

APOBEC3G-vermittelte Hemmung der Masernvirus-Replikation

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Fehrholz

aus Gelsenkirchen



Würzburg, Januar 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 31. Januar 2011

Markus Fehrholz

für Ursula, Marie Luise, Josefine
und meine Eltern

*"I may not have gone where I intended to go,
but I think I have ended up where I needed to be."*

Douglas Adams (1952 - 2001)

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VI
Abbildungen	XI
Tabellen	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Das Masernvirus	1
1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese	1
1.1.2. Taxonomie und Morphologie	4
1.1.3. Virusstämme	6
1.1.4. Genom und Proteine	8
1.1.5. Replikation	10
1.1.6. Induzierung und Blockierung der Interferonantwort	12
1.2. Die Cytosindesaminase APOBEC3G	13
1.2.1. APOBEC Proteine	14
1.2.2. Antivirale Eigenschaften	17
1.2.3. Proteindomänen	22
1.2.4. Expression	25
1.2.5. Oligomerisierung	27
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	29
2. Material	30
2.1. Geräte	30
2.2. Software	31
2.2.1. Software für die Durchflusszytometrie	31
2.2.2. Software für die Quantifizierung von Western-Blots	31
2.2.3. Software für die Auswertung und Darstellung ermittelter Daten	31
2.2.4. Software für das Arbeiten mit Sequenzinformationen	32
2.2.5. Software für die Bearbeitung von Bildinformationen	32
2.2.6. Software für die Quantifizierung von Fluoreszenz	32

2.3. Verbrauchsmaterialien	32
2.4. Chemikalien	33
2.5. Lösungen und Puffer	35
2.5.1. Lösungen für molekularbiologische Methoden	35
2.5.2. Lösungen für proteinbiochemische Methoden	35
2.5.3. Lösungen für immunologische Methoden	37
2.5.4. Lösungen für virologische Methoden	38
2.5.5. Lösungen für zellbiologische Methoden	39
2.6. Medien und Seren	39
2.7. Kits	40
2.8. Oligonukleotide und -peptide	41
2.8.1. DNA-Standard für Agarose-Gele	41
2.8.2. dNTPs für PCR und reverse Transkription von RNA	28
2.8.3. FIP	42
2.8.4. Oligonukleotide für reverse Transkription von RNA	42
2.8.5. Primer	42
2.8.6. Proteinstandard für Acrylamid-Gele	45
2.8.7. Sonde für die Detektion von MV-N-RNA und -cDNA	45
2.9. Plasmide	46
2.10. Antikörper und Antiseren	46
2.11. Enzyme	47
2.12. Viren	48
2.13. Bakterien	48
2.14. Zellen	48
3. Methoden	49
3.1. Molekularbiologische Methoden	49
3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese	49
3.1.2. Gelextraktion von DNA	49
3.1.3. Gerichtete Mutagenese	49
3.1.4. Isolierung von RNA	49
3.1.5. Kolonie-PCR	50
3.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50

3.1.7. Lagerung von Nukleinsäuren	50
3.1.8. Ligation	51
3.1.9. Maxipräparation	51
3.1.10. Minipräparation	51
3.1.11. PCR	52
3.1.12. Pfu-PCR	52
3.1.13. Real Time PCR	53
3.1.14. Restriktion von Plasmiden	55
3.1.15. RT-PCR	55
3.1.16. Sequenzierung von DNA	56
3.2. Proteinbiochemische Methoden	57
3.2.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	57
3.2.2. Detektion geblotteter Proteine	57
3.2.3. Erstellung von Proteinlysaten	58
3.2.4. SDS-PAGE	58
3.2.5. „Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen	59
3.2.6. Western-Blot	60
3.3. Immunologische Methoden	60
3.3.1. Durchflusszytometrie	60
3.3.2. ELISA	62
3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen	63
3.3.4. Immunpräzipitation	64
3.4. Virologische Methoden	64
3.4.1. Anzucht von MV	64
3.4.2. Anzucht von MVA-T7	65
3.4.3. Titration von MV	65
3.4.4. Titration von MVA-T7	65
3.4.5. Ultrazentrifugation von MV	66
3.5. Zellbiologische Methoden	66
3.5.1. Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel	66
3.5.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen	67
3.5.3. Lagerung eukaryotischer Zellen	68
3.5.4. Lagerung prokaryotischer Zellen	68
3.5.5. Minireplikon Assay	68
3.5.6. Quantifizierung von Fluoreszenz	70
3.5.7. Transduktion	71
3.5.8. Transfektion	72

3.5.9. Transformation	72
3.5.10. Zählung von Zellen	72
4. Ergebnisse	74
4.1. Stabile Expression von humanem APOBEC3G in Vero-Zellen	74
4.1.1. Immunfluoreszenzfärbung von humanem APOBEC3G	74
4.1.2. Detektion von humanem APOBEC3G mit Hilfe des Western-Blots	76
4.1.3. Durchflusszytometrische Analyse von humanem APOBEC3G	77
4.1.4. Einfluss von humanem APOBEC3G auf das Zellwachstum	77
4.2. Einfluss von humanem APOBEC3G auf die Replikation des Masernvirus	78
4.2.1. hA3G-vermittelte Restriktion der Bildung von Synzytien	79
4.2.2. hA3G-vermittelte Reduktion von viral exprimiertem EGFP	82
4.2.3. hA3G-vermittelte Reduktion viraler Titer	84
4.2.4. Sequenzanalysen von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH	88
4.2.5. Quantifizierung von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH-RNAs mittels Real Time RT-PCR	91
4.3. Einfluss von FIP auf die Reduktion von exprimiertem EGFP	93
4.4. Anreicherung von humanem APOBEC3G in Viruspartikeln	95
4.4.1. Western-Blot mit UZ-gereinigtem Virus	95
4.4.2. Western-Blot mit UZ-gereinigtem Überstands-Virus in Anwesenheit von FIP	96
4.5. Immunfluoreszenzfärbungen von humanem APOBEC3G und Proteinen des Masernvirus	97
4.6. Generierung von markiertem APOBEC3G	99
4.6.1. HA-markiertes APOBEC3G	100
4.6.2. Koexpression von HA- und C-Myc-markiertem APOBEC3G	101
4.6.3. FLAG-markiertes APOBEC3G	102
4.7. Immunpräzipitation von markiertem APOBEC3G	103
4.7.1. RT-PCR nach Koimmunpräzipitation von HA-markiertem APOBEC3G	103
4.7.2. Western-Blot nach Koimmunpräzipitation von HA-markiertem APOBEC3G	105
4.8. Minireplikon Assay mit APOBEC3G-exprimierenden Zelllinien	106
4.9. Generierung von APOBEC3G Punkt-Mutanten	108
4.9.1. Expression von mutiertem humanem APOBEC3G auf mRNA-Ebene	109
4.9.2. Expression von mutiertem humanem APOBEC3G auf Protein-Ebene	110
4.9.3. Phänotyp des mutierten humanen APOBEC3Gs	110
4.10. Funktionalitätstests mit mutiertem humanem APOBEC3G	114

4.11. Einfluss von mutiertem APOBEC3G auf die Replikation des Masernvirus	116
4.11.1. Quantifizierung von viral exprimiertem EGFP nach transienter Transduktion	116
4.11.2. Bestimmung viraler Titer nach transienter Transduktion	117
5. Diskussion	119
5.1. APOBEC3G und das Masernvirus im Kontext der angeborenen Immunantwort	119
5.2. Die Rolle von APOBEC3G bei der Replikation des Masernvirus	121
5.3. Die Bedeutung der N-terminalen Desaminase-Domäne für die antivirale Aktivität von APOBEC3G	133
5.4. Fazit	134
6. Zusammenfassung	136
7. Summary	138
8. Literatur	140
9. Lebenslauf	156
10. Veröffentlichungen	158
10.1. Publikationen	158
10.2. Posterpräsentationen	158
10.3. Vorträge	158
Danksagung	160
Anhang	162
APOBEC3G	162
Plasmide	163

Abkürzungen

6-FAM™	6-Carboxyfluorescein
A	Adenosin
AAV	Adeno assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADAR	"adenosine deaminase acting on RNA"
AG	Arbeitsgruppe
ahd.	althochdeutsch
AID	"activation induced deaminase"
APME	akute postinfektiöse Masernenzephalitis
APOBEC	"apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide(-like)"
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATV	"antibiotic-trypsin-Versene"
BCA	"bicinchoninic acid"
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
CAMH	Hämagglutinin des Nager-adaptierten MV Stammes CAM/RB
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	"complementary DNA"
CDV	Hundestaupavirus
CEM15	APOBEC3G
CFSE	"carboxyfluorescein succinimidyl ester"
CIAP	"calf intestinal alkaline phosphatase"
CMV	Zytomegalievirus
C-Myc	zelluläres Myc
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat

DC	dendritische Zelle
DCP1A	"decapping enzyme homolog 1A"
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	deionisiertes H ₂ O
DMV	Delphin Morbillivirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dpi	"days post infection"
Dr.	Doktor
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ("ethylene diamine tetra acetic acid")
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"
EIAV	"equine infectious anemia virus"
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EMMPRIN	"extracellular matrix metalloproteinase inducer"
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und Andere
EYFP	"enhanced yellow fluorescent protein"
F	"forward"
FACS	"fluorescence activated cell sorting"
FCS	"fetal calf serum"
FIP	"fusion inhibitory peptide"
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	"Forward Scatter"
FV	Foamyvirus
g	Erdschwerebeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gly	Glycin
HA	Hämagglutinin des Influenza A Virus
hA3G	humanes APOBEC3G
HBV	Hepatitis B Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HERV	"human endogenous retrovirus"
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hpi	"hours post infection"

HPLC	"high performance liquid chromatography"
HRP	"horseradish peroxidase"
HTLV-1	"human T-cell leukemia virus type 1"
IAP	"intracisternal A-particle"
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus-Kinase
Jh.	Jahrhundert
kb	Kilobasenpaar(e)
L1	"long interspersed nuclear element 1"
lat.	lateinisch
LB	"lysogeny broth"
log	dekadischer Logarithmus
M	mol/L
MAP	"mitogen-activated protein"
MEM	"minimal essential medium"
mhd.	mittelhochdeutsch
MIBE	Einschlusskörperchenenzephalitis
min	Minute
MLV	murines Leukämie Virus
M-MLV	Moloney MLV
md.	mittelniederdeutsch
MOI	"multiplicity of infection"
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
Myc	Myelocytomatose
n/a	nicht angegeben
niederd.	niederdeutsch
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P-40
NTE	Natrium-TRIS-EDTA
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
Oligo dT	Oligodesoxythymidin
OPD	ortho-Phenylendiamin
ORF	"open reading frame"
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	"pathogen-associated molecular pattern"

PBL	periphere Lymphozyten des Blutes
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
P-bodies	"RNA processing bodies"
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDV	Hundsrobbe-staupevirus
PEI	Polyethylenimin
pfu	"plaque forming unit"
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHA	Phytohämagglutinin
Phe	Phenylalanin
PIC	Prä-Integrationskomplex
Pl.	Plural
PMA	Phorbolmyristatacetat
PMV	Tümmeler Morbillivirus
POX	Peroxidase-konjugiert
PP	Polypropylen
PPRV	Pest der kleinen Wiederkäuervirus
Prof.	Professor
R	"reverse"
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rMV	rekombinantes Masernvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	"rounds per minute"
RPV	Rinderpestvirus
RSV	respiratorisches Synzytial-Virus
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	"sodium dodecyl sulfate"
SINE	"short interspersed nucleoside element"
SIV	simianes Immundefizienz-Virus
SLAM	CD150, SLAMF1, "signaling lymphocytic activation molecule F1"
sog.	so genannt(e)
SSC	"Side Scatter"
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
STAT	"signal transducer and activator of transcription"
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	"BupH® Tris Buffered Saline"
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	"transforming growth factor"
TLR	"Toll-like receptor"
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
u. a.	und andere, unter anderem
ÜN	über Nacht, 16 Stunden
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
usw.	und so weiter
UTR	untranslatierte Region
UZ	Ultrazentrifuge, Ultrazentrifugation
v	Volumen
vgl.	vergleiche
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus
w	Gewicht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XMRV	"human exogenous gammaretrovirus"
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe
z. B.	zum Beispiel

Maßeinheiten entsprechen dem Internationalen Einheitensystem („Système internationale d’unités“, SI).
Summenformeln werden nach IUPAC („International Union of Pure and Applied Chemistry“) bezeichnet.

Abbildungen

Abb. 1.1	Weltweite Infektionen mit MV Februar bis August 2010 (WHO 2010)	2
Abb. 1.2	Masern im Exanthemstadium.....	3
Abb. 1.3	Die Familie der <i>Paramyxoviridae</i> und der Stammbaum der Morbilliviren	5
Abb. 1.4	MV Virionen	6
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des MV Genoms	8
Abb. 1.6	Das Morbillivirus P-Gen mit alternativen Leserastern	9
Abb. 1.7	Schematischer Ablauf der MV Replikation.....	12
Abb. 1.8	Die APOBEC Superfamilie	14
Abb. 1.9	APOBEC3G-vermittelte Hemmung der Alu-Transposition	18
Abb. 1.10	Antivirale Aktivität von APOBEC3G bei HIV-1	21
Abb. 1.11	Strukturmodell des APOBEC3G-Proteins	22
Abb. 1.12	Schematische Darstellung der Desaminierung eines Cytidins zu Uridin durch APOBEC3G.....	23
Abb. 1.13	Das Zusammenspiel von Vif und APOBEC3G.....	24
Abb. 1.14	Expressionsmuster der APOBEC3-Proteine in menschlichen Zellen und Geweben.....	26
Abb. 2.1	In dieser Arbeit verwendete DNA-Standards.....	41
Abb. 2.2	In dieser Arbeit verwendeter Proteinstandard	45
Abb. 4.1	Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien 023, 024-1, 024-2 und 024-3	75
Abb. 4.2	Detektion von hA3G mit Hilfe des Western-Blots	76
Abb. 4.3	Durchflusszytometrische Analyse von hA3G-exprimierenden Einzelzellklonen.....	77
Abb. 4.4	Analyse des Proliferationsverhaltens von hA3G-exprimierenden Einzelzellklonen.....	78
Abb. 4.5	Synzytienbildung in 023 und 024-2 3 Tage nach Infektion mit rMV ^{Edtag} EGFPCAMH	80
Abb. 4.6	Expression von CD150 vermittelt durch pseudotypisierte, retrovirale Partikel	81
Abb. 4.7	Synzytienbildung in CD150-transduzierten 023 und 024-2 Zellen 3 Tage nach Infektion mit rMV ^{IC323} EGFP	82
Abb. 4.8	Reduktion von durch rMV ^{Edtag} EGFPCAMH exprimiertem EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen.....	83
Abb. 4.9	Reduktion von durch rMV ^{IC323} EGFP exprimiertem EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen.....	84
Abb. 4.10	Wachstumskurve von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen	85
Abb. 4.11	Titer von rMV ^{IC323} EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen drei und vier Tage nach Infektion.....	86

Abb. 4.12	Passagierung von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH auf hA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien.....	87
Abb. 4.13	Sequenzanalysen von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH	90
Abb. 4.14	Reduktion zellgebundener viraler RNAs und genomischer RNAs in präpariertem Überstand.....	92
Abb. 4.15	Relative Änderung der MV-N Transkriptmenge zwischen 2 und 24 hpi.....	93
Abb. 4.16	Durchflusszytometrische Messung von viral exprimiertem EGFP in Anwesenheit von FIP.....	94
Abb. 4.17	Western-Blot mit UZ-gereinigtem rMV ^{Edtag} EGFPCAMH.....	95
Abb. 4.18	Western-Blot mit UZ-gereinigtem rMV ^{Edtag} EGFPCAMH aus mit FIP behandelten Zellkulturüberständen.....	96
Abb. 4.19	Immunfluoreszenzfärbung von mit rMV ^{Edtag} EGFPCAMH infizierten, hA3G-exprimierenden 024-2 Zellen	98
Abb. 4.20	Immunfluoreszenzfärbung von mit rMV ^{Edtag} LMMEGFPM infizierten, hA3G-exprimierenden 024-1 und 024-2 Zellen.....	99
Abb. 4.21	Immunfluoreszenzfärbungen HA-markierter hA3G-Proteine	101
Abb. 4.22	Immunfluoreszenzfärbungen HA- und C-Myc-markierter hA3G-Proteine	102
Abb. 4.23	Immunfluoreszenzfärbung FLAG-markierter hA3G-Proteine.....	103
Abb. 4.24	RT-PCRs mit RNA aus Immunpräzipitationen.....	104
Abb. 4.25	Western-Blot Analyse von IPs aus hA3GHA transfizierten, rMV ^{Edtag} EGFPCAMH infizierten 293T Zelllysaten.....	105
Abb. 4.26	MV Minireplikon Assay mit hA3G exprimierenden Vero Zelllinien.....	107
Abb. 4.27	Semiquantitative RT-PCR mit hA3G-Mutanten	109
Abb. 4.28	Western-Blot mit hA3G-Mutanten	110
Abb. 4.29	Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G mit unverändertem Phänotyp nach Transduktion von Vero-Zellen	111
Abb. 4.30	Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G mit verändertem Phänotyp nach Transduktion von Vero-Zellen	113
Abb. 4.31	Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G und Calnexin nach Transduktion von Vero-Zellen	114
Abb. 4.32	„HIV single round infectivity assay“ mit hA3G-Mutanten	115
Abb. 4.33	Relative Fluoreszenz von durch rMV ^{Edtag} EGFPCAMH exprimiertem EGFP auf transient mit wildtypischem oder mutiertem hA3G transduzierten Vero-Zellen	117
Abb. 4.34	Titer von rMV ^{Edtag} EGFPCAMH auf Vero-Zellen mit transienter Transduktion von wildtypischem und mutiertem hA3G drei Tage nach Infektion.....	118
Abb. 5.2	Modell der APOBEC3G-vermittelten Hemmung der MV-Replikation.....	135
Abb. A.1	DNA-Sequenz von humanem APOBEC3G.....	162
Abb. A.2	Proteinsequenz von humanem APOBEC3G	163
Abb. A.3	pMFA3GFLAG	163
Abb. A.4	pMFA3GHA.....	164

Abb. A.5	pMFA3GMyc	164
Abb. A.6	pMFEYFP.....	165
Abb. A.7	pMFSLAM.....	165

Tabellen

Tab. 2.1	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte.....	30
Tab. 2.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tab. 2.3	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	33
Tab. 2.4	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits.....	40
Tab. 2.5	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer.....	42
Tab. 2.6	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide und deren Herkunft.....	46
Tab. 2.7	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper und Antiseren sowie deren Herkunft.....	46
Tab. 2.8	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme.....	47
Tab. 2.9	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Viren und deren Herkunft.....	48
Tab. 2.10	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien und deren Herkunft.....	48
Tab. 3.1	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 48 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH N-cDNA aus der Kontrolllinie 023.....	89
Tab. 3.2	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 49 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH M-cDNA aus der Kontrolllinie 023.....	89
Tab. 3.3	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 46 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH N-cDNA aus der Kontrolllinie 024-2.....	89
Tab. 3.4	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 50 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH M-cDNA aus der Kontrolllinie 024-2.....	89
Tab. 3.5	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 52 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH N-cDNA aus der Kontrolllinie 024-3.....	90
Tab. 3.6	Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 47 Klonen für rMV ^{Edtag} EGFPCAMH M-cDNA aus der Kontrolllinie 024-3.....	91
Tab. 3.7	Im Rahmen dieser Arbeit generierte ha3G Mutanten.....	108

1. Einleitung

1.1. Das Masernvirus

Ma|sern <Pl.>: Der seit dem 16. Jh. bezeugte Name des rötlichen, grobfleckigen Hautausschlags ist wahrscheinlich der *Plural* des unter ↑Maser „[flammende] Zeichnung des Holzes“ behandelten Wortes. Der Name der Kinderkrankheit, der sich von Norddeutschland her ausgebreitet hat, kann beeinflusst sein von *niederd.* maseln „Masern“ (beachte *mnd.* masel[e] „Pustel, Pickel“, *mhd.* masel, *ahd.* masala „Blutgeschwulst“).^{© Dudenverlag}

1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese

Epidemiologie

Die Masern (lat. *Morbilli*) sind eine hochansteckende Krankheit, die durch Tröpfcheninfektion mit dem Masernvirus (MV) verursacht wird. Trotz des verfügbaren Lebendimpfstoffes betrug die geschätzte Zahl der im Jahr 2008 durch eine Infektion mit MV verursachten Todesfälle 164.000 (WHO, 2010). Mehr als 95 % davon traten in einkommensschwachen Ländern mit geringer medizinischer Versorgung auf. Damit sind Masern noch immer eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen und, da eine Infektion überwiegend im frühen Lebensalter auftritt, eine der führenden Todesursache bei Kindern.

Das Vorhandensein von größeren Menschengruppen ist für die Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen Infektionskette erforderlich, da bei Überlebenden einer Maserninfektion eine lebenslange Immunität besteht. Man nimmt an, dass es sich hierbei um Populationen von mehreren hunderttausend Individuen mit einer Geburtenrate zwischen 5.000 und 10.000 pro Jahr handeln muss. In Europa ist das MV vermutlich schon seit dem ersten Jahrtausend vor Christus verbreitet (Retief und Cilliers, 2010). Im Zuge der Entdeckung der neuen Welt wurde es dann im 16. Jahrhundert in Amerika eingeführt. Die Folgen für die Ureinwohner waren verheerend. Tausende starben an Masern und Pocken und ermöglichten so die Eroberung Amerikas durch die Europäer mit (Moss und Griffin, 2006).

Seit etwa 50 Jahren steht durch die Passagierung eines MV-Isolates auf verschiedenen Zelllinien durch John Enders und Thomas Peebles ein attenuierter Lebendimpfstoff gegen Masern zur Verfügung (Moss und Griffin, 2006). Seitdem ist die Anzahl der weltweit durch Masern verursachten Todesfälle drastisch zurückgegangen und liegt seit 2006 bei unter 500.000 pro Jahr (WHO, 2010). Um jedoch die endemischen Ausbrüche von Masern komplett zu unterbinden, sind Durchimpfungsraten von mehr als 95 % notwendig (Griffin *et al.*, 2008). Besonders in Entwicklungsländern wird diese Rate aufgrund logistischer Probleme sowie einer allgemeinen Empfindlichkeit des eingesetzten Impfstoffes gegenüber höheren Temperaturen nicht erreicht. Aber auch in Europa und anderen westlichen Ländern führte die in der Bevölkerung auftretende Impfmüdigkeit in den letzten Jahren immer wieder zu vereinzelt auftretenden Epidemien, wie z. B. aktuelle Ausbrüche in Frankreich (du Châtelet *et al.*, 2010), Griechenland (Pervanidou *et al.*, 2010) oder die 71 aufgetretenen Masern-Fälle bei Schülern einer Walldorfschule in Essen im Frühjahr 2010 (Roggendorf *et al.*, 2010) zeigen. Abb. 1.1 gibt den aktuellen Stand der weltweit auftretenden Infektionen mit MV wieder.

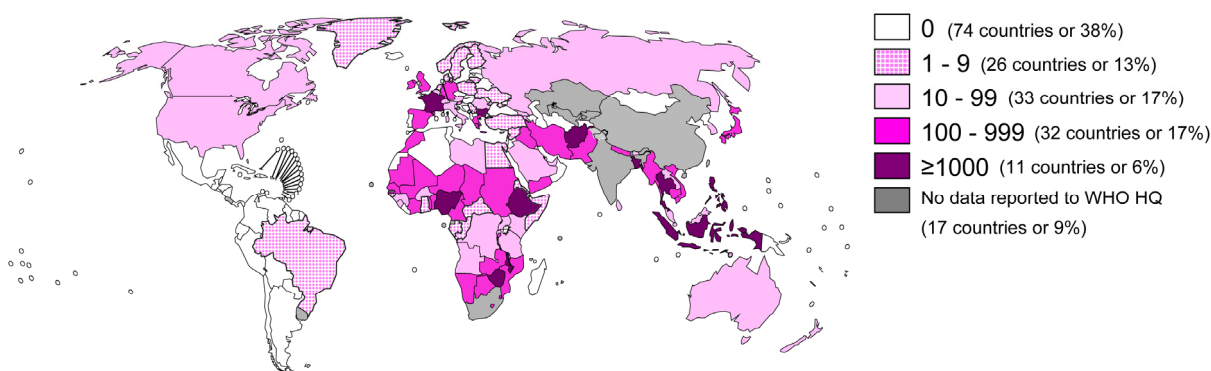


Abb. 1.1 | Weltweite Infektionen mit MV Februar bis August 2010 (WHO 2010).

Von ihrem erklärten Ziel die Masern weltweit zu eliminieren ist die WHO daher noch weit entfernt. Strategien zur Bekämpfung der auftretenden Maserninfektionen sind die Bereitstellung von Impfstoffen für jedes Kind ab einem Alter von neun Monaten oder später, die Möglichkeit einer Zweitimpfung durch durchgeführte Massenimpfungen, die effiziente Überwachung aller bestehenden Masern-Fälle sowie eine grundsätzliche medizinische Versorgung von an Masern Erkrankten mit zusätzlicher Behandlung durch Vitamin A, die einer Erblindung durch die Entzündung der Hornhaut vorbeugen soll (WHO, 2010). Die Erforschung weiterer antiviraler Mechanismen, welche bei der Bekämpfung von Masern hilfreich sein könnten, ist daher weiterhin von zentraler Bedeutung für dessen weltweite Eliminierung.

Pathogenese

Nachdem das MV über Aerosole in die oberen Atemwege in den Körper gelangt ist, kommt es im Anschluss daran zu einer systemischen Infektion. Hierbei zeigt sich ein Tropismus des Virus für Mono- und Lymphozyten. Es wird über dendritische Zellen (DCs) in die lokalen Lymphknoten transportiert und befällt anschließend verschiedene Organe wie Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt und die Lunge (de Swart *et al.*, 2007). Während der Infektion entwickeln die Betroffenen eine ausgeprägte Leukopenie, was vermutlich auf die erhöhte Adhäsionsfähigkeit der infizierten Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen zurückzuführen ist (Nanan *et al.*, 1999) und Virus kann aus infizierten peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) isoliert werden (Lightwood und Nolan, 1970).

Die ersten äußeren Anzeichen einer Infektion mit MV sind charakterisiert durch hohes Fieber, welches ca. zehn bis zwölf Tage nach der Primärinfektion auftritt. Damit einhergehend sind Husten, Schnupfen und Bindehautentzündung (Prodromalstadium). Außerdem können weiße, ca. einen halben Millimeter große Flecken auf der Wangenschleimhaut im Bereich der Backenzähne, die so genannten Koplikschen Flecken, vorhanden sein. Nach mehreren Tagen tritt dann der makulopapuläre Hautausschlag auf (Exanthemstadium), dem die Krankheit ihren Namen verdankt (Moss und Griffin, 2006). Er beginnt hinter den Ohren, breitet sich danach rasch über Gesicht, Hals und den ganzen Körper aus und hält ca. fünf bis sechs Tage lang an (Abb. 1.2). Im darauf folgenden Rekonvaleszenzstadium ist der Körper aber weiterhin stärker empfänglich gegenüber anderen Erkrankungen.

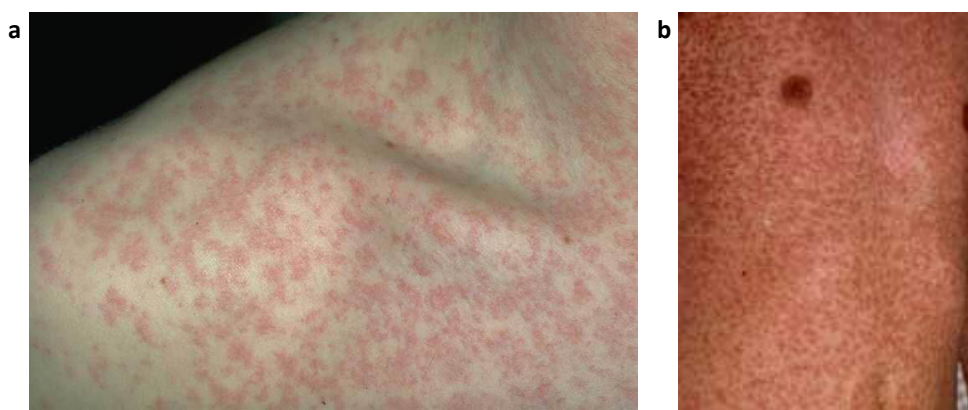


Abb. 1.2 | **Masern im Exanthemstadium.** Durch eine Infektion mit MV verursachte Exantheme im Bereich der Schulter (a)¹ und im Bereich des Oberkörpers (b)².

Im Fall einer tödlich verlaufenden Infektion mit MV sind hierfür vor allem höhere Anfälligkeiten gegenüber sekundären bakteriellen und viralen Infektionen aufgrund der MV-

¹ http://www.stuedeli.net/reto/medizin/kdb/content/paedi/bilder/MasernExanthem3_Dermls.jpg (Oktober 2010)

² http://www.stuedeli.net/reto/medizin/kdb/content/paedi/bilder/MaernEx_NU.jpg (Oktober 2010)

Induzierten Immunsuppression verantwortlich (Moss und Griffin, 2006). Die häufigsten bei Masern auftretenden Komplikation sind Pseudokrupp, Bronchitis oder Bronchopneumonie. Neben den durch Sekundärinfektion verursachten kommt es in seltenen Fällen jedoch auch zu neurologischen Komplikationen, die durch das MV selbst hervorgerufen werden. Dazu gehören die akute postinfektiöse Masernenzephalitis (APME), die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) sowie die Einschlusskörperchenenzephalitis (MIBE), bei denen es sich im Fall von APME um eine sehr früh (wenige Tage) und im Fall von MIBE und SSPE um sehr spät (Monate bis Jahre) nach der eigentlichen MV Infektion auftretende Komplikationen handelt (Reuter und Schneider-Schaulies, 2010).

Immunsuppression

In immunkompetenten Patienten wird die Infektion mit MV durch die virusspezifische Immunantwort beseitigt. Hierbei tritt jedoch, wie bereits erwähnt, eine generelle Immunsuppression auf, die bis mehrere Wochen nach Auftreten des Exanthems anhalten kann (Schneider-Schaulies und Schneider-Schaulies, 2009) und die für die hohe Todesrate bei infizierten Kindern in einkommensschwachen Ländern verantwortlich ist (Beckford *et al.*, 1985; Greenberg *et al.*, 1991).

Die durch MV verursachte Immunsuppression ist charakterisiert durch (i) eine deutliche Leukopenie, die jedoch schnell wieder verschwindet (Ryon *et al.*, 2002), (ii) ein Zytokin-Ungleichgewicht, welches eine verlängerte Immunantwort von T-Helferzellen des Typs 2 bewirkt und damit eine zelluläre Immunität gegenüber sekundären Infektionen unterdrückt (Griffin und Ward, 1993), sowie (iii) die mangelnde Fähigkeit von peripheren Lymphozyten des Blutes (PBLs) in Folge von polyklonaler oder Antigen-spezifischer Stimulation zu expandieren (Borrow und Oldstone, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 2001). Diese mangelnde Proliferationsfähigkeit wird hierbei durch die nach erfolgter Infektion von Zellen an der Oberfläche exprimierten viralen Glykoproteine vermittelt, welche bei Kontakt auch die Proliferation anderer, noch uninfizierter Zellen verhindern (Schlender *et al.*, 1996). In T-Zellen spielt hierbei die Inhibition der Proteinkinasen B (Akt) eine Rolle (Avota *et al.*, 2001).

1.1.2. Taxonomie und Morphologie

Taxonomie

Das MV gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*. Aufgrund seines nichtsegmentierten, negativ- und einzelsträngigen RNA-Genoms wird es neben den *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae* und *Filoviridae* der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet. Innerhalb der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* bildet es zusammen mit dem Hundestaupevirus (CDV), dem Hundsrobbe-

staupevirus (PDV), dem Pest der kleinen Wiederkäuervirus (PPRV), dem Rinderpestvirus (RPV), sowie dem Delphin- bzw. Tümmler Morbillivirus (DMV bzw. PMV) den Genus *Morbillivirus* (siehe Abb. 1.3).

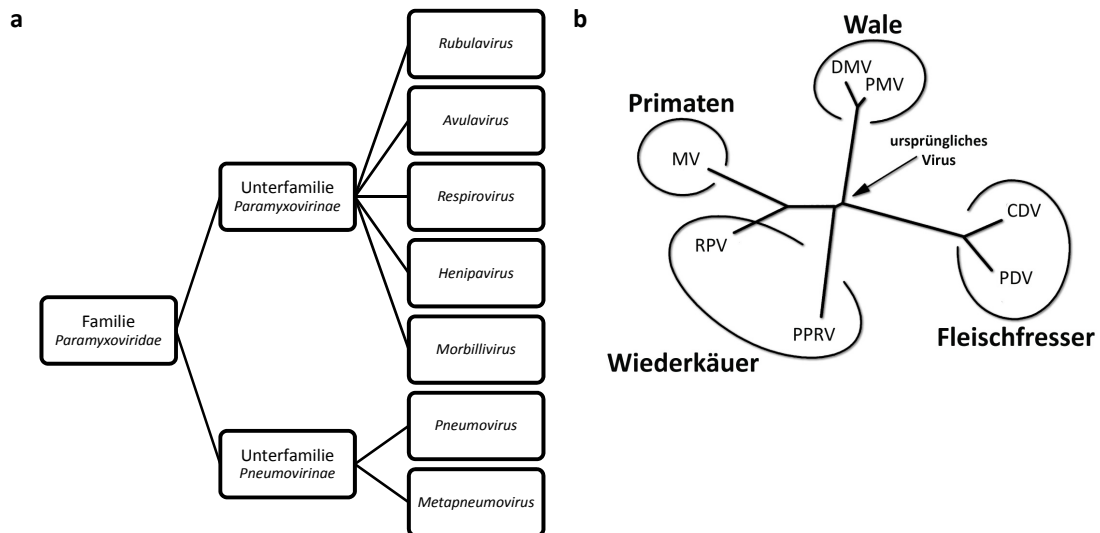


Abb. 1.3 | Die Familie der *Paramyxoviridae* und der Stammbaum der Morbilliviren. (a) Einteilung der Mitglieder der Familie *Paramyxoviridae*. (b) Phylogenetischer Stammbaum der Morbilliviren (nach Barrett, 1999). CDV, Hundestaubevirus; DMV, Delphin Morbillivirus; MV, Masernvirus; PDV, Hundsröbentstaubevirus; PMV, Tümmler Morbillivirus; PPRV, Pest der kleinen Wiederkäuerviren, RPV, Rinderpestvirus.

Das MV entstand vermutlich vor mehr als 10.000 Jahren aus Vorläufern des heutigen Hundstaubevirus (CDV) und/oder Rinderpestvirus (RPV) durch die beginnende Domestikation von Hunden und Rindern im mittleren Osten (Retief und Cilliers, 2010). Eine andere Studie jedoch zeigt, dass die heutige Form des MV vermutlich erst seit Beginn des 20. Jahrhunderts anzutreffen ist und sich eine eindeutige Trennung zwischen MV und RPV erst ab dem 11. oder 12. Jahrhundert ereignet hat (Furuse *et al.*, 2010).

Heute ist das monotypische MV in der ganzen Welt verbreitet. Anhand der Sequenz des C-Terminus des Nukleokapsidproteins (N) wird es in verschiedene Genotypen unterteilt, von denen einige jedoch bereits als ausgestorben gelten (Taylor *et al.*, 1991; Rima *et al.*, 1995).

Morphologie

MV Virionen sind stark pleomorphe Partikel einer Größe von ca. 120 bis 250 nm. Es sind sowohl filamentöse als auch irreguläre Formen bekannt (Miller und Raine, 1979; Fontana *et al.*, 2008a). Sie bestehen aus einer Lipidhülle, die den viralen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) umgibt. Der RNP setzt sich aus der viralen RNA, dem Nukleokapsidprotein (N), dem

Phosphoprotein (P) sowie der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, L) zusammen. Die Lipiddoppelschicht, in die die viralen Glykoproteine, das Hämagglutinin (H) und das Fusionsprotein (F), eingelagert sind, entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, aus der sie durch Knospung entstanden ist (Abb. 1.4).

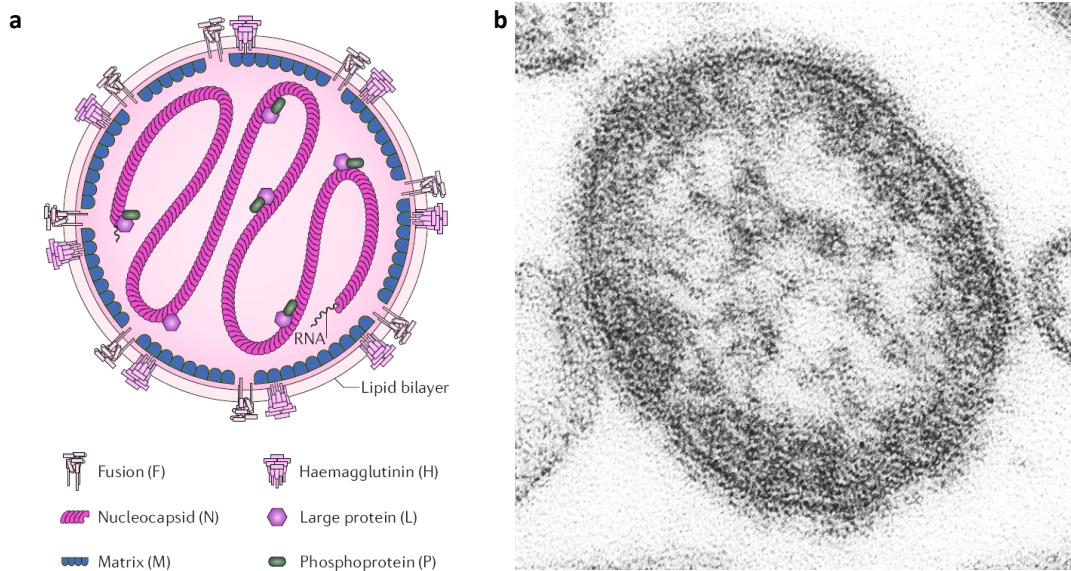


Abb. 1.4 | **MV Virionen.** (a) Schematische Darstellung eines MV Partikels (nach Moss und Griffin, 2006). (b) Das MV im TEM³.

Die Virushülle ist gegenüber äußeren Einflüssen relativ empfindlich und kann leicht durch Hitze, UV-Strahlung, Ether oder Detergentien zerstört werden. Die Proteine H und F stehen aus der Virushülle hervor und interagieren durch ihren zytoplasmatischen Enden mit dem Matrixprotein (M), welches wiederum die Hülle des Virus mit dem RNP verknüpft.

1.1.3. Virusstämme

Wildtypische Stämme

Obwohl sich wildtypische Masernviren aufgrund ihrer genomischen Sequenz unterscheiden können (Genotypen), so verleihen doch alle bisher eingesetzten Impfstämme eine Immunität gegenüber diesen Wildtypstämmen (Rima *et al.*, 1997). Zur Zeit wird angenommen, dass es sich bei den verschiedenen Wildtyp-Stämmen von MV um mindestens acht verschiedene Genotypen handelt (Taylor *et al.*, 1991; Rima *et al.*, 1995). Eine variable Region des N-Proteins, welches von allen MV-Proteinen am stärksten exprimiert wird (vgl. 1.1.5.), dient hierbei zum Vergleich der verschiedenen Genotypen. Sequenzvergleiche mit den H-Proteinen

³ http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/Measles_virus.JPG (Oktober 2010)

verschiedener Stämme, bei dem es sich um einen weiteren für das Immunsystem wichtigen Stimulus handelt, führten jedoch auch zu vergleichbaren phylogenetischen Einteilungen (Rima *et al.*, 1997). Das H-Protein weist nach dem N-Protein die zweithöchste Variabilität aller MV Proteine auf. Die Einteilung verschiedener MV-Isolate nach Genotypen spiegelt die Zeitpunkte, Isolationsorte und die Passagierungsgeschichte dieser Isolate wieder. In Europa sind Stämme der Gruppe C2 und D6 vorherrschend (Rima *et al.*, 1997; Santibanez *et al.*, 1999).

Impfstämme

Nahezu alle heute verwendeten MV-Impfstämme gehen auf den 1954 aus Blut von David Edmonston durch John Enders und Thomas Peebles isolierten Stamm (MV^{Edmonston}) zurück (Rota *et al.*, 1994; Moss und Griffin, 2006). Bei der Einteilung der MV-Isolate nach Genotypen bilden diese den sog. Edmonston Cluster (Rima *et al.*, 1997).

Rekombinante Stämme

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten MV-Stämmen handelt es sich um rekombinante Formen, die neben den viralen Proteinen zusätzlich die modifizierte Form des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) exprimieren. Möglich wurde die Generierung dieser Stämme durch ein System, welches erstmals von Radecke *et al.* 1995 beschrieben wurde. In einer abgewandelten Form wird dieses System auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt (vgl. 3.5.5.). Hierbei kann wildtypische oder rekombinante DNA auf Basis des MV-Genoms mit Hilfe einer RdRp des Bakteriophagen T7 in negativ-strängige (genomische) RNA umgeschrieben werden. Das gleichzeitige Bereitstellen der für die MV-Replikation (vgl. 1.1.5.) notwendigen viralen Proteine durch Expressionsvektoren führt zur Bildung von Synzytien, aus denen replikationskompetente, virale Partikel reisoliert werden können. Auf diese Weise wurden auch die rekombinanten Stämme rMV^{Edtag}EGFPCAMH (Duprex *et al.*, 1999a, 1999b, 2000) sowie rMV^{IC323}EGFP (Hashimoto *et al.*, 2002) erstellt, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Beide enthalten einen separaten, dem N-Gen vorgelagerten offenen Leserahmens des EGFP-Gens.

Neben der Integration von Fremdgenen in das MV-Genom bietet die Möglichkeit der Reisolation rekombinanter Virionen eine Vielzahl anderer Möglichkeiten, wie die gerichtete Mutagenese von MV-Genen (Patterson *et al.*, 2001), die Erstellung von Fusionsproteinen (Duprex *et al.*, 2002) oder Deletionsmutanten (Parks *et al.*, 2006) sowie der artifiziellen Rekombination von Genen verschiedener Genotypen innerhalb eines Stammes (Ohgimoto *et al.*, 2001).

1.1.4. Genom und Proteine

Genomaufbau

Das virale Genom des MV ist ein nichtsegmentiertes, negativ-strängiges, lineares RNA Molekül von ca. 16 kb Länge (Radecke und Billeter, 1995). Es kodiert für sechs strukturelle Gene, die ohne Überlappung linear aneinandergereiht sind (Abb. 1.5).

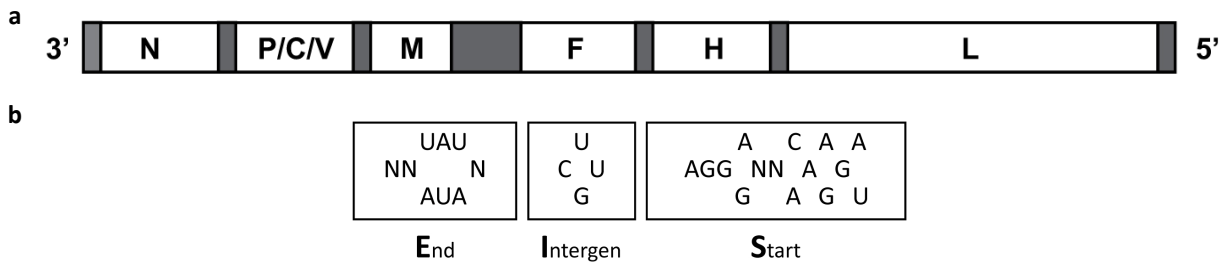


Abb. 1.5 | **Schematische Darstellung des MV Genoms.** (a) Das MV-Genom beginnt 3' mit einer sog „leader“-Sequenz, die u. a. auch die konservierten Nukleotide der „Start“-Region (b) enthält. Es endet mit der „5'-trailer“-Sequenz, die u. a. die konservierten Nukleotide der „End“-Region (b) enthält. Den offenen Leserastern der MV Genen N, P, M, F, H und L sind intergenische Sequenzen zwischengelagert, deren Nukleotid-Konsensussequenzen aus „End“- , „Intergen“- und „Start“-Regionen besteht.

Das Genom wird von beiden Seiten von zusätzlichen, nichtkodierenden Sequenzen von jeweils mehr als 100 Basen flankiert. Es handelt sich um die sog. „3'-leader“- bzw. die „5'-trailer“-Sequenzen (Abb. 1.5). Es wird vermutet, dass diese Sequenzen spezifische Verpackungs-Signale sowie die viralen Promoter für die virale Transkription und/oder Replikation enthalten. Aus dem P-Gen können durch verschiedene Mechanismen zwei weitere mRNAs für nicht-strukturelle Proteine – C und V – transkribiert werden (Liston *et al.*, 1995; Liston und Briedis, 1995). Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich kurze, nicht-kodierende intergenische Sequenzen, dessen Konsensussequenzen in Abb. 1.5 dargestellt sind. Sie sind u. a. für den bei der Replikation entstehenden Transkriptionsgradienten (siehe 1.1.5.) verantwortlich.

Proteine

Das 60 kDa große Nukleokapsidprotein N wird während der MV-Replikation zuerst und damit am häufigsten exprimiert. Es interagiert N-terminal mit dem MV-Genom und führt so zu dessen Enkapsidierung, welche das Genom vor der Degradation durch RNasen schützt. Außerdem ist es phosphoryliert (Prodhomme *et al.*, 2010) und bildet stabile Komplexe mit dem Phosphoprotein P (Gombart *et al.*, 1995).

Das P-Protein (72 kDa) ergänzt als Kofaktor die Polymeraseaktivität der RdRp L und fungiert hier als Transkriptionsregulator. Da es nach dem N-Protein das am zweitstärksten exprimierte Protein darstellt, sind auch hier große Mengen im Zytoplasma infizierter Zellen vorhanden, von denen aber nur wenige Proteine (~300) in neue Viruspartikel verpackt werden (Horikami und Moyer, 1995). Es ist ebenfalls phosphoryliert (Fuentes *et al.*, 2010).

Durch Leserasterverschiebungen der für P kodierenden Sequenz werden mRNAs für die nichtstrukturellen Proteine C (20 kDa) und V (46 kDa) transkribiert. Hierbei entsteht V durch Translation einer editierten P mRNA. Die Editierung verursacht durch den Einbau eines zusätzlichen Guanosins einen vom P-Protein verschiedenen, cysteinreichen sowie zinkbindenden C-Terminus (Cattaneo *et al.*, 1989, Liston und Briedis, 1995). Funktionen von V sind u. a. eine Hemmung der viralen RdRp (Tober *et al.*, 1998) sowie eine Inhibition der Apoptose durch Interaktion mit dem Tumor Suppressor Protein p73 (Cruz *et al.*, 2006). Das C-Protein entsteht durch die Benutzung eines anderen Start-Codons 22 Nukleotide nach dem des P-Proteins (Bellini *et al.*, 1985). Das Protein ist stark basisch und fungiert ebenfalls als Inhibitor der RdRp sowie als Verstärker der Synthese infektiöser viraler Partikel (Fontana *et al.*, 2008a). Neben den oben genannten Funktionen wird beiden Proteine eine Rolle bei der Manipulation der zellulären Interferonantwort (1.1.6.) zugeschrieben. Abb. 1.6 zeigt die genauen Positionen der C- und V-Leserahmen im MV-P-Gen.

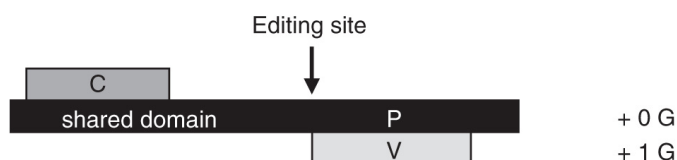


Abb. 1.6 | **Das Morbillivirus P-Gen mit alternativen Leserastern.** Das C-Protein des MV wird aus einem alternativen, kurzen offenen Leseraster des P-Gens translatiert. Das V-Protein hingegen besitzt die gleiche Anfangssequenz wie P („shared domain“), aber nach Editierung der P-mRNA an der „Editing site“ einen alternativen, verkürzten C-Terminus (nach Fontana *et al.*, 2008a).

Das Matrixprotein M (37 kDa) ist ein peripheres Membranprotein und bildet eine Proteinschicht an der Membraninnenseite der Viruspartikel sowie den infizierten Zellen bzw. Zellkomplexen. Es ist für die Bildung neuer Virus-Partikel und der damit einhergehenden Verpackung der RNPs verantwortlich – daher findet eine Interaktion des M-Proteins mit N statt. Zusätzlich ist das Protein mit den zytoplasmatischen Anteilen des F-Proteins assoziiert (Moll *et al.*, 2002, Runkler *et al.*, 2007). Ist das M-Protein an den RNP gebunden, so wirkt es wie das C-Protein ebenfalls als negativer Regulator der viralen RdRp (Reuter *et al.*, 2006).

Die beiden Transmembranproteine F (Fusionsprotein, welches als Heterodimer aus den Proteinen F₁ (41 kDa) und F₂ (22 kDa) besteht) und H (Hämagglutinin, 80 kDa) sind beide in

der Lipidmembran der Viruspartikel lokalisiert und bilden funktionelle Trimere (Wild *et al.*, 1994). Das F-Protein ist für die Fusion von Virus- und Zellmembran verantwortlich (Samuel und Shai, 2001). Es wird zunächst als Vorläuferprotein (F₀, 60 kDa) synthetisiert und dann im Golgi-Apparat zur aktiven Form prozessiert (Bolt *et al.*, 1999). Die Fusion kann jedoch erst erfolgen, nachdem das H-Protein die Bindung an zelluläre Rezeptoren vollzogen hat (Navaratnarajah *et al.*, 2009). Dieses besteht aus einem tetrameren Komplex, der wiederum aus zwei Dimeren besteht, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Bildung der Dimere erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (Devaux *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 2000).

Die RdRp L (220 kDa) ist für die Transkription der viralen mRNAs sowie der genomischen RNAs verantwortlich. Da letztere nicht selbst als mRNAs fungieren können ist die Anwesenheit der MV-Polymerase in Viruspartikeln erforderlich. Daher ist sie zusammen mit N und P Teil des RNPs. Ihre Aktivität wird durch das P-Protein reguliert. Außerdem führt sie die Polyadenylierung sowie das „capping“ der viralen Transkripte durch und besitzt eine Proteinkinasefunktion zur Phosphorylierung von P und N (Duprex *et al.*, 2002; Cevik *et al.*, 2004).

1.1.5. Replikation

Rezeptoren

Die zwei bis heute bekannten Rezeptoren, welche eine Bindung und ein darauf folgendes Eindringen des MV in die Wirtszelle ermöglichen sind CD46, ein komplementbindender Rezeptor (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993), sowie CD150 (SLAM), ein Molekül, welches u. a. die Proliferation aktivierter B-Zellen stimuliert (Tatsuo *et al.*, 2000; Erlenhöfer *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001). Allgemein anerkannt wird in der Fachliteratur, dass es einen oder mehrere weitere Rezeptoren geben muss, die vor allem bei der Infektion von Epithelzellen eine Rolle spielen (Hashimoto *et al.*, 2002). Die Identifikation von CD147 (EMMPRIN) als potentiellen MV-Rezeptor von Epithelzellen durch Watanabe *et al.* (2010) ist allerdings umstritten.

CD46 wird auf allen humanen kernhaltigen Zellen exprimiert, jedoch nur durch die von MV^{Edmonston} abgeleiteten Impfstämme (zusätzlich zu CD150) benutzt. Bei dieser Form der Virus-Aufnahme in die Wirtszelle handelt es sich also um eine Adaptation, welche durch die Passagierung des Edmonston-Isolates auf verschiedenen Zelllinien entstanden sein muss. Der von allen Wildtyp- und Impfstämmen für die Aufnahme von MV verwendete Rezeptor CD150 wird auf aktivierten T- und B-Zellen, reifenden DCs sowie Gedächtniszellen exprimiert (Punnonen *et al.*, 1997). Der Kontakt von CD150 mit dem MV könnte zur Induktion

einer Signalkaskade innerhalb der Zelle führen, über die bisher allerdings nichts bekannt ist. Die Infektion von CD150-positiven Zellen durch das MV führt jedoch zu einer Verringerung der CD150-Expression (Erlenhöfer *et al.*, 2001) auf der Oberfläche der infizierten Zellen.

Replikationsverlauf

Die Replikation des MV ist auf das Zytoplasma der infizierten Zelle begrenzt. Nachdem das Virus durch die Bindung des H-Proteins an den entsprechenden zellulären Rezeptor an die Zellmembran gebunden ist, führt eine Konformationsänderung des $F_{1/2}$ -Heterodimers zur Fusion der Virus- mit der Zellmembran, indem die hydrophoben Anteile des F-Proteins in der Zellmembran verankert werden. Bei diesem Vorgang wird der RNP in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt (Navaratnarajah *et al.*, 2009; Singethan *et al.*, 2010). Die Initiation der Transkription erfolgt durch Bindung des Polymerase-Komplexes an den innerhalb der „3'-leader“-Sequenz des MV-Genoms befindlichen Promoter. Hierbei wird die Transkription in Richtung der „5'-trailer“-Sequenz des Genoms immer wieder durch die intergenische Sequenzen unterbrochen (vgl. 1.1.4.). Nach Überspringen einer dieser intergenischen Sequenzen setzt die Polymerase die Transkription für das nächst folgende Gen fort. Da die Wahrscheinlichkeit für einen verfrühten Abbruch der Transkription steigt, je weiter sich die Polymerase in Richtung der „5'-trailer“-Sequenz bewegt, bildet sich ein Transkriptionsgradient der sechs entstehenden mRNAs aus (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990, 1999). Am 3'-Ende eines jeden Gens erfolgt, vermutlich durch eine Art Stotter-Mechanismus der Polymerase bei Erreichen der Terminations-Signale, eine Polyadenylierung der mRNAs. Da die entstehenden mRNAs außerdem eine 5'-Cap-Struktur erhalten haben, kann im Anschluss an die Transkription die Translation durch die zelluläre Maschinerie erfolgen.

Die für die Entstehung neuer viraler Partikel erforderliche Synthese von einzelsträngiger genomischer RNA erfolgt mit Hilfe eines Überschusses an N-Protein im Zytoplasma. Dieses lagert sich bei der Transkription an die RNA an und verhindert so ein Abfallen der Polymerase an den intergenischen Sequenzen (Blumberg *et al.*, 1981). So ist nach ausreichender Translation aller viralen Proteine zunächst eine Generierung positiv-strängiger Antigenome und die darauf folgende Transkription neuer Genome durch Bindung der Polymerase im „5'-trailer“-Bereich möglich. Hierbei wirkt sich die unter 1.1.4. beschriebene Komplexbildung des N-Proteins mit dem P-Protein und die des P-Proteins mit der Polymerase positiv auf die Entstehung von Antigenomen und somit auch von Genomen aus.

Damit eine Freisetzung neuer Viruspartikel erfolgen kann, lagern sich translatierte M-Proteine an die Innenseite der Plasmamembran an, in die bereits neu synthetisierte H/ $F_{1/2}$ -Trimere eingelagert wurden. Eine Interaktion von M mit zytoplasmatischen Bereichen von H und F führt zur Ausbildung einer Matrixschicht, die wiederum mit neu entstandenen RNPs

interagiert. Neues Virus wird freigesetzt, indem sich RNPs und Teile der zellulären Membran abschnüren, ein Vorgang der „budding“ genannt wird. Abb. 1.7 fasst die Vorgänge von Virusaufnahme bis „budding“ zusammen.

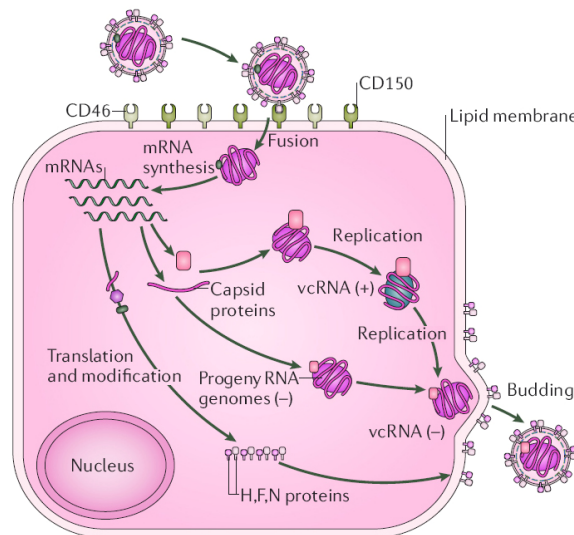


Abb. 1.7 | **Schematischer Ablauf der MV Replikation.** Die dargestellte Wirtszelle exprimiert die Rezeptoren CD46 sowie CD150 (nach Moss und Griffin, 2006).

1.1.6. Induzierung und Blockierung der Interferonantwort

Interferone (IFNs) sind inflammatorische Zytokine, die eine wichtige Rolle bei der Inhibition viraler Replikation sowie der Immunität von Wirtszellen spielen (Fontana *et al.*, 2008a). Sie werden u. a. nach Erkennung verschiedener Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs), wie z. B. doppelsträngiger RNA oder Glykoproteinen, durch die sog. Toll-like Rezeptoren (TLRs) über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Signal-Kaskaden exprimiert (Boo und Yang, 2010). Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz wird grundsätzlich zwischen IFNs des Typs I, II oder III unterschieden. Besonders IFNs vom Typ I besitzen viele Subtypen, von denen mindestens dreizehn IFN- α Subtypen und ein IFN- β Subtyp von den meisten Zelltypen während viraler Infektionen exprimiert werden. Das IFN vom Typ II (IFN- γ) wird von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entweder direkt nach der Erkennung infizierter Zellen oder dem Erhalt anderer mitogener oder phlogistischer Signale exprimiert. Obwohl die IFNs- α/β und IFN- γ keine offensichtliche strukturelle Homologie besitzen, so führen sie doch in allen Zelltypen zur Ausbildung eines sog. antiviralen Zustandes, welcher die anschließende Expression einer Vielzahl IFN-stimulierter, antiviraler Proteine bewirkt (Fontana *et al.*, 2008a).

Zusätzlich zu ihren Gemeinsamkeiten in der Morphologie, Reproduktion und Genom-Organisation haben alle Paramyxoviren Mechanismen zur Beeinflussung der angeborenen Immunantwort ihres Wirtes entwickelt. In den meisten Fällen wird diese Beeinflussung durch nicht-strukturelle Proteine bewirkt. So wurde auch für das MV eine Rolle des P-Proteins sowie der nicht-strukturellen Proteine C und V bei der Verhinderung einer zellulären Interferonantwort beschrieben (Fontana *et al.*, 2008a). Eine Blockade der IFN-Signalkaskaden durch MV-C wurde beispielsweise von Shaffer *et al.* (2003) gezeigt. Palosaari *et al.* (2003) und Takeuchi *et al.* (2003) konnten dies auch für das V-Protein sowie Devaux *et al.* (2007) für das P-Protein des MV belegen. Hierbei scheint das V-Protein bei allen untersuchten MV-Stämmen die bedeutendste Rolle zu besitzen (Fontana *et al.*, 2008b). Während die genaue Rolle des C-Proteins in diesem Zusammenhang noch unklar ist, so wurde für das P- und das V-Protein eine Inhibition der Phosphorylierung und/oder ein Defekt in der nukleären Akkumulation von Mitgliedern der „signal transducer and activator of transcription“-Proteine (STAT-Proteine) belegt. Diese direkte Interaktion mit Mitgliedern des JAK-STAT-Signalweges verhindert anschließend die Transkription der durch die Induktion der IFNs aktivierten antiviralen Gene.

Neben der Beeinflussung der Interferonantwort wurde für das MV auch eine Interaktion mit zellulären Interferonen gezeigt (Moss und Griffin, 2006). So ist z. B. die Produktion von Interleukin 12, welches für die Ausbildung einer Immunantwort durch T-Helferzellen des Typs 1 erforderlich ist, nach Bindung von MV-Impfstämmen an CD46 *in vitro* sowie für mehrere Wochen bei Kindern mit Masern reduziert (Karp *et al.*, 1996).

1.2. Die Cytosin-Desaminase APOBEC3G

Schon seit mehreren Jahren ist bekannt, dass verschiedene immortalisierte, CD4-positive T-Zell-Linien wie H9, HUT78 und CEM sowie primäre, CD4-positive T-Zellen nichtinfektiöse virale Partikel produzieren, wenn sie zuvor mit einem Vif-defizienten HIV-1-Laborstamm infiziert wurden (von Schwedler *et al.*, 1993; Gaddis *et al.*, 2003). Das Vif-Protein („viral infectivity factor“) ist ein akzessorisches, 27 kDa großes, zytoplasmatisches Protein, dessen Funktion im Replikationszyklus von HIV lange unbekannt war (Chiu und Greene, 2008a). Aufgrund der Unfähigkeit infektiöse HIV-Partikel zu bilden, wurden diese Zelllinien „nicht-permissiv“ benannt. In anderen, „permissiven“ Linien (SupT1, Jurkat oder CEM-SS) wurden nach der Infektion mit den gleichen HIV-1 Vif-defizienten Stämmen hingegen virulente Partikel generiert.

Im Jahre 2002 wurde von Sheehy *et al.* in Nature veröffentlicht, dass der Grund für diese Unfähigkeit der nicht-permissiven Zelllinien in der Anwesenheit eines Proteins besteht, das

die Autoren CEM15 nannten. Sie hatten zuvor die nicht-permissive Linie CEM-SS und die eng verwandte permissive Linie CEM durch cDNA-Subtraktion verglichen und nachgewiesen, dass CEM15 in allen nicht-permissiven Linien, nicht aber in permissiven Linien exprimiert wird. Kurz darauf wurde gezeigt, dass es sich bei CEM15 um die Cytosin Desaminase „apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G“ (APOBEC3G) handelt (Jarmuz *et al.*, 2002), die in einzelsträngiger DNA Cytosine zu Uracil desaminiert (Suspène *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004a). Damit war das humane APOBEC3G (hA3G) das erste Protein, dem eine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 nachgewiesen werden konnte. Bald darauf wurden weitere Mitglieder der APOBEC-Superfamilie mit antiviralen sowie anderen Eigenschaften identifiziert (Bishop *et al.*, 2004a; Harris und Liddament, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004).

1.2.1. APOBEC Proteine

Die Superfamilie der APOBEC-Proteine in Menschen besteht nach heutigem Forschungsstand aus fünf Unterfamilien und insgesamt elf Mitgliedern. Hierbei stellen die „activation induced deaminase“ (AID) sowie APOBEC1, -2 und -4 jeweils die einzigen Vertreter ihrer Unterfamilien dar (Prochnow *et al.*, 2009). Abb. 1.8 gibt einen Überblick über die APOBEC-Superfamilie.

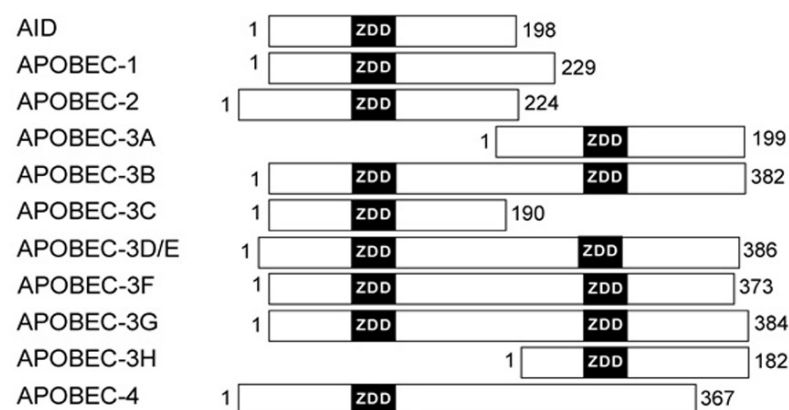


Abb. 1.8 | Die APOBEC Superfamilie. Schematische Darstellung der Mitglieder der APOBEC Superfamilie. Die Zink-abhängigen Desaminase-domänen (ZDD) sind in Bezug auf ihre Aminosäure-Ähnlichkeiten sortiert⁴.

Die Unterfamilie der APOBEC3 Proteine besteht aus den insgesamt sieben Proteinen APOBEC3A-G. Hierbei wurde APOBEC3DE zunächst nicht als eigenständiges Protein identi-

⁴ http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/smith/images/figure2no_lg.jpg (Oktober 2010)

fiziert, daher die zweifache Bezeichnung (Jarmuz *et al.*, 2002; Prochnow *et al.*, 2009). Die humanen Proteine APOBEC1 und AID sind auf Chromosom 12, das Protein APOBEC2 auf Chromosom 6 und das APOBEC4-Protein auf Chromosom 1 lokalisiert (Rogozin *et al.*, 2005). Der Cluster der APOBEC3-Unterfamilie befinden sich auf Chromosom 22 (Harris und Liddament, 2004; Cullen, 2006).

Alle APOBEC Proteine besitzen die Fähigkeit Cytosin zu Uracil zu desaminieren. Zu diesem Zweck enthalten sie mindestens eine katalytisch aktive Domäne mit Zink-abhängiger Cytidin-Desaminase-Aktivität. Sie besteht aus den konservierten Aminosäuren Histidin-X-Glutamat-X₂₃₋₂₈-Prolin-Cystein-X₂₋₄-Cystein, wobei „X“ eine beliebige Aminosäure bezeichnet. Die Proteine APOBECB, -DE, -F und -G sind durch Genduplikationen entstanden und besitzen zwei dieser Desaminase-Domänen (Jarmuz *et al.*, 2002; Harris und Liddament, 2004; Huthoff und Malim, 2005; Holmes *et al.*, 2007). Obwohl jeweils beide Domänen in APOBEC3F und -G als Desaminase-Domänen bezeichnet werden, so sind doch die N-terminalen Domänen beider Proteine katalytisch nicht aktiv. Zur Desaminierung sind nur die C-terminalen Domänen befähigt. Interessanterweise trifft dies nicht auf APOBEC3B zu, welches zwei katalytisch aktive Domänen besitzt (Bishop *et al.*, 2004a; Liddament *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Iwatani *et al.*, 2006; Bogerd *et al.*, 2007). Über die genauen Funktionen der beiden Domänen des APOBEC3DE-Proteins ist noch zuwenig bekannt, obwohl eine antivirale Aktivität von APOBEC3DE gegen HIV-1 bereits beschrieben ist (Haché *et al.*, 2008).

Evolution

Obwohl sich der Name der APOBEC-Familie von APOBEC1 ableitet, welches die mRNA des Apolipoproteins spezifisch an Position 6666 desaminiert (Blanc und Davidson, 2010), so wird doch vermutet, dass es sich bei dem ursprünglichsten APOBEC-Protein um AID handeln muss und alle anderen Vertreter sich durch Genduplikation aus AID entwickelt haben (Conticello *et al.*, 2005).

Gene aus der Familie der APOBEC-Proteine finden sich in allen Vertebraten. AID und APOBEC2 wurden bisher in einigen Knochenfischen gefunden, wohingegen Mitglieder der APOBEC1 und -3 Familie nur spezifisch für Säugetiere zu sein scheinen (Saunders und Marmor, 2005; Conticello *et al.*, 2005; Zaho *et al.*, 2005). Während die Genome der Primaten für sieben verschiedene APOBEC3-Proteine kodieren, so ist bisher in allen anderen Vertebraten nur jeweils ein APOBEC3-Protein identifiziert worden (Mariani *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche mit dem humanen APOBEC3G-Gen und anderen verwandten Sequenzen aus Primaten und Hominiden haben ergeben, dass der APOBEC3-Locus noch vor der Radiation der Primaten einem positiven Selektionsdruck unterlegen haben muss, der dessen Expansion durch

Duplikation begünstigte (Harris und Liddament, 2004; Sawyer *et al.*, 2004). Dies scheint jedoch bereits vor dem Auftreten der modernen Lentiviren geschehen zu sein. Als Grund für diese Expansion wird angenommen, dass Mitglieder der APOBEC3-Proteine zunächst gegen humane endogene Retroviren (HERV) gerichtet waren. Die Funktion als antivirale Faktoren gegen insbesondere exogene Retroviren scheinen evolutionsgeschichtlich jünger zu sein (Sawyer *et al.*, 2004).

Funktionen

Viele der bemerkenswert unterschiedlichen Funktionen von Mitgliedern der APOBEC-Familie, welche auf der Fähigkeit der Proteine DNA oder RNA zu binden, sowie Cytosin zu Uracil zu desaminieren beruhen, konnten in der Vergangenheit aufgeklärt werden. Das Protein AID beispielsweise spielt eine Schlüsselrolle bei der Reifung von Antikörpern durch Desaminierung nukleärer DNA. Die Insertion somatischer Hypermutationen in die Sequenzen der Antikörper erlaubt die Selektion derjenigen Antikörper mit erhöhter Affinität zu ihren Antigenen (Prochnow *et al.*, 2009). Auch eine Funktion bei der Demethylierung von DNA durch AID (Fritz und Papavasiliou, 2010) und die Restriktion von Retrotransposons (McDuff *et al.*, 2009) wird diskutiert.

APOBEC1 ist das einzige Protein der APOBEC-Familie, bei dem eine direkte Desaminierung von RNA, nämlich der mRNA des Apolipoproteins B an Position 6666 in Epithelzellen des Dünndarms, nachgewiesen wurde (Teng *et al.*, 1993; Blanc und Davidson, 2010). Durch die Editierung wird die Produktion der Lipoproteine APOB100 bzw. APOB48 reguliert.

Das Protein APOBEC2 scheint eine Rolle bei der Entwicklung zu spielen. Es wird ausschließlich in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert, blockiert TGF- β und trägt damit zur Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie in der frühen Embryogenese bei (Liao *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2009; Vonica *et al.*, 2010).

Die Gruppe der APOBEC3-Proteine, insbesondere die biologisch relevanten Proteine APOBEC3G und APOBEC3F, hemmen die Mobilität endogener Retroelemente und wirken antiviral gegen verschiedene Pathogene, darunter HIV und HBV (Prochnow *et al.*, 2009). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch die Fähigkeit dieser beiden Enzyme, unabhängig von ihrer Desaminase-Aktivität ebenfalls eine Hemmung retroviraler Infektionen zu bewirken. Dies wurde durch Mutagenese der APOBEC3G- und APOBEC3F-Proteine gezeigt (Newman *et al.*, 2005; Bishop *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 2007). Einer der Mechanismen, die diese Desaminase-unabhängige Restriktion vermitteln, scheint die Inhibition der Anlagerung von tRNA^{Lys-3} an die virale RNA zu sein, durch die die Initiation der reversen Transkription verhindert wird (Guo *et al.*, 2006, 2007; Yang *et al.*, 2007). Weitere Desaminase-unabhängige

Mechanismen, die ebenfalls auf der Fähigkeit der APOBEC3-Proteine RNA zu binden beruhen werden vermutet.

Für APOBEC3A wurde eine Rolle bei der Degradation zellfremder DNA (Stenglein *et al.*, 2010), die Inhibition von intrazellulären Retrotransposons (Dang *et al.*, 2006) sowie eine Restriktion von HIV-1 beschrieben (Peng *et al.*, 2007). Für APOBEC3B und -C wurde bereits eine antivirale Aktivität gegen das simiane Immundefizienz-Virus (SIV) gezeigt (Yu *et al.*, 2004b). Außerdem wirkt APOBEC3C ebenfalls inhibierend auf endogene Retrotransposons (Dang *et al.*, 2006) und vermittelt in CD4-positiven T-Zellen durch Integration von Hypermutationen eine Hemmung der Replikation von HIV-1 (Bourara *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt ist die auch bei APOBEC3DE und HIV-1 möglich (Dang *et al.*, 2006; Haché *et al.*, 2008). Für APOBEC3H aus Altwelt-Affen ist eine effiziente antivirale Aktivität gegen Lentiviren aus Primaten beschrieben, in Menschen scheint diese Aktivität jedoch aufgrund verringerter Expression verloren gegangen zu sein (OhAinle *et al.*, 2006; Dang *et al.* 2008; OhAinle *et al.*, 2008).

APOBEC4 wird ausschließlich im Hoden exprimiert. Obwohl seine genaue Funktion bisher unbekannt ist wird angenommen, dass es bei der Spermatogenese von Bedeutung sein könnte (Rogozin *et al.*, 2005).

1.2.2. Antivirale Eigenschaften

Retroelemente

Wie bereits erwähnt wird vermutet, dass es sich bei der ursprünglichsten Funktion der APOBEC3-Proteine der Primaten um die Inhibition von endogenen Retroelementen handelt, welche schließlich zu einer Expansion des APOBEC3-Genlokus geführt haben (Harris und Liddament, 2004; Sawyer *et al.*, 2004). Bei der Regulation der enzymatischen Aktivität des APOBEC3G-Proteins spielt dessen zelluläre Lokalisation und Multimerisierung eine besondere Rolle (vgl. 1.2.5.). So konnten mehrere Studien zeigen, dass eine Inhibition von Retroelementen überwiegend dann stattfindet, wenn APOBEC3G in hochmolekularen Komplexen gebunden vorliegt (Chiu *et al.*, 2006; Chiu und Greene 2009; Chiu *et al.*, 2010). Diese Komplexe bestehen aus mindestens 95 verschiedenen Proteinen, darunter zahlreichen RNA-bindenden Proteinen mit verschiedensten Aufgaben zur Regulation von RNA-Aktivität und RNA-Metabolismus (Kozak *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007), sowie unterschiedlichsten RNA-Spezies. Die bedeutendste Fraktion dieser RNA stellen Retroelemente wie Alu-RNAs oder humane Y-RNAs (hY1 bis hY5) (Chiu *et al.*, 2006; Chiu und Greene, 2009).

Alu-Elemente, die größte Gruppe innerhalb der „short interspersed nucleoside elements“ (SINEs), sind eine erfolgreiche Gruppe endogener Retroelemente, die etwa 10 % des

menschlichen Genoms ausmachen. Ebenso wie andere Retroelemente amplifizieren sie über zytoplasmatische RNA-Zwischenstufen (Chiu and Greene, 2008). Da sie für keine eigene Reverse Transkriptase kodieren, sind sie auf die Enzyme von sog. „long interspersed nuclear elements 1“ (L1s) angewiesen.

Mehrer Studien konnten u. a. durch Messung von L1-abhängigen Alu-Retrotranspositions-Ereignissen zeigen, dass APOBEC3-Proteine und insbesondere APOBEC3G eine Reduktion der Retrotransposition von Alu-Elementen und vieler weiterer Retroelementen wie das humane endogene Retrovirus K (HERV-K), „intracisternal A-particles“ (IAPs), MusD und L1 bewirken (Esnault *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006; Esnault *et al.*, 2006; Hulme *et al.*, 2007; Chiu and Greene, 2008). Hierbei konnte bei durch Mutagenese katalytisch-inaktiven APOBEC3G-Proteinen ebenfalls eine Reduktion der Transposition beobachtet werden, was für Desaminase-unabhängige Mechanismen spricht (Chiu *et al.*, 2006; Hulme *et al.*, 2007). Die Restriktion der Alu-Transposition ist schematisch in Abb. 1.9 dargestellt.

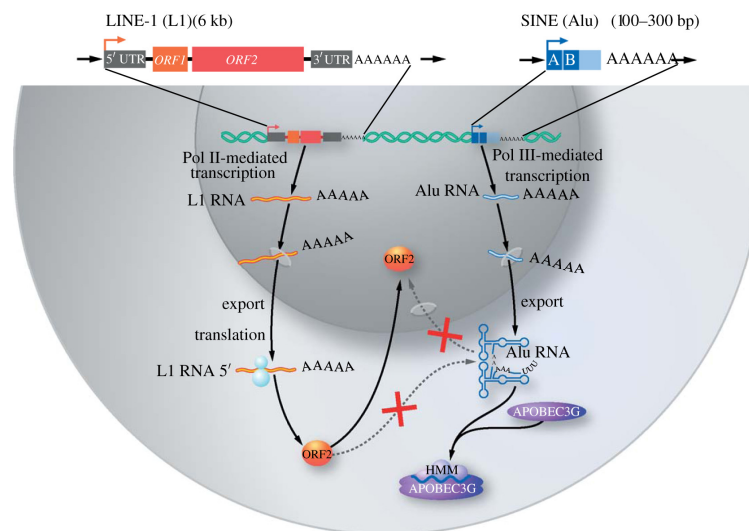


Abb. 1.9 | **APOBEC3G-vermittelte Hemmung der Alu-Transposition.** Die reverse Transkriptase-Endonuklease von L1 (ORF2) kann die reverse Transkription und Integration von Alu-RNAs nicht mehr vermitteln, da APOBEC3G diese RNAs in hochmolekularen Komplexen (HMM) bindet. ORF, „open reading frame“; Pol II, RNA Polymerase II; Pol III, RNA Polymerase III; UTR, „untranslated region“ (nach Chiu und Greene, 2009).

APOBEC3G und andere Mitglieder der APOBEC3-Unterfamilie tragen also durch die Inhibition endogener Retrotransposition auch dazu bei, die Integrität des menschlichen Genoms zu gewährleisten (Chiu *et al.*, 2006).

Retroviren und HBV

Bereits kurz nach der Entdeckung der Restriktion von HIV-1 durch APOBEC3G wurde klar, dass APOBEC3G und weitere Mitglieder der APOBEC3-Unterfamilie inhibitorisch auf viele verschiedene Retroviren wirken können. Zu ihnen gehören u. a. EIAV („equine infectious anemia virus“) (Mangeat *et al.*, 2003), MLV (murines Leukämie Virus) (Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Bishop *et al.*, 2004a; Kobayashi *et al.*, 2004), FV (Foamy Virus) (Löchelt *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2005; Delebecque *et al.*, 2006) und XMRV („human exogenous gammaretrovirus“) (Stieler und Fischer, 2010).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch HBV (Hepatitis B Virus), welches im Verlaufe seiner Replikation eine reverse Transkription durchführt, einer Restriktion durch APOBEC3G unterliegt (Turelli *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2005; Rösler *et al.*, 2005; Suspène *et al.*, 2005). Ein weiteres, nicht zu den Retroviren zählendes Virus, welches durch ein APOBEC3-Protein, nämlich APOBEC3A, in seiner Replikation beeinträchtigt wird, ist das Parvovirus AAV (Adeno assoziiertes Virus) (Chen *et al.*, 2006a).

Bei den meisten dieser nachgewiesenen Restriktionen handelt es sich um Desaminase-abhängige Mechanismen, das heißt es wurden Mutationen bzw. Hypermutationen der viralen Genome nachgewiesen. In manchen Fällen wird jedoch auch hier eine Desaminase-unabhängige Restriktion diskutiert (Turelli *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2007), vor allem dann, wenn wie im Fall von HBV nur wenige Mutationen nachgewiesen werden können (Noguchi *et al.*, 2005; Suspène *et al.*, 2005).

HIV

Der am besten untersuchte antivirale Effekt von APOBEC3G ist die Inhibition von HIV-1. Die zuerst von Sheehy *et al.* (2002) in Nature beschriebene Grund für die Fähigkeit von Vif-defizientem HIV-1 in APOBEC3G-exprimierenden Zellen nur nicht-infektiöse Partikel zu produzieren ist seitdem von vielen Gruppen untersucht und aufgeklärt worden. Hierbei wird dieser Effekt in vergleichbarer Weise auch für weitere Mitglieder der APOBEC3-Familie und andere Retroviren beobachtet (Bishop *et al.*, 2004a; Harris und Liddament, 2004; Liddament *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004).

Die Basis für diesen antiviralen Mechanismus bildet der Einbau von APOBEC3G in neu synthetisierte Partikel nach einer Infektion von APOBEC3G-exprimierender Zelllinien, welche daher auch nicht-permissive Zelllinien genannt werden, durch eine Vif-defizienten HIV-1-Stamm (Stopak *et al.*, 2003). Frühe Studien haben gezeigt, dass APOBEC3G über eine Interaktion mit der Nukleokapsid-Domäne des Gag-Vorläufers in HIV-1-Partikel verpackt wird (Alce und Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2004). Versuche mit

verschiedenen, nicht-HIV-1 Gag-Proteinen, die allein ebenfalls für einen effizienten Einbau ausreichend sind, haben gezeigt, dass dies jedoch über keine direkte Interaktion, sondern über RNA-Brücken zwischen Gag und der N-terminalen Domäne von APOBEC3G erreicht wird (Luo *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004). Welche zelluläre und/oder virale RNA hierbei von Bedeutung ist, oder ob dies unspezifisch geschieht, ist noch ungeklärt (Strebel und Khan, 2008). APOBEC3G ist als Aggregat mit Gag in all denjenigen Kompartimenten des späten Endosoms an der zellulären Membran assoziiert, in denen auch Gag zu finden ist (Madani und Kabat, 1998). Es wird vermutet, dass durch diese Kompartimentisierung eine gezielte Verpackung von APOBEC3G in neu entstehende Partikel, insbesondere eine Assoziation mit den viralen Kernen und dem Komplex der reversen Transkriptase, möglich wird, die eine Überführung in neu infizierte Zellen sicherstellt.

Bei Neuinfektion weiterer Zellen führt APOBEC3G in erster Linie zu einer Desaminierung von viraler, negativ-strängiger cDNA (Suspène *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004a). Diese Desaminierung führt zu einer massiven Ansammlung von G nach A Mutationen im positiv-strängiger cDNA, welche auch als Hypermutationen bezeichnet werden. Die entstandene Editierung inhibiert die HIV-1 Replikation durch (i) die spätere Entstehung aberranter viraler Proteine, (ii) die Degradation viraler DNA durch zelluläre, Uracil-spezifische Reparaturmechanismen und (iii) fehlerhafte Integration viraler DNA in das zelluläre Genom (Henriet *et al.*, 2009). Diese generellen Mechanismen der APOBEC3G-vermittelten HIV-1-Restriktion sind in Abb. 1.10 schematisch dargestellt.

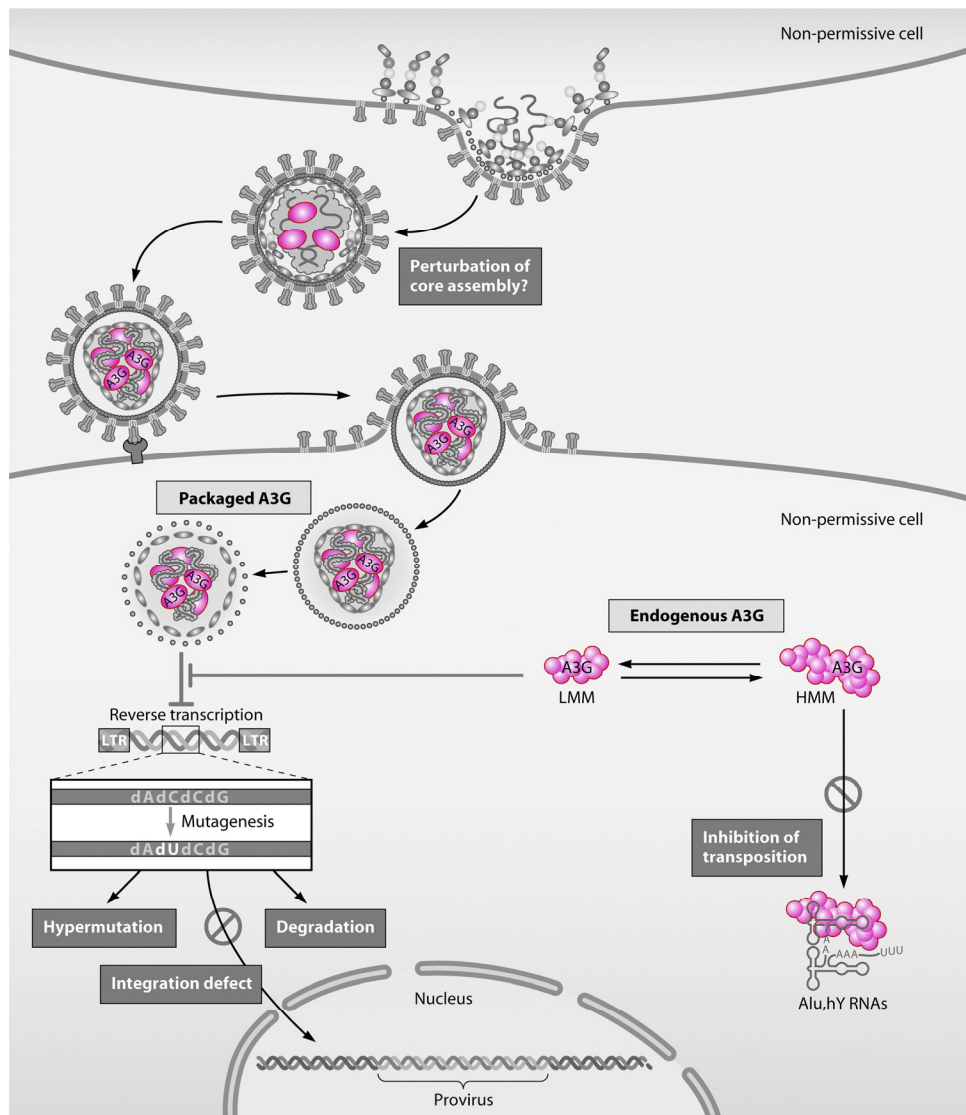


Abb. 1.10 | Antivirale Aktivität von APOBEC3G bei HIV-1. HMM, hochmolekularer Komplex; LMM, niedrigmolekularer Komplex (nach Henriët *et al.*, 2009).

Die Tatsache, dass APOBEC3G in aktivierten CD4-positiven T-Zellen sowie nach Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen überwiegend in hochmolekularen Komplexen an Alu-RNAs gebunden vorliegt (Abb. 1.10), fördert hierbei die Anfälligkeit für eine effektive Infektion durch HIV-1 zusätzlich (Chiu and Greene, 2009; Chiu *et al.*, 2010).

Zusätzlich zu der durch Desaminierung vermittelten Restriktion werden alternative Mechanismen diskutiert (Holmes *et al.*, 2007). Da gezeigt wurde, dass die N-terminale Domäne allein für eine Inhibition von HIV-1 ausreichend ist (Li *et al.*, 2004), müssen diese Mechanismen überwiegend auf der Fähigkeit des APOBEC3G-Proteins beruhen, RNA zu binden. Eine Möglichkeit besteht in der Inhibition des viralen Strangtransfers während der reversen Transkription (Li *et al.*, 2007). Eine andere in der Blockierung des tRNA-Primings und der reversen Transkription an sich (Guo *et al.*, 2006, 2007). Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass APOBEC3G auch eine Desaminase-unabhängige Verringerung der HIV-1-

DNA-Integration vermittelt, indem es an die Integrase selbst bindet und/oder eine Modifikation der Prä-Integrationskomplexe (PICs) bewirkt (Luo *et al.*, 2007; Mbisa *et al.*, 2007).

1.2.3. Proteindomänen

Das heutige Strukturmodell des APOBEC3G Proteins beruht auf Röntgenstrukturanalysen mit APOBEC2. Aus einem nicht bekannten Grund und trotz zahlreicher Versuche ließen sich bisher keine vollständigen APOBEC3G-Kristalle für die Analyse erstellen (Huthoff, mündliche Mitteilung). Einzig die Strukturanalyse der C-terminalen Desaminase-Domäne ist bisher gelungen (Zhang *et al.*, 2007; Holden *et al.*, 2008; Brandsteitter *et al.*, 2009; Harjes *et al.*, 2009; Prochnow *et al.*, 2009; Albin und Harris, 2010). Abb. 1.11 gibt das zur Zeit aktuelle Strukturmodell von APOBEC3G wieder.

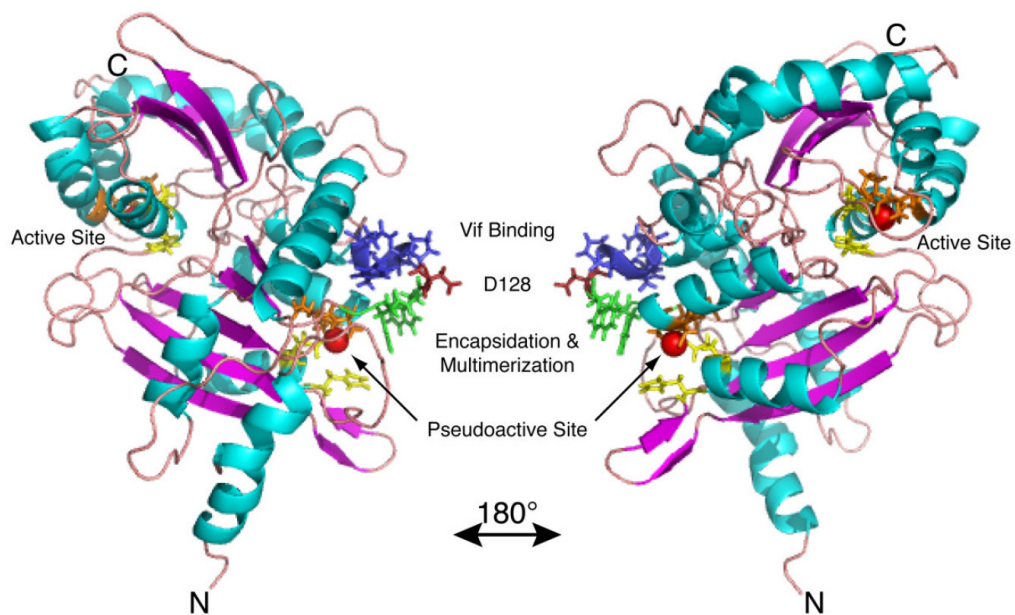


Abb. 1.11 | **Strukturmodell des APOBEC3G-Proteins.** Besondere Regionen sind die katalytisch aktive Desaminase-Domäne („Active Site“), die inaktive Desaminase-Domäne („Pseudoactive Site“), Bereiche für die Interaktion mit Vif („Vif Binding“) samt Aspartat 128 („D128“), welches für die artspezifische Interaktion mit Vif von zentraler Bedeutung ist, sowie die für die Verpackung in HIV-1-Virionen und Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren („Encapsidation & Multimerization“) entscheidende Region (nach Albin und Harris, 2010).

Die C-terminale katalytisch-aktive Desaminase-Domäne und die N-terminale inaktive Desaminase-Domäne werden jeweils aus α -Helices und β -Faltblättern gebildet. Hierbei liegen die sich auch in der N-terminalen Hälfte des Proteins gelegenen Bereiche für die Interaktion mit Vif und die für die Verpackung in HIV-1-Virionen und Bildung von Dimeren bzw. Oli-

gomerer entscheidende Regionen auf der Oberfläche des Proteins in enger Nachbarschaft vor (Harjes *et al.*, 2009; Albin und Harris, 2010).

Aktive Desaminase Domäne

Die für die Desaminierung essentiellen Aminosäuren der C-terminalen Desaminase-Domäne von APOBEC3G wurden durch Mutagenese-Studien als das Histidin an Position 257 sowie Glutamat an Position 259 identifiziert (Albin und Harris, 2010). Hierbei wird das Zink-Ion durch zwei ebenfalls konservierte Cystein-Reste (siehe 1.2.1.) sowie das Histidin koordiniert, während der Glutaminsäurerest für die Protonenübertragung verantwortlich ist (Liddament *et al.*, 2004; Prochnow *et al.*, 2009; Albin und Harris, 2010). Die Domäne besteht aus insgesamt fünf α -Helices die über fünf β -Faltblättern angeordnet sind (Chen *et al.*, 2008). Die hydrolytische Desaminierung des Cytosins der gebundenen DNA findet an Position C4 der Base statt (Zhang *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2007). Der Vorgang ist in Abb. 1.12 schematisch dargestellt.

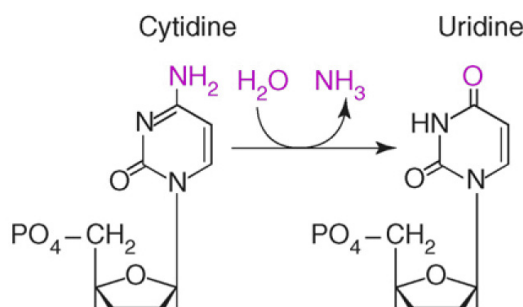


Abb. 1.12 | Schematische Darstellung der Desaminierung eines Cytidins zu Uridin durch APOBEC3G (nach Holmes *et al.*, 2007).

Die C-terminale Desaminase-Domäne von APOBEC3G besitzt außerdem eine Präferenz für CCC-Nukleotide, wobei das Cytosin an Position drei desaminiert wird (Unterstrich). Diese Präferenz ist nur für APOBEC3G zu finden und beruht auf einer Erkennungs-Schleife des Proteins die durch die Aminosäuren 314 bis 322 gebildet wird (Kohli *et al.*, 2009, 2010).

Inaktive Desaminase Domäne

Obwohl die N-terminale Desaminase-Domäne die gleichen konservierten Aminosäuren wie die C-terminale Domäne enthält, so ist sie doch katalytisch inaktiv (Bishop *et al.*, 2004b; Navarro *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Iwatani *et al.*, 2006). Der genaue Grund für diese Inaktivität ist bisher noch immer ungeklärt (Prochnow *et al.*, 2009). Gezeigt wurde jedoch,

dass die konservierten, sich im pseudoinaktiven Zentrum befindenden Aminosäuren Histidin an Position 65 sowie Glutamat an Position 67 essentiell für eine Bindung von APOBEC3G an RNA sind (Navarro *et al.*, 2005; Albin und Harris, 2010).

Weitere wichtige Bereiche mit aufgeklärter Funktion im Bereich der N-terminalen Domäne sind die Aminosäuren 124 bis 127, welche die Multimerisation des Proteins und seine Verpackung in HIV-1 vermitteln (Haché *et al.*, 2005; Harjes *et al.*, 2009; Albin und Harris, 2010). Sie überlappen mit der Region 126 bis 132, in der eine Bindung von Vif an APOBEC3G mit Aspartat 128 als zentraler Aminosäure, welche die Spezies-Spezifität von Vif determiniert, erfolgt (Huthoff und Malim, 2007; Henriët *et al.*, 2009). Zusätzlich stellen die Aminosäuren 129 bis 132 die Überreste einer putativen Vif-Bindestelle dar (Albin und Harris, 2010).

Interaktion mit Vif

Die Interaktion des akzessorischen HIV-1-Proteins Vif und verwandter Proteine anderer Lentiviren mit APOBEC3 Proteinen wurde bisher, nicht zuletzt wegen des potentiellen Nutzens in Bezug auf die Entwicklung antiviraler Substanzen, eingehend untersucht (Goila-Gaur und Strebel, 2008; Henriët *et al.*, 2009). In Abb. 1.13 sind die verschiedenen Formen der APOBEC3G-Vif Interaktion sowie ein schematisches Modell der Interaktion von Vif, APOBEC3G, Elongin C und Cullin 5 dar.

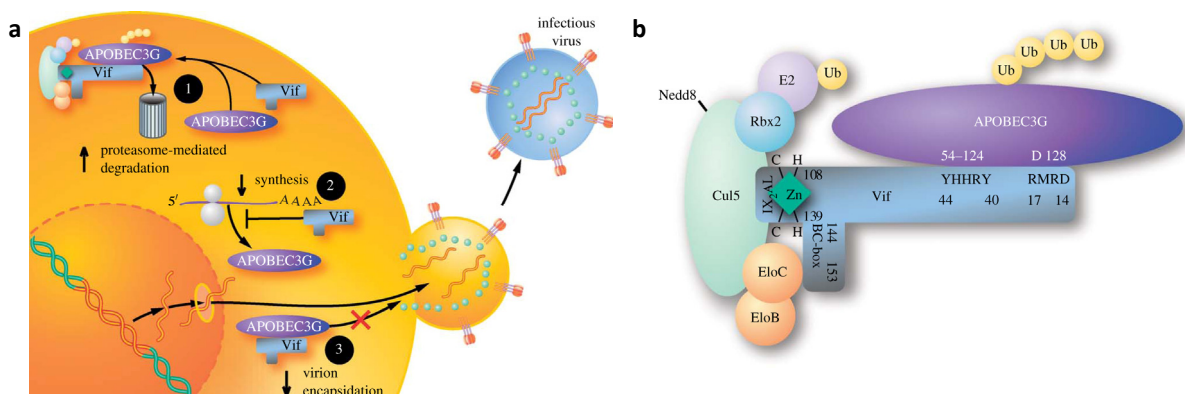


Abb. 1.13 | **Das Zusammenspiel von Vif und APOBEC3G.** (a) Die drei verschiedenen Formen der APOBEC3G-Interaktion von Vif: Bindung von Vif an APOBEC3G und Degradation durch das zelluläre Proteasom (1), Inhibition der APOBEC3G-mRNA Translation (2) und potentieller Ausschluss von APOBEC3G aus viralen Partikeln durch Bindung von Vif ohne stattfindende Degradation. (b) Schematisches Modell der Interaktion von Vif, APOBEC3G, Elongin C und Cullin 5 (nach Chiu und Greene, 2008).

Vif vermittelt die Reduktion der in HIV-1 integrierten APOBEC3G-Proteine auf verschiedene Weise. Im Vordergrund steht hierbei die Bindung von Vif an APOBEC3G, welche letztendlich zu einer Degradation von APOBEC3G durch das zelluläre 26S Proteasom führt.

Das im humanen APOBEC3G vorhandene Aspartat an Position 128 ist, wie bereits erwähnt, für die artspezifische Bindung des Vif-Proteins verantwortlich, denn an APOBEC3G-Proteine aus Grünen Meerkatzen, welche ein APOBEC3G-Protein mit Lysin an Position 128 besitzen, kann Vif aus HIV-1 nicht mehr binden (Mangeat *et al.*, 2004). Eine Übertragung von HIV auf andere Spezies sowie von SIV aus Grünen Meerkatzen auf den Menschen ist somit nicht möglich (Mariani *et al.*, 2003). Vif besitzt bestimmte Domänen (siehe Abb. 1.13), welche eine Interaktion mit Elongin C und Cullin 5 vermitteln (Huthoff und Malim, 2007; Chiu und Greene, 2008a). Durch diese Interaktion wird der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cullin 5 und Rbx 1, rekrutiert, welcher zu einer Ubiquitinylierung von APOBEC3G führt (Conticello *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2003; Sheehy *et al.*, 2003; Stopak *et al.*, 2003). Als weitere, unabhängige Mechanismen werden die reine Bindungsfähigkeit von Vif an APOBEC3G sowie die Fähigkeit von Vif die Translation von APOBEC3G-mRNA zu inhibieren diskutiert (Stopak *et al.*, 2003; Chiu und Greene, 2008a).

1.2.4. Expression

APOBEC3G wird von vielen Zellen der hämatopoetischen Linie wie T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert und ist somit, ebenso wie antimikrobielle Peptide, proteolytische Kaskaden, Signalmoleküle wie Interferone und spezielle phagozytierende Zellen, Teil der angeborenen Immunantwort (Bieniasz, 2004; Harris und Liddament, 2004). Zusätzlich wird das Protein jedoch auch in vielen weiteren Geweben exprimiert (Koning *et al.*, 2009). In letzteren korreliert das APOBEC3G-mRNA-Niveau mit dem Gehalt an lymphoiden Zellen. APOBEC3G wird in der Zelle nur zytoplasmatisch exprimiert, vermutlich um eine Editierung des zellulären Genoms zu verhindern (Sawyer *et al.*, 2004). Hier ist die Lokalisation des Proteins außerdem sehr variabel (Chiu *et al.*, 2006), da es sowohl in niedrig- als auch in hochmolekularen Komplexen vorliegen kann (vgl. 1.2.5.). Abb. 1.14 stellt die relative Expression von APOBEC3G und anderen APOBEC3-Proteinen in verschiedenen Zelltypen und Geweben quantitativ dar.

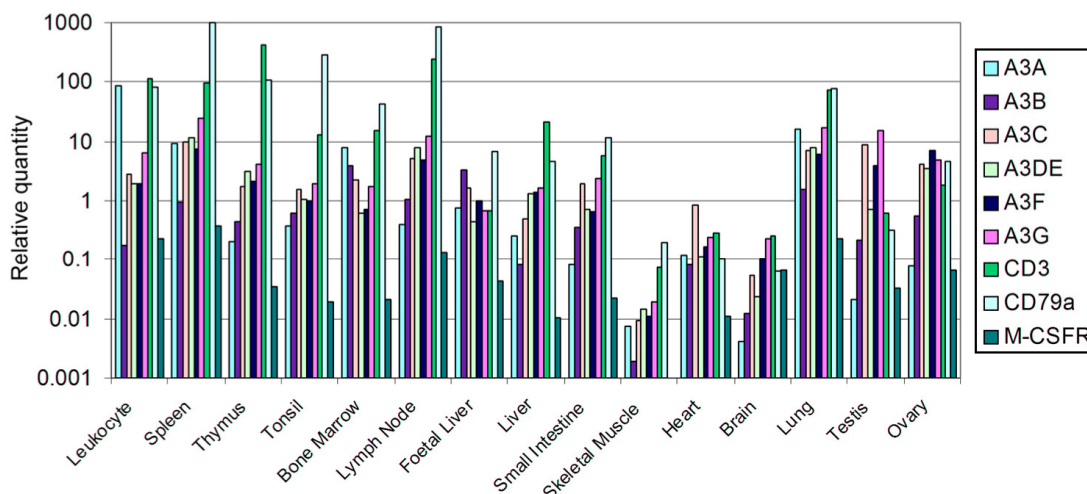


Abb. 1.14 | Expressionsmuster der APOBEC3-Proteine in menschlichen Zellen und Geweben (nach Koning *et al.*, 2009).

Die Regulation der basalen Expression von APOBEC3G erfolgt über eine 180 bp große Promoter-Region, an die die ubiquitären Transkriptionsaktivatoren „specifity protein“-1 (SP-1) und SP-3 binden (Muckenfuss *et al.*, 2007). MAP-Kinase-abhängige Signalkaskaden, die in die Expression von APOBEC3G involviert sind wurden von Rose *et al.* (2004) beschrieben. In der stromaufwärts des Start-Codons gelegenen untranslatierten Region des APOBEC3G-Gens befinden sich Bindestellen für mitogen-aktivierte Transkriptionsfaktoren, wie Ets-1, c-Myc und Elk-1, die durch Bindung von Phytohämagglutinin (PHA) und Phorbolmyristatacetat (PMA) eine erhöhte Transkription vermitteln (Stopak *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2004).

Von Stopak *et al.* (2003) wurde außerdem eine Erhöhung der Transkription von APOBEC3G in CD4-positiven Zellen nach Aktivierung beobachtet. Weitere Studien zeigten, dass eine Differenzierung von myeloiden Zellen zu Makrophagen die Expression von APOBEC3G beeinflusst und diese dann von Interferon- α stimuliert werden kann (Peng *et al.*, 2006). Die gleiche Fähigkeit zur Stimulation konnten Bonvin *et al.* (2006) und Chen *et al.* (2010) für Leber-Zellen und Chen *et al.* (2006b) für nicht-aktivierte CD4-positive T-Zellen beobachten. Koning *et al.* (2009) beschreiben eine Erhöhung des APOBEC3G-Protein-Niveaus durch Interferon- α in Makrophagen und DCs, nicht jedoch aber in T-Zellen. Überhaupt scheint der Einfluss von Interferonen in der Induktion von APOBEC3G eine bedeutende Rolle zu spielen, obwohl dies stark von dem jeweiligen Zelltyp und dem aktuellen Status der Zellen abhängig ist (Rose *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass spezifische Zytokine die Expression von APOBEC3G in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich beeinflussen können (Stopak *et al.*, 2007).

1.2.5. Oligomerisierung und Bindung an RNA

Dimerisierung und Oligomerisierung

Neben APOBEC3G neigen auch viele der sonst bekannten Desaminasen dazu, Oligomere – meistens Dimere oder Tetramere – zu bilden (Shandilya *et al.*, 2010). So formen beispielsweise die Cytosindesaminasen aus *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* Dimere (Carlow *et al.*, 1999) sowie die humanen Adenosindesaminasen ADAR1 und -2 („adenosine deaminase acting on RNA“) Homodimere (Valente and Nishikura, 2007).

Viele Studien haben gezeigt, dass APOBEC3G innerhalb des Cytoplasmas in verschiedenen Stadien vorliegen kann. Hierbei reicht die Spanne der nachgewiesenen Formen über Monomere bis hin zu Komplexen im Megadalton-Bereich, welche aus Homo-Multimeren aufgebaut sind (Jarmuz *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2006; Wedekind *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2008; Goila-Gaur und Strebel, 2008; Huthoff *et al.*, 2009). Da eine vollständige Strukturanalyse von APOBEC3G bisher noch nicht vorliegt (siehe 1.2.3.) wurden vergleichende Studien an APOBEC2-Tetrameren, welche einem APOBEC3G-Dimer ähneln (Chelico *et al.*, 2010), sowie der C-terminalen katalytischen Domäne von APOBEC3G durchgeführt (Prochnow *et al.*, 2009). Das APOBEC3G-Homo-Dimer scheint sich durch eine Interaktion von Aminosäuren der N-terminalen Domänen zu bilden (Malim, 2008; Huthoff *et al.*, 2009). Hierbei sind die Aminosäuren 124 bis 127 in Schleife 7 der Domäne essentiell (Lavens *et al.*, 2010). Interessanterweise sind die analogen Aminosäuren der C-terminalen Domäne für die Substratspezifität von APOBEC3G verantwortlich (Prochnow *et al.*, 2009). In dieser Form des Dimers wäre einzelsträngiger DNA der Zugang zur N-terminalen Domäne nicht mehr möglich, was erklären könnte, warum diese Domänen inaktiv sind. Es werden jedoch auch andere Modelle der Dimer-Bildung diskutiert, bei denen die C-terminale Domäne des Proteins eine Rolle spielt (Wedekind *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2008). Vermutlich trägt jede der beiden Domänen in einer bestimmten Art und Weise dazu bei, hochmolekulare Komplexe zu bilden. So zeigt eine neuere Studie von Shandilya *et al.* (2010), dass eine Vielzahl von Epitopen des APOBEC3G-Proteins Ansatzpunkte für eine Multimerisierung bieten könnten. Zusätzlich ist außerdem die vorliegende Konzentration an Salzen sowie die Anwesenheit von DNA oder RNA für die Oligomerisierung von Bedeutung (Chelico *et al.*, 2008, 2010).

Versuche mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) haben gezeigt, dass APOBEC3G in viralen Partikeln in Form von an RNA gebundenen Oligomeren vorliegt (Burnett und Spearman, 2007). Diese Multimerisierung scheint durch die Bindung von RNA stabilisiert zu werden und ist für die Verpackung in das HIV-1 und somit auch für die Vermittlung der antiviralen Aktivität essentiell (Friew *et al.*, 2009; Huthoff *et al.*, 2009). Da APOBEC3G in der Lage ist eine Vielzahl verschiedener RNA-Moleküle zu binden (Khan *et al.*, 2007), ist nicht bekannt, ob nur eine bestimmte oder verschiedene RNAs für die Oligomerisierung von zytoplasmatischem APOBEC3G verantwortlich sind.

Bindung an RNA

Die Fähigkeit von APOBEC3G an RNA zu binden spielt nicht nur eine zentrale Rolle für dessen Fähigkeit Multimere auszubilden, sondern ebenfalls für dessen zelluläre Lokalisation sowie der Regulation zelleigener als auch antiviraler Aktivität (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007; Huthoff *et al.*, 2009).

Huthoff *et al.* (2009) konnten zeigen, dass nur Mutationen der N-terminalen Desaminase-Domäne zu einer Reduzierung von RNA-abhängiger Oligomerisierung und einem damit verbundenen Verlust der Assoziation mit zellulären RNA-Spezies führen. Dies ist vermutlich auf eine positiv geladene Vertiefung auf der Oberfläche im Bereich der N-terminalen Domäne zurückzuführen, in die vor allem die Aminosäuren an Position 124 und 127, sowie an Position 24, 30 und 136 involviert sind. Die Autoren konnten durch chemische Verknüpfung der APOBEC3G-Proteine, einer Behandlung mit RNase und anschließender Analyse mit Hilfe von Western-Blots feststellen, dass APOBEC3G zellulär überwiegend als Homo-Dimer vorliegt, welches sich nur dann ausbildet, wenn RNA an diese Vertiefungen gebunden ist (Huthoff *et al.*, 2009).

Innerhalb des Zytoplasmas liegt APOBEC3G diffus verteilt, sowie angereichert in großen Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) vor, wobei letztere Form der Lokalisation ebenfalls RNA-abhängig ist (Chelico *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Bei diesen RNPs handelt es um hochmolekulare Mikrodomänen, die an der Regulation des zellulären RNA-Metabolismus beteiligt sind. Zu ihnen gehören die sog. „Staufen-containing RNA granules“, „Ro-RNPs“, „P-bodies“ und „stress granules“ (Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007; Chiu und Greene, 2009). Besonders in CD4-positiven T-Zellen ist die Fähigkeit von APOBEC3G, die Replikation von HIV-1 zu inhibieren, stark an dessen Lokalisation innerhalb solcher hochmolekularen Komplexe gekoppelt. So konnten mehrere Studien zeigen, dass nur APOBEC3G-Proteine in niedrig-molekularen Komplexen zu einer Restriktion Vif-defizienter HIV-Stämme befähigt sind, wohingegen die Restriktion von Retroelementen (vgl. 1.2.2.) in Form kurzer RNAs in hoch-molekularen Komplexen erfolgt (Chiu *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007).

Die Form der durch APOBEC3G gebundenen RNA entscheidet also folglich über die Aktivität des Proteins, wobei im Falle von HIV-1 der Einbau in virale Partikel entscheidend ist (Huthoff *et al.*, 2009). Dies trifft auch für die gesamte APOBEC3-Unterfamilie und deren Inhibition von Retroelementen und Retroviren zu (Bishop *et al.*, 2004a; Liddament *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Iwatani *et al.*, 2006; Huthoff *et al.*, 2009).

Die Rolle von RNA bei der Bildung von Dimeren und der damit einhergehenden zellulären Lokalisation ist somit insbesondere für die Regulation der Desaminase-unabhängigen

antiviralen Aktivität der APOBEC3G-Proteine von zentraler Bedeutung (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007; Huthoff *et al.*, 2009). Welche RNAs genau an den beschriebenen Mechanismen beteiligt sind wird weiterhin kontrovers diskutiert (Prochnow *et al.*, 2009).

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die antiviralen Eigenschaften von APOBEC3G in Bezug auf ein negativ-strängiges RNA Virus wie MV zu untersuchen. Hierbei steht die Fähigkeit von APOBEC3G RNA zu binden ebenso im Vordergrund, wie dessen Fähigkeit zur Desaminierung. Obwohl es sich bei APOBEC3G um ein Enzym handelt, welches vornehmlich einzelsträngige DNA desaminiert, kann eine Fähigkeit zur Desaminierung von RNA nicht ausgeschlossen werden (Bishop *et al.*, 2004b). Ein RNA-editierendes Enzym ist mit APOBEC1 in der Familie der APOBEC-Enzyme ebenfalls vorhanden (Blanc und Davidson, 2010).

Das MV dient in dieser Arbeit als Modellorganismus für negativ-strängige RNA-Viren. In parallelen Arbeiten unserer Gruppe wird zudem der Einfluss von APOBEC3G auf die Replikation anderer negativ-strängiger RNA-Viren, wie das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) oder das Mumpsvirus (MuV), untersucht. Da APOBEC-Proteine bereits ein breites Spektrum von Retroviren und Retrotransposons inhibieren (Prochnow *et al.*, 2009), ist es für unsere Gruppe von Interesse, weitere potentielle Gruppen pathogener Faktoren zu identifizieren, die einer Inhibition durch APOBEC3-Proteine unterliegen. Im Vordergrund dieser Arbeit stehen auch die daran beteiligten molekularen Mechanismen, welche zur Aufklärung der antiviralen Funktion von APOBEC-Proteinen beitragen.

2. Material

2.1. Geräte

Tab. 2.1 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte, deren Bezeichnung und deren Hersteller auf.

Tab. 2.1 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bakterienschüttler	Certomat® H	B Braun (Melsungen)
Blottingapparatur	n/a	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
Brutschrank (Bakterien)	B 60 30	Heraeus (Hanau)
Brutschrank (Zellkultur)	n/a	Heraeus (Hanau)
Drehschüttler	n/a	A. Hartenstein (Würzburg)
Durchflusszytometer	FACScan Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Eismaschine	AF30	Scotsman (Italien)
ELISA Reader	BEP®2000	Siemens (München)
Feinwaage	L 610 D	Sartorius (Göttingen)
Filmkammer	DIN 6832	Dr. Goos-Suprema (Heidelberg)
Floreszenzmikroskope	DM IRE220	Leica (Solms)
Fluoreszenzreader	Safire 2	Tecan (Crailsheim)
Gefrierschrank (-20 °C)	Sikafrost Comfort	Siemens (München)
Gelkammer (Acrylamid-Gele)	n/a	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
Gelkammer (Agarose-Gele)	n/a	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
Homogenisator	n/a	A. Hartenstein (Würzburg)
Kühlschrank (4 °C)	Sikafrost Comfort	Siemens (München)
Laborwaage	EW 3000-2M	Kern (Balingen)
Lichtmikroskop	090-135-002	Leica (Solms)
Magnetheizrührer	Ikamag RCT	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikropipetten	Reference®	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowellengerät	n/a	Panasonic (Hamburg)
Multipipette	Discovery +	Abimed (Langenfeld)
pH Meter	FiveEasy	Mettler-Toledo (Giessen)
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	Accu Jet® Pro	Brand (Wertheim)
Real Time Thermocycler	ABI7500	Applied Biosystems (USA)

Tab. 2.1 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte (Fortsetzung).

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Real Time Thermocycler	LightCycler 2.0 real-time PCR System	Roche (Schweiz)
Sequenzierapparatur	ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Advanced Biolab Service (München)
Spannungsgerät für Gele	E455	Consort (Belgien)
Spannungsquelle	EV243	Peqlab (Erlangen)
Standzentrifuge	Rotana 460R	Hettich (Tuttlingen)
Sterilwerkbank	BSB 4A	Gelaire (Australien)
Thermoblock	n/a	Liebisch (Bielefeld)
Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	Eppendorf Gradient Cycler	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühltruhe (-80 °C)	n/a	Revco (USA)
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge	Sorvall® Discovery™ 90SE	Hitachi (USA)
UV-Transilluminator	Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)
Vibromischer	Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS (Japan)
Wasserbad	n/a	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Wippschüttler	WS 5	Edmund Bühler (Tübingen)
Zählkammer nach Thoma	n/a	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen)

2.2. Software

2.2.1. Software für die Durchflusszytometrie

Für die Auswertung der am Durchflusszytometer ermittelten Daten wurde „FlowJo Version 7.6“ der Firma Tree Star (USA) verwendet.

2.2.2. Software für die Quantifizierung von Western-Blots

Für die Quantifizierung detektierter Proteinmengen eines Western-Blots wurde „GeneTools Version 3.07“ der Firma SynGene (Vereinigtes Königreich) verwendet.

2.2.3. Software für die Auswertung und Darstellung ermittelter Daten

Für die Auswertung und Darstellung ermittelter Daten wurde „Prism® Version 5.00“ der Firma GraphPad (USA) oder „Excel Version 2007“ der Firma Microsoft (USA) verwendet.

2.2.4. Software für das Arbeiten mit Sequenzinformationen

Für die Arbeit mit RNA-, DNA- oder Protein-Sequenzen wurde die Software „Lasergene Version 7.0“ der Firma DNASTAR (USA) verwendet.

2.2.5. Software für die Bearbeitung von Bildinformationen

Für die Bearbeitung von Bildinformationen wurde „Photoshop Version 8.0.1“ der Firma Adobe (USA) verwendet.

2.2.6. Software für die Quantifizierung von Fluoreszenz

Für die Auswertung und Darstellung ermittelter Fluoreszenzintensitäten wurde „XFLUOR4 Version 4.51“ der Firma Tecan (Crailsheim) sowie „Excel Version 2007“ der Firma Microsoft (USA) verwendet.

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2 listet alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller auf.

Tab. 2.2 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
6 cm Schalen	Nunc (Langensfeld)
6 Well Platten	Greiner (Frickhausen)
96 Well Platten für ELISA	Nunc (Langensfeld)
Amicon Ultra Filter	Millipore (Frankreich)
Bakterienplatten	Sarstedt (Nümbrecht)
Chamberslides	Nunc (Langensfeld)
Deckgläschen	A. Hartenstein (Würzburg)
Einfrierröhrchen	Greiner (Frickhausen)
Einmalpipetten	Greiner (Frickhausen)
Einmalspitzen	Roth (Karlsruhe)
Einmalspitzen	A. Hartenstein (Würzburg)
FACS Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filterspitzen	Sorenson (USA)

Tab. 2.2 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung).

Bezeichnung	Hersteller
Glas Pipetten	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
Küvetten	Brand (Wertheim)
Nitrocellulose	Whatman (USA)
PCR Tubes groß	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR Tubes klein	A. Hartenstein (Würzburg)
PP Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2,0 mL	Eppendorf (Hamburg)
PP Röhrchen 15 mL und 50 mL	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilm	Fuji (Japan)
Spritzen	A. Hartenstein (Würzburg)
Sterilfilter PES-Membran 0,22 µm und 0,4 µm	Millipore (Frankreich)
UZ Röhrchen	Kontron (München)
UZ Röhrchen	Seton (USA)
Whatman Papier	Whatman (USA)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber	A. Hartenstein (Würzburg)

2.4. Chemikalien

Tab. 2.3 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller auf.

Tab. 2.3 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	AppliChem (Darmstadt)
Agar für Plaquetest	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
Agar für Platten	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	AppliChem (Darmstadt)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Antibiotikum Mix	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
BCA Lösung	Sigma-Aldrich (USA)
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
BSA	AppliChem (Darmstadt)
CFSE	Becton Dickinson (Heidelberg)
DAPI	Invitrogen (USA)
dH ₂ O	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Entwickler	Kodak (USA)
Ethanol	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (USA)

Tab. 2.3 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien (Fortsetzung).

Bezeichnung	Hersteller
Fixierer	Kodak (USA)
Fluoromount G	Southern Biotech (USA)
Glycerin	AppliChem (Darmstadt)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
H2O für HPLC	AppliChem (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
Kupfersulfatlösung	Sigma-Aldrich (USA)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Natriumazid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Neutralrot	Merck (Darmstadt)
NP40	Sigma-Aldrich (USA)
OPD Tabletten	Dako (USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PEI	Polyscience (USA)
Puromycin	AppliChem (Darmstadt)
QuantiTect™ SYBR® Green	Qiagen (Hilden)
Saccharose	AppliChem (Darmstadt)
Salzsäure	AppliChem (Darmstadt)
SDS	AppliChem (Darmstadt)
TEMED	Fluka (Schweiz)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich (USA)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (USA)

2.5. Lösungen und Puffer

2.5.1. Lösungen für molekularbiologische Methoden

DNA Ladepuffer

Bromphenol Blau	0,03 % (v/v)
Glycerol	60 % (v/v)
Na ₂ EDTA	60 mM
Tris-HCl	10 mM
Xylencyanol	0,03 % (v/v)

in dH₂O gelöst; pH 7,6

TRIS-Acetat-EDTA-Puffer

EDTA-Na ₂ -Salz	1 mM
Essigsäure	40 mM
TRIS	40 mM

in dH₂O gelöst

2.5.2. Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Anodenpuffer I

Methanol	20 % (v/v)
TRIS-HCl	300 mM

in dH₂O gelöst; pH 10,4

Anodenpuffer II

Methanol	20 % (v/v)
TRIS-HCl	25 mM

in dH₂O gelöst; pH 7,4

Kathodenpuffer

Aminocapronsäure	40 mM
Methanol	20 % (v/v)
TRIS-HCl	25 mM

in dH₂O gelöst; pH 9,4

NP40 Lysispuffer

NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Protease-Inhibitor (Roche)	1 Tablette/50 mL
TRIS	50 mM

in dH₂O gelöst; pH 8,0

Protein Ladepuffer

β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,004 % (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)
SDS	3,19 mM
TRIS-HCl	25 mM

in dH₂O gelöst; pH 6,8

Protein Laufpuffer

Glycin	1,44 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
TRIS	0,303 % (w/v)

in dH₂O gelöst

„Stripping“ Puffer

Glycin 100 mM

in dH₂O gelöst; pH 2,9

2.5.3. Lösungen für immunologische Methoden**Beschichtungspuffer für ELISA**

Na₂CO₃ 50 mM

NaN₃ 0,02 % (w/v)

Phenolrot 10 µl

in dH₂O gelöst; pH 9,5

FACS-Puffer

BSA 0,4 % (w/v)

Natriumazid 0,02 % (w/v)

in PBS gelöst

RNA Bindungspuffer

β-Mercaptoethanol 7 mM

Glycerol 5 % (v/v)

HEPES 20 mM

KCl 25 mM

NP-40 0,1 % (v/v)

in dH₂O gelöst

Serumdiluent

BSA	1 % (w/v)
NaCl	350 mM
TRIS	50 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

in dH₂O gelöst

Substratpuffer für ELISA

H ₂ O ₂ (30 %)	1,25 µL pro 3 mL dH ₂ O
OPD-Tabletten	1 pro 3 mL dH ₂ O

in dH₂O gelöst

Waschpuffer für ELISA

NaCl	350 mM
TRIS	50 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

in dH₂O gelöst

2.5.4. Lösungen für virologische Methoden**NTE Puffer**

EDTA	1 mM
NaCl	100 mM
TRIS-HCl	10 mM

In dH₂O gelöst; pH 7,4

2.5.5. Lösungen für zellbiologische Methoden

ATV

D-Glukose	5 mM
NaCl	137 mM
Na ₄ EDTA	200 mg/L
NaHCO ₃	70 mM
KCl	5,4 mM
Trypsin	500 mg/L

in dH₂O gelöst

PBS

CaCl ₂	1,5 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
MgCl ₂	1 mM
NaCl	137 mM
NaHPO ₄ · 7 H ₂ O	4,3 mM

in dH₂O gelöst

2.6. Medien und Seren

Doppel-MEM

zweifach konzentriertes MEM

FCS

Fötales Kälberserum wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, vor Gebrauch einmalig bei 56 °C für 30 Minuten inaktiviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

LB_{Ampicillin}-Agar

Agar	1,5 % (w/v)
Ampicillin	100 µg/mL
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g

mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt; autoklaviert; Zugabe von Ampicillin erst bei Agar < 40 °C

LB-Medium

Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g

mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt; autoklaviert

MEM

„Minimum essential medium“ wurde in der Medienküche des Instituts für Virologie nach Eagle und Levin hergestellt (Eagle und Levine, 1967). Pro 500 mL wurden vor Benutzung 15 mL 5,6 % (w/v) NaHCO₃-Lösung und eine bestimmte Menge FCS hinzugegeben. Verwendet wurden 5 % (Vero-Zellen) beziehungsweise 10 % FCS (293T- und BHK-Zellen).

2.7. Kits

Tab. 2.4 listet alle in dieser Arbeit für bestimmte Methoden verwendete Kits und deren Hersteller auf.

Tab. 2.4 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits.

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Detektion Peroxidase-markierter Antikörper	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific (USA)
Erststrang cDNA Synthese	RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
Gelelution von DNA	QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
gerichtete Mutagenese von Plasmiden	QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (USA)
Immunpräzipitation von HA-markierten Proteinen	ProFound™ Mammalian HA Tag IP/Co-IP Kit	Thermo Scientific (USA)

Tab. 2.4 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits (Fortsetzung).

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Maxipräparation von Plasmiden	Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Minipräparation von Plasmiden	QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
One Step Real Time RT-PCR	Quantifast Probe PCR +ROX Vial Kit	Qiagen (Hilden)
RNA Präparation	GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich (USA)
Sequenzierung von DNA	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies (USA)

Alle in Tab. 2.4 aufgeführten Kits wurden, falls nicht anders erwähnt, nach Angabe des Herstellers verwendet.

2.8. Oligonukleotide und -peptide

2.8.1. DNA-Standard für Agarose-Gele

Für alle in dieser Arbeit erstellten Agarose-Gele wurde die „GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“ bzw. „GeneRuler™ 100bp DNA Ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Abb. 2.1 zeigt die in diesen Standards vorhandenen DNA-Fragmente.

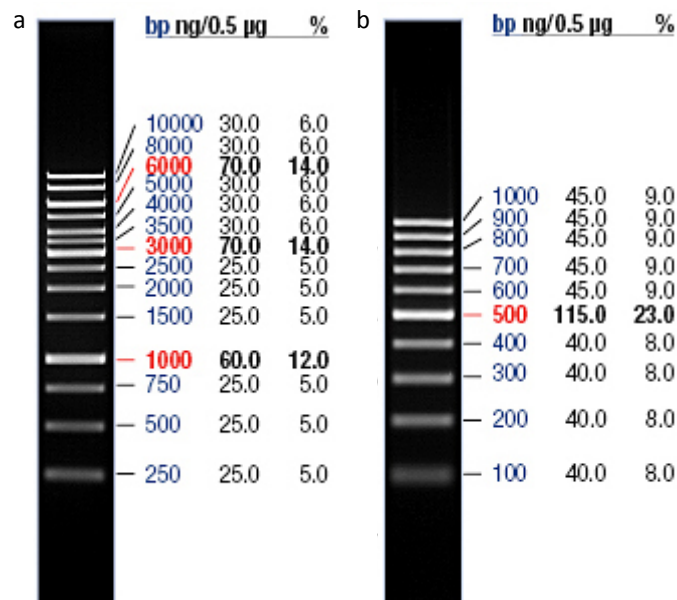


Abb. 2.1 | In dieser Arbeit verwendete DNA-Standards. (a) GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. (b) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.

2.8.2. dNTPs für PCR und reverse Transkription von RNA

Die in dieser Arbeit verwendeten dNTPs (10 mM pro Nukleosid) wurden aus 100 mM dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP Nukleosiden der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durch 1:10 Verdünnung in dH₂O hergestellt.

2.8.3. FIP

Zur Inhibition der Zell-Zell-Fusion nach Infektion von Zellkulturen mit MV wurde das Peptid „Z-D-Phe-Phe-Gly-OH“ (FIP) der Firma Bachem (Schweiz) verwendet. „Z“ steht in dieser Sequenz für die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe die zum Schutz für Aminogruppen eingesetzt wird.

2.8.4. Oligonukleotide für reverse Transkription von RNA

Oligo(dT)₁₈ Primer

Für die spezifische reverse Transkription von mRNA wurden Oligo(dT)₁₈ Primer der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Random Hexamere

Für die unspezifische reverse Transkription von RNA wurden Random Hexamer Primer der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

2.8.5. Primer

Tab. 2.5 listet alle die in dieser Arbeit für Mutagenese von Plasmiden, Klonierungen, PCR und spezifische reverse Transkription von RNA verwendeten Primer auf.

Tab. 2.5 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer. Alle Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. F, Forward Primer; R, Reverse Primer; EGFP-Primer (DEREG2F und -R) wurden freundlicherweise von Dajana Reuter (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz
A3G-AS	GCAGGACCCAGGTGTCATTG
A3GC100SF	GCCCCTGCACAAAGTCTACAAGGGATATGGC

Tab. 2.5 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer (Fortsetzung). Alle Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. F, Forward Primer; R, Reverse Primer; EGFP-Primer (DEREG2F und -R) wurden freundlicherweise von Dajana Reuter (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz
A3GC100SR	GCCATATCCCTTGTAGACTTTGTGCAGGGGC
A3GC97SF	ATATCCTGGAGCCCCTCCACAAAGGTACAAGG
A3GC97SR	CCTTGTACACTTTGTGGAGGGGCTCCAGGATAT
A3GE259QF	TGAAGGCCGCCATGCACAGCTGTGCTTC
A3GE259QR	GAAGCACAGCTGTGCATGGCGGCCTTCA
A3GE67QF	CGAACTTAAGTACCACCCACAGATGAGATTCTTCCA
A3GE67QR	TGGAAGAATCTCATCTGTGGGTGGTACTTAAGTTCG
A3GeYFPXhoIR	CCTACTCGAGTCAGTTTTCTGATTCTGGAGAATGG
A3GF70AF	GTACCACCCAGAGATGAGAGCCTTCCACTGGTTCAGCAAG
A3GF70AR	CTTGCTGAACCAAGTGGAAAGCTCTCATCTCTGGGTGGTAC
A3GFlagR	CCTAGAATTCTCACTTGTCTGCTGCTCCTTGTAGTCGTTTTCTGATTCTGGAGAATGG
A3GH257RF	CTTGAAGGCCGCCGTGCAGAGCTGTGC
A3GH257RR	GCACAGCTCTGCACGGCGGCCTTCAAG
A3GH65RF	TATTCCGAACCTAAGTACCGCCAGAGATGAGATTCTTC
A3GH65RR	GAAGAATCTCATCTCTGGGCGGTACTTAAGTTCGGAATA
A3GHA2F	CACCGAATTCATGAAGCCTCACTTCAGAAACACAGTGG
A3GHA2R	CCTAGAATTCTCAGGCATAGTCTGGGACGTATATGGATAGTTTTCTGATTCTGGAGAATGG
A3GHAF	CACCGAATTCATGTATCCATATGACGTCCAGACTATGCCAAGCCTCACTTCAGAAACACAGTGG
A3GHAR	CCTAGAATTCTCAGTTTTCTGATTCTGGAGAATGG
A3GK40AF	TGGCTGTGCTACGAAGTGGCAACAAGGGTCCCTCAAG
A3GK40AR	CTTGAGGGACCCCTTGTGCCACTTCGTAGCACAGCCA
A3Gmyc	CCTAGAATTCTCACAGATCTTCTCAGAAATAAGTTTTGTTTCGTTTTCTGATTCTGGAGAATGG
A3GNSeqF	GATCTTTCGAGGCCAGGTGTATTC
A3GNSeqF2	TTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTC
A3GR122AF	TGACCATCTTTGTTGCCCCCTCTACTACTTCTGGG
A3GR122AR	CCCAGAAGTAGTAGAGGGCGGCAACAAAGATGGTCA
A3G-S	GGTCAGAGGACGGCATGAGA
A3GW127AF	CCGCCTCTACTACTTCGCGGACCCAGATTACCAG
A3GW127AR	CTGGTAATCTGGGTCCGCGAAGTAGTAGAGGCGG
A3GW94LF	TCACCTGGTACATATCCTTGAGCCCTGCACA
A3GW94LR	TGTGCAGGGGCTCAAGGATATGTACCAGGTGA
A3GY124AF	CTTTGTGCCCCCTCGCCTACTTCTGGGACCCA
A3GY124AR	TGGGTCCCAGAAGTAGGCGAGGCGGGCAACAAAG
A3GY91AF	GTATGAGGTCACCTGGCCATATCCTGGAGCCCC
A3GY91AR	GGGGCTCCAGGATATGGCCAGGTGACCTCATACT
DEREG2F	GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
DEREG2R	GGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGG
eYFPEcoF	CACCGAATTCATGGCCAGATCTGTGAGCAAGGGC
eYFPEcoR	CCTAGAATTCTATCCGGATCCGGTCTTGACAGC
hA3GHAcoRIR	CCTAGAATTCTCACTGAGCAGCGTAATCTGG
hY1F	GGCTGGTCCGAAGGTAGTGA
hY1R	AAAGACTAGTCAAGTGCAGTAGTGAG
MEA1F	TGGCATCTGAACCTCGGTATCAC

Tab. 2.5 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer (Fortsetzung). Alle Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. F, Forward Primer; R, Reverse Primer; EGFP-Primer (DEREG2F und -R) wurden freundlicherweise von Dajana Reuter (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz
MEA2R	TGTCCTCAGTAGTATGCATTGCAA
MFAP03G385F	GGCTCCACATAAACACGGTTTC
MFAP03G385R	CCCACTCAGGTCTTGGCTGTGC
MFAP03G515F	GGATCCACCCACATTCACCTTCAA
MFAP03G515R	GGCTGTGCTCATCTAGTCCATCC
MVFF	GCCTCCGGGGTCCACTAA
MV-F F	TGCACTTCACCACTCC
MV-F R	AGCTTCTGGCCGATTA
MVFR	ATCCCTATCAACCCTCCAAGACAC
MVHF	GCTGACTATCCCGCAATGAAG
MVHR	AGATTCTGAGTCCGCAAGCACAC
MV-L F	GTGTGAAAGCGACGAG
MV-L R	TGTTCCACGAAGATCCT
MVLF	GCATAGGTTGAGGGATCGTAGCAC
MVLR	CTGGCCAAGTAGATAGTGAATAA
MV-L-trailer F	GAGAAACAGATTATTATGACGGG
MV-L-trailer R	CAAAGCTGGGAATAGAAACT
MV-M-clonF2	ATACAACCCACCACCTACAG
MV-M-clonR2	ATGCGGTTGGTGGTTGGATCGG
MVMF	GACCTTATGTTACCCGCTGATGGA
MVMF1	TTCCACAATGACAGAGATCTACG
MVMR	TCGTTGTGGAGTTCTTGTGTTGA
MVMR1	TTGTGGAGTTCTTGTGTTGAGG
MV-M-seq	TTCCGTGTTGTTTATATGAGC
MVMseq2	AGAAGACCTTATGTTACCCGC
MV-N F	CCCTCTGCTCTGGAGCTATG
MV-N R	GCCAATGTGGAAGTACCTT
MV-NclonF1	AAGGCTGTTAGAGGTTGTCC
MV-NclonF2	AGGCGGACCAATACTTTTAC
MV-NclonR1	ATAACAATGATGGAGGGTAGG
MV-NclonR2	TAGGCGGATGTTGTTCTGGTC
MVNF	CCACACTGAGTCCCTGATGAACC
MVNR	TGGGCAGCTCTCGCATCACT
MV-N-seq	TCCTTGATGAACCTTTACCAG
pcMS28R	GACCTTGCAATCCTTTGGCGAGAG
pcMSADF2	CCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAG
pcMSeYFPR	TGATATAGACGTTGTGGCTGTTGT
SLAM2156AF	CCATTACCAGACAACAGTGAAAAAAGCCTTACGATCTA
SLAM2156AR	TAGATCGTAAGGCTTTTTTTTCCACTGTTGTCTGGTAATGG
SLAMEcoF	CACCGAATTCATGGATCCCAAGGGGCTCCTCTCC
SLAMEcoR	CCTAGAATTCTCAGCTCTCTGGAAGTGCACACTAGC
SLAMF	CAAAGTGCTGCTGCCCTGACAT
SLAMR	ACCTGTTTCTGGACTTGGGCATAG

2.8.6. Proteinstandard für Acrylamid-Gele

Als Proteinstandard für Acrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen wurde die „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Abb. 2.2 zeigt die bei Verwendung dieses Markers entstehenden Banden in Acrylamid-Gelen sowie nach dem anschließenden Western-Blot.

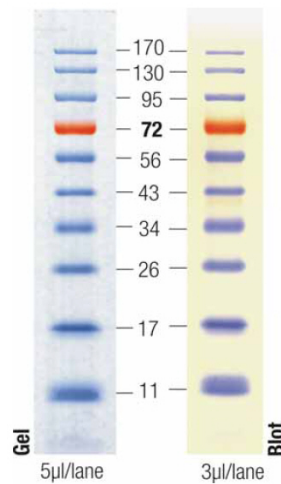


Abb. 2.2 | In dieser Arbeit verwendeter Proteinstandard. Entstehende Banden im Acrylamidgel und anschließenden Western-Blot bei Verwendung der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas.

2.8.7. Sonde für die Detektion von MV-N-RNA und -cDNA

Für die Detektion von MV-N-RNA und -cDNA in Real Time PCRs nach „one-step RT-PCRs“ mit Überständen und präparierter RNA aus MV-infizierten Zellkulturen wurde die MV-N spezifische, markierte Sonde „MEA-TM1“ mit der Sequenz 5'-6-FAM™-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTTCAGA-BBQ-3' verwendet, wobei der Farbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM™) für die Quantifikation der vorhandenen DNA-Menge bei einer Anregung mit 492 nm Licht der Wellenlänge 517 nm emittiert. Der Farbstoff BBQ wird als Quencher für eine Wellenlänge von 550 bis 650 nm eingesetzt.

2.9. Plasmide

Tab. 2.6 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Herkunft auf.

Tab. 2.6 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide und deren Herkunft.

Name	Herkunft
hA3GHA	freundlicherweise von Dr. Hendrik Huthoff (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
p(-)MVDIEGFP	freundlicherweise von Dr. Linda Rennick (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
pCG ^{DUB} FLAG	freundlicherweise von Emma Millar (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
pcMS28	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
pcMFA3GFLAG	kloniert aus <i>Pfu</i> -PCR mit pRH024 (EcoRI-Fragment) und pcMS28 (Vektor)
pcMFA3GMyc	kloniert aus <i>Pfu</i> -PCR mit pRH024 (EcoRI-Fragment) und pcMS28 (Vektor)
pcMFeYFP	kloniert aus <i>Pfu</i> -PCR mit pcz-CFG-feYFP (EcoRI-Fragment) und pcMS28 (Vektor)
pcMFHAA3G	kloniert aus <i>Pfu</i> -PCR mit pRH024 (EcoRI-Fragment) und pcMS28 (Vektor)
pcMFSLAM	kloniert aus <i>Pfu</i> -PCR mit pSLAM-EGFP (EcoRI-Fragment) und pcMS28 (Vektor)
pczCFG2feYFP	freundlicherweise von Dr. Axel Rethwilm (Würzburg) zur Verfügung gestellt
pczVSV-G	freundlicherweise von Dr. Axel Rethwilm (Würzburg) zur Verfügung gestellt
pEMC-La	freundlicherweise von Dr. Martin Billeter (Schweiz) zur Verfügung gestellt
pEMC-N	freundlicherweise von Dr. Martin Billeter (Schweiz) zur Verfügung gestellt
pEMC-Pa	freundlicherweise von Dr. Martin Billeter (Schweiz) zur Verfügung gestellt
pGEM [®] -T Easy	Promega (Mannheim)
pGJ3EGFP	freundlicherweise von Boris Nowotny (Würzburg) zur Verfügung gestellt
pHit60	freundlicherweise von Dr. Axel Rethwilm (Würzburg) zur Verfügung gestellt
piRESvif	freundlicherweise von Boris Nowotny (Würzburg) zur Verfügung gestellt
pRH024	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
pSLAM-EGFP	freundlicherweise von Dr. Duncan Howie (USA) zur Verfügung gestellt

2.10. Antikörper und Antiseren

Tab. 2.7 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antiseren sowie deren Herkunft auf.

Tab. 2.7 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper und Antiseren sowie deren Herkunft.

Name	Herkunft
anti-A3G (polyklonales Kanninchenserum)	Dr. Michael Malim (Vereinigtes Königreich)
anti-Calnexin (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon AF18)	Acris (Herford)
anti-DCP1A (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon 2G10)	Abnova (Taiwan)
anti-FLAG (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon M2)	Sigma-Aldrich (USA)

Tab. 2.7 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper und Antiseren sowie deren Herkunft (Fortsetzung).

Name	Herkunft
anti-GAPDH (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon 1D4)	Acris (Herford)
anti-HA (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon 2C16)	MBL International (USA)
anti-hSLAM (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon 5C6)	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
anti-Kanninchen Alexa 488 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)
anti-Kanninchen Alexa 594 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)
anti-Maus Alexa 488 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)
anti-Maus Alexa 594 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)
anti-Maus HRP (Ziege IgG (H+L))	Dianova (Hamburg)
anti-MV (polyklonales Kanninchen Serum)	Arbeitsgruppe Dr. Jürgen Schneider-Schaulies (Würzburg)
anti-MV-F (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon A504)	Arbeitsgruppe Dr. Jürgen Schneider-Schaulies (Würzburg)
anti-MV-H (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon L77)	Arbeitsgruppe Dr. Jürgen Schneider-Schaulies (Würzburg)
anti-MV-M (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon CV8/CV9)	Chemicon (USA)
anti-MV-N (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon F227)	Arbeitsgruppe Dr. Jürgen Schneider-Schaulies (Würzburg)
anti-MV-P (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon P3)	Arbeitsgruppe Dr. Jürgen Schneider-Schaulies (Würzburg)
anti-Myc (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon 9E10)	Santa Cruz (USA)
anti-Kanninchen HRP (Ziege IgG (H+L))	Dianova (Hamburg)
anti-VSV-G (monoklonales Maus IgG ₁ , Klon IN2)	Dr. Elita Avota (Würzburg)

2.11. Enzyme

Tab. 2.8 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, deren Bezeichnung und Hersteller auf.

Tab. 2.8 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Name	Bezeichnung	Hersteller
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (#EF0341)	Fermentas (St. Leon-Rot)
M-MLV RT	M-MLV Reverse Transcriptase (#M170A)	Promega (USA)
<i>Pfu</i> -Polymerase	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (recombinant) (#EP0501)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Protease-Inhibitor	Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (#11 697 498 001)	Roche (Schweiz)
Restriktionsenzyme	diverse	Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (USA)
RNase-Inhibitor	RNasin® Ribonuclease Inhibitor (#N211A)	Promega (USA)
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase (#EL0011)	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant) (#EP0402)	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.12. Viren

Tab. 2.9 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Viren und deren Herkunft auf.

Tab. 2.9 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Viren und deren Herkunft.

Name	Herkunft
MVA-T7	freundlicherweise von Dr. Gerd Sutter (Neuherberg) zur Verfügung gestellt
rMV ^{Edtag} EGFPCAMH	freundlicherweise von Dr. Paul Duprex (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
rMV ^{Edtag} LMMEGFPM	freundlicherweise von Dr. Paul Duprex (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
rMV ^{IC323} EGFP	freundlicherweise von Dr. Yusuke Yanagi (Japan) zur Verfügung gestellt

2.13. Bakterien

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen zur Amplifikation von Plasmiden wurden ultrakompetente XL10-Gold® Bakterien (basierend auf *Escherichia coli*) der Firma Stratagene (USA) verwendet. Diese wurden als Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.14. Zellen

Tab. 2.10 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Herkunft auf.

Tab. 2.10 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien und deren Herkunft.

Name	Herkunft
023	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
024-1	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
024-2	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
024-3	freundlicherweise von Dr. Rebecca Holmes (Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt
293T	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
BHK	freundlicherweise von Dr. Christine Kreml (Würzburg) zur Verfügung gestellt
Vero	Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg)
VeroHSLAM	freundlicherweise von Dr. Yusuke Yanagi (Japan) zur Verfügung gestellt

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 %igen oder 1,2 %igen TAE-Agarosegelen (w/v) für eine Stunde bei 80 bis 110 mV. Vor der Aushärtung in Agarose-Gelkammern wurden die Gele mit 0,008 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt. Alle Gele wurden unter UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) mithilfe eines UV-Transilluminators digital erfasst.

3.1.2. Gelextraktion von DNA

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellervorgaben. Zur Elution der an die Säule gebundenen DNA wurden 50 μL des mitgelieferten Elutionspuffers verwendet.

3.1.3. Gerichtete Mutagenese

Zur gerichteten Mutagenese von Plasmiden wurde das „QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (USA) nach Vorgabe des Herstellers verwendet. Die für die Mutagenese verwendeten Primer wurden mit Hilfe des „QuikChange® Primer Design“ Programms der gleichen Firma erstellt und über Sigma-Aldrich (USA) geordert.

3.1.4. Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte durch das „GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit“ der Firma Sigma-Aldrich (USA) entsprechend den Vorgaben des

Herstellers. Die an die Säule gebundene RNA wurde stets mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

3.1.5. Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob transformierte Bakterienkolonien ein bestimmtes, zuvor durch Ligati-on erstelltes Plasmid enthielten, wurde eine so genannte Kolonie-PCR durchgeführt.

Hierzu wurden nach Übernacht-Inkubation entstandene, Ampicillin-resistenten Bakte-riekolonien mit einer Einmalspitze (10 bis 100 µl Volumen) in 20 µl dH₂O resuspendiert und 2 µl dieser Suspension in einer PCR (3.1.11.) mit spezifischen Primern eingesetzt. Als Binde-stelle der Primer wurde stets ein Bereich im verwendeten Vektor sowie ein Bereich im ligier-ten Insert bestimmt. Bakteriensuspensionen mit Plasmiden, welche in der so durchgeführten PCR deutliche Fragmente mit der erwarteten Größe lieferten, wurden durch Minipräparation (3.1.10.) amplifiziert und zur weiteren Analyse für Sequenzierungen (3.1.15.) eingesetzt.

3.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäurelösungen zu bestimmen, wurden 3 µL der Lösung in 70 µL dH₂O verdünnt, gemischt und in eine Kunststoffküvette der Firma Brand (Wertheim) überführt.

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte in einem „BioPhotome-ter 6131“ der Firma Eppendorf (Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzent-ration der Lösungen in µg/µL ergibt sich hierbei durch die OD₂₆₀ multipliziert mit dem Ver-dünnungsfaktor sowie einem Multiplikationsfaktor von 50 für doppelsträngige DNA bzw. 40 für RNA.

3.1.7. Lagerung von Nukleinsäuren

Eluierte PCR-Produkte, cDNA, Plasmide, Primer und andere DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert. RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.1.8. Ligation

Zur Erstellung neuer Plasmide durch Ligationen wurde der Zielvektor zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert (3.1.14.) und anschließend eluiert (3.1.2.). Um eine spätere Religation des Vektors zu verhindern, wurden die Enden des eluierten Plasmids für eine Stunde bei 37 °C mit CIAP nach Angabe des Herstellers dephosphoryliert und der Vektor erneut über eine Agarose-Gelelektrophorese (3.1.1) aufgereinigt und eluiert.

Um die aus *Pfu*-PCRs entstandenen DNA-Fragmente für Ligationen einzusetzen, wurden diese ebenfalls aus Agarosegelen eluiert, mit den passenden Enzymen restringiert und nach einer erneuten Agarose-Gelelektrophorese erneut eluiert.

Für die Ligation wurden schließlich stets 10 µl des eluierten DNA-Fragmentes (Insert), 2 µl des Zielvektors, 1,5 µl des T4 Ligase Puffers (Aliquots) und 1,5 µl der T4 DNA Ligase (Fermentas) für 4 Stunden bei 22 °C im Thermocycler inkubiert. Direkt im Anschluss wurde der komplette Ansatz für eine Transformation verwendet (3.5.9.).

3.1.9. Maxipräparation

Alle Maxipräparationen von Plasmiden wurden aus 100 mL Übernachtskulturen transformierter Bakterien mit Hilfe des „Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Vorgabe des Herstellers erstellt.

Zur Inokulation der Übernachtskultur wurden zunächst 5 mL LB Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit 1 µL eines Bakterien-Glycerolstocks (3.5.4.) versetzt. Nach 8 Stunden Inkubation bei 37 °C im Bakterienschüttler (200 rpm) wurden 100 µL dieser Vorkultur in 100 mL LB Medium mit 100 µg/mL Ampicillin überführt und ÜN bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Nach der Maxipräparation wurde das getrocknete DNA-Pellet in 200 bis 300 µL Elutionspuffer des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) gelöst und für weitere Verwendung Stocks mit 0,1 µg/µL durch Verdünnung mit dH₂O erstellt.

3.1.10. Minipräparation

Alle Minipräparationen von Plasmiden wurden aus 5 mL Übernachtskulturen transformierter Bakterien mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Vorgabe des Herstellers erstellt.

Zur Inokulation der Übernachtskultur wurden 5 mL LB Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und entweder mit 10 µL einer Bakterien-Suspension für Kolonie-PCRs (3.1.5.) oder direkt mit einer Bakterienkolonie einer Bakterienplatte (mit Hilfe einer Einmalspitze) versetzt. Die ÜN-Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienrüttler.

3.1.11. PCR

Jede PCR (Mullis, 1990) wurde mit Thermocyclern „Eppendorf Gradient Cycler“ der Firma Eppendorf (Hamburg) und der DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* „Taq DNA Polymerase (recombinant)“ von Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde stets der mitgelieferte Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet. Die Endkonzentration an Magnesiumionen pro Reaktionsvolumen (25 µL) betrug 2,5 mM. Die Komponenten einer regulären PCR bestanden aus:

- 0,25 µL Taq DNA Polymerase
- 1 µL 10 mM dNTPs
- 1 µL 10 µM Forward Primer
- 1 µL 10 µM Reverse Primer
- 2 µL Template
- 2,5 µL PCR Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 2,5 µL 25 mM MgCl_2
- 14,75 µL dH_2O

Die für diese Arbeit generierten Primerpaare wurden überwiegend für eine Annealingtemperatur bei 55 °C optimiert. Falls nicht anders angegeben, wurde jedes PCR Programm nach folgendem Schema durchgeführt:

- 94 °C, 4 min (Erstdenaturierung)
 - 94 °C, 30 s (Denaturierung)
 - primerspezifische Annealingtemperatur, 45 s
 - 72 °C, 1 s · bp⁻¹ (Elongation)
 - 72 °C, 10 min (terminale Elongation)
- } 35 Zyklen

3.1.12. Pfu-PCR

DNA-Fragmente, die für Ligationen bestimmt waren, wurden nicht mit Taq-Polymerase, sondern mit der Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* amplifiziert, welche sequenzexaktere DNA-Amplifikate liefert.

Für die *Pfu*-PCR wurden 50 µL Gesamtansätze verwendet. Sie bestanden aus:

- 1 µL *Pfu* DNA Polymerase
- 2 µL 10 mM dNTPs
- 1 µL 10 µM Forward Primer
- 1 µL 10 µM Reverse Primer
- 2 µL Template
- 5 µL *Pfu*-PCR Puffer mit MgSO₄
- 38 µL dH₂O

Bei Verwendung eines Plasmids zur Amplifizierung eines darin enthaltenen Fragments wurden stets 0,2 µg für die *Pfu*-PCR eingesetzt. Jedes *Pfu*-PCR Programm wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 94 °C, 4 min (Erstdenaturierung)
 - 94 °C, 30 s (Denaturierung)
 - 52 °C, 1 min (Annealing)
 - 72 °C, 2 s · bp⁻¹ (Elongation)
 - 72 °C, 10 min (terminale Elongation)
- } 35 Zyklen

3.1.13. Real Time PCR

Real Time RT-PCRs wurden freundlicherweise in der Diagnostik des Instituts für Virologie und Immunbiologie (Würzburg) von Christiane Prifert durchgeführt. Als Template wurden entweder Überstände aus mit MV infizierten Zellkulturen oder präparierte RNA (3.1.4.) verwendet.

Die Real Time PCRs wurden auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt.

One-Step RT-PCR mit MV-N Sonde „MEA-TM1“

Die Detektion von MV-spezifischer RNA aus Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe der MV-N spezifischen Sonde „MEA-TM1“ und des „QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kits“ der Firma Qiagen (Hilden) in einer so genannten „One-Step RT-PCR“. Hierzu wurde der Real Time Cycler „ABI7500“ der Firma Applied Biosystems (USA) verwendet.

Ein Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 13 µL 2fach QuantiFast Probe RT-PCR MMX (mit ROX Dye Solution)
- 0,25 µL 20 µM MEA-TM1
- 0,5 µL 20 µM Forward Primer (MEA1F)
- 0,5 µL 20 µM Reverse Primer (MEA1R)
- 5 µL Zellkulturüberstand (1:100 verdünnt)
- 0,25 µL QuantiFast RT Mix
- 5,5 µL dH₂O

Die One-Step RT-PCR mit MEA-TM1 wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 50 °C, 10 min
 - 95 °C, 5 min (Erstdenaturierung)
 - 95 °C, 10 s (Denaturierung)
 - 60 °C, 32 s (Annealing und Elongation)
- } 50 Zyklen

LightCycler Real Time RT-PCR mit QuantiTect™ SYBR® Green

Die Erststrang cDNA Synthese aus Gesamt-RNA von Zellkulturen erfolgte mit 200 ng RNA und durch das „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) nach Vorgabe des Herstellers. Als Masernspezifische Primer wurden „MV-F forward“, „MV-F reverse“, „MV-L forward“, „MV-L reverse“, „MV-N forward und MV-N reverse“ (Plumet *et al.*, 2005; Reuter *et al.*, 2006) verwendet. Als genomische Primer für MV wurden „MV-L-trailer forward“ und „MV-L-trailer reverse“ (Plumet *et al.*, 2005) verwendet.

Alle Real Time PCRs mit „QuantiTect™ SYBR® Green“ wurden in einem „LightCycler 2.0 real-time PCR System“ der Firma Roche (Schweiz) in einem Volumen von 20 µL durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 10 µL QuantiTect™ SYBR® Green
- 0,5 µL 20 µM Forward Primer
- 0,5 µL 20 µM Reverse Primer
- 5 µL cDNA (1:100 verdünnt)
- 4 µL dH₂O

Die Amplifikation der DNA erfolgte nach folgendem Programm:

- 95 °C, 15 min (Erstdenaturierung)
 - 94 °C, 15 s (Denaturierung)
 - 56 °C, 30 s (Annealing)
 - 72 °C, 20 s (Elongation)
 - 95 °C, 1 s (Denaturierung)
 - 65 °C, 15 s (Reannealing)
 - 65 bis 95 °C, 0,1 °C · s⁻¹ (Schmelzkurve)
 - 10 °C, 30 s (Cooling)
- } 50 Zyklen

3.1.14. Restriktion von Plasmiden

Alle Plasmidrestriktionen wurden mit Restriktionsenzymen der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) oder Promega (USA) in Vielfachen von 20 µL durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µg DNA, 2 µL Restriktionspuffer, 1 µL Restriktionsenzym und der entsprechenden Rest-Menge dH₂O.

Waren für die Restriktion der DNA zwei verschiedene Enzyme notwendig, so wurden diese bei überlappendem Puffer gleichzeitig durchgeführt. Bei Nicht-Kompatibilität der Puffer wurde das DNA-Fragment nach der ersten Restriktion zunächst über eine Agarose-Gelelektrophorese (3.1.1.) mit anschließender Elution (3.1.2.) aufgereinigt. Danach erfolgte die zweite Restriktion.

3.1.15. RT-PCR

Für die Erststrang cDNA Synthese aus isolierter RNA wurde die Reverse Transkriptase „M-MLV Reverse Transcriptase“ der Firma Promega (USA) eingesetzt. In Abweichung zu dem Protokoll des Herstellers wurden in einem Ansatz zunächst folgende Substanzen vereinigt:

- 10 µL RNA (~10 µg)
- 1 µL 100 µM oligo(dT)₁₈ Primer
- 1 µL 100 µM Random Hexamere
- 2 µL 10 mM dNTPs
- 5 µL dH₂O

Der Sekundärstrukturen der RNA des Ansatzes wurden für 5 min bei 95 °C in einem „Eppendorf Gradient Cycler“ der Firma Eppendorf (Hamburg) denaturiert und das Reaktionsgefäß

anschließend direkt auf Eis überführt. Es erfolgte die Zugabe von 5 µL Reaktionspuffer (5fach). Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß für 5 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und dort direkt im Anschluss 1 µL RT hinzupipettiert. Die Erststrang cDNA Synthese erfolgte durch Inkubation für 50 min bei 42 °C und die Inaktivierung der RT durch Inkubation für 15 min bei 70 °C ebenfalls im Thermocycler. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für anschließende PCRs wurden stets 2 µL pro Reaktion (25 µL Gesamtvolumen) eingesetzt.

3.1.16. Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen von DNA wurden mit Hilfe des „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits“ der Firma Life Technologies (USA) in einem „Eppendorf Gradient Cycler“ der Firma Eppendorf (Hamburg) und in einem Gesamtvolumen von 5 µL durchgeführt. Ein Sequenzierungsansatz setzte sich zusammen aus:

- 1 µL Plasmid-DNA (aus Minipräparation, ~500 ng)
- 1 µl 10 pM Primer (F oder R)
- 1 µl „BigDye®“ Puffer (5fach, enthält dNTPs und unterschiedlich markierte ddNTPs)
- 1 µl „BigDye®“ DNA Polymerase

Die Amplifikation der DNA, bei der es durch die in der Reaktion anwesenden, unterschiedlich markierten ddNTPs zu Strangabbrüchen kommt, wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

- 96 °C, 30 s (Denaturierung)
 - 50 °C, 15 s (Annealing)
 - 60 °C, 4 min (Elongation)
- } 29 Zyklen

Die Detektion der unterschiedlichen DNA-Fragmente, bei denen solche gleicher Größe und Endbase dieselbe Markierung mit einem von vier unterschiedlichen Fluorochromen aufwiesen, erfolgte freundlicherweise durch die Diagnostik des Instituts für Virologie und Immunbiologie (Würzburg) in einem „ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer“ der Firma Advanced Biolab Service (München).

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 10 μL des entsprechenden Proteinlysates in einem Gemisch aus 1960 μL BCA Lösung (Sigma-Aldrich) und 40 μL Kupfersulfatlösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 bis 10 min.

Die Proteinmenge der Ansätze wurde anschließend in Küvetten (Brand) in einem „Bio-Photometer 6131“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit Hilfe eines ebenfalls getesteten Proteinstandards (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bei 562 nm bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion der Probe durch die des Standards dividiert und mit der Konzentration des Standards sowie der eingesetzten Verdünnung multipliziert.

3.2.2. Detektion geblotteter Proteine

Für die Detektion von auf eine Nitrocellulose-Membran geblotteten Proteinen (3.2.6) wurde die Membran zunächst für mindestens eine Stunde in einem Blocking-Puffer inkubiert (10 % Magermilchpulver (w/v) in PBS) und anschließend mit PBS 0,05 % Tween® 20 (v/v) gewaschen. Die Inkubation mit den unterschiedlich stark verdünnten Erstantikörpern (1:500 bis 1:5000) erfolgte in PBS 0,05 % Tween® 20 (v/v) 5 % Magermilchpulver (w/v) ÜN bei 4 °C auf einem Wippschüttler „WS 5“ der Firma Edmund Bühler (Tübingen). Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBS 0,05 % Tween® 20 (v/v) erfolgte die Inkubation mit 1:2000 in PBS 0,05 % Tween® 20 (v/v) 5 % Magermilchpulver (w/v) verdünnten, Meerrettichperoxidase-markierten, gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers gerichteten Zweitantikörpern für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Wippschüttler. Abschließend wurde die Membran erneut drei mal mit PBS 0,05 % Tween® 20 (v/v) gewaschen.

Die Detektion der Peroxidase-markierten Zweitantikörper – und somit auch der mit Hilfe des Erstantikörpers detektierten Proteine – erfolgte mit Hilfe des „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrates“ der Firma Thermo Scientific (USA) nach Vorgabe des Herstellers. Chemilumineszente Signale wurden anschließend auf Röntgenfilm der Firma Fuji (Japan) in einer Filmkammer von Dr. Goos-Suprema (Heidelberg) sichtbar gemacht, welcher nach Belichtung durch Entwickler und Fixierer der Firma Kodak (USA) entwickelt bzw. fixiert wurde.

3.2.3. Herstellung von Proteinlysaten

Proteinlysate durch Verwendung von M-PER® Reagenz

Zur Herstellung von Proteinlysaten mit Hilfe des M-PER® Reagenzes des „ProFound™ Mammalian HA Tag IP/Co-IP Kits“ der Firma Thermo-Scientific (USA) wurden adhärenente Zellen mit eiskaltem TBS gewaschen und anschließend mit 500 µL M-PER® Reagenz und 0,1 U/µL RNase-Inhibitor pro 6 cm Schale versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT auf einem Wippschüttler „WS 5“ der Firma Edmund Bühler (Tübingen) wurden die Lysate abgenommen, in 1,5 mL PP Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei $25.553 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die von Zelltrümmern bereinigten Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Proteinlysate durch Verwendung von NP40-Lysispuffer

Zur Herstellung von Proteinlysaten mit Hilfe von NP40-Lysispuffer wurden Zellpellets mit PBS gewaschen und anschließend in ca. 20 µL/cm² Zellkulturfläche NP40-Lysispuffer resuspendiert. Nach 45minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate für 15 min bei $25.553 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die von Zelltrümmern bereinigten Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.4. SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteingemischen in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 20-25 µg Gesamtprotein für kleine bzw. 40-50 µg Gesamtprotein für große Elektrophoresekammern aus Proteinlysaten zunächst mit einem Drittel Protein Ladebuffer (4fach) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die so vorbereiteten Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei 4 °C gelagert.

Bei der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt eine Aufkonzentrierung der aufgetragenen Proben an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, welches sich horizontal zwischen zwei Glasplatten befindet. Die beiden Gele unterscheiden sich durch ihren pH-Wert. Außerdem liegen in den Gelen Glycinionen in unterschiedlichen Ladungszuständen vor. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele zur Trennung der Proteine bestanden aus 10 % Polyacrylamid.

Das Trenngel bestand aus folgenden Komponenten:

- 40 % (v/v) Acrylamid-Lösung
- 37,5 % (v/v) 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8
- 22,25 % (v/v) dH₂O
- 1 % (w/v) SDS
- 0,25 % (v/v) TEMED
- 0,2 % (w/v) APS

Die Komponenten wurden auf Eis vereinigt, unmittelbar nach Zugabe von TEMED zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 500 bis 1000 µL Isopropanol überschichtet, bis die Polymerisierung abgeschlossen war (~30 min). Anschließend wurde das Isopropanol mit Hilfe von dH₂O entfernt und mit dem zuvor erstellten Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel bestand aus folgenden Komponenten:

- 12,4 % (v/v) Acrylamid-Lösung
- 12,4 % (v/v) 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8
- 74,95 % (v/v) dH₂O
- 1 % (w/v) SDS
- 0,25 % (v/v) TEMED
- 0,1 % (w/v) APS

Anschließend wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisierung wurde das Gel bis zur Verwendung in Frischhaltefolie bei 4 °C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in eine Gelkammer eingespannt und mit Protein-Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde der Kamm entfernt, die so entstandenen Taschen mit Puffer gespült um Gelrückstände zu entfernen und die Proteinproben eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für kleine Apparaturen für ca. 2 Stunden bei 25 mA bzw. für große Apparaturen ÜN bei 10 mA pro Gel.

3.2.5. „Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen

Zum Entfernen der an eine Nitrocellulose-Membran gebundenen Erst- und Zweitantikörper (3.2.2.) wurden die Membranen für eine Stunde bei RT in „Stripping“ Puffer auf einem Wippschüttler „WS 5“ der Firma Edmund Bühler (Tübingen) inkubiert. Abschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS.

Nach dem „Stripping“ konnte die von Antikörpern befreite Membran erneut für eine Detektion (3.2.2.), vergleichbar mit einer frisch geblotteten Membran, verwendet werden.

3.2.6. Western-Blot

Um die in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine zu detektieren, müssen diese auf eine Membran überführt (geblottet) werden. Dieser Vorgang wird, im Gegensatz zum Blotten von RNA oder DNA, Western-Blot genannt.

Hierfür wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel nach der erfolgreichen SDS-PAGE aus der Gelapparatur entfernt und zunächst in Kathodenpuffer überführt. Dann wurden drei in Anodenpuffer I und zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere in der Größe des Gels bzw. der Nitrocellulose-Membran nacheinander auf die leicht mit dH₂O befeuchtete Unterseite der Blotting-Apparatur luftblasenfrei aufgelegt. Eine zuvor in Anodenpuffer II angefeuchtete Nitrocellulose-Membran und das Polyacrylamid-Gel wurden anschließend ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Die letzte Schicht bildeten drei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere in der Größe des Gels. Abschließend wurde die Apparatur mit einer ebenfalls leicht angefeuchteten Oberseite geschlossen.

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 50 mA für Gele aus kleinen bzw. für 100 mA für Gele aus großen Gel-Apparaturen. Ein erfolgreicher Transfer konnte direkt im Anschluss der Prozedur durch die Übertragung des vorgefärbten Proteinstandards überprüft werden. Anschließend wurden die Membranen für eine Detektion wie unter 3.2.2. beschrieben weiterverwendet.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. Durchflusszytometrie

Um die verschiedenen morphologischen und optischen Eigenschaften von lebenden oder fixierten Zellen quantitativ und qualitativ zu erfassen, wurden durchflusszytometrische Messungen an einem „FACScan Calibur“ der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden mit der Software „FlowJo Version 7.6“ der Firma Tree Star (USA) ausgewertet.

Während einer durchflusszytometrischen Messung werden Einzelzellen mit Hilfe eines Lasers anhand von Kriterien wie Größe („Forward Scatter“) und Granularität („Side Scatter“), sowie anhand vorhandener Fluoreszenzfarbstoffe unterschieden. Die Vermessung sehr vieler

Zellen ermöglicht eine statistische Auswertung der verschiedenen ermittelten Eigenschaften. Hierfür werden die sich in Suspension befindenden Zellen in einem dünnen Strahl an Lasern vorbeigeführt. Die durch die unterschiedlichen Zustände der Zellen entstehende Streuung, sowie die durch vorhandene Fluorochrome erfolgte Emission des Lichts werden detektiert. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich dabei proportional zu der Anzahl der auf der Zelle gebundenen Fluorochrome.

Um adhärenente Zellen für die Durchflusszytometrie vorzubereiten, wurden diese zunächst mit ATV abgelöst und mit FACS-Puffer gewaschen. Je nach Art des Versuches wurden die Zellen unterschiedlich weiterbehandelt.

Minireplikon-Assay

Aufgrund der vorhandenen, intrazellulären Expression von EGFP konnten die Zellen ohne weitere Behandlung in FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen werden. Pro Zelltyp wurden stets 30.000 Zellen in dreifacher Wiederholung gemessen.

Oberflächenfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in 100 μ L FACS-Puffer mit der entsprechenden Verdünnung des Erstantikörpers aufgenommen und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und ebenfalls für eine Stunde bei 4 °C in einer 1:200 Verdünnung des Fluorochrommarkierten Zweitantikörpers gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers in FACS-Puffer gefärbt. Nach erneutem abschließendem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Zellen für die durchflusszytometrische Messung in frischem FACS-Puffer aufgenommen werden. Standardmäßig wurden je 10.000 Zellen gemessen.

Intrazellulärfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen zunächst bei RT in PBS 4 % PFA (w/v) für 20 min fixiert und nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer für 10 min mit PBS 0,1 % Triton® X-100 (v/v) bei 4 °C permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Färbung mit Erst- und Zweitantikörpern analog der in der Oberflächenfärbung beschriebenen Prozedur.

Durch die zuvor erfolgte Fixierung und Permeabilisierung erhalten die gegen intrazelluläre Proteine gerichteten Antikörper einen Zugang zu den entsprechenden Epitopen durch die Zellmembran ins Zytoplasma der Zellen.

3.3.2. ELISA

Im enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) werden Antigenkonzentrationen anhand des Substratumsatzes mittels einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert. Durch die in der Hüllmembran von pseudotypisierten, retroviralen Partikeln vorhandenen Rezeptorproteine ist somit auch eine Titration dieser Partikel mittels eines ELISAs möglich.

Für die Titration von VSV-G pseudotypisierten, retroviralen Partikeln wurde zunächst eine 96 Well Platte „MaxiSorp® flat-bottom“ der Firma Nunc (Langensfeld) bei 4 °C ÜN mit seriellen Verdünnungen der zu titrierenden Partikel in 100 µL Beschichtungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank innerhalb einer feuchten Kammer mit 100 µL einer 1:1000 Verdünnung eines monoklonalen anti-VSV-G-Mausantikörpers in Serumdiluent inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Erstantikörper mit Hilfe von 100 µL einer 1:3000 Verdünnung eines anti-Maus HRP-gekoppelten Ziege IgG (H+L) in Serumdiluent für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank innerhalb einer feuchten Kammer gebunden. Nach erneutem abschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Farbreaktion indem jedes Wells für 10 min im Dunkeln mit 100 µL Substratpuffer versetzt wurde. Die Reaktion wurde anschließend mit 100 µL 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und bei 492 nm (Messwellenlänge) bzw. 650 nm (Referenzwellenlänge) gemessen.

Die Titer der zu testenden Partikel wurde durch einen Vergleich mit bereits titrierten Partikeln ermittelt. Diese, in Zielzellen eYFP exprimierenden Partikel (Ursprungsvektoren für die Pseudotypisierung waren pczVSV-G, pHit60 sowie pcMFeYFP) wurden zuvor in verschiedenen Verdünnungen auf Vero-Zellen aufgebracht und die transduzierten Zellen drei Tage später durchflusszytometrisch gemessen. Der Titer errechnete sich aus dem prozentualen Anteil transduzierter Zellen multipliziert mit der Zellzahl bei Transduktion sowie der eingesetzten Verdünnung. Als Ausgangspunkt für diese Berechnung diente eine Verdünnung der Partikel, welche eine ~10 %ige Transduktionsrate der Zellen hervorruft. Nach erfolgter Titration wurden diese Referenz-Partikel ebenfalls in seriellen Verdünnungen für den ELISA eingesetzt. Durch die Erstellung einer Eichgeraden konnte so der Titer der zu titrierenden Partikel bestimmt werden.

3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen

Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen fanden stets in so genannten „Chamberslides“ statt – für das Wachstum adhärenter Zellen optimierte Objektträger mit aufgebrachtene Kammern von einem bzw. zwei Quadratcentimetern Fläche. In diesen Kammern fand das Wachstum der Zellen vergleichbar mit dem in Zellkulturflaschen statt (3.5.2.).

Wie auch schon für die Durchflusszytometrie (3.3.1.) beschrieben, konnte bei der Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen zwischen einer Färbung von Oberflächenproteinen (Oberflächenfärbung) sowie der intrazellulärer Proteine (Intrazellulärfärbung) unterschieden werden.

Oberflächenfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Oberflächenproteinen wurden die adhärenenten Zellen im „Chamberslide“ zunächst mit PBS gewaschen und anschließend bei RT in PBS 4 % PFA (w/v) für 20 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine zwanzigminütige Inkubation der Zellen in PBS 5 % BSA (w/v) bei Raumtemperatur. Diese Inkubation mit BSA dient der Blockierung unspezifischer Bindungen der Primärantikörper. Im Anschluss erfolgte die Erstantikörper-Inkubation mit der entsprechenden Verdünnung des Antikörpers in PBS 1 % BSA (w/v) für mindestens eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4 °C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS 1 % BSA (w/v) gewaschen und dann für eine Stunde bei RT in einer 1:200 Verdünnung des Fluorochrom-markierten Zweitantikörpers gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers in PBS 1 % BSA (w/v) gefärbt. Fakultativ wurde anschließend ein Zellkern-Färbung mit PBS 300 nM DAPI durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS 1 % BSA (w/v) gewaschen, die Kunststoffkammer vom Objektträger entfernt und die gefärbten Zellen mit 200 µL „Fluoromount G“ der Firma Southern Biotech (USA) sowie einem Deckglas für die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop eingedeckt.

Intrazellulärfärbung

Um intrazelluläre Proteine für Antikörper zugänglich zu machen wurden die Zellen nach Waschen mit PBS und zwanzigminütiger Fixierung mit PBS 4 % PFA (w/v) bei RT in „Chamberslides“ für 10 min bei 4 °C mit PBS 0,1 % Triton® X-100 behandelt. Alle weiteren Behandlungen erfolgten analog zu den in der Oberflächenfärbung beschriebenen Schritten.

3.3.4. Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation wird der Vorgang der Anreicherung eines markierten Proteins aus einem Proteingemisch mit Hilfe von so genannten „Beads“, kleinen Kügelchen (meist Agarose) als Trägermaterial für gebundene Antikörper, bezeichnet. Interaktionspartner der markierten Proteine oder gebundene Nukleinsäuren können mitpräzipitiert und anschließend detektiert werden.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen wurden mit Hilfe des „ProFound™ Mammalian HA Tag IP/Co-IP Kits“ der Firma Thermo-Scientific (USA) nach Herstellervorgabe durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Präzipitationen dienten Proteinlysate, die unter Verwendung des M-PER® Reagenzes desselben Kits erstellt wurden (3.2.3.). Für das Waschen der „Beads“ nach erfolgter Inkubation mit den Proteinlysaten wurde abweichend vom Protokoll des Herstellers „RNA Bindungspuffer“ (Khan *et al.*, 2007) verwendet. Sollten die präzipitierten Proteine für eine anschließende RNA-Präparation verwendet werden, so wurden diese nach Elutionsprotokoll 1 eluiert. Erfolgte eine Analyse mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde Elutionsprotokoll 2 verwendet.

3.4. Virologische Methoden

3.4.1. Anzucht von MV

Für die Präparationen von MV (rMV^{Edtag}EGFPCAMH, rMV^{Edtag}LMMEGFPM, rMV^{IC323}EGFP) wurden Vero-Zellen in 175 cm² Kulturflaschen bis zu einer Dichte von 60-70 % angezogen ($\sim 6,5 \times 10^6$ Zellen) und anschließend mit einer MOI von 0,01 mit dem entsprechenden Virus infiziert. Am nächsten Tag wurden jede Flasche auf zwei neue expandiert. Nach Ausbildung des maximalen zytopathischen Effekts (circa zwei bis drei Tage nach Infektion) wurde das Medium der Flaschen bis auf 3 mL abgenommen und die Flaschen zunächst bei -80 °C eingefroren. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Flaschen bei 4 °C aufgetaut, der infizierte Zellrasen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in den 3 mL Restmedium resuspendiert. Falls mehrere Flaschen für eine MV-Anzucht vorhanden waren, wurden die Ansätze an diesem Punkt vereinigt. Um die größtenteils membrangebundenen Partikel besser zu lösen, wurden die Ansätze mit dem Homogenisator behandelt (circa zehnmaliges Homogenisieren). Abschließend folgte eine Zentrifugation für 15 min bei $3.500 \times g$ und 10 °C. Die Überstände wurden portioniert bei -80 °C in Einfrierröhrchen gelagert.

3.4.2. Anzucht von MVA-T7

Für die Amplifikation von MVA-T7 wurde eine oder mehrere 175 cm² Zellkulturflaschen mit circa 90 % konfluenten BHK-Zellen ($\sim 1,8 \times 10^7$ Zellen) mit einer MOI von 0,01 in 10 mL Kulturmedium ohne FCS infiziert. Nach zwei Stunden wurden 30 mL MEM 5 % FCS hinzugegeben. Zwei Tage nach Inkubation erfolgte die Präparation des Virus, indem der Zellrasen mit einem Zellschaber abgelöst wurde, ohne das Kulturmedium zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend in 50 mL PP Röhren überführt und für 15 min bei $3.500 \times g$ und 10 °C zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 500 µL 10 mM TRIS pH 9 pro Kulturflasche aufgenommen und durch drei aufeinander folgende Einfrier-Auftau-Zyklen lysiert, um das Virus freizusetzen. Dazu wurde die Zellsuspension in den 50 mL PP Röhren mit Hilfe einer Mischung aus technischem Ethanol und Trockeneis eingefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Abschließend wurden die MVA-T7-Präparationen portioniert und bei -80 °C in Einfrierröhren gelagert.

3.4.3. Titration von MV

Für die Titration von MV-Präparationen (3.4.2.) wurden zunächst $1,5 \times 10^5$ Vero-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und ÜN bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden Verdünnungen der zu titrierenden MV-Präparation von 10^{-1} bis 10^{-6} in serumfreiem MEM erstellt und die Zellen mit je 1 mL der Verdünnungen pro Napf für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Virusverdünnung entfernt wurde, wurden die Näpfe mit einer ~40 °C warmen Mischung aus 25 % (v/v) MEM 5 % (v/v) FCS, 37,5 % (v/v) Agar 2 % (w/v) und 37,5 % (v/v) Doppel-MEM überschichtet. Nach Erkalten der Mischung wurden die 6-well-Platten für fünf Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe mit einer 1:100 Verdünnung einer Neutralrot-Lösung 1,6 % (w/v) in PBS bei 37 °C für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Neutralrot-Lösung wurde entfernt und die Platten erneut für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Abschließend konnte der Titer der Viruspräparation (pfu/mL) durch Zählung der im Zellrasen durch die Färbung sichtbar gewordenen Plaques bestimmt werden, indem die Anzahl der vorhandenen (auszählbaren) Plaques mit dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe multipliziert wurden.

3.4.4. Titration von MVA-T7

Um den Titer einer MVA-T7-Präparationen zu bestimmen wurden je 9×10^4 BHK-Zellen pro Napf auf einer 12-well-Platte ausgesät und ÜN bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden Verdünnungen der zu titrierenden MVA-T7-Präparation von 10^{-5} bis 10^{-8} in

serumfreien MEM erstellt und die Zellen mit je 1 mL der Verdünnungen pro Napf für 1,5 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum durch 1 mL MEM 5 % FCS ersetzt. Nach einer zweitägigen Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank wurde eine Lebendfärbung mit Kristallviolett durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 0,5 mL Kristallviolett-Lösung (PBS 0,1 % (w/v) Kristallviolett 20 % Ethanol (v/v)) für 3 min gefärbt und danach dreimal mit 1 mL PBS gewaschen. Unter dem Lichtmikroskop konnte der Titer der Viruspräparation (pfu/mL) abschließend durch Zählung der im Zellrasen durch die Färbung sichtbar gewordenen Plaques bestimmt werden, indem die Anzahl der vorhandenen Plaques mit dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe multipliziert wurde.

3.4.5. Ultrazentrifugation von MV

Um MV aus Viruspräparationen aufzureinigen bzw. zu konzentrieren, wurden zunächst analog der in 3.4.1. beschriebenen Anzucht von MV infizierte Zellrasen in 175 cm² Kulturflächen bei -80 °C eingefroren und nach mindestens 24 Stunden auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers im vorhandenen Restmedium resuspendiert. Ein 500 µL bzw. 5 mL großes Kissen aus NTE-Puffer 25 % Saccharose wurde in 4 mL bzw. 37 mL UZ-Röhrchen der Firma Seton (USA) bzw. Kontron (München) mit der zuvor erstellten Virus-Präparation überschichtet und in der Ultrazentrifuge für 2 Stunden bei 78.400 × g bzw. 82.705 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden der Überstand sowie das Saccharosekissen abgegossen und das Virus-Pellet in NTE-Puffer auf Eis schonend aufgenommen. Die aufgereinigte Viruspräparation wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5. Zellbiologische Methoden

3.5.1. Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel

Bei denen im Rahmen dieser Arbeit als Vektoren verwendeten, retroviralen Partikeln handelte es sich stets um Partikel mit VSV-G Pseudotypisierung. Das Glykoprotein G des VSV ermöglicht eine Transduktion nahezu aller Zelltypen, da der zugehörige zelluläre Rezeptor aufgrund der breiten Spezies-Spezifität von VSV auf sehr vielen Zellen vertreten ist. Neben dem die Hüllproteine von VSV kodierendem Vektor pczVSV-G wurden zur Herstellung der Partikel der MLV-basierte Vektor pHIT60 (Expression von MLV-gag und -pol) sowie ein das Zielgen und die angrenzenden Verpackungs-Sequenzen enthaltene Vektor auf Basis von pcMS28 verwendet.

Um VSV-G-pseudotypisierte, retrovirale Partikel zu erstellen wurden $1,5 \times 10^6$ 293T-Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden je 2 µg aus 0,1 µg/µL Verdünnungen der Vektoren pHIT60 und pczVSV-G sowie der das Zielgen enthaltene Vektor auf Basis von pcMS28 zunächst mit 422 µL serumfreiem MEM vermischt und anschließend 18 µg PEI hinzupipettiert. Im Fall von hA3G-kodierenden Vektoren wurden zusätzlich 2 µg des Plasmids pIRESvif aus einer 0,1 µg/µL Verdünnung hinzugegeben, die Menge an PEI auf 24 µg erhöht und die Menge des Mediums auf 396 µL verringert. Die Expression von vif verhindert eine durch das in den 293T-Zellen exprimierte hA3G hervorgerufene Inhibition der Partikelsynthese, sowie die später bei Verwendung der Partikel als Vektoren in Zielzellen inhibierte Integration der rekombinanten, retroviralen DNA.

Das Transfektionsgemisch wurde für 30 min bei RT inkubiert und nach Entfernen des Kulturmediums der 293T-Zellen gleichmäßig tröpfchenweise auf die Zellkulturschale verteilt. Unmittelbar danach wurde 2,5 mL warmes MEM 10 % FCS hinzugegeben und die Zellen ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut ein Mediumwechsel vorgenommen, bei dem pro Zellkulturschale 3 mL warmes MEM 10 % FCS 10 mM Natriumbutyrat verwendet wurde. Natriumbutyrat bewirkt eine verstärkte Genexpression der unter der Kontrolle des CMV-Promoters stehenden Plasmide pHIT60 und pczVSV-G.

Nach einer weiteren Inkubation von ca. 32 Stunden wurde der Kulturüberstand abgenommen, mit Hilfe von 0,4 µm Sterilfiltern der Firma Millipore (Frankreich) sterilfiltriert und entweder direkt bei -80 °C gelagert oder zuvor als Vereinigung von fünf 6 cm Schalen (Gesamtvolumen 15 mL) durch 15minütige Zentrifugation bei RT und $4.000 \times g$ in „Amicon Ultra Filtern“ der Firma Millipore (Frankreich) mit 100 kDa-Porengröße auf ein Volumen von ca. 250 µL aufkonzentriert. Nach erneutem Auftauen konnten die die Partikel enthaltenden Überstände direkt zur Transduktion von Zellen verwendet werden.

3.5.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden stets bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank in Gewebekulturflaschen von Greiner (Frickenhausen) kultiviert. Für Vero-Zellen sowie alle auf Vero-Zellen basierende Linien (023, 024-1, 024-2, 024-3, VerohSLAM) wurde NaHCO₃-gepuffertes MEM 5 % FCS, für 293T- sowie BHK-Zellen wurde NaHCO₃-gepuffertes MEM 10 % FCS verwendet. Für transduzierte Zelllinien wurden dem Medium 5 bzw. 10 µg/µL Puromycin zugesetzt (3.5.7.).

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in 75 cm² Kulturflaschen zur Aufrechterhaltung der Zelllinien wurden die Zellen mit 37 °C warmem ATV gewaschen und danach in

3 mL (Vero-Zellen sowie alle auf Vero-Zellen basierende Linien) bzw. 1 mL (293T- sowie BHK-Zellen) ATV für ca. 2 min inkubiert. Anschließend wurden die nun abgelösten Zellen mit dem entsprechenden Kulturmedium in insgesamt 10 mL resuspendiert. Neun Teile dieser Suspension wurden aus der Flasche entfernt und konnte nach Zellzählung für verschiedene Versuche verwendet werden. Der in der Flasche verbleibende Teil der Suspension wurde mit frischem Medium auf insgesamt ca. 15 mL aufgefüllt, resuspendiert und die Gewebekulturflasche bei 37 °C im Brutschrank bis zur Ausbildung erneuter Konfluenz weiter kultiviert.

3.5.3. Lagerung eukaryotischer Zellen

Für die Lagerung eukaryotischer Zellen wurde zunächst eine bestimmte Menge der zu lagern- den Zellen aus Kultur mit ATV abgelöst und für 5 min bei RT und $310 \times g$ abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 1,5 mL FCS 10 % DMSO aufgenommen und in einem Einfrierröhrchen kurzfristig (maximal vier Monate) bei -80 °C gelagert. Für langfristige Lagerung der Zellen wurde das Einfrierröhrchen zunächst in eine Einfrierbox mit Isopropanol überführt und für einen Tag bei -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

3.5.4. Lagerung prokaryotischer Zellen

Für die Lagerung prokaryotischer Zellen wurde ein Teil der Vorkultur für Mini- oder Maxi- präparationen (3.1.9. bzw. 3.1.10.), welche aus Einzelkolonien transformierter Bakterien erstellt wurden, verwendet. Dazu wurde 850 µL der Vorkultur mit 150 µL Glycerol vermischt und in einem Einfrierröhrchen bei -80 °C gelagert.

3.5.5. Minireplikon Assay

Mit Hilfe des Minireplikon-Assays können Faktoren untersucht werden, die Einfluss auf die Funktionalität der MV RNA-Polymerase nehmen. Hierzu werden Zellen zunächst Plasmide zur Expression eines Transkriptionskomplexes, wie er auch bei der Replikation von MV auftritt, zur Verfügung gestellt. Hinzu kommen ein so genanntes Minigenom, welches bei Anwesenheit von T7 RNA-Polymerase eine Reporter-gen-RNA in Negativ-Strang Orientierung exprimiert. Ist ein MV-Transkriptionskomplex anwesend, wird diese Reporter-gen-RNA in eine positiv-strängige mRNA umgeschrieben, welche anschließend von der zellulären Maschinerie in das Reporterprotein translatiert wird. Durch die unterschiedliche Expression des

Reporterproteins bei Anwesenheit verschiedener Faktoren kann die Beeinflussung der Aktivität der MV RNA-Polymerase untersucht werden.

Für das Minireplikon-Assay wurden zunächst 3×10^5 Zellen (023, 024-1, 024-2 bzw. 024-3) in 6-well-Platten ausgesät und für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Der weitere Versuchsablauf des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Minireplikon-Assays gliedert sich in drei Abschnitte:

Infektion der Zellen mit MVA-T7

Um die Expression der negativsträngigen Reporter-gen-RNA durch die T7 RNA-Polymerase zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst mit dem attenuierten, rekombinanten Vakzinia Virus MVA-T7 infiziert.

Hierzu wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkultur-Mediums mit $1,2 \times 10^6$ pfu MVA-T7 (~MOI 2) in 2 mL serumfreiem MEM pro Napf überschichtet und für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Transfektion der für das Minireplikon-Assay erforderlichen Vektoren

Der Transfektionsmix zur Bereitstellung der für das Minireplikon-Assay erforderlichen Vektoren bestand aus folgenden Komponenten:

- 4 µg p(-)MVDIEGFP (0,1 µg/µL)
- 0,4 µg pEMC-La (0,1 µg/µL)
- 1,2 µg pEMC-N (0,1 µg/µL)
- 1,2 µg pEMC-Pa (0,1 µg/µL)
- 10,2 µg PEI (1 µg/µL)
- 421,8 µL MEM (serumfrei)

Die Plasmide wurden zunächst in einem separaten Ansatz mit 182 µL serumfreiem MEM und in einem zweiten Ansatz 10,2 µg PEI mit 239,8 µL serumfreiem MEM vermischt. Anschließend wurden die Ansätze zum Transfektionsmix vereinigt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz (500 µL Gesamtvolumen) auf die von Medium befreiten Zellen tröpfchenweise aufgebracht und mit 2,5 mL serumfreiem MEM versetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium durch MEM 5 % FCS ersetzt.

Durchflusszytometrische Auswertung

Nach einer Inkubation von ~42 Stunden bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese mit ATV abgelöst. Nachdem die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie in FACS-Puffer resuspendiert und konnten durchflusszytometrisch gemessen werden (3.3.1.).

3.5.6. Quantifizierung von Fluoreszenz

Zur Quantifizierung des durch rMV^{Edtag}EGFPCAMH oder rMV^{IC323}EGFP exprimierten EGFPs wurde der Fluoreszenzreader „Safire 2“ der Firma Tecan (Crailsheim) benutzt. Die für die Messung verwendeten, infizierten Zellen wurden stets in 6-well-Platten der Firma Greiner (Frickhausen) kultiviert und gemessen.

Hierzu wurden die 6-well-Platten zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die relative Emission bei 509 nm aufgezeichnet (Extinktions- bzw. Emissions-Maxima von EGFP). Die weiteren am Gerät vorgenommenen Einstellungen lauten wie folgt:

- Measurement mode Fluorescence Bottom
- Excitation bandwidth 10 nm
- Emission bandwidth 10 nm
- Gain 60
- Number of reads 5
- FlashMode High sensitivity
- Integration time 40 µs
- Lag time 0 µs
- Plate definition file GRE6ft.pdf
- Plate with cover
- Multiple reads per well (Circle) 9 × 9
- Time between move and flash 1 ms

Die Daten wurden zunächst mit Hilfe der Software „XFLUOR4 Version 4.51“ der Firma Tecan (Crailsheim) aufgezeichnet und die relativen Fluoreszenzintensitäten anschließend mit Hilfe von „Excel Version 2007“ der Firma Microsoft (USA) dargestellt.

3.5.7. Transduktion

Für die Transduktion von Zellen wurden diese in den gewünschten Zellkulturgefäßen ausgesät und mit VSV-G-pseudotypisierten, retroviralen Partikeln versetzt, indem diese direkt in das Kulturmedium gegeben wurden. Je nach Größe des Zellkulturgefäßes wurden unterschiedliche Mengen an Partikeln eingesetzt.

Transduktion von CD150

Um Zielzellen mit rekombinantem MV Wildtyp infizieren zu können, wurden die Zielzellen mit 200 µL nicht aufkonzentriertem, untitriertem Kulturüberstand aus 293T-Zellen versetzt, welche zuvor mit pHIT60, pczVSV-G sowie pcMFLAM transfiziert wurden (3.5.1.).

Transduktion ohne Selektion

Zielzellen wurden für die Transduktion in den gewünschten Zellkulturgefäßen mit einer MOI von 30 mit den entsprechenden Partikeln versetzt. Einen Tag später wurde das Medium gewechselt und ein bis zwei Tage nach Transduktion wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet.

Transduktion mit anschließender Selektion

Für die Transduktion mit anschließender Selektion erfolgreich transduzierter Zellen wurden zunächst 9×10^4 Vero-Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und einen Tag bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden $\sim 5,4 \times 10^6$ pseudotypisierte Partikel (MOI 30) in das Kulturmedium gegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel mit anschließender Inkubation von zwei Tagen bei 37 °C. Dann wurden die nun konfluenten Zellen mit ATV gespült, abgelöst und in 75 cm² Zellkulturflächen überführt. Hierzu wurde MEM 5 % FCS verwendet, welches zuvor mit 10 µg/mL Puromycin versetzt wurde.

Die transduzierten, selektionierten Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz einem täglichen Mediumwechsel mit MEM 5 % FCS 10 µg/mL Puromycin unterzogen. Wurde die Konfluenz erreicht, so wurde für die weitere Kultur der Zellen MEM 5 % FCS 5 µg/mL Puromycin verwendet.

3.5.8. Transfektion

Für die Transfektion von Plasmiden wurde Polyethylenimin (PEI) der Firma Polyscience (USA) verwendet. Das Polymer des Ethylenimins liegt in wässriger Lösung als Polykation vor und bindet daher besonders negativ geladenen Nukleinsäuren, was zur Bildung von Komplexen und deren Ausfällen führt. Die gebildeten Komplexe aus PEI und DNA können sich so an Zellmembranen anlagern und zur Aufnahme der DNA in die Zelle führen.

Für die Transfektion von Plasmiden mit Hilfe von PEI wurden 70 bis 80 % konfluente Zellen mit einem Transfektionsmix aus Plasmid-DNA und der 1,5fachen Menge an PEI in serumfreiem MEM versetzt, welcher nach Mischung zuvor für 30 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit dem für die Kultur erforderlichen Minimalvolumen an Medium überschichtet. Einen Tag nach Kultivierung bei 37 °C im Brutschrank wurden die transfizierten Zellen mit neuem Medium versetzt und ein bis zwei weitere Tage später für entsprechende Versuche verwendet.

3.5.9. Transformation

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden 50 µL kompetente „XL10-Gold“ Bakterien der Firma Stratagene (USA) auf Eis aufgetaut und für Plasmide aus Minipräparationen mit 1 µL bzw. für Plasmide aus Ligationen mit dem kompletten Ligationsansatz (15 µL) vermischt und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C im Thermoblock mit einer anschließenden Inkubation für 5 min auf Eis. Danach wurden die transformierten Bakterien mit 900 µL LB-Medium vermischt und für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde für Plasmide aus Minipräparationen 50 µL dieser Vorkultur auf Bakterienplatten mit LB_{Ampicillin} Agar ausplattiert. Für Plasmide aus Ligationen wurden die Bakterien der Vorkultur zunächst für 5 min bei RT und 3.780 × g abzentrifugiert, das Pellet in 100 µL Restmedium aufgenommen und auf eine Bakterienplatten mit LB_{Ampicillin} Agar ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden abschließend ÜN bei 37 °C kultiviert und bis maximal eine Woche bei 4 °C gelagert bzw. die entstandenen Kolonien für weiteren Versuche direkt weiter verwendet.

3.5.10. Zählung von Zellen

Zur Zählung von Zellen wurde die entsprechende Zellsuspension zunächst gründlich homogenisiert und anschließend 10 µL der Suspension auf eine Zählkammer nach Thoma mit aufgelegtem Deckglas gebracht. Nach Auszählung der auf der Kammer enthaltenen sechzehn

Gruppenquadraten ergab sich die Anzahl der Zellen pro mL als Faktor der gezählten Zellen multipliziert mit 1×10^4 .

4. Ergebnisse

4.1. Stabile Expression von humanem APOBEC3G in Vero-Zellen

Um Zelllinien zu erstellen, die dauerhaft hA3G überexprimieren, wurde das retrovirale System verwendet. Hierbei wird ein zuvor erstellter, artifizieller retroviraler Vektor auf Zielzellen gebracht. Das sich in diesem Vektor befindende positivsträngige RNA Fragment, welches typischerweise für ein „gene of interest“ sowie eine eukaryotische Resistenz kodiert, kann mithilfe der durch das Retrovirus bereitgestellten Proteine nach reverser Transkription in die DNA der Zielzelle integrieren. Die so transduzierte Zelle exprimiert zukünftig stabil das „gene of interest“ bzw. auch die Resistenz. Durch nachfolgende Vereinzelung können gezielt Zellen selektioniert werden, die ein besonders hohes Expressionsniveau des Gens erreichen. Das Expressionsniveau transduzierter Einzelzellen unterscheidet sich je nach Integrationsort der DNA aufgrund von für die Transkriptionsmaschinerie unterschiedlich gut zugänglicher Bereiche (Eu- bzw. Heterochromatin) oder angrenzender, unterschiedlich stark transkribierter Gene.

Zu Beginn meiner Arbeit wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise solche Einzelzellklone von Dr. Rebecca K. Holmes (King's College London, London, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt. Bei den Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 handelt es sich um hA3G-exprimierende Vero-Einzelzellklone mit einer Resistenz gegen Puromycin. Die Zelllinie 023 ist eine auf dem gleichen Prinzip beruhende Kontrolllinie, die jedoch aus einem Gemisch Puromycin-resistenter Vero-Zellen besteht. Für die Vermittlung dieser Resistenz wurde der entsprechende Vektor ohne hA3G verwendet (Leervektor) und keine Vereinzelung durchgeführt.

4.1.1. Immunfluoreszenzfärbung von humanem APOBEC3G

Um das hA3G-Expressionsniveau der Einzelzellklone zu überprüfen, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Als Antikörper gegen hA3G wurde ein Serum aus Kaninchen verwendet, welche im Labor von Prof. Dr. Michael Malim (King's College London, London, Vereinigtes Königreich) mit dem Peptid NH₂-PFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAIL-

QNQEN-COOH immunisiert wurden. Bei diesem Peptid handelt es sich um die letzten 28 AS des C-Terminus (357-384) des hA3G-Proteins. Falls nicht anders angegeben wird dieses Antiserum im Folgenden für alle Detektionen von hA3G verwendet (Immunfluoreszenzfärbungen, Western-Blots, Durchflusszytometrie).

Abb. 4.1 zeigt Immunfluoreszenzfärbungen von hA3G, DCP1A und DAPI der Zelllinien 023, 024-1, 024-2 und 024-3, welche für nachfolgende Experimente verwendet wurden.

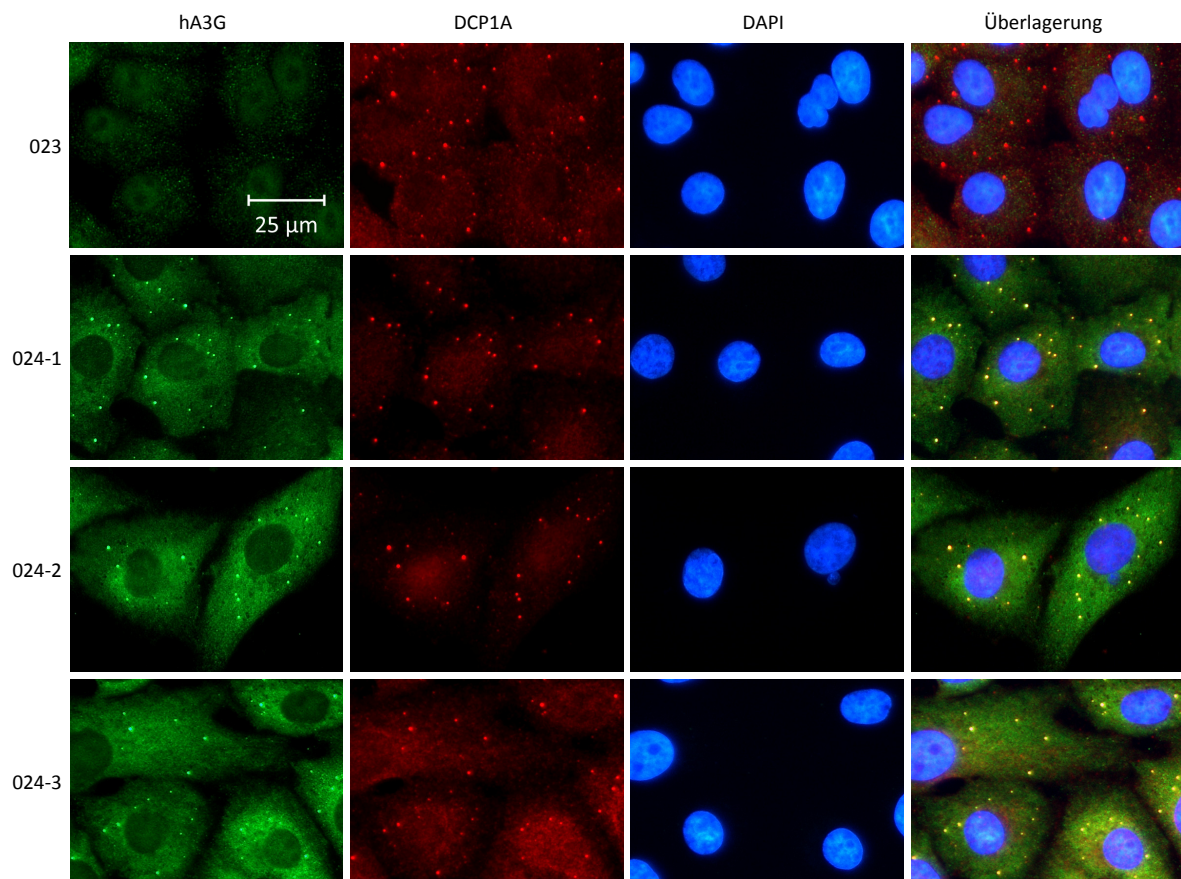


Abb. 4.1 | Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien 023, 024-1, 024-2 und 024-3. hA3G ist zytoplasmatisch diffus lokalisiert und außerdem in P-bodies, RNA-reichen Mikrodomänen, konzentriert. In den Einzelzellklonen 024-1, 024-2 und 024-3 zeigt sich daher eine verstärkte Färbung des Cytoplasmas sowie eine deutlichere Färbung dieser Foci (grün) die mit der roten Färbung des DCP1A kolokalisiert. P-bodies werden auch in den Kontrollzellen 023 angefärbt. Bei Färbung dieser Zellen mit dem hA3G-spezifischen Antiserum kann jedoch nur unspezifischer Hintergrund detektiert werden.

In Abb. 4.1 ist zu erkennen, dass hA3G positive Zellen das Protein zytoplasmatisch exprimieren. Gleichzeitig findet eine verstärkte Lokalisation des Proteins in abgegrenzten Foci statt. Hierbei handelt es sich um so genannte P-bodies – RNA reiche Mikrodomänen in denen hA3G mit mRNAs, kleinen RNA Spezies sowie RNA-bindenden Proteinen kolokalisiert. DCP1A ist ein Marker dieser P-bodies, da dessen Hauptfunktion im Entfernen der 5'-Cap-

Struktur von mRNAs besteht, welche in diesen Foci abgebaut werden. Eine Kolokalisation in allen drei ha3G-positiven Zelllinien ist deutlich zu erkennen.

4.1.2. Detektion von humanem APOBEC3G mit Hilfe des Western-Blots

Um die Stärke der ha3G Expression in den verschiedenen Einzelzellklonen besser quantifizieren zu können, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Da hier eine bestimmte Menge an zellulärem Gesamtprotein eingesetzt wird, ist ein Vergleich der Stärke der detektierten Proteinbanden untereinander ein Maß für die unterschiedlich starke Expression des entsprechenden Proteins.

Abb. 4.2 zeigt einen Western-Blot der Kontrolllinie 023 bzw. der Einzelzellklone 024-1, 024-2 und 024-3 mit 25 µg eingesetztem Gesamtprotein und Detektion von ha3G. Als Kontrolle wurde außerdem GAPDH detektiert, nachdem der Blot gestrippt wurde.

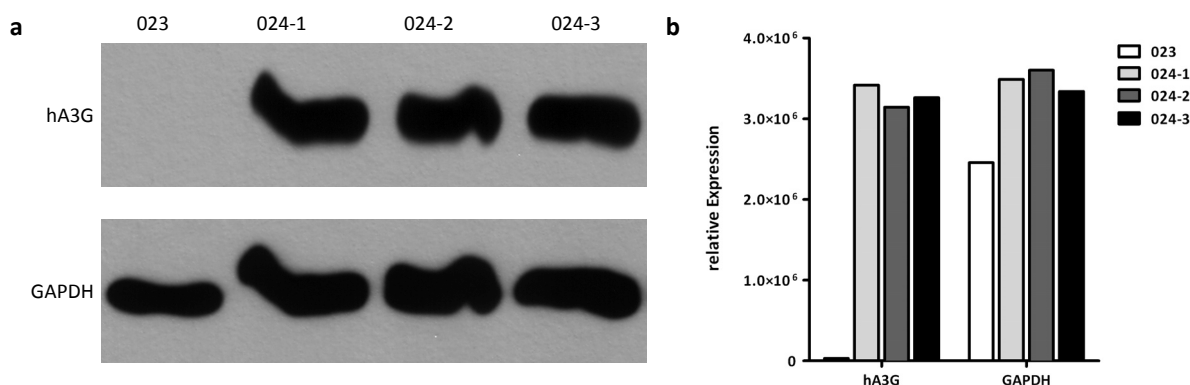


Abb. 4.2 | **Detektion von ha3G mit Hilfe des Western-Blots.** ha3G wird in vergleichbaren Mengen von den Zelllinien 024-1, 024-2 sowie 024-3 exprimiert (a, b). In den Kontrollzellen 023 kann das ha3G-spezifische Antiserum kein Protein detektieren (a, b). Da pro Zelllinie insgesamt 25 µg Gesamtprotein eingesetzt wurden, wird das als Ladekontrolle gefärbte Protein GAPDH zu vergleichbaren Mengen detektiert.

Es ist zu erkennen, dass alle ha3G-positiven Linien vergleichbare Mengen an ha3G exprimieren. GAPDH wird dagegen als ubiquitäres Protein in allen Linien mit vergleichbarer Menge detektiert. Das zur Detektion von ha3G verwendete Antiserum ist hochspezifisch, da im Gegensatz zu 024-1, 024-2 und 024-3 bei der Kontrolllinie 023 keine Färbung beobachtet werden konnte.

4.1.3. Durchflusszytometrische Analyse von humanem APOBEC3G

Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien wirklich um Einzelzellklone handelt, wurde eine durchflusszytometrische Messung der Linien 024-1, 024-2 und 024-3 sowie der Kontrolllinie 023 durchgeführt, bei der hA3G gefärbt wurde.

Exprimieren alle in einer Probe verwendeten Zellen die gleiche Menge an Protein, so entstehen in der detektierten Fluoreszenzintensität des angefärbten Proteins nur geringe Schwankungen, die zu einem schärferen Peak führen, als dies bei Zellen mit unterschiedlich ausgeprägten Expressionsniveaus der Fall wäre. Besitzt eine Zellpopulation bei durchflusszytometrischer Messung also einen sehr diskreten, positiven Fluoreszenzpeak eines gefärbten Proteins, so kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zellen um Klone einer Einzelzelle handelt.

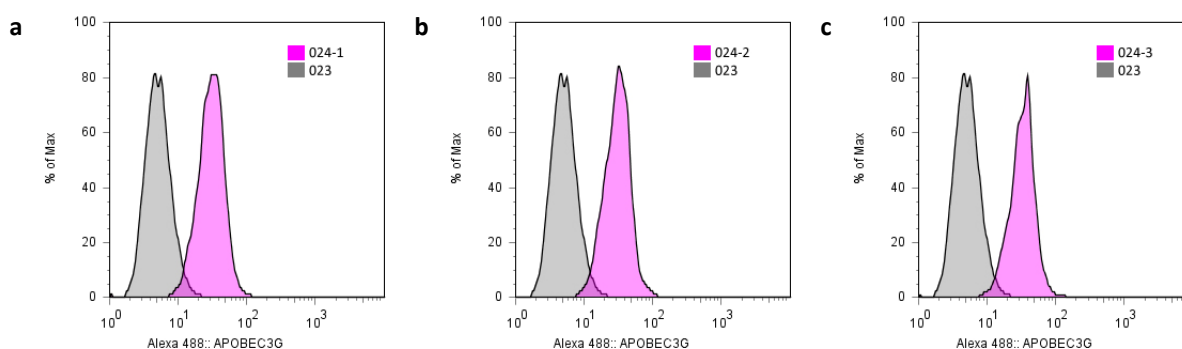


Abb. 4.3 | **Durchflusszytometrische Analyse von hA3G-exprimierenden Einzelzellklonen.** Deutlich erkennbar sind die diskreten Fluoreszenzpeaks bei der Messung der Linien 024-1 (a), 024-2 (b) und 024-3 (c) im Vergleich zu dem Fluoreszenzpeak, der durch Abwesenheit von hA3G in den Kontrollzellen 023 entsteht (Hintergrundfärbung).

In Abb. 4.3 ist deutlich zu erkennen, dass alle hA3G-positiven Zelllinien Klone einer Einzelzelle sein müssen, da die detektierten hA3G-Fluoreszenzpeaks sehr diskret sind. Wären Zellen mit unterschiedlich starkem hA3G-Expressionsniveaus innerhalb einer Population vorhanden, so würde sich der Peak im Vergleich zu dem der Kontrolle deutlich verbreitern.

4.1.4. Einfluss von humanem APOBEC3G auf das Zellwachstum

Um ausschließen zu können, dass das in den Einzelzellklonen exprimierte hA3G Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen nimmt, wurde eine Analyse mit CFSE durchgeführt. CFSE ist ein fluoreszierender, für die Zellen nicht toxischer Farbstoff, der es ermöglicht die Proliferationsrate von Zellen zu vergleichen. Einmal von Zellen aufgenommen, bindet CFSE

durch seine Succinimidylgruppe an intrazelluläre, zytoplasmatische Moleküle und wird daher nicht mehr abgegeben. Teilt sich die Zelle, so wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben – die Fluoreszenzintensität halbiert sich.

Abb. 4.4 zeigt die durchflusszytometrische Messung der Linien 023, 024-1, 024-2 und 024-3 direkt, bzw. drei Tage nach Behandlung mit CFSE

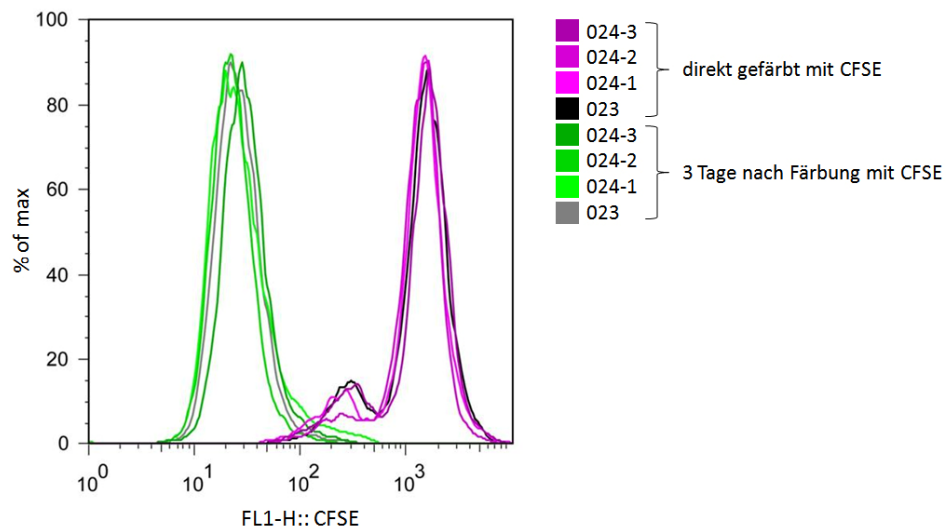


Abb. 4.4 | **Analyse des Proliferationsverhaltens von hA3G-exprimierenden Einzelzellklonen.** Drei Tage nach Färbung mit CFSE ist die Fluoreszenzintensität aller Zelllinien bedingt durch mehrmalige Teilung gleichermaßen abgefallen. Das Proliferationsverhalten der Linien 024-1, 024-2 und 024-3 sowie der Kontrolllinie 023 ist folglich identisch.

Drei Tage nach Färbung mit CFSE hat sich die Fluoreszenzintensität aller gemessenen Linien zu gleichen Teilen verringert. Die Überexpression von hA3G in den Linien 024-1, 024-2 und 024-3 hat demnach keinen Einfluss auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen im Vergleich zur Kontrolllinie 023.

4.2. Einfluss von humanem APOBEC3G auf die Replikation des Masernvirus

Nachdem sichergestellt war, dass die vorhandenen Einzelzellklone hA3G auf einem hohen Niveau exprimieren, sollte der Einfluss dieser Überexpression auf die Replikation des MV als Vertreter der Viren mit einzelsträngiger genomischer RNA negativer Polarität untersucht werden.

Für diese Untersuchungen standen verschiedene Virus-Stämme zur Verfügung. Direkt infizierbar sind die vorhandenen, auf Vero-Zellen beruhenden Linien nur durch Stämme, die in der Lage sind CD46 als Rezeptor zu benutzen. Dies ist bei Stämmen der Fall, die sich vom Impfstamm MV^{Edmonston} ableiten. Wildtypstämme, wie der ursprünglich im asiatischen Raum isolierte Stamm MV^{IC323}, benutzen CD150 (oder SLAM) als Rezeptor und können Vero-Zellen nicht *per se* infizieren. Um trotzdem eine Untersuchung des Replikationsverhaltens dieses Wildtypstammes unter dem Einfluss der hA3G-Überexpression durchführen zu können, wurde den Zellen vor Infektion mit Hilfe des retroviralen Systems CD150 zur Verfügung gestellt. Dazu dienten VSV-G pseudotypisierte, retrovirale Partikel, die eine Integration des CD150-Gens in die DNA der zu infizierenden Zellen ermöglichten. Nach Transduktion eines prozentual hohen Anteiles der Zellen (> 75 %) ist so die Infektion der hA3G-exprimierenden Vero-Zellen unter Ausbildung von Synzytien möglich.

Um die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur leichter verfolgen zu können, wurden rekombinante MV-Stämme verwendet, die das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) als eigenständiges Protein exprimieren. Die Expression von EGFP erfolgt bei dem verwendeten rekombinanten Impfstamm rMV^{Edtag}EGFPCAMH und dem rekombinanten Wildtypstamm rMV^{IC323}EGFP noch vor der Expression des N-Proteins. Infizierte Zellen bzw. Synzytien emittieren nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Licht der Wellenlänge 509 nm, das mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem Fluoreszenzreader detektiert bzw. quantifiziert werden kann.

4.2.1. hA3G-vermittelte Restriktion der Bildung von Synzytien

rMV^{Edtag}EGFPCAMH

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen der oben beschriebenen Einzelzellklone ohne Vorbehandlung auf 6 Well Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden später mit einer MOI von 0,1 bezogen auf die ausgesäte Zellzahl infiziert. Zum Zeitpunkt nahe dem maximalen zytopathischen Effekt (ca. drei Tage nach Infektion) wurde das Fortschreiten der Infektion der einzelnen Zelllinien zunächst am Fluoreszenzmikroskop verglichen.

Abb. 4.5 zeigt repräsentative Aufnahmen von Infektionen der Linie 023 sowie 024-2 mit dem grün fluoreszenten Stamm rMV^{Edtag}EGFPCAMH.

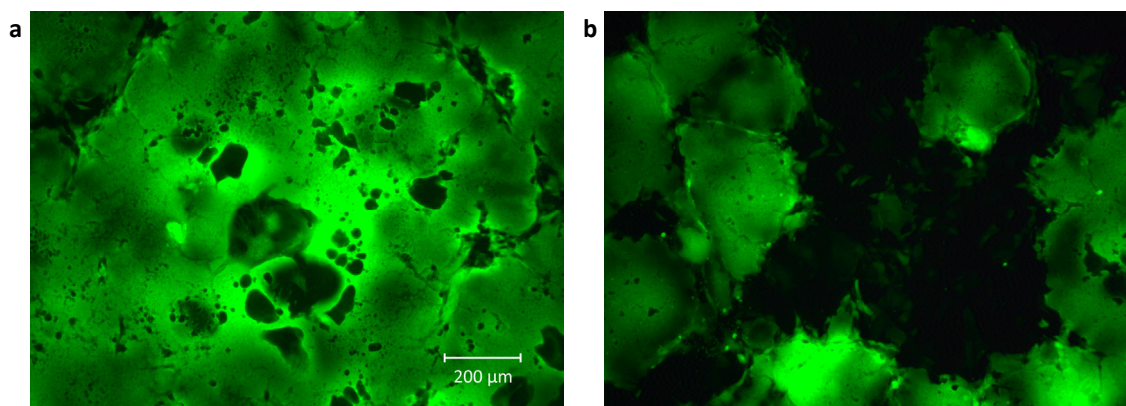


Abb. 4.5 | Synzytienbildung in O23 und O24-2 3 Tage nach Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH. Die Synzytienbildung auf den hA3G-exprimierenden O24-2-Zellen (b) ist im Vergleich zu der auf den Kontrollzellen O23 (a) reduziert.

Der Vergleich der unterschiedlich ausgeprägten Anzahl und Größe der auf den verschiedenen Zelllinien entstandenen Synzytien lässt den Schluss zu, dass die Zell-Zell-Fusion von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf hA3G-exprimierenden Zellen langsamer verläuft bzw. gehemmt ist. Bei dem in Abb. 4.5 gezeigten Bild von infizierten O24-2-Zellen handelt es sich um eine repräsentative Aufnahme, die so vergleichsweise auch bei den Linien O24-1 und O24-3 zu beobachten war.

rMV^{IC323}EGFP

Um die hA3G-exprimierenden Zelllinien mit dem rekombinanten Wildtypstamm rMV^{IC323}EGFP infizieren zu können, wurden 5×10^4 Zellen auf 6 Well Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden später mit 200 μ l Überstand von 293T Producer-Zellen behandelt, die pseudotypisierte, das CD150-Gen enthaltene Partikel produzieren (transfizierter retroviraler Vektor pcMFLAM). Zwei Tage später wurden diese Zellen dann mit $1,5 \times 10^4$ pfu rMV^{IC323}EGFP infiziert.

Abb. 4.6 zeigt zunächst die Expression von CD150 in Vero-Zellen, drei Tage nach Transduktion mit einer vergleichbaren Menge des oben genannten Überstandes in einer Immunfluoreszenzfärbung. Als Vergleich werden außerdem untransduzierte Vero-Zellen sowie dauerhaft CD150-positive Vero-Einzelzellklone (VerohSLAM) gezeigt.

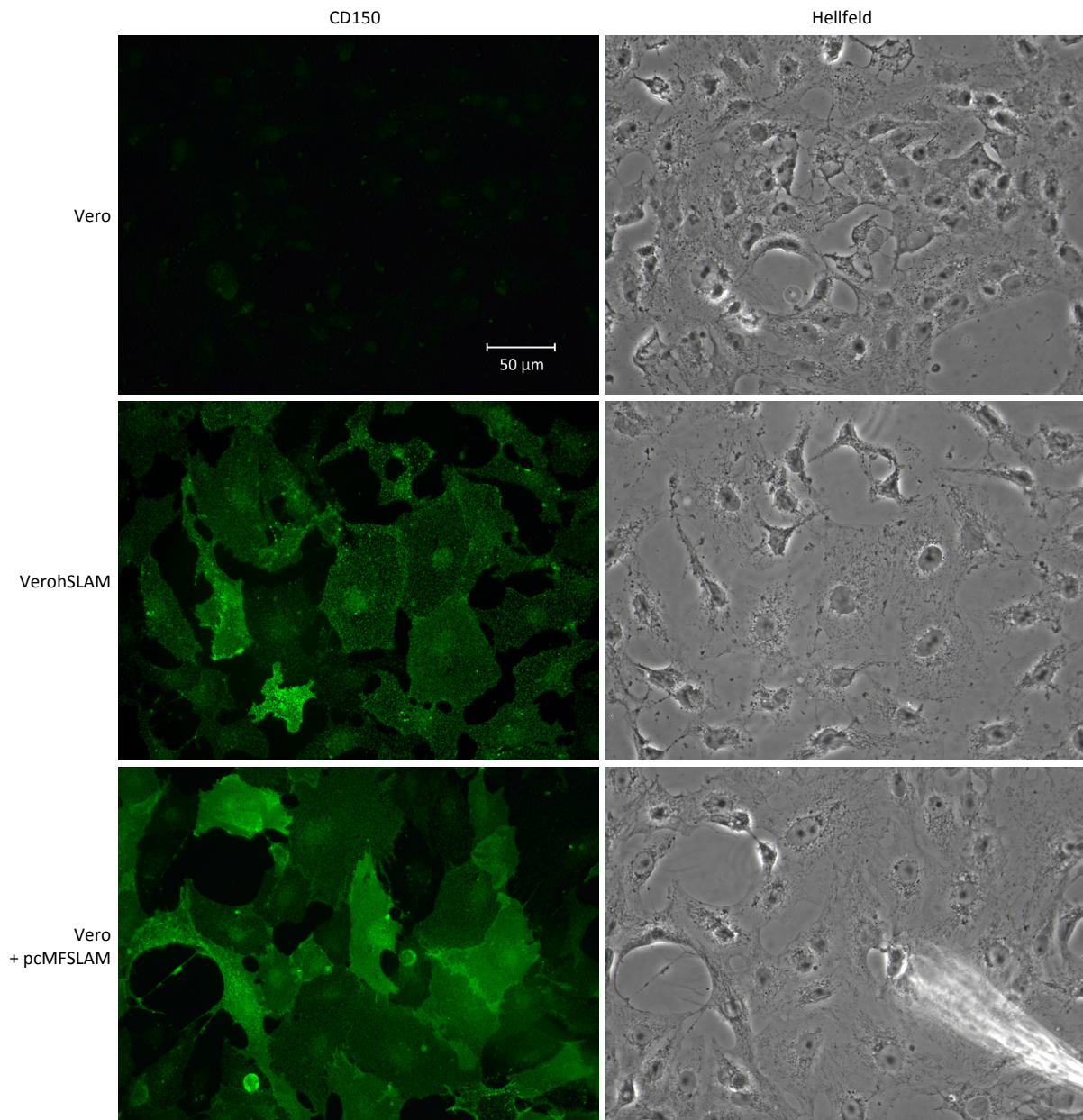


Abb. 4.6 | **Expression von CD150 vermittelt durch pseudotypisierte, retrovirale Partikel.** Die Expression von CD150, die auf CD150-negativen Vero-Zellen durch Transduktion mit pseudotypisierten, retroviralen Partikeln vermittelt wird, ist mit der vollständig positiver Zellen (VerohSLAM) vergleichbar. Unbehandelte Vero-Zellen zeigen nur Hintergrundfärbung.

Aus Abb. 4.6 wird ersichtlich, dass die Transduktion mit pseudoretroviralen Partikeln zur Vermittlung der CD150-Expression in ihrer Effizienz durchaus mit der einer vollständig CD150-positiven Linie (VerohSLAM) vergleichbar ist. Daher ist eine Bereitstellung von CD150 mit Hilfe des oben erwähnten Systems für Zwecke der Infektion mit wildtypischem MV gut möglich.

Abb. 4.7 zeigt repräsentative Aufnahmen der Kontrolllinie 023 sowie der hA3G-Linie 024-2 drei Tage nach Infektion mit dem grün fluoreszierenden Stamm rMV^{IC323}EGFP.

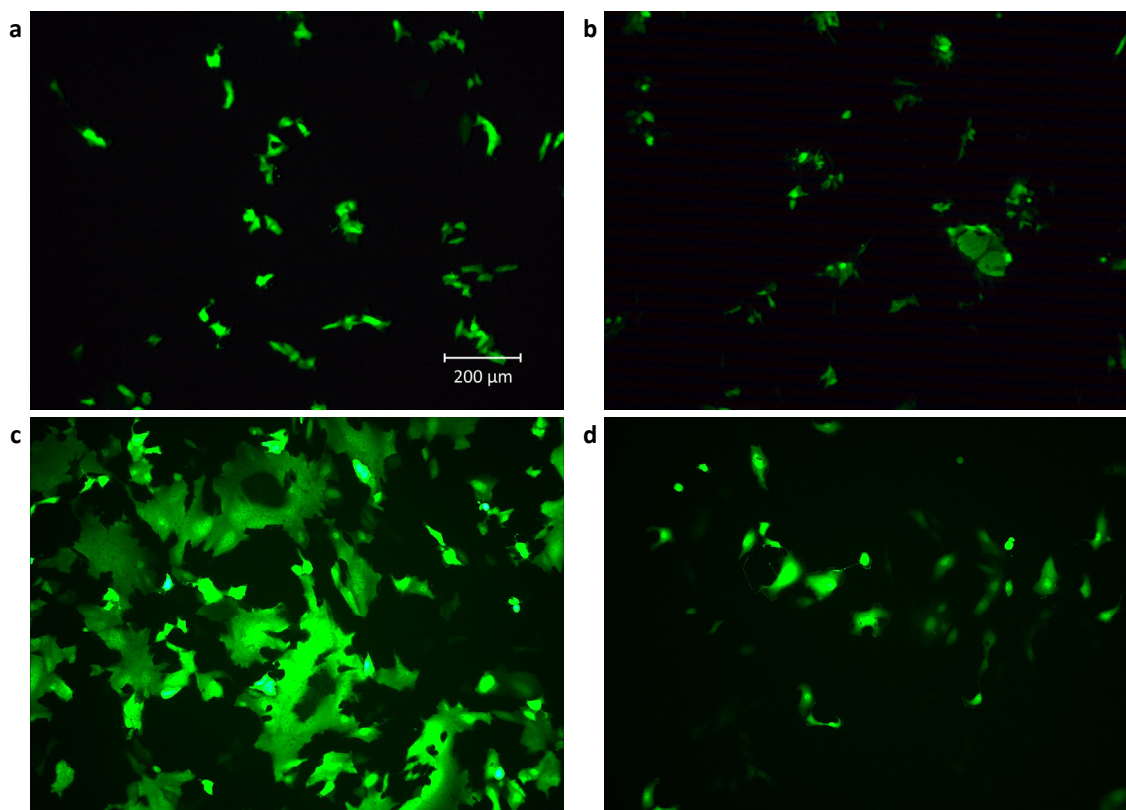


Abb. 4.7 | Synzytienbildung in CD150-transduzierten 023 und 024-2 Zellen 3 Tage nach Infektion mit $rMV^{IC323}EGFP$. Die Synzytienbildung auf den hA3G-exprimierenden 024-2-Zellen (**d**) ist im Vergleich zu der auf den Kontrollzellen 023 (**c**) reduziert. Untransduzierte 023-Zellen (**a**) und 024-2 Zellen (**b**) zeigen nur vereinzelt Infektion.

Die Benutzung des Wildtyprezeptors CD150 durch $rMV^{IC323}EGFP$ führt auf nicht vollständig CD150-positiven Zellen zu einem anderen Phänotyp der Infektion als dies z. B. bei $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ und dem auf jeder Zelle vertretenen CD46 der Fall ist (vgl. Abb. 4.5). Trotz der hohen Transduktionsrate und der damit einhergehenden Expression von CD150 erreicht die Infektion der transduzierten Zellen mit $rMV^{IC323}EGFP$ nicht die gleiche Ausprägung der Synzytienbildung, wie sie bei 100 % CD150-positiven Zellen (VerohSLAM) beobachtet wird. Die Stärke der Synzytienbildung reicht jedoch aus um mit Sicherheit sagen zu können, dass die Replikation des Wildtypstammes $rMV^{IC323}EGFP$ auf den hA3G-exprimierenden Zellen 024-2 im Vergleich zur Kontrolllinie 023 gehemmt ist. Bei dem in Abb. 4.7 gezeigten Bild von infizierten 024-2-Zellen handelt es sich um eine repräsentative Aufnahme, die vergleichsweise so auch bei den Linien 024-1 und 024-3 zu beobachten war.

4.2.2. hA3G-vermittelte Reduktion von viral exprimiertem EGFP

Um die im Fluoreszenzmikroskop sichtbare Reduktion quantifizieren zu können, wurde zunächst die Fluoreszenzintensität infizierter Zellen bestimmt (EGFP-Expression). Hierzu

wurden identische Ansätze wie unter 4.2.1. in einem Fluoreszenzreader von TECAN gemessen.

rMV^{Edtag}EGFPCAMH

In Abb. 4.8 werden die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensitäten aus fünf mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten Wells einer 6 Well Platte mit Vero-Zellen, Kontrollzellen 023, sowie hA3G-exprimierenden 024-1-, 024-2- und 024-3-Zellen aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten miteinander verglichen.

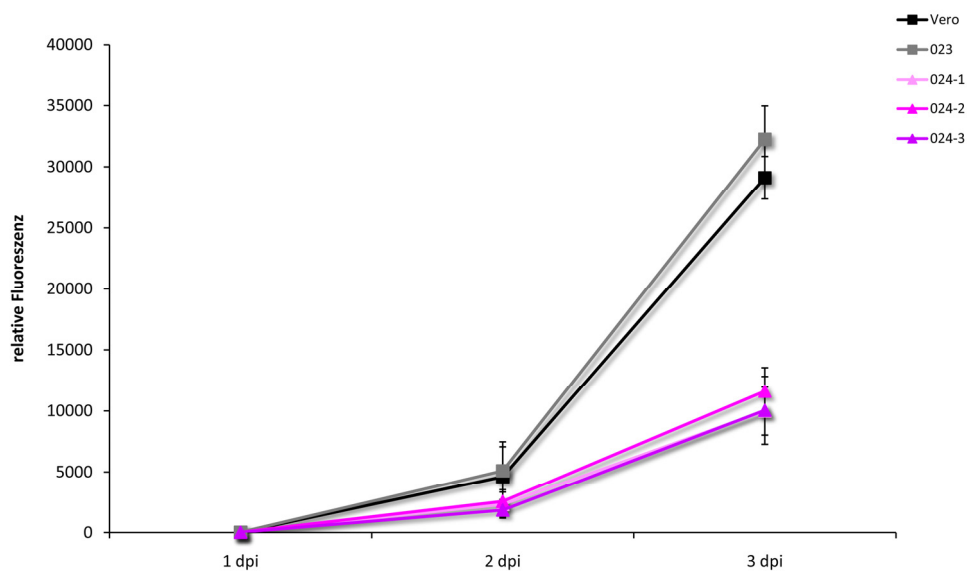


Abb. 4.8 | Reduktion von durch rMV^{Edtag}EGFPCAMH exprimiertem EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen. Die Expression von viral exprimiertem EGFP auf den hA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 ist zwei und drei Tage nach Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrolllinie 023 reduziert.

Da sich die gemessenen Fluoreszenzintensitäten direkt proportional zur Menge des exprimiertem EGFP verhalten, zeigt Abb. 4.8 deutlich, dass die Menge an viral exprimiertem EGFP in den Linien 024-1, 024-2 und 024-3 im Vergleich zur Kontrolllinie 023 zwei und drei Tage nach Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH um 64 bis 69 % reduziert ist.

rMV^{IC323}EGFP

In Abb. 4.9 werden die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensitäten aus fünf mit rMV^{IC323}EGFP infizierten Wells einer 6 Well Platte mit Vero-Zellen, Kontrollzellen 023, sowie

hA3G-exprimierenden 024-1-, 024-2- und 024-3-Zellen aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten miteinander verglichen.

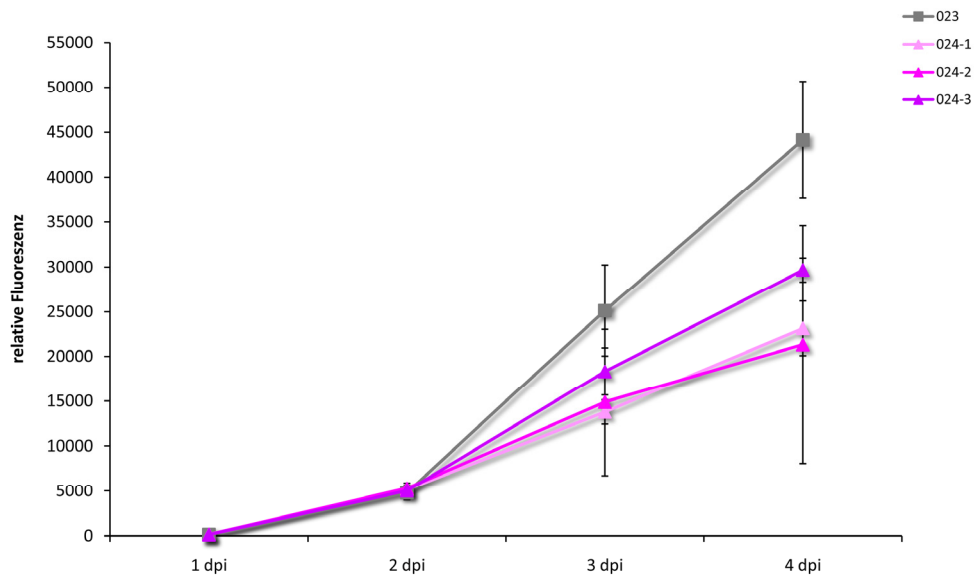


Abb. 4.9 | Reduktion von durch rMV^{IC323} EGFP exprimiertem EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen. Die Expression von viral exprimiertem EGFP auf den hA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 ist vier Tage nach Infektion mit rMV^{IC323} EGFP um durchschnittlich die Hälfte im Vergleich zur Kontrolllinie 023 reduziert.

Wie schon in Abb. 4.8 für rMV^{Edtag} EGFPCAMH gezeigt, so ist auch bei dem rekombinanten Wildtypstamm rMV^{IC323} EGFP (Abb. 4.9) die Menge an viral exprimiertem EGFP in den hA3G-exprimierenden Linien 024-1, 024-2 und 024-3 im Vergleich zur Kontrolllinie 023 vier Tage nach Infektion um durchschnittlich 45 % reduziert.

4.2.3. hA3G-vermittelte Reduktion viraler Titer

Wachstumskurven von rMV^{Edtag} EGFPCAMH

Durch die oben beschriebenen Versuche wurde zunächst nur gezeigt, dass die Anwesenheit von hA3G eine verminderte Expression des viral exprimierten EGFPs bewirkt. Um zu überprüfen, ob auch der gesamte Replikationszyklus der verschiedenen MV-Stämme von dieser Reduktion betroffen ist, wurde zusätzlich der resultierende Titer, also die Menge an entstehenden, infektiösen Viruspartikeln, in identischen Versuchsansätzen bestimmt.

Hierzu wurden parallele Ansätze wie unter 4.2.1. zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (1 dpi, 2 dpi, 3 dpi und 4 dpi) zunächst bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt die Menge des in den Wells entstandenen Gesamt-Virus (zellgebunden

sowie im Überstand) per Titration bestimmt. Abb. 4.10 zeigt die durch diese bestimmten Titer resultierenden Wachstumskurven („one step growth curves“) für rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf Vero-Zellen, Kontrollzellen 023 sowie den Linien 024-1, 024-2 und 024-3.

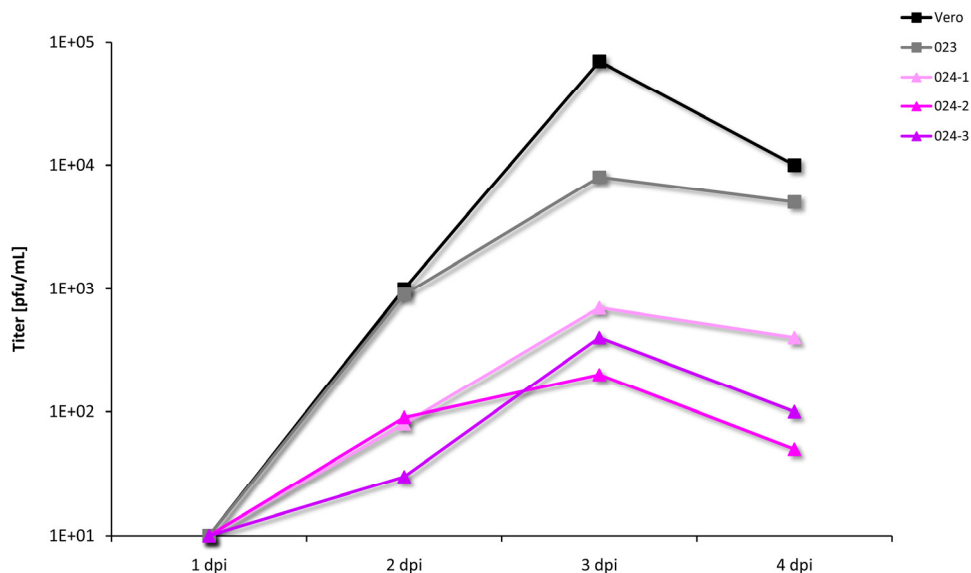


Abb. 4.10 | Wachstumskurve von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf hA3G-exprimierenden Vero-Zellen. Die Menge an entstandenen infektiösen rMV^{Edtag}EGFPCAMH-Partikeln auf den hA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 ist zwei, drei und vier Tage nach Infektion mindestens um das zehnfache im Vergleich zu Vero-Zellen und zur Kontrolllinie 023 um 90 bis 99 % reduziert.

Aus Abb. 4.10 wird ersichtlich, dass die Replikation von rMV^{Edtag}EGFPCAMH in hA3G-exprimierenden Zellen insgesamt gehemmt sein muss. Die entstandene Menge an infektiösem Virus in den Linien 024-1, 024-2 und 024-3 ist zwei, drei und vier Tage nach Infektion im Vergleich zu Vero-Zellen und der Kontrolllinie 023 stets um mindestens den Faktor Zehn reduziert. Dieses Experiment beweist, dass die durch hA3G vermittelte Hemmung nicht nur die Expression des dem N-Protein vorgelagertem EGFP, sondern den gesamten Replikationszyklus des Virus betreffen muss.

Wachstumskurven von rMV^{IC323}EGFP

Um zu überprüfen, ob die Reduktion viraler Titer auch für rMV^{IC323}EGFP besteht, wurden parallele Ansätze wie unter 4.2.1. nach Transduktion mit pseudoretroviralen Partikeln zur Vermittlung der CD150-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (3 dpi und 4 dpi) ebenfalls bei -80 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt titriert.

Abb. 4.11 zeigt die bestimmten Titer für rMV^{IC323}EGFP auf den Kontrollzellen 023 sowie den Linien 024-1, 024-2 und 024-3.

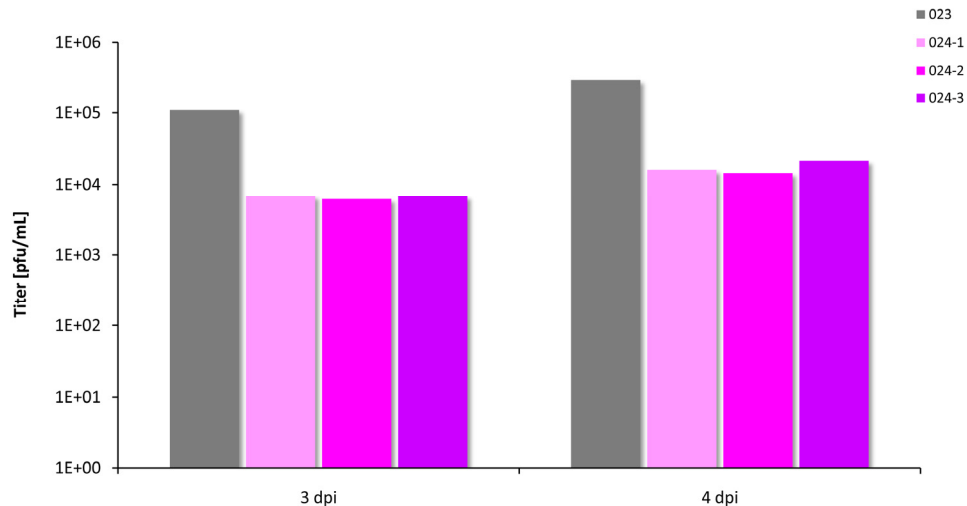


Abb. 4.11 | Titer von rMV^{IC323}EGFP auf HA3G-exprimierenden Vero-Zellen drei und vier Tage nach Infektion. Die Menge an entstandenen infektiösen rMV^{IC323}EGFP-Partikeln auf den HA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 ist drei und vier Tage nach Infektion um das zehnfache im Vergleich zur Kontrolllinie 023 reduziert.

Erkennbar in Abb. 4.11 ist, dass eine HA3G-vermittelte Reduktion viraler Titer für das rekombinante Wildtyp-Virus rMV^{IC323}EGFP ebenfalls besteht. Durch die nicht flächendeckende Expression von CD150 auf den verwendeten Vero-Zelllinien verläuft die Infektion wie schon unter 4.2.1. beschrieben anders ab. Drei und vier Tage nach Infektion wird in den Kontrollzellen 023 ein zehnmal höherer Titer erreicht ($\sim 10^5$ pfu/mL), als dies in den HA3G-exprimierenden Linien der Fall ist ($\sim 10^4$ pfu/mL). Diese Reduktion viraler Titer ist außerdem, wie schon für rMV^{Edtag}EGFPCAMH beobachtet, bei allen untersuchten Zeitpunkten gleichermaßen vorhanden.

Passagierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH

Eine Passage eines Virus wird durchgeführt, indem aus infizierten Zellkulturen Virus präpariert, also reisoliert wird. Bei diesem Virus handelt es sich um die erste Passage. Wird diese Präparation erneut für eine Infektion verwendet und anschließend wieder präpariert handelt es sich dann um die zweite Passage usw. Passagierungen werden durchgeführt, um zu untersuchen, ob bestimmte, während der Infektion beobachteten Effekte akkumulieren, da sie auf Veränderungen der entstandenen Viruspartikel beruhen.

In Abb. 4.12 werden Titer solcher Passagierungen von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf Kontrollzellen oder HA3G-exprimierenden Zellen 024-2 und 024-3 dargestellt. Die Versuchsansätze wurden in 175 cm² Kulturflaschen durchgeführt. Das reisolierter Virus wurde titriert und eine neue Kulturfläche mit der gleichen Menge an infektiösen Partikeln wie zuvor infiziert, um die nächst höhere Passage zu erhalten.

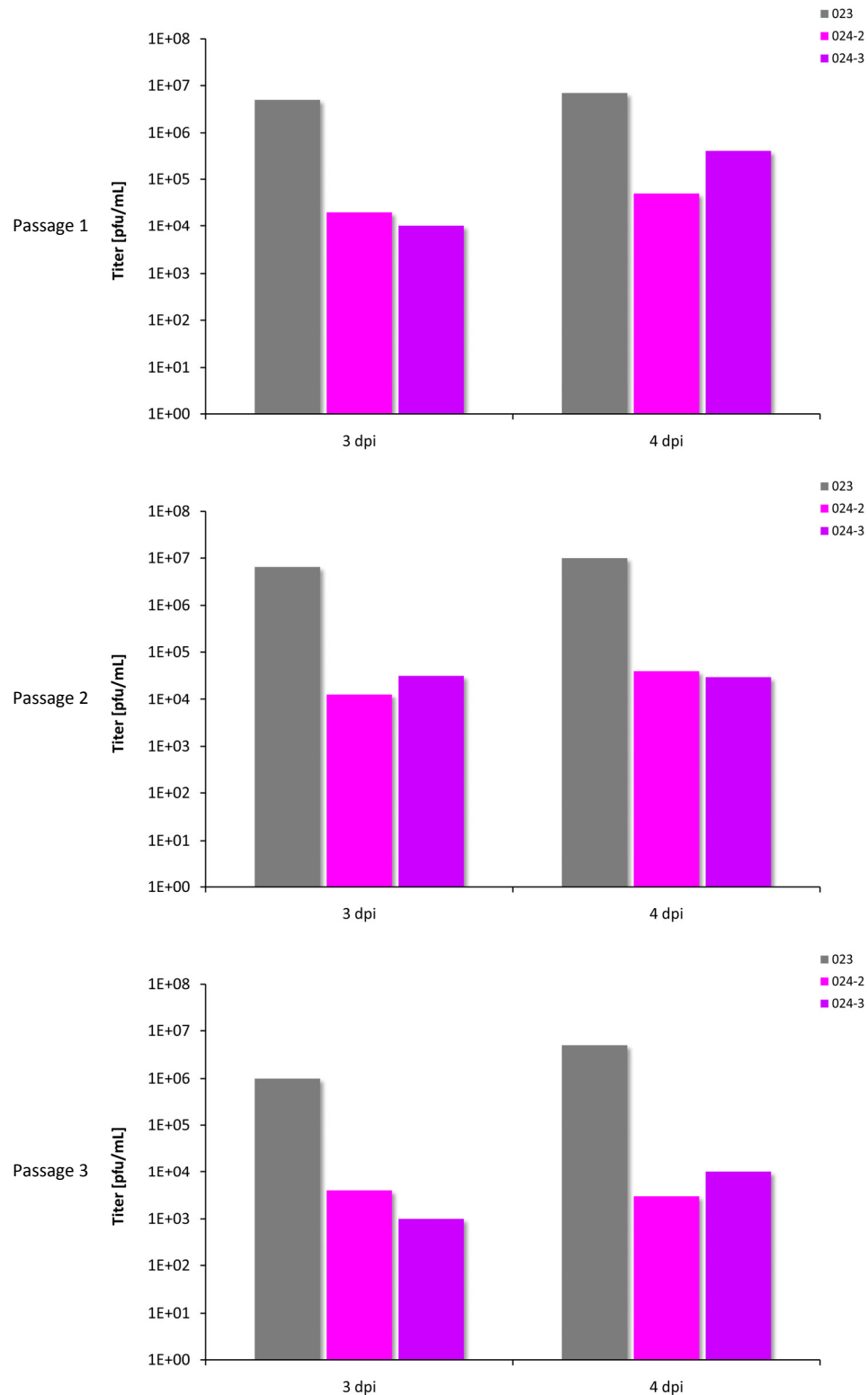


Abb. 4.12 | Passagierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf HA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien. Die Passagierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf HA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien führt zu einer geringen Verstärkung der Reduktion entstandener Titer.

Wie in Abb. 4.12 erkennbar ist, tritt bei Passagierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf HA3G-exprimierenden Vero-Zellen eine geringe Verstärkung der beobachteten Restriktion entstandener Titer ein. Diese Reduktion ist bei Verwendung der 175 cm² Kulturflaschen

stärker ausgeprägt, als dies bei Verwendung von 6 Well Zellkulturplatten beobachtet wurde. Der in 024-2- und 024-3-Zellen erreichte Titer liegt bei Passage 1 zunächst ein bis zwei Potenzen niedriger als in den Kontrollzellen. In Passage 3 fällt er dann teilweise jedoch auf über drei Potenzen unter den Titer, welcher in 023-Zellen erreicht wurde, ab. Wie schon bei den vorherigen Versuchen beobachtet, ist die Reduktion der Titer drei oder vier Tagen nach Infektion identisch.

4.2.4. Sequenzanalysen von rMV^{Edtag}EGFPCAMH

Einer der entscheidenden Mechanismen von hA3G bei der Restriktion von HIV beruht auf der Desaminierung von Cytosin zu Uracil im neu entstehenden cDNA-Strang des HIV-Genoms während der reversen Transkription als Teil des HIV-Replikationszyklus. Obwohl angenommen wird, dass hA3G hauptsächlich einzelsträngige DNA mutiert, wird in der Literatur auch die Fähigkeit des Proteins diskutiert, RNA zu desaminieren.

Um zu untersuchen, ob das in den Zelllinien 024-2 und 024-3 exprimierte hA3G in der Lage ist, mRNA von rMV^{Edtag}EGFPCAMH zu desaminieren, wurde Gesamt-RNA aus mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten Kontrollzellen 023 bzw. hA3G-exprimierenden 024-2- und 024-3-Zellen präpariert. Anschließend wurde eine RT-PCR mit Oligo(dT)₁₈ Primern durchgeführt und aus der resultierenden cDNA per PCR Bereiche aus der N- bzw. M-Sequenz amplifiziert. Diese amplifizierten Fragmente wurden mit Hilfe des „pGEM®-T Easy Vector Systems“ der Firma Promega in pGEM®-T Easy-Vektoren kloniert. Durch Blau-Weiß-Selektion konnten diejenigen Klone per Minipräparation amplifiziert werden, die eines der jeweiligen DNA-Fragmente enthielten. Abschließend wurden die klonierten Bereiche der N- bzw. M-cDNA sequenziert und mit der ursprünglichen Sequenz verglichen. Es wurden 1.335 bp pro MV-N-cDNA-Fragment und 809 bp pro MV-M-cDNA-Fragment sequenziert. Insgesamt wurden 48 Klone für MV-N- bzw. 49 Klone für MV-M-cDNA aus der Kontrolllinie 023, 46 Klone für MV-N- bzw. 50 Klone für MV-M-cDNA aus der Linie 024-2 sowie 52 Klone für MV-N- bzw. 47 Klone für MV-M-cDNA aus der Linie 024-3 sequenziert.

In Tab. 3.1 bis Tab. 3.6 werden die Ergebnisse aller oben beschriebenen Sequenzierungen bzw. die Anzahl an detektierten Mutationen im Vergleich zur Original-Sequenz dargestellt.

Tab. 3.1 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 48 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH N-cDNA aus der Kontrolllinie 023.
Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 64.080. ×, nicht detektierbar.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	0	4	0
T	0	×	0	2
G	3	0	×	0
C	0	2	0	×

Tab. 3.2 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen von 49 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH M-cDNA aus der Kontrolllinie 023.
Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 39.641. ×, nicht detektierbar.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	1	2	0
T	1	×	0	2
G	0	0	×	0
C	1	2	0	×

Tab. 3.3 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen aus 46 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH N-cDNA aus der Linie 024-2. Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 61.410. ×, nicht detektierbar.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	3	31	0
T	2	×	1	9
G	7	2	×	1
C	1	4	1	×

Tab. 3.4 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen aus 50 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH M-cDNA aus der Linie 024-2. Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 40.450. ×, nicht detektierbar.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	3	16	0
T	1	×	1	7
G	5	0	×	0
C	0	6	1	×

Tab. 3.5 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen aus 52 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH N-cDNA aus der Linie 024-3. Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 69.420. ×, nicht detektierbar.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	2	29	1
T	2	×	0	9
G	5	0	×	3
C	0	3	0	×

Tab. 3.6 | Zusammenfassung aller sequenzierten Mutationen aus 47 Klonen für rMV^{Edtag}EGFPCAMH M-cDNA aus der Linie 024-3. Die gesamte Anzahl an sequenzierten Basen beträgt n = 38.023. ×, nicht möglich.

Original-Base	Mutation zu A	Mutation zu T	Mutation zu G	Mutation zu C
A	×	0	13	2
T	2	×	1	10
G	4	0	×	2
C	0	5	0	×

In Abb. 4.13 ist eine Zusammenfassung aller detektierten Mutationen pro untersuchter Zelllinie grafisch dargestellt.

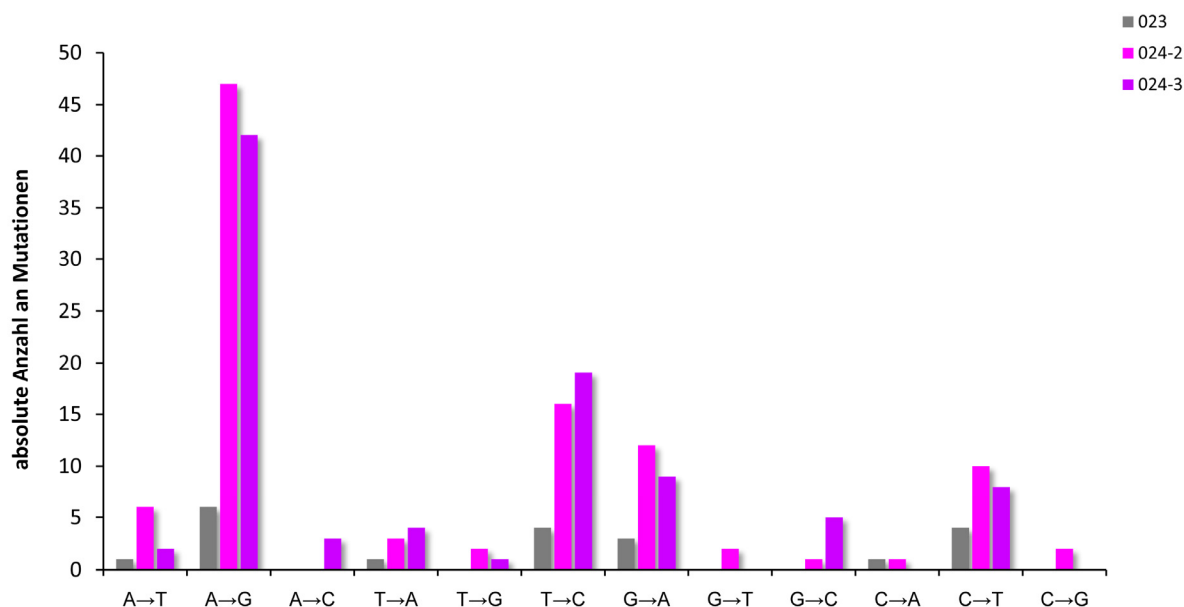


Abb. 4.13 | Sequenzanalysen von rMV^{Edtag}EGFPCAMH. Dargestellt ist die absolute Anzahl aller aufgetretenen Mutationen der sequenzierten Bereiche aus cDNAs des M- und N-Proteins von rMV^{Edtag}EGFPCAMH. Insgesamt wurden für die Kontrollzellen 023 97 Klone mit insgesamt 103721 bp, für die Linie 024-2 96 Klone mit insgesamt 101860 bp und für die Linie 024-3 99 Klone mit insgesamt 107443 bp sequenziert. In beiden hA3G-exprimierenden Linien ist eine vergleichsweise identische Erhöhung von Mutationen im Vergleich zur Kontrolllinie zu beobachten. Hierbei traten Mutationen von Adenosin zu Guanosin am häufigsten auf.

Aus Tab. 3.1 bis Tab. 3.6 sowie Abb. 4.13 wird ersichtlich, dass in den Sequenzen, die aus der Kontrolllinie 023 erhalten wurden, nur eine geringe Anzahl von Mutationen beobachtet werden kann (so genannte Hintergrundmutationen). Im Gegensatz dazu wurde bei Sequenzen, die aus den hA3G-exprimierenden Linien 024-2 und 024-3 erhalten wurden, eine erhöhte Anzahl an Mutationen detektiert. Hierbei fällt deutlich eine Präferenz für Mutationen von Adenin nach Guanin auf. Außerdem sind in einem geringeren Maße auch Mutationen von Thymin zu Cytosin, Guanin zu Adenin und Cytidin zu Thymin im Vergleich zur Kontrolllinie vermehrt aufgetreten. Zusammengefasst beträgt der beobachtete Anteil der Hintergrundmutationen in 023 ca. 0,2 Mutationen pro 1.000 bp und der der Linien 024-2 und 024-3 ca. 0,95 Mutationen pro 1.000 bp.

4.2.5. Quantifizierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH-RNAs mittels Real Time RT-PCR

In den vorangegangenen Experimenten wurde die durch hA3G verursachte Inhibition der MV Replikation direkt in hA3G-exprimierenden Zellen sowie indirekt durch Neuinfektion von Vero-Zellen mit präpariertem Virus durch Titration untersucht. Wie oben beschrieben erhöht sich die bei Titration beobachtete Inhibition auf mindestens den Faktor 10. Bei der durch die Titration bestimmten Menge an Viruspartikeln werden stets nur diejenigen Partikel erfasst, die funktional, also zur Bildung von Synzytien befähigt sind, da nur sie im Plaquetest identifiziert werden können.

Um die zu dieser erhöhten Reduktion führenden Mechanismen genauer zu identifizieren wurden mit Hilfe von Real Time RT-PCRs verschiedene MV RNA-Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert.

Reduktion von zellgebundener und genomischer RNA

$1,5 \times 10^5$ Kontrollzellen der Linie 023 sowie hA3G-exprimierende Zellen der Linien 024-1 und 024-2 wurden auf 6 Well Zellkulturplatten ausgesät und 24 h später mit einer MOI von 0,05 mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infiziert. Drei Tage später wurde RNA aus Zelllysaten sowie RNA aus gleichen Mengen an Kulturüberstand in Real Time RT-PCRs eingesetzt. Mit Hilfe MV-spezifischer Primer wurde die Menge an MV-mRNA in den verschiedenen Zelllysaten sowie die Menge an genomischer MV-RNA in den verschiedenen Überständen bestimmt.

Abb. 4.14 zeigt die Ergebnisse dieser Quantifizierungen relativ zueinander.

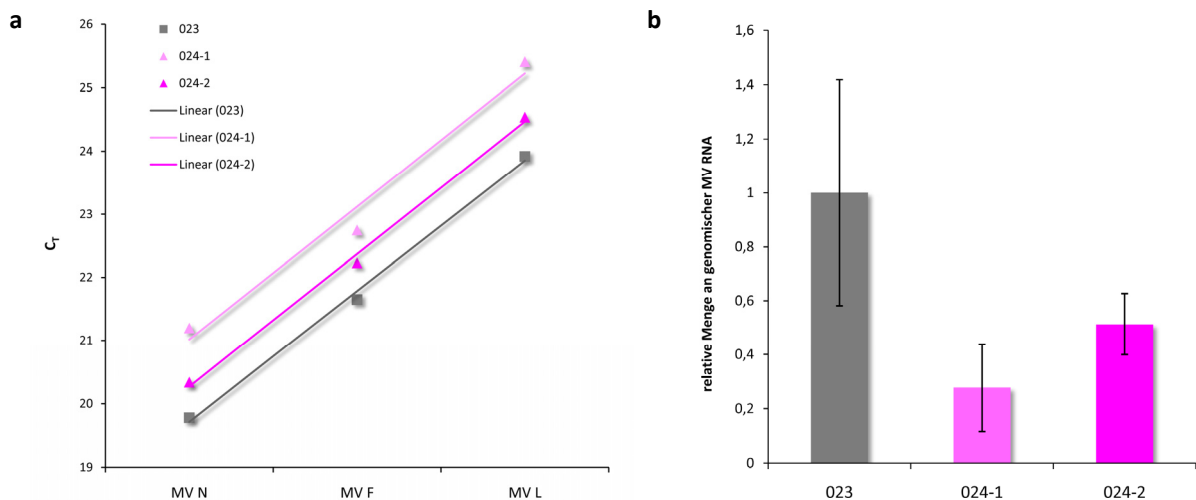


Abb. 4.14 | **Reduktion zellgebundener viraler RNAs und genomischer RNAs in präpariertem Überstand.** Die relative Menge an viraler RNA in Zelllysaten sowie die genomischer RNAs im Überstand aus mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten Zellen wurde mittels Real Time PCR bestimmt. **(a)** Im Vergleich zur Menge an detektierten MV-N-, MV-F-, und MV-L-RNAs in 023 Zellen ist die in 024-1 und 024-2 Zellen um 1-2 C_T-Einheiten reduziert. **(b)** Die relative Menge an genomischer RNA in Überständen aus 024-1 und 024-2 Zellen ist im Vergleich zu der in 023 Zellen um ca. 50-70 % reduziert.

Wie Abb. 4.14 zeigt, sind die ermittelten C_T-Werte in Lysaten aus 024-1 und 024-2 Zellen um ein bis zwei Einheiten höher, was einer zwei- bis vierfachen Menge an MV-N-, MV-F-, und MV-L-mRNAs in Lysaten aus 023 Zellen entspricht. Die Menge an genomischer MV-RNA im Überstand aus 023 Zellen ist im Vergleich zu der aus 024-1 und 024-2 Zellen um etwa 50-70 % reduziert.

Reduktion neu exprimierter viraler mRNAs

Analog zu dem in Abb. 4.14 gezeigten Versuch wurden gleiche Teile der so erhaltenen Kulturüberstände außerdem dazu verwendet, am Tag zuvor ausgesäte Vero-Zellen ($1,5 \times 10^5$) zu infizieren. Nach einer Stunde wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit saurem Puffer gewaschen, um nicht aufgenommenes Virus zu entfernen. Nach einer bzw. dreiundzwanzig Stunden wurde die RNA der infizierten Zellen präpariert und direkt in einer „one step“ Real Time RT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe einer MV-N spezifischen Sonde wurde die Menge an MV-N Transkripten in den verschiedenen Proben bestimmt.

Abb. 4.15 zeigt die relative Änderung der MV-N Transkriptmenge zwischen den zwei bestimmten Zeitpunkten (2 und 24 hpi) zueinander.

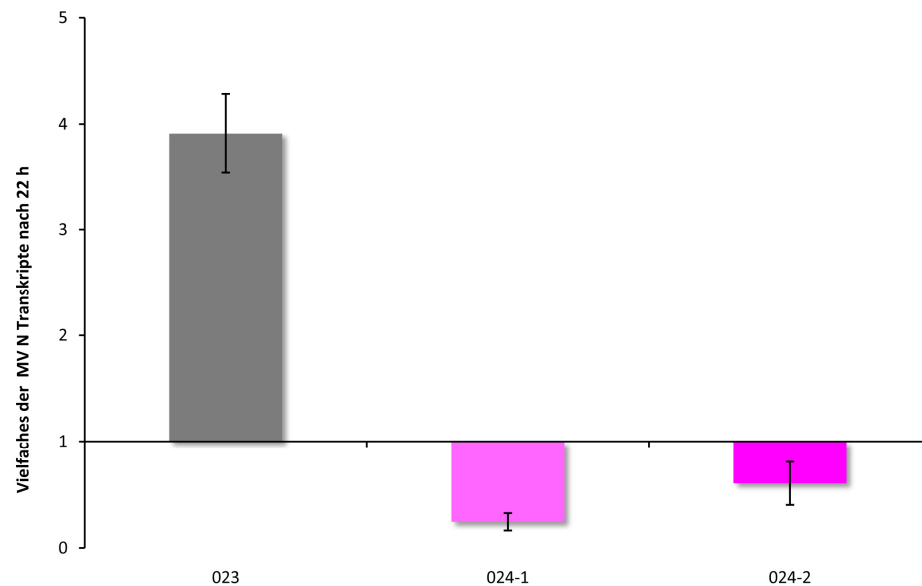


Abb. 4.15 | **Relative Änderung der MV-N Transkriptmenge zwischen 2 und 24 hpi.** In Abwesenheit von hA3G entstandenes rMV^{E_{dtag}}EGFP-CAMH im Kulturüberstand führt bei Neuinfektion von Vero-Zellen zu einem vierfachen Anstieg der MV-N Transkriptmenge nach 22 h. Bei Neuinfektion mit Kulturüberstand aus hA3G-exprimierenden 024-1- und 024-2-Zellen ist hingegen ein Abfall der Menge an MV-N Transkripten zu beobachten.

Während die vorhandene Menge an MV-N Transkripten mit Virus, welches aus den Kontrollzellen 023 erhalten wurde, um ca. den Faktor vier ansteigt, ist die Menge an MV-N Transkripten mit Virus aus den hA3G-exprimierenden Zelllinien 024-1 und 024-2 jedoch geringer als zuvor (Abb. 4.15).

4.3. Einfluss von FIP auf die Reduktion von exprimiertem EGFP

Die Bildung von Synzytien bei der Infektion von adhärenenten Vero-Zellen durch verschiedene MV-Stämme macht eine durchflusszytometrische Messung unmöglich, da die mehrkernigen Riesenzellen bei der Ablösung zerfallen. Der Vorteil einer durchflusszytometrischen Messung ist jedoch deren quantitative sowie qualitative Genauigkeit. Die Anwesenheit von FIP im Medium nach erfolgter Infektion von adhärenenten Zellen in Kultur verhindert die Fusion von Einzelzellen und somit die Bildung von Synzytien. Das Virus ist nun nur noch in der Lage sich intrazellulär zu replizieren. Eine Infektion neuer Zellen findet nicht statt, da freigesetztes, sich im Überstand befindendes Virus durch die Blockade des MV-Rezeptors durch FIP nicht mit der Zellmembran fusionieren kann.

Um zu untersuchen, ob die Expression von hA3G bereits Auswirkungen auf die intrazelluläre Expression von rMV^{E_{dtag}}EGFPCAMH-exprimiertem EGFP hat, wurden $1,5 \times 10^5$

Zellen auf 6 Well Platten ausgesät und 24 Stunden später mit $1,5 \times 10^4$ pfu infiziert. Nach einer Stunde wurde das Medium durch FIP-haltiges Medium ersetzt. Drei Tage später wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In Abb. 4.16 ist das Ergebnis dieser Messungen für die Zelllinien 023 und 024-2 dargestellt.

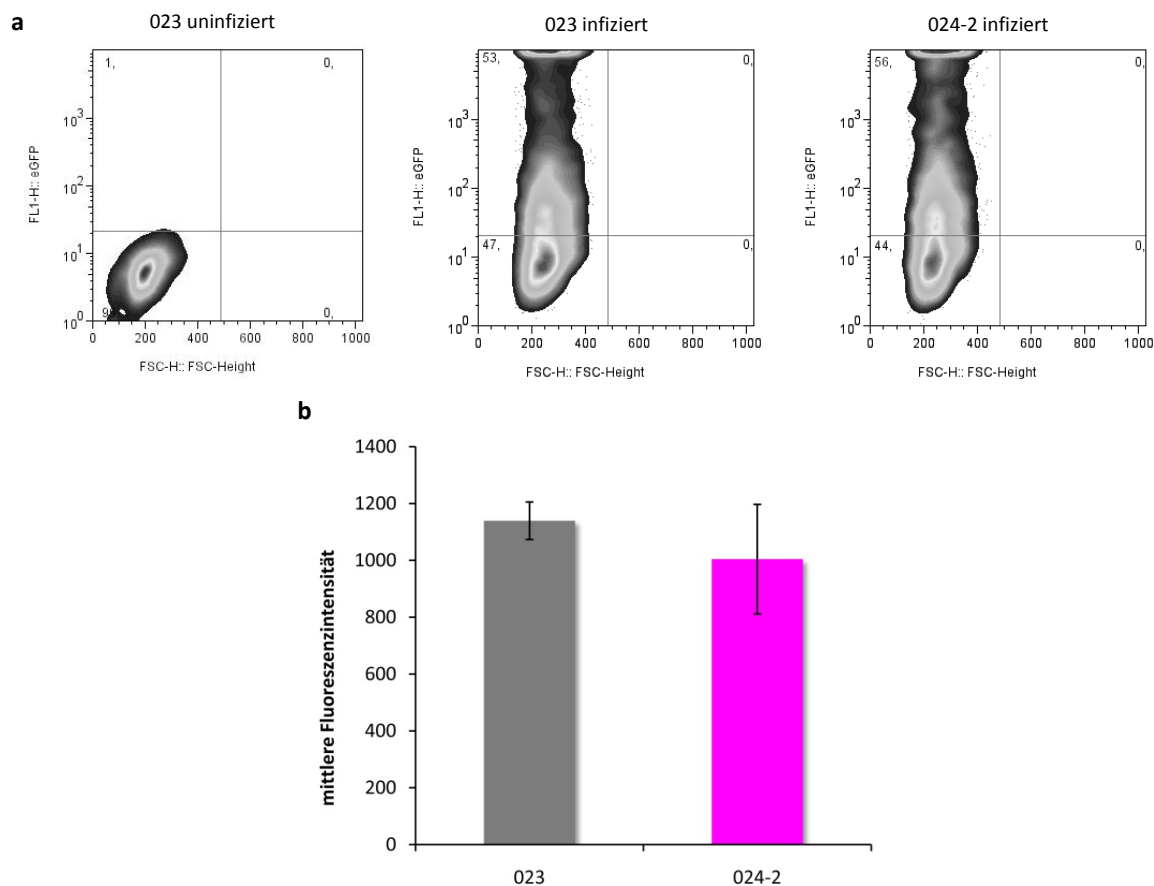


Abb. 4.16 | Durchflusszytometrische Messung von viral exprimiertem EGFP in Anwesenheit von FIP. Kontrollzellen (023) oder ha3G-exprimierende Zellen (024-2) wurden zunächst mit einer MOI von 1 mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infiziert. Nach einer Stunde wurde das Kulturmedium durch Medium mit FIP ersetzt. Drei Tage später wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von 10.000 dieser infizierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **(a)** Exemplarische Dot-Plots der gemessenen Zelllinien drei Tage nach Infektion. Als Maßstab für nicht-fluoreszente Zellen dienten uninfizierte 023 Zellen (nur Hintergrundfluoreszenz). **(b)** Die Quantitative Auswertung dreier gemittelter Versuchsansätze der infizierten, EGFP-positiven Zellen 023 und 024-2 mit Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität ergibt keine signifikanten Unterschiede.

Wie in Abb. 4.16 ersichtlich ist, besteht bei der intrazellulären EGFP-Expression von rMV^{Edtag}EGFPCAMH in einer identischen Anzahl von Einzelzellen kein signifikanter Unterschied der mittleren Fluoreszenzintensitäten in Kontrollzellen (023) oder ha3G-exprimierenden Zellen (024-2).

4.4. Anreicherung von humanem APOBEC3G in Viruspartikeln

4.4.1. Western-Blot mit UZ-gereinigtem Virus

Humanes APOBEC3G ist in der Lage RNA zu binden und Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen einzugehen. Die Rolle von RNA sowie verschiedener Proteine bei der Inkorporation von hA3G in HIV Partikel ist noch nicht eindeutig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Um zu überprüfen, ob hA3G durch Bindung an genomische MV RNA oder durch die Interaktion mit MV-Proteinen in neu entstehende Viruspartikel aufgenommen wird, wurde rMV^{Edtag}EGFPCAMH durch Präparation infizierter 024-2-Zellen gewonnen und durch ein Saccharosekissen per Ultrazentrifugation angereichert. Anschließend wurde das so gewonnene Virus im Western-Blot untersucht und mit zellulärem Lysat verglichen. Als Kontrollprotein diente das ubiquitäre GAPDH, das, ebenso wie hA3G, ein zytoplasmatisches, globuläres Protein ähnlicher Größe ist (~36 kDa). Abb. 4.17 zeigt die unterschiedlichen Verhältnisse von hA3G zu GAPDH in Lysat aus infizierten 024-2-Zellen sowie aus UZ-gereinigtem Virus.

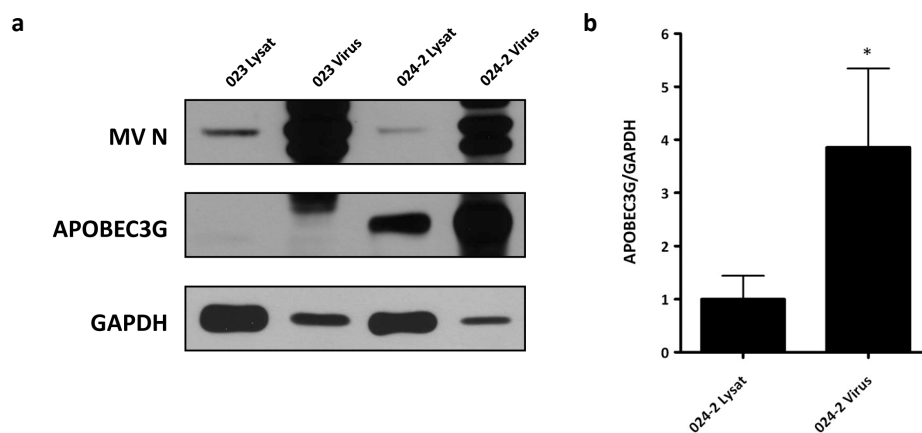


Abb. 4.17 | Western-Blot mit UZ-gereinigtem rMV^{Edtag}EGFPCAMH. Pro Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. (a) hA3G ist nur in Lysat sowie in UZ-gereinigtem Virus aus 024-2 Zellen detektierbar. Während das als Kontrollprotein verwendete GAPDH in Virus in verringertem Maße nachweisbar ist, so ist bei hA3G das Gegenteil der Fall – in Viruspartikeln wird eine größere Menge Protein nachgewiesen. In (b) ist das Verhältnis von hA3G zu GAPDH in Lysat bzw. Virus aus 024-2-Zellen aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen grafisch dargestellt. In einer identischen Menge Gesamtprotein aus UZ-gereinigter Viruspräparation besteht ein signifikant höheres Verhältnis von hA3G zu GAPDH (ca. 4fach) als in zellulärem Lysat. *, $p < 0,05$.

Wie in Abb. 4.17 zu erkennen ist, beträgt das Verhältnis von zellulärem hA3G zu zellulärem GAPDH in etwa eins zu eins, wohingegen in aufgereinigten Viruspartikeln ca. vier mal mehr hA3G als GAPDH vorhanden ist. Dies spricht für einen Mechanismus, bei dem bei der Knospung von neuen MV Partikeln hier gezielt hA3G angereichert wird.

4.4.2. Western-Blot mit UZ-gereinigtem Überstands-Virus in Anwesenheit von FIP

Um festzustellen, ob hA3G auch in MV Partikeln aus Zellkultur-Überstand nachweisbar ist, wurden infizierte bzw. uninfizierte, hA3G-exprimierende 024-2 Zellen nach einstündiger Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH mit FIP behandelt und drei Tage später gleiche Volumen Zellkulturüberstände analog zu dem Experiment in 4.4.1. über eine UZ aufgereinigt. Anschließend wurden nach der SDS-PAGE hA3G, MV-N und GAPDH mit Hilfe eines Western-Blots detektiert. Dieser Blot ist in Abb. 4.18 dargestellt.

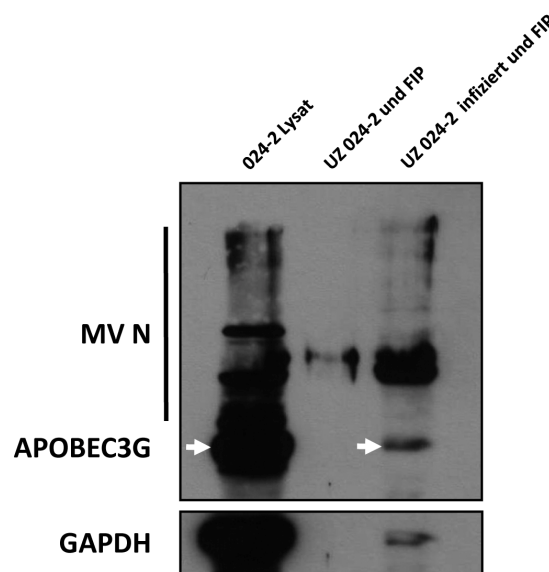


Abb. 4.18 | Western-Blot mit UZ-gereinigtem rMV^{Edtag}EGFPCAMH aus mit FIP behandelten Zellkulturüberständen. Es wurden 25 µg Gesamtprotein aus zellulärem Lysat infizierter 024-2-Zellen bzw. gleiche Mengen UZ-gereinigter Zellkulturüberstand aus infizierten und uninfizierten, mit FIP behandelten 024-2-Zellen aufgetragen. hA3G kann, ebenso wie GAPDH, nur in infizierten, mit FIP behandelten Zellkulturüberständen sowie in zellulärem Lysat detektiert werden (weiße Pfeile).

Deutlich zu erkennen ist in Abb. 4.18, dass hA3G bei uninfizierten Zellen nicht in den Kulturüberstand abgegeben wird. Nur bei Anwesenheit von in den Überstand abgegebenen MV Partikeln kann auch hA3G detektiert werden. Hier genügen schon geringe Mengen an Partikeln für einen Nachweis, wie die (schwache) Detektion des MV-N-Proteins zeigt.

4.5. Immunfluoreszenzfärbungen von humanem APOBEC3G und Proteinen des Masernvirus

Immunfluoreszenzfärbungen sind ein nützliches Hilfsmittel bei der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Werden zwei miteinander interagierende Proteine mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so zeigt sich diese Interaktion in der Immunfluoreszenz durch Überlappung der Färbung. Man spricht in diesem Fall von Kollokalisierung.

Um zu überprüfen, ob hA3G, sei es durch direkte Bindung oder über eine RNA Brücke, mit einem der Masernproteine N, P, M F, H oder L in Interaktion treten kann, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen von mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten hA3G-exprimierenden 024-2 Zellen durchgeführt. Abb. 4.19 zeigt diese Färbungen, mit Ausnahme der MV exprimierten RNA-Polymerase L, da gegen diese bisher kein passender Antikörper zur Verfügung steht.

Wie in Abb. 4.19 erkennbar ist besteht keine offensichtliche Kollokalisierung der verschiedenen MV-Proteine mit hA3G. Alle hier gefärbten Proteine bilden verschiedenste Formen von Clustern, die durch besonders helle Färbungen leicht zu erkennen sind. Alle diese Cluster sind jedoch räumlich voneinander getrennt vorzufinden. Interaktionen von zytoplasmatischem hA3G, welches sich nicht in P-bodies befindet, sind jedoch aufgrund der schwachen Färbung des hA3Gs in diesen Bereichen nicht vollständig auszuschließen.

Aufgrund der fehlenden Antikörper gegen die MV RNA-Polymerase wurde für diese Immunfluoreszenzfärbungen der MV Stamm rMV^{Edtag}LMMEGFPM (Duprex *et al.*, 2002) verwendet, der eine rekombinante Polymerase besitzt. Hier wurde in die Gelenk-Region zwischen die letzten beiden konservierten Domänen der Polymerase ein EGFP integriert. Somit besitzt die trotz dieser Modifikation immer noch funktionale RNA-Polymerase nun die Fluoreszenzeigenschaften des EGFPs und muss nicht mehr markiert werden.

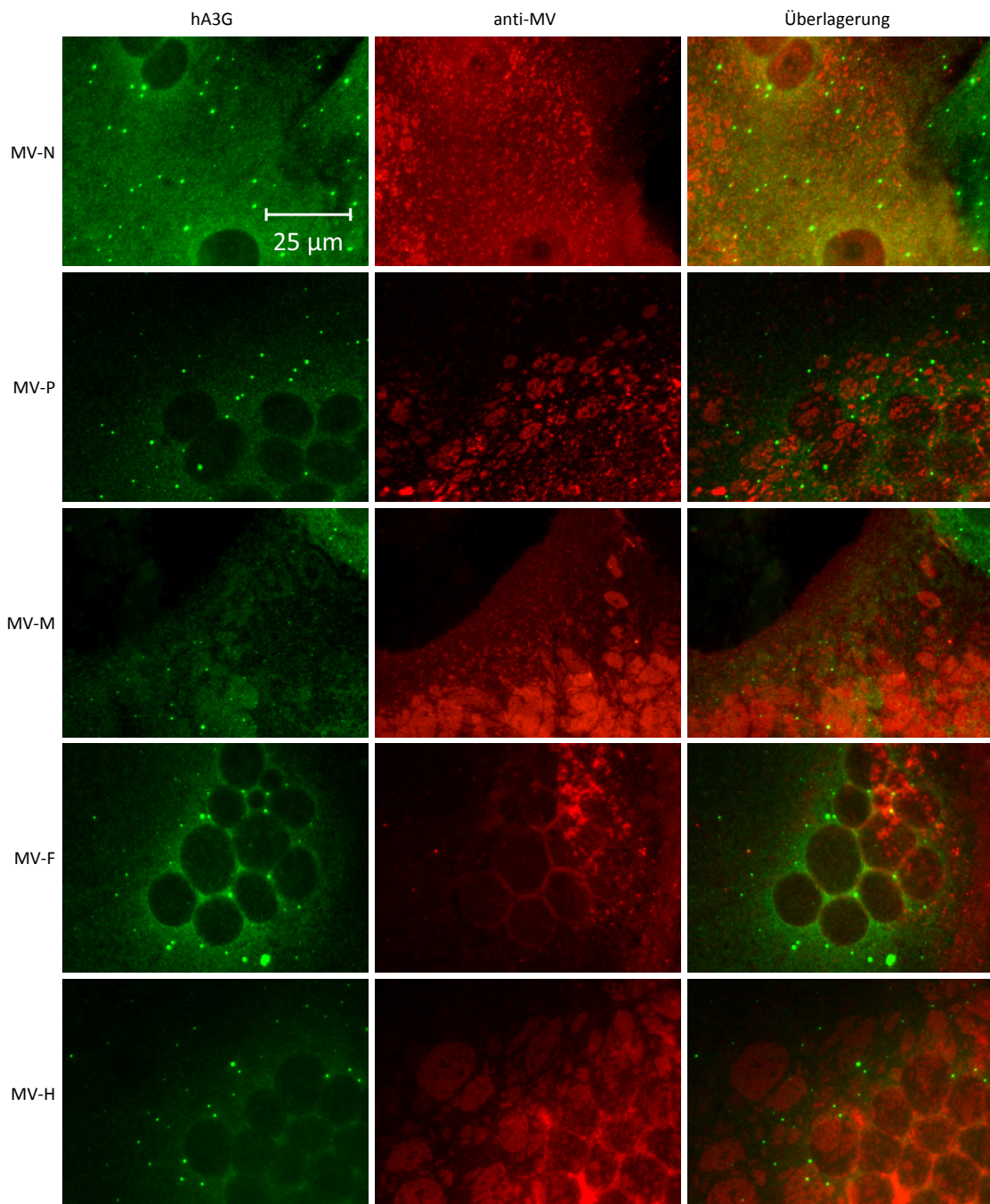


Abb. 4.19 | Immunfluoreszenzfärbung von mit $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ infizierten, hA3G-exprimierenden 024-2 Zellen. 024-2 Zellen wurden mit $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ infiziert und drei Tage nach Infektion mit Antikörpern gegen hA3G und eines der MV-Proteine N (Klon F227), P (Klon P3), M (Klon CV8/CV9), F (Klon A504) oder H (Klon L77) sowie dem passenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper markiert. In keinem Fall sind offensichtliche Kollateralisationen zu beobachten, die durch Überlappung beider Färbungen und somit gelbe Bereiche in der Überlagerung erkennbar wären.

Abb. 4.20 zeigt Färbungen des hA3G von mit $rMV^{Edtag}LMMEGFP$ infizierten 024-1 und 024-2 Zellen.

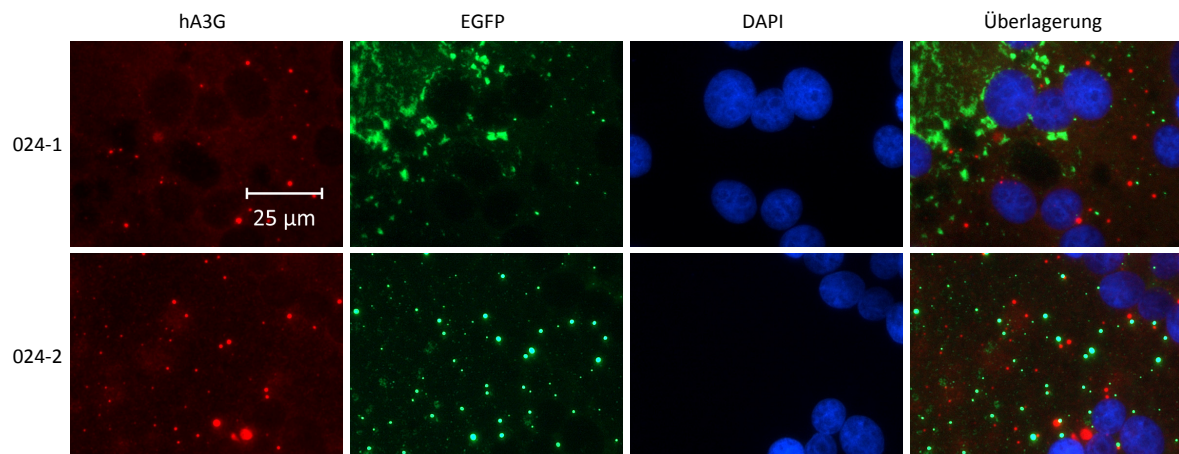


Abb. 4.20 | Immunfluoreszenzfärbung von mit $rMV^{Edtag}LMMEGFPM$ infizierten, hA3G-exprimierenden 024-1 und 024-2 Zellen. 024-1 und 024-2 Zellen wurden mit $rMV^{Edtag}LMMEGFPM$ infiziert und drei Tage nach Infektion mit Antikörpern gegen hA3G und dem passenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper markiert. In die RNA-Polymerase des $rMV^{Edtag}LMMEGFPM$ -Stammes ist EGFP integriert, daher ist hier keine Färbung notwendig. In keinem Fall sind jedoch offensichtliche Kolokalisationen zu beobachten, die durch Überlappung des EGFPs und des markierten hA3Gs in der Überlagerung erkennbar gewesen wären.

Auch bei den in Abb. 4.20 gezeigten Färbungen wurde keine Kolokalisation der viralen RNA-Polymerase mit hA3G beobachtet. Jedoch ist hier, ebenso wie für die in Abb. 4.19 gezeigten Färbungen, eine Interaktion von nicht P-body-assoziiertem, zytoplasmatischem hA3G mit der MV RNA-Polymerase aufgrund der zu geringen Färbung nicht ganz auszuschließen.

4.6. Generierung von markiertem APOBEC3G

Unter Markierung oder „tagging“ versteht man in der Biologie die Modifizierung eines Proteins mit einem kurzen Peptid. Dieser Protein-„Tag“ kann verschiedene Aufgaben erfüllen. Neben Affinitäts-„Tags“ und Markierungen zur Erhöhung der Löslichkeit des Proteins dienen die so genannten Epitop-„Tags“ als Bindungsstelle für bereits existierende, monoklonale Antikörper mit hoher Affinität. Die Peptidsequenzen dieser Epitope basieren oft auf viralen Genen (z. B. HA-„Tag“), können aber auch synthetisch erzeugt worden sein (FLAG-„Tag“). Zudem beeinträchtigen die kurzen Modifikationen die eigentliche Funktion des Proteins meist nicht.

Durch die Kombination von neu entstandenem Epitop und hoch affinem monoklonalen Antikörper erschließt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten der Anwendung, wie Immunfluoreszenzfärbungen und Immunpräzipitationen. Die gleichzeitige Verwendung von verschiedenen Markierungen durch Koexpression erlaubt zudem die Untersuchung von Kolokalisationen sowie Oligomerisierungen ein und desselben Proteins.

In der Literatur wird die Fähigkeit von hA3G diskutiert, neben der Bildung von Dimeren auch Oligomere bilden zu können. Die Rolle von RNA bei dieser Oligomerisierung ist noch umstritten. Mehrere Studien zeigen jedoch, dass RNA für die Bildung von Dimeren und für die Interaktion mit anderen Proteinen notwendig ist. Um die Fähigkeit von hA3G an MV RNA oder an MV-Proteine binden zu können genauer zu untersuchen, wurden zunächst Vektoren generiert, die verschieden modifizierte hA3G-Proteine exprimieren.

4.6.1. HA-markiertes APOBEC3G

Einer der gängigsten „Tags“ ist der auf dem Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus A beruhende HA-„Tag“ mit der Proteinsequenz N-YPYDVDPYA-C. Da in der Literatur sowohl N- wie auch C-terminale HA-„Tags“ verwendet werden, wurden verschieden modifizierte pRH024-Vektoren generiert, die beide markierte Versionen des hA3G-Proteins exprimieren. Mit Hilfe des retroviralen Systems wurden VSV-G pseudotypisierte Partikel in 293T Zellen generiert, die die DNA-Sequenzen für das N-terminal (HAA3G) oder die C-terminal markierte (A3GHA) Protein in die genomische DNA der Zielzelle integrieren. Die Partikel wurden durch Zentrifugation in Ambicon 100K Filtern aufkonzentriert.

Abb. 4.21 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen von HAA3G und A3GHA transduzierten Vero-Zellen, die mit Antikörpern gegen hA3G, HA und DCP1A sowie mit DAPI gefärbt wurden.

Wie Abb. 4.21 zeigt, ist die zelluläre Lokalisation der markierten hA3G-Proteine mit der des Wildtyps identisch, das heißt, dass die Funktionalität des Proteins sowohl durch den N- als auch den C-terminalen „Tag“ nicht beeinflusst wird. Allerdings konnten C-terminal markierte hA3G-Proteine nicht mehr mit dem sonst verwendeten Antiserum (vgl. 4.1.1.) angefärbt werden (Abb. 4.21 a). Durch den „Tag“ wird das durch die letzten 28 AS des C-Terminus gebildete Epitop also so stark verändert, dass alle polyklonalen Antikörper nicht mehr binden. C-terminal markierte Proteine konnten jedoch mit einem entsprechendem monoklonalen HA-Antikörper gefärbt werden (Abb. 4.21 b).

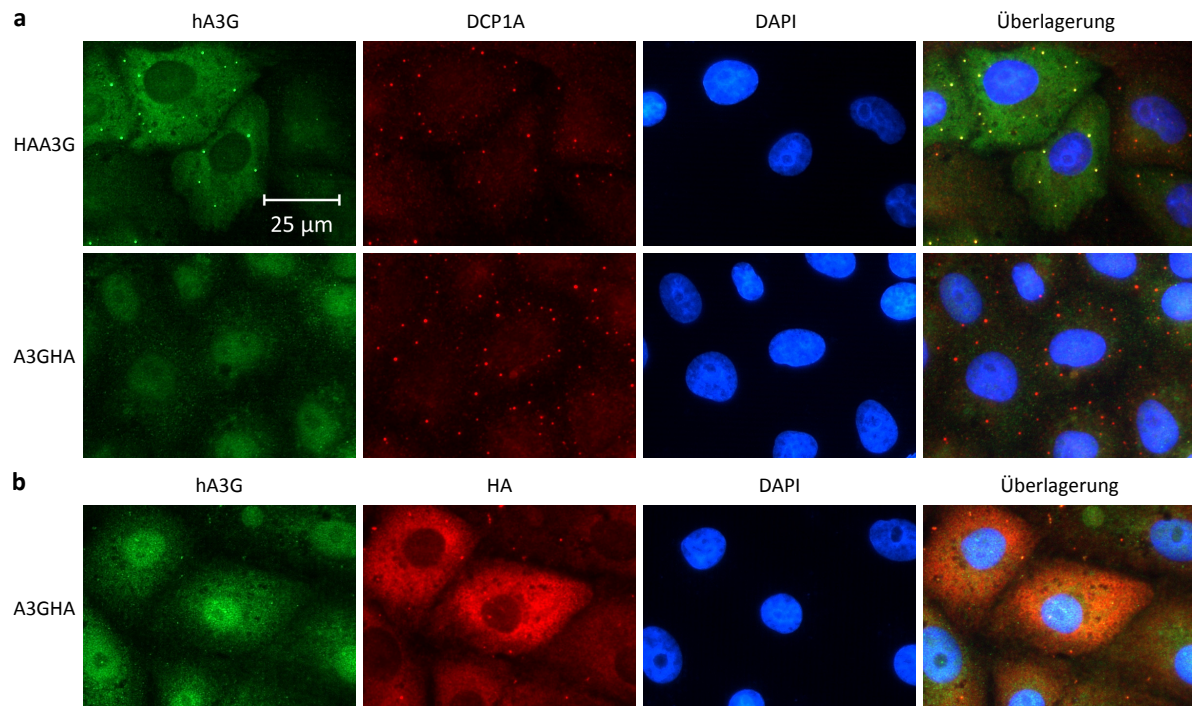


Abb. 4.21 | Immunfluoreszenzfärbungen HA-markierter hA3G-Proteine. Vero-Zellen wurden mit pseudotypisierten Partikeln HAA3G bzw. A3GHA transduziert und drei Tage später mit Antikörpern gegen hA3G, DCP1A oder HA und den passenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern markiert. Wird Antiserum gegen hA3G verwendet (**a**), kann nur N-terminal markiertes hA3G gefärbt werden. A3GHA-transduzierte Zellen (C-terminaler Tag) exprimieren jedoch auch P-body-lokalisiertes hA3G (**b**), welches nur durch einen monoklonalen HA-Antikörper angefärbt werden kann.

4.6.2. Koexpression von HA- und C-Myc-markiertem APOBEC3G

Für den Nachweis von an hA3G gebundener Proteine muss, um die Funktionalität der durchgeführten Experimente sicherzustellen, zunächst auch gezielt ein Protein nachgewiesen werden, welches für seine Bindung an hA3G bekannt ist (Positivkontrolle). Werden zwei unterschiedlich markierte Versionen von hA3G verwendet so kann hA3G selbst als ein solches Protein fungieren, da dessen Dimerisierungseigenschaften bereits nachgewiesen wurden. Zu diesem Zweck wurde zunächst pRH024-Vektoren generiert, die C-terminal C-Myc-markiertes hA3G (A3GMyc) exprimieren.

C-Myc ist ein 439 AS großes Protein, welches durch das Protoonkogen *MYC* kodiert wird. Die von diesem Protein abgeleitete Peptidsequenz N-EQKLISEEDL-C wird ebenfalls als gängiger „Tag“ eingesetzt. Mit Hilfe des retroviralen Systems wurden dann VSV-G pseudotypisierte, retrovirale A3GMyc Partikel hergestellt und nach der Einengung in Ambicon 100K Filtern für die Transduktion von Vero-Zellen verwendet. Drei Tage nach Transduktion wurden diese Zellen dann umgesetzt und einen weiteren Tag später mit dem Plasmid hA3GHA transfiziert. Dieses Plasmid besitzt einen effizienten, CMV basierten Promoter, welcher die Expression von dreifach C-terminal HA-markiertem hA3G bewirkt. Das Plasmid wurde

freundlicherweise von Dr. Hendrik Huthoff (King's College London, London, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt. Da dieser Vektor nicht im retroviralen System verwendet werden kann, wurde er mittels PEI transfiziert. Weitere drei Tage später wurden die Zellen mit Antikörpern gegen HA und C-Myc gefärbt. Abb. 4.22 zeigt Fluoreszenzaufnahmen dieser Zellen.

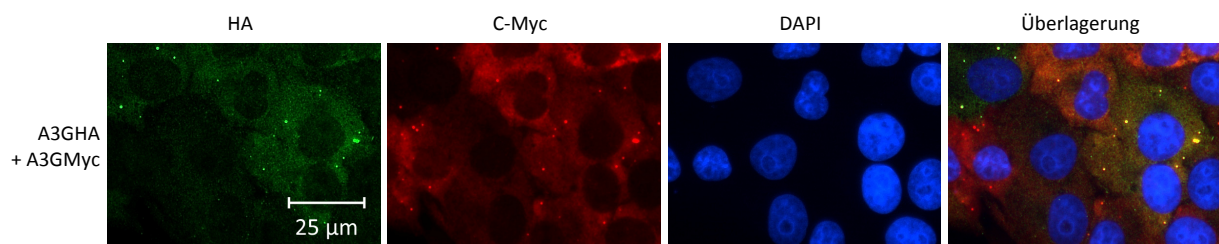


Abb. 4.22 | Immunfluoreszenzfärbungen HA- und C-Myc-markierter hA3G-Proteine. Vero-Zellen wurden zunächst mit pseudotypisierten Partikeln A3GMyC transduziert und nach vier Tagen mit hA3GHA transfiziert. Weitere drei Tage später wurde mit Antikörpern gegen HA, C-Myc und den passenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern gefärbt. Die Überlagerung zeigt, dass beide markierten hA3G-Proteine koexprimiert werden können. Hier decken sich die zwei unterschiedlichen Färbungen, was darauf schließen lässt, dass die zwei unterschiedlich markierte hA3G-Proteine eng benachbart lokalisiert sind.

Deutlich erkennbar in Abb. 4.22 ist, dass neben einzelnen Zellen, die nur eine Version der markierten Proteine exprimieren, auch Zellen existieren, die beide markierten hA3G-Proteine koexprimieren. Im letzteren Fall decken sich die zwei verschiedenen Färbungen (Kokolokalisation), was darauf schließen lässt, dass auch zwei unterschiedlich markierte hA3G-Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit untereinander Dimere oder Multimere ausbilden können.

4.6.3. FLAG-markiertes APOBEC3G

Als Alternative zu C-Myc markiertem hA3G wurde ebenfalls nach dem gleichen Prinzip FLAG markiertes hA3G generiert. Bei FLAG handelt es sich um einen vollständig synthetischen „Tag“, der auf der Proteinsequenz N-DYKDDDDK-C beruht und hauptsächlich für Affinitäts-Chromatographie verwendet wird (Hopp *et al.*, 1988). Sein synthetischer Charakter macht ihn jedoch hauptsächlich wegen der hohen Spezifität attraktiv.

Abb. 4.23 zeigt Fluoreszenzaufnahmen von A3GFLAG transduzierten Vero-Zellen drei Tage nach Transduktion.

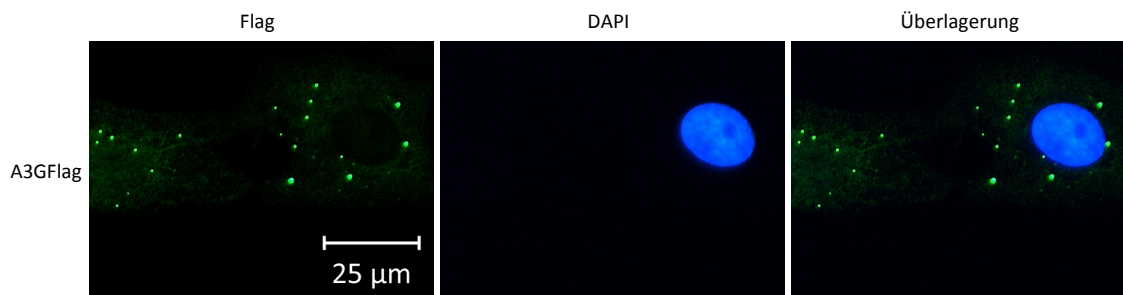


Abb. 4.23 | **Immunfluoreszenzfärbung FLAG-markierter hA3G-Proteine.** Vero-Zellen wurden mit pseudotypisierten Partikeln A3GFLAG transduziert und nach drei Tagen mit monoklonalen Antikörpern gegen FLAG und dem passenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern gefärbt. C-terminal FLAG-markiertes hA3G besitzt die gleiche zytoplasmatische Lokalisation wie wildtypisches hA3G.

Wie aus Abb. 4.23 ersichtlich, so besitzt auch C-terminal FLAG-markiertes hA3G einen wildtypischen Phänotyp mit zytoplasmatischer Lokalisation und P-body-Assoziation.

4.7. Immunpräzipitation von markiertem APOBEC3G

Um die direkte Interaktion von Proteinen zu untersuchen, werden häufig Immunpräzipitationen (IPs) verwendet. Hierbei werden aus einem Proteingemisch nach Bindung eines Proteins an einen spezifischen Antikörper alle nicht gebundenen Proteine entfernt. Bindet das präzipitierte Protein andere Proteine, so werden diese ebenfalls präzipitiert und können über einen Western-Blot nachgewiesen werden.

Es ist jedoch auch möglich, die von Proteinen gebundene DNA oder RNA mit zu präzipitieren. Ist z. B. RNA an ein Protein gebunden, so kann nach erfolgter Präzipitation mit anschließender RNA Präparation des Präzipitats diese RNA über eine RT-PCR nachgewiesen werden.

4.7.1. RT-PCR nach Koimmunpräzipitation von HA-markiertem APOBEC3G

Im folgenden Experiment sollte die Möglichkeit einer Bindung von hA3G an MV-spezifische RNAs untersucht werden. Hierzu wurden 293T-Zellen mit hA3GHA transfiziert und anschließend mit rMV^{E_{dtag}}EGFPCAMH infiziert. Drei Tage nach Infektion wurde aus diesen infizierten Zellen ein Proteinlysate erstellt, welches mit HA-Antikörper-gekoppelten Agarosebeads versetzt wurde. Nach mehrmaligem Waschen wurde das an die Beads gebundene Protein eluiert und mit diesem Eluat eine RNA-Präparation durchgeführt. Parallel wurde in einem zweiten Versuch statt Proteinlysate UZ gereinigtes Virus verwendet (vgl. 4.4.1.), um die Menge an im Ansatz vorhandenen mRNAs so weit wie möglich zu reduzieren.

In Abb. 4.24 sind 1,2 %ige Agarosegele von RT-PCRs dargestellt, bei denen MV-spezifische RNAs aus diesen präparierten RNAs detektiert wurden. Für die Erststrangsynthese wurde ein Gemisch aus Oligo(dT)₁₈ Primern und Random Hexameren verwendet. Als Kontrollen dienten jeweils RT-PCRs von RNA aus den für die IPs verwendeten Proteinlysaten, sowie untransfizierte Proben (kein hA3GHA).

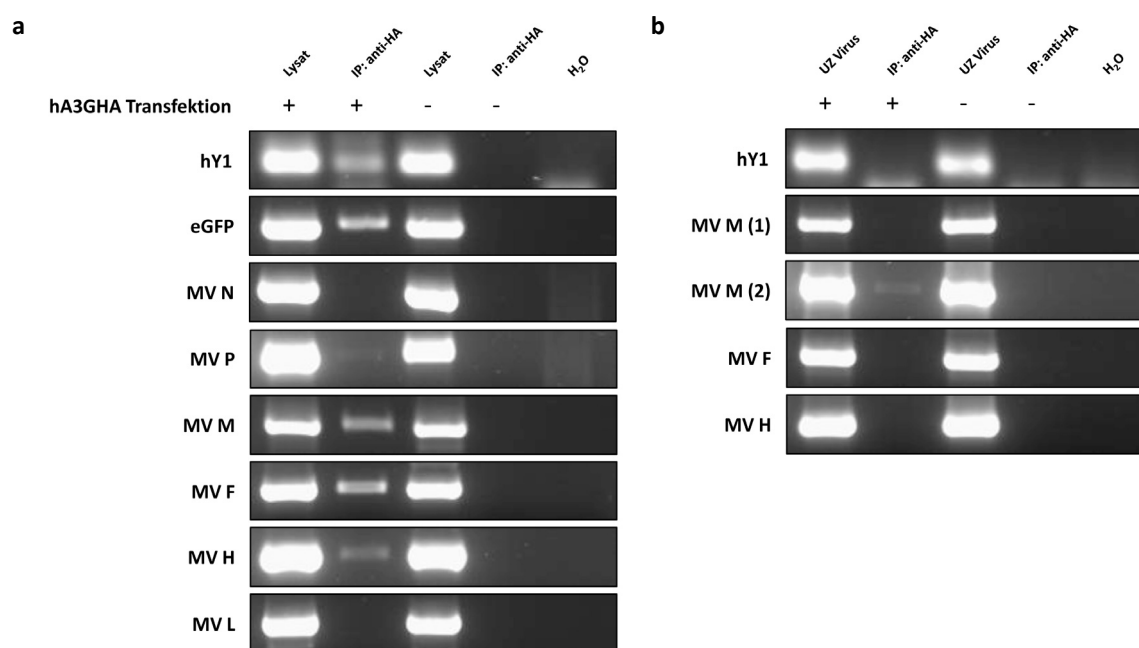


Abb. 4.24 | RT-PCRs mit RNA aus Immunpräzipitationen. RNA wurde aus IPs von mit hA3GHA transfizierten und mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten 293T-Zelllysaten präpariert und für MV-spezifische RT-PCRs eingesetzt. Als Kontrolle diente eine RT-PCR mit hY1-spezifischen Primern. Jede RNA ist stets in allen Lysaten bzw. UZ-gereinigtem Virus, nie jedoch in IPs aus untransfizierten Proben oder Wasserkontrollen nachweisbar. (a) Deutlich sind hY1-, EGFP-, MV-M-, MV-F-, MV-H- und schwach MV-P-RNAs per PCR in IPs aus hA3GHA-transfizierten Proben nachweisbar. MV-N- und MV-L-RNA hingegen wurden nicht detektiert. (b) Analog zu (a) wurden statt Zelllysaten hier UZ-gereinigte Viruspräparationen für die IPs verwendet, bei denen die Menge der vorhandenen mRNAs sehr stark reduziert ist, da ausschließlich genomische RNA in Viruspartikeln vorhanden ist. hY1-RNA kann in IPs aus hA3GHA-transfizierten Proben nicht mehr detektiert werden, da vermutlich kein hA3G mit gebundener hY1-RNA in Viruspartikeln vorhanden ist. Ebenso ist MV-F- und MV-H-RNA nicht und MV-M-RNA nur sehr schwach detektierbar, was dafür spricht, dass hA3G überwiegend an MV mRNAs bindet.

Abb. 4.24 zeigt, dass in IPs mit infiziertem Zelllysate aus hA3GHA-transfizierten Proben hY1-, EGFP-, MV-M-, MV-F-, MV-H- und schwach MV-P-RNAs per PCR nachweisbar sind. Obwohl bei der Replikation von MV aufgrund des bei der mRNA-Synthese bestehenden Gradienten überwiegend N-mRNA in den Lysaten vorhanden ist, wurde diese RNA hier, ebenso wie MV-L-RNA, nicht nachgewiesen (Abb. 4.24 a). Wird UZ gereinigtes Virus für die Versuche verwendet, so lassen sich ohne IP alle RNAs ebenfalls detektieren (Abb. 4.24 b). In IPs aus hA3GHA-transfizierten Proben hingegen ist nur noch MV-M-RNA sehr schwach nachweisbar.

4.7.2. Western-Blot nach Koimmunpräzipitation von HA-markiertem APOBEC3G

Der klassische Versuchsansatz bei der Frage nach Interaktionspartnern eines bestimmten Proteins ist, wie oben bereits erwähnt, die Detektion von präzipitierten Proteinen nach spezifischer IP des Proteins über einen Western-Blot.

Um zu untersuchen, ob hA3G in direkte Interaktion mit einem der MV-Proteine treten kann, wurden daher IPs mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten 293T-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden zunächst mit aufkonzentrierten, VSV-G pseudotypisierten, retroviralen A3GFLAG Partikeln transduziert. Drei Tage später wurden die Zellen in 6 cm Schalen umgesetzt, einen weiteren Tag später mit hA3GHA transfiziert und anschließend mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infiziert. Weitere drei Tage später wurden von diesen infizierten Zellen Proteinlysate hergestellt und entweder direkt oder nach IP mit HA-Antikörper-gekoppelten Agarosebeads auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrocellulose geblottet und MV-Proteine mit polyklonalem, MV-spezifischen Kaninchenserum bzw. A3GFLAG mit FLAG-spezifischem, monoklonalen Mausantikörper detektiert. Abb. 4.25 zeigt ein Photo der so detektierten Proteine.

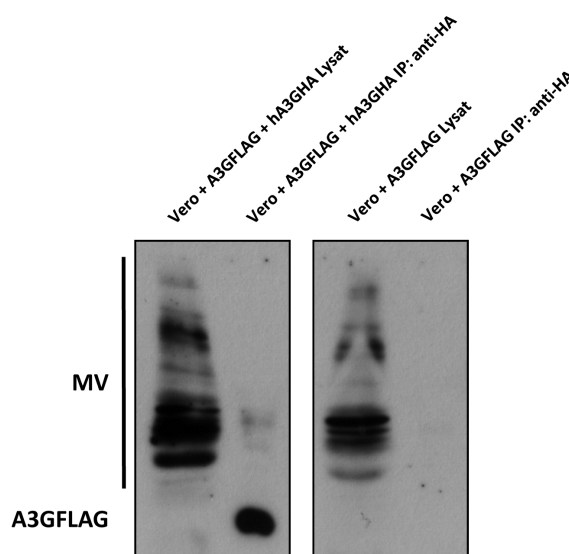


Abb. 4.25 | Western-Blot Analyse von IPs aus hA3GHA transfizierten, rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten 293T Zellysaten. Vor der Transfektion mit hA3GHA wurden die Zellen mit pseudotypisierten A3GFLAG Partikeln transduziert. Drei Tage später erfolgten die Transfektion sowie die anschließende Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH. A3GFLAG (ca. 40 kDa) ist nur in der IP aus Proben mit transfiziertem hA3GHA nachzuweisen. In sehr geringen Mengen sind in dieser Spur auch gebundene MV-Proteine sichtbar. In den aufgetragenen Lysaten sind verschiedene MV-Proteine sichtbar.

Wie Abb. 4.25 zeigt, ist A3GFLAG nur in der IP von hA3GHA transfiziertem Zelllysate nachzuweisen (starke Bande). Diese Spur zeigt schwach auch vorhandene MV-Proteine. In den Lysaten ist (obwohl transduziert) A3GFLAG jedoch nicht detektierbar.

4.8. Minireplikon Assay mit APOBEC3G-exprimierenden Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die Expression von hA3G gezielt Einfluss auf die virale RNA-Polymerase nehmen kann, wurde das so genannte Minireplikon System verwendet. Die hierfür notwendigen Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Linda Rennick (Queen's University Belfast, Belfast, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt. Durch die Expression der MV-Proteine N, P und der MV RNA-Polymerase L entsteht in der transfizierten Zelle ein Transkriptionskomplex, wie er auch bei der Replikation von MV auftritt. Ist in der transfizierten Zelle zusätzlich eine Reporter-gen-RNA in Negativ-Strang Orientierung vorhanden, so kann diese vom MV Transkriptionskomplex in eine positiv-strängige mRNA umgeschrieben werden. Um diese negativ-strängige Reporter-gen-RNA zu erhalten, wird zusätzlich ein so genanntes Minigenom mit transfiziert. Dieses Plasmid enthält ein Reporter-gen (z. B. EGFP) mit einem Promoter für die DNA abhängige RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 am 3' Ende des Gens und zusätzlich die für das spätere Capping und die Polyadenylierung erforderlichen, regulatorischen MV Sequenzen. Wird der Zelle zusätzlich eine T7 RNA-Polymerase zur Verfügung gestellt, so wird das Reporter-gen als RNA-Strang negativer Orientierung synthetisiert und kann vom MV Transkriptionskomplex in mRNA transkribiert werden. Die dann vorliegende mRNA wird von der zellulären Maschinerie in das Reporterprotein translatiert. Die Expression des Reporterproteins ist somit ein Maß für die Aktivität der MV RNA-Polymerase. Die T7 RNA-Polymerase wird in der Zelle durch die Infektion mit dem attenuierten, rekombinanten Vakzinia Virus MVA-T7 bereitgestellt.

Da die Anwesenheit aller am System beteiligter Komponenten (T7 RNA-Polymerase, Minigenom, Expressionsplasmide für MV-N, -P und -L) für die erfolgreiche Expression des Reporterproteins erforderlich ist, ist die Ausbeute an positiven Zellen sehr gering. Da durch die fehlenden Fusionsproteine MV-F und -H jedoch eine Zell-Zell-Fusion ausbleibt, kann die entstehende Expression des Reporterproteins wie z. B. EGFP sehr vieler Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die Anzahl an Zellen mit allen für das Assay erforderlichen Komponenten liegt jedoch bei weit unter einem Prozent.

Als Kontrolle für die Fähigkeit des Assays, Faktoren für die Hemmung der viralen RNA-Polymerase zu identifizieren, wurde zusätzlich ein Expressionsplasmid für das C-Protein von MV verwendet. Das MV-C-Protein besitzt mindestens zwei verschiedene Funktionen innerhalb des Replikationszyklus von MV – Beeinflussung der zellulären Interferon-Antwort und

Modulation der viralen Polymerase (Bankamp *et al.*, 2005). Die Anwesenheit des C-Proteins hemmt die Aktivität des MV-L-Proteins (Reduktion der mRNA Transkription sowie der Genomreplikation) durch direkte Bindung an das Protein selbst, aber auf noch unbekannte Art und Weise. Diskutiert wird in der Literatur die Rolle des C-Proteins, in der späten Phase der MV-Replikation durch die Hemmung der RNA-Polymerase eine Reifung fertiger Viruspartikel zu unterstützen (Bankamp *et al.*, 2005).

In Abb. 4.26 sind die mittleren, relativen Fluoreszenzintensitäten von je 30.000 023, 024-1, 024-2 und 024-3 Zellen dargestellt. Alle Zellen wurden dafür zunächst mit MVA-T7 infiziert und anschließend mit den übrigen Komponenten des Minireplikon-Systems transfiziert. Im Fall der Kontrollzellen 023 wurde in einem parallelen Ansatz als Positivkontrolle zusätzlich das MV-C exprimierende Plasmid pMV-C^{DUB}FLAG transfiziert, welches freundlicherweise von Emma Millar (Queen's University Belfast, Belfast, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt wurde. Nach 42 Stunden wurde die Fluoreszenzintensität dann durchflusszytometrisch bestimmt.

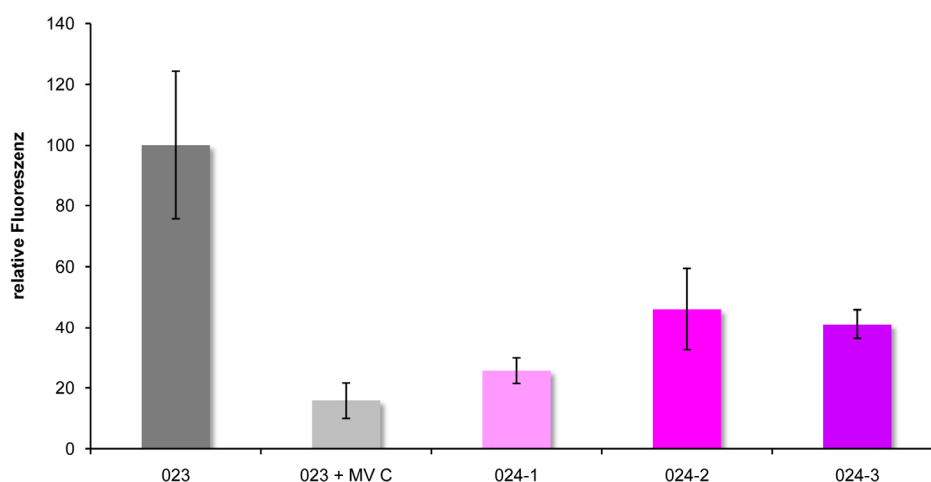


Abb. 4.26 | **MV Minireplikon Assay mit hA3G exprimierenden Vero Zelllinien.** Kontrollzellen 023 sowie hA3G exprimierende Zellen 024-1, 024-2 und 024-3 wurden mit MVA-T7 infiziert und mit Expressionsplasmiden für MV-N, MV-P, MV-L, dem Minigenom mit EGFP und zusätzlich in einem zweiten Ansatz für 023 mit einem Expressionsplasmid für MV-C transfiziert. 42 Stunden später wurde die mittlere Fluoreszenz von 30.000 Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. In allen hA3G exprimierenden Zellen ist die durch EGFP-Expression entstandene Fluoreszenz signifikant gegenüber der in Kontrollzellen 023 reduziert. Die als Positivkontrolle fungierende Transfektion von MV-C führt durch direkte Beeinflussung der MV RNA-Polymerase in 023 Zellen zu der niedrigsten gemessenen Fluoreszenzintensität.

Wie Abb. 4.26 zeigt, sinkt die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen 023 bei zusätzlicher Transfektion von MV-C auf ca. 20 % ab. Werden hA3G exprimierende Zellen eingesetzt zeigt sich auch hier eine gegenüber den Kontrollzellen signifikant verringerte Fluoreszenzintensität zwischen 30 und 50 %. Dies zeigt, dass die Expression von hA3G einen direkten, hemmenden Einfluss auf die MV RNA-Polymerase besitzt.

4.9. Generierung von APOBEC3G Punkt-Mutanten

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Aufklärung von Proteinfunktionen ist die so genannte Generierung von Punkt-Mutanten. Durch den gezielten Austausch einer AS kann die Auswirkung dieses Austausches auf die Funktion des entsprechenden Proteins untersucht werden. Dadurch können wiederum Rückschlüsse auf die Rolle der beteiligten Domäne des Proteins gezogen werden.

Im Fall von hA3G sind die zwei Desaminase-Domänen von entscheidender Bedeutung für die Hemmung der HIV Replikation. Um zu untersuchen, ob eine dieser Domänen auch an der Hemmung der MV Replikation beteiligt ist, wurden zunächst Expressionsplasmide für verschiedene hA3G Punktmutanten generiert. Als Ausgangs-Plasmid diente hierfür der retrovirale Vektor pRH024, der freundlicherweise von Dr. Rebecca K. Holmes (King's College London, London, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt wurde. Die Punkt-Mutationen wurden in das Plasmid mit Hilfe des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers inseriert. Tab. 3.7 gibt einen Überblick über alle im Rahmen dieser Arbeit generierten hA3G Punkt-Mutanten.

Tab. 3.7 | Im Rahmen dieser Arbeit generierte hA3G Mutanten. Als Vorlage für die inserierten Mutationen diente der Vektor pRH024.

Mutante	Basen in hA3G ORF	Änderung des Codons	Änderung der AS
K40A	118 - 120	AAA zu GCA	Lysin zu Alanin
H65R	193 - 195	CAC zu CGC	Histidin zu Arginin
E67Q	199 - 201	GAG zu CAG	Glutamat zu Glutamin
F70A	208 - 210	TTC zu GCC	Phenylalanin zu Alanin
Y91A	271 - 273	TAC zu GCC	Tyrosin zu Alanin
W94L	280 - 282	TGG zu TTG	Tryptophan zu Leucin
C97S	289 - 291	TGC zu TCC	Cystein zu Serin
C100S	298 - 300	TGT zu TCT	Cystein zu Serin
R122A	364 - 366	CGC zu GCC	Arginin zu Alanin
Y124A	370 - 372	TAC zu GCC	Tyrosin zu Alanin
W127A	379 - 381	TGG zu GCG	Tryptophan zu Alanin
H257R	769 - 771	CAT zu CGT	Histidin zu Arginin
E259Q	775 - 777	GAG zu CAG	Glutamat zu Glutamin

Für alle in Tab. 3.7 aufgeführten Mutanten wurden mit Hilfe des retroviralen Systems VSV-G pseudotypisierte, retrovirale Partikel in 293T-Zellen hergestellt und durch Zentrifugation in Ambicon 100K Filtern aufkonzentriert.

4.9.1. Expression von mutiertem humanem APOBEC3G auf mRNA-Ebene

Zunächst wurde die Expression der erzeugten Mutanten auf mRNA-Ebene untersucht. Hierzu wurden Vero-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln der hA3G-Mutanten transduziert und drei Tage später eine RNA Präparation der Zellen durchgeführt. In einer RT-PCR erfolgte dann mit Hilfe von Oligo(dT)₁₈ Primern die Erststrangsynthese aller mRNAs und mit Hilfe von hA3G-spezifischen Primern wurde hA3G mRNA detektiert.

Abb. 4.27 zeigt 1 %ige Agarosegele mit Proben dieser RT-PCRs für 35 sowie 20 PCR-Zyklen.

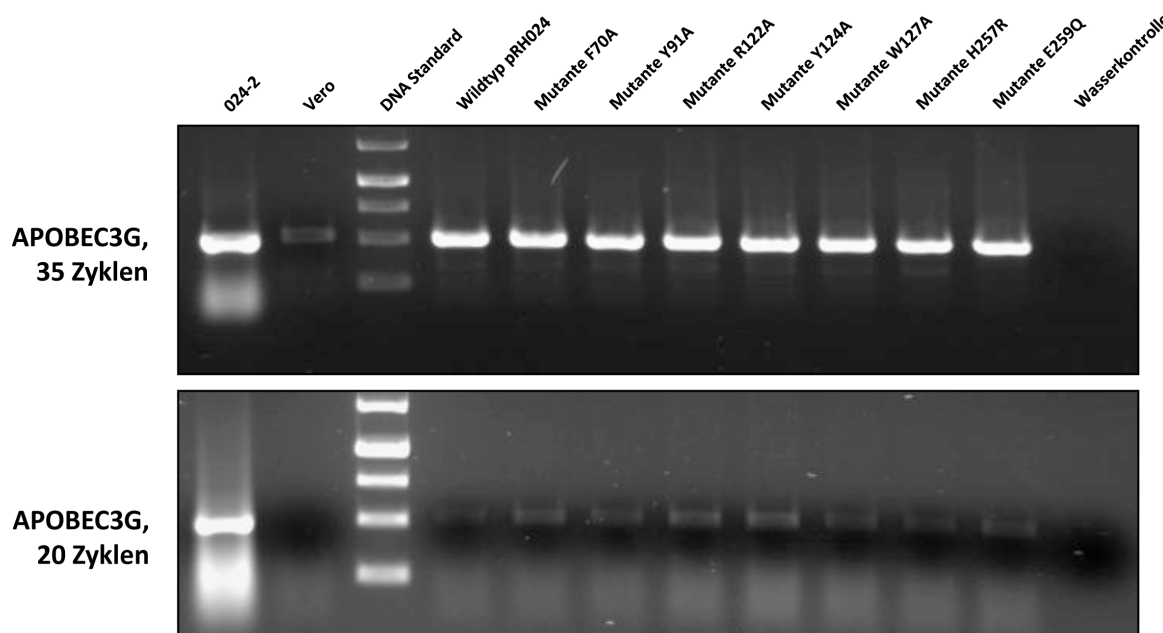


Abb. 4.27 | **Semiquantitative RT-PCR mit hA3G-Mutanten.** Vero-Zellen wurden mit gleicher Menge an pseudotypisierten Partikeln für hA3G Wildtyp und Mutanten transduziert und drei Tage später einer RT-PCR mit hA3G spezifischen Primern unterzogen. Die einheitlichen Unterschiede zwischen 20 und 35 durchgeführten PCR-Zyklen machen die identisch vorhandene Menge an mRNAs bei wildtypischem und mutierten hA3G deutlich.

Deutlich erkennbar wird durch die in Abb. 4.27 gezeigte semiquantitative RT-PCR, dass alle detektierten mRNAs der generierten hA3G-Mutanten in vergleichbaren Mengen in den transduzierten Zellen transkribiert werden. Das Vorhandensein der unterschiedlichen Mutationen hat demnach keinen Einfluss auf die Transkribierbarkeit der in die DNA der Zelle integrierten hA3G-Sequenzen. Bei der stabil transduzierten hA3G Linie 024-2 wird mRNA vergleichsweise stärker transkribiert. Bei 35 PCR-Zyklen kann mit den verwendeten Primern auch eine geringe Menge an mRNA des APOBEC3Gs aus *Chlorocebus* detektiert werden.

4.9.2. Expression von mutiertem humanem APOBEC3G auf Protein-Ebene

Um die Expression der hA3G-Mutanten auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Vero-Zellen analog zu dem in 4.9.1. durchgeführten Versuch mit pseudotypisierten Partikeln der hA3G-Mutanten transduziert und drei Tage später Proteinlysate der Zellen erstellt. Der Gesamt-Proteingehalt der Lysate wurde bestimmt und je 25 µg in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose geblottet und mit hA3G-spezifischem Kanincheneserum detektiert.

Abb. 4.28 zeigt eine Photo des in den Proben detektierten hA3G-Proteins.

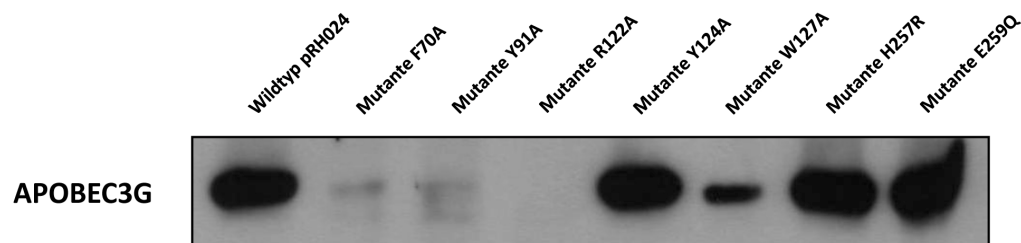


Abb. 4.28 | **Western-Blot mit hA3G-Mutanten.** Vero-Zellen wurden mit gleicher Menge an pseudotypisierten Partikeln für hA3G-Wildtyp und -Mutanten transduziert und drei Tage später die in 25 µg Gesamtprotein enthaltene Menge an hA3G mittels eines Western-Blots detektiert. Nur die Mutanten Y124A, H257R und E259Q werden in einer mit dem Wildtyp-Protein vergleichbaren Menge exprimiert. Die Proteinexpression der Mutante W127A ist stark reduziert, die der Mutanten F70A und Y91A sinkt an und die der Mutante R122A sogar unter die Grenze der Detektierbarkeit.

Wie Abb. 4.28 zeigt, bestehen hinsichtlich der Proteinexpression der generierten hA3G-Mutanten sehr große Unterschiede. Während die Expression der Mutanten Y124A, H257R und E259Q in einer mit dem Wildtyp-Protein vergleichbaren Menge exprimiert werden, so ist die der Mutante W127A trotz identischer Mengen an mRNA (vgl. 4.9.1) stark reduziert. Das von den Mutanten F70A und Y91A exprimierte hA3G ist mit Hilfe des durchgeführten Western-Blots kaum noch, im Fall der Mutante R122A überhaupt nicht mehr zu detektieren.

4.9.3. Phänotyp des mutierten humanen APOBEC3Gs

Um die zelluläre Lokalisation der exprimierten hA3G-Mutanten zu überprüfen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 30 mit aufkonzentrierten, VSV-G pseudotypisierten Partikeln der jeweiligen hA3G-Mutante transduziert und drei Tage später mit hA3G-spezifischem Kanincheneserum sowie monoklonalem Antikörper gegen DCP1A markiert. Bei der Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen stellte sich heraus, dass die Einführung von Punktmutationen teilweise eine Veränderung des

Phänotyps des hA3G-Proteins auf zellulärer Ebene bewirkt, der mit der in 4.9.2. beschriebenen, verringerten Proteinexpression korreliert.

Mutanten mit unverändertem Phänotyp

Abb. 4.29 zeigt Fluoreszenzaufnahmen und Überlagerungen von hA3G-Mutanten in Vero-Zellen mit wildtypischem Phänotyp.

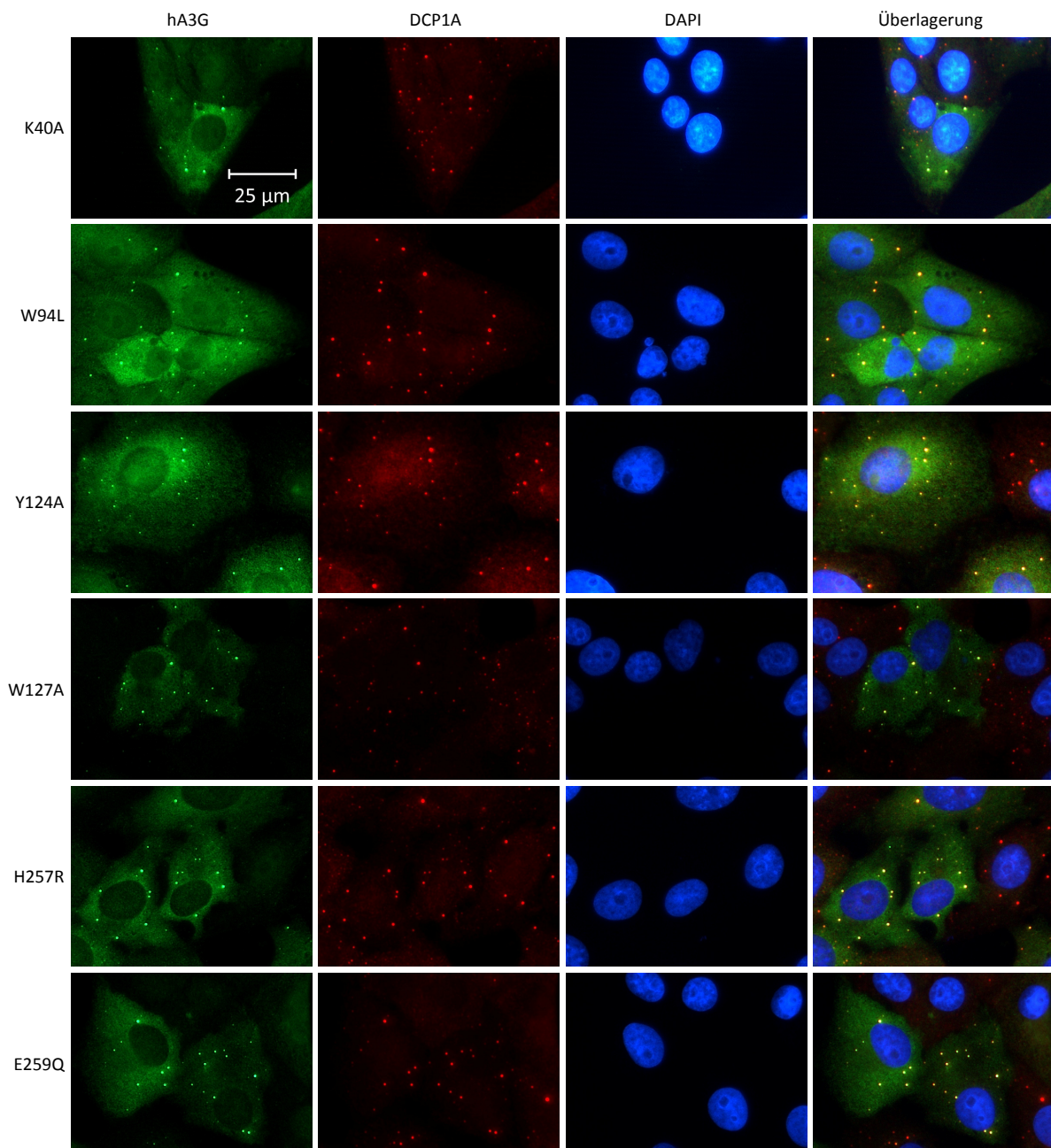


Abb. 4.29 | Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G mit unverändertem Phänotyp nach Transduktion von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit konzentrierten retroviralen Partikeln mit einer MOI von 30 transduziert und drei Tage später mit polyklonalem Antiserum gegen hA3G, monoklonalem Antikörper gegen DCP1A sowie DAPI gefärbt.

Wie Abb. 4.29 zeigt, beeinflussen die Mutationen K40A, W94L, Y124A, W127A, H257R und E259Q den Phänotyp des exprimierten hA3Gs nicht. Das so mutierte Protein ist demnach in seiner zellulären Lokalisation nicht von Wildtyp-hA3G zu unterscheiden (vgl. Abb. 4.1). Lediglich die Stärke der Expression der Mutante W127A ist gegenüber der des Wildtyps und der anderen oben abgebildeten Mutanten etwas verringert. In allen abgebildeten Mutanten ist hA3G weiterhin zytoplasmatisch diffus lokalisiert und in P-bodies konzentriert (hA3G-Foci kolokalisieren mit DCP1A).

Phänotyp von Mutanten mit defizienter RNA-Bindung

Abb. 4.30 zeigt Fluoreszenzaufnahmen und Überlagerungen von hA3G-Mutanten in Vero-Zellen mit verändertem Phänotyp.

Wie in Abb. 4.30 ersichtlich, besitzt punktmutiertes hA3G-H65R, -E67Q, -F70A, -Y91A, -C97S, -C100S und -R122A einen vom Wildtyp-hA3G verschiedenen Phänotyp (vgl. Abb. 4.1). Trotz teilweise nicht im Western-Blot detektierbarer Mengen an Protein (vgl. Abb. 4.28) können mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sehr wenige Zellen mit sichtbaren Anteilen an hA3G gefunden werden. Hierbei fällt auf, dass die nachweisbaren stern- oder wolkenförmigen Strukturen Ähnlichkeit mit der des endoplasmatischen Retikulums aufweisen. Eine Kolokalisation mit DCP1A ist bis auf C100S nicht mehr nachzuweisen. Dies spricht dafür, dass dieses mutierte hA3G seine Fähigkeit zur Bindung an RNA größtenteils verloren hat, denn eine wesentliche Voraussetzung für die Lokalisation in P-bodies als zelluläre Zentren der RNA-Speicherung und des RNA-Metabolismus ist die Fähigkeit von hA3G an RNA zu binden (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007).

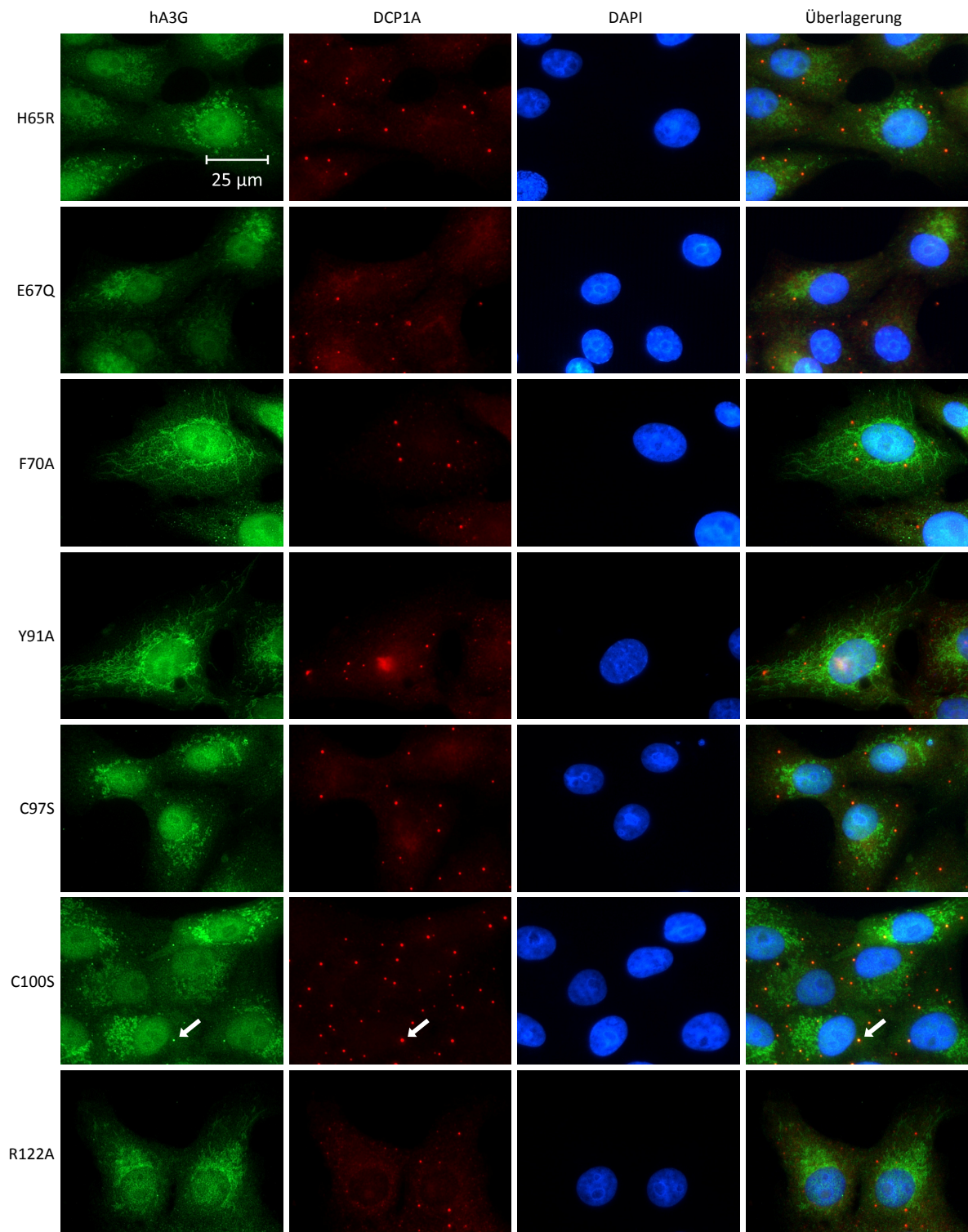


Abb. 4.30 | Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G mit verändertem Phänotyp nach Transduktion von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit konzentrierten retroviralen Partikeln mit einer MOI von 30 transduziert und drei Tage später mit polyklonalem Antiserum gegen hA3G, monoklonalem Antikörper gegen DCP1A sowie DAPI gefärbt. In der Mutante hA3G-C100S ist zusätzlich eine geringfügige Kollokalisierung mit DCP1A, also P-bodies, zu erkennen (Pfeile).

ER-Assoziation von Mutanten mit defizienter RNA-Bindung

Um zu überprüfen, ob der durch die Mutation der RNA-Bindungsdomäne hervorgerufene Phänotyp mit dem des ER identisch ist, wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Als Marker für das ER wurde Calnexin gewählt – ein membrangebundenes, am rauen ER lokalisiertes Lektin, das unvollständig gefaltete Proteine bei ihrem Faltungsprozess unterstützt.

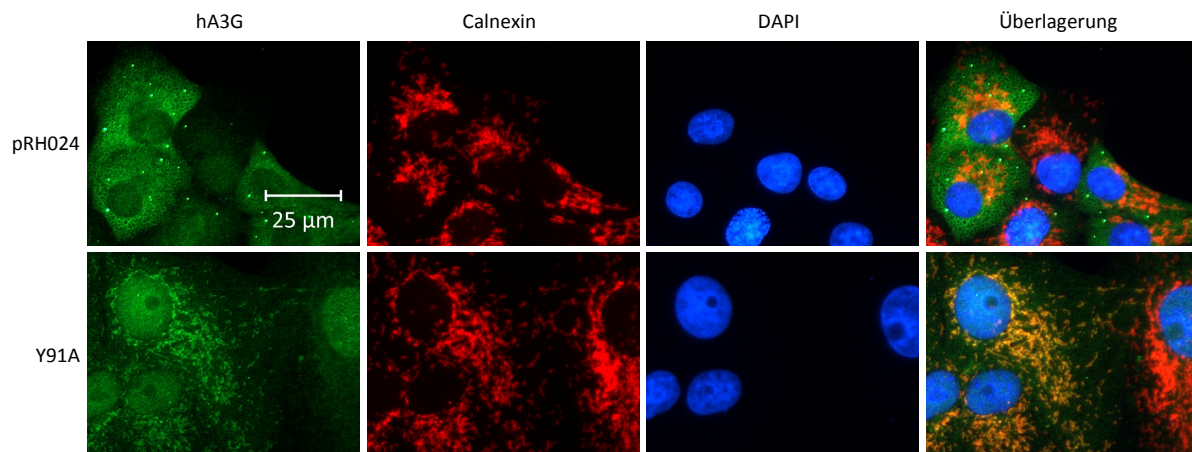


Abb. 4.31 | Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem hA3G und Calnexin nach Transduktion von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit konzentrierten retroviralen Partikeln mit einer MOI von 30 transduziert und drei Tage später mit polyklonalem Antiserum gegen hA3G, monoklonalem Antikörper gegen Calnexin sowie DAPI gefärbt.

Wie Abb. 4.31 exemplarisch zeigt, tritt bei Färbung von in Vero-Zellen exprimiertem wildtypischem hA3G keine Kolokalisation mit Calnexin als ER-Marker auf. Folglich ist unverändertes hA3G nicht an oder innerhalb des ER lokalisiert. Bei Färbung von punktmutiertem hA3G mit defizienter RNA-Bindung (hier exemplarisch hA3G-Y91A) ist jedoch eine solche Kolokalisation zu beobachten. Die Mutation der RNA-bindenden Domäne bewirkt also eine Lokalisation des Proteins an oder in das raue ER.

4.10. Funktionalitätstests mit mutiertem humanem APOBEC3G

Um zu testen, ob das durch das retrovirale System in transduzierten Zellen exprimierte hA3G funktional ist, wurde ein so genanntes „HIV single round infectivity assay“ durchgeführt. In diesem Assay werden die durch Transfektion mehrerer Plasmide entstehenden pseudotypisierten Partikel zur Neuinfektion von Zellen verwendet. Die in diesen Zellen entstehende Menge an Reporterprotein (hier EGFP) ist ein Maß für die in den Producer-Zellen entstandenen Partikel, beziehungsweise deren Funktionalität. Als Rezeptor für die Pseudotypisierung

wurde, wie auch bei den pseudotypisierten Partikeln zur Expression von hA3G, wieder VSV-G verwendet (Transfektion von pczVSV-G). Das sonst verwendete, MLV-basierte Plasmid pHIT60 (Expression von MLV-gag und -pol) und die dazugehörigen, auf pcMS28 basierenden Expressionsplasmide (z. B. pRH024 für wildtypisches hA3G) wurden durch das Plasmid pGJ3EGFP, einen Replikations-inkompetenten, HIV-1-basierten EGFP-Expressionsvektor, ersetzt.

Für das Assay wurden zunächst gleiche Mengen der als Producer-Zellen verwendeten 293T-Zellen mit den aufkonzentrierten Partikeln für die Expression von hA3G bzw. hA3G-Mutanten transduziert. Drei Tage später wurden die Zellen umgesetzt und einen Tag später mit pczVSV-G und pGJ3EGFP transfiziert. Weitere drei Tage später wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zur Transduktion von frischen 293T-Zellen verwendet. Wiederum drei Tage später wurden die in diesen Zellen vorhandene mittlere Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 4.32 stellt die in diesem Versuch ermittelten Werte grafisch dar.

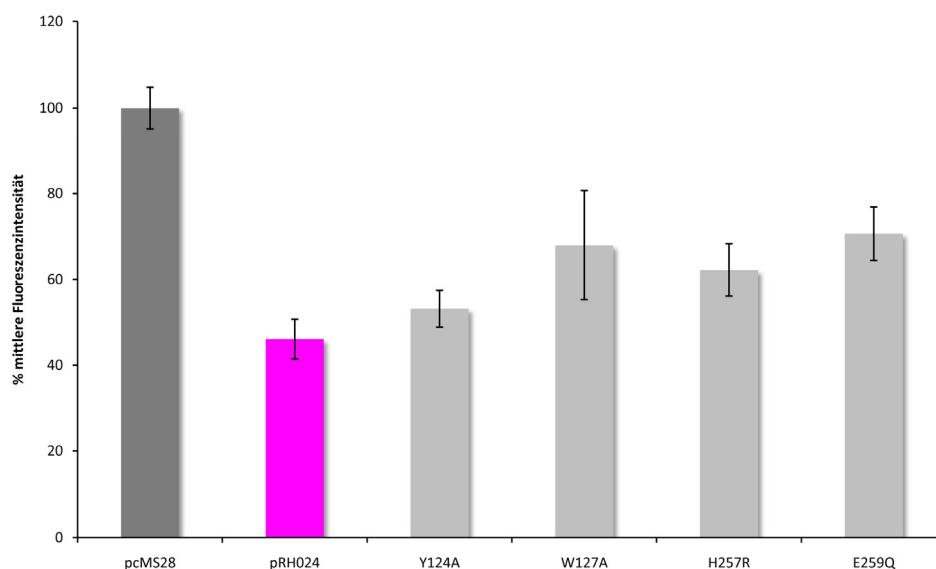


Abb. 4.32 | „HIV single round infectivity assay“ mit hA3G-Mutanten. Auf mit wildtypischem oder mutierten hA3G transduzierten 293T Zellen wurden HIV-EGFP VSV-G pseudotypisierte Partikel generiert und für die Transduktion frischer 293T Zellen verwendet. Drei Tage später wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von 10.000 dieser transduzierten 293T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität, welche durch Partikel aus mit wildtypischem hA3G transduzierten Zellen (pRH024) erreicht wird ist im Vergleich zu der, welche durch Partikel aus mit Leervektor transduzierten Zellen (pcMS28) erreicht wird um mehr als die Hälfte reduziert. Ist mutiertes hA3G in den Producer-Zellen vorhanden, so steigt die erreichte Fluoreszenzintensität an. Dies bedeutet, dass die bestehenden Mutationen hA3G in dessen Fähigkeit die HIV Replikation zu blockieren einschränken.

Wie in Abb. 4.32 zu erkennen ist, wird die Expression von EGFP in den transduzierten Zielzellen durch die Expression von wildtypischem hA3G in den Producer-Zellen um mehr

als 50 % reduziert. Dies beweist die Funktionalität des exprimierten hA3Gs. Die verschiedenen, in die hA3G-Sequenz eingefügten Punktmutationen bewirken eine verminderte Hemmung der Produktion von pseudotypisierten Partikeln, beziehungsweise eine höhere in den Zielzellen exprimierte Menge an EGFP. Hierbei sind die Mutationen W127A und E259Q in diesem Assay am effektivsten, um die hA3G-vermittelte Hemmung zu reduzieren – die in den Zielzellen gemessene Fluoreszenz steigt von ca. 50 % auf ca. 70 % an. Die Mutationen Y124A und H257R bewirken einen Anstieg auf 53 beziehungsweise 62 %.

4.11. Einfluss von mutiertem APOBEC3G auf die Replikation des Marnervirus

Um zu untersuchen, ob bei der durch hA3G vermittelten Restriktion von MV eine der konservierten Desaminase-Domänen beteiligt ist, wurden die generierten hA3G-Punktmutanten zunächst durch transiente Transduktion in Zielzellen eingebracht und diese transduzierten Zellen mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infiziert. Anschließend wurde die durch das viral exprimierte EGFP entstandene Fluoreszenz wie in den Versuchen in 4.2.2. beschrieben quantifiziert und die entstandenen Titer analog zu den Versuchen in 4.2.3. durch Titration ermittelt.

4.11.1. Quantifizierung von viral exprimiertem EGFP nach transienter Transduktion

Hierzu wurden gleiche Mengen Vero-Zellen mit einer MOI von 30 mit aufkonzentrierten, pseudotypisierten Partikeln der jeweiligen hA3G-Mutante transduziert und drei Tage später auf 6 Well Platten umgesetzt. Einen Tag später erfolgte die Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH (MOI 0,05) und die Fluoreszenz wurde weitere drei Tage später wie in 4.2.2. beschrieben quantifiziert.

Abb. 4.33 zeigt die quantifizierten Fluoreszenzen für mit pcMS28, pRH024, Y124A, W127A, H257R und E259Q transduzierte Vero-Zellen 3 dpi.

Wie in Abb. 4.33 ersichtlich, erfolgte nur für die Transduktion der hA3G-Mutante H257R eine Reduktion der entstanden Fluoreszenz (EGFP). Da jedoch der in 4.2.2. beschriebene Effekt von wildtypischen hA3G (pRH024 Transduktion) hier nicht beobachtet werden konnte, ist der Versuch nicht auswertbar.

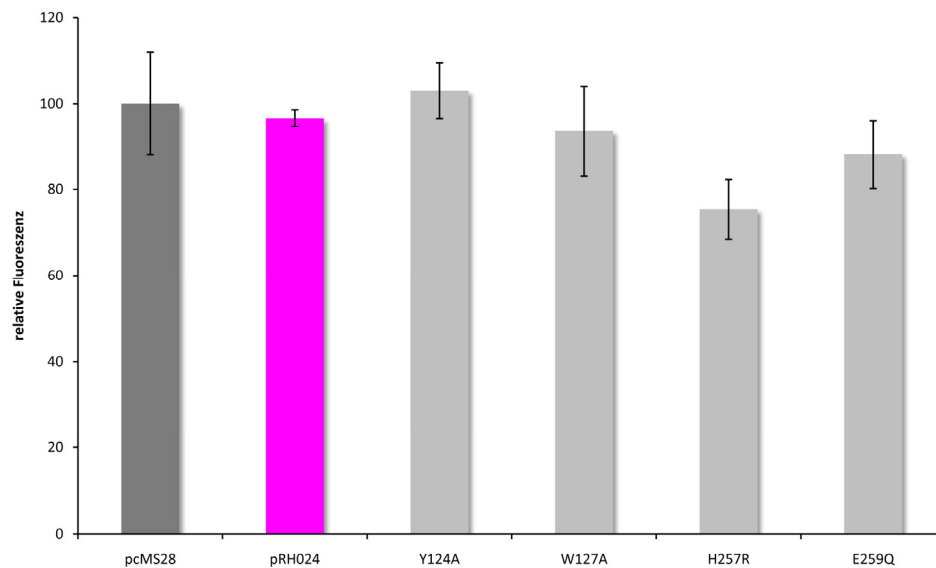


Abb. 4.33 | Relative Fluoreszenz von durch rMV^{Edtag} EGFPCAMH exprimiertem EGFP auf transient mit wildtypischem oder mutiertem hA3G transduzierten Vero-Zellen. Die Expression von viral exprimiertem EGFP auf den transient hA3G-exprimierenden Vero-Zellen (Wildtyp pRH024 oder Mutanten Y124A, W127A, H257R und E259Q) ist drei Tage nach Infektion mit rMV^{Edtag} EGFPCAMH im Vergleich zu der der Kontrolle (pcMS28) nicht signifikant unterschiedlich. Nur bei Mutante H257R ist eine Tendenz zur Reduktion erkennbar.

4.11.2. Bestimmung viraler Titer nach transienter Transduktion

Analog zu den Versuchen in 4.11.1. wurden Vero-Zellen transduziert, einen Tag später infiziert und die infizierten 6 Well Platten 3 dpi zunächst bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Wie in 4.2.3. beschrieben, wurden dann die entstandenen rMV^{Edtag} EGFPCAMH-Titer bestimmt.

Wie Abb. 4.34 zeigt, kann eine Reduktion bei den ermittelten Titern mittels transienter Transduktion von wildtypischem oder mutiertem hA3G analog zu dem in 4.2.3. gezeigten Effekt nicht beobachtet werden. Lediglich bei der hA3G-Mutante Y124A ist eine Reduktion der entstandenen Titer um ca. 70 % zu beobachten. Da jedoch (wie auch in 4.11.1.) die als Positivkontrolle fungierende Transduktion mit wildtypischem hA3G keine Reduktion des ermittelten Titors zeigt, kann auch dieser Versuch nicht ausgewertet werden.

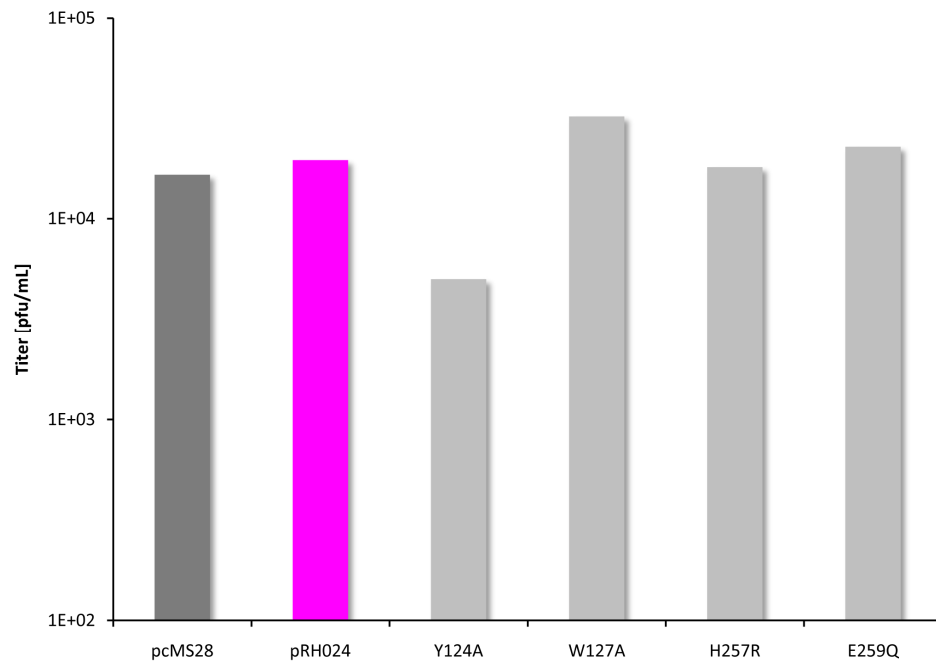


Abb. 4.34 | Titer von $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ auf Vero-Zellen mit transienter Transduktion von wildtypischem und mutiertem hA3G drei Tage nach Infektion. Die Menge an entstandenem infektiösen $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ -Partikeln auf den transient hA3G-transduzierten Vero-Zellen (Wildtyp pRH024 oder Mutanten Y124A, W127A, H257R und E259Q) ist im Vergleich zur Kontrolle (pcMS28) nicht reduziert. Eine Ausnahme bildet die Transduktion der Mutante Y124A, bei der die Menge an entstandenem infektiösen $rMV^{Edtag}EGFPCAMH$ -Partikeln um ca. 70 % reduziert ist.

5. Diskussion

5.1. APOBEC3G und das Masernvirus im Kontext der angeborenen Immunantwort

Als Teil der APOBEC3-Familie führt APOBEC3G wie viele weitere Mitglieder zu einer Beeinträchtigung der Replikation verschiedener Viren und Retroelemente (Refsland *et al.*, 2010). Das Protein wird durch verschiedene Interferone (IFNs) und Zytokine in seiner Expression gesteigert und stets auch auf einem bestimmten Niveau konstitutiv exprimiert. Aufgrund seiner antiviralen Eigenschaften kann es zusammen mit anderen zellulären Mechanismen als Teil der angeborenen Immunantwort gelten (Harris und Liddament, 2004; Stopak *et al.*, 2007; Refsland *et al.*, 2010).

Auffällig ist, dass sich die meisten APOBEC3G-exprimierenden Zelltypen und die bei einer MV-Infektion im menschlichen Körper zunächst bevorzugt infizierten Zellen überlappen. So wird APOBEC3G vor allem in peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) und lymphatischen Organen, aber auch im Knochenmark, der Leber, der Lunge und im Gehirn exprimiert (Koning *et al.*, 2009). Die früh während einer MV-Infektion infizierten Zelltypen sind CD150-exprimierende dendritische Zellen (DCs), Monozyten bzw. Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten der oberen Atemwege und drainierenden Lymphknoten (McChesney *et al.*, 1997; Tatsuo *et al.*, 2000; Erlenhöfer *et al.*, 2002; Condack *et al.*, 2007; de Swart *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2008).

Während einer MV-Infektion wird in infizierten Zellen über die Erkennung verschiedener Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs), wie doppelsträngiger RNA-Derivate und die Oberflächenproteine F und H, die Expression von Interferon- α/β induziert (Ikegame *et al.*, 2010). Die Expression von APOBEC3G in Monozyten bzw. Makrophagen, DCs und Lymphozyten wiederum kann durch Interferone und/oder Zytokine, vor allem durch IFN- α stimuliert werden (Rose *et al.*, 2004; Bonvin *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006b; Peng *et al.*, 2006; Sarkis *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2007; Pido-Lopez *et al.*, 2007; Stopak *et al.*, 2007; Koning *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Trapp *et al.* (2009) konnten außerdem zeigen, dass durch synthetische, doppelsträngige RNA (Poly (I:C)) die Bildung von IFN- α/β und die Rekrutierung von APOBEC3G in niedrig-molekulare Komplexe ohne eine Änderung des

APOBEC3G-mRNA-Expressionsniveaus in DCs induziert werden kann. Basierend auf anderen, neueren Studien sind CD14-positive, phagozytotische Zellen wie Monozyten bzw. Makrophagen jedoch die einzigen Leukozyten, in denen eine IFN-induzierte Erhöhung der APOBEC3-Expression bewirkt werden kann (Refsland *et al.*, 2010). In CD14-depletierten peripheren Lymphozyten des Blutes (PBLs) wiederum wird die APOBEC3G-Expression durch die Interleukine 2, 7 und 15 unter Einbeziehung des JAK- und MAP-Kinase Signalweges induziert (Stopak *et al.*, 2007).

Da Interferone eine Vielzahl zellulärer Abwehrmechanismen induzieren können, hat das MV, wie auch andere Paramyxoviren, Strategien entwickelt, um eine Interferonantwort der infizierten Zelle zu verhindern (vgl. 1.1.6.). Eine besondere Rolle spielen hierbei die akzesorischen Proteine C und V (Fontana *et al.*, 2008a). Obwohl alle heute verwendeten Impfstämme diese Proteine ebenfalls exprimieren, konnte doch gezeigt werden, dass wildtypische MV-Stämme eine wesentlich schwächere Induktion von IFNs bewirken, als dies für Impfstämme der Fall ist (Naniche *et al.*, 2000). Zusätzlich wird durch den Kontakt des Virus mit der Zelloberfläche neben der Hemmung des Akt-PI3-Kinase Signalweges auch der MAP-Kinase Signalweg gehemmt (Avota *et al.*, 2001, 2006), was zu einer Inhibition der Zytokin-Antwort einschließlich einer fehlenden Induktion der APOBEC3G-Expression führt. Im Fall einer Infektion mit attenuierten MV bleibt eine systemische Infektion des Wirtes aus. Es ist daher anzunehmen, dass die Induzierung einer Interferon-Antwort wesentlich dazu beiträgt, die wirtsspezifische Eliminierung des Virus zu vermitteln. Denkbar ist, dass in diesem Zusammenhang den Proteinen der APOBEC3-Familie, wie dem konstitutiv exprimierten und induzierbaren APOBEC3G, als Teil der angeborenen Immunität eine bedeutende Rolle zukommt.

Um diese Hypothese zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile, APOBEC3G-überexprimierende Zelllinien auf Basis von Vero-Zellen verwendet. Bei Vero-Zellen handelt es sich um eine Interferon-defiziente Zelllinie, die nach einer viralen Infektion keine Interferone des Typs I sekretiert (Desmyter *et al.*, 1968). Die Verwendung eines Interferon-freien Systems nach einer erfolgten MV-Infektion, sowie einer gleichzeitigen APOBEC3G-Überexpression erlaubt die gezielte Untersuchung einer möglichen Interaktion von MV und APOBEC3G.

Bevor eine Infektion mit MV erfolgte, wurden jedoch zunächst die möglichen Auswirkungen der APOBEC3G-Überexpression auf den Phänotyp und das Wachstum der Vero-Zellen untersucht. Immunfluoreszenz-Färbungen der APOBEC3G-exprimierenden Vero-Zelllinien zeigten, dass sich die Lokalisation des Proteins bei stabiler Überexpression in diesen Zellen (vgl. Abb. 4.1) nicht von der transienten Expression in menschlichen Zellen (HeLa-Zellen) unterscheidet (vgl. Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Die zelluläre Lokalisation des Proteins ist aufgrund des hohen enzymatischen Potentials der Desaminierung stark reguliert und

ausschließlich zytoplasmatisch. So könnte eine nukleäre Expression von APOBEC3G zu einer Editierung genomischer DNA führen, welche damit die Zelle irreparabel schädigen würde (Sawyer *et al.*, 2004). Auch innerhalb des Zytoplasmas ist die Lokalisation von APOBEC3G reguliert. Anreicherungen des Proteins befinden sich in höher- oder niedriger-molekularen Komplexen, wobei ein geringer Teil des Proteins auch zytoplasmatisch diffus verteilt vorliegt (Chiu *et al.*, 2006). Phänotypisch sind auch die APOBEC3G-freien Kontrollzellen nicht von den APOBEC3G-exprimierenden Zellen zu unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass die vorhandenen Mechanismen zu Regulation der APOBEC3G-Aktivität und -Lokalisation auch bei Überexpression des Proteins in artfremden Zellen greifen und somit eine normale zelluläre Aktivität weiterhin gewährleistet ist. Die Western-Blot- und durchflusszytometrische Analyse der artifiziell erstellten APOBEC3G-exprimierenden Zelllinien zeigte außerdem eine einheitlich hohe Expression des Proteins (vgl. Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Obwohl dieses eventuell über dem natürlich vorkommenden Niveau in primären Zellen liegt, konnte auch keine Beeinträchtigung des Zellwachstums im CFSE-Test beobachtet werden (Abb. 4.4).

Das in dieser Arbeit verwendete Modell einer APOBEC3G-überexprimierenden Zelle ohne ein induzierbares IFN-System ist daher gut geeignet, um einen möglichen Einfluss von APOBEC3G auf die Replikation des MV *in vitro* zu untersuchen. Eine mögliche Induktion weiterer zellulärer Restriktionsmechanismen nach erfolgter Infektion bleibt aus und erlaubt somit allein die Beobachtung und Messung einer möglichen APOBEC3G-vermittelten Restriktion. Im Fokus dieser Arbeit standen bei der Untersuchung dieses potentiellen restriktiven Effektes hierbei die Desaminase-abhängigen als auch -unabhängigen Mechanismen des Proteins im Rahmen der angeborenen Immunantwort.

5.2. Die Rolle von APOBEC3G bei der Replikation des Masernvirus

Der Einfluss von humanem APOBEC3G auf die Replikation des Masernvirus

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die hA3G-exprimierenden Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 sowie die Kontrolllinie 023 mit verschiedenen rekombinanten MV-Stämmen infiziert um zu klären, ob dessen Replikation in irgendeiner Weise durch die Anwesenheit von APOBEC3G beeinflusst wird.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die nach Infektion mit dem MV entstehende Formation von Synzytien in der Kultur adhärenter Zellen durch hA3G verändert wird. Hierzu wurden die vorliegenden Zelllinien entweder mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH oder mit rMV^{IC323}EGFP infiziert. Im letzteren Fall, bei welchem eine Infektion nicht über den auf den Zelllinien natürlicherweise vorhandenen Rezeptor CD46 sondern über den Wildtyp-Rezeptor CD150 erfolgt, wurden die Zellen zunächst mit pseudotypisierten, retroviralen Partikeln zur

Vermittlung einer CD150-Expression behandelt. Diese Vorbehandlung machte eine Infektion der auf Vero-Zellen basierenden Linien möglich (Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Es zeigte sich, dass sowohl für den Impfstamm als auch den wildtypischen Stamm eine deutliche Reduktion der Bildung von Synzytien beobachtet werden konnte (Abb. 4.5 und Abb. 4.7). Die Entwicklung der Infektion in den hA3G-exprimierenden Zellen wirkte, besonders mit fortschreitender Dauer, gegenüber der in Kontrollzellen verzögert.

In der Literatur sind bereits einige Mechanismen beschrieben worden, die zu einer vergleichbaren Reduktion der Bildung von Synzytien führen können. So hat beispielsweise die Transfektion von siRNA oder die Transduktion shRNA-exprimierender Vektoren, welche eine Verringerung der Expression der MV-Proteine N oder P bewirken, einen vergleichbaren Effekt (Reuter *et al.*, 2006; Zinke *et al.* 2009). Auch die Anwesenheit chemischer Substanzen, welche eine Interaktion des MV oder CDV mit zellulären Rezeptoren konzentrationsabhängig blockieren (Löffler *et al.*, 1997; Erlenhöfer *et al.*, 2001; Singethan *et al.*, 2010) oder Mutationen im MV-H-Protein (Kato *et al.*, 2009) führen zu ähnlichen Reduktionen im Wachstum von MV. Da es sich bei APOBEC3G jedoch um ein intrazelluläres Protein handelt, sind Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren unwahrscheinlich. Eine mögliche Ursache für den beobachteten Effekt, welcher auch in einem verlangsamten Wachstum der hA3G-exprimierenden Zelllinien begründet sein könnte, wurde durch Tests mit CFSE bereits ausgeschlossen (Abb. 4.4). Wahrscheinlich sind also Interaktionen von APOBEC3G mit intrazellulär vorliegenden Komponenten von MV, wie genomischer bzw. antigenomischer RNA, mRNA oder MV-Proteinen. Würde z. B. eine Bindung von APOBEC3G an MV-N-mRNA oder an MV-N-Proteine zu einer Reduktion funktionaler MV-N-Proteine führen, wäre die beobachtete Reduktion des MV-Wachstums erklärbar (vgl. Reuter *et al.*, 2006). Der Verlauf der Synzytienbildung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH und rMV^{IC323}EGFP auf hA3G-exprimierenden Vero-Zelllinien hat also gezeigt, dass APOBEC3G dazu in der Lage ist, die Replikation des MV negativ zu beeinflussen und dass dies vermutlich über eine Interaktion intrazellulärer Komponenten erfolgt.

Die Quantifizierung des während der Infektion von beiden Stämmen exprimierten EGFPs dreier unabhängiger Versuche im Fluoreszenzreader bestätigte die zuvor beobachtete Reduktion (Abb. 4.8 und Abb. 4.9). So liegt das EGFP-Niveau in mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infizierten 024-1-, 024-2- und 024-3-Zellen erst 3 dpi knapp über dem Niveau, welches in 023-Zellen schon nach 2 dpi erreicht wurde (Abb. 4.8). Ebenso erreicht nur die Infektion in 024-3-Zellen mit rMV^{IC323}EGFP 4 dpi das EGFP-Niveau, welches in 023-Zellen bereits 3 dpi erreicht wurde. Das Niveau in 024-1- und 024-2-Zellen ist 4 dpi immer noch geringer (Abb. 4.9). Auch in diesen Versuchen bestätigte sich die zuvor gemachte Beobachtung, dass im Verlauf der Infektion eine Akkumulation der Restriktion erfolgt. In den hA3G-exprimierenden Zellen beträgt das EGFP-Niveau nach Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH 2 dpi beispielsweise durchschnittlich 44 % des Niveaus in 023-Zellen. 3 dpi sind es jedoch nur noch 32 %

(Abb. 4.8). Wird hingegen eine Ausbreitung der Infektion durch die Anwesenheit eines Fusionsinhibitors (FIP) blockiert, so ist anschließend nur noch eine nicht signifikante Tendenz zur Reduktion erkennbar (Abb. 4.16).

Eine Akkumulation der Restriktion der Synzytienbildung ist auch für rekombinante, wildtypische MV-Stämme beobachtet worden, bei denen die Gene des P- bzw. L-Proteins durch die attenuierter Impfstämme ersetzt wurden (Takeda *et al.*, 2008). Hier wird die eingeschränkte Fähigkeit zu Bildung von Synzytien durch eine verlangsamte Aktivität des MV-Polymerase-Komplexes und einer daraus resultierenden verringerten Genexpression bewirkt. Gleiches konnten auch Duprex *et al.* (2002) beobachten, indem sie die Sequenz des EGFP in eine der zwei Gelenk-Regionen des MV-L-Proteins inserierten und so eine grün fluoreszierende, aber dennoch funktionale MV-Polymerase erstellten. Auch in diesem Fall führte die gezielte Veränderung der Polymerase zu einem verlangsamten Wachstum des rekombinanten MV *in vitro*. Ein weiterer Faktor, welcher das Wachstum von MV positiv oder negativ beeinflussen kann, ist das Vorhandensein untranslatierter Regionen (UTRs) im MV-M- und MV-F-Gen (Takeda *et al.*, 2005). Die Autoren konnten zeigen, dass Deletionen dieser UTRs die Expression der MV-M- und MV-F-Proteine und somit auch die Replikation des Virus modifiziert. Die in diesen Veröffentlichungen gemachten Beobachtungen zeigen also, dass vielfältige Faktoren existieren, die ein modifiziertes MV-Wachstum hervorrufen. Für APOBEC3G und das MV scheint außerdem die Ausbreitung des Virus durch Zell-Zellfusion den Restriktionsprozess zu verstärken, wie die Verwendung von FIP und die durchflusszytometrischen Messungen des exprimierten EGFPs zeigten (Abb. 4.16). Vermutlich ist dies auf die erhöhte Menge an APOBEC3G-Proteinen während des Infektionsprozesses zurückzuführen, die ihren Einfluss auf die MV-Komponenten bei jeder Zellfusion erneut ausüben können. Die durch die Quantifikation des viral exprimierten EGFPs beobachtete Restriktion der MV-Replikation durch hA3G bestätigte also die Vermutung, dass es sich bei dem restriktiven Prozess um eine Interaktion von APOBEC3G mit intrazellulären Bestandteilen des Virus handeln muss. In den bis *dato* durchgeführten Versuchen diente die Expression des viralen EGFPs als Maßstab der Restriktion. Da sich die eigenständige Genkassette des EGFPs der in dieser Arbeit verwendeten MV-Stämme jedoch im 5'-Bereich des Genoms noch vor der des N-Gens befindet und daher am stärksten exprimiert wird (vgl. 1.1.5.), sollte im Folgenden zunächst die Auswirkungen der hA3G-Expression auf die vollständige Synthese funktionaler viraler Partikel untersucht werden.

Die Bestimmung replikationskompetenter viraler Partikel erfolgte in dieser Arbeit über den sog. Plaque-Assay (3.4.3.). Durch Verdünnung der zu titrierenden Virus-Suspensionen werden infizierte Bereiche adhärenter Zellen (Plaques) sichtbar, welche auf ein einziges, funktionales Virus-Partikel zurückgehen. Mit Hilfe dieser Technik wurden verschiedene MV-Präparationen von rMV^{Edtag}EGFPCAMH und rMV^{IC323}EGFP aus Infektionen der Linien 023 sowie 024-1, 024-2 und 024-3 titriert. Hierbei zeigte sich, dass die aus hA3G-exprimierenden

Zelllinien stammenden Titer um das Zehn- bis Hundertfache gegenüber denen aus Kontrollzellen 023 reduziert waren (Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Dies traf auf beide titrierten Stämme zu, wobei der Effekt bei rMV^{Edtag}EGFPCAMH am prominentesten ausgeprägt war (Abb. 4.10). Die wiederholte Passagierung von rMV^{Edtag}EGFPCAMH auf hA3G-exprimierenden Zellen zeigte außerdem, dass diese Reduktion viraler Titer mit der zunehmenden Anzahl an Passagierungen zunahm. So sanken die Titer aus 024-2- und 024-3-Zellen zwischen der ersten und der dritten Passage weiter ab, wohingegen die Titer aus 023-Zellen nahezu konstant blieben (Abb. 4.12).

Die Anwesenheit von APOBEC3G-Proteinen bei der MV-Replikation hat also auf die Synthese von funktionalen Viruspartikeln einen größeren Einfluss (Faktor 10-100), als auf die Expression eines viralen Proteins (EGFP) allein (Faktor 2). Da funktionelle Partikel nur dann gebildet werden, wenn alle dafür notwendigen Faktoren zur Verfügung stehen, ist es in diesem Fall wahrscheinlich, dass APOBEC3G restriktiv in mehrere dieser Prozesse eingreift. Möglich ist jedoch auch, dass sich eine Interaktion von APOBEC3G mit einer für die Replikation erforderlichen Komponente auf die Funktion mehrerer weiterer Komponenten auswirkt, wie es z. B. für das MV-V-Protein bekannt ist. Das V-Protein interagiert mit der viralen RNA-Polymerase und führt bei Überexpression zu einer Inhibition der viralen Genexpression, was u. a. zu einer Reduktion aller translatierten Proteine, sowie einer daraus resultierenden drastischen Reduktion der Produktion infektiöser Viruspartikel führt (Tobler *et al.*, 1998; Niewiesk, 2009). Hierbei ist der beobachtete Effekt der Titer-Reduktion mit dem in hA3G-exprimierenden Zellen vergleichbar (vgl. Tobler *et al.*, 1998), was darauf hindeutet, dass es sich um einen vergleichbaren Mechanismus mit ähnlicher Relevanz handeln könnte. Nicht durch die in dieser Arbeit durchgeführten Titrationen messbar ist jedoch der nach Infektion entstehende Anteil an replikationsinkompetenten Partikeln, welcher nähere Auskunft über die Art der APOBEC3G-MV-Interaktion geben könnte. Die Titration der MV-Präparationen aus hA3G-exprimierenden Zellen hat also gezeigt, dass die Restriktion von APOBEC3G nicht nur das viral exprimierte EGFP, sondern den ganzen MV-Replikationszyklus betrifft.

Um einen tieferen Einblick in das Ausmaß der APOBEC3G-vermittelten Restriktion der MV-Genexpression zu erhalten, sollte in weiteren Versuchen daher zunächst die Transkriptmenge von stark, intermediär und schwach transkribierten MV-Genen, die daraus resultierende Menge an entstehender genomischer MV-RNA in Viruspartikeln, sowie die wiederum daraus entstehende Menge an MV-Transkripten (hier MV-N) in APOBEC3G-freien Zielzellen, wie sie auch für die Titration verwendet wurden, in Real Time RT-PCRs bestimmt werden. Dafür wurden hA3G-exprimierende Zellen oder Kontrollzellen mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH infiziert und drei Tage später (i) RNA aus diesen Zellen präpariert, (ii) RNA aus gleichen Teilen des Zellkultur-Überstandes präpariert, sowie (iii) gleiche Teile an Zellkultur-Überstand für die Infektion von neuen, hA3G-freien Vero-Zellen verwendet, aus denen nach 2 bzw. 24 Stunden wiederum RNA präpariert wurde. In Real Time RT-PCRs wurde anschlie-

ßend die relative Menge an MV-N-, MV-F-, und MV-L-mRNAs in hA3G-exprimierenden Zellen oder Kontrollzellen, die Menge an genomischer MV-RNA in den dazugehörigen Kulturüberständen, sowie die Menge an MV-N-RNA für 2 und 24 Stunden nach Neuinfektion hA3G-freier Zellen in diesen RNAs bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Menge aller drei bestimmten MV-mRNAs in Zelllysaten aus hA3G-exprimierenden Zellen (Abb. 4.14a) in einer ähnlichen Weise (50-70 %) wie bei der zuvor beobachtete Reduktion von EGFP (Abb. 4.8) reduziert waren. Der für MV bestehende Transkriptionsgradient (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990, 1999) war hierbei in allen untersuchten Fällen identisch (Abb. 4.14a). Interessanterweise führt APOBEC3G bei HIV-1 zu einer Reduktion viraler cDNA, indem es deren Synthese inhibiert, nicht aber die Initiation der reverse Transkription hemmt (Anderson und Hope, 2008; Bishop *et al.*, 2008). Dies scheint für das MV nicht der Fall zu sein, da sonst ein Abfall des Transkriptionsgradienten in hA3G-exprimierenden Zellen zu beobachten gewesen wäre. Vielmehr scheint hier generell die Initiation der Transkription inhibiert zu werden.

Für die Menge an genomischer MV-RNA in Überständen aus 024-1- und 024-2-Zellen konnte ebenfalls eine Reduktion zwischen 50 und 70 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 4.14b). Dies widerspricht der zuvor beobachteten 90 bis 99 %igen Reduktion viraler Titer (Abb. 4.10 und Abb. 4.11), weil diese indirekt mit der Anzahl an transkribierten Genomen korrelieren müsste. Da jedoch in der durchgeführten Real Time RT-PCR nur der Anteil der genomischen RNAs, nicht aber deren Funktionalität gemessen wurde, deutet dies auf einen erhöhten Anteil an nichtfunktionalen MV-Genomen hin, welcher zu der zuvor beobachteten drastischen Reduktion viraler Titer geführt haben könnten. Auch für HIV-1 wurde bereits gezeigt, dass Vif-defiziente Stämme, welche in nicht-permissiven, APOBEC3G-exprimierenden Zelllinien replizieren, gegenüber Wildtyp-Stämmen eine 55 bis 80 %ige Reduktion der synthetisierten cDNA, sowie eine vergleichbare Menge an produziertem p24-Protein aufweisen (Fisher *et al.*, 1987; Carr *et al.*, 2006). Zu Beginn hat APOBEC3G also auch bei HIV nur einen geringeren Einfluss auf die Replikation des Virus. Die nahezu vollständige Inhibition der Virussynthese erfolgt erst anschließend durch verpacktes APOBEC3G in neu infizierten Zellen (Henriet *et al.*, 2009).

Die relative Änderung der MV-N Transkriptmenge zwischen 2 und 24 Stunden nach Infektion mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH aus Kontrollzellen betrug das in etwa das Vierfache, wohingegen mit Virus aus hA3G-exprimierenden Zellen ein Abfall der Transkriptmenge beobachtet werden konnte (Abb. 4.15). Dieser Unterschied erklärt die beobachtete drastische Reduktion der zuvor titrierten Viruspartikel (Abb. 4.10 und Abb. 4.11), wobei es zunächst unlogisch erscheint, dass sich die gemessenen Transkripte in Infektionen mit Virus aus hA3G-exprimierenden Zellen reduzieren. Bedenkt man jedoch, dass durch die durchgeführten Messungen auch MV-N-Sequenzen aus nichtfunktionaler genomischer RNA erfasst wer-

den, welche keine Grundlage für eine spätere Transkription darstellen und 22 Stunden später bereits degradiert sein könnten, lässt sich dieser Abfall durchaus erklären. Frühe Studien haben zwar gezeigt, dass alle viralen mRNAs eine identische und eher langsame Umsatzrate besitzen (Ogura *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1991), da solche Raten jedoch durch Northern Blots bestimmt wurden, welche starre statt dynamischer Zustände zum Zeitpunkt der Probeentnahme messen, ist weiterhin nicht viel über die Umsatzrate viraler RNA-Spezies, insbesondere der genomischer und antigenomischer RNAs bekannt (Rima und Duprex, 2009).

Die gemessenen Änderungen der MV-mRNAs in hA3G-exprimierenden Zellen, der genomischen RNA in Überständen und der MV-N-Transkripte nach 22 Stunden in infizierten, hA3G-freien Zellen bestätigten also, dass APOBEC3G zunächst eine geringere generelle Inhibition von MV-Transkripten und genomischer RNA bewirkt (~50 %), aber dass diese jedoch zu einer verstärkten Reduktion replikationskompetenter Partikel führt (>90 %). Inwiefern die genomische MV-RNA als zentraler Teil des Virions an der Entstehung der Differenz zwischen funktionalen und nichtfunktionalen Partikeln beteiligt war, konnte durch die bisher durchgeführten Experimente jedoch noch nicht gezeigt werden. Um diese Frage zu klären, wurde daher im nächsten Schritt eine Sequenzierung von Teilen der MV-N- und MV-M-mRNA aus Infektionen von hA3G-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen durchgeführt, um zu überprüfen, ob APOBEC3G dazu in der Lage ist, MV-spezifische mRNA bzw. genomische oder antigenomische RNA zu mutieren.

Hierzu wurde RNA aus drei Tage infizierten 024-1-, 024-2- und 024-3-Zellen sowie Kontrollzellen präpariert und einer RT-PCR unterzogen. Anschließend wurden aus der so entstandenen cDNA Bereiche der MV-N- und MV-M-Sequenzen amplifiziert und in einen TA-Vektor kloniert. Durch die nachfolgende Amplifizierung und Sequenzierung verschiedener Klone konnten die Sequenzen einzelner cDNAs mit der Originalsequenz des Virus verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass es in allen sequenzierten Klonen gleichermaßen zu einem Anstieg unspezifischer Mutationen (durchschnittlich 0,95 Mutationen pro 1.000 bp), mit einer Präferenz für A nach G (~46 % aller Mutationen), gefolgt von Präferenzen für T nach C (~18 % aller Mutationen), sowie G nach A (~11 % aller Mutationen) und C nach T (~9 % aller Mutationen) kam (Abb. 4.13). Es handelte sich um das gleiche Muster, welches auch in Kontrollzellen in einem geringeren Maße (durchschnittlich 0,2 Mutationen pro 1.000 bp) zu beobachten war (Abb. 4.13).

Dies war überraschend, handelt es sich bei den eigentlich durch Desaminierung verursachten Mutationen, welche durch APOBEC3G-Proteine vermittelt werden, doch um C zu T bzw. G zu A Austausch (Vartanian *et al.*, 1991; Chiu und Greene 2008b). Da außerdem die Anzahl der detektierten Mutationen im Vergleich zu den bei HIV-Genomen beobachteten sehr gering ist, kann in diesem Fall eine direkte Desaminierung von MV-RNA-Spezies durch

APOBEC3G ausgeschlossen werden. Im Fall von APOBEC3G-vermittelter Mutation von HIV-Genomen werden in nahezu allen HIV-Patienten G zu A Austausche detektiert, die durchschnittlich zwischen 10 und 20 % (Kieffer *et al.*, 2005), manchmal sogar bis zu 60 % (Chiu und Greene, 2008b) aller Guanine eines Genoms ausmachen können. Dies entspricht einer möglichen Rate von ~36 bis 145 Mutationen pro 1.000 bp. Die beobachteten Mutationen der MV-cDNA scheinen dagegen von einem Faktor verursacht zu werden, der auch in Kontrollzellen bereits anwesend war, daher das identische Muster bei Kontrollen und hA3G-exprimierenden Zellen. Dies deutet erneut auf die virale RNA-Polymerase hin, welche zum Zeitpunkt der Anwesenheit von APOBEC3G die später sequenzierten Bereiche synthetisierte. Möglich wäre also, dass das normalerweise vorhandene Muster an zufällig durch die RdRp eingefügten Mutationen in Anwesenheit von APOBEC3G verstärkt wird. Die beobachtete Mutationsrate von 0,95 bp pro 1.000 bp führt rein rechnerisch zu ca. 15 zufällig verteilten Mutationen pro MV-Genom (~16 kb). Hiervon befinden sich durchschnittlich 6 im ORF der RdRp. 15 Mutationen führen zu ca. 5 bis 7 Aminosäureaustauschen, einschließlich entstehender Stop-Codons, welche zu nichtfunktionalen Proteinen führen können. Interessanterweise sind RNA-Viren für ihre hohe Mutationsrate bekannt (Holland *et al.*, 1982), was logischerweise auch für eine hohe Fehlerrate ihrer Polymerasen spricht. Gleichzeitig ist aber das MV auch als ein Virus mit sehr stabilem Genom bekannt (Rima *et al.*, 1995, Duprex *et al.*, 2000; de Swart *et al.*, 2007; Ludlow *et al.*, 2008), was dieser Tatsache widerspricht, aber auch darauf hindeutet, dass hier ein hoher Selektionsdruck für funktionale Genome bestehen muss. Die mögliche durch APOBEC3G verursachte Interferenz mit der RdRp könnte daher neben der Reduktion der viralen Genexpression um ~50 % auch dafür ausreichend zu sein, die normale Anzahl an funktionalen Partikeln auf 10 bis 1 % des normalen Wertes zu reduzieren.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte daher geklärt werden, ob es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus der APOBEC3G-vermittelten Restriktion der MV-Genexpression und -Replikation tatsächlich um eine Beeinflussung der RdRp handelt und ob diese durch eine Protein-Protein-Interaktion, eine Interaktion mit viraler RNA, oder durch beides verursacht wird.

Fehlende Kolokalisation von APOBEC3G und Proteinen des Masernvirus

Der erste Weg bei der Suche nach möglichen Proteininteraktionen ist der über eine direkte Färbung der beteiligten Proteine mit anschließendem Nachweis einer Kolokalisation. Um zu klären, ob APOBEC3G in direkter Interaktion mit MV-Proteinen steht, wurden daher Immunfluoreszenzfärbungen mit rMV^{Edtag}EGFPCAMH-infizierten, hA3G-exprimierenden Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass keine offensichtliche Kolokalisation der MV-Proteine N, P, M, F und H mit hA3G besteht (Abb. 4.19). Selbst eine Kolokalisation des RNA-

bindenden hA3G mit der RdRp (L), welche am unmittelbarsten in Kontakt zu allen viralen RNA-Spezies steht, konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.20).

APOBEC3G ist über das Zytoplasma verteilt und vor allem in mRNA-prozessierenden Partikeln lokalisiert (Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Obwohl eine offensichtliche Kollokalisierung von APOBEC3G mit MV-Proteinen, insbesondere der RdRp, nicht beobachtet werden konnte, kann eine Interaktion mit der Polymerase oder dem RNP nicht ganz ausgeschlossen werden. Der fehlende Nachweis könnte durch eine zu geringe Affinität des Proteins, durch eine zu kurze Bindung oder durch eine Interaktion von ausschließlich diffusem, nicht in großen Komplexen gebundenem APOBEC3G bedingt sein, welcher in den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen nicht gut detektierbar ist. Färbungen von MV-Proteinen und die Verwendung der rekombinanten MV-Polymerase mit EGFP haben gezeigt, dass zumindest die Synthese der viralen N-, P- und M-mRNAs in zytoplasmatischen Komplexen erfolgt (Duprex *et al.*, 2002; Ludlow *et al.*, 2005), was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abb. 4.20). APOBEC3G scheint offenbar nicht in diesen viralen Komplexen lokalisiert zu sein. Dies impliziert jedoch nicht, dass eine mögliche Interaktion mit viralen RNA-Spezies, die nicht (mehr) Teil dieser Komplexe sind, trotzdem besteht. Das Ziel weiterer Versuche war daher, eine mögliche Interaktion von APOBEC3G mit viralen RNAs nachzuweisen.

Die Bindung von markiertem APOBEC3G an virale RNA

Um zu überprüfen, ob APOBEC3G in der Lage ist virale RNA zu binden, wurden zunächst Expressionsvektoren für verschieden markierte hA3G-Proteine erstellt (4.6.). Expressionstests mit diesen markierten Proteinen zeigten, dass (i) deren zelluläre Lokalisation der des wildtypischen Proteins entspricht und dass (ii) eine Koexpression verschieden markierter Proteine innerhalb einer Zelle möglich ist (Abb. 4.21, Abb. 4.22 und Abb. 4.23). Die identische zytoplasmatische Verteilung zweier verschieden markierter hA3G-Proteine bei Koexpression (Abb. 4.22) zeigt außerdem, dass diese mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Hetero-Dimeren bzw. Hetero-Oligomeren befähigt sind. Diese und andere Studien (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007; Ao *et al.*, 2008; Huthoff *et al.*, 2009) lassen den Schluss zu, dass die markierten hA3G-Proteine in ihrer Aktivität nicht beeinträchtigt werden und daher ein geeignetes Modell darstellen, um die Bindungseigenschaften von APOBEC3G mit RNA und/oder Proteinen zu untersuchen.

Im Anschluss wurden hA3GHA exprimierende Zellen nach Infektion mit rMV^{Edta}-[§]EGFPCAMH für eine HA-Immunpräzipitation verwendet und mit den präzipitierten Proteinen RT-PCRs durchgeführt. Als Kontrolle für eine von hA3G gebundene RNA wurden Primer für hY1 verwendet, einem L1-abhängigem, nichtautonomen hY RNA Retroelement,

welches neben anderen zellulären RNA-Spezies dafür bekannt ist, von APOBEC3G in hochmolekularen Komplexen gebunden zu werden (Perreault *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007). Es zeigte sich, dass durch die Präzipitation von hA3GHA hY1-, EGFP-, MV-M-, MV-F-, MV-H- und in einem geringen Maße auch MV-P-RNAs kopräzipitiert werden konnten (Abb. 4.24a). In einem analogen Ansatz wurde statt Proteinlysat UZ-gereinigtes Virus aus Infektionen von hA3GHA-exprimierenden Zellen für die RT-PCRs verwendet. Hier war nur noch MV-M-RNA sehr schwach nachweisbar (Abb. 4.24b).

Während der Replikation aller Mitglieder der *Mononegavirales* bildet sich ein Gradient der Genexpression aus (1.1.5.), bei dem die dem 3'-Bereich des Genoms näher liegenden Gene (z. B. N und P) stärker exprimiert werden, als die dem 3'-Bereich des Genoms ferner liegenden Gene (z. B. H und L) (Gupta und Kingsbury, 1985; Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1989; Banerjee *et al.*, 1991; Whelan *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte eine Bindung von hA3G an MV-N-RNA nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.24a), obwohl die Fähigkeit von APOBEC3G zur Bindung an verschiedene mRNAs bekannt ist (Kozak *et al.*, 2006) und auch mehrere MV-RNAs von hA3GHA gebunden werden konnten. Dies ist insofern erstaunlich, da gerade MV-N-mRNA aufgrund des Transkriptionsgradienten (neben der artifiziellen Expression der EGFP-mRNA des verwendeten rekombinanten Virus) am stärksten gebildet wird. Daher ist es möglich, dass entweder seitens APOBEC3G eine Präferenz für bestimmte MV-RNAs besteht, oder dass aufgrund anderer Faktoren die MV-N-RNA (und ebenso die MV-L-mRNA) für eine Bindung durch APOBEC3G nicht zugänglich sind. Die ausgeprägte Präferenz von APOBEC3G für bestimmte RNAs im Allgemeinen und mRNAs im Besonderen wird in der Literatur bereits diskutiert (Jarmuz *et al.*, 2002; Kozak *et al.*, 2006).

Bei dem Nachweis von hY1 und MV-spezifischen RNAs aus UZ-gereinigtem Virus fällt auf, dass alle diese RNAs, unabhängig von einer Transfektion mit hA3GHA, zunächst per RT-PCR detektierbar waren (Abb. 4.24b). Dies spricht für eine unspezifische Anwesenheit dieser RNAs in Viruspartikeln sowie einer hohen Sensitivität der durchgeführten RT-PCR, da bei der Präzipitation von HA-markiertem hA3G anschließend nur noch sehr schwach MV-M-RNA nachweisbar ist. Die aus unpräzipitierten Proben detektierten RNAs können also nicht an hA3GHA gebunden vorgelegen haben, da sie sonst auch mitpräzipitiert hätte werden müssen. Für diese Interpretation spricht auch, dass keine hY1-RNA in hA3GHA-Präzipitaten vorhanden war, da vermutlich hA3GHA ohne gebundene MV-RNAs nicht in Partikeln eingebaut wird. Dass nur eine sehr geringe Menge an MV-M-RNA in hA3GHA-Präzipitaten detektiert wird deutet darauf hin, dass die von hA3G gebundene RNA hauptsächlich aus mRNA besteht, welche nicht, oder nur zu einem sehr geringen Teil in viralen Partikeln vorhanden ist. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen hA3G-gebundener mRNA und genomischer RNA ist in diesem Versuch jedoch nicht möglich. Obwohl also eine direkte Interaktion von APOBEC3G mit MV-Proteinen in Immunfluoreszenzfärbungen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4.19 und Abb. 4.20), so zeigt die nachgewiesene Fähigkeit von hA3G zur

Bindung einiger MV-RNAs (Abb. 4.24a), dass eine physische Interaktion tatsächlich stattfindet.

Die Bindung von markiertem APOBEC3G an virale Proteine

Die markierten hA3G-Proteine wurden außerdem dazu verwendet, um erneut eine mögliche Interaktion von APOBEC3G und MV-Proteinen nachzuweisen. Hierzu wurden nach einer Präzipitation von hA3GHA aus infizierten Lysaten eventuell mitpräzipitierte Proteine mittels eines Western-Blots detektiert. Als Kontrolle für eine Kopräzipitation diente das ebenfalls in den Lysaten anwesende A3GFLAG, welches allerdings schließlich nur in den Präzipitaten mit hA3GHA Transfektion, nicht jedoch in Zelllysaten nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.25). Nicht detektierbar war A3GFLAG ebenso in Präzipitaten, welche aus Zellen stammten, die nicht mit hA3GHA transfiziert wurden. MV-Proteine konnten in allen Lysaten und zu einem sehr geringen Teil auch in hA3GHA Immunpräzipitaten nachgewiesen werden.

APOBEC3G bildet Dimere und Oligomere aus (1.2.3.) (Harjes *et al.*, 2009). Huthoff *et al.* (2008) zeigte bereits, dass über die Präzipitation eines HA-markierten hA3Gs auch die Detektion von wildtypischem, unmarkiertem APOBEC3G möglich ist. In dieser Arbeit konnte dies mit zwei unterschiedlich markierten APOBEC3G-Proteinen bestätigt werden (Abb. 4.25). Die fehlende Detektion von FLAG-markiertem hA3G in Zelllysaten lässt sich dadurch erklären, dass die spezifische Präzipitation von hA3GHA aus einer großen Menge Lysat die Detektierbarkeit von gebundenem A3GFLAG erhöht, welches sonst in Lysaten vermutlich in einer zu geringen Menge exprimiert wird. Für die Spuren mit Lysaten wurden insgesamt nur 25 µg zelluläres Gesamtprotein aufgetragen, wohingegen für die Präzipitation 250 µL Lysat mit einer wesentlich höheren Gesamtproteinmenge verwendet wurde. Die geringe Menge an detektierten MV-Proteinen in der IP von hA3GHA transfiziertem Zelllysate ist in der IP von untransfiziertem Zelllysate, ebenso wie A3GFLAG, nicht vorhanden, was dafür spricht, dass es sich bei den detektierten Proteinen tatsächlich um eine spezifische Färbung von MV-Proteinen und nicht um eine Hintergrundfärbung handelt. Die schwache Färbung zeigt jedoch auch, dass es sich um eine sehr geringe Menge von MV-Proteinen handelt. Vermutlich wurde die Präzipitation der MV-Proteine über RNA-Brücken mit hA3G bewirkt, welche die indirekte Interaktion vieler Proteine mit APOBEC3G vermitteln (Kozak *et al.*, 2006). Ein zusätzlicher Vergleich mit RNase-behandelten Proben könnte darüber Auskunft geben. Die starke Färbung des kopräzipitierten A3GFLAG zeigt zusätzlich, dass es sich nur um eine indirekte Interaktion handeln könnte, was bereits durch die zuvor durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zu vermuten gewesen war (Abb. 4.19 und Abb. 4.20).

Da eine generelle Fähigkeit von APOBEC3G darin besteht, MV-RNA-Spezies zu binden (Abb. 4.24), und außerdem bereits gezeigt wurde, dass APOBEC3G zu einer drastischen

Reduktion viraler Titer führt, welcher in hA3G-freien Zellen bestimmt wurde, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, in welchem Maße APOBEC3G in aufgereinigten viralen Partikeln detektierbar ist.

Anreicherung von APOBEC3G in virale Partikel

Bei der Inhibition der HIV-1 Replikation spielt die Verpackung von APOBEC3G in virale Partikel, zumindest für die Desaminase-vermittelte Restriktion, eine wesentliche Rolle (Henriet *et al.*, 2009; Prochnow *et al.*, 2009). APOBEC3G ist in der Lage viele verschiedene zelluläre RNAs zu binden, welche auch in HIV-1-Partikeln nachweisbar sind. Sie scheinen jedoch für den gezielten Einbau von APOBEC3G in Virus-Partikel keine Rolle zu spielen (Khan *et al.*, 2007). Vielmehr bindet APOBEC3G an virale RNA welche anschließend über eine Interaktion mit Gag in neue Partikel integriert wird (Luo *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von APOBEC3G hier zu einem Integritätsverlust der viralen Kerne oder einzelner Nukleoprotein-Komplexe führen könnte, welcher sowohl die Kinetik der Transkription als auch die Interaktion von viralen und zellulären Proteinen beeinträchtigt (Aguiar und Peterlin 2008). Da auch MV-RNAs von APOBEC3G gebunden werden konnten, sollte überprüft werden, ob hA3G in aufgereinigten MV-Partikeln detektierbar ist. Hierzu wurden hA3G-exprimierende Zellen und Kontrollzellen mit rMV^{Edta}-^gEGFPCAMH infiziert und das aus diesen Zellen präparierte Virus über eine UZ aufgereinigt. Anschließend wurden gleiche Mengen Gesamtprotein mittels eines Western-Blots untersucht. Es zeigte sich, dass sich das Verhältnis von APOBEC3G und dem als Kontrollprotein verwendeten GAPDH im Vergleich zu Zellysate um den Faktor vier in Viruspartikeln erhöht hatte (Abb. 4.17).

Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass APOBEC3G in MV-Partikeln durch einen speziellen Mechanismus angereichert wird. Das globuläre GAPDH wurde als Kontrollprotein gewählt, da es mit ~36 kDa eine annähernd gleiche Größe wie APOBEC3G (~46 kDa) besitzt und außerdem ebenfalls überwiegend zytoplasmatisch vorliegt. Trotz verschiedener weiterer Funktionen fehlt GAPDH allerdings die RNA-bindende Eigenschaft des APOBEC3G (Chuang *et al.*, 2005). Vermutlich aufgrund dieser fehlenden RNA-Bindung konnte daher ein Abfall der detektierten Menge an GAPDH in Gesamtprotein aus aufgereinigtem Virus beobachtet werden, wohingegen bei hA3G das Gegenteil der Fall war (Abb. 4.17). Daraus resultierend ergibt sich vermutlich das erhöhte Verhältnis von APOBEC3G zu GAPDH in Viruspartikeln. Obwohl mittlerweile angenommen wird, dass der Einbau von APOBEC3G in HIV-Partikel über eine RNA-Brücke zu Gag erfolgt (Luo *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004), wurde zuvor auch eine direkte Interaktion zwischen hA3G und HIV-1-Gag nachgewiesen (Alce und Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004; Douaisi *et al.*, 2004). Denkbar für den Einbau in MV wäre daher neben der Interaktion mit viraler RNA auch eine direkte Inter-

aktion mit viralen Proteinen, die jedoch zuvor mit den angewandten Methoden nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4.19, Abb. 4.20 und Abb. 4.25). Zur eindeutigen Klärung dieser möglichen Interaktionen könnten mutierte APOBEC3G-Proteine mit defizienter RNA-Bindung eingesetzt werden (vgl. 4.9. und 5.3.), die in dieser Arbeit auch generiert wurden. In wie weit der nachgewiesene Einbau der APOBEC3G-Proteine zu der Erhöhung der Restriktion der funktionalen MV-Partikel beiträgt, bleibt jedoch weiterhin zu klären.

Die APOBEC3G-vermittelte Inhibition der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase

Um die Ursache der APOBEC3G-vermittelten Restriktion der MV-Expression und Virussynthese genauer zu ergründen, wurden Tests mit Reporterproteinen durchgeführt. Die Entkopplung der Funktion der viralen RNA-Polymerase vom gesamten Replikationszyklus ist durch das sog. Minireplikon-Assay möglich, bei dem die zur Funktion erforderlichen Komponenten auf ein Minimum reduziert werden (negativ-strängige RNA, Polymerasekomplex aus P- und L-Protein, von der RNA-Polymerase synthetisierte mRNA des Reporterproteins) (Rennick *et al.*, 2007). Die Synthese des Reporterproteins verläuft somit unabhängig von den durch die RdRp synthetisierten viralen mRNAs und den daraus resultierenden Proteinen ab. Hierfür wurden hA3G- und T7-Polymerase exprimierende Zellen bzw. T7-Polymerase exprimierende Kontrollzellen mit den für die Funktion des Assays erforderlichen Komponenten transfiziert und die Expression des Reporterproteins durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass diese Expression bei Anwesenheit von APOBEC3G teilweise um mehr als 50 % reduziert ist (Abb. 4.26).

Zwischen den acht vorhandenen Proteinen des MV besteht eine bemerkenswert hohe Zahl an Interaktionen, welche die Komplexität des viralen Replikationszyklus verdeutlicht (Rima und Duprex, 2009). Die Reduktion dieses komplexen Zusammenspiels auf weniger Komponenten und die zusätzliche Anwesenheit von APOBEC3G zeigte, dass auch die virale RdRp (MV-P- und/oder MV-L) von APOBEC3G beeinflusst werden muss. Hierbei könnte es sich um eine direkte Interaktion, aber auch um eine indirekte Beeinflussung handeln, da sich bereits vorher herausgestellt hatte, dass hA3G ebenfalls eine Bindung an EGFP-mRNA möglich ist (Abb. 4.24a). Zusätzlich kann hier auch eine Bindung an die synthetisierte, negativ-strängige Reporter-RNA erfolgen. Das als Kontrolle für die Hemmung der RdRp verwendete MV-C-Protein wirkt indes direkt auf das Enzym ein und hemmt dadurch die Minigenom Genexpression (Iwasaki *et al.*, 2009). Eine Unterscheidung der verschiedenen möglichen Interaktionen ist durch die durchgeführten Versuche nicht eindeutig möglich. Bedenkt man jedoch die zuvor gemachten Beobachtungen einer fehlenden Kolo-kalisation von hA3G mit MV-L und -P (Abb. 4.19, Abb. 4.20), scheint eine indirekte Beeinflussung der RdRp durch eine Bindung von APOBEC3G an die Reporter RNA wahrscheinlich zu sein. Die Reduktion des Reporter-Proteins durch die Bindung von APOBEC3G an die mRNA von EGFP kann

jedoch auch hier nicht ausgeschlossen werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird die beobachtete Hemmung der MV-Replikation also durch Bindung von APOBEC3G an MV-RNA-Spezies und einer daraus resultierenden erhöhten Fehlerrate der viralen RdRp verursacht.

5.3. Die Bedeutung der N-terminalen Desaminase-Domäne für die antivirale Aktivität von APOBEC3G

Obwohl zunächst unklar und kontrovers diskutiert, so wird mittlerweile der N-terminalen, katalytisch inaktiven Desaminase-Domäne von APOBEC3F und APOBEC3G eine gleichwertige Rolle bei der Restriktion von HIV-1 eingeräumt (Prochnow *et al.*, 2009). Den anderen Pfeiler der HIV-Inhibition bildet die katalytisch aktive C-terminale Desaminase-Domäne, welche die Hypermutationen des HIV-1-Genoms bzw. der viralen cDNA vermittelt (Henriet *et al.*, 2009). Um festzustellen, welche der beiden Domänen für die Inhibition der MV-Replikation verantwortlich ist, wurden zunächst verschiedene Mutationen in den ORF der hA3G-Sequenz eingefügt und mit Hilfe des entsprechenden Expressionsplasmids VSV-G pseudotypisierte Partikel generiert. Anschließende Analysen mit transduzierten Vero-Zellen zeigten, dass alle getestete Mutanten zwar eine einheitlich gute mRNA-Expression besitzen (Abb. 4.27), dass aber bei der Translation der mutierten APOBEC3G-Proteine wesentliche Unterschiede bestehen. So zeigte sich, dass beispielsweise einige Mutationen innerhalb der N-terminalen Desaminase-Domäne zu einer drastischen Reduktion der Proteinexpression führen, wohingegen die Expression bei Mutagenese der C-terminalen Desaminase-Domäne im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist (Abb. 4.28). Die im Anschluss durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen transduzierter Zellen zeigte, dass die zelluläre Lokalisation mehrerer in der N-terminalen Desaminase-Domäne mutierten hA3G-Proteine eindeutig von der des Wildtyps abweicht (Abb. 4.29 und Abb. 4.30). Weitere Immunfluoreszenzfärbungen offenbarten, dass hier eine Lokalisation der mutierten Proteine an oder in das raue ER stattgefunden haben muss (Abb. 4.31), die eine normale Lokalisation der Proteine verhinderte.

Diese Ergebnisse untermauern die Bedeutung der N-terminalen Desaminase-Domäne für die zelluläre Lokalisation der APOBEC3G-Proteine (Kozak *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Vermutlich ist der durch diese Mutationen entstandene Abfall der Proteinexpression und die vom Wildtyp-Protein abweichende Lokalisation (Abb. 4.28, Abb. 4.30 und Abb. 4.31) auf einen Verlust der Fähigkeit zur Bindung von RNA zurückzuführen (Bulliard *et al.*, 2009), da Mutationen analoger Aminosäuren der C-terminalen Desaminase-Domäne die Lokalisation und Expression nicht beeinflussen (Abb. 4.28 und Abb. 4.29). Aufgrund der fehlenden Proteinexpression mussten diese Mutanten jedoch von weiteren Versuchen ausgeschlossen werden.

Alle getesteten hA3G-Mutanten mit wildtypischer Expression zeigten im „HIV single round infectivity assay“ den in der Literatur beschriebenen Anstieg der Reporterprotein-Expression (EGFP), was einer eingeschränkten Fähigkeit des APOBEC3G-Proteins zur Inhibition der Partikelsynthese bzw. Hemmung der Integration der Reporter-DNA und/oder der Reporter-Expression entspricht (Abb. 4.32). Allerdings konnte bei der anschließend durchgeführten rMV^{E_{dtag}}EGFP-Infektion von transduzierten Vero-Zellen mit dem wildtypischen hA3G die zuvor beobachtete Restriktion der EGFP-Expression (Abb. 4.33) sowie die der viralen Titer (Abb. 4.34) nicht beobachtet werden.

Der unterschiedliche Anstieg der EGFP-Expression im „HIV single round infectivity assay“ verdeutlicht die Bedeutung der mutierten Aminosäuren für die Fähigkeit der Restriktion von Retroviren im Allgemeinen und von HIV im Besonderen. Dass keine der mutierten Aminosäuren zu einem vollständigen Anstieg der EGFP-Expression vergleichbar der Kontrolle ohne APOBEC3G geführt hat zeigt, dass sowohl die N- als auch die C-terminale Desaminase-Domäne an den Restriktionsvorgängen beteiligt sind (Brandsteitter *et al.*, 2009). Eine Restriktion der MV-Replikation mit dem in dieser Arbeit verwendeten transienten System der Transduktion von Vero-Zellen konnte jedoch u. a. für wildtypisches APOBEC3G nicht beobachtet werden (Abb. 4.33 und Abb. 4.34). Dies deutet darauf hin, dass für MV ebenso wie für HIV (i) ein bestimmtes Expressionsniveau von APOBEC3G für eine erfolgreiche Restriktion erforderlich ist (Haché und Harris, 2009) und (ii) dass dieses für MV über dem von HIV liegt. Die transiente Transduktion von Vero-Zellen mit einer daraus resultierenden niedrigeren hA3G-Expressionsrate im Vergleich zu der der Zelllinien 024-1, 024-2 und 024-3 (Abb. 4.27) reicht für eine signifikante Restriktion von MV folglich nicht aus. Um die Bedeutung der N-terminalen Desaminase-Domäne von APOBEC3G für die Restriktion von MV eindeutig zu belegen, sind daher Einzelzellklone mit einer vergleichbar hohen Expressionsrate erforderlich.

5.4. Fazit

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humanes APOBEC3G (i) eine Restriktion der MV-Replikation bewirkt, (ii) an virale RNA bindet, (iii) in virale Partikel eingebaut wird und (iv) die Aktivität der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase beeinträchtigt, was zu einer erhöhten Fehlerrate und einer reduzierten Genexpression führt. Die enzymatische Aktivität des APOBEC3G-Proteins ist, anders als bei der Restriktion von Retroelementen und Retroviren, in sekundären Zielzellen nicht mehr erforderlich, da hier eine Selektion auf Viruspartikel mit vollständig funktionalem Genom und funktionalem Polymerasekomplex erfolgt. Abb. 5.1 stellt diese Mechanismen schematisch dar.

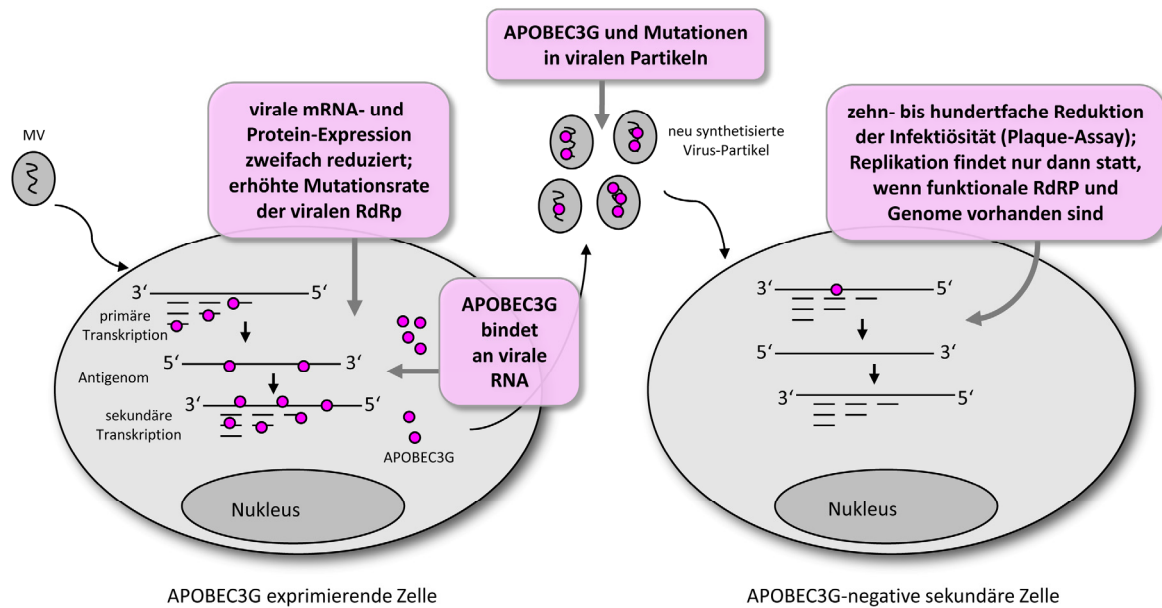


Abb. 5.1 | **Modell der APOBEC3G-vermittelten Hemmung der MV-Replikation.** Die Bindung von APOBEC3G an virale RNA-Spezies verursacht eine zweifache Reduktion der viralen mRNA- und Proteinexpression. Gleichzeitig wird APOBEC3G in neu synthetisierte Virus-Partikel verpackt. Eine Replikation in APOBEC3G-negativen sekundären Zielzellen kann nur dann stattfinden, wenn funktionale RdRp und Genome vorhanden sind. RdRp; RNA-abhängige RNA-Polymerase.

Da APOBEC3G in allen für die Infektion von MV relevanten Zellen und Geweben exprimiert wird (Koning *et al.*, 2009; Refsland *et al.*, 2010), könnte sich hier ein antiviraler Mechanismus basierend auf der RNA-Bindung des Proteins entwickelt haben, der nicht nur MV sondern auch andere negativ-strängige RNA-Viren betreffen könnte. Das Ziel weiterer Forschung ist es daher, mögliche antivirale Mechanismen seitens APOBEC3G gegen andere Mitglieder der *Mononegavirales* aufzudecken. Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse liefern weitere Einblicke in die Desaminase-unabhängigen antiviralen Mechanismen von APOBEC-Proteinen im Kontext viraler Infektionen.

6. Zusammenfassung

Das Masernvirus (MV) ist ein negativ-strängiges RNA-Virus aus der Familie der *Paramyxoviridae* und zählt immer noch zu den häufigsten Todesursachen bei Kindern in Entwicklungsländern. Nach dem Eintritt in den Körper führt eine Infektion von CD150-exprimierenden B- und T-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen (DCs) und Monozyten bzw. Makrophagen zu einer systemischen Infektion. Viele Mitglieder der Familie der APOBEC-Proteine („apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like proteins“), u. a. auch APOBEC3G, werden als Teil der angeborenen Immunantwort in diesen Zellen und infizierten Geweben exprimiert. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass diese Proteine durch ihre RNA-bindenden Eigenschaften und ihre Fähigkeit zur Desaminierung von Cytosin zu Uracil zu einer Inhibition von verschiedenen Retroelementen und Retroviren, wie beispielsweise den „long interspersed nuclear elements 1“ und dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) führen. Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche antivirale Mechanismen von humanem APOBEC3G gegen das MV als Vertreter der negativ-strängigen RNA-Viren zu identifizieren. Hierzu wurden rekombinante MV-Wildtyp und -Impfstämme, sowie APOBEC3G-überexprimierende Vero-Zelllinien verwendet.

Es zeigte sich, dass die Replikation des verwendeten rekombinanten Masern Wildtyp- und Impfvirus durch humanes APOBEC3G inhibiert wird. Diese Inhibition äußerte sich in einer reduzierten Synzytienbildung, einer mindestens 50 %igen Reduktion viral-exprimierter Proteine, sowie in einer 90-99 %igen Reduktion der auf APOBEC3G-exprimierenden Zellen entstandenen viralen Titer. Durch Sequenzanalysen konnte festgestellt werden, dass es zu einem Anstieg von 0,2 auf 0,95 unspezifischer Mutationen pro 1.000 Basenpaaren in MV-Transkripten kam, deren Muster mit dem in Kontrollzellen vergleichbar war, wohingegen typische C zu U(T) bzw. G zu A Hypermutationen nicht auftraten. Eine Kollokalisierung von humanem APOBEC3G mit MV-spezifischen Proteinen konnte ebenfalls nicht eindeutig beobachtet werden. Es zeigte sich allerdings, dass APOBEC3G an virale RNA binden konnte. Außerdem wurde APOBEC3G in aufgereinigten viralen Partikeln um etwa den Faktor 4 angereichert. Versuche mit einem MV-Minireplikon-System ergaben, dass APOBEC3G eine Inhibition der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase bewirkt, vermutlich aufgrund der Fähigkeit des Proteins an virale RNA zu binden.

Immunfluoreszenzfärbungen mit mutierten APOBEC3G-Proteinen haben auch in dieser Arbeit erneut belegt, dass der RNA-bindenden Desaminase-Domäne bei der zellulären Lokalisation des Proteins eine besondere Rolle zukommt, da einige Mutationen innerhalb dieses Bereiches zu einem hohen Verlust der Proteinexpression sowie zu einer Ansammlung der mutierten Proteine am rauen endoplasmatischen Retikulum führen.

Die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition der Replikation von MV durch humanes APOBEC3G lässt eine generelle antivirale Aktivität von Mitgliedern der APOBEC-Familie gegen negativ-strängige RNA-Viren vermuten, welche auf der Fähigkeit des Proteins beruht RNA zu binden. Weitere Untersuchungen bezüglich der Inhibition anderer Vertreter der *Mononegavirales* durch verschiedene APOBEC-Proteine könnten Aufschluss über die beteiligten Mechanismen geben.

7. Summary

Measles virus (MV) is a negative-strand RNA virus which belongs to the family *Paramyxoviridae* and remains one of the leading causes of morbidity and mortality in the developing world. Following entry of MV into the body, infection of CD150-positive B- and T-cells as well as dendritic cells and monocytes/macrophages leads to a systemic infection. Members of the APOBEC-protein family (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like proteins), such as APOBEC3G, are expressed in these cells and infected tissues and form an important component of the innate immune response to viral infections. A number of studies have previously demonstrated that these proteins are able to inhibit various retroelements and retroviruses, such as long interspersed nuclear elements 1 and human immunodeficiency virus (HIV). This inhibition is based on their ability to bind RNA and to deaminate cytosine to uracil. The goal of this thesis was to identify possible antiviral mechanisms of human APOBEC3G against MV as an example for negative-strand RNA viruses. This was achieved through the use of recombinant wild-type and vaccine strains of MV and Vero cell lines overexpressing APOBEC3G.

We could show that the replication of recombinant wild-type and vaccine strains of MV was inhibited by APOBEC3G, resulting in a 50 % reduction in the expression of viral proteins and syncytia formation, and a 90 to 99 % reduction in viral titers produced following infection of APOBEC3G expressing cells. Sequence analysis revealed that random mutations in viral transcripts increased from 0.2 to 0.95 mutations per 1000 bp and that the pattern of mutations was similar to that in control cells. Although typical C to U(T) or G to A hypermutations and co-localization of APOBEC3G and MV-specific proteins were not observed, APOBEC3G was able to bind viral RNA and was found to be enriched approximately 4-fold in viral particles. Further studies with a MV-specific minireplicon-system revealed that APOBEC3G led to an impairment of the viral RNA-dependent RNA-polymerase, probably due to the ability of the protein to bind RNA.

Immunofluorescence immunostaining of mutated APOBEC3G-proteins showed that the RNA binding deaminase domain plays an important role in determining the cellular localization of the protein. Amino-acid changes in this domain led to a considerable loss of protein expression and to accumulation of the mutated proteins at the rough endoplasmic reticulum.

The inhibition of MV replication described here suggests a general antiviral activity of members of the APOBEC family against negative-strand RNA viruses, based on the ability of these proteins to bind RNA. Further examinations including other members of the *Mononegavirales* may provide novel insights into the underlying mechanisms leading to inhibition of viral replication.

8. Literatur

A

- Aguiar R S und Peterlin B M (2008).** APOBEC3 proteins and reverse transcription. *Virus Res* 134, 74-85.
- Albin J S und Harris R S (2010).** Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Rev Mol Med* 12, e4.
- Alce T M und Popik W (2004).** APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 279, 34083-86.
- Anderson J L und Hope T J (2008).** APOBEC3G restricts early HIV-1 replication in the cytoplasm of target cells. *Virology* 375, 1-12.
- Ao Z, Yu Z, Wang L, Zheng Y und Yao X (2008).** Vpr14-88-Apobec3G fusion protein is efficiently incorporated into Vif-positive HIV-1 particles and inhibits viral infection. *PLoS One* 3, e1995.
- Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane L P, Bommhardt U, ter Meulen V und Schneider-Schaulies S (2001).** Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 7, 725-31.
- Avota E, Harms H und Schneider-Schaulies S (2006).** Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. *Cell Microbiol* 8, 1826-39.

B

- Banerjee A K, Barik S und De B P (1991).** Gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses. *Pharmacol Ther* 51, 47-70.
- Bankamp B, Wilson J, Bellini W J und Rota P A (2005).** Identification of naturally occurring amino acid variations that affect the ability of the measles virus C protein to regulate genome replication and transcription. *Virology* 336, 120-29.
- Barrett T (1999).** Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 69, 3-13.
- Beckford A P, Kaschula R O und Stephen C (1985).** Factors associated with fatal cases of measles. A retrospective autopsy study. *S Afr Med J* 68, 858-63.
- Bellini W J, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H und Richardson C D (1985).** Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53, 908-19.
- Bennett R P, Salter J D, Liu X, Wedekind J E und Smith H C (2008).** APOBEC3G subunits self-associate via the C-terminal deaminase domain. *J Biol Chem* 283, 33329-36.
- Bieniasz P D (2004).** Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5, 1109-15.

- Bishop K N, Holmes R K und Malim M H (2006).** Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* 80, 8450-58.
- Bishop K N, Holmes R K, Sheehy A M, Davidson N O, Cho S-J und Malim M H (2004a).** Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14, 1392-96.
- Bishop K N, Holmes R K, Sheehy A M und Malim M H (2004b).** APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 305, 645.
- Bishop K N, Verma M, Kim E-Y, Wolinsky S M und Malim M H (2008).** APOBEC3G Inhibits Elongation of HIV-1 Reverse Transcripts. *PLoS Pathog* 4, e1000231.
- Blanc V und Davidson N O (2010).** APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 594-602.
- Blumberg B M, Leppert M und Kolakofsky D (1981).** Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23, 837-45.
- Bogerd H P, Wiegand H L, Doehle B P und Cullen B R (2007).** The intrinsic antiretroviral factor APOBEC3B contains two enzymatically active cytidine deaminase domains. *Virology* 364, 486-93.
- Bolt G, Pedersen I R und Blixenkrone-Møller M (1999).** Processing of N-linked oligosaccharides on the measles virus glycoproteins: importance for antigenicity and for production of infectious virus particles. *Virus Res* 61, 43-51.
- Bonvin M, Achermann F, Greeve I, Stroka D, Keogh A, Inderbitzin D, Candinas D, Sommer P, Wain-Hobson S, Vartanian J-P und Greeve J (2006).** Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 43, 1364-74.
- Boo K H und Yang J S (2010).** Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei Med J* 51, 9-17.
- Borrow P und Oldstone M B (1995).** Measles virus-mono-nuclear cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 85-100.
- Bourara K, Liegler T J und Grant R M (2007).** Target cell APOBEC3C can induce limited G-to-A mutation in HIV-1. *PLoS Pathog* 3, 1477-85.
- Bransteitter R, Prochnow C und Chen X (2009).** The current structural and functional understanding of APOBEC deaminases. *Cell Mol Life Sci* 66, 3137-47.
- Bulliard Y, Turelli P, Röhrig U F, Zoete V, Mangeat B, Michielin O und Trono D (2009).** Functional Analysis and Structural Modeling of Human APOBEC3G Reveals the Role of Evolutionarily Conserved Elements in HIV-1 and Alu Inhibition. *J Virol* 83, 12611-21.
- Burnett A und Spearman P (2007).** APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J Virol* 81, 5000-13.

C

- Carlow D C, Carter C W, Mejlhede N, Neuhard J und Wolfenden R (1999).** Cytidine deaminases from *B. subtilis* and *E. coli*: compensating effects of changing zinc coordination and quaternary structure. *Biochemistry* 38, 12258-65.
- Carr J M, Davis A J, Coolen C, Cheney K, Burrell C J und Li P (2006).** Vif-deficient HIV reverse transcription complexes (RTCs) are subject to structural changes and mutation of RTC-associated reverse transcription products. *Virology* 351, 80-91.
- Cattaneo R, Kaelin K, Bacsko K und Billeter M A (1989).** Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759-64.

- Cattaneo R, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V und Billeter M A (1987).** Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160, 523-26.
- Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J und Kleiman L (2004).** The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279, 33177-84.
- Cevik B, Holmes D E, Vrotsos E, Feller J A, Smallwood S und Moyer S A (2004).** The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase. *Virology* 327, 297-306.
- Chelico L, Pham P, Calabrese P und Goodman M F (2006).** APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' -> 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 13, 392-99.
- Chelico L, Prochnow C, Erie D A, Chen X S und Goodman M F (2010).** A structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *J Biol Chem* 285, 16195-205.
- Chelico L, Sacho E J, Erie D A und Goodman M F (2008).** A model for oligomeric regulation of APOBEC3G cytosine deaminase-dependent restriction of HIV. *J Biol Chem* 283, 13780-91.
- Chen H, Lilley C E, Yu Q, Lee D V, Chou J, Narvaiza I, Landau N R und Weitzman M D (2006b).** APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* 16, 480-85.
- Chen H, Wang L-W, Huang Y-Q und Gong Z-J (2010).** Interferon-alpha Induces High Expression of APOBEC3G and STAT-1 in Vitro and in Vivo. *Int J Mol Sci* 11, 3501-12.
- Chen K-M, Harjes E, Gross P J, Fahmy A, Lu Y, Shindo K, Harris R S und Matsuo H (2008).** Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* 452, 116-19.
- Chen K, Huang J, Zhang C, Huang S, Nunnari G, Wang F-x, Tong X, Gao L, Nikisher K und Zhang H (2006a).** Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J Virol* 80, 7645-57.
- Chiu Y-L und Greene W C (2008b).** The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* 26, 317-53.
- Chiu Y-L und Greene W C (2008a).** Review. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.
- Chiu Y-L, Soros V B, Kreisberg J F, Stopak K, Yonemoto W und Greene W C (2010).** Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nature* 466, 276.
- Chiu Y-L, Witkowska H E, Hall S C, Santiago M, Soros V B, Esnault C, Heidmann T und Greene W C (2006).** High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15588-93.
- Chuang D-M, Hough C und Senatorov V V (2005).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 269-90.
- Condack C, Grivel J-C, Devaux P, Margolis L und Cattaneo R (2007).** Measles virus vaccine attenuation: suboptimal infection of lymphatic tissue and tropism alteration. *J Infect Dis* 196, 541-49.
- Coticello S G, Harris R S und Neuberger M S (2003).** The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* 13, 2009-13.
- Coticello S G, Thomas C J F, Petersen-Mahrt S K und Neuberger M S (2005).** Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22, 367-77.
- Cruz C D, Palosaari H, Parisien J-P, Devaux P, Cattaneo R, Ouchi T und Horvath C M (2006).** Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. *J Virol* 80, 5644-50.

Cullen B R (2006). Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* 80, 1067-76.

D

Dang Y, Siew L M, Wang X, Han Y, Lampen R und Zheng Y-H (2008). Human cytidine deaminase APOBEC3H restricts HIV-1 replication. *J Biol Chem* 283, 11606-14.

Dang Y, Wang X, Esselman W J und Zheng Y-H (2006). Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80, 10522-33.

de Swart R L, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yüksel S, Geijtenbeek T B H, Duprex W P und Osterhaus A D M E (2007). Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3, e178.

Delebecque F, Suspène R, Calattini S, Casartelli N, Saob A, Froment A, Wain-Hobson S, Gessain A, Vartanian J-P und Schwartz O (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80, 605-14.

Desmyter J, Melnick J L und Rawls W E (1968). Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2, 955-61.

Devaux P, Loveland B, Christiansen D, Milland J und Gerlier D (1996). Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol* 77 (Pt 7), 1477-81.

Devaux P, von Messling V, Songsunghong W, Springfield C und Cattaneo R (2007). Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 360, 72-83.

Dörig R E, Marcil A, Chopra A und Richardson C D (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295-305.

Douaisi M, Dussart S, Courcoul M, Bessou G, Vigne R und Decroly E (2004). HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 566-73.

du Châtelet I P, Antona D, Freymuth F, Muscat M, Halftermeyer-Zhou F, Maine C, Floret D und Lévy-Bruhl D (2010). Spotlight on measles 2010: update on the ongoing measles outbreak in France, 2008-2010. *Euro Surveill* 15.

Duprex W P, Collins F M und Rima B K (2002). Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame. *J Virol* 76, 7322-28.

Duprex W P, Duffy I, McQuaid S, Hamill L, Cosby S L, Billeter M A, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V und Rima B K (1999a). The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J Virol* 73, 6916-22.

Duprex W P, McQuaid S, Hangartner L, Billeter M A und Rima B K (1999b). Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol* 73, 9568-75.

Duprex W P, McQuaid S, Roscic-Mrkic B, Cattaneo R, McCallister C und Rima B K (2000). In vitro and in vivo infection of neural cells by a recombinant measles virus expressing enhanced green fluorescent protein. *J Virol* 74, 7972-79.

E

- Eagle H und Levine E M (1967).** Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature* 213, 1102-06.
- Erlenhöfer C, Wurzer W J, Löffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V und Schneider-Schaulies J (2001).** CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75, 4499-505.
- Erlenhöfer C, Duprex W P, Rima B K, ter Meulen V und Schneider-Schaulies J (2002).** Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* 83, 1431-36.
- Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance A J, Heidmann T und Schwartz O (2005).** APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430-33.
- Esnault C, Millet J, Schwartz O und Heidmann T (2006).** Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* 34, 1522-31.
- Esnault C, Priet S, Ribet D, Heidmann O und Heidmann T (2008).** Restriction by APOBEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cycle: ex vivo effects and in vivo "traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. *Retrovirology* 5, 75.

F

- Fisher A G, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo R C und Wong-Staal F (1987).** The *src* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 237, 888-93.
- Fontana J M, Bankamp B, Bellini W J und Rota P A (2008a).** Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* 374, 71-81.
- Fontana J M, Bankamp B und Rota P A (2008b).** Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev* 225, 46-67.
- Friew Y, Boyko V, Hu W-S und Pathak V (2009).** Intracellular interactions between APOBEC3G, RNA, and HIV-1 Gag: APOBEC3G multimerization is dependent on its association with RNA. *Retrovirology* 6, 56.
- Fritz E L und Papavasiliou F N (2010).** Cytidine deaminases: AIDing DNA demethylation? *Genes Dev* 24, 2107-14.
- Fuentes S M, Sun D, Schmitt A P und He B (2010).** Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. *Future Microbiol* 5, 9-13.
- Furuse Y, Suzuki A und Oshitani H (2010).** Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virol J* 7, 52.

G

- Gaddis N C, Chertova E, Sheehy A M, Henderson L E und Malim M H (2003).** Comprehensive investigation of the molecular defect in vif-deficient human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 77, 5810-20.
- Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson C M, Byers H, Lynham S, Ward M und Malim M H (2007).** Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* 81, 2165-78.

- Goila-Gaur R und Strebel K (2008).** HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 51.
- Gombart A F, Hirano A und Wong T C (1995).** Nucleoprotein phosphorylated on both serine and threonine is preferentially assembled into the nucleocapsids of measles virus. *Virus Res* 37, 63-73.
- Greenberg B L, Sack R B, Salazar-Lindo E, Budge E, Gutierrez M, Campos M, Visberg A, Leon-Barua R, Yi A und Maurutia D (1991).** Measles-associated diarrhea in hospitalized children in Lima, Peru: pathogenic agents and impact on growth. *J Infect Dis* 163, 495-502.
- Griffin D E, Pan C-H und Moss W J (2008).** Measles vaccines. *Front Biosci* 13, 1352-70.
- Griffin D E und Ward B J (1993).** Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168, 275-81.
- Guo F, Cen S, Niu M, Saadatmand J und Kleiman L (2006).** Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 80, 11710-22.
- Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick R J und Kleiman L (2007).** The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA^{Lys} annealing to viral RNA. *J Virol* 81, 11322-31.
- Gupta K C und Kingsbury D W (1985).** Polytranscripts of Sendai virus do not contain intervening polyadenylate sequences. *Virology* 141, 102-09.

H

- Haché G und Harris R S (2009).** CEM-T4 Cells Do Not Lack an APOBEC3G Cofactor. *PLoS Pathog* 5, e1000528.
- Haché G, Shindo K, Albin J S und Harris R S (2008).** Evolution of HIV-1 Isolates that Use a Novel Vif-Independent Mechanism to Resist Restriction by Human APOBEC3G. *Curr Biol* 18, 819-24.
- Harjes E, Gross P J, Chen K-M, Lu Y, Shindo K, Nowarski R, Gross J D, Kotler M, Harris R S und Matsuo H (2009).** An Extended Structure of the APOBEC3G Catalytic Domain Suggests a Unique Holoenzyme Model. *J Mol Biol* 389, 819-32.
- Harris R S, Bishop K N, Sheehy A M, Craig H M, Petersen-Mahrt S K, Watt I N, Neuberger M S und Malim M H (2003).** DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-09.
- Harris R S und Liddament M T (2004).** Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868-77.
- Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K und Yanagi Y (2002).** SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 76, 6743-49.
- Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart J-C und Marquet R (2009).** Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 211-32.
- Holden L G, Prochnow C, Chang Y P, Bransteitter R, Chelico L, Sen U, Stevens R C, Goodman M F und Chen X S (2008).** Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* 456, 121-24.
- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S und VandePol S (1982).** Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215, 1577-85.

- Holmes R K, Malim M H und Bishop K N (2007).** APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* 32, 118-28.
- Hopp T P, Prickett K S, Price V L, Libby R T, March C J, Cerretti D P, Urdal D L und Conlon P J (1988).** A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotechnol* 6, 1204-10.
- Horikami S M und Moyer S A (1995).** Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 35-50.
- Hsu E C, Iorio C, Sarangi F, Khine A A und Richardson C D (2001).** CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279, 9-21.
- Hulme A E, Bogerd H P, Cullen B R und Moran J V (2007).** Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene* 390, 199-205.
- Huthoff H, Autore F, Gallois-Montbrun S, Fraternali F und Malim M H (2009).** RNA-Dependent Oligomerization of APOBEC3G Is Required for Restriction of HIV-1. *PLoS Pathog* 5, e1000330.
- Huthoff H und Malim M H (2005).** Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* 334, 147-53.
- Huthoff H und Malim M H (2007).** Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* 81, 3807-15.

I

- Ikegame S, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y und Yanagi Y (2010).** Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol* 84, 372-79.
- Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T und Yanagi Y (2009).** The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the Nucleocapsid Protein. *J Virol* 83, 10374-83.
- Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K und Levin J G (2006).** Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J Virol* 80, 5992-6002.

J

- Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J und Navaratnam N (2002).** An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-96.

K

- Karp C L, Wysocka M, Wahl L M, Ahearn J M, Cuomo P J, Sherry B, Trinchieri G und Griffin D E (1996).** Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 273, 228-31.
- Kato S, Ohgimoto S, Sharma L B, Kurazono S, Ayata M, Komase K, Takeda M, Takeuchi K, Ihara T und Ogura H (2009).** Reduced ability of hemagglutinin of the CAM-70 measles virus vaccine strain to use receptors CD46 and SLAM. *Vaccine* 27, 3838-48.

- Khan M A, Goila-Gaur R, Opi S, Miyagi E, Takeuchi H, Kao S und Strebel K (2007).** Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* 4, 48.
- Kieffer T L, Kwon P, Nettles R E, Han Y, Ray S C und Siliciano R F (2005).** G->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol* 79, 1975-80.
- Kobayashi M, Takaori-Kondo A, Shindo K, Abudu A, Fukunaga K und Uchiyama T (2004).** APOBEC3G targets specific virus species. *J Virol* 78, 8238-44.
- Kohli R M, Abrams S R, Gajula K S, Maul R W, Gearhart P J und Stivers J T (2009).** A portable hotspot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* 284, 22898-904.
- Kohli R M, Maul R W, Guminski A F, McClure R L, Gajula K S, Saribasak H, McMahon M A, Siliciano R F, Gearhart P J und Stivers J T (2010).** Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. *J Biol Chem*, M110.177402.
- Koning F A, Newman E N C, Kim E-Y, Kunstman K J, Wolinsky S M und Malim M H (2009).** Defining APOBEC3 Expression Patterns in Human Tissues and Hematopoietic Cell Subsets. *J Virol* 83, 9474-85.
- Kozak S L, Marin M, Rose K M, Bystrom C und Kabat D (2006).** The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polyosomes and stress granules. *J Biol Chem* 281, 29105-19.

L

- Lavens D, Peelman F, der Heyden J V, Uyttendaele I, Catteeuw D, Verhee A, Schoubroeck B V, Kurth J, Hallenberger S, Clayton R und Tavernier J (2010).** Definition of the interacting interfaces of Apobec3G and HIV-1 Vif using MAPPIT mutagenesis analysis. *Nucleic Acids Res* 38, 1902-12.
- Leonard V H J, Sinn P L, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray P B, McChesney M B und Cattaneo R (2008).** Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* 118, 2448-58.
- Li J, Potash M J und Volsky D J (2004).** Functional domains of APOBEC3G required for antiviral activity. *J Cell Biochem* 92, 560-72.
- Li X-Y, Guo F, Zhang L, Kleiman L und Cen S (2007).** APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* 282, 32065-74.
- Liao W, Hong S H, Chan B H, Rudolph F B, Clark S C und Chan L (1999).** APOBEC-2, a cardiac and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 398-404.
- Liddament M T, Brown W L, Schumacher A J und Harris R S (2004).** APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14, 1385-91.
- Lightwood R und Nolan R (1970).** Epithelial giant cells in measles as an acid in diagnosis. *J Pediatr* 77, 59-64.
- Liston P und Briedis D J (1995).** Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol* 69, 6742-50.
- Liston P, DiFlumeri C und Briedis D J (1995).** Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res* 38, 241-59.

- Livak K J und Schmittgen T D (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* 25, 402-08.
- Löchelt M, Romen F, Bastone P, Muckenfuss H, Kirchner N, Kim Y-B, Truyen U, Rösler U, Battenberg M, Saib A, Flory E, Cichutek K und Münk C (2005).** The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7982-87.
- Löffler S, Lottspeich F, Lanza F, Azorsa D O, ter Meulen V und Schneider-Schaulies J (1997).** CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol* 71, 42-49.
- Ludlow M, Duprex W P, Cosby S L, Allen I V und McQuaid S (2008).** Advantages of using recombinant measles viruses expressing a fluorescent reporter gene with vibratome slice technology in experimental measles neuropathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 424-34.
- Ludlow M, McQuaid S, Cosby S L, Cattaneo R, Rima B K und Duprex W P (2005).** Measles virus superinfection immunity and receptor redistribution in persistently infected NT2 cells. *J Gen Virol* 86, 2291-303.
- Luo K, Liu B, Xiao Z, Yu Y, Yu X, Gorelick R und Yu X-F (2004).** Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol* 78, 11841-52.
- Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J und Yu X-F (2007).** Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81, 7238-48.

M

- MacDuff D A, Demorest Z L und Harris R S (2009).** AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic Acids Res* 37, 1854-67.
- Madani N und Kabat D (1998).** An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol* 72, 10251-55.
- Malim M H (2008).** Review. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L und Trono D (2003).** Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Mangeat B, Turelli P, Liao S und Trono D (2004).** A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* 279, 14481-83.
- Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H und Landau N R (2003).** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114, 21-31.
- Marin M, Rose K M, Kozak S L und Kabat D (2003).** HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9, 1398-403.
- Mbisa J L, Barr R, Thomas J A, Vandegraaff N, Dorweiler I J, Svarovskaia E S, Brown W L, Mansky L M, Gorelick R J, Harris R S, Engelman A und Pathak V K (2007).** Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol* 81, 7099-110.
- McChesney M B, Miller C J, Rota P A, Zhu Y D, Antipa L, Lerche N W, Ahmed R und Bellini W J (1997).** Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* 233, 74-84.

- Miller C A und Raine C S (1979).** Heterogeneity of virus particles in measles virus. *J Gen Virol* 45, 441-53.
- Moll M, Klenk H-D und Maisner A (2002).** Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76, 7174-86.
- Moss W J und Griffin D E (2006).** Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4, 900-08.
- Muckenfuss H, Kaiser J K, Krebil E, Battenberg M, Schwer C, Cichutek K, Münk C und Flory E (2007).** Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res* 35, 3784-96.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.

N

- Nanan R, Chittka B, Hadam M und Kreth H W (1999).** Measles virus infection causes transient depletion of activated T cells from peripheral circulation. *J Clin Virol* 12, 201-10.
- Naniche D, Wild T F, Rabourdin-Combe C und Gerlier D (1993).** Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol* 74 (Pt 6), 1073-79.
- Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman R M und Oldstone M B (2000).** Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* 74, 7478-84.
- Navaratnarajah C K, Leonard V H J und Cattaneo R (2009).** Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 329, 59-76.
- Navarro F, Bollman B, Chen H, König R, Yu Q, Chiles K und Landau N R (2005).** Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374-86.
- Newman E N C, Holmes R K, Craig H M, Klein K C, Lingappa J R, Malim M H und Sheehy A M (2005).** Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* 15, 166-70.
- Niewiesk S (2009).** Current animal models: cotton rat animal model. *Curr Top Microbiol Immunol* 330, 89-110.
- Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A und Chayama K (2007).** Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol* 88, 432-40.
- Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S und Chayama K (2005).** G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 41, 626-33.

O

- Ogura H, Baczko K, Rima B K und ter Meulen V (1987).** Selective inhibition of translation of the mRNA coding for measles virus membrane protein at elevated temperatures. *J Virol* 61, 472-79.
- Ohainle M, Kerns J A, Li M M H, Malik H S und Emerman M (2008).** Antiretroelement Activity of APOBEC3H Was Lost Twice in Recent Human Evolution. *Cell Host Microbe* 4, 249-59.

OhAinle M, Kerns J A, Malik H S und Emerman M (2006). Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J Virol* 80, 3853-62.

Ohgimoto S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge I M, Pfeuffer J, Johnston I C, Schneider-Schaulies J, Weidmann A, ter Meulen V und Schneider-Schaulies S (2001). The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol* 82, 1835-44.

P

Palosaari H, Parisien J-P, Rodriguez J J, Ulane C M und Horvath C M (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77, 7635-44.

Parks C L, Witko S E, Kotash C, Lin S L, Sidhu M S und Udem S A (2006). Role of V protein RNA binding in inhibition of measles virus minigenome replication. *Virology* 348, 96-106.

Patterson J B, Cornu T I, Redwine J, Dales S, Lewicki H, Holz A, Thomas D, Billeter M A und Oldstone M B (2001). Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease. *Virology* 291, 215-25.

Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei K J, Rangel Z G, Munson P J und Wahl S M (2007). Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393-400.

Peng G, Lei K J, Jin W, Greenwell-Wild T und Wahl S M (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* 203, 41-46.

Perreault J, Noel J-F, Brière F, Cousineau B, Lucier J-F, Perreault J-P und Boire G (2005). Retroseudogenes derived from the human Ro/SS-A autoantigen-associated hY RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 2032-41.

Pervanidou D, Horefti E, Patrinos S, Lytras T, Triantafillou E, Mentis A, Bonovas S und Panagiotopoulos T (2010). Spotlight on measles 2010: ongoing measles outbreak in Greece, January-July 2010. *Euro Surveill* 15.

Pido-Lopez J, Whittall T, Wang Y, Bergmeier L A, Babaahmady K, Singh M und Lehner T (2007). Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in CD4(+) T cells and dendritic cells. *J Immunol* 178, 1671-79.

Plempner R K, Hammond A L und Cattaneo R (2000). Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *J Virol* 74, 6485-93.

Plumet S, Duprex W P und Gerlier D (2005). Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* 79, 6900-08.

Prochnow C, Bransteitter R und Chen X S (2009). APOBEC deaminases-mutases with defensive roles for immunity. *Sci China C Life Sci* 52, 893-902.

Prodhomme E J F, Fack F, Revets D, Pirrotte P, Kremer J R und Muller C P (2010). Extensive Phosphorylation Flanking the C-Terminal Functional Domains of the Measles Virus Nucleoprotein. *J Proteome Res* 9, 5598-609.

Punnonen J, Cocks B G, Carballido J M, Bennett B, Peterson D, Aversa G und de Vries J E (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 993-1004.

R

- Radecke F und Billeter M A (1995).** Appendix: measles virus antigenome and protein consensus sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 181-92.
- Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dötsch C, Christiansen G und Billeter M A (1995).** Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14, 5773-84.
- Refsland E W, Stenglein M D, Shindo K, Albin J S, Brown W L und Harris R S (2010).** Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* 38, 4274-84.
- Rennick L J, Duprex W P und Rima B K (2007).** Measles virus minigenomes encoding two autofluorescent proteins reveal cell-to-cell variation in reporter expression dependent on viral sequences between the transcription units. *J Gen Virol* 88, 2710-18.
- Retief F und Cilliers L (2010).** Measles in antiquity and the Middle Ages. *S Afr Med J* 100, 216-17.
- Reuter D und Schneider-Schaulies J (2010).** Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol* 199, 261-71.
- Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S und Schneider-Schaulies J (2006).** RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol* 80, 5951-57.
- Rima B K und Duprex W P (2009).** The measles virus replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* 329, 77-102.
- Rima B K, Earle J A, Baczko K, ter Meulen V, Liebert U G, Carstens C, Carabaña J, Caballero M, Celma M L und Fernandez-Muñoz R (1997).** Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol* 78 (Pt 1), 97-106.
- Rima B K, Earle J A, Yeo R P, Herlihy L, Baczko K, ter Meulen V, Carabaqa J, Caballero M, Celma M L und Fernandez-Muñoz R (1995).** Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. *J Gen Virol* 76 (Pt 5), 1173-80.
- Rösler C, Köck J, Kann M, Malim M H, Blum H E, Baumert T F und von Weizsäcker F (2005).** APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology* 42, 301-09.
- Roggendorf H, Mankertz A, Kundt R und Roggendorf M (2010).** Spotlight on measles 2010: measles outbreak in a mainly unvaccinated community in Essen, Germany, March-June 2010. *Euro Surveill* 15.
- Rogozin I B, Basu M K, Jordan I K, Pavlov Y I und Koonin E V (2005).** APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 4, 1281-85.
- Rose K M, Marin M, Kozak S L und Kabat D (2004).** Transcriptional regulation of APOBEC3G, a cytidine deaminase that hypermutates human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 279, 41744-49.
- Rota J S, Wang Z D, Rota P A und Bellini W J (1994).** Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus Res* 31, 317-30.
- Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk H-D und Maisner A (2007).** Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9, 1203-14.
- Russell R A, Wiegand H L, Moore M D, Schäfer A, McClure M O und Cullen B R (2005).** Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* 79, 8724-31.

Ryon J J, Moss W J, Monze M und Griffin D E (2002). Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 994-1003.

S

Samuel O und Shai Y (2001). Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry* 40, 1340-49.

Santibanez S, Heider A, Gerike E, Agafonov A und Schreier E (1999). Genotyping of measles virus isolates from central Europe and Russia. *J Med Virol* 58, 313-20.

Sarkis P T N, Ying S, Xu R und Yu X-F (2006). STAT1-independent cell type-specific regulation of antiviral APOBEC3G by IFN-alpha. *J Immunol* 177, 4530-40.

Sato Y, Probst H C, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Neuberger M S und Rada C (2009). Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber-type, diminished body mass and myopathy. *J Biol Chem* 285, 7111-18.

Saunders H L und Magor B G (2004). Cloning and expression of the AID gene in the channel catfish. *Dev Comp Immunol* 28, 657-63.

Sawyer S L, Emerman M und Malik H S (2004). Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* 2, E275.

Schäfer A, Bogerd H P und Cullen B R (2004). Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* 328, 163-68.

Schlender J, Schnorr J J, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter M A, ter Meulen V und Schneider-Schaulies S (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13194-99.

Schneider-Schaulies J, Niewiesk S, Schneider-Schaulies S und ter Meulen V (1999). Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* 5, 613-22.

Schneider-Schaulies S, Kreth H W, Hofmann G, Billeter M und Meulen V T (1991). Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* 182, 703-11.

Schneider-Schaulies S, Liebert U G, Baczko K, Cattaneo R, Billeter M und ter Meulen V (1989). Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology* 171, 525-34.

Schneider-Schaulies S, Liebert U G, Baczko K und ter Meulen V (1990). Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. *Virology* 177, 802-06.

Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J und ter Meulen V (2001). Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1, 163-81.

Schneider-Schaulies S und Schneider-Schaulies J (2009). Measles virus-induced immunosuppression. *Curr Top Microbiol Immunol* 330, 243-69.

Shaffer J A, Bellini W J und Rota P A (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315, 389-97.

Shandilya S M D, Nalam M N L, Nalivaika E A, Gross P J, Valesano J C, Shindo K, Li M, Munson M, Royer W E, Harjes E, Kono T, Matsuo H, Harris R S, Somasundaran M und Schiffer C A (2010). Crystal Structure of the APOBEC3G Catalytic Domain Reveals Potential Oligomerization Interfaces. *Structure* 18, 28-38.

- Sheehy A M, Gaddis N C, Choi J D und Malim M H (2002).** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-50.
- Sheehy A M, Gaddis N C und Malim M H (2003).** The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9, 1404-07.
- Singethan K, Hiltensperger G, Kendl S, Wohlfahrt J, Plattet P, Holzgrabe U und Schneider-Schaulies J (2010).** N-(3-cyanophenyl)-2-phenylacetamide, an effective inhibitor of the Morbillivirus-induced membrane fusion with low cytotoxicity. *J Gen Virol* 91, 2762-2772.
- Stenglein M D, Burns M B, Li M, Lengyel J und Harris R S (2010).** APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17, 222-29.
- Stieler K und Fischer N (2010).** Apobec 3G Efficiently Reduces Infectivity of the Human Exogenous Gammaretrovirus XMRV. *PLoS One* 5, e11738.
- Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W und Greene W C (2003).** HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 12, 591-601.
- Stopak K S, Chiu Y-L, Kropp J, Grant R M und Greene W C (2007).** Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem* 282, 3539-46.
- Strebel K und Khan M (2008).** APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology* 5, 55.
- Suspène R, Guétard D, Henry M, Sommer P, Wain-Hobson S und Vartanian J-P (2005).** Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8321-26.
- Suspène R, Sommer P, Henry M, Ferris S, Guitard D, Pochet S, Chester A, Navaratnam N, Wain-Hobson S und Vartanian J-P (2004).** APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* 32, 2421-29.
- Svarovskaia E S, Xu H, Mbisa J L, Barr R, Gorelick R J, Ono A, Freed E O, Hu W-S und Pathak V K (2004).** Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279, 35822-28.

T

- Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M und Yanagi Y (2005).** Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* 79, 14346-54.
- Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T und Yanagi Y (2008).** Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM-knockin mice. *J Virol* 82, 11979-84.
- Takeuchi K, Kadota S-i, Takeda M, Miyajima N und Nagata K (2003).** Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545, 177-82.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K und Yanagi Y (2000).** SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893-97.
- Taylor M J, Godfrey E, Bacsko K, ter Meulen V, Wild T F und Rima B K (1991).** Identification of several different lineages of measles virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 1), 83-88.
- Teng B, Burant C F und Davidson N O (1993).** Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260, 1816-19.

- Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter M A, Johnston I C, Niewiesk S, ter Meulen V und Schneider-Schaulies S (1998).** Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* 72, 8124-32.
- Trapp S, Derby N R, Singer R, Shaw A, Williams V G, Turville S G, Bess J W, Lifson J D und Robbani M (2009).** Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *J Virol* 83, 884-95.
- Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S und Trono D (2004).** Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829.

V

- Valente L und Nishikura K (2007).** RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *J Biol Chem* 282, 16054-61.
- Vartanian J P, Meyerhans A, Asjö B und Wain-Hobson S (1991).** Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 65, 1779-88.
- von Schwedler U, Song J, Aiken C und Trono D (1993).** Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 67, 4945-55.
- Vonica A, Rosa A, Arduini B und Brivanlou A H (2010).** APOBEC2, a selective inhibitor of TGFβ signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Dev Biol*, YDBIO-05007 .

W

- Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, Terao-Muto Y, Sato H und Kai C (2010).** CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J Virol* 84, 4183-93.
- Wedekind J E, Gillilan R, Janda A, Krucinska J, Salter J D, Bennett R P, Raina J und Smith H C (2006).** Nanostructures of APOBEC3G support a hierarchical assembly model of high molecular mass ribonucleoprotein particles from dimeric subunits. *J Biol Chem* 281, 38122-26.
- Whelan S P J, Barr J N und Wertz G W (2004).** Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 61-119.
- Wichroski M J, Robb G B und Rana T M (2006).** Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog* 2, e41.
- Wiegand H L, Doehle B P, Bogerd H P und Cullen B R (2004).** A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23, 2451-58.
- Wild T F, Fayolle J, Beauverger P und Buckland R (1994).** Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* 68, 7546-48.

Y

- Yang Y, Guo F, Cen S und Kleiman L (2007).** Inhibition of initiation of reverse transcription in HIV-1 by human APOBEC3F. *Virology* 365, 92-100.

Yu Q, Chen D, König R, Mariani R, Unutmaz D und Landau N R (2004b). APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* 279, 53379-86.

Yu Q, König R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, Richman D, Coffin J M und Landau N R (2004a). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* 11, 435-42.

Z

Zhang H, Yang B, Pomerantz R J, Zhang C, Arunachalam S C und Gao L (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94-98.

Zhang K-L, Mangeat B, Ortiz M, Zoete V, Trono D, Telenti A und Michielin O (2007). Model structure of human APOBEC3G. *PLoS ONE* 2, e378.

Zhao Y, Pan-Hammarström Q, Zhao Z und Hammarström L (2005). Identification of the activation-induced cytidine deaminase gene from zebrafish: an evolutionary analysis. *Dev Comp Immunol* 29, 61-71.

Zheng Y-H, Irwin D, Kurosu T, Tokunaga K, Sata T und Peterlin B M (2004). Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 78, 6073-76.

Zinke M, Kendl S, Singethan K, Fehrholz M, Reuter D, Rennick L, Herold M J und Schneider-Schaulies J (2009). Clearance of measles virus from persistently infected cells by shRNA. *J Virol* 83, 9423-9431.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Markus Fehrholz
Geburtsdatum	10. Mai 1973
Geburtsort	Gelsenkirchen

Ausbildung

2007-2011	Promotion Julius-Maximilians-Universität Würzburg Institut für Virologie und Immunbiologie AG Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies
2007	Diplom in Biologie
2004-2007	Hauptstudium Biologie Diplom Universität Hamburg
2003	Vordiplom Biologie
2001-2003	Grundstudium Biologie Diplom Ruhr-Universität Bochum
2000	Zwischenprüfung Biologie Lehramt
1999	Zwischenprüfung Pädagogik Lehramt
1997-2003	Studium Biologie und Pädagogik Lehramt Ruhr-Universität Bochum

- 1994-1997 **Ausbildung zum staatlich anerkannten Erzieher**
Johannes-Kessels-Akademie Gladbeck
- 1992-1994 **Zivildienst**
Kinderheim St. Josef Gelsenkirchen
- 1992 **Allgemeine Hochschulreife**
Schalker Gymnasium Gelsenkirchen

Würzburg, 31. Januar 2011

Markus Fehrholz

10. Veröffentlichungen

10.1. Publikationen

Fehrholz M, Kendl S, Prifert C, Weissbrich B, Lemon K, Rennick L J, Duprex W P, Rima B K, Holmes R K, Malim M H und Schneider-Schaulies J (2010). The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of negative-strand RNA viruses. *J Virol*, submitted.

Zinke M, Kendl S, Singethan K, **Fehrholz M**, Reuter D, Rennick L J, Herold M J und Schneider-Schaulies J (2009). Clearance of measles virus from persistently infected cells by shRNA. *J Virol* 83, 9423-9431.

10.2. Posterpräsentationen

Fehrholz M, Kendl S, Duprex W P, Holmes R K, Malim M H und Schneider-Schaulies J (2009). Antiviral activity of the cellular deaminase APOBEC3G against measles virus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2009, Leipzig.

Zinke M, Singethan K, **Fehrholz M**, Reuter D und Schneider-Schaulies J (2009). Investigating the therapeutic potential of siRNA against persistent measles virus infection. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2009, Leipzig.

10.3. Vorträge

XX. Measles Meeting. The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of negative-strand RNA viruses. Würzburg, 2010.

IX. Measles Meeting. Antiviral activity of APOBEC3G against measles virus. Würzburg, 2009.

XVIII. Measles Meeting. Antiviral activity of cellular deaminases against measles virus. Würzburg, 2008.

3rd Network Meeting DFG Doctoral Training and Graduate Programs Würzburg, Erlangen, Tübingen. Antiviral activity of cellular deaminases against measles virus. Wildbad, Rothenburg ob der Tauber, 2008.

XVII. Measles Meeting. Antiviral activity of cellular deaminases against measles virus. Würzburg, 2007.

Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Meinem Chef Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe ohne auferlegte Zwänge durchführen zu können, seine beispiellose Offenheit und Freundlichkeit sowie dem konstruktiven Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Georg Krohne für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und seine Diskussionsbereitschaft.

Dr. Paul Duprex for beeing my third supervisor as well as his scientific and human contributions to this thesis.

The group of Prof. Michael Malim especially Rebecca Holmes and Hendrik Huthoff for all APOBEC-related materials and helpful discussions.

Sabine Kendl für die unermüdliche Mitarbeit an den Ergebnissen dieser Arbeit, ihre Präsenz im Labor, dafür dass sie immer weiß ob und wo etwas zu finden ist sowie für alle offenen, lustigen und ernsten Gespräche. Außerdem hat sie mir ein paar mal ihr Auto geliehen.

Dajana Reuter für die langjährige Banknachbarschaft, ihre aufopfernde Hilfsbereitschaft, ihre einzigartige Persönlichkeit und dafür, dass auf sie immer Verlass ist.

Dr. Benedikt Weißbrich und Christiane Prifert für die Durchführung zahlreicher qPCRs sowie für ihre Anregungen und ihr Interesse an dieser Arbeit.

Johannes Weirather für die Etablierung des Minireplikon-Systems, seine einzigartige Arbeitseinstellung und den Spass im Labor.

Michael Zinke für seinen Humor, die medizinischen Gespräche und dass er mir ein wenig Schwäbisch beigebracht hat.

Dr. Balamurugan Vinayagamurthy for his endless help, scientific discussions and for teaching me real life cloning.

Dr. Martin Ludlow for correction of the summary and fun in the lab.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG JSS, die das Labor so einzigartig machen, Katrin Singethan, Doreen Lüttge, Sandra Dittmar, Valentin Vogt, Christina Helm, Julia Wohlfahrt, Jung Woo Han, Kristina Strasheim, Tobias Königer, Moritz Lund und allen anderen, die kamen und gingen.

Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe, Elita Avota, Barbara Schelle, Beatrix Loth, Andreas Salditt, Ibrahim „Ibo“ Boussaad, Evelyn Gassert, Nicolette Rechkemmer, Hieu Tran-Van, Susanne Köthe, Charlene Börtlein, Carolin Götz, Alice Riedel, Belinda Aul und allen anderen für all die Hilfe und den Spaß im Laboralltag.

Margarethe Haucke für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Boris Nowotny für den regen Austausch über das, was uns beiden zur Zeit am meisten zu schaffen macht – Kinder und APOBEC3G.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die mir eine reibungslose Durchführung meiner Arbeit ermöglichten.

Ursula danke ich besonders dafür, dass sie immer zu mir hält und für mich da ist.

Anhang

APOBEC3G

Die folgenden Abbildungen enthalten die in dieser Arbeit verwendeten DNA- bzw. Proteinsequenzen des humanen APOBEC3G.

```

1  ATGAAGCCTC  ACTTCAGAAA  CACAGTGGAG  CGAATGTATC  GAGACACATT
51  CTCCTACAAC  TTTTATAATA  GACCCATCCT  TTCTCGTCGG  AATACCGTCT
101 GGCTGTGCTA  CGAAGTGAAA  ACAAAGGGTC  CCTCAAGGCC  CCCTTTGGAC
151 GCAAAGATCT  TTCGAGGCCA  GGTGTATTCC  GAACTTAAGT  ACCACCCAGA
201 GATGAGATTC  TTCCACTGGT  TCAGCAAGTG  GAGGAAGCTG  CATCGTGACC
251 AGGAGTATGA  GGTACACCTG  TACATATCCT  GGAGCCCTG  CACAAAGTGT
301 ACAAGGGATA  TGGCCACGTT  CCTGGCCGAG  GACCCGAAGG  TTACCCTGAC
351 CATCTTTGTT  GCCCGCCTCT  ACTACTTCTG  GGACCCAGAT  TACCAGGAGG
401 CGCTTCGCAG  CCTGTGTCAG  AAAAGAGACG  GTCCGCGTGC  CACCATGAAG
451 ATCATGAATT  ATGACGAATT  TCAGCACTGT  TGGAGCAAGT  TCGTGTACAG
501 CCAAAGAGAG  CTATTTGAGC  CTTGGAATAA  TCTGCCTAAA  TATTATATAT
551 TACTGCACAT  CATGCTGGGG  GAGATTCTCA  GACACTCGAT  GGATCCACCC
601 ACATTCACTT  TCAACTTTAA  CAATGAACCT  TGGGTCAGAG  GACGGCATGA
651 GACTTACCTG  TGTTATGAGG  TGGAGCGCAT  GCACAATGAC  ACCTGGGTCC
701 TGCTGAACCA  GCGCAGGGGC  TTTCTATGCA  ACCAGGCTCC  ACATAAACAC
751 GGTTCCTTG  AAGGCCGCCA  TGCAGAGCTG  TGCTTCCTGG  ACGTGATTCC
801 CTTTTGGAAG  CTGGACCTGG  ACCAGGACTA  CAGGGTTACC  TGCTTCACCT
851 CCTGGAGCCC  CTGCTTCAGC  TGTGCCCAGG  AAATGGCTAA  ATTCATTTCA
901 AAAACAAAC  ACGTGAGCCT  GTGCATCTTC  ACTGCCCGCA  TCTATGATGA
951 TCAAGGAAGA  TGTCAGGAGG  GGCTGCGCAC  CCTGGCCGAG  GCTGGGGCCA
1001 AAATTTCAAT  AATGACATAC  AGTGAATTTA  AGCACTGCTG  GGACACCTTT
1051 GTGGACCACC  AGGGATGTCC  CTTCCAGCCC  TGGGATGGAC  TAGATGAGCA
1101 CAGCCAAGAC  CTGAGTGGA  GGCTGCGGGC  CATTCTCCAG  AATCAGGAAA
1151 ACTGA

```

Abb. A.1 | **DNA-Sequenz von humanem APOBEC3G.** DNA-Sequenz (Gene ID: 60489) des humanen APOBEC3G. Basen der konservierten N- bzw. C-terminalen Desaminase-Domänen sind grau unterlegt.

```

1 MKPHFRNTVE RMYRDTFSYN FYNRPILSRR NTVWLCYEVK TKGPSRPPLD
51 AKIFRGQVYS ELKYHPEMRF FHWFSKWRKL HRDQEYEVTV YISWSPCTKC
101 TRDMATFLAE DPKVTLTIFV ARLYYFWDPD YQEALRSLCQ KRDGPRATMK
151 IMNYDEFQHC WSKFVYSQRE LFEPWNNLPK YYILLHIMLG EILRHSM DPP
201 TFTFNFNNEP WVRGRHETYL CYEVERMHND TWVLLNQRRG FLCNQAPHKH
251 GFLEGRHAEL CFLDVIPIFKW LDLDQDYRVT CFTSWSPCF S CAQEMAKFIS
301 KNKHVSLCIF TARIYDDQGR CQEGLRTLAE AGAKISIMTY SEFKHCWDTF
351 VDHQGC PFQP WDGLDEHSQD LSGRLRAILQ NQEN

```

Abb. A.2 | **Proteinsequenz von humanem APOBEC3G**. Protein-Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_068594.1) des humanen APOBEC3G. Aminosäuren, welche im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurden sind grau unterlegt.

Plasmide

Die folgenden Abbildungen enthalten Karten der Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden.

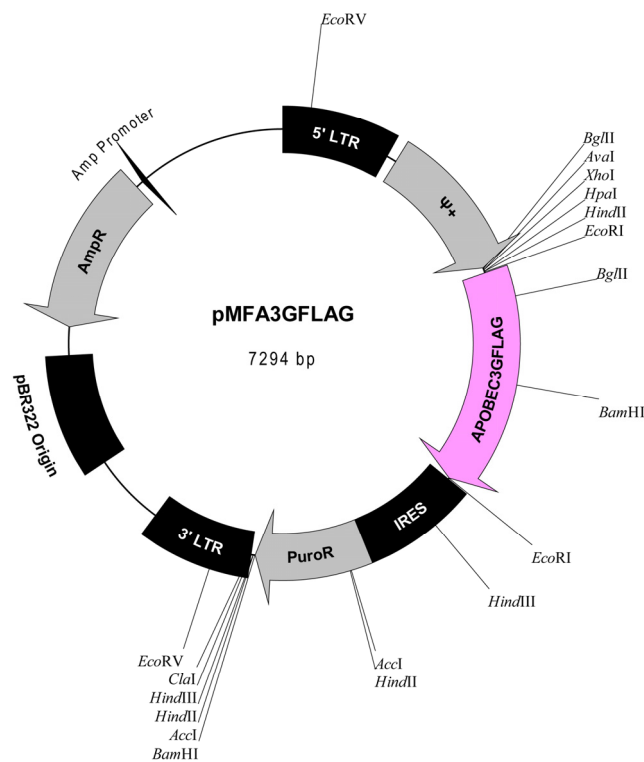


Abb. A.3 | **pMFA3GFLAG**. Das Plasmid enthält die Sequenz eines FLAG-markierten humanen APOBEC3Gs.

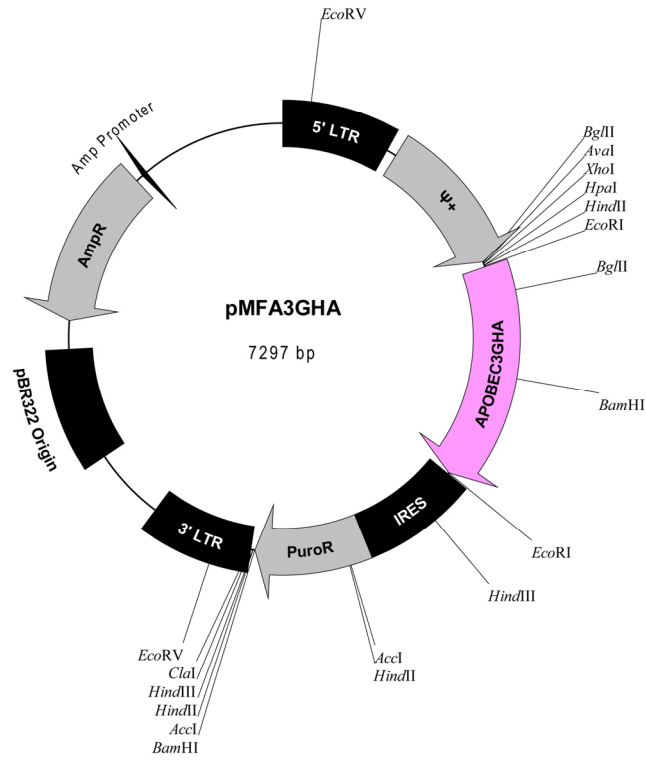


Abb. A.4 | **pMFA3GHA**. Das Plasmid enthält die Sequenz eines HA-markierten humanen APOBEC3Gs.

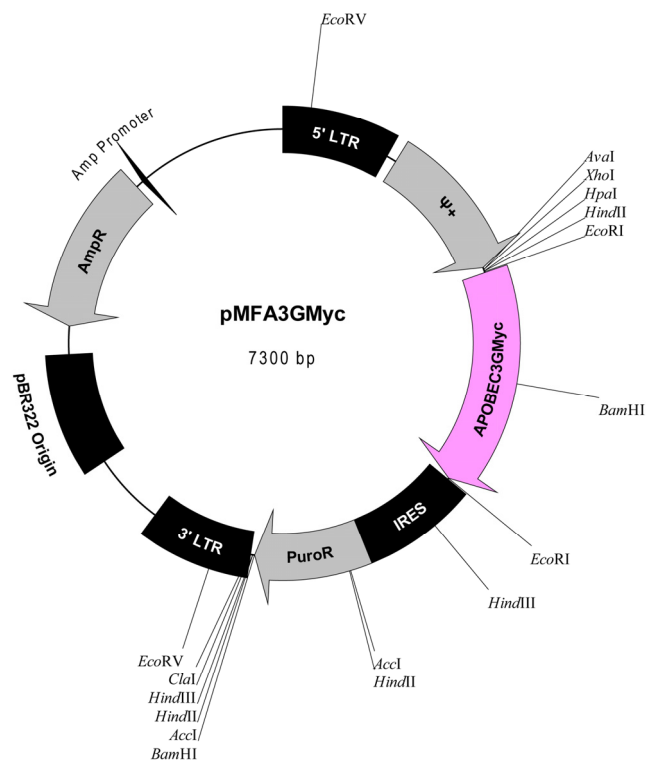


Abb. A.5 | **pMFA3GMyc**. Das Plasmid enthält die Sequenz eines C-Myc-markierten humanen APOBEC3Gs.

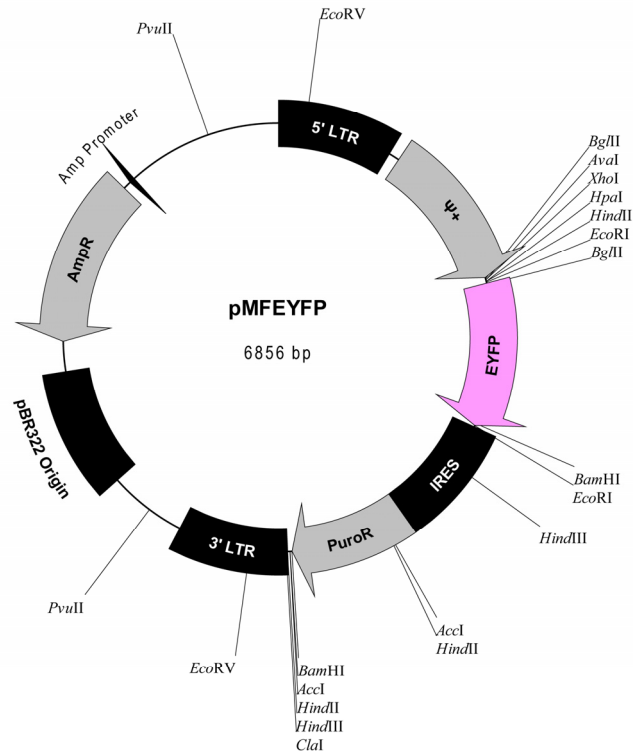


Abb. A.6 | **pMFEYFP**. Das Plasmid enthält die Sequenz von EYFP.

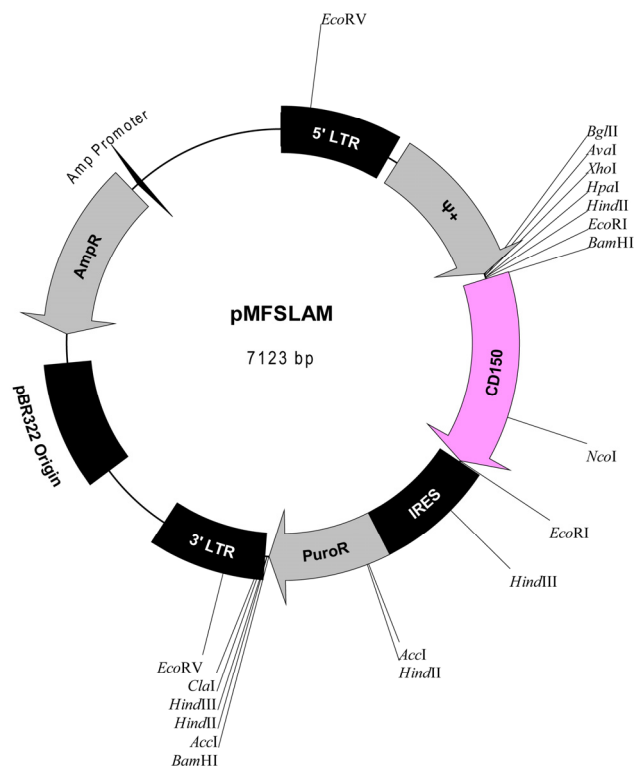


Abb. A.7 | **pMFSLAM**. Das Plasmid enthält die Sequenz des humanen CD150 (SLAM).

