachgewiesen.

Diese Ergebnisse entsprechen Berichten über das Auftreten von viralen Antigenen von PCV2, die im Nukleus transfizierter und infizierter Zellen akkumulieren (Mahe *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Cheung & Bolin, 2002). Liu *et al.* beschrieben im Kapsidprotein von PCV2 eine nukleäre Erkennungssequenz innerhalb der N-terminalen 41 AS (Liu *et al.*, 2001), die Voraussetzung für ein Kernimport von Cap ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch das Kapsidprotein von PCV1 in den Nukleoli akkumuliert. Mit Fortschreiten der Infektion kommt es zum Auswandern des Cap-Proteins in den gesamten Nukleus und später ins Cytoplasma (Finsterbusch *et al.*, 2005).

Die biologische Funktion des Transports des Kapsidproteins in den Bereich der Nukleoli ist unbekannt. Über die nukleoläre Lokalisation viraler Proteine von DNAund RNA-Viren ist berichtet worden (Hiscox, 2002). Es wird angenommen, dass virale Proteine im Bereich der Nukleoli die virale Transkription unterstützen oder den Zellzyklus verändern. Gleichfalls könnte der Zusammenbau der PCV-Virionen im Zellkern erfolgen.

Das rekombinante Virus PRVC2 repliziert in PS Zellen, eine produktive Infektion resultiert jedoch nicht. Dieses ist vermutlich auf die veränderte Funktion des Fusionsproteins zurückzuführen, welches beispielsweise den Zusammenbau des Viruskapsids verhindern könnte. Wird anstelle des EGFP das kleinere S-Tag an das Kapsidprotein angefügt, kann das rekombinante Virus PRVC3 eine stabile Infektion in PS-Zellen initiieren, die darüber hinaus zur Synthese von Viruspartikeln führt, die in den Überstand ausgeschleust und dort nachgewiesen werden können (Finsterbusch *et al.*, 2005). Der kleinere S-Tag behindert offensichtlich weder die Replikation noch das Assembly des rekombinanten Virus.

Transfektion von PS-Zellen mit dem rekombinanten Virus PRVR2, welches eine EGFP-rep Fusion besitzt, führte nicht zur Expression des Rep:EGFP Fusionsprotein. Überimpfungsstudien zeigten, dass keine infektiösen Partikel gebildet wurden.

Die Fusion mit EGFP interferiert offensichtlich mit der Funktion des Rep-Proteins. Das Rep Protein kann Sequenzveränderungen offensichtlich nur in sehr geringem Maße kompensieren, denn schon eine Verkürzung um nur wenige AS führte zum Verlust der Replikationsaktivität (Mankertz & Hillenbrand, 2001).

Es gelang mit den vorliegenden Versuchen ein Reportersystem zur Visualisierung einer PCV1 Infektion in lebenden Zellen zu etablieren. Es gelang aber nicht ein rekombinantes Virus herzustellen, das Replikationsaktivität zeigte und infektös war. Eine Fusion von Cap mit dem EGFP-Gen beeinträchtigte nicht die Expression, wohl aber die Fusion von Rep mit EGFP. Infektiösität wurde bei keiner Variante beobachtet werden. Auufbauend auf diesen Arbeiten wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, dass das kleinere S-Tag am C-Terminus von Cap trug und sowohl zur Replikation als auch zur Infektion in der Lage war (Finsterbusch *et al.*, 2005).

5.3 Subzelluläre Lokalisation viraler Proteine

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Genprodukte von *rep* und *cap* von PCV1 wurden *rep, rep', rep** und das *cap*-Gen in den Vektor pEGFP-C1 sowie pDsRed1-C kloniert. Das *cap*-Gen von PCV2 wurde nur in den Vektor pEGFP-C1 kloniert. Es wurden auf diese Weise insgesamt 9 Fusionsproteine hergestellt, bei denen das Fluoreszenzprotein jeweils den N-Terminus der Fusionsproteine darstellt. Die Fusion wurde sowohl mit EGFP als auch mit DsRed1 durchgeführt, um in Kolokalisationsexperimenten die Fusionsproteine voneinander unterscheiden zu können.

Die Fusionsproteine mit dem cap-Protein von PCV1 zeigen Fluoreszenzsignale im Bereich der Nukleoli mit Aussparung der übrigen nukleären Bereiche. Zytoplasmatische Fluoreszenz war nicht nachweisbar. Die Transfektion mit dem cap-Protein aus PCV2 lieferte identische Resultate. Für das Kapsidprotein aus PCV2 sind Diese wurden nukleäre Lokalisationssequenzen bekannt. durch Deletionsexperimente auf der Basis von EGFP-Fusionsproteinen auf die N-Terminalen 41 AS des Kapsidproteins eingrenzt (Liu et al., 2001).

Cheung et al. beschreiben ebenfalls die Lokalisation des Kapsidproteins von PCV1 und PCV2 im Bereich der Nukleoli 24 h post-transfektionem und nukleolär nach 48h Stunden (Cheung & Bolin, 2002). Damit werden die vorliegenden Befunde bestätigt, dass das Cap Protein seine Lokalisation im Laufe des viralen Replikationszyklus ändert. Allerdings erfolgte hier der Nachweis durch Antikörper, die gegen das Kapsidprotein gerichtet war.

Das Kapsidprotein von PCV1 trägt ebenfalls nukleäre Lokalisationssequenzen im Nterminalen Bereich. Elektronenmiskroskopische Untersuchungen an persistierend mit PCV1 infizierten PK-15 Zellen zeigen eine große Anzahl an elektronendichten intrazytoplasmatischen Einschlüssen, vor allem im perinukleären Zytoplasma (Stevenson et al., 1999). Sie bestehen aus parakristallinen Bereichen, in denen sich Viruspartikel in regelmäßigen Strukturen ablagern. Es wird von zwei Formen berichtet, die als small non-membrane bound (SICI) und als larger membrane bound (LICI) bezeichnet werden, berichtet (Stevenson et al., 1999). SICI enthalten teilweise icosahedrale Virionen von 12 ± 2 nm Größe oder "paracrystalline arrays" und es wird spekuliert, dass sie der Ort des zytoplasmatischen Virusassembly oder der Maturation (Reifung) sind. LICI sind von einer Membran umgeben und enthalten teilweise ebenfalls Viruspartikel, die parakristallin angeordnet sind. Die Größe dieser Partikel entspricht 12 ± 2 nm. Ursprung der LICI ist nicht bekannt. Vermutlich handelt es sich hierbei um Autophagolysosomen. In der gleichen Arbeit wurde auch über intranukleäre Einschlüsse (INI) berichtet, die sich von intrazytoplasmatischen Einschlüssen unterscheiden und seltener auftreten. Sie sind nicht membrangebunden und scharf vom Nukleoplasma abgegrenzt. Eine INI Form besteht aus unregelmäßig begrenzten zirkulär angeordneten virusähnlichen Partikeln, die einen Durchmesser von ca. 10-12 nm haben. Die andere INI-Variante ist rundlich, 0.1-1.0 µm im Durchmesser, elektronendicht und granulär. Beide INI Formen befinden sich in mit netzartigen Mustern versehenen Nucleolibereichen ("reticulated nucleoli"). Möglicherweise handelt es sich um unreife Viruspartikel auf dem Weg in das Zytoplasma.

Unreife Viruspartikel wurden mit der hier angewandten Methode nicht beobachtet. Möglicherweise ist der Transport des unreifen Kapsidproteins zum Ort des Virusassembly durch die Präsenz des Fusionsproteins in das Zytoplasma gestört und es kommt nicht zu einer Änderung des Fluoreszenzmusters im Verlauf.

Mit dem zur Infektion und Replikation fähigen rekombinanten Virus PRVC3, das am C-Terminus des Cap-Proteins ein S-Tag trägt, könnte dies u. U. geklärt werden.

Transfektion der Plasmide, die Rep, Rep' und Rep* als EGFP bzw. DsRed-Fusionsproteine exprimieren, zeigten eine Lokalisation dieser Proteine im Nukleus unter Aussparung der Nukleoli. Es gelang mit dieser Arbeit erstmalig, die subzelluläre Lokalisation der Rep Proteine zu analysieren.

Die Kotransfektion von Cap- und Rep-Fusionsproteinen zeigte eine Akkumulation von Cap im Bereich der Nukleoli, während die Rep Proteine räumlich getrennt davon im Nukleus zu sehen waren. Eine gegenseitige Beeinflussung der Lokalisation bzw. Verdrängung aus dem initialen Kompartiment scheint damit wenig wahrscheinlich. Aufbauend auf die hier vorgestellten Ergebnisse konnten die nukleären Lokalisationssignale durch Deletions- und Mutageneseexperimente kartiert (Finsterbusch et al., 2005) werden.

6. Zusammenfassung

Die Porcinen Circoviren Typ1 (PCV1) und Typ2 (PCV2) gehören zur Familie der *Circoviridae*. Sie gelten in Bezug auf die Xenotransplantation als potenzielle Gefahr für den humanen Empfänger.

Zunächst erfolgte die Expression von Fusionsproteinen der beiden größten offenen Leserahmen, die für die Replikationsproteine Rep und Rep` sowie das Kapsidprotein Cap kodieren. Die Expression des vollständigen Kapsidproteins von PCV1 und PCV2 mittels des Expressionsvektors pGEX als GST-Fusionsprotein war nicht möglich, da ein Volllängenprodukt nicht nachweisbar war. Die Variation der Expressionstemperatur, der Zusammensetzung des Nährmediums sowie der Einsatz Proteasedefizienter Bakterienstämme brachte keine Verbesserungen. Als mögliche Ursache wurde die Codonzusammensetzung des *cap*-Gens in Betracht gezogen, die für die Synthese in *E.coli* ungünstig ist. Durch computergestützte Berechnungen wurde der Codongebrauch optimiert. Die Expression der modifizierten Fusionsproteine ergab Produkte der Größe von ca. 42 kDa für PCV1 sowie der Größe 45 kDa für PCV2, die mit den unlöslichen Zellfraktionen erhalten wurden. Die exprimierten Cap-Proteine stellten die Grundlage zur Synthese von Cap-spezifischer Antikörper dar.

Durch Herstellung von Fusionsproteinen mit Fluoreszenzproteinen EGFP bzw. pDsRed konnte die subzelluläre Lokalisation des Kapsidproteins von PCV1 sowie PCV2, als auch der Replikationsproteine von PCV1 einzeln und in Kombination gezeigt werden. Das Kapsidprotein von PCV1 und von PCV2 war in den Nukleoli lokalisiert, es zeigte sich keine Abhängigkeit der Lokalisierung von den Replikationsproteinen. Die Produkte des *rep*-Gens Rep sowie Rep` akkumulieren im Nukleus, wobei die Nukleoli ausgespart wurden. Die subzelluläre Lokalisation änderte sich bei Kotransfektion von Rep und Cap nicht, demzufolge scheint eine gegenseitige Beeinflussung der Lokalisation nicht wahrscheinlich. Die Kernloklisation wird durch nukleäre Lokalisationssignale (NLS) vermittelt, die in sich anschließenden Studien eingegrenzt wurden (Finsterbusch et al., 2005).

Es wurden weiterhin zwei rekombinante Viren hergestellt, die jeweils am 3'-Ende des *rep*- bzw. des *cap*-Gens ein EGFP-Gen tragen. Nach Transfektion mit dem rekombinanten Virus pRVC2, welches das an das *cap*-Gen fusionierte EGFP Protein enthielt, wurde Fluoreszenz beobachtet. Das Fusionsprotein war in den ersten 24 h nach Transfektion im Bereich der Nukleoli lokalisiert, danach kam es zur Verteilung im gesamten Nukleus. Eine produktive Infektion von Zellkulturzellen wurde mit dem

rekombinanten Virus RVC2 nicht beobachtet. Vermutlich ist das Fusionsprotein nicht in der Lage die natürlichen Funktionen des Kapsidproteins zu übernehmen. Nach Transfektion des rekombinanten Virus PRVR2, welches das an das *rep*-Gen fusionierte EGFP-Protein trug, wurde weder Fluoreszenz noch eine Infektion nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass Manipulationen am Rep-Protein von PCV1 schlechter kompensiert werden können.

7. Summary

The porcine circovirus type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) belong to the family of Circoviridae. They are regarded as a potential danger for the human recipient in the context of Xenotransplantation.

The present thesis evaluated:

- 1. The expression of fusion proteins of the two largest open reading frames of PCV.
- 2. The construction of fluorescent fusion proteins
- 3. The construction of two recombinant circovirus type 1 isolates carrying the gene of green fluorescent protein fused at the 3' end of cap or rep.

The expression of full capsid protein of PCV1 and PCV2 using the pGEX expression vector system was possible. Variation of the expression temperature, the composition of the culture medium and the use of protease-deficient bacterial strains brought no improvement. The codon preference of the cap gene was considered as a possible cause. Therefore the codon preference was analysed by computer calculation and optimised regions were fused and expressed with the pGEX-expression system.

The subcellular localization of the capsid protein and replication proteins Rep / Rep' were analyzed by the construction of fusion proteins with fluorescent proteins EGFP or pDsRed. Cap of PCV1 and PCV2 were localized in the nucleoli and showed no dependence of the localization of the replication proteins Rep / Rep'. The products of the rep gene Rep / Rep' accumulated in the nucleus. Cotransfection showed no change in the localization. A reciprocal influence of the localization was not considered likely.

Two recombinant viruses, which carry an EGFP gene in each case at the 3 ' ends of the rep or the cap gene were constructed furthermore.

After transfection with the recombinant virus PRVC2, which contained the EGFP gene fused to the cap gene, fluorescence was observed. The fusion protein was located in the first 24 h after transfection in the nucleoli. Later, distribution throughout the nucleus was seen.

A productive infection of tissue culture cells with the recombinant virus RVC2 was not observed. Presumably, the fusion protein is incapable to take over of the natural functions of the capsid protein.

After transfection of the recombinant virus PRVR2, which contained the EGFP gene fused to the rep gene neither fluorescent nor infection was observed what points to the fact that manipulations in the Rep protein can be worse compensated by PCV1.

8. Literaturverzeichnis

- ALLAN, G., MEEHAN, B., TODD, D., KENNEDY, S., MCNEILLY, F., ELLIS, J., CLARK, E. G., HARDING, J., ESPUNA, E., BOTNER, A. & CHARREYRE, C. (1998). Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* **142**, 467-468.
- ALLAN, G. M. & ELLIS, J. A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* **12**, 3-14.
- ALLAN, G. M., KENNEDY, S., MCNEILLY, F., FOSTER, J. C., ELLIS, J. A., KRAKOWKA, S. J., MEEHAN, B. M. & ADAIR, B. M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* **121**, 1-11.
- ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., MEEHAN, B., MCNAIR, I., WALKER, I. & KENNEDY, S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145, 2421-2429.
- BACH, F. H. (1998). Xenotransplantation: problems and prospects. *Annu Rev Med* **49**, 301-310.
- BAIRD, G. S., ZACHARIAS, D. A. & TSIEN, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-11989.
- BALASCH, M., SEGALES, J., ROSELL, C., DOMINGO, M., MANKERTZ, A., URNIZA, A. & PLANA-DURAN, J. (1999). Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* **121**, 139-148.
- BASSAMI, M. R., BERRYMAN, D., WILCOX, G. E. & RAIDAL, S. R. (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* **249**, 453-459.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- BOEVINK, P., CHU, P. W. & KEESE, P. (1995). Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology* **207**, 354-361.
- BOLIN, S. R., STOFFREGEN, W. C., NAYAR, G. P. & HAMEL, A. L. (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. J Vet Diagn Invest 13, 185-194.
- BONEVA, R. S., FOLKS, T. M. & CHAPMAN, L. E. (2001). Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiol Rev* **14**, 1-14.

- BUHK, H. J., TISCHER, I., KOCH, M. A. (1985). Cloning and sequencing of the porcine circovirus (PCV) genome. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* [A] A 260, 465.
- CHAPMAN, L. E., HENEINE, W., SWITZER, W., SANDSTROM, P. & FOLKS, T. M. (1999). Xenotransplantation: the potential for xenogeneic infections. *Transplant Proc* **31**, 909-910.
- CHEUNG, A. K. (2003). Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* **305**, 168-180.
- CHEUNG, A. K. & BOLIN, S. R. (2002). Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol* **147**, 43-58.
- CHOI, C. & CHAE, C. (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* **121**, 265-270.
- COHEN, S., CHANG, A. & HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2210-2214.
- DENNER, J. (2000). Mikrobiologische Risiken der Xenotransplantation. In Neue Perspektiven der Transplantationsmedizin im interdisziplinären Dialog. ed. ENGELS, E., BADURA-LOTTER, G. & SCHICKTANZ, S., pp. 142-169. Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden.
- DULAC, G. C. & AFSHAR, A. (1989). Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* **53**, 431-433.
- EDWARDS, S. & SANDS, J. J. (1994). Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* **134**, 680-681.
- ELLIS, J., KRAKOWKA, S., LAIRMORE, M., HAINES, D., BRATANICH, A., CLARK, E., ALLAN, G., KONOBY, C., HASSARD, L., MEEHAN, B., MARTIN, K., HARDING, J., KENNEDY, S. & MCNEILLY, F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11, 3-14.
- ELLIS, J. A., BRATANICH, A., CLARK, E. G., ALLAN, G., MEEHAN, B., HAINES, D. M., HARDING, J., WEST, K. H., KRAKOWKA, S., KONOBY, C., HASSARD, L., MARTIN, K.
 & MCNEILLY, F. (2000). Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest 12, 21-27.
- FENAUX, M., HALBUR, P. G., GILL, M., TOTH, T. E. & MENG, X. J. (2000). Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. J Clin Microbiol **38**, 2494-2503.

- FINSTERBUSCH, T., STEINFELDT, T., CALISKAN, R. & MANKERTZ, A. (2005). Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology* **343**, 36-46.
- FISHMAN, J. A. (1998). The risk of infection in xenotransplantation. Introduction. Ann N Y Acad Sci 862, 45-51.
- GODDARD, M. J., FOWERAKER, J. E. & WALLWORK, J. (2000). Xenotransplantation--2000. *J Clin Pathol* **53**, 44-48.
- HAMEL, A. L., LIN, L. L. & NAYAR, G. P. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* **72**, 5262-5267.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- HARDING, R. M., BURNS, T. M., HAFNER, G., DIETZGEN, R. G. & DALE, J. L. (1993). Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J Gen Virol* **74** (**Pt 3**), 323-328.
- HATTERMANN, K., SCHMITT, C., SOIKE, D. & MANKERTZ, A. (2003). Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch Virol* **148**, 2471-2480.
- HENRY, S. C., SCHMADER, K., BROWN, T. T., MILLER, S. E., HOWELL, D. N., DALEY, G. G. & HAMILTON, J. D. (2000). Enhanced green fluorescent protein as a marker for localizing murine cytomegalovirus in acute and latent infection. *J Virol Methods* 89, 61-73.
- HISCOX, J. A. (2002). The nucleolus--a gateway to viral infection? Arch Virol 147, 1077-1089.
- Ho, D. Y. & MOCARSKI, E. S. (1988). Beta-galactosidase as a marker in the peripheral and neural tissues of the herpes simplex virus-infected mouse. *Virology* **167**, 279-283.
- KATUL, L., MAISS, E., MOROZOV, S. Y. & VETTEN, H. J. (1997). Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* **233**, 247-259.
- KIM, J., CHOI, C. & CHAE, C. (2003). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* **128**, 52-59.
- KRAKOWKA, S., ELLIS, J. A., MCNEILLY, F., RINGLER, S., RINGS, D. M. & ALLAN, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* **38**, 31-42.
- KRAKOWKA, S., ELLIS, J. A., MEEHAN, B., KENNEDY, S., MCNEILLY, F. & ALLAN, G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of

postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* **37**, 254-263.

- KURLAND, C. & GALLANT, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 489-493.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAROCHELLE, R., MAGAR, R. & D'ALLAIRE, S. (2002). Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* **90**, 101-112.
- LEKCHAROENSUK, P., MOROZOV, I., PAUL, P. S., THANGTHUMNIYOM, N., WAJJAWALKU, W. & MENG, X. J. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol* **78**, 8135-8145.
- LI, X., ZHANG, G., NGO, N., ZHAO, X., KAIN, S. R. & HUANG, C.-C. (1997). Deletions of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein Define the Minimal Domain Required for Fluorescence. *J. Biol. Chem.* **272**, 28545-28549.
- LIU, Q., TIKOO, S. K. & BABIUK, L. A. (2001). Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* **285**, 91-99.
- MAGAR, R., MULLER, P. & LAROCHELLE, R. (2000). Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* **64**, 184-186.
- MAHE, D., BLANCHARD, P., TRUONG, C., ARNAULD, C., LE CANN, P., CARIOLET, R., MADEC, F., ALBINA, E. & JESTIN, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81, 1815-1824.
- MANDEL, M. & HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol 53, 159-162.
- MANKERTZ, A., DOMINGO, M., FOLCH, J. M., LECANN, P., JESTIN, A., SEGALES, J., CHMIELEWICZ, B., PLANA-DURAN, J. & SOIKE, D. (2000a). Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* **66**, 65-77.
- MANKERTZ, A., HATTERMANN, K., EHLERS, B. & SOIKE, D. (2000b). Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* **145**, 2469-2479.
- MANKERTZ, A. & HILLENBRAND, B. (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* **279**, 429-438.
- MANKERTZ, A. & HILLENBRAND, B. (2002). Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J Gen Virol* **83**, 2743-2751.

- MANKERTZ, A., MANKERTZ, J., WOLF, K. & BUHK, H. J. (1998a). Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* **79 (Pt 2)**, 381-384.
- MANKERTZ, A., MUELLER, B., STEINFELDT, T., SCHMITT, C. & FINSTERBUSCH, T. (2003). New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J Virol* **77**, 9885-9893.
- MANKERTZ, A., PERSSON, F., MANKERTZ, J., BLAESS, G. & BUHK, H. J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* **71**, 2562-2566.
- MANKERTZ, J., BUHK, H. J., BLAESS, G. & MANKERTZ, A. (1998b). Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* **16**, 267-276.
- MANNING, W. C. & MOCARSKI, E. S. (1988). Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* **167**, 477-484.
- MCNEILLY, F., KENNEDY, S., MOFFETT, D., MEEHAN, B. M., FOSTER, J. C., CLARKE, E. G., ELLIS, J. A., HAINES, D. M., ADAIR, B. M. & ALLAN, G. M. (1999). A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). J Virol Methods 80, 123-128.
- MCNULTY, M. S., DALE, J. L., LUKERT, P. D., MANKERTZ, A., RANDLES, J. & TODD, D. (2000). *Circoviridae. In: Seventh report of the international committee on taxanomy of viruses* Academic Press.
- MEEHAN, B. M., CREELAN, J. L., MCNULTY, M. S. & TODD, D. (1997). Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* **78 (Pt 1)**, 221-227.
- MEEHAN, B. M., MCNEILLY, F., TODD, D., KENNEDY, S., JEWHURST, V. A., ELLIS, J. A., HASSARD, L. E., CLARK, E. G., HAINES, D. M. & ALLAN, G. M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. J Gen Virol **79** (Pt 9), 2171-2179.
- MICHAELS, M. G. (1997). Infectious concerns of cross-species transplantation: xenozoonoses. *World J Surg* **21**, 968-974.
- MIYAWAKI, A. (2003). Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 591-596.
- MIYAWAKI, A., LLOPIS, J., HEIM, R., MCCAFFERY, J. M., ADAMS, J. A., IKURA, M. & TSIEN, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.
- MOROZOV, I., SIRINARUMITR, T., SORDEN, S. D., HALBUR, P. G., MORGAN, M. K., YOON, K. J. & PAUL, P. S. (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in

pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. J Clin Microbiol 36, 2535-2541.

- NAWAGITGUL, P., MOROZOV, I., BOLIN, S. R., HARMS, P. A., SORDEN, S. D. & PAUL, P. S. (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* **81**, 2281-2287.
- NIEMANN, H. (1999). [Transgenic pigs for xenotransplantation for humans]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **106**, 141-146.
- PALMER, K. E., SCHNIPPENKOETTER, W. H. & RYBICKI, E. P. (1998). Geminivirus isolation and DNA extraction. *Methods Mol Biol* **81**, 41-52.
- PERICO, N., BENIGNI, A. & REMUZZI, G. (2002). Xenotransplantation in the 21st Century. *Blood Purification* **20**, 45-54.
- PHENIX, K. V., WESTON, J. H., YPELAAR, I., LAVAZZA, A., SMYTH, J. A., TODD, D., WILCOX, G. E. & RAIDAL, S. R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. J Gen Virol 82, 2805-2809.
- PLATT, J. L. (1999). Prospects for xenotransplantation. *Pediatr Transplant* 3, 193-200.
- PLATT, J. L. & LIN, S. S. (1998). The future promises of xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862, 5-18.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LUKERT, P. D., STEFFENS, W. L., 3RD & LATIMER, K. S. (1989). Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* **171**, 83-88.
- ROHDE, W., RANDLES, J. W., LANGRIDGE, P. & HANOLD, D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology* **176**, 648-651.
- ROSELL, C., SEGALES, J., PLANA-DURAN, J., BALASCH, M., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M., KENNEDY, S., ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., LATIMER, K. S. & DOMINGO, M. (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. J Comp Pathol **120**, 59-78.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SANO, Y., WADA, M., HASHIMOTO, Y., MATSUMOTO, T. & KOJIMA, M. (1998). Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. *J Gen Virol* **79** (**Pt 12**), 3111-3118.
- SEGALES, J., CALSAMIGLIA, M., ROSELL, C., SOLER, M., MALDONADO, J., MARTIN, M. & DOMINGO, M. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol* **85**, 23-30.

- SMITH, D. B. & JOHNSON, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- SOIN, B., VIAL, C. M. & FRIEND, P. J. (2000). Xenotransplantation. *Br J Surg* 87, 138-148.
- SPAETE, R. R. & MOCARSKI, E. S. (1985). Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J Virol* **56**, 135-143.
- SPAETE, R. R. & MOCARSKI, E. S. (1987). Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7213-7217.
- STANLEY, J. (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206**, 707-712.
- STAPPERT, J., WIRSCHING, J. & KEMLER, R. (1992). A PCR method for introducing mutations into cloned DNA by joining an internal primer to a tagged flanking primer. *Nucleic Acids Res* **20**, 624.
- STEINFELDT, T., FINSTERBUSCH, T. & MANKERTZ, A. (2001). Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* **291**, 152-160.
- STEINFELDT, T., FINSTERBUSCH, T. & MANKERTZ, A. (2006). Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J Virol* **80**, 6225-6234.
- STEVENSON, G. W., KIUPEL, M., MITTAL, S. K. & KANITZ, C. L. (1999). Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol* **36**, 368-378.
- TISCHER I, GELDERBLOM H, VETTERMANN W & MA., K. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* **195**, 64-66.
- TISCHER, I., MIELDS, W., WOLFF, D., VAGT, M. & GRIEM, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* **91**, 271-276.
- TISCHER, I., RASCH, R. & TOCHTERMANN, G. (1974). Characterization of papovavirusand picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* [A] **226**, 153-167.
- TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., RIXON, F. & MCNULTY, M. S. (1990). Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* **71** (**Pt 4**), 819-823.
- TODD, D., WESTON, J. H., SOIKE, D. & SMYTH, J. A. (2001). Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* **286**, 354-362.

- TRUONG, C., MAHE, D., BLANCHARD, P., LE DIMNA, M., MADEC, F., JESTIN, A. & ALBINA, E. (2001). Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol* **146**, 1197-1211.
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.
- WALL, M. A., SOCOLICH, M. & RANGANATHAN, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* **7**, 1133-1138.
- YARBROUGH, D., WACHTER, R. M., KALLIO, K., MATZ, M. V. & REMINGTON, S. J. (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 462-467.
- Yoo, D. & GIULIVI, A. (2000). Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* **64**, 193-203.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Bedarf und durchgeführte Transplantationen	9
Abbildung 1.2: PCV und Tabakvirus	11
Abbildung 1.3: Das rep-Gen und seine beiden Transkripte	15
Abbildung 1.4: Genomorganisation von PCV1 bzw. PCV2	16
Abbildung 3.1: Einfügen von Punktmutationen nach Kemmler und Huber (Erläuterungen im Text)	35
Abbildung 3.2: pGEX-6P1 (aus Pharmacia Biotech)	44
Abbildung 3.2: Plasmid pEGFP-C2	50
Abbildung 3.3: Plasmid pDsRed-C1	51
Abbildung 4.2: Plasmid pSK-144	52
Abbildung 4.3: Plasmid pGEX-Cap1	53
Abbildung 4.4: Plasmid pGEX-Cap2	54
Abbildung 4.5: Plasmid pGEX-Cap1Δ	55
Abbildung 4.6: Plasmid pGEX-Cap2∆*(430-738)	57
Abbildung 4.7: Plasmid pGEX-Cap2Δ(193-702)	57
Abbildung 4.8: Plasmid pGEX-Cap2A(37-402)	58
Abbildung 4.9: Übersicht über die konstruierten pGEX-Cap-Plasmide	58
Abbildung 4.8: Wachstumskurve pGEX-6P1, pGEX-Cap1 sowie pGEX-Cap1Delta	59
Abbildung 4.9: Wachstumskurve pGEX-Cap2 und Derivate	60
Abbildung 4.10: SDS Elektrophorese	61
Abbildung 4.11: Codon Preference Plots von Cap1 sowie Cap2 mit Hilfe des Programms "MacVector 6.5"	62
Abbildung 4.12: Plasmid pSK-144.	64
Abbildung 4.13: Plasmid pSK-140.	65
Abbildung 4.14a: Konstruktion pUC 19 Rekombinant	66
Abbildung 4.14b: Konstruktion pUC 19 Rekombinant	66
Abbildung 4.15: Konstruktion von pRVC0 bzw. pRVR0	69
Abbildung 4.16: Konstruktion pRVC1, pRVC2, pRVR1 bzw. pRVR2	70
Abbildung 4.17: Infektion mit pRVC2 nach 24, 48 sowie 72 Stunden	.71
Abbildung 4.18: Infektion mit pRVR2 nach 24, 48 sowie 72 Stunden	72
Abbildung 4.19: Konstruktion des Plasmids pEGFP-Cap1	73
Abbildung 4.20: Konstruktion des Plasmids pEGFP-Cap2	74
Abbildung 4.21: Konstruktion des Plasmids pDsRed-Cap	75
Abbildung 4.22: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep	76
Abbildung 4.23: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep'	77
Abbildung 4.24: Konstruktion des Plasmids pEGFP-rep*	78
Abbildung 4.25: Konstruktion des Plasmids pDsRed-rep	80
Abbildung 4.26: Konstruktion des Plasmids pDsRed-rep'	81
Abbildung 4.27: Konstruktion des Plasmids pDsRed-rep*	82
Abbildung 4.28: Fluoreszenzmuster der Plasmide pEGFP-Cap1 (A), pDsRed-Cap1 (B), pEGFP-Cap2 (C) sow	<i>ie</i>
pEGFP-C2 (D)	83
Abbildung 4.29: Fluoreszenzmuster der Plasmide pEGFP-rep (A, B), pEGFP-rep' (C) sowie pEGFP-rep* (D).	. 84
Abbildung 4.30: Kolokalisation der Plasmide pDsRed-rep' und pEGFP-rep*, pDsRed-cap1 und pEGFP-rep*,	
pDsRed-rep' und pEGFP-cap1 sowie pDsRed-cap1 und pEGFP-rep	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht Eigenschaften pGEX-6P1 Vektor	.43
Tabelle 3.2: Pipettierschema	.44
Tabelle 4.2: Größenübersicht Fusionsproteine	.61

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Robert Koch - Institut in der Arbeitsgruppe Mankertz im Fachgebiet 12 "Virale Infektionen" angefertigt. Ich danke der Leitung des Institutes, Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth und Herrn Prof. Dr. Reinhard Burger für die Möglichkeit am Robert Koch-Institut zu arbeiten und besonders für die uneingeschränkte Arbeitsmöglichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Annette Mankertz für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung der Arbeit, ihre stete Ansprechbarkeit, für die kritische Durchsicht und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Tim Finsterbusch für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine konstruktive Kritik und die Unterstützung bei der Durchführung experimenteller Arbeiten sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die fortwährend gute Zusammenarbeit. Besonders möchte ich Dr. Kim Hattermann für Ihre Hilfsbereitschaft danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Frau. Ohne die Unterstützung, die Motivation und den Rückhalt, den Sie mir in all diesen Jahren gegeben haben, wäre dies nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

In der elektronischen Version nicht verfügbar.
Publikation

Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind:

- Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T: Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication. Vet Microbiol. 2004 Feb 4;98(2):81-8.
- Finsterbusch T, Steinfeldt T, Caliskan R, Mankertz A: Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep´and Cap of porcine circovirus type 1. Virology 343 (2005) 36-46

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Expressionsanalyse viraler Fusionsproteine sowie Studien zur Infektion mit rekombinanten Genomen des porcinen Circovirus selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 1. Mai 2008