

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Viren mit ssDNA-Genom	1
1.2	Die Anelloviren	3
1.2.1	Das humane Torque Teno Virus	3
1.2.1.1	Molekularbiologie des humanen Torque Teno Virus	6
1.2.1.2	Epidemiologie und Pathogenese des humanen TTV	10
1.2.1.3	Nichthumane TTV	12
1.2.2	Das Torque Teno Mini Virus	13
1.2.3	Das humane Torque Teno Midi Virus	13
1.3	Zielsetzungen	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>15</b>
2.1	Bezugsquellennachweis	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Biochemikalien	16
2.1.3	Enzyme, Marker	18
2.1.4	Proteinstandard	19
2.1.5	Nukleinsäuren	19
2.1.6	Antikörper	19
2.1.7	Vektoren	20
2.1.8	Oligonukleotide und Primer	20
2.1.9	Bakterienstämme, Hefestämme	20
2.1.10	Zelllinien	21
2.1.11	Antibiotika	21
2.1.12	Filterpapier, Membranen	21
2.1.13	Reagenziensätze	22
2.1.14	Glaswaren	22
2.1.15	Kunststoffartikel	23
2.1.16	Weitere Verbrauchsmaterialien	23
2.2	Kulturmedien, Seren und Lösungen	23
2.2.1	<i>E. coli</i>	23

2.2.2	Yeast Two Hybrid	24
2.2.3	Zellkultur	25
<b>2.3</b>	<b>Puffer- und Gebrauchslösungen</b>	<b>25</b>
2.3.1	Agarosegelelektrophorese	26
2.3.2	SDS-PAGE	27
2.3.3	Western Blot	27
2.3.4	Yeast Two Hybrid	28
<b>2.4</b>	<b>Software</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>31</b>
3.1.1	Prinzip der DNA-Amplifikation durch die PCR	31
3.1.1.1	DNA-Amplifikation	31
3.1.1.2	Amplifikation GC-reicher DNA-Abschnitte	32
3.1.1.3	Semi-nested PCR	33
3.1.2	Amplifikation von RNA (Reverse Transkriptase PCR)	34
3.1.2.1	Erststrang-cDNA-Synthese ausgehend vom 3'-Ende	35
3.1.2.2	Erststrang-cDNA-Synthese ausgehend vom 5'-Ende	35
3.1.3	RACE-PCR	37
<b>3.2</b>	<b>DNA-Rekombinationstechniken</b>	<b>39</b>
3.2.1	Restriktionsanalyse	39
3.2.1.1	Einführen von Punktmutationen in die DNA-Sequenz	40
3.2.2	DNA-Restriktion von 3'-überhängenden Nukleotiden	40
3.2.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
3.2.4	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
3.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.6	TOPO TA Cloning	42
3.2.7	Klonierung von PCR-Produkten	43
3.2.8	Hybridisierung von Nukleinsäuren	43
3.2.9	Herstellung religierter Virus DNA	44
<b>3.3</b>	<b>Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten</b>	<b>44</b>
3.3.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
3.3.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	45
<b>3.4</b>	<b>Transformation rekombinanter Plasmide</b>	<b>46</b>
3.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	46
3.4.2	Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden	46

3.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	47
3.4.3.1	Bakterielle Vermehrung in Flüssigkultur	48
3.4.3.2	DNA-Präparation durch alkalische Lyse und Ethanol-fällung	48
3.4.3.3	DNA-Präparation durch Adsorption an Silikagelmembran	48
3.4.3.4	DNA-Präparation über Anionenaustauschersäulen	49
3.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
3.4.4.1	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel	50
3.4.4.2	Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	50
3.4.5	Sequenzierung von Nukleinsäuren	51
<b>3.5</b>	<b>Elektrophorese</b>	<b>52</b>
3.5.1	Agarosegelelektrophorese	52
3.5.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	53
3.5.2.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
<b>3.6</b>	<b>Replikationsassay</b>	<b>55</b>
3.6.1	Biolumineszenz-Assay zur quantitativen Bestimmung der Luziferase-Aktivität	56
<b>3.7</b>	<b>Yeast Two-Hybrid: MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3</b>	<b>57</b>
3.7.1	Transformation kompetenter Hefezellen	59
3.7.2	Herstellung kompetenter Hefezellen	60
<b>3.8</b>	<b>Immunopräzipitation (IP)</b>	<b>61</b>
3.8.1	Induktion der Protein:Protein-Interaktion	61
3.8.2	Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes	62
3.8.3	Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes	62
3.8.4	Detektion einer Koimmunopräzipitation	62
3.8.5	Immuno-/Western Blot	63
3.8.6	Färbung membrangebundener Proteine	63
3.8.7	Immunologische Detektion membrangebundener Proteine	63
3.8.8	<i>In vitro</i> Proteinexpression	64
<b>3.9</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>65</b>
3.9.1	Kultivierung von Zelllinien	65
3.9.2	Zellzählung	65
3.9.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	66
3.9.4	Transfektion eukaryotischer Zellen	66
3.9.5	Präparation der Lysate	67
3.9.6	Isolierung von DNA aus Zellkultur	67
3.9.7	Gesamt-RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen	68
3.9.8	Zellaufschluss für die Präparation von Proteinen	68

<b>3.10 Immunfluoreszenz</b>	<b>69</b>
3.10.1 Der indirekte Immunfluoreszenztest	69
<b>3.11 Mikroskopie</b>	<b>70</b>
3.11.1 Konfokale Laserscanmikroskopie	70
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Klonierung des Gesamtgenoms P/1C1</b>	<b>71</b>
4.1.1 Konstruktion des Plasmids pGEM/TTVKus2a (6728 bp) - Auffüllen der 68 bp Deletion	71
4.1.2 Konstruktion des Plasmids pGI3-P/1C1	72
<b>4.2 Untersuchung eukaryotischer Zelllinien hinsichtlich TTV-spezifischer DNA</b>	<b>73</b>
<b>4.3 Kartierung der Transkripte von P/1C1</b>	<b>75</b>
4.3.1 cDNA-Synthese ausgehend von mRNA aus P/1C1 transfizierten Leberzellen (Huh7)	75
4.3.2 Synthese der 5'- und 3'-RACE von TTV-Transkripten	75
4.3.3 Sequenzanalyse der 5'- und 3'-RACE-Produkte	76
4.3.4 Transkriptionskarte und Expressionsmuster	80
4.3.5 Sequenzanalyse der Proteine des TTV-Isolates P/1C1	81
4.3.6 Klonierung der viralen Leserahmen in den Vektor pcDNA3.1(+)	83
<b>4.4 Subzelluläre Lokalisation von TTV-Proteinen</b>	<b>83</b>
4.4.1 Klonierung der ungespleißten ORF1-Isoform ORF1*	84
4.4.2 Detektion der viralen Proteine in Huh7-Zellen	84
4.4.3 Nachweis der ORF1-Expression mittels Antiserum AK47	87
4.4.3.1 Detektion der ORF1-Isoformen mittels Antiserum AK47 im Western Blot	88
4.4.3.2 Detektion der ORF1-Isoformen mittels Antiserum AK47 in Zellkultur	89
4.4.4 Kartierung der Kernlokalisationssequenzen (NLS) des ORF1-Proteins der TTV-Isolate P/1C1 und J01B6	92
4.4.4.1 Kartierung der NLS des ORF1-Proteins (Isolat P/1C1)	93
4.4.4.2 Kartierung der NLS des ORF1-Proteins (Isolat J01B6)	96
<b>4.5 In vitro Replikationsstudien</b>	<b>98</b>
4.5.1 Analyse der essentiellen Replikationskomponenten von TTV	99
4.5.2 Klonierung der verkürzten UTR in den pGI3-Promotor	101
4.5.3 Kartierung des Replikationsursprungs	101
4.5.4 Identifizierung der Replikase und Austauschbarkeit von Replikationsfaktoren	103
4.5.5 Nachweis der Replikation in unterschiedlichen Zelllinien	105
<b>4.6 Untersuchungen hinsichtlich homologer und heterologer Interaktion zwischen viralen Proteinen in Hefezellen</b>	<b>106</b>

4.6.1	Klonierung und Expressionskontrolle der N-terminalen HA- und c-Myc-Fusionsproteine	107
4.6.2	„Yeast Two-Hybrid“ - ORF1 Derivate bilden keine homologen oder heterologen Komplexe in Hefezellen	108
<b>4.7</b>	<b>Koimmunopräzipitation</b>	<b>112</b>
<b>4.8</b>	<b>Untersuchung zur subzellulären Lokalisation der TTV-Proteine ORF3 und ORF4</b>	<b>114</b>
4.8.1	Detektion der Proteine ORF3 und ORF4 im Nukleoplasma	114
<b>4.9</b>	<b>Einfluss der Proteine ORF3 und ORF4 auf die virale Transkription</b>	<b>115</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>119</b>
<b>5.1</b>	<b>Das TTV-Isolat P/IC1 besitzt vier Transkripte, welche für sieben Proteine kodieren</b>	<b>119</b>
<b>5.2</b>	<b>Das <i>orf1</i>-Gen kodiert für die Replikase von TTV und der Replikationsursprung ist in der UTR lokalisiert</b>	<b>122</b>
<b>5.3</b>	<b>Die Replikation von TTV kann auch durch die Replikase eines anderen Genotyps initiiert werden</b>	<b>124</b>
<b>5.4</b>	<b>Der Zelltyp beeinflusst die virale Replikation</b>	<b>125</b>
<b>5.5</b>	<b>Mit Ausnahme des ORF2-Proteins sind die TTV-kodierten Proteine im Zellkern lokalisiert</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>139</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>157</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>159</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>161</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>163</b>

<b>8.1 Oligonukleotide und Primer</b>	<b>163</b>
<b>8.2 Klonierung von Plasmidkonstrukten</b>	<b>167</b>
<b>8.3 Aminosäuresequenzen</b>	<b>170</b>