

Die antivirale Funktion der RNA-abhängigen Adenosin Desaminase bei der angeborenen Immunantwort

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Roland Zahn
aus Karlsruhe

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. H. Schwalbe

Erstgutachter: Prof. R. Marschalek

Zweitgutachter: Prof. D. von Laer

Datum der Disputation: 25.02.05

Gewidmet meinen Eltern

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer für die Überlassung des stets spannend bleibenden Themas und die intensive Betreuung meines Dissertationsvorhabens bedanken. Viele hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen und technische Vorschläge halfen mir sehr, meine Arbeit zielgerichtet zu verfolgen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek danke ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Bei Frau Dr. Miyoko Higuchi und Herrn Dr. Jochen Hartner bedanke ich mich für die Überlassung der ADAR-1 „knockout“ Mäuse.

Herrn Dr. Olaf Utermöhlen danke ich für die LCMV-Infektion der Mäuse und die Isolierung der Organe.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Laer bedanke ich mich für die stete Unterstützung und die nette, kollegiale Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank für viele hilfreiche Diskussionen und wissenschaftliche Anregungen gilt hierbei: Holger Martinius, Gunda Brandenburg, Marc Egelhofer, Felix Hermann, Yvonne Fischer, Ingrid Choi, Sebastian Newrzela und Tsanan Giroglou. Für ihre tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei Patricia Schult-Dietrich, Tefik Merovci, und Ina Schelp bedanken.

Allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das anregende wissenschaftliche Umfeld.

Bei meiner Schwester Sabine Zahn bedanke ich mich herzlich für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Vorschläge, die beim Anfertigen dieser Arbeit hilfreich waren.

Meiner Frau Inka danke ich insbesondere für ihren Rückhalt, ihre Geduld und das Korrekturlesen.

1. Inhalt

1. Inhalt	1
2. Zusammenfassung	5
3. Einleitung	7
3.1. LCMV	7
3.1.1. Vorkommen und Krankheitsverlauf bei Arenaviren	7
3.1.2. Aufbau von LCMV	8
3.1.3. Replikation und Morphogenese von LCMV	9
3.1.4. Das Glykoprotein von LCMV	11
3.1.5. Bindung und Aufnahme von LCMV in die Zelle	12
3.1.6. Persistenzmechanismen bei LCMV	13
3.1.7. Immunreaktion auf LCMV	14
3.1.7.1. Zelluläre angeborene und adaptive Immunantwort in Mäusen	14
3.1.7.2. Angeborene Immunantwort in der Zelle	15
3.2. RNA-abhängige Adenosin Desaminasen	18
3.2.1. RNA-Editierung durch die ADAR	18
3.2.2. Isoformen der ADAR-1	22
3.2.3. Die Editierung von viralen Substraten durch die ADAR-1	23
3.3. Zielsetzung der Arbeit	24
4. Material und Methoden	26
4.1. Materialien	26
4.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
4.1.2. Puffer und Lösungen	26
4.1.3. Verwendete Kits	29
4.1.4. Oligonukleotide	30
4.1.5. Enzyme	31
4.1.6. Antikörper	31
4.1.7. Plasmide	32
4.1.8. Bakterien	33
4.1.9. Viren	34
4.1.10. Zelllinien	34
4.1.11. Mausstämme	35

1. Inhalt	2
4.1.12. Geräte	35
4.1.13. Verbrauchsmaterialien	36
4.2. Methoden	37
4.2.1. Gentechnische Methoden	37
4.2.1.1. Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i>	37
4.2.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
4.2.1.3. Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
4.2.1.4. Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA-Enden	38
4.2.1.5. Phosphorylierung von DNA	39
4.2.1.6. Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow-Polymerase	39
4.2.1.7. Gelelektrophorese von DNA	39
4.2.1.8. Isolierung von DNA aus Gelen	40
4.2.1.9. Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen und Mausgeweben	40
4.2.1.10. Reverse Transkription von RNA	41
4.2.1.11. Genamplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	41
4.2.1.12. Ligation von DNA-Fragmenten	43
4.2.1.13. Ligation von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren	43
4.2.1.14. Herstellung kompetenter Zellen mit <i>Escherichia coli</i>	44
4.2.1.15. Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA	44
4.2.1.16. Sequenzierung von DNA	45
4.2.1.17. Zielgerichtete DNA-Mutagenese	45
4.2.1.18. Quantitative PCR	46
4.2.1.19. ELISA	47
4.2.1.20. Assay zur Messung der Editierungs-Aktivität der ADAR-1	47
4.2.2. Zellkulturmethoden	48
4.2.2.1. Kultivierung und Konservierung von Zelllinien	48
4.2.2.2. Transiente Transfektion von Zelllinien	49
4.2.2.3. Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren	49
4.2.2.4. Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen	50
4.2.2.5. Titration von retroviralen Zellkulturüberständen	50
4.2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	50
4.2.2.7. FACS-Sorting	52
4.2.2.8. Infektion von Zelllinien mit LCMV	52
4.2.2.9. Titration von LCMV-haltigen Zellkulturüberstände	52

1. Inhalt	3
4.2.3. Proteinbiochemische Methoden	53
4.2.3.1. Zellyse von Zellen	53
4.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zelllysate	53
4.2.3.3. Elektro-Blotting	55
4.2.3.4. Immundetektion durch Chemilumineszenz	55
4.2.3.5. Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen	56
4.2.4. Tierversuche	56
4.2.4.1. LCMV-Infektion der Mäuse	56
4.2.4.2. Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten	57
5. Ergebnisse	58
5.1. LCMV-GP-Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen	58
5.2. Mutationen im LCMV-GP in LCMV-infizierten L929-Zellen	60
5.2.1. Expression der mutierten LCMV-GP-Klone aus L929-Zellen	64
5.3. Mutationen im LCMV-GP in LCMV-infizierten Mäusen	67
5.3.1. Expression der mutierten LCMV-GP-Klone aus muriner Milz	71
5.4. Ursache des Mutationsmusters im LCMV-GP	74
5.5. Niveau der mRNA-Expression der iADAR-1 bei der LCMV-Infektion	75
5.5.1. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten L929-Zellen	75
5.5.2. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen	76
5.5.3. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten Mäusen	78
5.6. IFN- α -Niveau in LCMV-infizierten Zellen und Mäusen	79
5.7. Induktion der iADAR-1 durch LCMV auf Proteinebene	81
5.8. Editierungs-Aktivität der iADAR-1 in LCMV-infizierten Zellen	82
5.9. Zelluläre Lokalisation der iADAR-1	85
5.10. Einfluss der iADAR-1-Überexpression auf Mutationen im viralen Genom von LCMV	86
5.11. Infektion von iADAR-1 exprimierenden 293T-Zellen mit LCMV	90
5.12. Isolierung von primären MEF ^{-/-iADAR-1} und Etablierung einer MEF ^{-/-iADAR-1} Zelllinie	93
5.13. Mutationen im LCMV-GP in infizierten MEF ^{-/-iADAR-1} und MEF wt	95
5.14. iADAR-1-Expression in LCMV-infizierten MEF wt	97
5.15. 5'-Nachbar-Präferenz der ADAR-1	100

1. Inhalt	4
<hr/>	
6. Diskussion	102
6.1. Gehäufte A→G Mutationen im viralen Genom von LCMV und deren Auswirkungen auf die Funktion des LCMV-GP	103
6.2. Induktion der iADAR-1 durch LCMV	109
6.3. Wechselwirkung zwischen der iADAR-1 und LCMV	111
6.4. Modell der antiviralen Aktivität der iADAR-1	114
7. Literatur	116
8. Anhang	125
8.1. Abkürzungsverzeichnis	125
8.1.1. Aminosäuren	125
8.1.2. Abkürzungen	125
8.2. Sequenzen der hypermutierte Klone	128
8.3. Plasmidkarten	130

2. Zusammenfassung

Die angeborene Immunantwort von Säugetieren ist die erste wirkungsvolle Barriere gegen eindringende Pathogene, die sowohl Infektionen als auch die Entstehung von Neoplasien verhindern kann. Insbesondere wird durch sie die Ausbreitung und Replikation von Viren wirksam bekämpft. Bei RNA-Viren wird die angeborene Immunabwehr in infizierten Zellen von der doppelsträngigen RNA aktiviert, die während der Replikation oder Transkription dieser Viren entsteht. Es kommt zur Sezernierung von Interferon- α und - β (IFN- α/β), die wiederum die Expression einer Reihe von antiviralen Proteinen stimulieren. Eines dieser Proteine ist die IFN- α -induzierbare RNA-abhängige Adenosin Desaminase (iADAR-1).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der iADAR-1 in der Immunabwehr näher zu charakterisieren. Bisher wurde die antivirale Aktivität der iADAR-1 gegen verschiedene Virusstämme, deren Genome Adenosin zu Guanosin (A→G) Hypermutationen aufweisen, nur angenommen, jedoch noch nicht direkt gezeigt [4]. In dieser Arbeit wurde am Beispiel des Glykoproteins (GP) des lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) untersucht, ob solche A→G Mutationen im viralen Genom tatsächlich durch die iADAR-1 verursacht werden und ob dadurch die Funktion der viralen Proteine und damit die Infektiosität von LCMV reduziert wird. Des Weiteren wurde die Induktion der iADAR-1 durch die Infektion mit LCMV und die Wirkung der iADAR-1 auf die Replikation von LCMV analysiert.

Bekannt war nur, dass die iADAR-1 durch IFN- α selbst oder durch die Infektion von Makrophagen mit Adenoviren induziert wird. In dieser Arbeit wurde erstmals für Fibroblasten, neuronale Zellen und *in vivo* in Mäusen nachgewiesen, dass die iADAR-1 direkt durch die Infektion mit LCMV hochreguliert wird. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die iADAR-1 zu den antiviralen Effektormolekülen der angeborenen Immunabwehr zählt. LCMV induzierte die Expression der iADAR-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Im Gegensatz zu Vaccinia- und Adenoviren, die die Aktivität der iADAR-1 inhibieren [5, 6], konnte bei der Infektion von SH-SY5Y-Zellen mit LCMV keine reduzierte Aktivität der iADAR-1 festgestellt werden.

Ferner konnte das schon in anderen Viren beobachtete A→G Hypermutionsmuster nun auch für LCMV bestätigt werden. Sowohl *in vitro* in L929-Zellen als auch *in vivo* in Mäusen wurde eine erhöhte A→G Mutationsfrequenz gefunden, die zwischen 50 und 75 % aller Mutationen in der S-RNA von LCMV ausmacht. Dies zeigte sich vor allem in der späten Phase der Infektion, also zu Beginn der Persistenz. Insgesamt wurden zu diesem Zeitpunkt in L929-Zellen 27 % und in der Maus 15 % nicht funktionelles LCMV-GP synthetisiert. Zudem wurde die Relevanz der A→G Hypermutionen für die beeinträchtigte Funktion des GPs deutlich, da sie 62 % der nicht infektiösen GP-Moleküle verursachen.

Die desaminierende Wirkung der iADAR-1 auf das virale Genom von LCMV wurde in 293T-Zellen direkt gezeigt. A→G Mutationen in der S-RNA von LCMV nahmen durch die Überexpression der iADAR-1 in 293T-Zellen um 40 % zu. Ebenso wurde die Replikation bzw. das Assembly von Virionen durch die iADAR-1 reduziert, da im Vergleich zu Kontrollzellen der LCMV-Titer im Überstand von iADAR-1-überexprimierenden Zellen wesentlich niedriger war.

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass die A→G Mutationen nicht durch die virale Polymerase induziert werden. Hierfür wurden iADAR-1 „knockout“ murine embryonale Fibroblasten (MEF) isoliert und als stabile Zelllinie etabliert. In diesen Zellen war kein A→G Hypermutionsmuster in der LCMV-RNA zu erkennen. In MEF wt war ebenfalls kein A→G Hypermutionsmuster nachweisbar. Der Grund hierfür könnte die im Vergleich zu L929-Zellen deutlich geringere basale iADAR-1-Expression der nicht völlig ausdifferenzierten MEFs sein.

Um in Zukunft die hier gezeigten antiviralen Effekte der iADAR-1 genauer zu charakterisieren und zu generalisieren, bieten die iADAR-1 „knockout“ MEF einen viel versprechenden Ansatz bei der Verwendung einer iADAR-1 exprimierenden Kontrollzelllinie. Hiermit könnte der antivirale Effekt der iADAR-1 auch für andere Viren direkt untersucht werden. Solche Untersuchungen ermöglichen einen besseren Vergleich zwischen den antiviralen Effekten der iADAR-1 und anderen antiviralen Mediatoren der angeborenen Immunabwehr, wie z.B. den MX-Proteinen oder der RNaseL.

3. Einleitung

Das genaue Verständnis der Virus-Wirtsinteraktionen stellt einen wichtigen Baustein für die Behandlung und Vorbeugung viraler Infekte dar. Das Immunsystem verhindert meist die weitere Ausbreitung des Virus im Wirt. Die erste Barriere gegenüber Viren und anderen Krankheitserregern stellt die angeborene Immunantwort dar. Diese reagiert unspezifisch auf virale Infektionen, indem in infizierten Zellen Interferone (IFN) ausgeschüttet werden, die einen antiviralen Status in der Zelle sowie in den Nachbarzellen induzieren. Durch IFN- α wird, neben anderen Mediatoren der Immunantwort, auch die RNA-abhängige Adenosin Desaminase (ADAR) verstärkt exprimiert. Bislang ist die Interaktion zwischen der IFN-induzierbaren ADAR-1 und Viren kaum erforscht. Die Funktion der ADAR-1 in der angeborenen Immunabwehr gegenüber Viren wird in dieser Arbeit anhand des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) untersucht. Mit LCMV als Modellvirus wurden in der Vergangenheit bereits viele immunologische Fragestellungen untersucht und wichtige Grundlagen der adaptiven Immunantwort, wie die MHC Restriktion von T-Zellen, erforscht [7, 8].

3.1. LCMV

3.1.1. Vorkommen und Krankheitsverlauf bei Arenaviren

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus, ein RNA-Virus, gehört zur Gruppe der Arenaviren. Der Name Arena (lat. Sand) leitet sich von der körnigen Struktur der in das Virion eingelagerten Ribosomen ab, die in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen sind. LCMV wurde erstmals 1933 als Verursacher einer Meningitisepidemie in St. Louis beschrieben [9]. In Europa, Amerika und Afrika sind Nager bzw. Fledermäuse die natürlichen Wirte von LCMV und anderen Arenaviren. In Tierställen kommt es immer wieder zum Aufflammen von LCMV-Infektionen und in freier Wildbahn sind häufig ganze Mauskolonien chronisch infiziert. Andere Arenaviren sind teilweise fatale Humanpathogene, obwohl die Infektion im natürlichen Nagerwirt asymptomatisch ist. Die Übertragung erfolgt meist durch Inhalation von getrocknetem Nagerfäzes oder durch kontaminierte Nahrungsmittel.

Lassa Fieber Virus (LFV), ein weiteres Arenavirus, wurde erstmals 1970 in Westafrika beschrieben [10, 11] und führt in 15 % der Fälle zum Tode [1, 12, 13]. Im klinischen Verlauf des Lassa Fiebers treten hohes Fieber, Hämorrhagien und toxisches Kreislaufversagen bzw. Nierenversagen auf. LFV flammt immer wieder in Westafrika auf (Abb. 1), aber vereinzelt kommt es auch in Europa zur Diagnose von Lassa Fieber, das meist eingeschleppt wurde.

Bei Infektionen mit den in Südamerika verbreiteten Arenaviren Guanarito, Junita oder Machupo Virus, ist die Mortalitätsrate durch hämorrhagisches Fieber im Vergleich zu LFV höher. LCMV hingegen

verursacht meist nur milde fieberähnliche Symptome; in seltenen Fällen kann es allerdings auch zu einer aseptischen Meningitis kommen. Problematisch sind LCMV- ebenso wie LFV-Infektionen bei Schwangeren. Sie führen häufig zu einer Schädigung des Fetus mit psychomotorischer Retardierung, Mikrocephalie, Chorioretinitis und weiteren Degenerierungen [14].



Abb. 1: Verbreitung von Lassa Fieber in Westafrika [1]. Die roten Punkte zeigen LFV-Epidemien an und die blauen Punkte serologischen Nachweis von humanen LFV-Infektionen.

3.1.2. Aufbau von LCMV

LCMV ist ein polymorphes, umhülltes und nicht zytopathisches Virus, mit einem Durchmesser von 62-200 nm (Abb. 2). Im Viruspartikel sieht man eingelagerte zelluläre Ribosomen. Die äußere Hülle beinhaltet das Glykoprotein des Virus. Das Genom ist auf zwei RNA-Strängen verteilt und hat eine ambisense Kodierungsstrategie für je zwei Proteine pro Strang. Das Nukleokapsid Protein (NP) mit ca. 63 kD [15] und das Glykoprotein (GP-C) mit ca. 75 kD [16-18] werden von der kurzen S-RNA mit 3,4 kb kodiert. Die 7,2 kb große L-RNA kodiert für die Polymerase L mit ca. 200 kD [19] und das Ringfinger Protein Z mit 11 kD [20].

Die 17 letzten Basenpaare der L- und S-RNA am 3'-Ende sind identisch und bilden vermutlich mit ihrem komplementären 5'-Ende eine pfannenartige Struktur aus [21]. Es sind ca. zweimal so viele S-RNA wie L-RNA Moleküle im Virion enthalten.

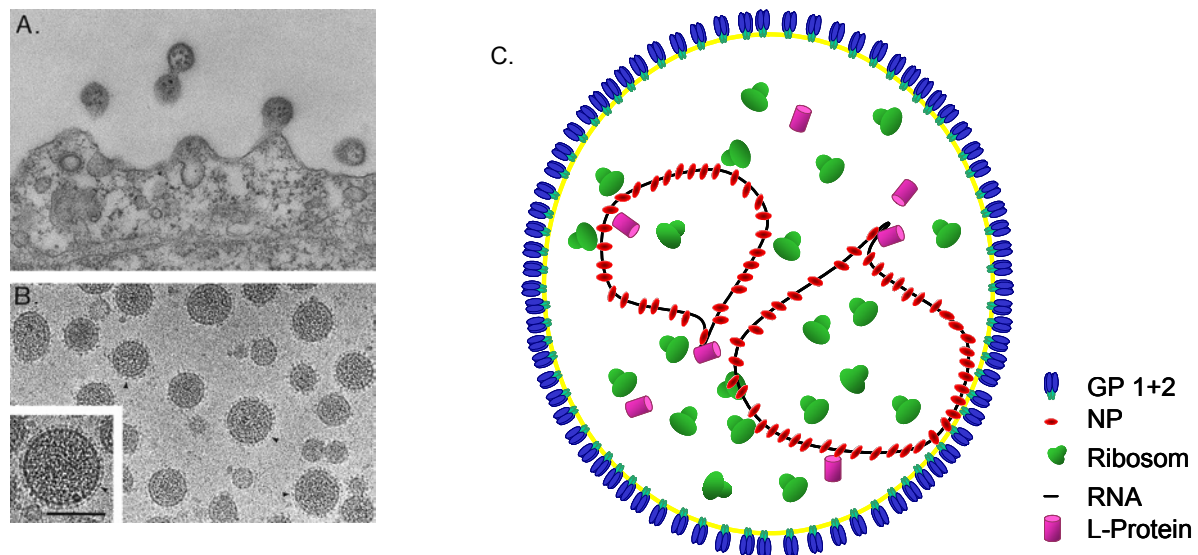


Abb. 2: A: Elektronenmikroskopische Aufnahme von LCMV-Partikeln, die von der Zellmembran knospen [20]. B: Cryoelektronische Aufnahme von LCMV-Partikeln. Die körnige Struktur wird durch Ribosomen verursacht. Der Balken auf dem Ausschnittsbild zeigt 100 nm an. Hier sieht man auch die Spike-Struktur des GP-Proteins. C: Schematische Zeichnung des Virus. Die Ribosomen sind in grün dargestellt. Die beiden RNA-Stränge, L- und S- sind in pfannenartiger Struktur eingezeichnet, die vom Nukleoprotein umlagert sind. Das L-Protein, die Polymerase, ist vermutlich mit der RNA assoziiert.

3.1.3. Replikation und Morphogenese von LCMV

Die Replikation und Transkription der viralen mRNA verläuft zum Teil über ein Antigenom [20]. Hierbei kommt die besondere ambisense Kodierung der Arenaviren zum Tragen. Ein Gen auf jedem Strang wird in positiver (GP & Z), das andere in negativer Orientierung (NP & L) kodiert. Getrennt werden beide Leseraster von einer intergenischen Region (IGR), die im Gegensatz zum restlichen Genom GC reich ist und einen Hairpin von bis zu 217 Basenpaaren ausbildet. Das Genom selbst enthält 20 % mehr AT als GC. Die Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase verläuft über die antigenomische RNA, die als Matrize für die genomische RNA dient (Abb. 3). Die genomische RNA trägt kein 5'-Cap. Die mRNA für NP und L wird direkt vom genomischen Strang synthetisiert und besitzt ein 5'-Cap wie alle LCMV-viralen mRNA's. Das 5'-Cap wird, vermutlich ähnlich dem Mechanismus bei Bunyamwera und Influenza [22, 23], durch die Aktivität der viralen Polymerase von zellulären mRNA's "geklaut" (cap-snatching)[24].

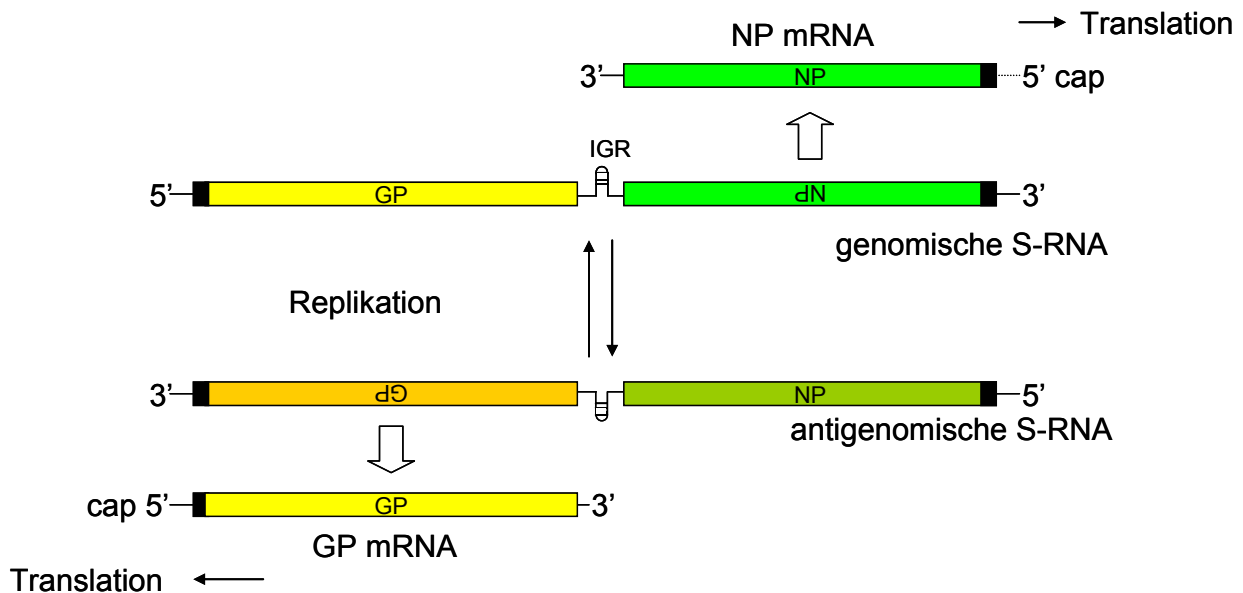


Abb. 3: Replikation und Translationsstrategie der viralen s-RNA von LCMV. Für die Replikation muss erst eine antigenomische RNA transkribiert werden. Von dieser wird sowohl die genomische S-RNA als auch die mRNA für GP transkribiert. Für die Translation der mRNA von NP kann direkt die genomische RNA als Template verwendet werden.

Das 3'-Ende der RNA ist nicht polyadenyliert, wobei die genaue Struktur des 3'-Endes nicht bekannt ist. Die IGR dient als Terminationssignal der mRNA-Transkription durch die virale Polymerase [25]. Für die Transkription der GP- und Z-mRNA muss erst die gesamte antigenomische RNA synthetisiert werden, da diese Proteinene nicht direkt vom Genom translatiert werden. Dies führt dazu, dass zuerst NP in großen Mengen translatiert wird, danach L und später GP und Z. NP ist für die Replikation und Transkription in ausreichender Konzentration unabkömmlich. Es gibt aber keine Hinweise auf einen Einfluss von NP auf die Regulation dieser beiden Prozesse [26].

Die Morphogenese der Virionen ist schlecht charakterisiert. Genomische RNA, NP und L-Polymerase bilden das Capsid. Dabei werden auch Ribosomen mit in dieses Konglomerat eingelagert. NP lagert sich vermutlich während dieses Prozesses an den C-terminus von GP an und es kommt zur Knospung von der Zelloberfläche. Das Z-Protein scheint dabei eine große Rolle zu spielen. Ohne Z kommt es nicht zur Knospung, wie in Studien mit einem reversen Genetik System gezeigt werden konnte. Dabei kolokalisiert Z mit TSG101, einer Komponente der Vakuolaren Protein Sortierungsmaschinerie [27]. Z scheint also die Rolle der Matrixproteine von Negativstrang-RNA-Viren zu übernehmen. Z ist dann auch im Virion an NP assoziiert [28].

3.1.4. Das Glykoprotein von LCMV

Das Glykoprotein von LCMV wird als ein Vorläuferprotein, dem GP-C, mit einem Molekulargewicht von 70-80 kD translatiert. Dieses wird vermutlich an mehreren Stellen N-glykosyliert [29], nachdem im ER das N-terminale Signalpeptid (58 AS) abgespalten wurde. Die zelluläre Subtilase SKI-1/S1P spaltet GP-C in GP-1 und GP-2. Dies findet wahrscheinlich im späten Golgi- oder nach dem Golgi-Netzwerk statt [30, 31]. Die Erkennungssequenz der Protease ist hierbei RRLA und ähnelt der des LFV: RRLL [32]. Direkt hinter der RRLA Sequenz findet sich die Spaltstelle nach der Aminosäureposition 265 (Abb. 4). Eine Aminosäuremutation von Leucin an der Stelle 110 zu Prolin im LCMV-GP WE verhindert die Spaltung des GP-C [33]. GP-2 (35 kD) bildet hierbei das integrale Membranprotein, das über ionische Wechselwirkungen mit dem GP-1 (44 kD), dem peripheren Membranglykoprotein, verknüpft ist. Hieraus formt sich ein Homotetramer aus GP-1/GP-2 Heterodimeren. Antikörper gegen LCMV binden ausschließlich an GP-1 [34, 35], das die Bindung an den zellulären Rezeptor vermittelt. An GP-2 ist vermutlich C-terminal NP assoziiert. GP-2 hat dabei drei potenzielle Glykolisierungsstellen und GP-1 6, wobei 30% des Molekulargewichtes von GP-1 durch Glykolisierung hervorgerufen wird [29]. Deletionen im KRR-Motiv des C-terminus von GP-2 führen zu einem nicht funktionellen GP-C [31]. GP-2 weist in der N-terminalen Hälfte zwei „heptad repeats“ auf und vermittelt die virale Fusion [36].

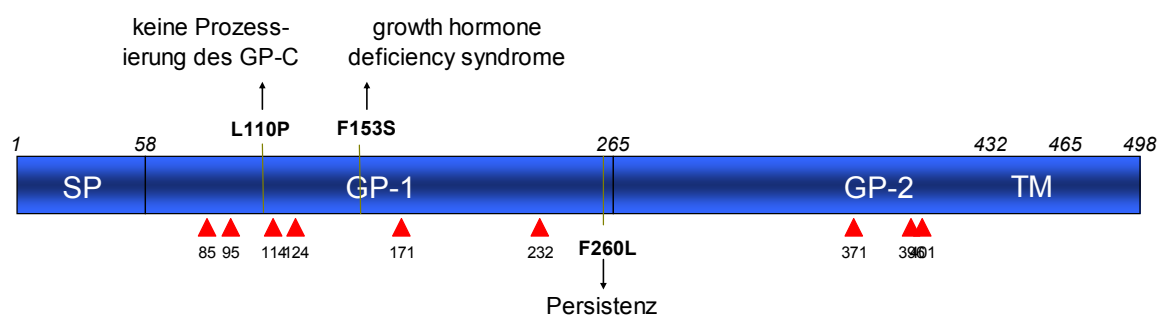


Abb. 4: GP-C wird in das SP, GP-1 und GP-2 gespalten. Die kursiven Zahlen geben die Aminosäureposition der Spaltprodukte des GP-C an. Die eingezeichneten Aminosäureaustausche in Fettdruck werden im Text näher beschrieben. Potenzielle N-Glykolisierungsstellen sind mit roten Dreiecken eingezeichnet. Die Transmembrandomäne (TM) des GP-2 ist grau unterlegt.

3.1.5. Bindung und Aufnahme von LCMV in die Zelle

Das GP-1 von LCMV und auch LFV bindet primär über α -Dystroglykan (α -DG) an die Wirtszelle [37] (Abb. 5). Auch Oliveros und Latino, zwei Neuwelt-Arenaviren binden an α -DG, während die anderen in Amerika vorkommenden Arenaviren einen anderen, noch unbekanntem Rezeptor verwenden [38]. Die Bindung hängt vornehmlich von den Aminosäurepositionen 259 und 260 im GP-1 ab. Die Aminosäure 260 muss hierfür Isoleucin oder Leucin sein, ein Valin an dieser Position führt zu schwächerer Bindung an α -DG. DG wird als Vorläuferprotein synthetisiert und in α -DG und β -Dystroglykan gespalten. Durch α -DG wird die extrazelluläre Matrix mit Aktin in der Zelle verknüpft. α -DG ist dabei nicht kovalent an das membrandurchspannende β -DG gebunden. Laminin-1 und -2 sowie Agrin und Perlecan verankern die Zelle über α -DG in der Matrix [2].

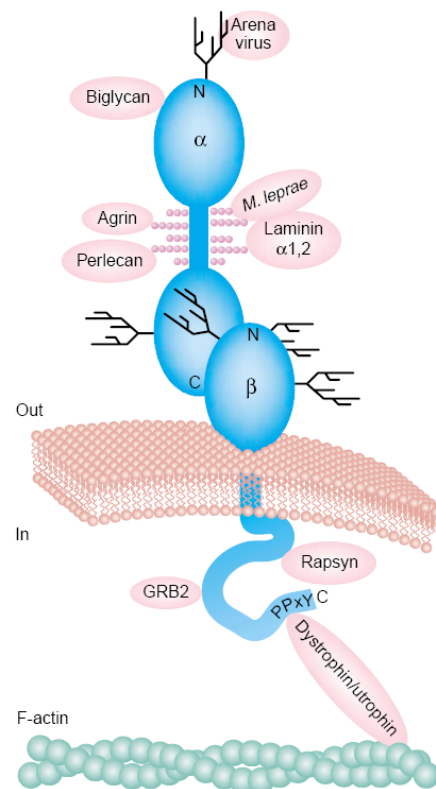


Abb. 5: Übersicht über α -DG und die Bindung von Arenaviren daran [2]. Die blau gefärbten Symbole kennzeichnen das extrazelluläre α -DG und das transmembrane β -DG. In roten Kreisen sind die jeweiligen Bindungspartner des α - und β -DG dargestellt.

Nach Bindung von LCMV durch GP-1 an α -DG bildet sich ein nicht von Clathrin umhülltes Vesikel aus, wodurch LCMV in die Zelle aufgenommen wird. In diesem endocytotischen Vesikel dissoziiert GP-1 vom GP-2 ab und es kommt zur Exposition des Fusionspeptides von GP-2. Dieser Vorgang spielt sich bei einem pH-Optimum von pH 5,3-5,5 ab [39, 40]. Das Nukleokapsid von LCMV wird aus dem Vesikel in das Zytoplasma freigesetzt und es kommt zum Start der Replikation und Translation im Zytoplasma.

Die Bindungsaffinität von GP-1 an α -DG korreliert mit dem weiteren Verlauf der LCMV-Infektion. Die Aminosäuremutation von Phenylalanin zu Leucin an der Position 260 des GP-1 (Abb. 4) im Klon13 des LCMV-Stammes ARM53b resultiert in einer deutlich stärkeren Bindung an α -DG. Dies führt zu einer persistierenden Infektion und zu einer Supprimierung der cytotoxischen T-Zell Antwort, die

normalerweise die LCMV-Infektion in Mäusen limitiert [41, 42]. Neonatale Infektionen von C3H/St Mäusen mit dem Stamm WE c2.2 führen ebenfalls zur Persistenz. Dabei kommt es zu einem „growth hormone deficiency syndrome“ (GHDS), das durch Wachstumsstörungen und Hyperglykämie gekennzeichnet ist. Als Auslöser konnte die Aminosäuremutation im LCMV GP-1 an der Position 153 von Phenylalanin zu Serin (Abb. 4) bestimmt werden [43]. Interessanterweise führt auch diese LCMV WE c2.2 Variante WE c54 zu einer stärkeren Bindung des GP-1 an α -DG [38, 44]. Der Stamm WE c54 und Klon13 von ARM53b zeigen aufgrund ihrer hochaffinen Bindung zu α -DG auch einen veränderten Tropismus und lokalisieren in der lymphatischen weißen Pulpa in der Milz [42]. Der LCMV Stamm ARM53b lokalisiert dagegen in der roten Pulpa der Milz.

3.1.6. Persistenzmechanismen bei LCMV

Infektionen mit LCMV können sowohl in Mäusen wie auch in der Zellkultur persistieren. Die Mechanismen, die dem Übergang von der akuten Phase der Infektion zur Persistenz zugrunde liegen, sind sicherlich unterschiedlich. In Mäusen hat die Immunabwehr des Wirtes einen entscheidenden Anteil am Verlauf der Infektion. Auch der Virusstamm und dessen Rezeptorverwendung spielen eine große Rolle. Die neonatale Infektion von Mäusen mit LCMV führt immer zur Persistenz, da LCMV-spezifische T-Zellen im sich entwickelnden Thymus nicht reifen, sondern absterben und sich eine Immuntoleranz ausbildet [20].

In der Zellkultur kommt es im Laufe der Infektion zu einem Abfall der Expression des Glykoproteins auf der Zelloberfläche und zur Reduktion des Virustiters im Überstand der Zellen [17, 45]. Dabei akkumulieren auch trunkierte, in der Länge heterogene RNAs. Defekte interferierende (DI) RNA, die aus dem Gehirn persistent infizierter Mäuse isoliert wurde, hat terminale Trunkierungen von bis zu 41 Basen. Diese führen wahrscheinlich zu replikationskompetenten aber transkriptions-inkompetenten RNAs, die mit vollständigen genomischen RNAs konkurrieren [12, 25]. Eine genauere Charakterisierung der DI-RNA im Hinblick auf die Persistenz in vivo wie auch in vitro liegt allerdings noch nicht vor. Infiziert man L-Zellen mit hoher MOI in vitro, kommt es zu einem wellenförmigen Infektionsverlauf, bei dem sich ein Peak mit hoher Viruspartikelproduktion mit der Produktion großer Mengen an DI-Partikeln abwechselt [46].

DI-Partikel finden sich auch bei niedriger MOI im Gemisch mit vollständigen Viruspartikeln, bei hoher MOI überwiegen jedoch DI-Partikel [47]. Bei persistierenden Infektionen von Mäusen und Zelllinien wurde eine s-RNA in DNA-Form gefunden [48]. Dies wird durch eine endogene reverse Transkriptase vermittelt und könnte ein Mechanismus zur Etablierung persistenter Infektionen sein.

3.1.7. Immunreaktion auf LCMV

3.1.7.1. Zelluläre angeborene und adaptive Immunantwort in Mäusen

Infektionen von Mäusen durch LCMV verlaufen je nach Infektionsort, Wirt und Virusstamm unterschiedlich. Wird eine immunkompetente, erwachsene Maus mit LCMV WE c2.2 infiziert, kommt es zwei bis drei Tage nach der Infektion zur akuten angeborenen Immunantwort durch die Ausschüttung von IFN- α/β [49]. IFN- α/β regt natürliche Killerzellen (NK) zur Proliferation und zu einer erhöhten Zytotoxizität an. Außerdem induziert IFN- α/β einen antiviralen Status in den Nachbarzellen und lockt weitere Effektorzellen an.

In der adaptiven spezifischen Immunantwort proliferieren danach LCMV-spezifische zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen (CTL) und IFN- γ wird sezerniert. Das höchste Niveau der CTL-Antwort ist am Tag acht erreicht. Durch die CTL kommt es zur Perforin vermittelten Lyse der infizierten Zellen. Perforin „knockout“ Mäuse sind nicht in der Lage, die LCMV-Infektion durch CTL zu eliminieren [50, 51]. Bei dem schon beschriebenen LCMV-Klon 13 ARM53b verursacht diese CTL vermittelte Zytotoxizität eine persistierenden Infektion. Durch die stärkere Bindung an α -DG werden 90% der DEC205⁺ und CD11c⁺ dendritischen Zellpopulation infiziert, im Gegensatz zu einer Infektion mit LCMV ARM53b, bei der nur 10 % dendritische Zellen (DC) infiziert werden. Diese mit LCMV-Klon 13 infizierten DC werden dann durch CTLs eliminiert. Dadurch wird aber diese DC-Population, die ein wichtiger Mediator der Immunantwort ist, weitgehend ausgeschaltet, was zur Persistenz führt [42].

Neben dem ausgeschütteten $\text{IFN-}\gamma$ bilden auch CD4^+ -T-Zellen und die humorale Immunantwort einen wichtigen Baustein bei der Eliminierung von LCMV. Ohne CD4^+ -T-Helferzellen kommt es gerade bei stark virulenten Stämmen zu einer zu schwachen, deregulierten CTL-Antwort [52].

Neutralisierende Antikörper (nAb) verhindern im weiteren Verlauf der Infektion, dass der Virustiter erneut ansteigt und sich eine persistente Infektion bildet. Dies konnte insbesondere durch Studien gezeigt werden, in denen eine CTL-Antwort entweder durch die Depletion von CD8^+ -T-Zellen reduziert ist oder bei CTL „knockout“ Mäusen völlig fehlt [53, 54]. In diesen Tieren kommt es, anders als in immunkompetenten Tieren, zeitlich verzögert zu einer scheinbaren Eliminierung von LCMV, auch ohne CTLs. Allerdings bilden sich hierbei nAb „escape“ Varianten, die nicht von nAb erkannt und eliminiert werden. Dies kann zu einem Wiederaufflammen der Infektion nach 80-200 Tagen führen, so dass sich eine persistierende Infektion ausbildet [55] (Abb. 6).

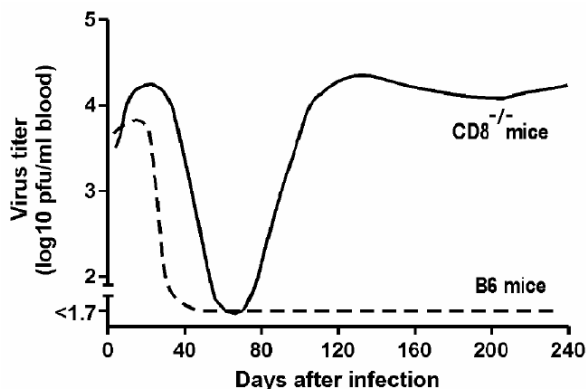


Abb. 6: Infektionsverlauf in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen. Die gestrichelte Linie stellt den Virustiter im Blut von Kontrollmäusen dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Virustiter bei CD8^- Mäusen des gleichen Mausstamms. Hier kommt es zu einem Wiederaufflammen der Infektion [8, 53].

In den nAb „escape“ Varianten sind insbesondere drei Aminosäurebereiche im GP-1 mutiert: Aminosäure 105-133, 175-185 und 211-214. Darunter ist auch eine Mutation an der Position 119 des GP-1, die zur Resistenz gegenüber der Neutralisation mit dem monoklonalen anti GP-1-Antikörper KL25 führt [56].

3.1.7.2. Angeborene Immunantwort in der Zelle

Wird eine Zelle in einem Zellverband von LCMV-infiziert, kommt es wie bei anderen Viren auch zu einer akuten unspezifischen Immunreaktion in der Zelle. Dabei entstehende virale dsRNA führt zur Induktion der antiviralen Immunantwort. Dadurch wird $\text{IFN-}\alpha/\beta$, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, von virusinfizierten Zellen ausgeschüttet und wirkt sowohl auto- wie auch parakrin.

Die Zelle kann dsRNA über die dsRNA-bindende Protein-Kinase (PKR) [3] oder extrazellulär über den Toll-like- Rezeptor 3 (TLR) [57] detektieren. Alternativ existieren noch die Faktoren dsRNA-activated factor (DRAF) und virus-activated factor (VAF), die unabhängig virale dsRNA auf einem anderen Weg erkennen und auch zur Aktivierung immunstimulierbarer Gene (ISG) beitragen.

Auch die Bindung von Viren an den zellulären Rezeptor kann eine IFN- α Immunantwort auslösen [58]. Durch die Bindung von dsRNA an die PKR dimerisiert diese und wird durch Auto-Phosphorylierung aktiviert.

I κ B, ein Kofaktor des Nukleären Faktors κ B (NF- κ B), wird durch aktivierte PKR phosphoryliert, wodurch NF- κ B aus dem Zytoplasma in den Kern lokalisiert und an den IFN- β Promotor bindet. Dieser wird durch die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren aktiviert und IFN- β -mRNA wird synthetisiert [59]. IFN- β wirkt direkt autokrin auf die Zelle und aktiviert durch die Bindung an den zellulären IFN- α/β Rezeptor JAK1 und Tyk2 (Abb. 7). Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT2 und danach STAT1, die einen Heterodimer bilden. IFN-response Faktor (IRF) 9 bindet daran, wodurch sich der IFN-stimulierte Gen-Faktor (ISGF) 3 bildet, der über ein IFN-response Element (ISRE) im Promotorbereich von antiviralen Genen bindet und diese aktiviert. Dadurch wird auch der Faktor IRF 7 in der Zelle exprimiert, der wiederum IFN- α/β durch Bindung an deren Promotorbereich aktiviert. Dieser „feedbackloop“ ist durch verschiedene Proteine reguliert.

Durch IFN- α/β werden verschiedene Proteine aktiviert bzw. stärker exprimiert. Zu den wichtigsten gehören die PKR, die Mx Proteine, die 2'-5' Oligoadenylat Synthetase (OAS) sowie die RNA-abhängige Adenosin Desaminase (ADAR).

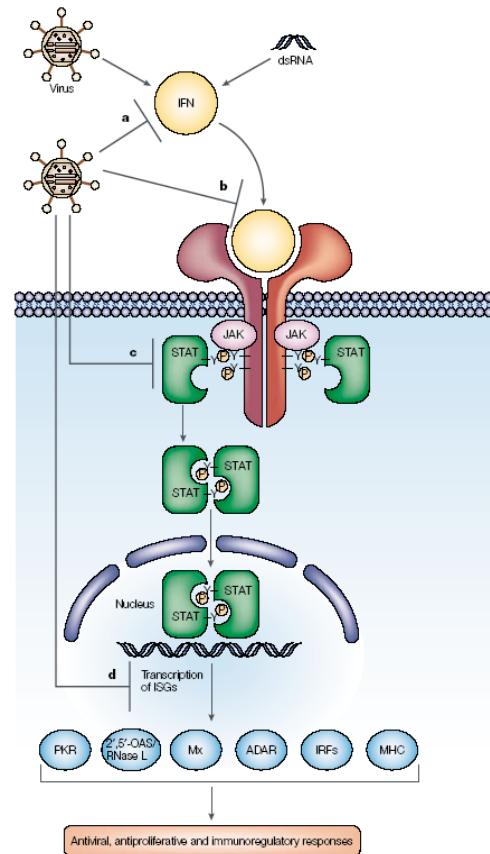


Abb. 7: Übersicht über den IFN-Signalweg. dsRNA führt zur Induktion von IFN- α/β , das spezifisch an einen zellulären Rezeptor bindet und über den Jak-STAT-Signaltransduktionsweg IFN stimulierbare Gene aktiviert [3].

PKR phosphoryliert außer I κ B auch die α Untereinheit des eukaryotischen Translations Initiations Faktor 2 (eIF-2). Dadurch wird ein wichtiger Schritt der mRNA Translation gehemmt. GTP-gebundenes eIF-2 bindet zusammen mit der 40S RNA Untereinheit die Met-tRNA. Durch Phosphorylierung von eIF-2 α wird der Austausch von GDP zu GTP in der eIF-2B Untereinheit von eIF-2 verhindert. Dadurch verhindert aktivierte PKR die mRNA-Translation von viralen wie auch zellulären Proteinen [59]. Die OAS katalysiert die Synthese von 2'-5' Oligo Adenylic Säure (2'-5' A) aus ATP und wird ebenfalls durch IFN- α induziert. Die Bindung von 2'-5' A an RNaseL führt zur Dimerisierung und damit zur Aktivierung der RNaseL. Virale wie auch zelluläre ssRNA wird durch RNaseL gespalten, wodurch die Translation inhibiert wird und es auch zum Abbau viraler Genome kommt. Die RNaseL reguliert hierdurch auch eine übermäßige Expression antiviraler Gene, da deren mRNA ebenfalls degradiert wird. IFN- α/β induzierte Mx Proteine sind GTPasen, die mit der Aktivität viraler Polymerasen interferieren. Die in Wirbeltieren hochkonservierten Mx-Proteine inhibieren die Replikation einer Vielzahl von RNA-Viren, aber der genaue Mechanismus konnte noch nicht aufgeklärt werden. Die IFN-induzierte ADAR (iADAR) bindet dsRNA und desaminiert Adenosin zu Inosin im Zytoplasma. Dies kann zu Mutationen im viralen Genom von RNA-Viren führen und zur Anreicherung von Inosin in der RNA. Da Inosin mit Cytidin paart, kann die A \rightarrow I Desaminierung im viralen Genom zu Änderungen der Kodons führen. Inosinhaltige RNA wird durch RNasen degradiert, die spezifisch stark inosinhaltige RNA erkennen [60, 61]. Ob und inwieweit die iADAR eine Rolle in der Immunabwehr spielt, ist aber noch ungeklärt. Eine weitere wichtige Funktion des IFN- α -Signalweges ist die Hochregulation der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) Klasse-1-Expression. MHC-Klasse-1 präsentiert zelluläre wie auch virale Peptide auf der Oberfläche von Zellen. Dadurch können infizierte Zellen durch spezifische zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert werden. Die durch IFN- α erhöhte MHC-Klasse-1-Expression von uninfizierten Zellen bietet Schutz vor der Lyse durch NK-Zellen, welche spezifisch Zellen erkennen, die wenig MHC-Klasse-1 auf ihrer Oberfläche präsentieren. Manche Viren, wie z.B. Adenoviren, HIV und das humanen Cytomegalie-Virus, inhibieren die Expression oder die Präsentation von MHC-Klasse-1, um die Erkennung durch CTL zu verhindern [62].

IFN- α/β führt auch zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen. Der Mechanismus der zur Apoptose führt, ist nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch die Induktion von „Apoptose“-Rezeptoren wie TNF- α „related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) und Fas/FasL sowie der Rekrutierung der Fas „associated death domain“ (FADD). PKR, RNaseL sowie OAS spielen bei der Apoptose-Induktion auch eine entscheidende Rolle, wie „knockout“ Maus-Studien gezeigt haben. Durch die Apoptose infizierter Zellen wird die Virusreplikation effektiv eingeschränkt, auf Kosten der einzelnen infizierten Zelle, aber zum Wohle des Wirtes [63].

Die Bedeutung der antiviralen Gene und insbesondere der PKR für die Verhinderung und Eindämmung viraler Infektionen erkennt man an der Tatsache, dass fast jedes der beschriebenen antiviralen Proteine durch Viren gehemmt wird. Vaccinia Virus exprimiert zum Beispiel zwei Gene, E3L und K3L, die die PKR auf zwei verschiedenen Wegen hemmen. E3L bindet an die eIF-2 α Bindungstasche der PKR, wodurch die Bindung von eIF-2 α verhindert wird. Des Weiteren inhibiert E3L den OAS-RNaseL-Weg. K3L ist ein eIF-2 α -Homolog und bildet ein Pseudosubstrat, wodurch zusätzlich die Inaktivierung von eIF-2 durch PKR gestört wird [64]. Auch andere Viren haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um die angeborene Immunantwort zu umgehen [59, 62, 64].

3.2. RNA-abhängige Adenosin Desaminasen

3.2.1. RNA-Editierung durch die ADAR

Die ADAR gehört wie die PKR zur Familie der dsRNA-bindenden Proteine und katalysiert die Desaminierung des C6 von Adenosin (Abb. 8) zu Inosin. In der Desaminase-Domäne chelatisiert dabei ein katalytisches Zn²⁺ und die ADAR-1 bildet nach der dsRNA-Bindung einen Homodimer aus [65]. Die Desaminierung von Adenosin in mRNA kann zu einer Kodonänderung führen, da Inosin wie Guanosen mit Cytidin paart. Durch die RNA-Editierung wird der Informationsfluss vom Gen zum Protein moduliert. Wird RNA von RNA-Viren oder Retroviren editiert, kann die Mutation bei der Replikation auch im Genom der Viren fixiert werden.

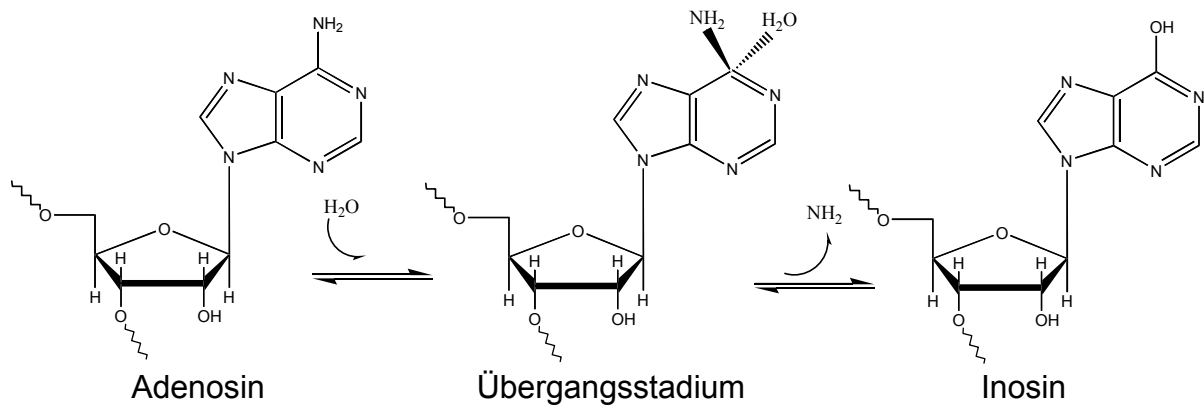


Abb. 8: Die katalytische Desaminierung von Adenosin durch die ADAR. Das H_2O Molekül greift nukleophil über den Sauerstoff am C6 des Adenosins an und es kommt zu einem Übergangsstadium, das im Inosin und der Freisetzung von NH_3 mündet.

In Wirbeltieren existieren drei verschiedene ADAR-Isoformen mit unterschiedlicher Spezifität. ADAR-1 und ADAR-2 kommen in allen Geweben ubiquitär vor, aber die Expression ist im Gehirn am höchsten und in der Skelettmuskulatur am geringsten [66]. Die ADAR-3 wird hingegen nur in bestimmten Regionen im Gehirn exprimiert und hat auch keine nachweisbare enzymatische Aktivität [67] (Abb. 9).

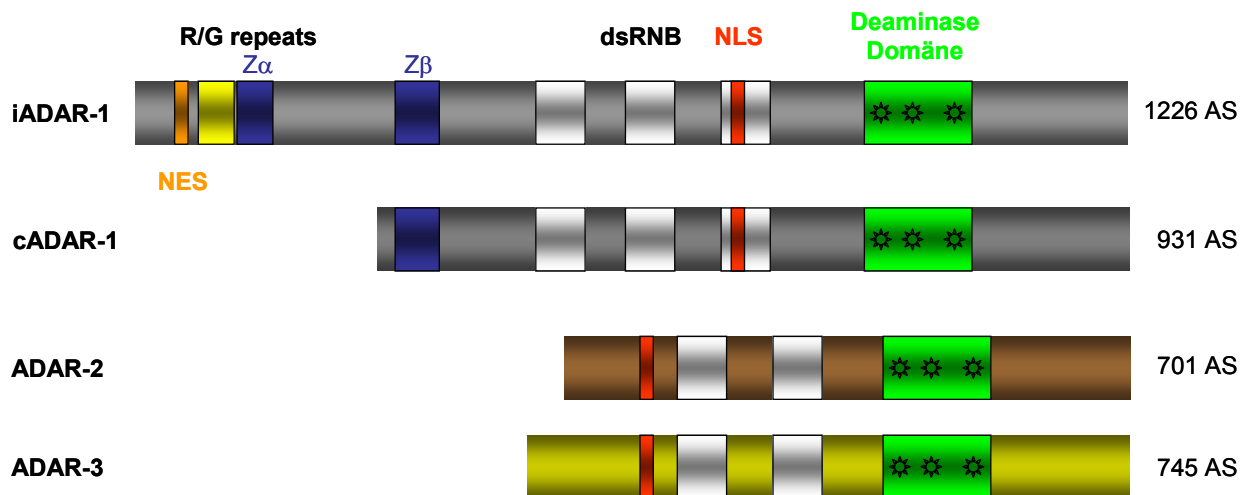


Abb. 9: Schematisches Diagramm der funktionellen Domänen der ADA-Isoformen. R/G repeats bezeichnet eine an Arginin-Glycin reiche Region, NES steht für ein nukleäres Export-Signal und $Z\alpha$ sowie $Z\beta$ sind zwei Z-DNA-Bindungsdomänen. dsRNB sind die drei doppelsträngigen RNA-Bindungsdomänen, worin eine nukleäre Import-Sequenz (NLS) eingelagert ist, und eine Desaminase-Domäne, in der die Zink bindenden Domänen durch Sterne gekennzeichnet sind.

ADAR-1 bildet zwei Isoformen aus, eine kurze konstitutiv exprimierte mit 110 kD (cADAR-1) und eine längere IFN induzierbare mit 150 kD (iADAR-1). Alle ADAR-Isoformen besitzen die Desaminase-Domäne mit den drei Zn^{2+} -Bindungsstellen. Eine homologe katalytische Domäne findet sich auch im ersten RNA editierenden Enzym, das entdeckt wurde, der Apo-B-mRNA editierende Cytidin Desaminase (APOBEC 1) [68, 69].

Die dsRNA Bindungsdomänen (dsRNB) vermitteln die spezifische Bindung an dsRNA, wobei die Spezifität der ADAR Isoformen eher auf der Struktur der dsRNA als auf der RNA-Sequenz beruht [70]. Sowohl die ADAR-1 als auch die ADAR-2 editieren *in vitro* bevorzugt Adenosine, die als 5'-Nachbarn Adenosin oder Uridin aufweisen. Adenosine mit Cytidin oder Guanodin als 5'-Nachbar werden weniger bevorzugt von der ADAR-1 und -2 editiert. ADAR-2 zeigt zusätzlich eine Bevorzugung von Uridin und Guanodin als 3'-Nachbar des editierten Adenosins [71, 72]. Die Z-DNA Bindungsdomänen der ADAR-1 sind vermutlich für die Kopplung der RNA-Transkription mit der RNA-Editierung verantwortlich [73]. Die linksgängige Z-DNA entsteht *in vivo* bei der Transkription induzierten negativen Superspiralisierung der DNA 5' vor oder hinter der sich bewegenden RNA-Polymerase. Die Funktion des an Arginin/Glycin reichen Bereiches ist noch unbekannt.

Natürliche Substrate der ADAR-1 und der ADAR-2 in Säugetieren finden sich hauptsächlich im Gehirn. Beide Enzyme sind z.B. an der Editierung von glutamatgesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren (GluRs) und Serotonin-Rezeptoren (5-HT_{2c}R) beteiligt. Die Effizienz der Editierung eines bestimmten Adenosins hängt von der Substratbindung an die unterschiedlichen dsRNB der zwei Isoformen ADAR-1 und -2 ab [74].

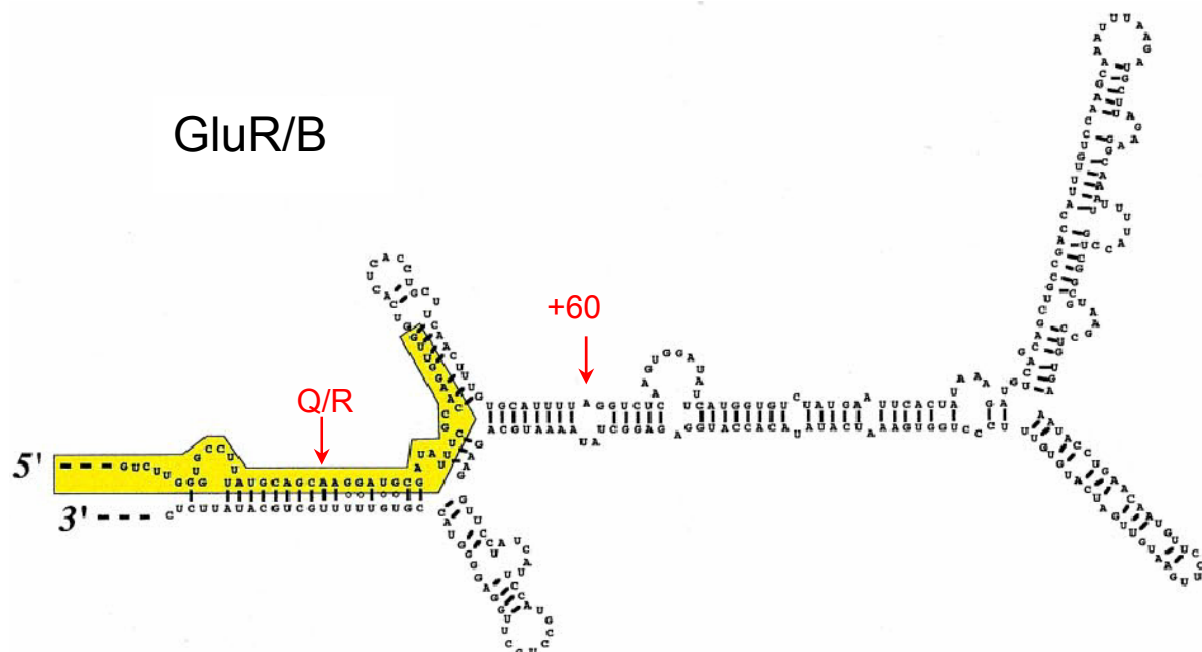


Abb. 10: Ausschnitt der GluR/B RNA. Das Exon 11 ist gelb unterlegt und im Intron befindet sich die mit einem roten Pfeil markierte +60 Editierungsstelle. Diese wird spezifisch von der iADAR-1 editiert, die Q/R-Stelle wird primär von der ADAR-2 editiert. (Adaptiert von [75])

Ein wichtiges Substrat für die ADAR-1 und -2 ist die GluR/B prä-mRNA. Im Intron der prä-mRNA für diesen Rezeptor befindet sich eine der Editierungsstelle komplementäre Sequenz (ECS). Die ECS faltet sich zurück zum Exon 11, paart mit diesem und es bilden sich kurze dsRNA-Bereiche, die spezifisch editiert werden [75]. Hierbei begrenzen RNA-Schleifen die dsRNA-Bereiche, die für die ADAR zugänglich sind. Die Editierung an der Q/R-Stelle durch ADAR-2 führt zur Änderung des Kodons CAG zu CIG, wodurch ein Arginin anstelle eines Glutamins translatiert wird. Diese Editierung ist lebensnotwendig, da sonst die normale Funktion des α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA) Rezeptors im Gehirn nicht gewährleistet ist. GluR/B ist eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors und durch die verschiedenen GluR-Untereinheiten wird die Ca^{2+} -Permeabilität des AMPA-Rezeptor Ionenkanals gesteuert.

In ADAR-2 „knockout“ Mäusen kommt es 13 Tage nach der Geburt zu epileptischen Anfällen und nach ca. drei Wochen sterben die Tiere. Der Epilepsie-Phänotyp der ADAR-2^{-/-} Tiere verliert sich durch Einkreuzen von Tieren, die bereits ein Kodon für Arginin an der Q/R-Stelle im GluR/B tragen [76].

ADAR-1 hingegen editiert die +60 Stelle sowie die R/G-Stelle in Exon13. Auch an der R/G Stelle bildet sich eine dsRNA zwischen dem Exon und der ECS des Introns aus. Durch die Editierung von Arginin zu Glycin wird die Erholungsdauer von der Desensibilisierung des AMPA-Rezeptors bestimmt [77]. ADAR-1 „knockout“ Mäuse sind im Gegensatz zu ADAR-2 „knockout“ Mäusen nicht überlebensfähig. Sie sterben bereits während der Embryogenese vor Tag 11,5 an einem Defekt in der Blutbildung in der Leber [78].

An diesen Beispielen wird die Relevanz der Modifikation des Leserahmens durch RNA-editierende Enzyme deutlich. Inzwischen sind durch Sequenzanalysen mehr als 12000 A→I Editierungsstellen gefunden worden [79]. Letztere befinden sich meist in nicht kodierenden Bereichen, typischerweise in „Alu repeats“. Dies führt während der Transkription zur Destabilisierung dsRNA-Bereiche, die dann nicht mehr komplett basengepaart sind.

3.2.2. Isoformen der ADAR-1

Die ADAR-1 wird, wie eben beschrieben, in zwei Isoformen exprimiert. Die Expression der 1226 Aminosäuren großen IFN-induzierbaren Isoform wird vom Promotor Pi-1A getrieben, der über ein IFN-stimulierbares Antwort-Element (ISRE) und eine Kinase-konservierte Sequenz (KCS) gesteuert wird [80]. Die Interaktion zwischen dem ISRE- und dem KCS-Motiv, die als eine Promotoreinheit agieren, konnte zuerst für die PKR gezeigt werden [81]. Die Expression der konstitutiven 931 Aminosäure-großen cADAR-1 wird durch drei Promotoren gesteuert, wobei der Promotor Pc-2 innerhalb des Exons 2 lokalisiert ist. Dadurch kommt es immer zu einer Koexpression von cADAR-1, wenn iADAR-1 exprimiert wird (Abb. 11) [82]. Diese drei Promotoren führen zu einer hohen basalen cADAR-1-Expression.

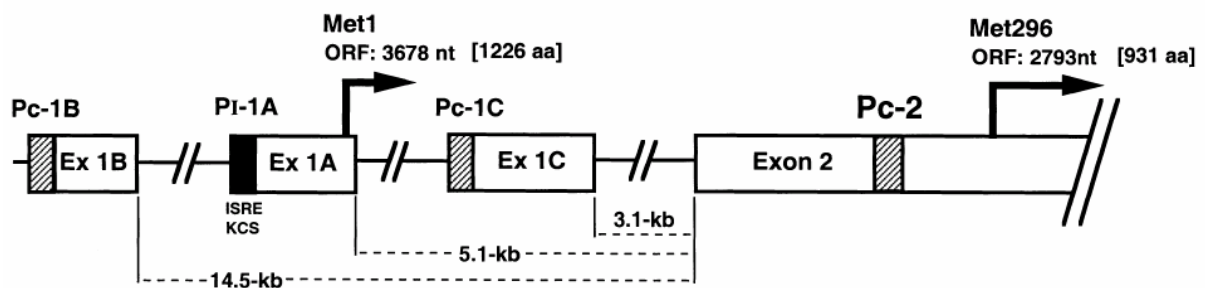


Abb. 11: Promotorbereich der ADAR-1. Die Promotoren für die cADAR1 sind jeweils in grau dargestellt, der für iADAR-1 in schwarz. (Modifiziert nach [82])

cADAR-1 kommt vornehmlich im Kern vor, während die IFN-induzierbare Isoform ins Zytoplasma wandert. Der Export der iADAR-1 aus dem Kern wird durch Bildung eines Komplexes mit den Proteinen CRM1 und RanGT, die an das NES der iADAR-1 binden, vermittelt [83]. ADAR-1 bildet drei natürliche „Splice“-Varianten: die eben beschriebene Form, eine um 26 Aminosäuren zwischen der dsRNB3 und der Desaminase-Domäne verkürzte Form und eine um 19 Aminosäuren zwischen der dsRNB2 und dsRNB3 verkürzte Form [84]. Die „Splice“-Varianten weisen eine etwas verschiedene editierende Aktivität auf und werden gewebsspezifisch exprimiert.

3.2.3. Die Editierung von viralen Substraten durch die ADAR-1

Außer zellulärer RNA könnte auch virale dsRNA als Substrat für die ADAR-1 dienen. Diese Annahme wird vor allem durch die IFN abhängige Expression der langen Form der ADAR-1 gestützt, da IFN- α bei vielen viralen Infektionen ausgeschüttet wird.

Bisher bekannt ist die Editierung des RNA-Antigenoms vom Hepatitis δ Virus (HDV) durch die ADAR-1 [85]. Dadurch wird bei der Replikation ein Stopp-Kodon zu einem Tryptophan mutiert, da die A \rightarrow I Transition an der Editierungsstelle zu einer mRNA mit U \rightarrow C Transition führt. Es kommt zur Translation eines 19 Aminosäure-längeren Proteins, dem HDAg-p27, das für die Verpackung von HDV benötigt wird. Dies ist die einzige spezifische Editierung eines viralen Genoms durch die kurze Form der ADAR-1 im Kern, die beschrieben ist [86]. Bei anderen Viren wurde allerdings ein A \rightarrow G bzw. U \rightarrow C Hypermutionsmuster beobachtet und dies wird auf die ADAR-1 zurückgeführt.

Das Matrix-Protein vom Masern Virus, einem Negativ-Strang-RNA-Virus aus der Gruppe der Paramyxoviren, zeigt in Patienten mit subakut sklerosierender Panenzephalitis (SSPE) eine hohe U \rightarrow C Mutationsrate [87, 88]. Die äußerst seltene SSPE führt 5-10 Jahre nach der Erstinfektion zum Tode. Einzelne Virusklone des Humanen Parainfluenza Virus 3 (HPIV3), einem weiteren Paramyxovirus, tragen in ihren 3' Enden ebenfalls einen hohen Anteil an U \rightarrow C oder A \rightarrow G Mutationen [89]. Diese Mutationen finden sich allerdings erst in Klonen, die in der persistenten Infektion isoliert wurden. Respiratory Syncytial Virus (RSV) ist wie Masern Virus und HPIV3 ein Paramyxovirus und auch hier treten A \rightarrow G Hypermution auf. Bei diesem Virus wurden A \rightarrow G Mutationen vorwiegend in der RNA des Glykoproteins von Antikörper „escape“ Varianten gefunden [90].

Auch im Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), einem weiteren Negativ-Strang-RNA-Virus aus der Gruppe der Rhabdoviridae, kommt es in der Persistenz zu Hypermutionen in Defekten Interferierenden (DI) Partikeln. Sowohl Partikel mit A \rightarrow G wie auch mit U \rightarrow C Mutationsmustern wurden gefunden [91].

Die Hypermutionen in diesen RNA-Viren treten alle in der persistenten Phase der Infektion auf und werden auf die Aktivität der ADAR zurückgeführt [4]. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen der ADAR und der viralen Hypermution bislang nicht bewiesen worden. Interessant hierbei ist jedoch, dass das E3L-Protein vom Vaccinia Virus die ADAR-1-Aktivität inhibiert.

Essentiell hierfür ist eine C-terminale dsRNB und eine Z-DNA-Bindungsdomäne von E3L [6]. Auch die Virus-assoziierte VAI-RNA des Adenovirus hemmt die Aktivität der ADAR-1 [5]. Viren haben also Mechanismen entwickelt, um die ADAR zu inhibieren, was die mögliche Funktion der ADAR in der Immunabwehr unterstreicht.

3.3. Zielsetzung der Arbeit

Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr gegenüber Viren könnte die IFN-abhängig-exprimierte lange Form der ADAR-1 sein. Die Rolle der ADAR-1 bei der Abwehr von viralen Infektionen soll mit dem Modellvirus LCMV aufgeklärt werden. Hierbei stellt sich die Frage: Werden durch die iADAR-1 A→G Hypermutationen in der viralen RNA von LCMV induziert? Exemplarisch wird hierfür der GP-Bereich der LCMV-RNA analysiert und untersucht, ob Mutationen im GP für die verringerte GP-Oberflächenexpression in der späten Phase der LCMV-Infektion verantwortlich sind. Hierbei wird auch die Auswirkung der mutagenen Aktivität der iADAR-1 auf die Replikation untersucht. Ferner soll ermittelt werden, inwieweit die iADAR-1-Expression außer durch IFN- α ebenfalls durch eine virale Infektion selbst hochreguliert wird.

Um den Einfluss von Mutationen auf die GP-Oberflächenexpression zu klären, wird zuerst das GP zu einem späten Zeitpunkt der Infektion sowohl in Mäusen als auch in der Zellkultur charakterisiert. Untersucht werden Mutationen in der mRNA, korrekte Proteinexpression und die Funktionalität des GP. Insbesondere soll ermittelt werden, ob ein A→G (U→C) Hypermutationsmuster vorliegt, das auf die Aktivität der iADAR-1 hinweist.

Eine Voraussetzung für die Aktivität der iADAR-1 ist die Induktion dieser bei der Infektion von Zellen und Mäusen mit LCMV. Die Hochregulierung der iADAR-1 wird auf mRNA-Ebene durch eine qPCR und auf Proteinebene im Western Blot nachgewiesen. Da verschiedene Viren die ADAR-1-Aktivität inhibieren, soll auch die Aktivität der iADAR-1 bei der Infektion mit LCMV bestimmt werden. Hierfür muss ein geeignetes Messsystem entwickelt werden.

Um gezielt die Auswirkungen der iADAR-1-Expression auf LCMV zu untersuchen, werden zwei Systeme eingesetzt. Hiermit soll direkt gezeigt werden, dass die iADAR-1 das virale Genom editiert und die Replikation inhibiert.

Zum einen wird die iADAR-1 in Zellen überexprimiert. Damit wird der Einfluss der iADAR-1 auf die Mutationshäufigkeit, die GP-Oberflächenexpression und die Bildung von infektiösen Virionen untersucht. Zum anderen werden ADAR-1 „knockout“ Zellen aus Embryonen isoliert und können dann in vergleichenden Untersuchungen mit wt Zellen eingesetzt werden. Hierbei werden wieder die Parameter Mutationsfrequenz, GP-Oberflächenexpression und die Bildung von infektiösem Virus untersucht. Mit den ADAR-1 „knockout“ Zellen kann ausgeschlossen werden, dass die virale Polymerase für die A→G Mutationen verantwortlich ist.

Durch diese Analysen soll die generelle Bedeutung der iADAR-1 in der Immunabwehr gegenüber Viren anhand von LCMV besser charakterisiert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Bestandteile der Nährmedien und Agar zur Anzucht von Bakterien wurden von Difco (Augsburg) und Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Es wurden Plastikwaren und Filtersysteme von BD (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Costar (Bodenheim), Sarstedt (Nürnbrecht), und Millipore (Eschborn) verwendet. Medien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur wurden von BioWhittaker (Verviers, Belgien) oder Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Für die PCR wurden Oligonucleotide von MWG Biotech GmbH (Ebersberg) und Thermo Hybaid (Ulm) verwendet. Molekulargewichtsmarker und DNA-Restriktionsenzyme sowie deren Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) geliefert.

4.1.2. Puffer und Lösungen

Lösungen und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Puffer und Nährmedien wurden für 20 Min bei 121°C und 2 bar sterilisiert, bei Hitzeinstabilität steril filtriert oder bereits steril bezogen.

Tabelle 1: Häufig verwendete Puffer und Lösungen (Lagerung bei RT, soweit nicht anders angegeben)

Name	Zusammensetzung
10 x TBE	Tris 540 g, Borsäure 270 g, EDTA (0.5 M) 200ml, mit dH ₂ O auf 5000 ml auffüllen Einstellen des pH auf 8.0
50 x TAE	Tris 1220 g, Essigsäure 285.5 g, EDTA (0.5 M) 500ml, mit dH ₂ O auf 5000 ml auffüllen Einstellen des pH auf 8.0
Ammoniumpersulfat (APS), 10%	10 g APS mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung bei -20°C
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in Wasser, Lagerung bei -20°C
Dithiothreitol (DDT)	771 mg DDT mit dH ₂ O auf 5 ml auffüllen Lagerung bei -20°C
DNA-Ladepuffer	0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylene, 15% Ficoll Typ 400 in 20 ml Wasser
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid in Aqua dest.
Glycerol, 40%	40 ml Glycerol mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
HEPES, 200 mM	23,83 g HEPES mit 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen mit dH ₂ O auf 500 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
Kanamycin	60 mg/ml in sterilem Wasser, Lagerung bei -20°C
LB-Ampicillin für Platten	10 g Trypton /Peton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar-Agar mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen pH 7.0 mit 5 M NaOH und autoklaviert hinzufügen von 40 mg/ml Ampicillin kurz vor Gießen der Platten
LB-Medium	10 g Trypton / Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen und autoklaviert
MPBST, 2.5%	5% MPBST mit PBST 1:2 verdünnen

Name	Zusammensetzung
MPBST, 5%	5 g Milchpulver 10 ml 10x PBS 100 µl Tween-20 mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung kurzzeitig bei 4°C möglich
Na ₂ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O, 100 mM	4,46 g Na ₂ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
NaCl, 5 M	29,224 g NaCl mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
NaF, 500 mM	2,9224 g NaF mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%	25 g SDS mit dH ₂ O auf 250 ml auffüllen
Natriumvanadat, 10 mM	0,0828 g Natriumvanadat mit dH ₂ O auf 45 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
PBS, 1 x / NaN ₃ , 0,02%	2 µg NaN ₃ mit 10 ml 1 x PBS auffüllen
PBST, 1 x	10 ml 10x PBS 100 µl Tween-20 mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen
Pefabloc [®] SC, 100 mM	0,12 g Pefabloc mit dH ₂ O auf 5 ml auffüllen Lagerung bei -20°C
Sammelgelpuffer	30,25 g Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen mit dH ₂ O auf 500 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
Stripping Puffer	62 mM Tris-HCl 2% SDS 100 mM 2-Mercaptoethanol
SDS-Ladungspuffer, 6 x	60% (v/v) Glycerin 18% (w/v) SDS 0,3% (v/v) Bromphenolblau 600 mM Tris-HCl 12% (v/v) β-SH-Ethanol
TE	Tris (pH 8) 10mM, EDTA (pH 8) 1 mM in deionisiertem Wasser
Trenngelpuffer	91 g Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen mit dH ₂ O auf 500 ml auffüllen Lagerung bei 4°C

Name	Zusammensetzung
Triton X-100, 20%	10 ml Triton X-100 50 ml dH ₂ O zugeben Lagerung bei 4°C
Westernblot-Transferpuffer	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) 10x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer Lagerung bei 4°C
1 x PBS	BioWhittaker, Verviers, Belgien
25 mM Chloroquin	Sterilfiltriert
DMEM	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
DMEM supplementiert (Kulturmedium)	DMEM 10% FCS 5% Glutamin 1% Pen/Strep
FACS-Puffer	RPMI 1640 ohne Phenolrot 1% (v/v) FCS
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, South America
Glutamin-Lösung	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Trypanblau (4 x Stammlösung)	Invitrogen, Eggenstein
0,25% Trypsin/1 mM EDTA-Lösung	Invitrogen, Eggenstein

4.1.3. Verwendete Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Kit	Firma
JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit	Genomed, Löhne
JETquick Plasmid miniprep Spin Kit	Genomed, Löhne
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Genomed, Löhne
Jetquick Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Niederlande
ECL Western Blot Detection Kit	Amersham Bioscience, England
ECL-Plus Western Blot Kit	Amersham Bioscience, England
Rneasy-Kit zur RNA-Isolierung	Qiagen, Hilden
Anti Human IFN- α ELISA	Biozol, Eiching
Anti Maus IFN- α ELISA	PBL Biomedical, USA
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transfectin	BioRad, München
Calcium Phosphat Transfektion Kit	Sigma, Deisenhofen
EZNA Cycle Pure Kit	peqLab Biotechnologie, Erlangen
Zero Blunt TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.4. Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Primer-Sequenz in 5'→3' Richtung
mDRA127	CCTGCACATGCCGTGATCAGC
mDRA128	GGGTGGACAAGTACCACCTG
PGKterm5	TAGATCTATAGATCTCTCGTGGGATC
mGapDH_up	CATGGCCTTCCGTGTTCTA
mGapDH_low	GCGGCACGTCAGATCCA
mPKR up1	ATTGGCTTAGGTGGATTTGGTCA
mPKR low1	GTGCTCCGCCTTCTCCGTGTTAT
mADAR up1	AGCCCCCTGGAGTTGTGAATC
mADAR low1	GGAGTTGCCCTTGCCCTGTAGAC
hADAR up1	AATGCCTCGCGGGCGCAATGAATC
hADAR low1	GACTTCCGAGATGCACG
GapDH up	GATGACATCAAGAAGGTGGTG
GapDH low	GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC
S-RNA up 6	CGGGGATCCTAGGCTTTTTGG
S-RNA up 5	CAAGGTGCCTGGTGTAAAACTAT
S-RNA low4	ATGAACCGCCCTTTATGTGTC
S-RNA up 29	TGCGCTTTCCTTTAGGACAACTGG
S-RNA low 861	GGTGAATGTGCCTGAAAGTCTCCT
B13 for	CCTAGGAGATCTGGATGTGCATTG
B13 rev	CCTAGGTCTAGATATGTGTGATC
Del. ADAR mut up	CTGTCAATGACTGCCAAGCAGGAAATAATCTCCCGGAG
Del. ADAR mut low	CTCCGGGAGATTATTTCTGCATGGCAGTCATTGACAG
Adarup	ATGGAAAGGCAGGGGGATGTCT
Adarlow	ATGTGATGAGGAATGCTACGA
Adarmidup	GCTCCCATGGCTTTGCTGCTGAAT
Adarmidlow	GCGACCCCAACTTTTGCTTGGTA
Piup	GATATCGCGGGCGCAATGAATCC
Pc-upper	GATATCCTTGAGTTTTTAGACAT
PcPi-lower	CCTCTCTCGCTTCTTGTCTGTC
Adar1-low/sbf1	CCTGCAGGAGCATACTATACTGGGCAGAGATA
Adup638-660	GGGGAAGGGAAGGCCACACAGC
Adup1621-1640	GATGCCCTCCTTCTACAG
Adup2073-2096	CCTGCGAATTCGTCTCCTGTCCA
Adup2838-2861	TCGTCAGCTTGGGAACAGGGAATC
Adup3798-3220	TGGAGAACGGAGAAGGCACAATC
Adlow3412-3433	ACAGCAAATAGCACGGGTCAGA
Adlow2976-2996	CCTTCGCAGTCTGGGAGTTGT
Adlow2090-2109	GCAGGGCCTTCTTTGGACAG
Adlow1520-1543	GCCATTTTCAAAGTCAACATACCC
Adlow743-765	GGGGGTGTTCTGCTCTTTCTG
GFP NotI up	CTGAAAATTAGCTCGACAAAGTTA
GFP SacII low	GCCGCGGATTCATCATGTGGTGGTGGTGGG
hADAR up HAtag	AAGATTGGCGAGCTCGTGAGATACCT
hADAR low HAtag	GCCCCCCTGCAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG TATACTGGGCAGAGATAAAAAG

4.1.5. Enzyme

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzyme	Hersteller
DNA Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	BD, Heidelberg
DNA-Ligase & 10 X Ligasepuffer	New England Biolabs
Klenow-Fragment von <i>E.coli</i> DNA-Polymerase	Fermentas, Heidelberg
Reverse Transkriptase, Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München
T4-Polynucleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Alkalische Shrimp Phosphatase & 10X Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach

4.1.6. Antikörper

Primäre Antikörper		Hersteller/Referenz	Verdünnung
Maus α -LCMV GP-1 (Klon 25)		Bruns et al.	1:10
Ratte α -HA-(YPYDVPDYA) (Klon 3F10)		Roche, Petersberg	1:1000
<i>PolyFast</i> Kaninchen α -ADAR1		Zytomed, Berlin	1:1000
Kaninchen α -PLC- γ		BD Pharmingen, Heidelberg	1:500
Sekundäre Antikörper	Markierung	Hersteller	
Ziege α -Kaninchen IgG	HRPO	Dianova,	1:10000
Ziege α -Ratte IgG	HRPO	Jackson, USA	1:10000
Ziege α -Maus IgG (H+L)	R-Phycoerythrin	Caltag, USA	1:20
Ziege α -Maus IgG (H+L)	APC	Caltag, USA	1:20

4.1.7. Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Vektoren (Plasmidkarten siehe Anhang 8.3)

Name	Verwendungszweck	Referenz
M23	Klonierungsplasmid pBluescript für Umklonierungen und Insertion von phosphorylierten PCR-Produkten	Stratagene, Heidelberg
M56a	Retroviraler Vektor mit dem optimierten MP71-Leader und dem Markergen GFP	[92]
M57	Helferplasmid zur Expression von <i>gag-pol</i> für die Produktion retroviraler Partikel	[33, 92]
M108	Expressionsplasmid für LCMV-GP WE (HPI)	[93]
M109	Expressionsplasmid für LCMV-GP:HA WE (HPI)	[33]
M243	Expressionsplasmid mit EF1- α Promotor und einer Puromycin Resistenz	Winfried Beyer
M267	pcDNA 3.1; Expressionsplasmid mit MCS, CMV-Promotor und Neomycin Resistenzgen	Invitrogen, Karlsruhe
M288	Expressionsplasmid mit einer MCS, β -Globin Intron und CMV-Promotor	Tsanan Girolglou
M318	Retroviraler Vektor zur Expression des Fusionsproteins eGFP:SV40	[94]
M430	LCMV-GP-HA in pBluescript M23	Yvonne Fischer
pCR2.1-TOPO	Sequenzier- und Klonierungsvektor für PCR Produkte, die mit TAQ-Polymerase amplifiziert wurden.	Invitrogen, Karlsruhe
pCR-Blunt II-TOPO	Sequenzier- und Klonierungsvektor für PCR Produkte, die mit PFX-Polymerase amplifiziert wurden.	Invitrogen, Karlsruhe
pDSRed2-Nuc	Expressionsvektor für nukleär lokalisiertes RFP	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Tabelle 6: Klonierte Plasmide (Plasmidkarten siehe Anhang 8.3)

Name	Verwendungszweck	Klonierungsstrategie
M198	iADAR Zwischenklonierung in M198	PCR mit den Primern Piup und Adar1-low/sbf1 aus cDNA von HeLa-Zellen und Klonierung der iADAR in pCR2.1-TOPO.
M243-HA	Expressionsplasmid für LCMV-GP:HA zur Klonierung der	Umklonierung des LCMV-GP:HA aus M430 in M243 unter Verwendung der Schnittstellen SpeI und EcoRV

Name	Verwendungszweck	Klonierungsstrategie
M265	mutierten LCMV-GP-Klone aus Mäusen Retrovirales B13 Expressionsplasmid mit MP1 Leader und eGFP als Kontrollgen	PCR von b13 Plasmid [95] mit den Primern B13 for/rev und Zwischenklonierung in M23. Spaltung mit AvrII und Klonierung in einen MP1-eGFP Vektor [92].
M273	Expressionsplasmid für iADAR unter Kontrolle des CMV Promotors, basierend auf M267	Klonierung von iADAR aus M198 über NotI/Spel in M267 (pcDNA3.1, geschnitten mit NotI/XbaI).
M280	Expressionsplasmid für iADAR:HA unter Kontrolle des CMV Promotors, basierend auf M273	PCR von M198 mit den Primern ADAR up/low HA-tag. Spaltung mit Sall/SbfI und Reklonierung in M198. Klonierung über NotI/Spel in M267 (pcDNA3.1, geschnitten mit NotI/XbaI).
M291	Expressionsplasmid für del. iADAR unter Kontrolle des CMV Promotors, basierend auf M273	Quickchange von iADAR in M198 mit den Primern Del. ADAR mut up/low. Klonierung in M273 über BspEI/SbfI.
M350	Expressionsplasmid für eGFP:iADAR unter Kontrolle des CMV Promotors, basierend auf M267 und M56a	PCR von M56a mit den Primern GFP NotI up/SacII low. Klonierung in M280 über NotI, SacII
M432	B13 Minigen mit Guanosin an der +60 Stelle in pCR2.1-TOPO	PCR von cDNA isoliert aus M265 transfizierten SH-SY5Y. Klonierung in pCR2.1-TOPO und Selektion eines Klons mit Guanosin an +60 Stelle.
M482	Expressionsplasmid für LCMV-GP:HA mit optimierter MCS zur Klonierung der mutierten LCMV-GP-Klone aus L929-Zellen	Klonierung von LCMV-GP (HPI):HA aus M109 über BamHI in M288.

4.1.8. Bakterien

Als Wirtstamm für molekularbiologische Arbeiten wurden *Escherichia coli*-Stämme TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) oder XL1-blue von Stratagene (Heidelberg) verwendet.

Tabelle 7: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-blue	F ⁻ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>SupE44 hasdR17 recA1 endA1 deoR gyrA96 thi-1 relA lac</i> ⁻	Stratagene, Heidelberg

4.1.9. Viren

Alle Infektionen wurden mit dem LCMV-Stamm WE(HPI) [33] durchgeführt.

4.1.10. Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz/ ATCC- Nummer	Medium
Anjou65	Humane Nierenepithelzellen, 293T-Zellen stabil mit MLV gag-pol transfiziert	[96] CRL-11269	DMEM-Standard
293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen mit dem inserierten T-Antigen von SV40	[97] CRL-11268	DMEM-Standard
L929	Murine Fibroblastenzelllinie	[98] CCL-1	DMEM-Standard
SH-SY5Y	Humane Neuroblastom-Zelllinie	[99] CRL-2266	20% FCS; DMEM-Standard
293	Humane embryonale Nierenepithelzellen	[100] CRL-1573	DMEM-Standard
TE671	Humane rhabdomyosarcoma Zelllinie	[101] CRL-8805	DMEM-Standard
MEF	Murine embryonale Fibroblasten; isoliert aus C57Bl/6 Mäuseembryonen	[102]	DMEM-Standard

4.1.11. Mausstämme

Für die LCMV-Infektionsversuche wurden C57BL/6 Mäuse von Charles River wiga (Sulzfeld) eingesetzt. Die Isolierung der MEF erfolgte aus heterozygoten $\Delta 2-13$ ADAR C57Bl/6 Mäusen [78], die von Miyoko Higuchi aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. Die Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) gehalten.

4.1.12. Geräte

Tabelle 9: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern, Albstadt
Autoklav HST 4-5-6 E	Zirbus Technology, Bad Grund
Aussschwingzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank Cytoperm für die Zellkultur	Heraeus, Hanau
DNA-Elektrophoreseapparatur	BioRad, München
DNA-Sequenzierung: 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Zellzählgerät, Casy TT	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer: FACSCalibur & Software CellQuestPro	BD, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Heizblock DRI-BLOCK DB 2D	Techne, England
Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20	Beckman, München
Kühlzentrifuge Rottina 48R	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop	Leica, Bensheim
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter Mettler Toledo MP 220	Mettler, Gießen
Photometer SmartSpec™ 3000	BioRad, München
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	Schroeder und Henke, Wiesloch
Schüttelinkubator	Heraeus, Hanau
Rotorstator Homogenisator T 25 basic	IKA Werke, Staufen
Rührer RCT Basic	IKA, Staufen
SDS-PAGE-und Westernblot-Apparatur für Proteingele, mini Protean II	BioRad, München

Gerät	Hersteller
Spannungsquelle Power Pac 1000	BioRad, München
iCycler	BioRad, München
Schüttler TH25	Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank für Zellkulturen HERAsafe HS12	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
UV-Transilluminator GelDoc 2000	BioRad, München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel

4.1.13. Verbrauchsmaterialien

Labormaterialien	Hersteller
6-Loch-Platten 24-Loch-Platten 96-Loch-Platten	Costar, Corning NY, USA
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
ELISA-96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Filtereinheiten (Ø 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Kanülen	Becton-Dickson, Heidelberg
Kulturflaschen	Becton-Dickson, Heidelberg
Kulturplatten (6-, 24-Loch)	Costar, Corning, NY, USA
Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten	DrakeMedox, Vancouver, Kanada
2 ml Pipetten 5 ml Pipetten 10 ml Pipetten	Costar, Corning, NY, USA
10 µl Pipettenspitzen 200 µl Pipettenspitzen 1000 µl Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
14 ml Reaktionsröhrchen 15 ml Reaktionsröhrchen 50 ml Reaktionsröhrchen	BD Falcon, Heidelberg
0,2 ml Reaktionsgefäße 1,5 ml Reaktionsgefäße 2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
10 µl Safetytips 200 µl Safetytips 1000 µl Safetytips	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
1 ml Spritzen 5 ml Spritzen 10 ml Spritzen	Medox (Codan/Dahlhausen/Omnifix)
Zählkammern	Braur Melsungen, Melsungen

4.2. Methoden

4.2.1. Gentechnische Methoden

4.2.1.1. Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

Plasmidtragende *Escherichia coli*-Stämme wurden in mit 100 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Selektivmedium kultiviert. Einzelkolonien wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit LB-Agar-Medium und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erhalten. Zur Konservierung konnten die Platten bei 4 °C gelagert werden und waren für mehrere Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendbar.

Flüssigkulturen wurden zur dauerhaften Konservierung über Nacht geschüttelt und jeweils 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Wasser mit 7 % DMSO gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Identifizierung neuer Transformanden oder für Umklonierungen erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab aus einer 2 ml-Übernachtskultur. Das verwendete JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit von Genomed ergab dabei in der Regel eine Ausbeute von je 10-20 µg Mini-Präparation. Für die Isolierung im präparativen Maßstab wurde eine 50 bzw. 250 ml-Übernachtskultur angesetzt und die DNA mit dem Jetstar Plasmid Midi Kit von Genomed oder dem QIAprep Plasmid Maxi Kit von QIAGEN erhalten. Beim Midi Kit betragen die DNA-Ausbeuten zwischen 100 und 500 µg, beim Maxi Kit 500-1000 µg. Die Plasmid-DNA-Lösungen wurden zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

4.2.1.3. **Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Bei der Neukonstruktion oder Testung von Plasmiden wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen gespalten. Dabei wurde in der Regel das Puffersystem der Firma New England Biolabs verwendet, das auf den Angaben von Sambrook et al. [103] basiert. Die Auswahl des geeigneten Puffers erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

Etwa 0.5 µg Plasmid-DNA wurden zur Restriktionsanalyse eingesetzt, im präparativen Maßstab bis zu 5 µg. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl, wobei 5 Units der Restriktionsendonuclease eingesetzt wurden. Die Puffer wurden als zehnfach konzentrierte Lösungen hinzugefügt und die Inkubationszeit betrug je nach Enzymkombination und Verwendungszweck zwischen 1 und 12 Stunden. Bei Bedarf wurden die erhaltenen Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert oder für den Einsatz in Ligationen das Restriktionsenzym bei 65 °C hitzeinaktiviert.

4.2.1.4. **Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA-Enden**

Zur Eliminierung von 5'-Phosphatresten an DNA-Fragmenten oder Plasmiden, die nur mit einem Enzym an mehreren Stellen geschnitten worden sind, wurde der Restriktionsverdau mit Wasser, 10 X Phosphatase-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und mit Shrimp Alkalische Phosphatase 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde bei 65 °C für 20 min hitzeinaktiviert. Die so erhaltene DNA konnte sofort für Ligationsreaktionen eingesetzt werden. Alternativ wurde die „Calf-Intestinal-Phosphatase“ (CIP) verwendet, wobei die behandelte DNA anschließend mit dem EZNA Pure Kit oder mittels Gelelektrophorese aufgereinigt werden musste, da das Enzym nicht hitzeinaktivierbar ist.

4.2.1.5. **Phosphorylierung von DNA**

Zur Vorbereitung der Ligationen von neuen PCR-Produkten mit dephosphorylierten Plasmiden wurde das Amplifikat oder andere DNA-Fragmente am 5'-Ende mit T4-Polynucleotidkinase behandelt. Dazu wurde die DNA mit 10 X Kinasepuffer und 5 Units T4 Polynucleotidkinase 1 Stunde inkubiert und bei 65 °C für 20 min hitzeinaktiviert. Die so erhaltene DNA konnte danach sofort für die Ligation eingesetzt werden.

4.2.1.6. **Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow-Polymerase**

Die nach Behandlung mit Restriktionsenzymen entstandenen überhängenden Einzelstrang-Enden wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase in glatte Enden überführt. Dazu wurde 1 Unit des Enzyms DNA Klenow-Polymerase in der vom Hersteller mitgeliefertem 10 X Puffer, 1 µl dNTP-Mix (je 1 mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) mit 1 µg DNA vereinigt. Der Ansatz wurde für 15 Min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Klenow-Polymerase wurde für 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert und die DNA konnte anschließend für die weitere Klonierung verwendet werden.

4.2.1.7. **Gelelektrophorese von DNA**

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen mit TBE oder TAE als Laufpuffer. Standardmäßig wurden dabei 1 %ige Agarosegele eingesetzt. Sind die zu untersuchenden Fragmente kleiner als 500 Basenpaare, so wurden höherprozentige Gele mit bis zu 2 % Agarose eingesetzt. Waren die Fragmente deutlich größer, so wurden 0.5-0.8 %ige Gele verwendet. Die gewünschte Menge an Agarose wurde mit TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Dann wurde 1/1000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1 % w/v in Wasser) zugegeben und die Flüssigkeit in die Gelkammer mit einem Geltaschenformer gegossen. Nach Erstarrung des Agarose-Gels wurde der Geltaschenformer entfernt und das Gel in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Die Proben wurden mit 6 X DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Jede Geltasche wurde üblicherweise mit maximal 20 µl DNA-Lösung beladen. Als Größenmarker wurden 0.5 µg 100-Basenpaarmarker oder 1-kb-Marker verwendet (New England Biolabs). Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 100 Volt für die Dauer von 20 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Sofern erforderlich wurden entsprechende Fragmente zur Gelisolierung mit einem Skalpell herausgeschnitten und isoliert (siehe 4.2.1.8).

4.2.1.8. **Isolierung von DNA aus Gelen**

Nach der Gelelektrophorese wurden die für die Klonierung gewünschten Banden aus dem Gel isoliert. Dazu wurde die Bande mit einem Skalpell vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung wurde das Jetquick Gel Extraction Kit verwendet. Die erhaltene DNA konnte direkt für weitere Klonierungen, Restriktionsanalysen und Sequenzierungen verwendet werden und es waren keine weiteren Reinigungsschritte erforderlich.

4.2.1.9. **Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen und Mausgeweben**

RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Gefrorenes Mausgewebe wurde gewogen und pro mg 40 µl RLT Puffer zugesetzt. Das Gemisch wurde mit einem Dispergiergerät mit Rotor-Stator 1 min lang homogenisiert. 600 µl davon wurden für die Aufreinigung der RNA eingesetzt.

Adhärente Zellen wurden direkt auf der 6 Loch- oder 24 Loch-Platte mit 600 µl RLT Puffer lysiert und in RNase frei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden nachfolgend laut dem RNeasy Protokoll aufgearbeitet. Die RNA aus den Mausgeweben wurde mit 2 x 50 µl H₂O eluiert, die der Zellen mit 50 µl. Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurde der im RNeasy Kit beschriebene DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Der RNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bestimmt.

4.2.1.10. Reverse Transkription von RNA

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in komplementäre cDNA. cDNA kann dann für PCR-Reaktionen verwendet werden. Die Transkription der RNA erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen reversen Transkriptase (RT). Die hier eingesetzte Superscript II ist ein Derivat des Moloney Murine Leukämie Virus (M-MLV) RT [104-106] mit reduzierter RNase H-Aktivität und besserer Hitzestabilität.

Für die RT-Reaktion wurde standardmäßig 1 µg RNA mit Random-Primern eingesetzt, da hierdurch auch virale RNA umgeschrieben wird. Folgendes Pipetierschema wurde verwendet:

1 µl dNTP's (10 mM)

1 µl Random-Primer (250 nM)

5 µl gesamt RNA (1 µg)

5 µl H₂O

danach bei 65 °C 5 min inkubieren

folgenden Mastermix zugeben:

4 µl Superscript Puffer

1 µl RNASEout

2 µl 0,1 M DTT

danach bei 10 min bei Raumtemperatur inkubieren

1 µl Superscript zugeben

50 min bei 42 °C inkubieren

Die gewonne cDNA kann entweder direkt in einer PCR eingesetzt werden oder bei -20 °C gelagert werden.

4.2.1.11. Genamplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von Genen aus einer cDNA-Bank oder zur Vervielfältigung bereits klonierter Genbereiche verwendet [107]. Dabei wurden jeweils zwei gegenläufige Oligodesoxynukleotide im Überschuss eingesetzt, die etwa 20 Basenpaare der Zielsequenz flankieren. Je nach Bedarf enthielten die Oligonukleotide zur Klonierung am 5'-Ende noch Restriktionsschnittstellen.

Die Reaktion wurde in der Regel mit der Pfx-DNA-Polymerase durchgeführt, die aufgrund ihrer Proofreading-Aktivität eine sehr geringe Fehlerrate besitzt und DNA mit glatten Enden („blunt ends“) bildet. Nicht präparative PCRs wurden mit der Taq-Polymerase durchgeführt.

Die folgenden Komponenten wurden in einer Standard-PCR in ein kleines PCR-Eppendorfgefäß pipettiert:

	PFX-Polymerase	Taq-Polymerase
10x Amplifikationspuffer	5 µl	5 µl
50 mM MgSO ₄	1,5 µl	Im Puffer enthalten
dNTP-Lösung (10 mM ATP,GTP, CTP, TTP)	1,5 µl	0,5 µl
Forwardprimer (10 µM)	1 µl	1 µl
Reverseprimer (10 µM)	1 µl	1 µl
Polymerase	0,5 µl (2,5 U/µl)	0,25 µl (1,2 U/µl)
add Wasser auf 49 µl	38,5 µl	41,75 µl
cDNA	1 µl	1 µl
Gesamt	50 µl	50 µl

Standard PCR-Programm für PFX- und Taq-Polymerase im Thermocycler:

95 °C	3 min	Denaturierung	
94 °C	30 s	Denaturierung	
60 °C	30 s	Annealing	
68 °C (72 °C Taq)	1 min	Elongation	
68 °C (72 °C Taq)	3 min	Vervollständigung	

Beim Denaturierungsschritt wurden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zerlegt, so dass die beiden Primer beim Annealing-Schritt an den Zielsequenzen hybridisieren konnten. Die Annealing-Temperatur wurde für jede PCR in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer zwischen 56 °C und 68 °C gewählt.

Dabei wurde die Temperatur für jeden verwendeten Primer nach einer Faustformel berechnet, wobei G, C, A und T die Häufigkeit der Nukleotide im Primer angibt:

$$T_m = 4 \times (\text{G oder C}) + 2 \times (\text{A oder T})$$

Bei der Elongationstemperatur von 68 °C replizierte die Pfx-Polymerase in Gegenwart der dNTPs die komplementären Stränge. Die Menge des amplifizierten Produktes stieg dabei exponentiell mit der Zahl der Zyklen. Die Konzentration an MgSO₄, die Zyklenzahl und die Menge an cDNA bzw. Plasmid-DNA wurden je nach PCR individuell optimiert. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit zur Produktgröße gewählt und betrug 1 min pro Kilobase. Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte, da wo notwendig, mit dem JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit nach Herstelleranweisung.

4.2.1.12. **Ligation von DNA-Fragmenten**

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 2,5 µl vom Hersteller mitgelieferten 10 X Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Für die Ligation wurden etwa 50 fmol des geschnittenen Plasmids und ein etwa dreifacher Überschuss des Inserts eingesetzt. Je 10 µl des Reaktionsansatzes und eine Kontrolle ohne Insert wurden zur Transformation von *Escherichia coli* mit den Ligationsprodukten verwendet.

4.2.1.13. **Ligation von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren**

Das Protokoll erfolgte weitgehend nach der Gebrauchsanweisung des Topo TA cloning kits für Taq Polymerase amplifizierte PCR Produkte oder des Zero Blunt TOPO Cloning Kit für Pfx-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte. Anschließend wurden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung und 1 µl Topo-Vektor für 5 bis 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Der mit dem Kit mitgelieferte Vektor ist bereits geschnitten und besitzt an beiden Enden das Enzym Topoisomerase, das eine effiziente und schnelle Insertion des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistet.

Nach Inkubation wurden die Ligationsprodukte in hochkompetente *Escherichia coli* Top10 transformiert und auf einer LB-Agarplatte, versetzt mit Ampicillin oder Kanamycin, ausplattiert. Nach 12-14 Stunden waren die Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von kleinen Minikulturen mit je 2 ml LB-Medium eingesetzt werden.

4.2.1.14. Herstellung kompetenter Zellen mit *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* mit Ligationsprodukten oder vollständigen Plasmiden wurden zunächst kompetente Zellen hergestellt. Hierfür wurde 2 ml einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* zum Animpfen einer 200 ml-Kultur verwendet und bis zu einer $OD_{600} = 0.5 - 0.7$ herangezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren mit 20 ml kalter 0.1 M $MgCl_2$ -Lösung, wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert, in 20 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4°C pelletiert und in 2 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 15% Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 200 µl in Eppendorf-Gefäße verteilt und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Die Zellen hatten in der Regel eine Kompetenz von etwa 5×10^5 bis 1×10^6 Kolonien/µg DNA.

4.2.1.15. Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Produkte einer Ligation oder Plasmide wurden mit Hilfe von chemisch-kompetenten Zellen in *Escherichia coli* transformiert. 50 µl der kompetenten *Escherichia coli* Top10-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und 10 µl Ligationsansatz beziehungsweise 50 ng Plasmid hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und für 2 min im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 125 U/min und 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 8000 U/min herunterzentrifugiert und 450 µl Überstand verworfen. Im Restvolumen wurden die Zellen resuspendiert und auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Nach 12-14 Stunden wurden die einzelnen Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von Minikulturen (2 ml) verwendet werden.

4.2.1.16. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Ursula Dietrich) auf einem 3100 Avant Genetic Analyzer durchgeführt. Die Methode erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. [108]. Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 7 µl DNA-Lösung verwendet und mit 1 µl 10 µM Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0.5 bis 1 µg Plasmid-DNA in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 15 µl (~ 0,5 µg) des aufgereinigten PCR-Ansatzes mit 1 µl 10 µM Primerlösung versetzt.

4.2.1.17. Zielgerichtete DNA-Mutagenese

Für die *in vitro* zielgerichtete Mutagenese wurde das Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) laut Herstellerprotokoll verwendet. Hiermit ist es möglich Punktmutationen, Kodonaustausche sowie Deletionen oder Insertionen von ein oder mehreren Kodons in doppelsträngige DNA einzuführen.

Ausgehend von einem Plasmid mit dem zu mutierenden Genfragment, wurden zwei für die einzuführende Mutation kodierenden Oligonukleotide, die jeweils komplementär zu einem DNA-Strang des Plasmids waren, in einer PCR-Reaktion mittels einer *PfuTurbo* DNA-Polymerase verlängert. Durch den Einbau der Oligonukleotide wurde ein mutiertes Plasmid generiert, das Einzelstrangbrüche enthielt.

Die parentalen Plasmide wurden im Anschluss an die PCR-Reaktion mit dem Enzym *DpnI* verdaut. Die parentalen Plasmide wurden in *dam*⁺ *E.coli*-Stämmen amplifiziert und die DNA dadurch *dam* methyliert. *DpnI* (Zielsequenz 5`-Gm⁶ATC-3`) schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und somit wurden die in der PCR generierten, mutationstragenden Plasmide selektioniert, da die in der PCR erzeugten Plasmide nicht methyliert waren. Die die gewünschte Mutation enthaltenden Vektoren wurden in *E.coli* XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert und diese auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Einzelne Klone wurden für eine Mini-Plasmidpräparation gepickt und die Sequenz der aufgereinigten Plasmide mit einer Sequenzierung überprüft.

4.2.1.18. **Quantitative PCR**

Die quantitative PCR (qPCR) dient der quantitativen Bestimmung der Genexpression innerhalb einer DNA- bzw. cDNA-Probe. Die Bestimmung erfolgt immer gegen ein Referenzgen; in diesem Fall entweder humanes oder murines GapDH. Die Menge des DNA-Amplifikas wird durch erhöhte Fluoreszenz bei Einlagerung von Sybgreen in die dsDNA gemessen. Der Amplifikationszyklus, bei dem sich die Bildung eines Amplifikates zeigt, wird C_T Wert genannt und definiert die Kopienzahl des Gens innerhalb der Probe. Die Messung erfolgte auf einem iCycler von BioRad mit dem iQ Sybgreen BioRad Mix, indem bereits Nukleotide, ein Kalibrierungsfarbstoff, der PCR-Puffer, Sybgreen sowie die Hotstart-Polymerase enthalten sind.

Für die qPCR wurde die cDNA aus Kapitel 4.2.1.10 1:5 verdünnt mit H_2O eingesetzt. Es wurden je Probe 25 μ l Ansätze in Triplikaten vermessen. Dazu wurde folgender Ansatz als Mastermix je Probe pipettiert:

6,5 μ l H_2O		Mastermix 1 x je Probe
12,5 μ l 2x iQ Sybgreen BioRad Mix		
0,5 μ l Primer up		
0,5 μ l Primer up		
5 μ l cDNA		

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem 2-Schritt-Protokoll durchgeführt:

180 s 95°C	Denaturierung + Aktivierung der Polymerase	} 50 x
30 s 95°C	Denaturierung	
45 s 58°C	Annealing + Elongation	

Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzpunktbestimmung mit dem iCycler durchgeführt, indem die Temperatur in 0,5 °C Schritten von 50 °C ausgehend erhöht wurde. Dabei denaturiert die amplifizierte DNA und interkaliertes Sybgreen wird freigesetzt. Die Erniedrigung der Fluoreszenz in der Probe zeigt den Schmelzpunkt des amplifizierten DNA-Fragments an. Damit können auch eventuelle Nebenprodukte bestimmt werden.

Die Auswertung der C_T -Werte erfolgte mit der iCycler Software. Die Quantifizierung der gesuchten Genexpression im Verhältnis zum Referenzgen wurde mit der q-gene96 Excel-Matrix [109] durchgeführt.

4.2.1.19. ELISA

Mit einem „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) können quantitativ und hochspezifisch Antigene, meist Proteine, nachgewiesen werden. Im hier verwendeten „sandwich“ ELISA, wird eine Mikrotiterplatte mit einem Antikörper gegen das Antigen beschichtet. Dann werden die Proben aufgetragen, inkubiert und nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Gebundene Antigene werden mit einem zweiten spezifischen Antikörper detektiert. Der zweite Antikörper ist mit der Horseradish Peroxidase (HRPO) gekoppelt, die den Farbstoff TMB umsetzt, der mit einem ELISA-Reader photometrisch detektiert wird.

Die ELISA für IFN- α und IFN- γ wurden laut Herstellerprotokoll mit einmal eingefrorenem unverdünnten Mäuse-Serum bzw. Zellkulturüberstand durchgeführt.

4.2.1.20. Assay zur Messung der Editierungs-Aktivität der ADAR-1

Die *in vivo* Editierungs-Aktivität der ADAR-1 wurde anhand des Plasmids M265 bestimmt. M265 kodiert für einen Teil des GluR/B, in dem die +60 Stelle lokalisiert ist und die von der ADAR-1 *in vivo* zu 80 % editiert wird.

Das Plasmid M265 wurde jeweils im entsprechenden Experiment kotransfiziert. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde RNA aus den Zellen isoliert, cDNA synthetisiert und eine PCR mit den Primern B13 for/rev durchgeführt. Die Zahl der Amplifikationsrunden in der PCR wurde dabei möglichst gering gehalten. Das PCR-Produkt wurde mit dem Primer B13 for sequenziert und das Verhältnis des Guanosinpeaks zur Summe aus Adenin- und Guanosinpeak berechnet. Die Höhe des Guanosinpeak spiegelt die ADAR-Aktivität wieder. Bei jeder PCR wurde eine Eichgerade aus mitamplifizierten Mischungen der Plasmide M265 (Adenin an der +60 Stelle) und M432 (Guanosin an der +60 Stelle) erstellt, an der die einzelnen Proben abgeglichen wurden.

4.2.2. Zellkulturmethoden

4.2.2.1. Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 7 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Als Standardmedium wurde DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin sowie den Antibiotika 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin verwendet.

Die adhärenenten Zellen wurden in DMEM-Standardmedium gehalten, alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium gefüttert und regelmäßig in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:15 gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in FCS mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff. Zum Einlagern wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen nach dem abtrypsinieren bei 1500 U/min 5 min abzentrifugiert, in 1 ml FCS/10 % DMSO aufgenommen und in ein 2 ml Cryogefäß überführt. Die Zellen wurden in einer Styroporbox einen Tag bei -80 °C eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C schnell erwärmt und in 5 bis 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen. Adhärenente Zellen wurden anschließend in frischem und vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

Die Zellzahl wurde mit dem Zellzählgerät CASY TT bestimmt. 100 µl der Zellsuspension wurden hierfür in 10 ml Casyton verdünnt und vermessen.

4.2.2.2. **Transiente Transfektion von Zelllinien**

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine lagert sich an DNA an und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen. Da Streptomycin und Penicillin die Transfektionseffizienz verringern, wurde DMEM ohne diese Antibiotika verwendet. Adhärenz Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5$ Zellen pro 24-Loch-Schale in 500 μ l DMEM ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 2 μ l Lipofectamine und 50 μ l serumfreies DMEM sowie eine Lösung B mit 1 μ g Plasmid-DNA in 50 μ l serumfreiem DMEM angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Das Gemisch wurde auf die Zellen pipettiert und nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurde erneut das Medium gewechselt. Nach 24-48 h ist die Expression der Plasmid DNA sichtbar.

4.2.2.3. **Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren**

Die retroviralen Vektoren wurden durch transiente Transfektion mit Calciumphosphat in der Zelllinie Anjou65 produziert. Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion 6×10^6 Anjou65-Zellen in einer 10 cm-Petrischale ausplattiert und in DMEM unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Kurz vor der Transfektion wurde am nächsten Tag das Medium durch DMEM mit 10 μ M Chloroquin zur Erhöhung der Transfektionseffizienz ersetzt. 7,5 μ g retroviraler Vektor, 12,5 μ g des gag-pol-Expressionsplasmids (M57) sowie 1 μ g des LCMV-env-Expressionsplasmids (M108 bzw. die zu testenden LCMV-GP Mutanten) wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Wasser auf 450 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 μ l CaCl_2 -Lösung (2,5 M), wurde die Lösung tröpfchenweise zu 500 μ l HEPES-Puffer unter ständigem Vortexen gegeben. Die Lösung wurde für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 6 bis 8 Stunden mit dem DNA-Präzipitat inkubiert und anschließend das Medium mit 6 ml frischem DMEM ohne Chloroquin ausgetauscht. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden nach 12, 24, 36 und 48 Stunden abgenommen und durch 6 ml frisches Medium ersetzt.

Die gesammelten Überstände wurden durch einen 0.45 µm-Filter steril filtriert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.2.2.4. **Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen**

In eine 24-Loch-Platte wurden je $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen in 1 ml gegeben und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und durch virushaltige Zellkulturüberstände ersetzt. Nach Zugabe von 1 µl Polybrene (4 mg/ml) wurde für 1 Stunde bei 2000 U/min und 31 °C zentrifugiert. Nach Bedarf wurde die Transduktion mehrfach wiederholt.

4.2.2.5. **Titration von retroviralen Zellkulturüberständen**

Zur Bestimmung des Titers von retroviralen Zellkulturüberständen aus Kapitel 4.2.2.3 erfolgte analog zur Transduktion aus Kapitel 4.2.2.4. Es wurde die Indikatorzelllinie TE671 mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro 24-Loch-Platte verwendet. Von den Zellkulturüberständen wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:10000 hergestellt. Es wurde je 1 ml der verdünnten Überstände für die Transduktion eingesetzt. Die transduzierten Zellen wurden nach 3 Tagen durchflusszytometrisch vermessen, je nach Gen auf dem retroviralen Vektor mit entsprechender Antikörper-Färbung oder direkt durch die Anregung des exprimierten fluoreszierenden Proteins. Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{TU/ml} = \text{Verdünnung} \times 5 \times 10^4 \times (\% \text{ positive Zellen}/100)$$

4.2.2.6. **Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander angeordnet und einzeln mittels eines Laserstrahls untersucht. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können simultan Zellgröße und Granularität für mehrere tausend einzelne Zellen bestimmt werden.

Nach Anfärbung mit einem Fluorochrom oder durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. grün fluoreszierendes Protein) können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Oberflächenproteine können mit einem Primärantikörper erkannt und mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert werden. Die Höhe der Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen Zahl der Moleküle des Fluorochroms oder der Bindungsstellen für den fluoreszenz-markierten Antikörper. Im Durchflusszytometer passieren die Zellen dann einen Laserstrahl, der die Fluoreszenzmarker anregt. Fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen lassen sich so unterscheiden und voneinander trennen.

Direkte Färbung der Zellen

Für jede Probe wurden etwa 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Nach Zugabe von 20 μ l des fluoreszenz-markierten Antikörpers wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um den überschüssigen und ungebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurde zu den Zellen 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 1 % fetalem Kälberserum) gegeben, gevortext und für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden erneut 2 ml FACS-Puffer zugegeben und nach Vortexen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in FACS-Puffer mit 1.5 % Formaldehyd konserviert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Indirekte Färbung der Zellen

Für die indirekte Färbung der Zellen wurden für jede Probe zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 5 min pelletiert. Anschließend wurde 1 μ g des primären Antikörpers zugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers wurden die Zellen gewaschen: 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 1 % fetales Kälberserum) wurden zur Zellsuspension hinzugegeben, gevortext, für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und das Waschen zweimal wiederholt. Pro Probe wurden 20 μ l einer 1:20-Verdünnung des Phycoerythrin- oder APC-gekoppelten Zweitantikörpers zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und anschließend in FACS-Puffer mit 1.5 % Formaldehyd bis zur Messung konserviert und bei 4 °C gelagert.

Die FACS-Messung und -Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (FACScan oder FACS-Calibur (BD, Heidelberg) mit der Software CellQuest Pro.

4.2.2.7. **FACS-Sorting**

Die Zellseparation mittels „FACS-Sorting“ diente der Anreicherung von transduzierten Zellen, sofern diese keinen Selektionsmarker exprimierten. In ein steriles FACS-Röhrchen wurden Zellen wie oben beschrieben (Kapitel 4.2.2.6) mit dem Erstantikörper inkubiert, gewaschen und nach Inkubation mit dem Zweitantikörper mit sterilem PBS auf eine Konzentration von etwa 1×10^7 eingestellt. Der FACS-Calibur wurde für 30 min mit 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Während des Sortiervorgangs wurde die Sort-Frequenz unter 1000 Zellen pro Sekunde belassen. Direkt nach dem „Sorten“ wurde ein Teil der Zellen für die Reanalyse verwendet und die Effizienz der Sortierung überprüft. In der Regel betrug die Reinheit $> 95 \%$ der sortierten Zellen.

4.2.2.8. **Infektion von Zelllinien mit LCMV**

Für alle Infektionsversuche wurde der Stamm LCMV WE (HPI) verwendet. Zellen werden entsprechend ihrer optimalen Wachstumsbedingung in einer 24- oder 6-Loch-Platte ausgesät. Nach Anheften der Zellen, wurde das Medium entfernt. Die entsprechende Virusverdünnung der jeweiligen MOI wurde hergestellt und 200 μl bei 24- und 500 μl bei 6-Loch-Platten auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde im Brutschrank inkubiert und einmal vorsichtig mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Viren zu entfernen. Danach wurde frisches Standardmedium zugegeben.

4.2.2.9. **Titration von LCMV-haltigen Zellkulturüberstände**

Die Titration erfolgte in Triplikaten auf L929 Zellen. Je 24-Loch wurden 5×10^4 Zellen ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Infektion der L929 Zellen mit den Virusüberständen analog zu Kapitel 4.2.2.8. Dabei wurden die einzelnen Proben in einer Verdünnungsreihe 1:10 verdünnt. 48 h nach Infektion wurden die Zellen abtrypsiniert, 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert und in 1,5 % Formaldehyd-Lösung fixiert. Danach erfolgte die FACS Färbung der Zellen analog zu Kapitel 4.2.2.6 mit dem anti LCMV-GP KL25 als Erstantikörper. Der Virustiter wurde aus der Verdünnung errechnet, bei der zwischen 3 % und 15 % LCMV-GP positive Zellen gemessen wurden.

Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{IU/ml} = \text{Verdünnung} \times 5 \cdot 10^4 \times (\% \text{ LCMV-GP pos. Zellen}/100)$$

4.2.3. Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1. Zellyse von Zellen

Adhärente Zellen wurden abtrypsiniert und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (13000 U/min, 2 min). Die Zellpellets wurden einmal mit 1 ml kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend sofort bei -20 °C eingefroren. Unmittelbar vor der Zellyse wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend je 100 µl eiskalter Lysispuffer zugegeben. Die Zellpellets wurden in diesem gut resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min gevortext. Das im Lysispuffer enthaltene Detergenz TritonX-100 umlagert aufgrund seiner lipophilen Anteile die Proteine und solubilisiert diese aufgrund seiner hydrophilen Bestandteile in wässriger Lösung. Proteaseinhibitoren wie Apronitin, Na₃VO₄ sowie Pefabloc[®]SC verhindern eine Degradierung der Proteine. Anschließend wurden Zelltrümmer, Membranbestandteile sowie Organellen abzentrifugiert (13000 U/min, 10 min) und die proteinhaltigen Überstände in neue, sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellysate wurden bei -20 °C gelagert.

4.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zellysate

Bei der SDS-PAGE werden Proteine gemäß ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld in einer engmaschigen Polyacrylamid-Gelmatrix aufgetrennt. Die Gelmatrix entsteht durch die Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Bisacrylamid. Da unterschiedliche Proteine eine unterschiedliche Nettoladung haben, wird diese von Natriumdodecylsulfat (SDS) abgeschirmt. Das amphiphile SDS komplexiert die Proteine mit seinem aliphatischen Teil (1,4 g SDS/1 g Protein). Dadurch werden die Proteine mit einer stark negativen Ladung maskiert.

Bei einer Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe bei konstanter Spannung und Stromstärke, steht deren relative Beweglichkeit in der Gelmatrix logarithmisch zu deren Masse.

Es wird ein diskontinuierliches Gel nach Laemmli [110] angewandt, das aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Im weitmaschigen Sammelgel werden alle Proteine der aufgetragenen Proteinlösung auf ein einheitliches Startniveau gebracht und anschließend im engmaschigen Trenngel gemäß ihrer Masse aufgetrennt.

Bei der SDS-PAGE wurde zunächst ein 12 %iges oder 7 %iges Trenngel und anschließend ein 4 %iges Sammelgel wie folgt zusammenpipettiert:

Stammlösung	Sammelgel*	12 % Trenngel*	7 % Trenngel*
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % (w/v) N,N'-Bisacrylamid	1,3 ml	4 ml	2,3 ml
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris)	2,5 ml	-----	-----
Trenngel-Puffer (1,5 M Tris)	-----	2,5 ml	2,5 ml
Aqua dest.	6,1 ml	3,4 ml	5,2 ml
10 % Amoniumpersulfat (APS)	25 µl	50 µl	50 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	10 µl	10 µl

* Alle angegebenen Volumina reichen für je zwei Gele

Die Trenngel-Lösung wurde zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur gegossen und mit 150 µl Isopropanol überschichtet. Dadurch wird eine glatte Geloberfläche erzeugt. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Isopropanol mit Wasser gewaschen und anschließend verbliebene Feuchtigkeit mit Filterpapier entfernt. Die Sammelgellösung wurde auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das fertige Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese bis über die Geloberkante mit Laufpuffer gefüllt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Zellysate 1:3 in DDT-haltigem 3x Ladungspuffer verdünnt und 5 min bei 100°C im Heizblock aufgeköcht. Dadurch wird eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht. Jede Probenasche wurde mit 15 µl beladen. Eine Probenasche wurde mit 10 µl NEB-Marker beladen. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 200 V.

4.2.3.3. **Elektro-Blotting**

Bei diesem Verfahren werden die durch das Poloyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen.

Hierzu wurde zunächst die für jedes Gel benötigten Filterpapiere und Schwämme in Transferpuffer eingeweicht. Je Gel wurde eine Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Die Glasplatten der Gelapparatur wurden vorsichtig voneinander getrennt und das Sammelgel vom vollständigen Proteingel abgetrennt. Das Trenngel wurde vorsichtig von der Glasplatte gelöst und 10 Min in Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurde der Blot in der Transferkassette mit folgender Reihenfolge zusammengebaut: 1. Schwamm, 2. Filterpapier, 3. Gel, 4. Membran, 5. Filterpapier, 6. Schwamm.

Die Membran wurde dabei luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und angedrückt. Die fertige Transferkassette wurde in den Blotting-Tank eingesetzt und dieser bis über die Transferkassette mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 100 V bei 4 °C.

4.2.3.4. **Immundetektion durch Chemilumineszenz**

Die auf die Nitrocellulose-Membran transferierten Proteine können nun durch spezifische primäre Antikörper und peroxidasegekoppelte sekundäre Antikörper detektiert werden, indem man die Membran in einer Substrat-Lösung der Peroxidase inkubiert. Die Lichtemission bei Substratumsatz kann auf einem Film detektiert werden.

Die Membran wurde 1 Stunde in 5 % MPBST unter Schwenken inkubiert. Dadurch wurden die proteinfreien Oberflächen der Membran durch Milchproteine abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde in 2,5 % MPBST verdünnt (Endvolumen 10ml) und die Membran darin über Nacht unter Schwenken bei 4 °C, oder 2 h bei RT inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min in je 10 ml 1 x PBST gewaschen, der sekundäre Antikörper in 2,5 % MPBST verdünnt (Endvolumen 10ml) und die Membran darin für zwei Stunden unter Schwenken bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran erneut für je 10 min in je 10 ml 1 x PBST und einmal abschließend 5 min in 10 ml 1 x PBS gewaschen.

Zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die Membran mit der Substrat-Lösung der Peroxidase bedeckt (ECL Plus Western Blotting Detection Kit, 2 ml Reagenz A + 50 µl Reagenz B) und 5 min darin inkubiert. Die Substratlösung wurde vorsichtig abgetupft und die Membran in einer Plastikhülle in einer Filmkassette platziert. Im Photolabor wurden unter Rotlicht verschiedene Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten auf die Membran aufgelegt und die Filme unmittelbar nach der Exposition entwickelt.

4.2.3.5. Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen

Das vollständige Entfernen gebundener Antikörper (Stripping) von einer Western Blot Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen (Reprobing). Obwohl die Behandlung der Membranen mit dieser Methode zu einer Abnahme des Signals führt, ist die erneute Detektion von spezifischen Antigenen mehrmals möglich. Die Membranen wurden dreimal in 1 x PBST gewaschen und anschließend für 45 min bei 50 °C in Stripping-Puffer inkubiert. Die Membran wurde fünfmal gewaschen und mit Blockierungsreagenzien blockiert. Anschließend konnte eine weitere Antikörperfärbung durchgeführt werden.

4.2.4. Tierversuche

4.2.4.1. LCMV-Infektion der Mäuse

6 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden über die Schwanzvene intra-venös mit 10^5 infektiösen Einheiten LCMV-infiziert. Jeweils vor und zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Mäuse mit Ether betäubt und es folgte der Bruch des Genicks, das Öffnen des Thorax mit dem Skalpell und die Punktur des Herzens. Das freigesetzte Blut wurde mit einer Spritze aufgenommen und in die jeweiligen Reaktionsgefäße gegeben, in denen Heparinlösung vorgelegt wurde.

Nach der Blutabnahme wurden alle Reaktionsgefäße abzentrifugiert (5000 U/min, 10 Min) und der Überstand (Serum) in frische, sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die gewonnenen Seren wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Der Bauchraum wurde geöffnet, die Milz entnommen, zweigeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.4.2. **Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten**

Die heterozygoten $\Delta 2-13$ ADAR C57Bl/6 Mäuse wurden verpaart und die Befruchtung der Mäuse durch Kontrolle des Vaginalpropfes sichergestellt. 11 Tage nach der Paarung wurden die Tiere mit Ether betäubt und das Genick gebrochen. Der Bauchraum wurde, nach Desinfektion des Fells mit Alkohol, geöffnet und die beiden Hörner, in denen sich die Embryonen befinden, vom Uterus abgetrennt und in eine 10 cm Schale mit PBS überführt. Die Embryonen wurden sorgfältig, ohne die amniotische Membran zu zerstören, aus dem Horn entfernt. Die einzelnen Embryos wurden dann in einer neuen 10 cm Schale mit PBS aus der Fruchtblase isoliert. Der Hinterkopf und Schwanz wurden abgetrennt und separat in ein PCR Gefäß mit 20 μ l PBS zur Genotypisierung gelegt. Der restliche Embryo wurde mit einem 5 cm Spritzenstempel durch ein feines Sieb in ein 50 ml Gefäß gedrückt und anschließend das Sieb mit viel PBS gespült. Es wurde 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 2 ml 20 % FCS DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Standard DMEM weiterkultiviert und jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 6-Loch-Platte ausgesät.

5. Ergebnisse

Die *in vitro* Infektion von Zellen mit LCMV führt nach einer anfänglichen Phase mit einer hohen Virusreplikation und LCMV-GP-Oberflächenexpression im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Verminderung der Viruspartikel-Produktion und GP-Expression. Dies ähnelt dem persistenten Stadium der LCMV-Infektion. Eine Ursache hierfür können Mutationen im viralen Genom sein, die neben der viralen Polymerase auch durch die IFN-stimulierbare, zelluläre iADAR-1 induziert werden können. In dieser Arbeit wird der Zusammenhang zwischen Mutationen im Genom von LCMV und der iADAR-1, als zelluläres, antivirales Enzym der Immunabwehr, untersucht. Die Bedeutung der Mutationen für die verringerte LCMV-GP-Expression und deren Ursache wird im Zellkultursystem und zusätzlich auch in einem Mausmodell analysiert.

5.1. LCMV-GP-Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen

Als Modellsystem für LCMV-Infektionen von Zellen *in vitro* wurden L929-Zellen verwendet. In diesen Zellen bildet sich nach kurzer, starker Virusreplikation eine persistente Infektion aus, in der kaum noch replikationsfähige Viren gebildet werden [111]. Die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 wurde 1948/49 zum ersten Mal beschrieben [98] und die Ergebnisse lassen sich anhand der vielfältigen Literatur gut einordnen.

Weiterhin wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) eingesetzt, die nach der Isolierung aus C57BL/6 Embryonen durch Passagieren immortalisiert wurden. Die aus ADAR-1 „knockout“ Mäusen isolierbaren MEF können gezielt eingesetzt werden, um die Interaktionen des Virus mit diesem zellulären Gen zu untersuchen. Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y [99] wurde als Modellzelle eingesetzt, da auch das Gehirn von LCMV-infiziert wird. SH-SY5Y-Zellen sind außerdem besonders sensitiv für IFN- α , das bei viralen Infektionen ausgeschüttet wird und die ADAR-1 induziert.

Die murinen Zellen L929, MEF wt und die humane SH-SY5Y-Zelllinie wurden in mehreren Parallelansätzen mit LCMV WE (HPI) infiziert (MOI 0,1). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde je eine Kultur abtrypsiniert, mit einem Antikörper gegen LCMV-GP gefärbt und durchflusszytometrisch vermessen.

Die Infektion sowohl humaner als auch muriner Zellen mit LCMV WE (HPI) führte zur Expression des viralen GPs auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Nach 48 - 72 Stunden kam es zu einem Expressionsmaximum des LCMV-GPs, danach zu raschem Abfall der Expression (Abb. 12).

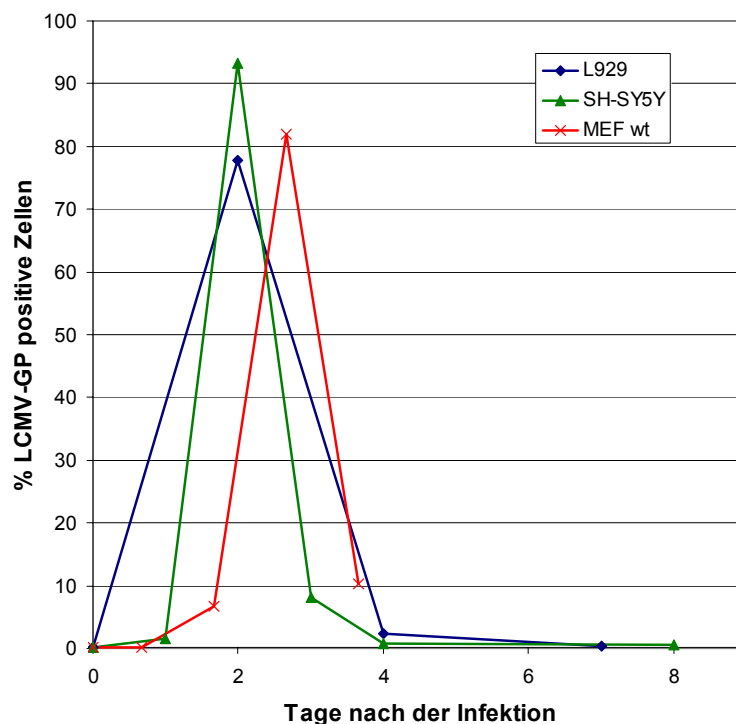


Abb. 12: LCMV-GP-Oberflächenexpression auf verschiedenen Zelllinien im Laufe der Infektion mit LCMV. Die murinen Zelllinien L929, MEF wt und die humane SH-SY5Y-Zelllinie wurden mit LCMV WE (HPI) infiziert (MOI 0,1). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde je eine Kultur abtrypsiniert und mit einem Antikörper gegen LCMV-GP gefärbt. Die Abbildung zeigt drei repräsentative Infektionsverläufe. Diese Daten konnten auch für andere MOIs bestätigt werden.

Der Mechanismus, der zur Reduktion des GPs auf der Oberfläche führt, ist nicht genau bekannt. Vermutet wird, dass entweder „defective-interfering“ (DI) RNAs oder fehlerhafte S-RNA gebildet wird. Die fehlerhafte S-RNA führt zur Bildung einer verkürzten GP-Variante, die nicht mehr richtig prozessiert werden kann und somit nicht an die Oberfläche gelangt [111, 112].

5.2. Mutationen im LCMV-GP in LCMV-infizierten L929-Zellen

Eine mögliche Ursache für die schwächere LCMV-GP-Expression in der späten Phase der Infektion (siehe Abb. 12) könnte die Anhäufung von Mutationen in der viralen RNA sein, wodurch die GP-Prozessierung und der Transport auf die Zelloberfläche gestört würden. Für die Mutationen könnte zum einen die fehlerbehaftete Replikation und Transkription durch die virale RNA-Polymerase verantwortlich sein [113, 114], zum anderen ein zellulärer Faktor, wie die IFN-induzierbare ADAR-1.

Zuerst wurde die virale RNA daraufhin untersucht, ob Mutationen die Ursache für die geringe GP-Expression sind. Murine L929-Zellen wurden mit LCMV bei einer MOI von 0,1 infiziert und die Mutationen im viralen Genom zwei und sieben Tage nach der Infektion bestimmt. Tag zwei stellt hierbei einen Zeitpunkt kurz nach der Infektion dar, an dem eine hohe GP-Oberflächenexpression vorliegt. Tag sieben ist ein Zeitpunkt, an dem die Zellen nur noch eine geringe GP-Expression aufweisen und der dem persistenten Stadium von LCMV entspricht.

Hierfür wurde Gesamt-RNA aus den LCMV-infizierten L929-Zellen isoliert und eine RT-PCR für die S-RNA von LCMV durchgeführt. Die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes ergab keine Mutationen, die von der ursprünglichen LCMV WE(HPI) Sequenz abwichen. Um Fehler in einzelnen viralen S-RNA-Strängen zu detektieren, wurde das PCR-Produkt in einen Vektor kloniert und die erhaltenen Einzelklone sequenziert. Für die PCR wurde eine PFX-Polymerase [115] verwendet. Diese stammt aus *Pyrococcus* sp. und weist eine 3'→5' Fehlererkennung auf, wodurch die Fehlerrate der PCR im Vergleich zur Taq-Polymerase reduziert wird. Dies ist notwendig, da Taq-Polymerasen eine 10 mal höhere Fehlerrate aufweisen und speziell A→G Mutationen induzieren [116], wohingegen für die PFX-Polymerase kein bestimmter Mutationstyp beschrieben ist. Es wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet: S-RNA up6-seq low4; S-RNA up29-seq low4 und S-RNA up29-seq low 856 (Abb. 13).

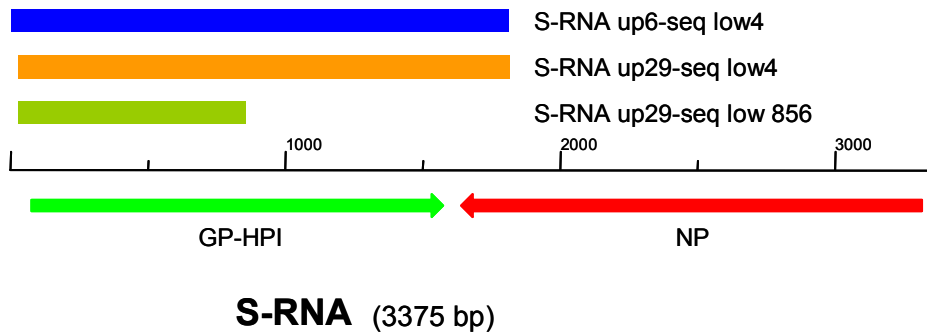


Abb. 13: Amplifikate der im Text beschriebenen Primerpaare in der S-RNA von LCMV. Die PCR-Produkte der Primerpaare sind in blau (S-RNA up6-seq low4), orange (S-RNA up29-seq low4) und grün (S-RNA up29-seq low 856) eingezeichnet. Zur Orientierung sind die viralen Gene für GP und NP dargestellt.

Durch die unterschiedlichen Primerpaare wurde sichergestellt, dass auch S-RNA-Kopien mit Mutationen in einer Primersequenz mit einem anderen Primerpaar amplifiziert werden.

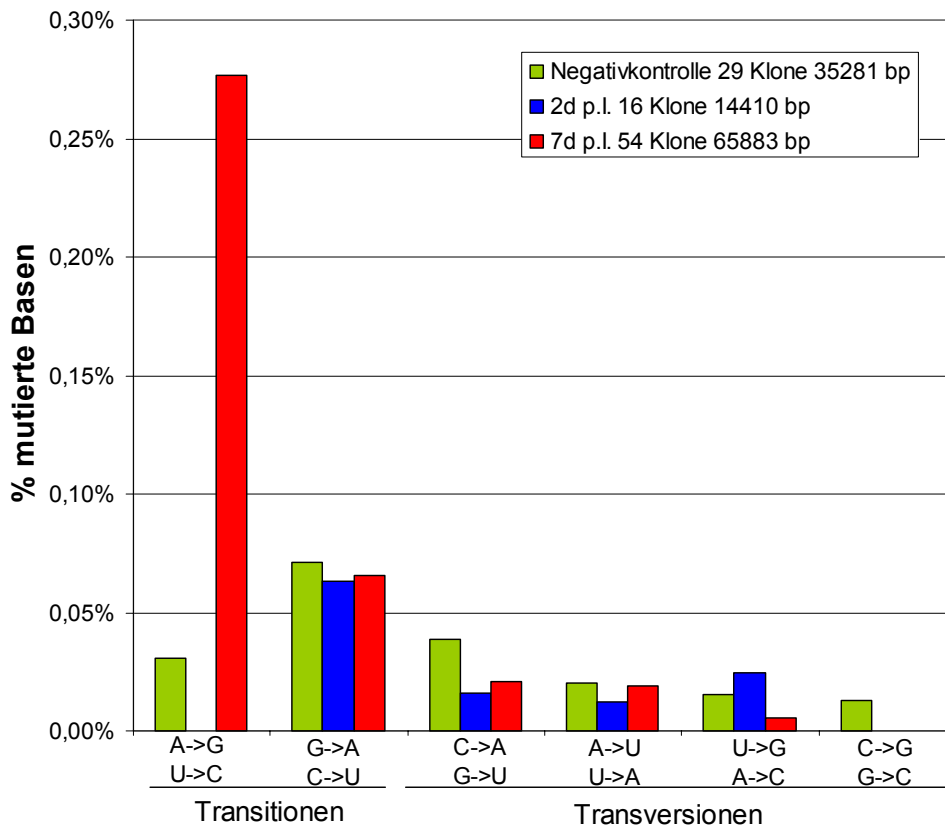


Abb. 14: Mutationen im viralen Genom von LCMV. L929-Zellen wurden mit LCMV MOI 0,1 infiziert und eine RT-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert und mehrere Klone sequenziert. In der PCR wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet. Die Abbildung zeigt die Summe aller Mutationen aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die relative Zahl mutierter Basen, errechnet aus dem Verhältnis der Zahl mutierter Basen zur Gesamtzahl der sequenzierten Basen. Dabei wurde berücksichtigt, dass der GC-Gehalt der S-RNA um 10 % geringer als der AU-Gehalt ist. Als Negativkontrolle wurden L929-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für die S-RNA von LCMV unter der Kontrolle eines PolI-Promotors kodiert. Die Zellen wurden ebenfalls lysiert, RNA extrahiert und in der RT-PCR eingesetzt. In der Legende ist jeweils die Zahl der sequenzierten Klone und Basen angegeben.

Zwei Tage nach der Infektion war kein spezifisches Mutationsmuster in der viralen RNA erkennbar und es fanden sich keine A→G bzw. U→C Transitionen (Abb. 14). Die Transition A→G entspricht der Mutation U→C im komplementären RNA-Gegenstrang. Die Negativkontrolle, in der die von einem Plasmid in L929-Zellen transkribierte S-RNA amplifiziert wurde, zeigte ebenfalls kein spezifisches Mutationsmuster. Am Tag zwei und bei der Negativkontrolle hielten sich Transitionen und Transversionen die Waage.

Nach sieben Tagen hingegen wurde ein spezifisches Mutationsmuster beobachtet: 75 % aller gefundenen Mutationen waren A→G bzw. U→C Transitionen. Dies resultiert zusammen mit den G→A Mutationen in einem mit 88 % hohen Anteil an Transitionen im viralen Genom sieben Tage nach der Infektion.

In zwei Klonen von Tag sieben trat ein Hypermutationsmuster auf, in dem sehr viele A→G bzw. U→C Austausche in einem Klon vorlagen. Hierbei war in einem 420 Basenpaar langen Bereich des viralen Genoms 38 % aller A→G in dem einen Klon mutiert und in einem 370 Basenpaar langen Bereich 14 % aller U→C im anderen Klon mutiert (siehe Anlage), während im restlichen Genom dieser Klone kaum Mutationen vorlagen.

Aus den gesamten sequenzierten Klonen von Tag zwei und sieben nach der Infektion von L929 mit LCMV, lässt sich die Fehlerrate im viralen Genom am jeweiligen Tag bestimmen. Die Fehlerrate errechnet sich aus der Zahl der Mutationen im Verhältnis zur Zahl der sequenzierten Basen. Diese Rate stieg um das 8-fache an, von $2,49 \times 10^{-4}$ Fehler pro Basenpaar an Tag zwei auf 20×10^{-4} Fehler an Tag sieben an. Die Zahl der dadurch im translatierten LCMV-GP hervorgerufenen Aminosäureaustausche stieg ebenfalls im Laufe der Infektion an. Am Tag zwei trugen 20 % aller Klone wenigstens eine Aminosäuremutation, am Tag sieben 50 % aller Klone (Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht über die LCMV-GP-Klone die sieben Tage nach der Infektion von L929-Zellen mit LCMV isoliert wurden. Die grau unterlegten Klone wurden auf Expression des GPs überprüft. Mit einem Stern markierte Mutationen wurden durch A→G (U→C) Mutationen hervorgerufen.

Klon	AS 1	AS 2	AS 3	Klon	AS 1	AS 2	AS 3
17	3 Q→R*	Hypermutationen		L3	123 C→G	134 F→C	
L4	8 F→L*			L1	357 M→T*		
L9	14 I→T*	56 C→Y	396 N→D*	92	164 N→Y		
16	36 Y→C	77 V→A*		L11	208 W→R*		

Klon	AS 1	AS 2	AS 3	Klon	AS 1	AS 2	AS 3
1	39 A→T	135 D→G*		L23	188	21 W→R*	25 *
12	42 G→T	250 I→L		L17	226		
L20	45 A→T			L8		407 D→N	
94	47 V→A*			38	258 K→Q	Hypermutationen	
L13	49 F→L*	298 K→I		93	265 A→Y		
14	49 F→L			L5	322 I→F		
10	84 L→F			L21	322 I→F		
96	92 C→Y			L18	412 E→STOP		
18	115 D→G*	184 C→Y*		L22			
				L2	478 K→N		

Auch die absolute Zahl der Aminosäureaustausche stieg im Laufe der Infektion an, wobei in der Negativkontrolle 63 % mehr Nukleotidmutationen als an Tag zwei der LCMV-infizierten L929-Zellen zu beobachten waren. Dadurch war in diesen Klonen die Zahl der Aminosäuremutationen deutlich erhöht (Abb. 15). Der hohe Anteil von A→G bzw. U→C Transitionen an Tag sieben führte dazu, dass zu diesem Zeitpunkt mehr als 50 % aller Aminosäuremutationen durch diese Transition verursacht wurden.

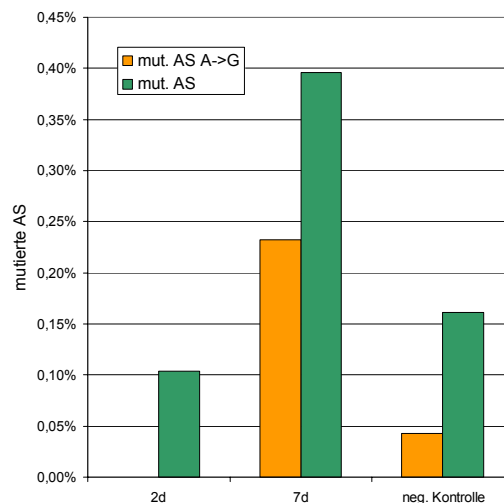


Abb. 15: Die Grafik zeigt die Zahl der mutierten AS im LCMV-GP im Verhältnis zur Gesamtzahl der sequenzierten Aminosäure-Kodons. Zusätzlich ist die Zahl der durch A→G (U→C) Transitionen hervorgerufenen Aminosäuremutationen dargestellt.

12 von 27 Klonen tragen mehr als einen Aminosäureaustausch, fünf tragen mehrere Aminosäureaustausche und hiervon sind zwei hypermutiert; in diesen liegen mehrere Aminosäureaustausche vor. Interessant hierbei ist, dass durch die A→G Mutationen kein Stoppkodon entstehen kann. Sowohl Klon L9 als auch Klon 38 haben eine Mutation an einer potentiellen Glykolysierungsstelle des GP-2. Da vollständig unglykolysiertes GP-C weder gespalten noch an die Oberfläche transportiert wird [29], wurden diese Klone genauer untersucht.

5.2.1. Expression der mutierten LCMV-GP-Klone aus L929-Zellen

Am Tag sieben nach der Infektion von L929-Zellen zeigte sich in 50 % aller LCMV-GP-Klone zumindest eine Aminosäuremutation. Um die Expression und Prozessierung der mutierten LCMV-GP-Klone genauer zu analysieren, wurden 10 Klone in das Expressionsplasmid für LCMV-GP:HA umklont. Durch Pseudotypisierung von MLV-Partikeln können ferner die GP-Varianten auf Infektiosität bzw. Funktionalität untersucht werden [93]. Unter Pseudotypisierung versteht man die Herstellung von Viren, die ein fremdes Hüllprotein tragen. In diesem Fall wird ein MLV-basierter Retrovirus verwendet. Dieser wird durch die Transfektion von drei Plasmiden erzeugt: ein Plasmid kodiert für das LCMV-Hüllprotein, ein weiteres kodiert für die virale Integrase, die Reverse-Transkriptase und die akzessorischen Proteine, und ein Plasmid kodiert für die retrovirale RNA mit dem Verpackungssignal, den LTR-Regionen sowie GFP als Markergen.

Die korrekte Expression und Prozessierung des LCMV-GP wurde im Western Blot überprüft. Die LCMV-GP-Klone wurden in den Expressionsvektor M482 mit CMV-Promotor und β -Globin-Intron umklont. Gegen LCMV-GP ist kein Antikörper zur Detektion im Western Blot verfügbar. Deshalb wurde die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA, die einen Teil des Influenza Hemagglutinin Proteins darstellt (HA Tag), zur Detektion an das C-terminale Ende des Proteins fusioniert. Dies ermöglicht die Detektion des LCMV-GP mit einem anti HA-Antikörper. Das Expressionsplasmid, das die LCMV-GP Varianten kodiert, wurde durch CaCl_2 -Transfektion in 293T-Zellen eingebracht. Nach Lyse eines Teils der Zellen, wurde das Lysat für einen Western Blot eingesetzt (Abb. 16).

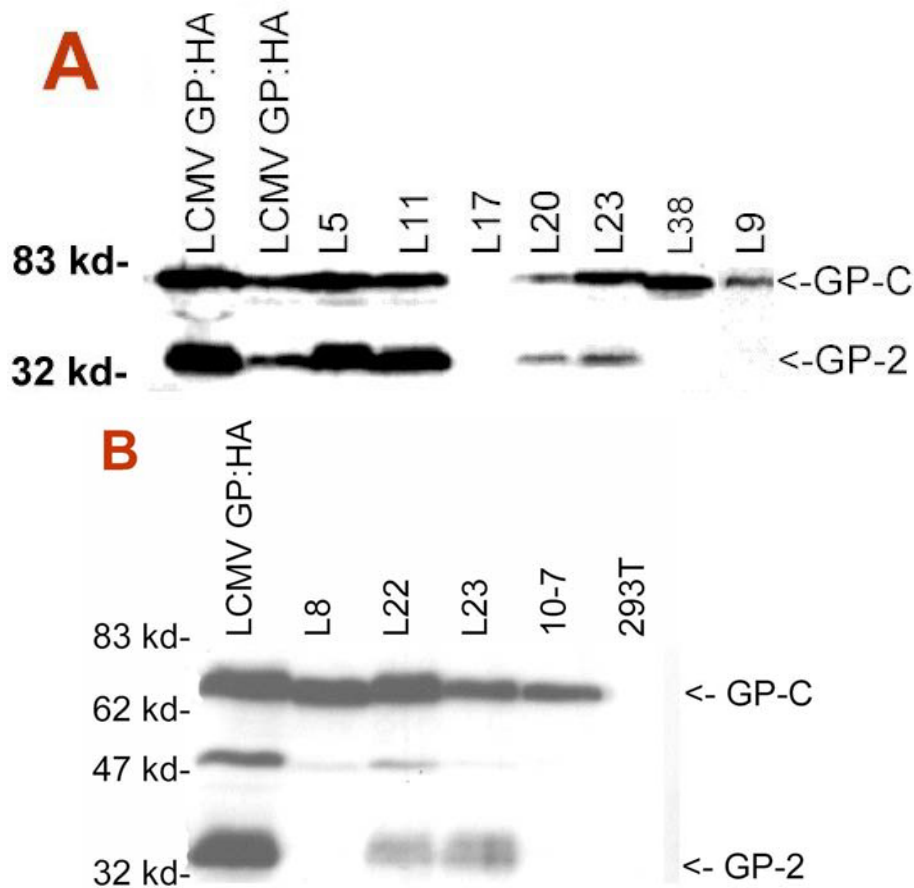


Abb. 16: Anti-HA Western Blot der mutierten LCMV-GP-Klone. Man sieht das prozessierte GP-2 und das ungespaltene GP-C. 293T-Zellen wurden mit den Plasmiden, die für LCMV-GP:HA kodieren, transfiziert, zwei Tage später lysiert und in einem denaturierenden Western Blot eingesetzt. Abgebildet ist je ein repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Die Positivkontrolle entspricht einem nicht mutierten LCMV-GP, welches in den gleichen Vektor wie die mutierten LCMV-GP-Sequenzen kloniert wurde. Im Western Blot wies die Positivkontrolle wie erwartet zwei Banden auf: eine GP-C-Bande bei ~75 kD und eine GP-2-Bande bei ~35 kD [33]. Nach Spaltung des GP-C durch die zelluläre Protease SKI-1/S1P entsteht GP-1 und GP-2.

Da das GP-C am C-Terminus den HA-Tag trägt, ist durch den Anti-HA Antikörper auf dem Western Blot nach Spaltung des GP-C nur das GP-2, nicht aber das GP-1 detektierbar. Die schwache Bande bei ~52 kD ist nicht glykolysiertes GP-C [93].

Das GP-C und GP-2 des Klon L17 war auf dem Gel nicht sichtbar, da der Klon vor dem HA-Tag am C-terminalen Ende eine Stoppkodon-Mutation trägt. Der hypermutierte Klon 38 wurde nicht von der zellulären Protease gespalten und die GP-C-Bande hatte, vermutlich aufgrund ungenügender Glykolysierung, im Gegensatz zu den anderen Klone ein vermindertes Molekulargewicht unter 75 kD. Auch Klon L9 (14 I→T; 56 C→T; 396 N→D) und Klon L8 waren nicht richtig prozessiert und wiesen nur die GP-C Bande auf.

Alle anderen Klone waren, wie die Positivkontrolle LCMV-GP:HA, korrekt gespalten. Die Klone L20, L22 und L23 hatten allerdings eine etwas schwächere GP-2-Bande als die Positivkontrolle.

Um die Expression des GPs an der Zelloberfläche zu überprüfen, wurde ein weiterer Teil der Zellen mit dem anti GP-Antikörper KL25 angefärbt und im FACS detektiert. Um die LCMV-GP-Klone auf Infektiosität und Funktionalität zu überprüfen, wurden sie zum Pseudotypisieren von MLV basierten Retroviren eingesetzt (Abb. 17). Hierfür wurden 293T-Zellen mit dem Plasmid M57, das für gag und pol kodiert, einem retroviralen Expressionsplasmid M56a, das für eGFP kodiert, und dem Plasmid, das für das Hüllprotein LCMV-GP kodiert, transfiziert. Die Titration der retroviralen Zellkulturüberstände erfolgte auf der Indikatorzelllinie TE671.

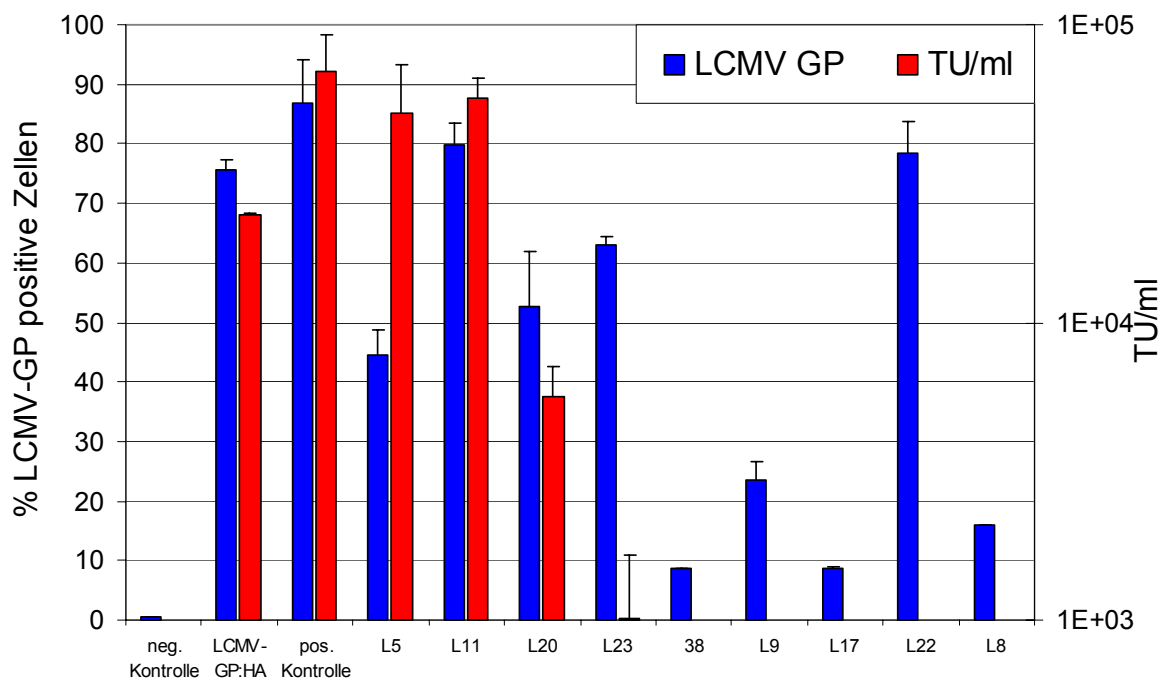


Abb. 17: LCMV-GP Oberflächenexpression auf 293T-Zellen und Pseudotypisierungsfähigkeit der mutierten GP-Klone aus L929-Zellen. In Blau: % der LCMV-GP positiven 293T-Zellen. In Rot: die eGFP Transfer Units (TU) der mutierten Klone pro ml. 293T-Zellen wurden hierfür mit einem für das Hüllprotein von LCMV-GP kodierenden Plasmid, einem gag-pol Plasmid und einem Plasmid, das für eGFP kodiert, transfiziert. 24 und 36 Stunden nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, filtriert und auf TE671-Zellen mit einem FACS basierten Assay titriert. Der eingezeichnete Fehlerbalken ist die mittlere Abweichung gewonnen aus zwei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen. Als Negativkontrolle wurden transfizierte 293T-Zellen ohne Plasmid Hüllprotein verwendet. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich zum LCMV-GP:HA Plasmid ein weiteres Plasmid M109 eingesetzt, das auch für LCMV-GP kodiert.

Die Expression der mutierten LCMV-GPs an der Oberfläche von 293T-Zellen korrelierte, bis auf Klon L23 und Klon L22, mit der richtigen Prozessierung im Western Blot. Diese GP wurden trotz einer verminderten Prozessierung, sichtbar an der schwächeren GP-2-Bande (Abb. 16), effizient auf der Zellmembran exprimiert.

Allerdings bildeten sie kaum bzw. keine MLV-Pseudotypen aus. Bei allen anderen im Western Blot positiven Klonen bildeten sich infektiöse MLV-Pseudotypen aus. Die fünf Klone, die im Western Blot keine oder nur eine GP-C-Bande zeigten, bildeten keine Pseudotypen, obwohl eine geringe LCMV-GP-Expression auf der Oberfläche der 293T-Zellen detektiert wurde. Es ist allerdings bekannt, dass auch ungeschnittene GP-Varianten eine Oberflächenexpression aufweisen können, aber keine infektiösen Partikel ausbilden [31]. Klon L5, der im Western Blot eine richtige Prozessierung aufwies, hatte eine geringere LCMV-GP-Oberflächenexpression im Vergleich zur Positivkontrolle. Da der Klon aber Pseudotypen ausbildete, könnte die geringe GP-Expression auch aus einer verminderten Bindung des Antikörpers KL25, der zur Detektion verwendet wurde, herrühren. Sieben der 11 untersuchten mutierten GP-Klone bildeten demnach keine infektiösen Partikel mehr aus. Mit diesen 64 % nicht funktionellen, untersuchten LCMV-GP-Klonen, kann man die Zahl aller 27 gefundenen mutierten GP-Klone berechnen, die nicht funktionell sind. Auf die gesamten, sowohl mutierten wie auch nicht mutierten, isolierten Klone berechnet, bilden 17 der 54 sequenzierten LCMV-GP-Klone keine infektiösen Partikel mehr aus. Dies entspricht 32 % der sequenzierten Klone, wobei die Klone mit wenigstens einer A→G Mutationen daran einen Anteil von 64 % haben.

5.3. Mutationen im LCMV-GP in LCMV-infizierten Mäusen

Um das Auftreten des A→G Mutationsmuster in der S-RNA von LCMV in L929-Zellen *in vivo* im Tiermodell zu überprüfen, wurden drei Monate alte C57BL/6 Mäuse intravenös mit LCMV ($1 \cdot 10^5$ IU) infiziert und täglich drei bzw. an Tag fünf fünf Mäuse getötet. Alle Milzen der Mäuse zeigten aufgrund der Immunreaktion gegen LCMV eine typische Gewichtszunahme im Verlauf der Infektion. Auch mittels einer RT-PCR konnte der Infektionsverlauf bestätigt werden: Aus dem Milzgewebe wurde RNA isoliert und in einer RT-Reaktion mit nachfolgender qPCR auf virale S-RNA eingesetzt (Abb. 18).

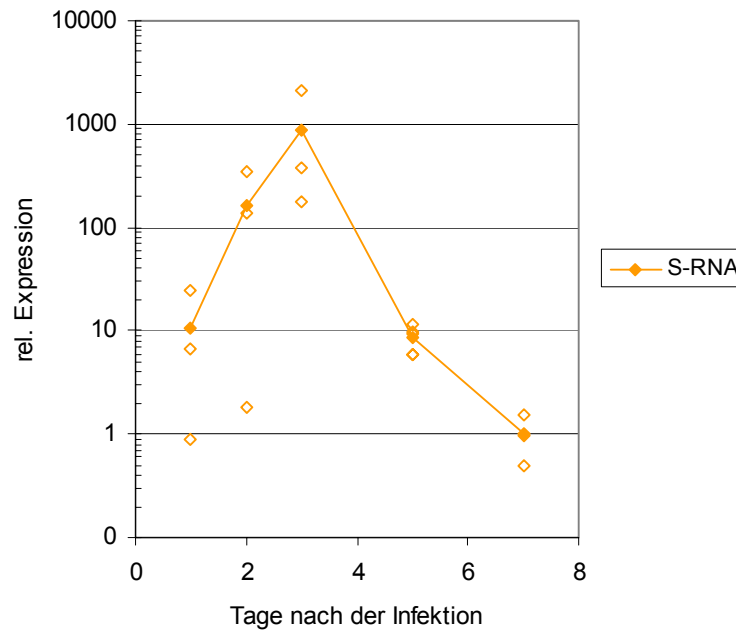


Abb. 18: Relative Expression der S-RNA von LCMV im Verhältnis zu GapDH in der Milz LCMV-infizierter Mäuse. Die gefüllten Symbole geben jeweils den Mittelwert von drei Mäusen (fünf an Tag fünf) wieder. Die offenen Symbole entsprechen dem Messwert einer Maus. Es wurden jeweils nach einem, zwei, drei, fünf und sieben Tagen Milzen entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend lysiert. Aus dem Lysat wurde RNA isoliert und diese für eine RT-Reaktion mit anschließender qPCR (siehe auch Kapitel 5.5), unter Verwendung der Primer seq up 5-seq low 4, eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Das S-RNA-Level stieg in den ersten drei Tagen nach der Infektion bis auf das 1000-fache im Vergleich zu Tag sieben nach der Infektion an. Die S-RNA-Expression von Tag sieben wurde auf eine relative Expression von eins festgelegt. Wie bei den L929-Zellen wurde bei den Mäusen der späte Zeitpunkt nach Tag sieben der Infektion, an dem die S-RNA-Menge gering ist, als Anfang der Persistenz von LCMV gewertet.

Für die Untersuchung der Mutationen im viralen GP wurde die cDNA mit einer PCR amplifiziert, das PCR-Produkt in einen Vektor kloniert, sequenziert (Abb. 19) und die mutierten GP auf Funktionalität hin untersucht. Hierbei wurde das Primerpaar S-RNA seq up29-low 856 eingesetzt (Abb. 13), das kurz nach dem Beginn des GP-2 endet, um eine größere Anzahl von einzelnen GP-Klonen sequenzieren zu können. Im Versuch mit L929-Zellen (siehe Kapitel 5.2) hatte sich gezeigt, dass die unterschiedlichen Primerpaare nicht das Mutationsmuster beeinflussten.

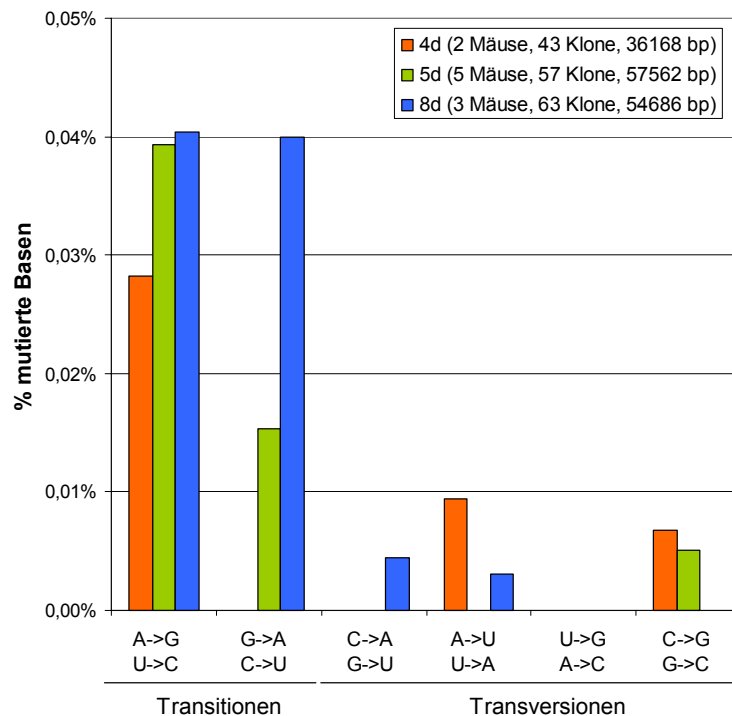


Abb. 19: Mutationsanalyse der Klone, die aus der RT-PCR von LCMV-infizierten Mäusemilzen gewonnen wurden. Die Graphik stellt jeweils die Summe aller gefundenen Mutationen eines Typs im Verhältnis zur Summe aller sequenzierten Basen dar. Die Klone an Tag vier und acht stammen aus einem, und die Klone an Tag fünf aus einem zweiten unabhängigen Versuch. In der Legende ist jeweils die Zahl der sequenzierten Klone und Basen angegeben.

Am Tag vier und fünf nach der Infektion waren 64 % aller Mutationen der GP-Klone A→G bzw. U→C Transitionen. Dieses Mutationsmuster ähnelt dem der aus L929-Zellen isolierten GP-Klone an Tag sieben nach der Infektion, unter denen ebenfalls hauptsächlich A→G Mutationen auftraten. Am Tag acht hingegen traten genauso viele A→G Mutationen wie G→A Gegenmutation auf. Zu diesem Zeitpunkt war der Höhepunkt der LCMV-GP-Expression weit überschritten und die S-RNA-Menge in der Milz war deutlich geringer als an Tag vier und fünf (Abb. 19). Hypermutierte Klone wurden an keinem untersuchten Zeitpunkt gefunden. Die Häufigkeit von Transitionen im Vergleich zu Transversionen lag bei 70 % an Tag vier und bei 92 % an Tag acht nach der Infektion. Die Fehlerrate im Genom von LCMV war in den Mäusen mit $4,4 \times 10^{-4}$ Fehlern an Tag acht nach der Infektion im Vergleich zu den L929-Zellen mit 20×10^{-4} Fehlern an Tag sieben nach der Infektion deutlich niedriger.

Tabelle 11: Übersicht über die LCMV-GP-Klone, die nach der Infektion von Mäusen mit LCMV isoliert wurden. Die grau unterlegten Klone wurden auf Expression des GPs überprüft. Mit einem Stern markierte Mutationen wurden durch A→G (U→C) Mutationen hervorgerufen.

Klon	AS 1	AS 2	Klon	AS 1	AS 2
9-10	7 M→V*		7-8	160 C→R*	
20-6	14 I→V*		12-6	176 D→G*	
11-21	50 L→P*		19-2	176 D→H	
18-7	50 + 1 Kodon		16-12	192 I→T*	
16-4	55 R→G*		11-1	210 W→stop	227 Y→C*
19-10	57 C→M		11-4	210 W→stop	
12-11	63 N→D*		12-5	217 T→A*	
12-9	73 Q→R*	258 K→M	9-19	218 T→S	
12-4	80 D→Y		12-15	221 S→G*	
11-16	81 M→V*		7-17	221 S→T	
10-1	92 C→Y		19-8	242 K→E*	
12-3	94 A→V		18-4	247 M→I	
9-3	108 L→P*		11-9	252 F→L*	
11-20	142 V→T*	165 G→S	7-8	252 F→L*	
10-7	160 C→Y		9-11	254 A→G*	
19-5	160 C→L*		20-3	255 E→G*	

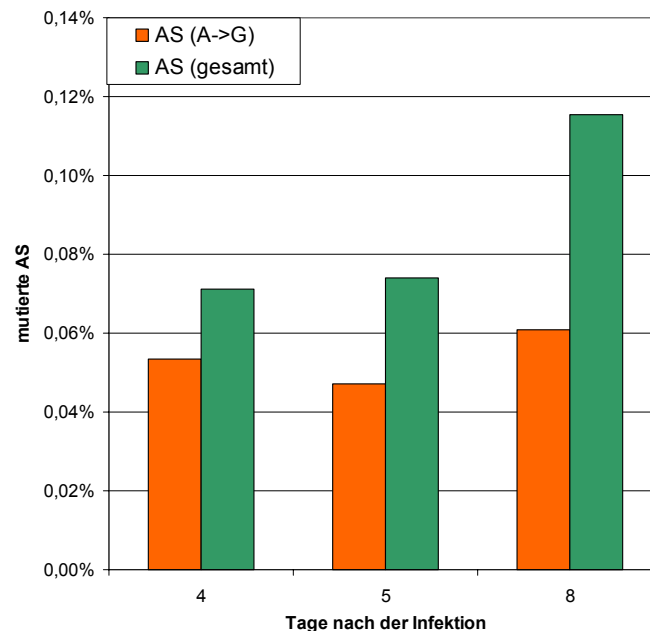


Abb. 20: Die Grafik zeigt die Zahl der mutierten AS im LCMV-GP im Verhältnis zur Gesamtzahl der sequenzierten Aminosäurekodons. Zusätzlich ist die Zahl der durch A→G (U→C) Transitionen hervorgerufenen Aminosäuremutationen dargestellt.

Insgesamt trugen 32 von 163 Klonen eine Aminosäuremutation im sequenzierten Bereich des LCMV-GP-1 (Tabelle 11). 20 Klone enthielten Aminosäureaustausche, die durch A→G (U→C) Mutationen hervorgerufen wurden.

Ein Klon an Tag fünf trug zudem noch eine Kodoninsertion (CUU) an der Position 225, was zu einer Insertion eines Prolin vor der Aminosäure-Position 50 des GP-C führte. Im Gegensatz zu den GP-Klonen, die aus L929 isoliert wurden, betraf keine Mutation eine potentielle Glykolysierungsstelle des LCMV-GP. Wie *in vitro* mit LCMV-infizierten L929-Zellen gezeigt, stieg auch hier die Zahl der mutierten Aminosäuren im LCMV-GP während des Infektionsverlaufs an. Hierbei blieb die Zahl der durch A→G verursachten Aminosäuremutationen annähernd konstant. In L929-Zellen wurden absolut 0,4 % Aminosäureaustausche detektiert und in den Mäusen an Tag acht nach der Infektion nur 0,12 %. In den infizierten Mäusen wurde deutlich, dass A→G bzw. U→C Mutationen an Tag vier und fünf nach der Infektion 72 % der Aminosäuremutationen im LCMV-GP bewirken (Abb. 20). An Tag acht nach der Infektion hingegen wurden nur 53 % aller Aminosäuremutationen durch A→G Mutationen verursacht. In LCMV-infizierten Mäusen kam es demnach während der Infektion zuerst zu einer Akkumulation von Aminosäureaustauschen im viralen GP, die durch A→G Transitionen verursacht werden. Im weiteren Verlauf der Infektion kamen an Tag acht zu den A→G Transitionen auch die gleiche Zahl an G→A Transitionen dazu. Für die weiteren Analysen der mutierten GP-Klone wurden die Klone von Tag acht verwendet, da dieser Zeitpunkt der späten Phase der LCMV-Infektion entspricht.

5.3.1. Expression der mutierten LCMV-GP-Klone aus muriner Milz

Um die aus Mäusen isolierten LCMV-GP-Mutanten auf korrekte Expression und Prozessierung zu überprüfen, wurden neun zufällig ausgewählte Varianten in ein Expressionsplasmid für LCMV-GP:HA umklont. Durch Pseudotypisierung von MLV-Partikeln können ferner die GP-Klone auf Infektiosität und Funktionalität untersucht werden [93].

Die korrekte Expression und Prozessierung wurde im Western Blot überprüft. Die LCMV-GP-Klone wurden in den Expressionsvektor M243_HA mit dem EF1- α -Promotor umklont. Die Detektion erfolgte wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben.

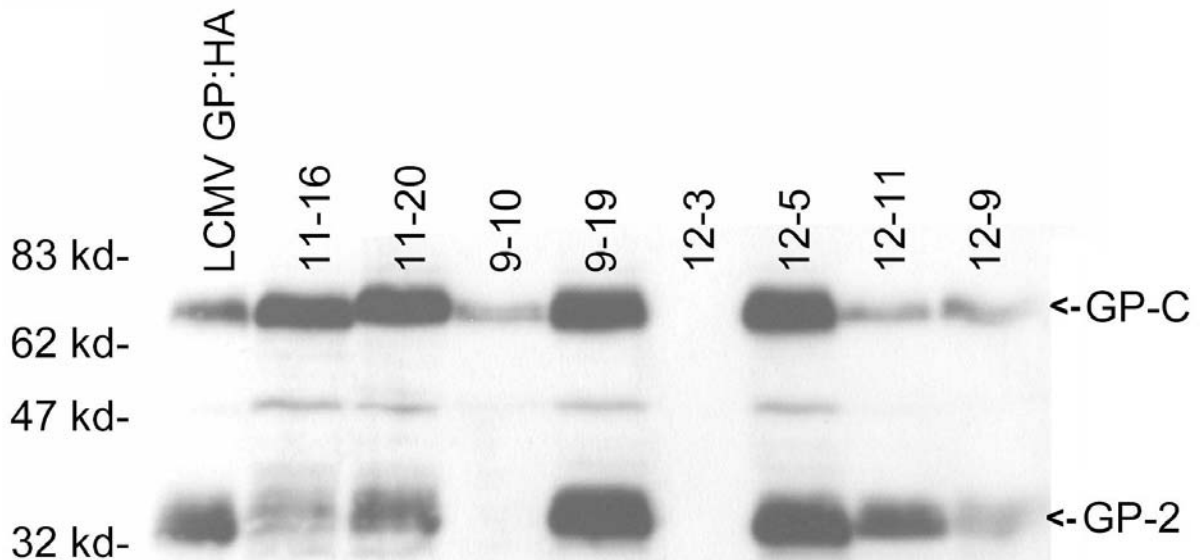


Abb. 21: Anti HA-Tag Western Blot der mutierten LCMV-GP-Klone. Man sieht das prozessierte GP-2 und das ungespaltene GP-C. 293T-Zellen wurden mit den Plasmiden kodierend für LCMV-GP:HA transfiziert, zwei Tage später lysiert und in einem denaturierenden Western Blot eingesetzt. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot. Die Probe 10-7 ist in Blot B Abb. 16 aufgetragen.

Im Western Blot (Abb. 21) sieht man, dass Klon 9-19 und 12-5 sowohl eine GP-C als auch eine ähnlich starke GP-2-Bande aufwiesen. Diese Klone exprimierten im Vergleich zur Positivkontrolle (LCMV-GP:HA) höher, die Verteilung der Banden von GP-C zu GP-2 hingegen ist gleich. Der Klon 12-9 dagegen wurde insgesamt schwächer exprimiert. Beim Klon 11-20 war die GP-2-Bande schwächer als die GP-C-Bande. Dies war bei Klon 11-16 noch stärker ausgeprägt und könnte auf eine unvollständige Spaltung hindeuten. Der Klon 12-11 wies eine schwächere GP-C-Bande im Vergleich zu GP-2 auf. Bei Klon 9-10 und 10-7 (Abb. 16 B) war keine GP-2-Bande zu erkennen, sondern nur die ungespaltene GP-C-Bande. Der Klon 12-3 zeigte im Western Blot keine Bande – es wurde kein Protein mit HA-Tag gebildet. Insgesamt wurden von neun analysierten Klone drei nicht gespalten bzw. exprimiert und drei weitere Klone hatten ein von der Positivkontrolle abweichendes Verhältnis von GP-C zu GP-2.

Um die Expression an der Oberfläche zu überprüfen, wurde ein weiterer Teil der Zellen mit einem anti LCMV-GP-Antikörper angefärbt und durchflusszytometrisch vermessen. Auch hier wurden die Zellkulturüberstände der transfizierten 293T-Zellen gesammelt und auf einer Indikator-Zelllinie titriert, um die Pseudotypisierungsfähigkeit der einzelnen LCMV-GP-Klone zu überprüfen.

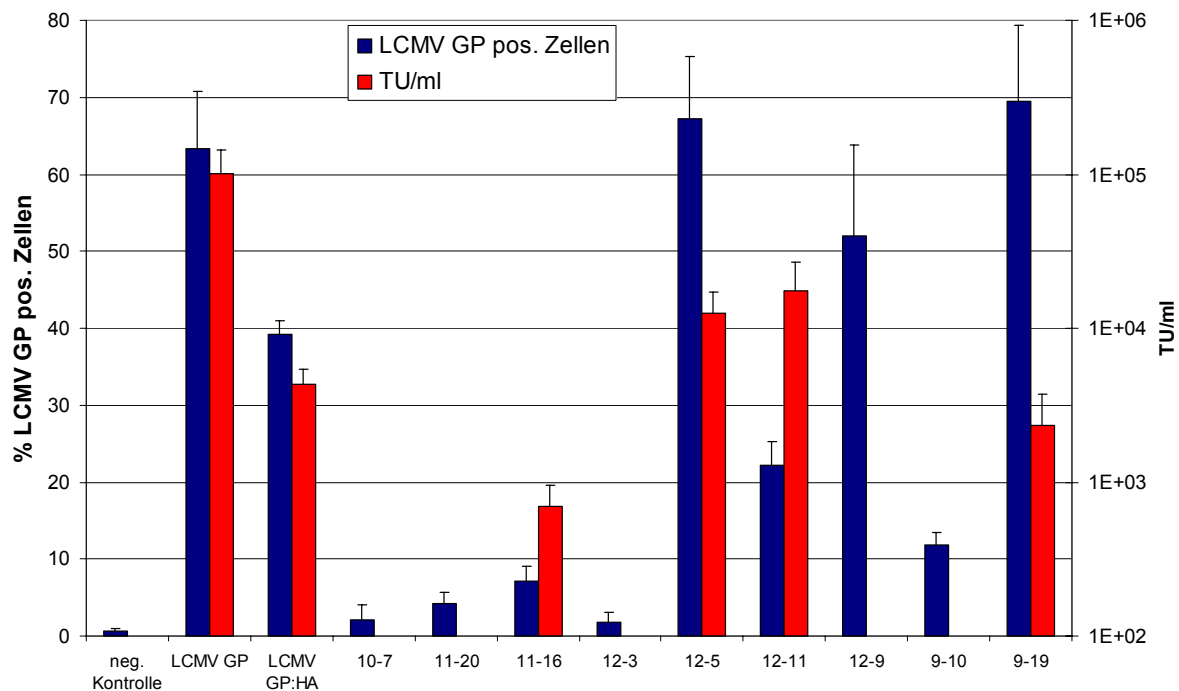


Abb. 22: Die LCMV-GP-Oberflächenexpression auf 293T-Zellen und die Pseudotypisierungsfähigkeit der mutierten LCMV-GP-Klone aus der Maus. Blau: % der LCMV-GP positiven 293T-Zellen. Rot: die eGFP Transfer Units (TU) der mutierten Klone pro ml. 293T-Zellen wurden hierfür mit einem für das LCMV-GP kodierenden Plasmid transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen LCMV-GP gefärbt und im FACS vermessen. Der eingezeichnete Fehlerbalken ist die mittlere Abweichung gewonnen aus zwei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Als Positivkontrolle diente zusätzlich zum LCMV-GP:HA ein weiteres Plasmid M108, das für LCMV-GP ohne HA Tag kodiert. Die Pseudoviren wurden durch eine Verpackung des retroviralen Vektors M56a erzeugt, der für eGFP als Markergen kodiert, mit den mutierten LCMV-GP-Klonen als Hüllprotein und dem Plasmid M57, das für die gag und pol Sequenzen kodiert. Die Titration der Zellkulturüberstände erfolgte auf TE671-Zellen.

Die Expression des LCMV-GP war um 30 % höher als die des LCMV-GP:HA (Abb. 22). Der HA-Tag könnte den Transport an die Zelloberfläche stören, da die basische C-terminale Sequenz des GP-2 von entscheidender Bedeutung hierfür ist [31]. Dies wurde auch deutlich am geringeren Titer der MLV-Pseudoviren, die als Hüllprotein LCMV-GP:HA tragen. Die Klone 12-5 und 9-19 wiesen dennoch eine höhere Expression als LCMV-GP und LCMV-GP:HA auf. Dies könnte durch eine stärkere Protein-Expression verursacht sein, die im Western Blot (Abb. 21) ersichtlich wurde. Die LCMV-GP-Oberflächenexpression (Abb. 22) korrelierte bei den einzelnen GP-Klonen mit der korrekten Prozessierung im Western Blot (Abb. 21). Einzig Klon 9-10 wies eine geringe GP-Oberflächenexpression auf, obwohl im Western Blot keine Spaltung des GP-C in GP-2 erkennbar war. Ausgenommen Klon 12-9 pseudotypisieren auch alle im Western Blot korrekt prozessierten LCMV-GP-Klone.

Obwohl mit dem Klon 11-16 transfizierte Zellen nur eine schwache GP-2-Bande im Western Blot zeigten und kaum LCMV-GP auf der Zelloberfläche nachweisbar war, synthetisierten die Zellen einen geringen Titer an Pseudovirionen.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass nur vier von neun untersuchten LCMV-GP-Varianten der Klone an Tag acht nach der Infektion der Mäuse eingeschränkt funktionell waren und infektiöse Partikel ausbildeten. Die anderen LCMV-GP-Varianten exprimierten nur schwach LCMV-GP an der Oberfläche der transfizierten Zellen und bildeten keine funktionellen MLV-Pseudotypen. Hochgerechnet auf alle sequenzierten Klone, bilden an Tag acht der Infektion 15 % aller 63 LCMV-GP-Klone keine infektiösen MLV-Pseudotypen aus. A→G Transitionen induzierte Aminosäuremutationen hatten daran einen Anteil von 60 %. Auch hier wurde, wie in L929-Zellen sieben Tage nach der Infektion, ein Großteil der nicht infektiösen Klone durch A→G Transitionen verursacht. Zur Übersicht sind in Tabelle 12 die Daten der mutierten LCMV-GP-Klone, die aus infizierten L929-Zellen und Mäusen isoliert wurden, dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht über die Mutationen in der aus L929-Zellen und Mäusen isolierten S-RNA.

	Fehlerrate pro Basenpaar	Anteil an A→G Mutationen	Anteil an LCMV-GP Klonen mit Amino- säure Mutationen	Anteil an nicht infektiösen LCMV-GP Klonen
L929 7 d	20×10^{-4}	75 %	27 (13*) von 54	6 (4*) von 11(5*)
C57BL/6 4 & 5 d	$2,8 \times 10^{-4}$	65 %	18 (12*) von 100	nicht untersucht
C57BL/6 8 d	$4,4 \times 10^{-4}$	50 %	14 (9*) von 63	7 (4*) von 11(7*)

* Klone, in denen mindestens ein Aminosäureaustausch durch A→G Mutation hervorgerufen wird.

5.4. Ursache des Mutationsmusters im LCMV-GP

Sowohl in LCMV-infizierten L929-Zellen als auch in Mäusen zeigte sich, dass mit vermehrten Mutationen in der viralen S-RNA ebenfalls ein Rückgang der LCMV-Replikation bzw. der LCMV-GP-Expression auf der Zelloberfläche einhergeht. Die häufigsten Mutationen im LCMV-GP -mit einem Anteil von 75 % in L929-Zellen sieben Tage und 64 % in Mäusen vier und fünf Tage nach der Infektion- waren A→G bzw. U→C Transitionen. Diese Mutationen führen teilweise zu fehlerhaft exprimiertem LCMV-GP.

Die A→G Mutationen könnten durch die zytoplasmatische ADAR-1 verursacht werden, die in dsRNA Adenosin zu Inosin desaminiert. Inosin, das mit Cytidin paart, wird von Polymerasen als Guanosin erkannt. Die Interferon- α und - γ -induzierbare ADAR-1 wäre damit Teil der IFN-abhängigen Immunabwehr gegenüber Viren. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde die Expression der iADAR-1 bei der Infektion von Zellen und Mäusen mit LCMV untersucht.

5.5. Niveau der mRNA-Expression der iADAR-1 bei der LCMV-Infektion

Um die Expression der iADAR-1 auf mRNA-Ebene zu quantifizieren, wurde eine qPCR auf einem iCycler durchgeführt. Detektiert wurde das PCR-Produkt mit dem interkalierenden SYBR Green [117]. Als Referenzgen diente entweder murines oder humanes GapDH. Die Auswertung erfolgte mit dem qGene96 Microsoft® Excel Makro [109]. Vor der Durchführung der qPCR wurde sichergestellt, dass die eingesetzten Primer eine Effizienz zwischen 90 und 110 % (laut der iCycler Software) aufwiesen und die mRNA nicht mit DNA kontaminiert war. Um DNA-Kontaminationen zu detektieren, wurde jeweils eine RNA-Probe der Versuchsreihe ohne reverse Transkriptase in der PCR eingesetzt. Um einen Vergleich zu erleichtern, sind in den folgenden Abbildungen die Werte immer relativ zu nicht infizierten Zellen angegeben.

5.5.1. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten L929-Zellen

Murine L929-Zellen wurden mit LCMV mit verschiedener MOI infiziert oder mit murinem rekombinanten IFN- α stimuliert (1000 U/ml). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion, wurden die Zellen direkt in Lysepuffer aufgenommen und anschließend RNA extrahiert. Eine RT-Reaktion mit anschließender qPCR unter Verwendung der Primerpaare mPKR up1-low1 und mADAR up1-low1 folgte. Als Kontrolle für die Induktion des IFN- α/β -Signaltransduktionsweges durch LCMV wurde die mRNA-Expression der PKR ebenfalls bestimmt. Dieses Enzym ist ein Hauptregulator der IFN-abhängigen Immunantwort in infizierten Zellen.

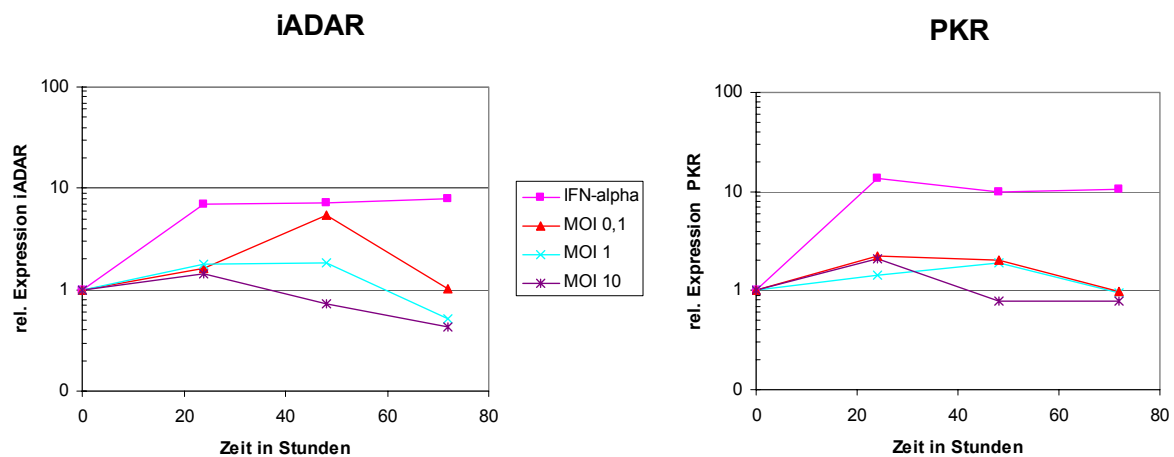


Abb. 23: Relative Expression der iADAR-1 und PKR im Verhältnis zu GapDH in L929-Zellen nach IFN- α -Stimulation oder Infektion mit LCMV. Es wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion L929-Zellen lysiert und RNA extrahiert. Letztere wurde für eine RT-Reaktion und anschließender qPCR auf iADAR-1 und PKR eingesetzt.

Die mRNA von iADAR-1 wurde durch die Infektion mit LCMV (MOI 0,1) in L929-Zellen um das 5-fache hochreguliert (Abb. 23). Bei einer höheren MOI von zehn bzw. eins wurde die iADAR-1 maximal um das 1,5- bis 2-fache hochreguliert. Im Laufe der Infektion sank die Expression, die bei 48 Stunden ihr Maximum erreichte, wieder stark ab und war bei einer MOI von eins und zehn niedriger als die Ausgangsexpression. Die PKR wurde bei allen drei eingesetzten MOIs um das 2-fache durch LCMV hochreguliert und die erhöhte Expression zeigte die Initialisierung des IFN-Signaltransduktionsweges der unspezifischen Immunabwehr; auch hier führte eine geringere MOI zu einer etwas höheren Expression. IFN- α führte sowohl bei der PKR als auch bei der iADAR-1 zu einer 10-fach stärkeren Expression als in nicht infizierten Zellen. Durch IFN- α Gabe erreichte die iADAR-1- und PKR-Expression schon 24 Stunden nach der Stimulation das Maximum und verblieb dort.

5.5.2. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde, wie auch die L929-Zelllinie, auf erhöhte Expression der iADAR-1 nach der Infektion mit LCMV untersucht. Für diese Zelllinie wurde gezeigt, dass IFN- α die iADAR-1-Expression um das 10-fache stimuliert [118].

Auch hier wurde, wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben, eine qPCR mit dem Primerpaar hADAR up1-low1 durchgeführt. In diesem Versuch wurden SH-SY5Y-Zellen mit 1000 U/ml humanem rekombinanten IFN- α stimuliert.

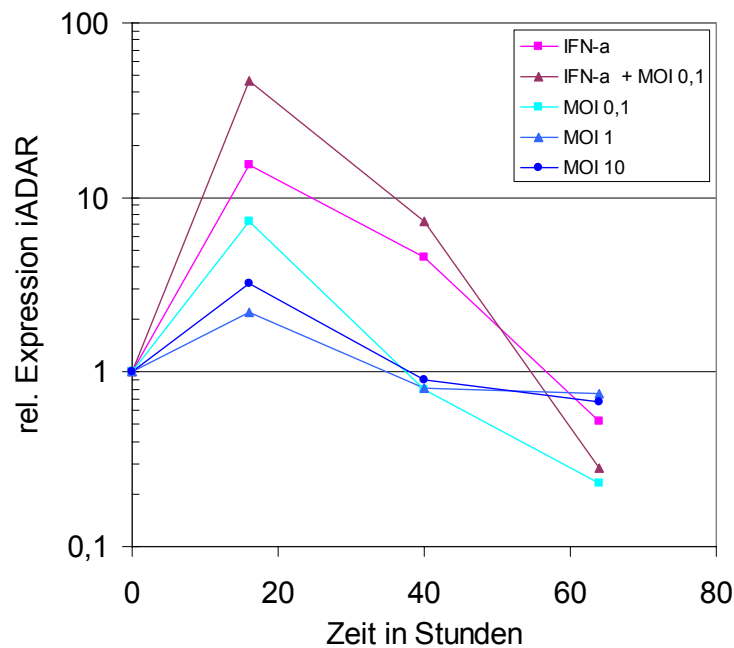


Abb. 24: Relative Expression der iADAR-1 im Verhältnis zu GapDH in SH-SY5Y-Zellen nach IFN- α -Stimulation und LCMV-Infektion mit verschiedener MOI. Es wurden jeweils nach 16, 40 und 64 Stunden Zellen lysiert und RNA isoliert. Letztere wurde für eine RT-Reaktion und anschließende qPCR auf iADAR-1 eingesetzt. Die Grafik stellt einen repräsentativen Versuch dar.

In den LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen wurde die mRNA der iADAR-1 bis zu 7-fach höher exprimiert als in nicht infizierten Zellen. IFN- α stimulierte auch hier wie in L929-Zellen eine mehr als 15-fache erhöhte Expression der iADAR-1, was mit den Literaturdaten übereinstimmt [118]. Kombinierte man die Gabe von IFN- α mit der Infektion der Zellen eine Stunde später, war die Expression der iADAR-1 nochmals erhöht. Nach 72 Stunden wurde deutlich, dass auf das Maximum der iADAR-1-Expression nach 24 Stunden wieder eine Herunterregulation folgte und zwar auf ein niedrigeres Niveau als das Ausgangsniveau. Das Maximum der iADAR-1-Expression in LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen war 24 Stunden früher erreicht als in infizierten L929-Zellen.

5.5.3. mRNA-Expression der iADAR-1 in LCMV-infizierten Mäusen

mRNA aus den LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen (siehe Kapitel 5.3) wurde ebenfalls für die qPCR eingesetzt, um auch hier die Expression der iADAR-1 nach der Infektion mit LCMV zu messen. Zur Bestimmung der Induktion des IFN-Signaltransduktionsweges wurde zusätzlich die Expression der PKR bestimmt.

Die RNA wurde hierfür aus den Milzen der infizierten Mäuse isoliert. Es wurde eine RT-Reaktion mit Random-Primern und anschließend eine qPCR unter Verwendung der Primerpaare mPKR up1-low1, mADAR up1-low1 und seq up5-seq low4 durchgeführt. Zusätzlich wurde hier mit dem letzten Primerpaar noch das Expressionsniveau der viralen S-RNA bestimmt.

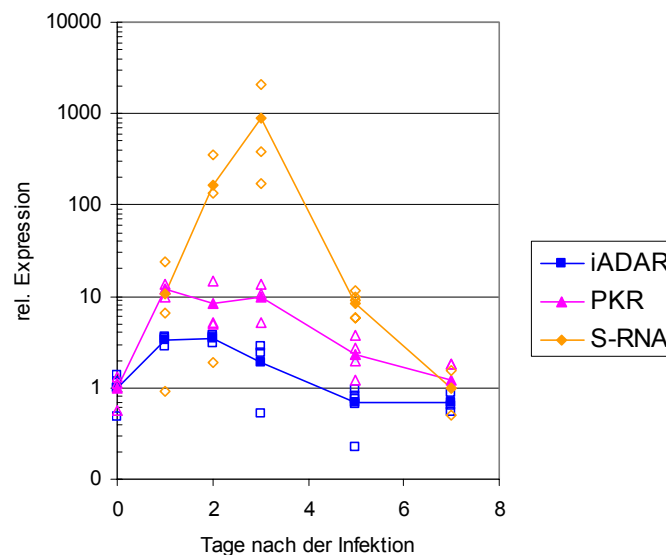


Abb. 25: Relative Expression der iADAR-1, der PKR und der S-RNA von LCMV im Verhältnis zu GapDH in der Milz LCMV-infizierter Mäuse. Die gefüllten Symbole geben jeweils den Mittelwert von drei Mäusen (fünf an Tag fünf) wieder. Die offenen Symbole entsprechen dem Messwert einer Maus. Es wurden jeweils nach einem, zwei, drei, fünf und sieben Tagen Milzen entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend lysiert. Aus dem Lysat der einzelnen Milzen wurde RNA isoliert und diese für eine RT Reaktion mit anschließender qPCR auf iADAR-1, PKR und S-RNA eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen.

In Mäusen wurde die iADAR-1 einen Tag nach der Infektion um das 4-fache und die PKR um das 12-fache hochreguliert. Die S-RNA wurde auf eine relative Expression von eins an Tag sieben gesetzt, da an Tag Null in nicht infizierten Mäusen keine S-RNA detektierbar war. Die S-RNA Expression erreichte ihr Maximum an Tag drei nach der Infektion. Die iADAR-1- und PKR- Expression nahm mit dem Anstieg der S-RNA Menge zu und hielt das maximal erreichte Niveau bis Tag drei. Danach fiel die Expression der iADAR-1 und PKR genauso wie die der S-RNA an Tag drei wieder ab.

Im Vergleich zu L929-Zellen war die iADAR-1-Induktion ähnlich stark, aber die PKR-Expression war in der Milz deutlich höher. Die Situation in der Milz unterscheidet sich allerdings von der Zellkultur. Zum einen, da die Immunantwort auf die LCMV-Infektion nicht nur auf die direkten antiviralen Effekte der infizierten Zelle, wie z.B. die IFN- α/β Sekretion, beschränkt ist. Zum anderen kommen in der Milz T-Zellen, Makrophagen und andere Immuneffektorzellen zum Tragen, die ihrerseits Zytokine wie z.B. IL-12, IFN- α und IFN- γ ausschütten [49]. Des Weiteren ist die Zelldichte in der Milz deutlich höher, so dass parakrine Effektoren wie ausgeschüttete Zytokine allein durch die höhere lokale Konzentration eine bessere Wirkung zeigen. Dadurch ergeben sich zwangsläufig Unterschiede zwischen dem *in vitro* System wie L929 und diesem Mausmodell.

5.6. IFN- α -Niveau in LCMV-infizierten Zellen und Mäusen

Die mRNA-Expression der iADAR-1 nahm, sowohl in humanen und murinen Zellen als auch *in vivo* in der Maus, durch eine Infektion mit LCMV schwach zu. Dies traf im murinen System auch auf die PKR zu. Um zu klären, ob die iADAR-1 und PKR mRNA-Expression mit der Ausschüttung von IFN- α korreliert, wurde dies mittels eines anti IFN- α ELISA's genauer bestimmt. Hierdurch wurde die Kinetik der IFN- α -Regulation der iADAR-1- und PKR-Expression genauer definierbar.

Im Überstand humaner LCMV-infizierter Zellen (293-, TE671- und SH-SY5Y-Zellen) konnte kein IFN- α detektiert werden. Die untere Nachweisgrenze des ELISA's waren 25 pg IFN- α pro Milliliter Zellkulturüberstand. Daraufhin wurde der Gehalt an IFN- α und IFN- γ im Serum der LCMV-infizierten Mäuse bestimmt (Abb. 26). IFN- γ wurde in der Maus zusätzlich bestimmt, da sowohl die iADAR-1 als auch die PKR durch IFN- γ stimulierbar sind [64, 119, 120]. In den Zellkulturüberständen wurde der IFN- γ -Gehalt nicht gemessen, da Fibroblasten kein IFN- γ sezernieren.

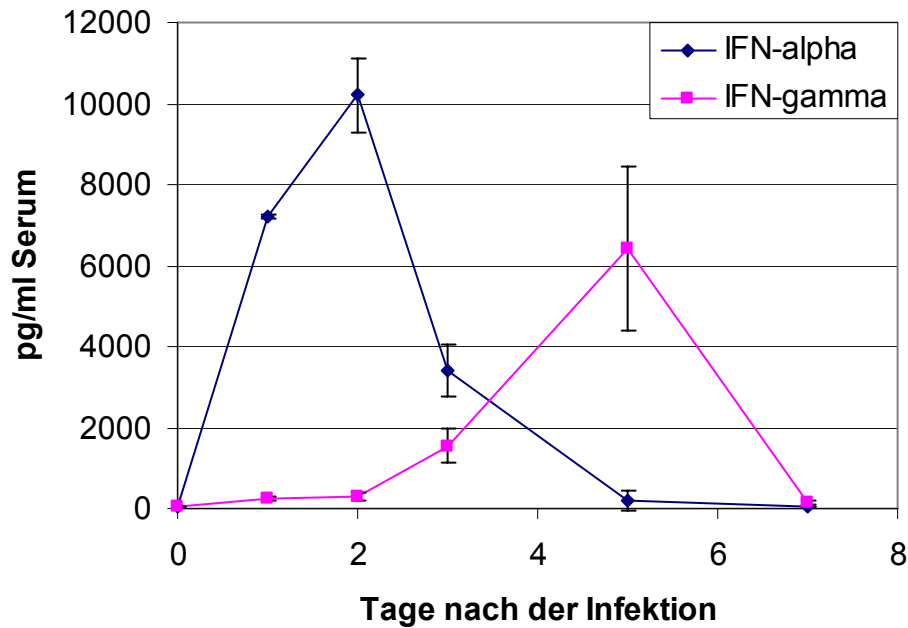


Abb. 26: IFN- α und IFN- γ ELISA mit dem Serum LCMV-infizierter Mäuse. Zu jedem Zeitpunkt wurde je drei Mäusen (fünf an Tag fünf) Blut entnommen und eingefroren.

In Mäusen korrelierte der erhöhte IFN- α Level im Serum zu Beginn der Infektion mit der erhöhten mRNA Expression der PKR und iADAR-1 (siehe Kapitel 5.5.3). Beide Proteine wurden deutlich schwächer exprimiert als der IFN- α Gehalt im Blut wieder unter die Detektionsgrenze von 25 pg/ml sank. Die Kinetik des IFN- α Levels im Serum korrelierte auch mit dem Infektionsverlauf von LCMV und entspricht den Literaturdaten [121]. IFN- α wird zu Beginn der Infektion in großen Mengen ausgeschüttet und sinkt beim Rückgang der Infektion schnell wieder ab. Die IFN- γ Konzentration erreichte ihr Maximum im Serum deutlich später wie oben beschrieben [122]; dies entspricht der späteren T-Zell vermittelten Immunabwehr, die nach der unspezifischen Immunreaktion folgt.

Es bleibt offen, ob die iADAR-1 durch auto- oder endokrin ausgeschüttetes IFN- α oder direkt durch die Infektion mit LCMV und der dabei möglicherweise entstehenden dsRNA induziert wird. In Mäusen stimmte jedoch die Kinetik der IFN- α -Ausschüttung mit der der iADAR-1- und PKR-Induktion überein. Durch IFN- γ wurde weder die iADAR-1 noch die PKR in stärkerem Maße induziert (siehe Kapitel 5.5.3), obwohl dies zu erwarten gewesen wäre, da beide Proteine *in vitro* IFN- γ stimulierbar sind.

5.7. Induktion der iADAR-1 durch LCMV auf Proteinebene

Um die Induktion der iADAR-1 mRNA-Transkription bei der LCMV-Infektion von Zellen (siehe Kapitel 5.5) auf Proteinebene zu verifizieren, wurden SH-SY5Y-Zellen mit LCMV infiziert und mit den infizierten Zellen ein Western Blot durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür abtrypsiniert, mit PBS gewaschen, lysiert und im Auftragspuffer gekocht. Die Proben wurden über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit einem polyklonalen anti ADAR-1-Antiserum detektiert. Das anti ADAR-1-Antiserum erkennt ein Epitop am C-terminalen Ende der ADAR-1. Dadurch bindet das Antiserum an alle „Splice“-Varianten der ADAR-1 und sind so auf dem Western Blot nachweisbar. Als Ladekontrolle des Western Blots dient ein anti Phospholipase C- γ -Antikörper (PLC- γ), da PLC- γ konstitutiv exprimiert wird und ein ähnliches Molekulargewicht (148 kD) wie die iADAR-1 aufweist.

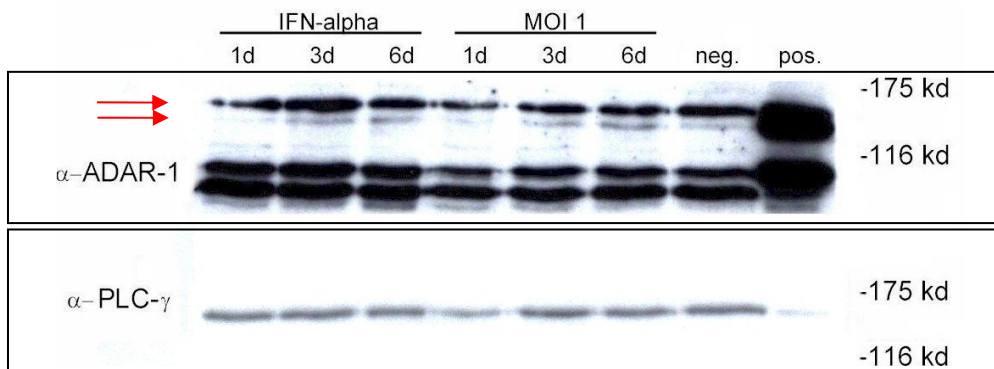


Abb. 27: Western Blot von LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen. Die Anfärbung erfolgte mit einem anti ADAR-1-Antikörper, der sowohl die lange als auch die kurze Form der ADAR-1 detektiert. Die Membran wurde gestrippt und anschließend mit einem anti PLC- γ -Antikörper als Ladungskontrolle gefärbt. Die Negativkontrolle sind unbehandelte SH-SY5Y-Zellen, die drei Tage nach Kulturbeginn lysiert wurden. Die roten Pfeile kennzeichnen die IFN- α induzierbare iADAR-1. Die Positivkontrolle besteht aus 293T-Zellen, in denen die iADAR-1 überexprimiert wurde (siehe Kapitel 5.11).

Auf dem Western Blot (Abb. 27) sieht man, wie die iADAR-1 (rote Pfeile) durch IFN- α induziert wurde. Die iADAR-1 bildete in SH-SY5Y-Zellen, wie in der Literatur beschrieben [84], eine Doppelbande aus. Durch die LCMV-Infektion ist diese Induktion etwas schwächer ausgeprägt, aber gut an der unteren Doppelbande erkennbar. Die Bildung des Proteins stimmte mit den qPCR-Daten überein; es kam zu einer schwachen Induktion der iADAR-1 bei einer Infektion mit einer MOI von

eins. Die Expression des iADAR-1-Proteins erfolgte aufgrund der langsameren Proteinsynthese etwas später als die der mRNA.

Da kein Antikörper gegen murine iADAR-1 erhältlich war, wurde der Versuch mit 293-Zellen statt mit L929-Zellen wiederholt (Abb. 28).

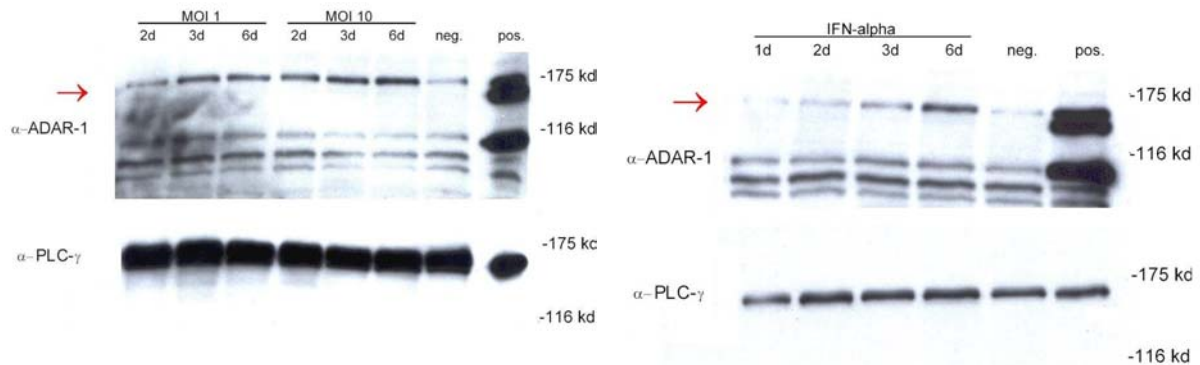


Abb. 28: Western Blot von LCMV-infizierten 293-Zellen. Die Anfärbung erfolgte mit einem anti ADAR-1-Antikörper, der sowohl die lange als auch die kurze Form der ADAR detektiert. Die Membran wurde gestriipt und anschließend mit einem anti PLC- γ -Antikörper als Ladungskontrolle gefärbt. Der rote Pfeil gibt die Position der iADAR-1 an. Die Positivkontrolle besteht aus lysierten 293T-Zellen, in denen die iADAR-1 überexprimiert wurde (siehe Kapitel 5.11). Die Negativkontrollen sind jeweils unbehandelte 293-Zellen die drei bzw. sechs Tage nach Kulturbeginn lysiert wurden.

Auch in 293-Zellen wurde die Induktion der iADAR-1 durch IFN- α -Stimulation deutlich. Die Infektion mit LCMV bei einer MOI von eins und zehn führte zu einer verstärkten Expression der iADAR-1. Hier war im Gegensatz zu den SH-SY5Y-Zellen nur eine Bande bei \sim 150 kD erkennbar. Die Doppelbande in SH-SY5Y-Zellen könnte durch differenzielles „Splicen“ der iADAR-1 entstehen [84], wodurch ein Protein exprimiert wird, das 26 oder 35 Aminosäuren weniger enthält.

In beiden Zelllinien wurde durch die Infektion mit LCMV und durch die Stimulation mit IFN- α die iADAR-1 verstärkt exprimiert. Allerdings zeigte sich auch deutlich, dass außer der kurzen Form der ADAR-1, welche konstitutiv exprimiert wurde, ebenfalls die iADAR-1 endogen schwach exprimiert wurde.

5.8. Editierungs-Aktivität der iADAR-1 in LCMV-infizierten Zellen

Die Aktivität der ADAR-1 wird vom Vaccinia Virus Protein E3L und auch der VAI RNA des Adenovirus inhibiert [5, 6]. Obwohl eine LCMV-Infektion die iADAR-1 mRNA- und Protein-Expression induzierte, könnte auch hier ein virales Protein oder RNA die Aktivität der iADAR-1 inhibieren. Dies wurde anhand einer Aktivitätsbestimmung der

ADAR-1 bei der Infektion von SH-SY5Y-Zellen überprüft. Die A→I Editierungs-Aktivität der ADAR-1 wurde mit dem RNA-Element B13 gemessen (Abb. 27).

Das B13 RNA-Element stellt einen Teil des Glutamatrezeptors B (GluR/B) dar, der *in vivo* und *in vitro* zu 87 % an der +60 Stelle editiert wird [75, 123]. Der retrovirale Vektor M265 kodiert das B13 RNA-Element und enthält als Kontrollgen zusätzlich eGFP.

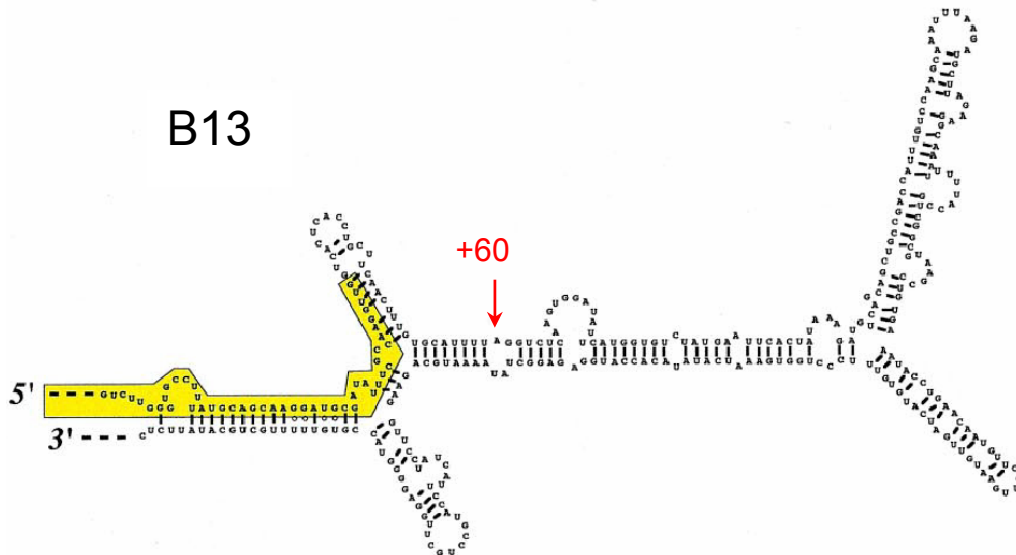


Abb. 29: Angenommene Faltung des B13 RNA-Elements, das einen Teil des GluR/B darstellt (Adaptiert von [75]). Das Exon ist gelb unterlegt und im Intron befindet sich die mit einem roten Pfeil markierte +60 Editierungsstelle. Diese wird spezifisch von der iADAR-1 editiert; Adenosin wird zu Inosin desaminiert.

Für die Aktivitätsbestimmung der ADAR-1 wurde das Plasmid M265 in SH-SY5Y-Zellen transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit LCMV-infiziert oder mit IFN- α stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde zwei Tage nach der Infektion aus den Zellen isoliert und anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt, um alle Reste der Plasmid-DNA zu entfernen. Der von der ADAR-1 editierbare Bereich des B13 RNA-Elements wurde danach mit dem Primerpaar B13 up/low durch eine RT-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und anhand einer Eichgerade der Grad der Editierung an der +60 Stelle bestimmt. Dafür wurde aus dem Elektropherogramm das Verhältnis von Adenosin- zu Guanodin-Peak entnommen (Abb. 30), da das Inosin von der PFX-Polymerase als Guanodin erkannt wird.

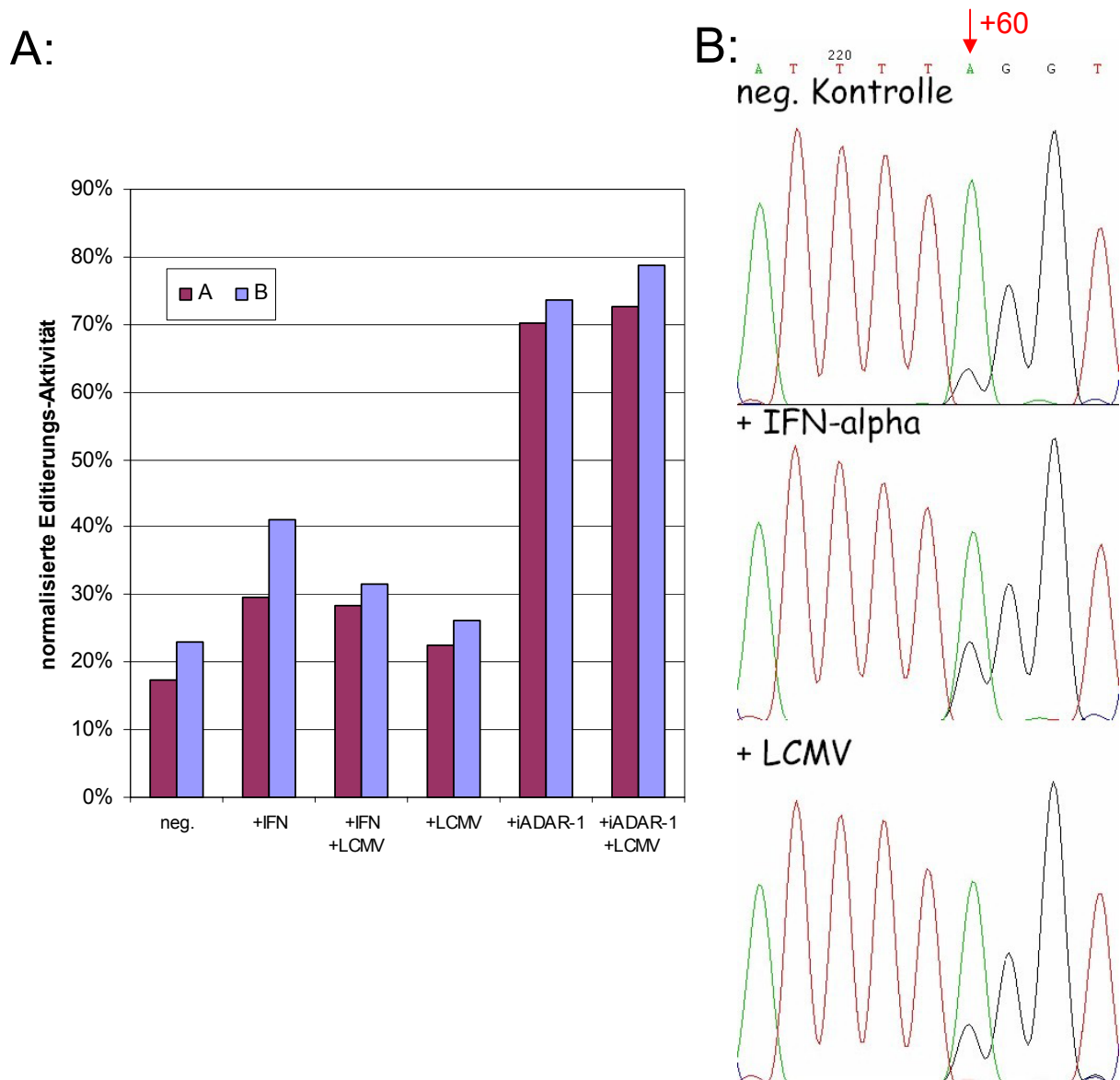


Abb. 30: Die ADAR-1 Editierungs-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen zwei Tage nach der Infektion mit LCMV (MOI 0,1) oder die Stimulation mit IFN- α . Als Positivkontrolle diente die Überexpression der iADAR-1 (siehe Kapitel 5.10) in SH-SY5Y. A: Das Balkendiagramm stellt jeweils zwei unabhängige Ansätze dar. B: Drei repräsentative Elektropherogramme sind zum besseren Verständnis dargestellt. Der rote Pfeil gibt die Position der +60 Editierungsstelle an.

Die Editierungs-Aktivität der iADAR-1 stieg sowohl in IFN- α -behandelten als auch in LCMV-infizierten Zellen zwei Tage nach der Infektion leicht an. Der Aktivitäts-Anstieg der ADAR-1 ist in den IFN- α -behandelten Zellen höher als in den Zellen, die mit LCMV-infiziert wurden. Dies korreliert mit der erhöhten iADAR-1-mRNA-Expression der IFN- α -behandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu LCMV-infizierten Zellen (siehe qPCR Kapitel 5.5.2). Durch Überexpression der iADAR-1 sind ~70 % der Transkripte an der +60 Stelle von A→G(I) editiert. Die Zellen, die nach der iADAR-1-Transfektion mit LCMV-infiziert wurden, zeigten eine etwas stärkere Editierungs-Aktivität der ADAR als Zellen, die nicht infiziert wurden.

Im Vergleich zu IFN- α -behandelten SH-SY5Y-Zellen ist die Editierungs-Aktivität in Zellen, die mit IFN- α -behandelt und zusätzlich mit LCMV-infiziert wurden, kaum abgeschwächt. LCMV inhibierte demnach nicht wesentlich die iADAR-1-Aktivität an der GluR/B +60 Stelle in SH-SY5Y-Zellen.

Durch die Infektion von murinen und humanen Zellen sowie von Mäusen kam es zu einer bis zu 10-fach erhöhten Expression der iADAR-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Diese erhöhte Expression führte in LCMV-infizierten SH-SY5Y-Zellen auch zu einer verstärkten A \rightarrow I Editierungs-Aktivität der iADAR-1 an der +60 Stelle des GluR/B.

5.9. Zelluläre Lokalisation der iADAR-1

Eine verstärkte iADAR-1-Expression durch LCMV-Infektion konnte auf mRNA-, auf Proteinebene und auf der Ebene der ADAR-1-Aktivität gezeigt werden. Im Folgenden wurde nachgewiesen, dass das beobachtete A \rightarrow G Hypermutterationsmuster des LCMV-Genoms durch die iADAR-1-Aktivität hervorgerufen wird. Dafür wurde die iADAR-1 in einem Zellkulturmodell überexprimiert. Die iADAR-1 wurde aus cDNA von HeLa-Zellen mit den Primern Pi up/Adar1-low/sbf1 durch eine PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert (M273). Der Expressionsvektor M273 kodiert für die iADAR-1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

Im Vorfeld wurde die zytoplasmatische Lokalisation der klonierten iADAR-1 verifiziert. LCMV repliziert im Zytoplasma und nur dort kann die vermutete Interaktion der iADAR-1 mit LCMV erfolgen. Dieses Experiment wurde mit einem Fusionsprotein aus iADAR-1 und einem N-terminalen eGFP durchgeführt. Die Sequenz von eGFP wurde mit dem Primerpaar M350 up/low ohne Stoppkodon durch eine PCR aus dem Vektor M56a amplifiziert und im Leserahmen vor die iADAR-1 kloniert. Der daraus entstandene eGFP-iADAR-1-Vektor M350 wurde zusammen mit dem Vektor pDsRED2-Nuc in 293T-Zellen transfiziert (Abb. 31). pDsRED2-Nuc dient hierbei der Expression eines nukleär lokalisierten RFP aus *Discosoma sp* [124].

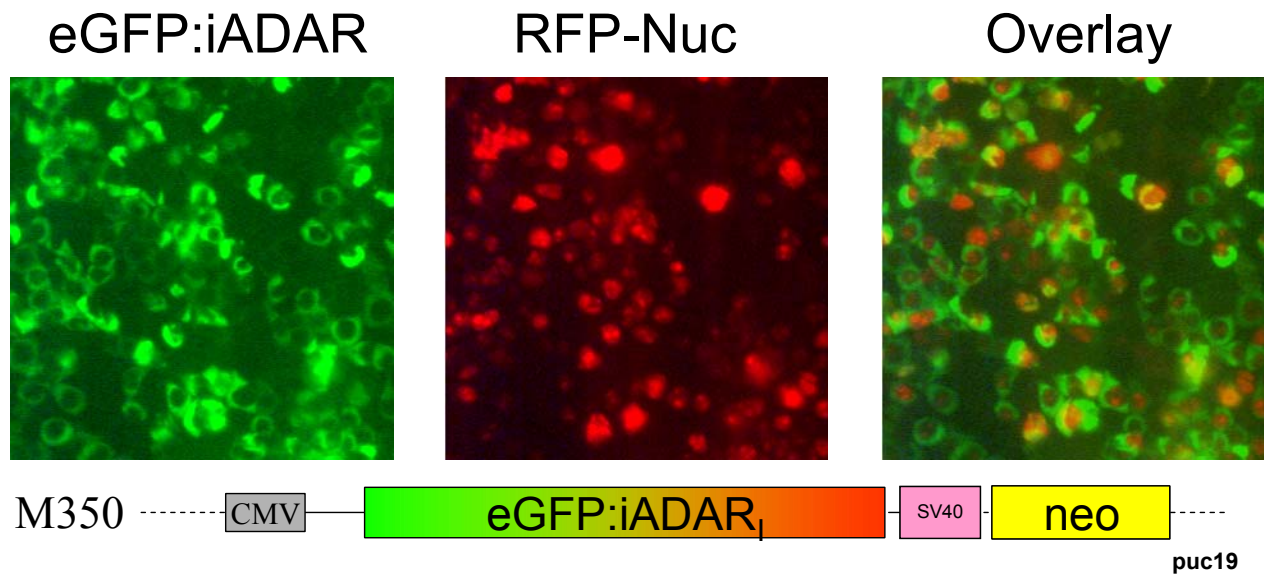


Abb. 31: Transfektion der Plasmide M350 und pDsRED2-Nuc in 293T-Zellen. Die grüne Fluoreszenz wird durch das eGFP-iADAR-1-Protein hervorgerufen. Die rote Fluoreszenz im Kern wird durch RFP-Nuc hervorgerufen, das Kernlokalisationssequenzen enthält.

In Abb. 31 sieht man, dass die N-terminale eGFP fusionierte Form der iADAR-1 zytoplasmatisch vorlag. Der Kern der 293T-Zellen war durch RFP-Nuc nur rot gefärbt. Das „Overlay“-Bild zeigt deutlich, dass die beiden Fluoreszenz markierten Proteine nicht kolokalisieren. Die iADAR-1 wurde N-terminal mit eGFP fusioniert, da bei der C-terminalen Fusion von eGFP an die iADAR-1, durch einen internen Promotor im iADAR-1-Gen [80], vorwiegend eine nukleär vorliegende, kürzere ADAR-1-eGFP-Variante exprimiert wird. Für die folgenden Versuche wurde, nach der Verifizierung der zytoplasmatischen Lokalisation der iADAR-1, der ursprüngliche iADAR-1-Expressionsvektor M273 verwendet.

5.10. Einfluss der iADAR-1-Überexpression auf Mutationen im viralen Genom von LCMV

Um die Interaktion der iADAR-1 mit dem viralen Genom von LCMV nachzuweisen, wurde die iADAR-1 mit dem Plasmid M273 überexprimiert. Hiermit soll bestätigt werden, dass die Induktion des A→G Hypermutationsmusters im Genom von LCMV durch die iADAR-1-Aktivität hervorgerufen wird. Dieses A→G Hypermutationsmuster konnte bereits im Genom von LCMV-infizierten L929-Zellen und Mäusen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.2 und 5.3).

Die Überexpression der iADAR-1 wurde zuerst im Western Blot verifiziert und die Aktivität der iADAR-1 anhand der +60 Stelle des GluR/B RNA-Elements B13 mit einem Editierungs-Assay (siehe Kapitel 5.8) bestätigt. Anschließend wurden die Art und Zahl der Mutationen im viralen Genom mit einer RT-PCR bestimmt. Für die Überexpression der iADAR-1 wurden 293T-Zellen verwendet, da sich diese gut ≥ 90 % transfizieren ließen.

Der Vektor M273 sowie als Negativkontrolle der gleiche Vektor (M267), der nach dem CMV-Promotor kein Gen kodiert (Abb. 32), wurden in 293T-Zellen transfiziert. Für die Messung der Editierungs-Aktivität der iADAR-1 wurde jeweils das Reporterplasmid M265 (siehe Kapitel 5.8) kotransfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit LCMV-infiziert. Die Zellen wurden drei Tage nach der Infektion abtrypsinisiert, lysiert und Gesamt-RNA isoliert oder für den Western Blot eingesetzt. Die RNA wurde in einer reversen Transkription mit Random-Primern in cDNA umgeschrieben. Random-Primer haben den Vorteil, dass in einem Ansatz sowohl zelluläre als auch virale RNA in cDNA umgeschrieben wird.

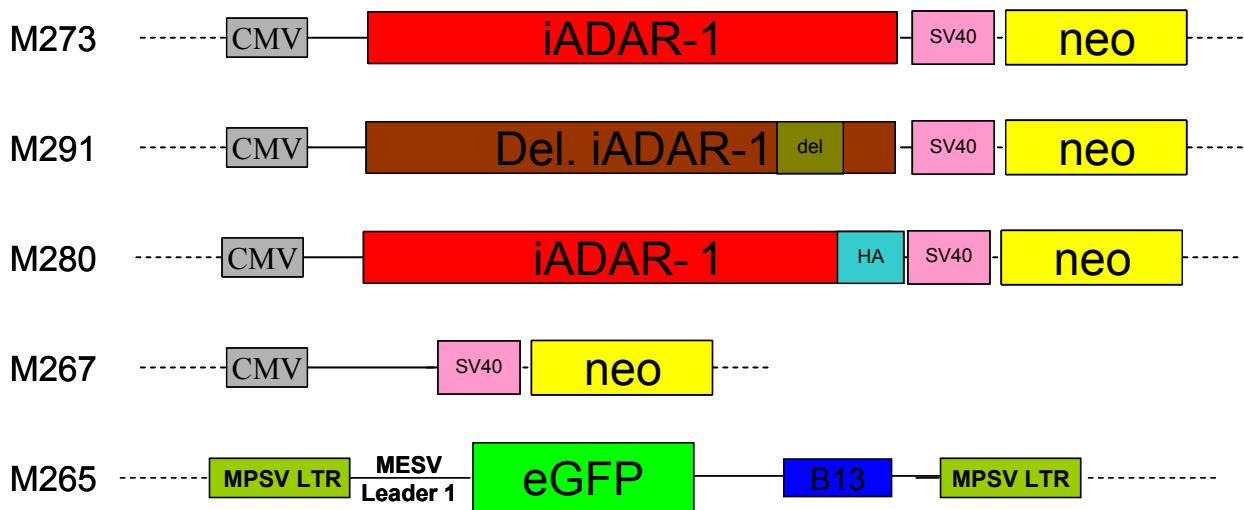


Abb. 32: Schematische Darstellung der iADAR-1- und B13-Expressionsplasmide.

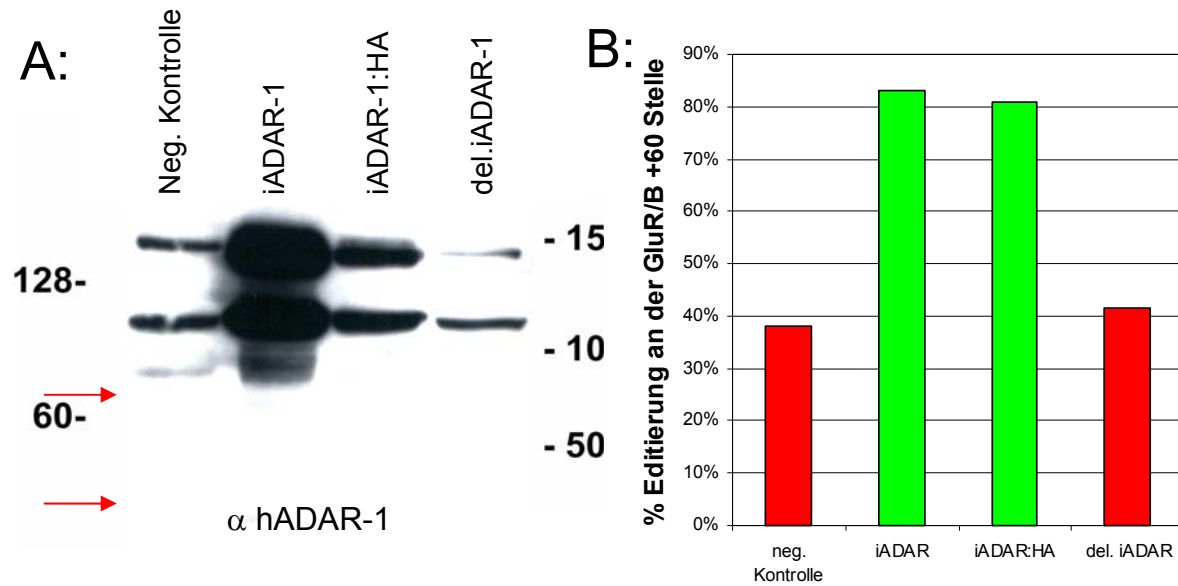


Abb. 33: A: anti hADAR-1 Western Blot der transfizierten 293T-Zellen. Die Pfeile markieren jeweils die lange IFN-induzierbare Form der ADAR (iADAR-1) und die kurze nukleäre Form der ADAR-1 (cADAR-1). 293T-Zellen wurden jeweils mit den Vektoren M267, M273, M280 und M291 transfiziert. Zusätzlich wurde noch der Vektor M265 kotransfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit LCMV (MOI 0,01) infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen abtrypsiniert, lysiert und im Western Blot eingesetzt. B: Editierungs-Aktivität der ADAR-1 gemessen am Reporterplasmid M265. Die Zelllysate aus A wurden zur Extraktion von RNA verwendet, diese wurde für eine RT-PCR eingesetzt und anschließend wurde das PCR-Produkt sequenziert. Aus dem Elektropherogramm der Sequenzierreaktion wurde die Editierungs-Aktivität der ADAR-1 an der +60 Stelle des GluR/B errechnet

Im Western Blot erkennt man (Abb. 33 A), dass die iADAR-1 in den M273 transfizierten Zellen sehr hoch exprimiert wurde. Die roten Pfeile zeigen die Position der iADAR-1 und der immer koexprimierten kurzen Form der ADAR-1 an. Der für die Expression der kurzen ADAR-1 Form verantwortliche Promotor ist im kodierenden Bereich der iADAR-1 lokalisiert [82]. In den Zellen, die mit M267 transfiziert wurden, war auch eine schwache Expression der endogenen iADAR-1 und cADAR (siehe rote Pfeile in Abb. 33) erkennbar.

M280 ist ein weiterer Vektor, der wie M273 für iADAR-1 kodiert, jedoch zusätzlich noch C-terminal einen HA-Tag trägt. Dieser zeigte im Western Blot eine schwächere Expression der iADAR-1:HA als M273 (iADAR-1). Das Plasmid M291 kodiert für eine Deletionsmutante der iADAR-1 (del. iADAR-1), die zwei Mutationen in der Desaminase-Domäne trägt und dadurch inaktiviert ist [125]. Diese Mutationen liegen im Epitop des anti iADAR-1-Antikörpers, so dass man nach der Transfektion von M291 keine erhöhte Expression der iADAR-1 im Western Blot erkennt.

Die Editierungs-Aktivität an der +60 Stelle des GluR/B war in Zellen, die mit iADAR-1 transfiziert wurden, ca. doppelt so hoch wie in Zellen, die entweder mit dem leeren Vektor M267 oder der Deletionsmutante der iADAR-1 transfiziert wurden (Abb. 33 B).

Dies bestätigte den Versuch aus Kapitel 5.8, in dem durch LCMV die Aktivität der iADAR-1 nicht vermindert wurde. Allerdings war die Editierungs-Aktivität der iADAR-1 in den mit den Vektoren M267 und M291 transfizierten und infizierten Zellen doppelt so hoch wie in den nicht LCMV-infizierten, nur mit dem B13-Expressionsplasmid transfizierten SH-SY5Y-Zellen (siehe Abb. 30). Nicht infizierte 293-Zellen zeigten in mehreren unabhängigen Versuchen ebenfalls eine ähnlich geringe Editierungs-Aktivität wie nicht infizierte SH-SY5Y-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Deletionsmutante der iADAR-1 M291 übt offenbar keinen dominant negativen Effekt auf die Editierungs-Aktivität der iADAR-1 aus. Die Editierungs-Aktivität an der +60 Stelle unterscheidet sich in den Zellen, die mit dem leeren Vektor (M267) transfiziert wurden, nicht von Zellen, die mit der Deletionsmutante der iADAR-1 (M291) transfiziert wurden.

Um zu untersuchen, ob die iADAR-1-Überexpression verstärkt Mutationen im LCMV-GP hervorruft, wurde aus der cDNA von M273 bzw. M267 transfizierten Zellen anschließend eine PCR auf LCMV-GP durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert und die erhaltenen Klone sequenziert (Abb. 34). Hierfür wurde wiederum das Primerpaar S-RNA up29-seq low 4 verwendet.

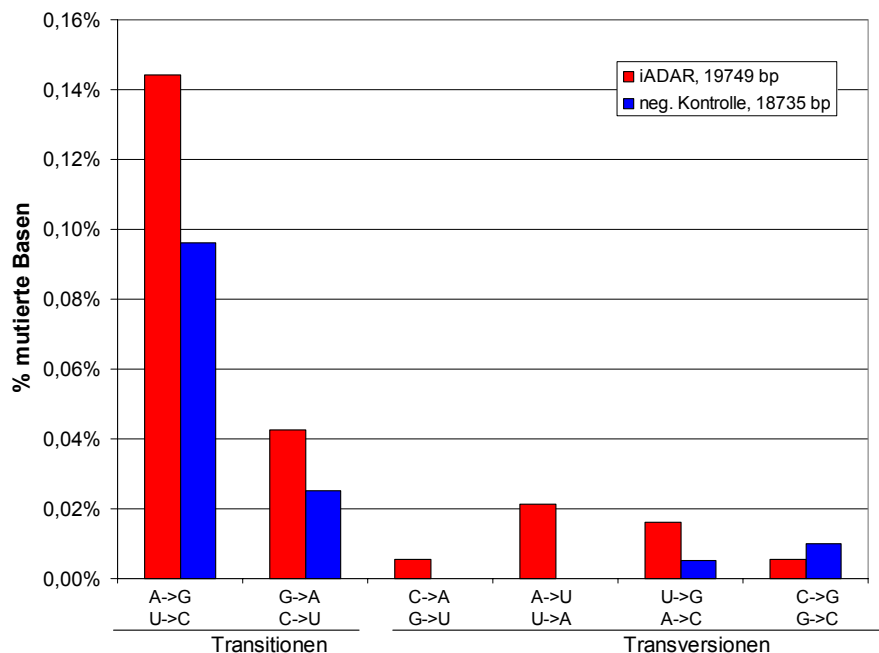


Abb. 34: Mutationen im LCMV-GP der iADAR-1-überexprimierenden Zellen. 293T-Zellen wurden jeweils mit den Vektoren M267 und M273 transfiziert. Zusätzlich wurde noch der Vektor M265 kotransfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit LCMV (MOI 0,01) infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen abtrypsiniert, lysiert und RNA isoliert. Es wurde eine RT-PCR auf LCMV-GP durchgeführt und das Amplifikat in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert. Anschließend wurden die Vektoren sequenziert. Die Graphik stellt jeweils die Summe aller gefundenen Mutationen eines Typs im Verhältnis zur Summe der sequenzierten Basen dar. In der Legende ist die Zahl der sequenzierten Basen angegeben.

In den iADAR-1-überexprimierenden Zellen traten 40 % mehr A→G (U→C) Mutationen auf als in den Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Sowohl in den iADAR-1-überexprimierenden als auch in der Negativkontrolle M267 wurde jeweils ein hypermutierter Klon gefunden. Im Western Blot zeigte sich im Gegensatz zu SH-SY5Y-Zellen in 293T-Zellen eine relativ hohe endogene iADAR-1-Expression und eine hohe Editierungs-Aktivität an der +60 Stelle. Dies könnte für die hohe Mutationsrate in der Negativkontrolle verantwortlich sein.

In 293T-Zellen wurde drei Tage nach der Infektion ein ähnliches A→G Hypermutationsmuster wie in L929-Zellen sieben Tage nach der Infektion mit LCMV detektiert. Die Hypermutationen finden sich auch hier in einem kurzen, begrenzten Bereich, in dem sehr viele Adenosine zu Guanosinen bzw. Uridine zu Cytidinen mutiert sind. In einen Klon aus den iADAR-1-transfizierten Zellen sind 30 % aller Adenosine mutiert, im Klon aus der Negativkontrolle nur 14 % aller Uridine (siehe Anhang 8.2).

5.11. Infektion von iADAR-1 exprimierenden 293T-Zellen mit LCMV

In Kapitel 5.2.1 und 5.3.1 wurde gezeigt, dass A→G Hypermutierte LCMV-GP-Mutanten sowie 60 % der durch A→G Transversionen induzierten Aminosäuremutationen zu nicht infektiösem LCMV-GP führten. Dies konnte anhand von LCMV-GP pseudotypisierten Retroviren verdeutlicht werden. Die Überexpression der iADAR-1 in 293T-Zellen induzierte ebenfalls ein A→G Hypermutationsmuster im Genom von LCMV. Im Folgenden werden die Auswirkungen der durch iADAR-1-Überexpression induzierten Mutationen auf die LCMV-GP-Oberflächenexpression sowie auf die Synthese von infektiösen LCMV-Virionen untersucht.

Für diese Versuche wurden die Expressionsplasmide kodierend für die iADAR-1 (M273) und für die Deletionsmutante der iADAR-1 (M291) eingesetzt. Durch die Verwendung des Plasmids M291 anstatt des Plasmids M267 wurde sichergestellt, dass die Überexpression eines Proteins alleine keinen Einfluss auf die Expression des LCMV-GP hat. Das Plasmid M267 kodiert im Gegensatz zu M291 nicht für ein Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors. Auch mögliche Wechselwirkungen anderer iADAR-1-Domänen mit zellulären und viralen Faktoren sind zwischen der iADAR-1 und der del. iADAR-1 vergleichbar.

In Abb. 35 ist die GP-Expression auf der Zelloberfläche von iADAR-1-transfizierten Zellen dargestellt. 293-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion mit dem Expressionsplasmid M273 bzw. M291 mit LCMV-infiziert (MOI 1) und die LCMV-GP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt.

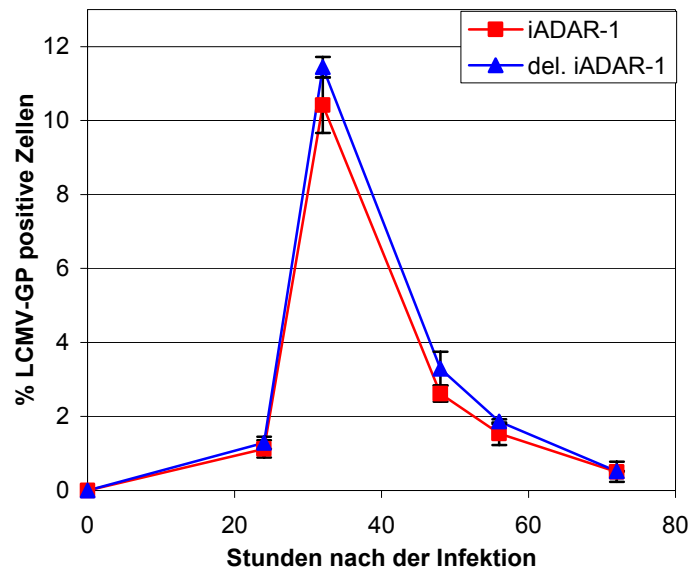


Abb. 35: LCMV-GP-Expression im Infektionsverlauf von LCMV auf 293-Zellen, die mit M273 (iADAR-1) oder M291 (del. iADAR-1) transfiziert wurden. 293-Zellen wurden mit einer MOI von 1 24 Stunden nach der Transfektion mit M273 und M291 infiziert. Es wurden jeweils Triplikate durchflusszytometrisch, nach Färbung mit dem anti LCMV-GP-Antikörper KL25, bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Abweichung an.

Die LCMV-GP-Oberflächenexpression stieg bis 36 Stunden nach der Infektion auf bis zu 11,5 % an, um danach wieder auf ein fast undetektierbares Niveau abzufallen. Im Gegensatz zu einer Infektion mit einer niedrigeren MOI von 0,1 (siehe Kapitel 5.1), bei der auf bis zu 90 % der Zellen LCMV-GP nachweisbar war, zeigte sich bei einer MOI von eins bereits Interferenz, die zu einer schwächeren LCMV-GP-Expression führte.

In iADAR-1-transfizierten Zellen ist die LCMV-GP-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (del. iADAR-1) kaum vermindert (Abb. 35). Die iADAR-1-Überexpression hat demnach kaum Auswirkungen auf die LCMV-GP-Expression auf der Zelloberfläche. Durch die Infektion von 293T-Zellen mit LCMV kommt es, wie in Kapitel 5.7 beschrieben, zur Induktion der iADAR-1. Dies könnte die geringen Unterschiede der LCMV-GP-Expression auf den iADAR-1 und den del. iADAR-1-überexprimierenden Zellen erklären, da die eingebrachte iADAR-1 nur zusätzlich zur hochregulierten endogenen iADAR-1 wirken kann.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die iADAR-1 eine reduzierte Infektiösität bzw. Synthese von LCM-Virionen verursacht. 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden M273 und M291 transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit LCMV (MOI 1) infiziert und der LCMV-Titer im Überstand an drei verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt.

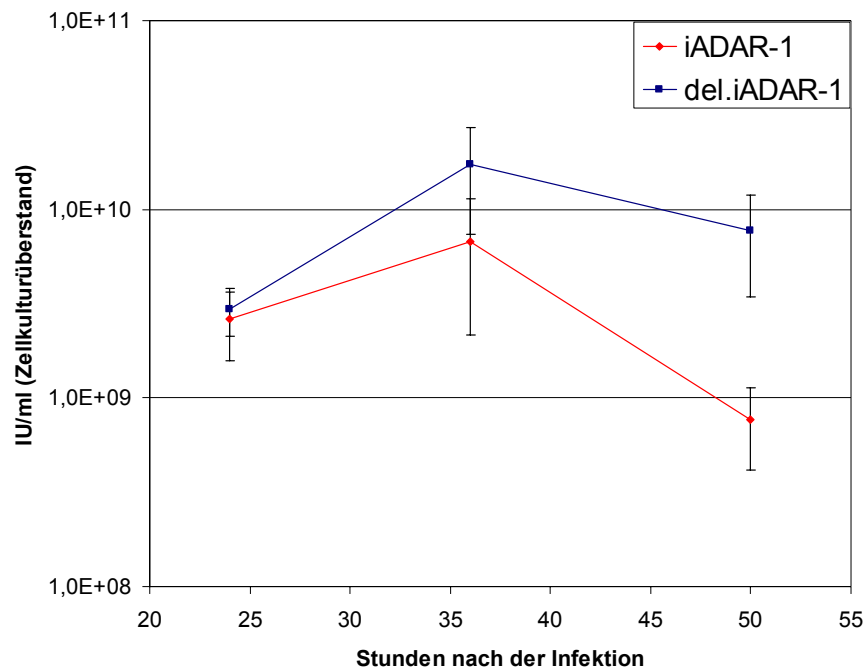


Abb. 36: Titration der LCMV-Überstände von infizierten 293T-Zellen, die entweder mit iADAR-1 (M273) oder der Deletionsmutante der iADAR-1 (M291) transfiziert wurden. 293T-Zellen wurden in Triplikaten mit M273 oder M291 transfiziert. Ein Tag später wurden die Zellen mit LCMV (MOI 1) infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden jeweils 24, 36 und 50 Stunden nach der Infektion abgenommen und auf L929-Zellen titriert. Die Titration erfolgte in Triplikaten. Die Fehlerbalken resultieren aus der mittleren Abweichung aller Titrations der Überstände.

Der LCMV-Titer im Überstand der transfizierten Zellen stieg 24 Stunden nach der Infektion der Zellen kontinuierlich an und erreichte das höchste Niveau nach 36 Stunden; danach sank der Titer wieder ab. Die Menge an infektiösen LCM-Virionen im Überstand korrelierte hierbei mit der LCMV-GP-Expression an der Oberfläche von infizierten Zellen, bei denen das höchste Expressionsniveau ebenfalls 36 Stunden nach der Infektion erreicht wurde.

In den Überständen der mit iADAR-1 transfizierten Zellen war der Titer von LCMV deutlich niedriger als in Zellen, die die Deletionsmutante der iADAR-1 exprimierten. Die Zahl der infektiösen Virionen des Zellkulturüberstands wich im Laufe der Infektionsdauer in den iADAR-1 transfizierten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, immer stärker, bis hin zu einer log Stufe ab. Die iADAR-1-Expression in 293T-Zellen führte demnach zu einer Verringerung an produzierten infektiösen LCM-Virionen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der iADAR-1 nicht zu einer reduzierter GP-Oberflächenexpression führte, jedoch zu einer Verringerung der Infektiosität der Überstände von iADAR-1-überexprimierenden Zellen. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen aus Kapitel 5.2.1, 5.3.1 sowie der Beschreibung von S. Kunz et al. [31]. Selbst wenn LCMV-GP auf der Oberfläche von Zellen detektierbar ist, werden nicht unbedingt in gleichem Maße infektiöse Partikel gebildet. Dies wird durch defekte GP-Varianten hervorgerufen, die nicht in Viruspartikel inkooperiert werden können oder nicht fusogen sind.

Die verringerte Infektiosität der Überstände von iADAR-1-exprimierenden Zellen könnte auch durch induzierte A→G Mutationen in anderen Genom-Bereichen außerhalb des LCMV-GP Gens hervorgerufen werden. Dadurch wäre die Replikation oder die Transkription eingeschränkt. Zusätzlich könnte desaminierte, inosinhaltige RNA von spezifischen RNasen [60, 61] degradiert werden, wodurch sich die Menge an funktionellem viralem Genom weiter reduziert und es somit zu einer verringerten Synthese von infektiösen Partikeln kommt.

5.12. Isolierung von primären MEF^{-/-iADAR-1} und Etablierung einer MEF^{-/-iADAR-1} Zelllinie

Die iADAR-1-Überexpression in 293T-Zellen verminderte den Titer an infektiösen LCMV-Virionen und induzierte eine erhöhte A→G Mutationsrate im viralen Genom. Allerdings war die iADAR-1 auf Proteinebene im Western Blot in der Negativkontrolle nachweisbar und auch die Editierungs-Aktivität der ADAR-1 war im Vergleich zu nicht infizierten 293-Zellen höher. Zusätzlich konnten in infizierten Kontrollzellen vermehrt A→G Mutationen beobachtet werden (siehe Kapitel 5.10). In den Kapiteln 5.5-5.7 wurde bereits gezeigt, dass die iADAR-1-Expression und -Aktivität durch IFN- α sowie eine Infektion mit LCMV hochreguliert wurde.

Diese basale iADAR-1-Expression und die Hochregulation der iADAR-1 bei einer Infektion von Zellen mit LCMV interferiert mit der Genauigkeit der Ergebnisse bei der Überexpression der iADAR-1. Besser geeignet ist ein Modell, in dem keine störende basale Aktivität der iADAR-1 vorhanden ist. Hierfür eignen sich „knockout“ Mäuse und hieraus isolierte Zellen, da im Gegensatz zu transienten „knockout“ Systemen wie der RNAi-Transfektion dauerhaft ein spezifisches Gen abgeschaltet ist.

Allerdings sterben Mäuse, die homozygot eine ADAR-1-Gen-Deletion tragen, bereits an Tag 11,5 der Embryonalentwicklung [78]. Die Deletion im iADAR-1-Gen erstreckt sich bei diesen Tieren von Exon 2 bis Exon 13 und umfasst alle bekannten funktionalen Elemente der iADAR-1 (Abb. 37).

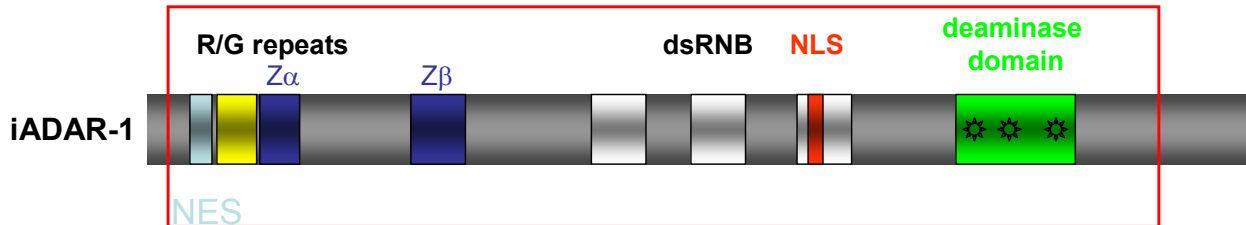


Abb. 37: Die funktionellen Domänen der iADAR-1. Die rote Box zeigt die deletierten Bereiche des iADAR-1-Proteins der iADAR-1 „knockout“ Mäuse an. R/G repeats bezeichnet eine an Arginin und Glycin reiche Region, NES steht für ein Nukleäres Export Signal und $Z\alpha$ sowie $Z\beta$ sind zwei Z-DNA Bindungsdomänen. dsRNB sind die drei doppelsträngigen RNA Bindungsdomänen, worin eine nukleäre Import Sequenz (NLS) eingelagert ist, und eine Desaminase Domäne, in der die drei Zink bindenden Aminosäuren durch Sterne gekennzeichnet sind.

Heterozygote Mäuse hingegen, die die Deletion der iADAR-1 nur auf einem Allel tragen, sind überlebensfähig. Aus gepaarten heterozygoten Mäusen können dann murine embryonale Fibroblasten (MEF) gewonnen werden, die homozygot für die Deletion des iADAR-1 Gens sind. Mit diesen $MEF^{-/-iADAR-1}$ und als Kontrolle MEF wt, die homozygot das iADAR-1 Gen enthalten, wurden die weiteren Versuche durchgeführt, um die Interaktion von iADAR-1 und LCMV nachzuweisen.

Hierfür wurden $MEF^{-/-iADAR-1}$ und MEF wt aus Embryonen von heterozygoten C57BL/6 Mäusen isoliert, die eine Deletion im murinen iADAR-1-Gen auf einem Allel tragen. Schwangere C57BL/6 Mäuse, heterozygot für die 2-13 Deletion im iADAR-1-Gen, wurden an Tag zehn der Schwangerschaft getötet und die Embryonen entnommen. Diesen wurde der Hinterkopf und der Schwanz abgetrennt, zerkleinert und je Embryo auf einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Identität der Zellen bezüglich der homozygoten Deletion der iADAR-1 wurde mit einer PCR unter Verwendung der Primer mDRA127, mDRA128 und PGKterm5 bestätigt. Die Zellen einer Maus wurden in Kultur gehalten und durch mehrmaliges Passagieren laut dem 3T3-Protokoll immortalisiert [102]. Die MEF durchlaufen sonst nur acht bis zehn Teilungen, bevor sie sich nicht mehr teilen und anschließend in ein Ruhestadium eintreten [126]. Beim 3T3-Protokoll werden die Zellen alle drei Tage bei definierter Zellzahl passagiert. Die Immortalisierung auf diesem Weg gelang allerdings nicht mit den homozygoten $MEF^{-/-iADAR-1}$, sondern nur mit den parallel isolierten MEF wt.

Eine Zelllinie wurde etabliert, indem die MEF^{-/-iADAR-1} und parallel auch MEF wt durch Transduktion mit dem Vektor M318 immortalisiert wurden. Der Vektor M318 kodiert für das SV40 large T-Antigen, das mit GFP fusioniert ist. Durch das large T-Antigen des DNA-Tumor-Virus SV40 werden unter anderem die Negativ-Regulatoren des Zellwachstums p53 und pRB inaktiviert [127]. Hierdurch geht ein Teil der Zellen in der Wachstumskrise nicht zugrunde und wird immortalisiert. Die immortalisierten Zelllinien wurden über mehr als vier Monate mit 40 Passagen in Kultur gehalten, ohne dass eine Wachstumskrise erkennbar war.

5.13. Mutationen im LCMV-GP in infizierten MEF^{-/-iADAR-1} und MEF wt

Mit den hier erstmals isolierten MEF^{-/-iADAR-1} wurde untersucht, ob die iADAR-1 A→G Mutationen im Genom von LCMV induzieren. In MEF^{-/-iADAR-1} existiert im Zytoplasma keine basale iADAR-1-Aktivität mehr, so dass in diesen Zellen keine iADAR-1-induzierten A→G Mutationen auftreten sollten. Als Positivkontrolle für die iADAR-1-induzierten A→G Mutationen wurden, in Anlehnung an die Versuche mit der murinen Fibroblasten-Zelllinie L929 aus Kapitel 5.2, MEF wt verwendet. In L929-Zellen konnte sieben Tage nach der Infektion mit LCMV ein A→G Hypermutterationsmuster im viralen Genom beobachtet werden.

Dieser Versuch wurde sowohl mit primären MEF als auch durch das SV40 large T-Antigen transformierten Zelllinien durchgeführt. MEF^{-/-iADAR-1} und MEF wt wurden mit LCMV (MOI 0,1) infiziert, die Zellen danach sieben Tage passagiert und an Tag sieben wurde Gesamt-RNA daraus isoliert. Für die RT-PCR wurden wiederum die Primer S-RNA up29-seq low 856 ausgewählt. Um zusätzlich noch einen Teil der genomischen RNA zu sequenzieren, wurde das Primerpaar S-RNA seq up5-seq low4 eingesetzt (Abb. 38).

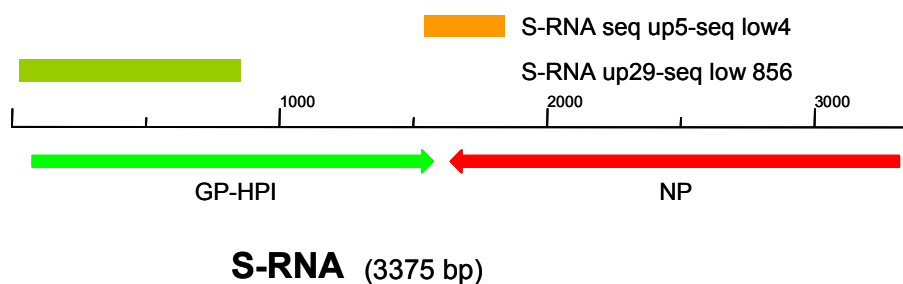


Abb. 38: Amplifikate der im Text beschriebenen Primerpaare in der S-RNA von LCMV. Die PCR-Produkte der Primerpaare sind in orange (S-RNA seq up5-seq low4) und olivgrün (S-RNA up29-seq low 856) eingezeichnet. Zur Orientierung sind noch die Gene für GP und NP dargestellt.

Mit diesen beiden Primerpaaren wurde eine RT-PCR durchgeführt und das PCR-Produkt in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert und sequenziert.

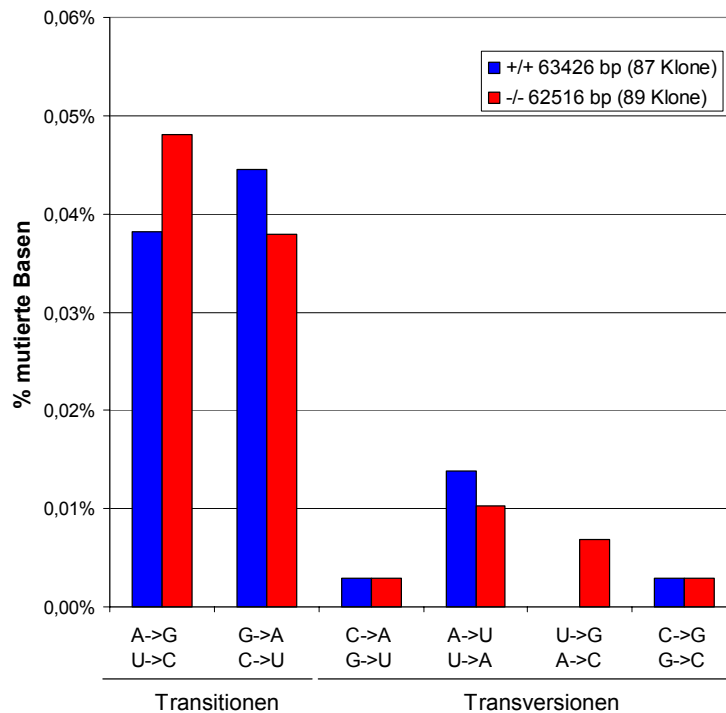


Abb. 39: Mutationen in der S-RNA von LCMV-infizierten MEF wt (+/+ in blau) und MEF^{-iADAR-1} (-/- in rot). MEF^{-iADAR-1} und MEF wt wurden mit LCMV (MOI 0,1) infiziert und sieben Tage passagiert. Danach wurden die Zellen lysiert, RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Das Amplifikat wurde in Vektoren kloniert und sequenziert. Die Grafik stellt die Summe aller Mutation eines Typs im Verhältnis zu den gesamten sequenzierten Basen aus vier Einzelerperimenten dar. Drei der Experimente erfolgten mit primären, eines mit den SV40-transformierten MEF. Je zwei Experimente wurden mit den Primerpaaren S-RNA seq up5-seq low4 oder S-RNA up29-seq low 856 durchgeführt. In der Legende ist jeweils die Zahl der sequenzierten Klone und Basen angegeben.

Es wurde weder bei den MEF^{-iADAR-1} noch bei den MEF wt eine ausgeprägte Präferenz von A→G oder G→A Transitionen beobachtet (Abb. 39). Insgesamt traten bei beiden Zelllinien mehr Transitionen (80 %) als Transversionen (20 %) auf. Im Gegensatz zu den vorherigen Mutationsuntersuchungen von Kapitel 5.2, 5.3 und 5.10 wurden keine A→G Hypermuationen in den MEF wt beobachtet. Eine A→G Mutationspräferenz der viralen Polymerase konnte man allerdings aufgrund der Mutationsanalysen in MEF^{-iADAR-1} ausschließen.

Parallel zu den Mutationsanalysen wurden noch LCMV-Infektionsversuche mit den MEF wt und MEF^{-iADAR-1} durchgeführt. In Analogie zu den Versuchen mit den iADAR-1-überexprimierenden 293T-Zellen (siehe Kapitel 5.11) sollte hiermit untersucht werden, ob die iADAR-1 in den MEF einen direkten Einfluss auf die LCMV-GP-Oberflächenexpression oder die Synthese von infektiösen LCM-Virionen hat.

Bei der Betrachtung der LCMV-GP-Expression waren zwischen MEF^{-/-iADAR-1} und MEF wt allenfalls geringe Unterschiede in der Oberflächenexpression des LCMV-GP im Infektionsverlauf nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die MEF^{-/-iADAR-1} Zellen wiesen keine deutlich erhöhte LCMV-GP-Expression im Vergleich zu MEF wt nach der Infektion auf. Auch der Titer von LCMV im Überstand infizierter MEF^{-/-iADAR-1} und MEF wt war bei mehreren Experimenten nicht verschieden. Die iADAR-1 in den MEF wt wirkte sich demnach, im Vergleich zu MEF^{-/-iADAR-1}, nicht negativ auf die Replikation von LCMV und die Expression des GPs aus. Ein Einfluss der iADAR-1 auf den Titer von LCMV wäre jedoch laut den iADAR-1-Überexpressions-Experimenten in 293T-Zellen (siehe Kapitel 5.11) zu erwarten gewesen.

Bei den vergleichenden Experimenten zwischen LCMV-infizierten MEF^{-/-iADAR-1} und MEF wt konnte demnach kein unterschiedliches Verhalten zwischen den MEF festgestellt werden; weder auf der Ebene der A→G Mutationen im Genom von LCMV noch bei der Expression von LCMV-GP auf der Oberfläche oder dem LCMV-Titer im Überstand der Zellen. In MEF wt zeigten sich demnach nicht wie in L929 A→G Hypermutationen im viralen Genom, obwohl in MEF wt das Niveau der LCMV-GP-Oberflächenexpression im Laufe der LCMV-Infektion der von L929 ähnlich ist (siehe Kapitel 5.1, Abb. 1). Um die Ursachen dieser nicht vorhandenen Unterschiede zwischen infizierten MEF wt und MEF^{-/-iADAR-1} zu klären, wurde die iADAR-1-Expression in MEF wt genauer untersucht.

5.14. iADAR-1-Expression in LCMV-infizierten MEF wt

Die iADAR-1 mRNA-Expression stieg, wie in Kapitel 5.5 gezeigt, durch die Infektion von Zellen und Mäusen mit LCMV um das 5-8 fache an. Um dies auch für MEF wt zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression der iADAR-1 nach der Infektion mit LCMV auch in diesen Zellen bestimmt. Damit wurde der Frage nachgegangen, ob eine mangelnde Induktion der iADAR-1 für die nicht vorhandene A→G Hypermutation des viralen Genoms in MEF wt verantwortlich ist.

Die Expression der iADAR-1 in MEF wt auf mRNA-Ebene wurde mit einer qPCR wie in Kapitel 5.5 untersucht. Als Kontrolle der zellulären Immunreaktion auf die LCMV-Infektion diente eine spezifische qPCR für die PKR.

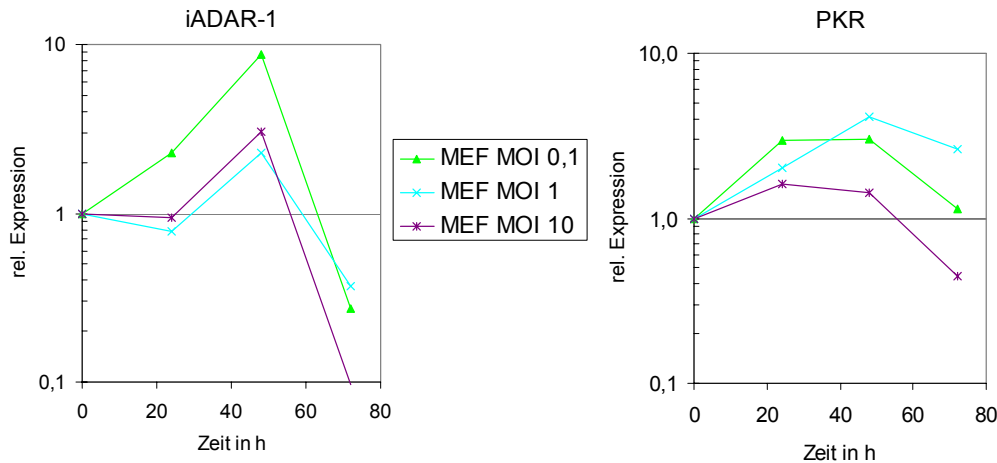


Abb. 40: qPCR für iADAR-1 und PKR von MEF wt. Der Graph links zeigt die relative Expression der iADAR-1 gegenüber GapDH und der Graph rechts die relative Expression der PKR gegenüber GapDH. MEF wt wurden mit LCMV mit unterschiedlicher MOI infiziert. 24, 48 und 72 Stunden später wurden die Zellen auf der Platte lysiert und RNA isoliert. Die RNA wurde für die RT-Reaktion mit anschließender qPCR eingesetzt. Gezeigt ist eine repräsentative qPCR-Reaktion.

Die 9-fache Induktion der iADAR-1 in MEF wt nach der Infektion mit LCMV (MOI 0,1) erreichte im Verhältnis zur endogenen iADAR-1-Expression das gleiche Niveau wie in den L929-Zellen (Abb. 40). Im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen, die die höchste iADAR-1-Induktion nach 24 Stunden zeigten, erfolgte das Maximum der Induktion in MEF wt 48 Stunden nach der Infektion, genau wie in L929-Zellen. Die iADAR-1 wurde in den MEF wt und in den L929-Zellen stärker hochreguliert als die PKR. Dies steht im Gegensatz zur Expression der beiden Proteine in Mäusen, in denen die PKR stärker hochreguliert wird als die iADAR-1 (siehe Kapitel 5.5).

Die iADAR-1 wurde in MEF wt, im Verhältnis zur basalen iADAR-1-Expression, ähnlich stark wie in L929-Zellen hochreguliert. Da sich dadurch nicht die unterschiedliche A→G Mutationshäufigkeit zwischen L929-Zellen und MEF wt erklären lässt, wurde die basale iADAR-1-Expression in nicht infizierten Zellen bestimmt. Damit wurde überprüft, ob sich die iADAR-1-Konzentration pro Zelle in L929 und MEF wt unterscheidet und es hierdurch zu unterschiedlichen Mutationsmustern in L929 und MEF wt kommt. Zusätzlich wurde die basale iADAR-1-Expression in Mäusen mitbestimmt, um einen besseren Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

RNA aus nicht infizierten, unbehandelten murinen Milzen von C57BL/6 Mäusen, L929-Zellen und MEF wt wurde für eine RT-Reaktion verwendet und die cDNA anschließend in einer qPCR eingesetzt.

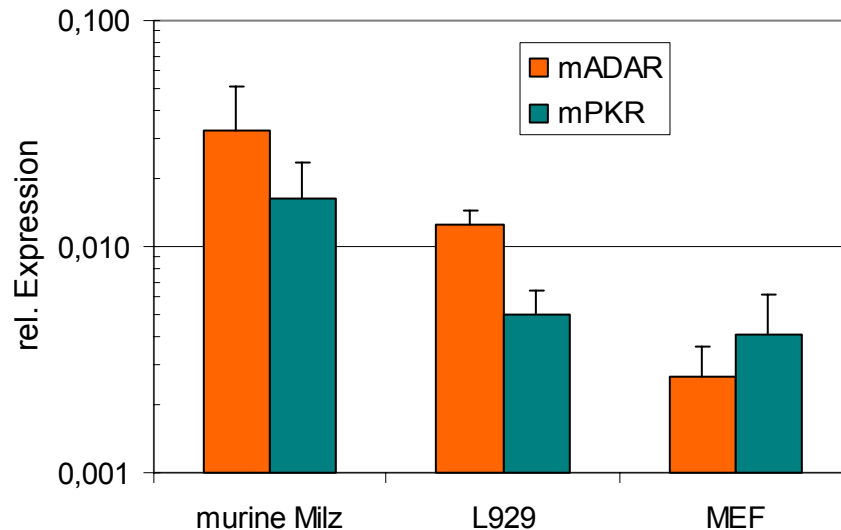


Abb. 41: Basale iADAR-1-Expression in der Milz von nicht infizierten Mäusen, L929-Zellen und MEF wt relativ zu GapDH. RNA wurde aus muriner Milz, L929-Zellen und MEF wt isoliert und für die RT-qPCR auf iADAR-1 und PKR eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Abb. 41 zeigt die basale iADAR-1-mRNA-Expression in der Milz von Mäusen, L929-Zellen und MEF. Die Expression der iADAR-1 war in der murinen Milz am höchsten. Im Vergleich hierzu ist die Expression der iADAR-1 in MEF wt 12-fach niedriger. Auch im Verhältnis zu L929-Zellen zeigten MEF wt eine um das 4-fache niedrigere iADAR-1-Expression. Durch eine Infektion von MEF wt wird die iADAR-1 maximal 9-fach hochreguliert (siehe Abb. 40). Dadurch war die höchste iADAR-1-Expression in MEF wt aber nur doppelt so hoch wie die basale Expression der iADAR-1 in L929. Die geringere iADAR-1-Expression in MEF wt wurde auch im Verhältnis der iADAR-1-Expression im Vergleich zur PKR deutlich. Sowohl in Mäusen wie auch in L929-Zellen wurde die PKR schwächer als die iADAR-1 exprimiert. In MEF wt hingegen war die basale PKR-Expression höher als die der iADAR-1.

Die verringerte absolute iADAR-1-Konzentration in der Zelle könnte eine Erklärung für die geringen Unterschiede zwischen $MEF^{-/-iADAR-1}$ und MEF wt sein. Die iADAR-1 liegt vermutlich nicht in ausreichender Menge in der Zelle vor, um das virale Genom entscheidend zu editieren und damit A→G Mutationen zu induzieren. Dadurch divergierten die $MEF^{-/-iADAR-1}$ und die MEF wt weder in den Mutationen in der viralen S-RNA nach der LCMV-Infektion noch in der LCMV-GP-Oberflächenexpression.

5.15. 5'-Nachbar-Präferenz der ADAR-1

In vitro zeigt die ADAR-1 bei kurzen dsRNA-Sequenzen eine spezifische 5'-Nachbar-Präferenz des Adenosins der Editierungsstelle [71]. Adenosine, die ein Uridin oder Adenosin als 5'-Nachbarn haben, werden weitaus häufiger editiert als Adenosine, die ein Guanosin oder Cytidin als 5'-Nachbarn haben. Um zu überprüfen, ob die gefundenen A→G Mutationen in der S-RNA von LCMV dieser Präferenz entsprechen, wurden die 5'-Nachbarn der A→G Mutationen bestimmt. In diese Untersuchung fließen nur die A→G Mutationen aus muriner Milz (4 & 5 d), L929- (7 d) und 293T-Zellen ein. Hier konnte eine erhöhte A→G Mutationsfrequenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 14, Abb. 19 und Abb. 34). Damit soll die Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, mit der diese A→G Hypermutationen durch die ADAR-1 induziert wurden.

Die Wahrscheinlichkeit der Editierung eines Adenosins durch die ADAR-1 mit Adenosin oder Uridin als 5'-Nachbarn, wurde von Lehmann et al. *in vitro* mit jeweils 60 % bestimmt [71]. Ein Guanosin als 5'-Nachbar von Adenosin wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 19 % und Cytidin als 5'-Nachbar mit einer Wahrscheinlichkeit von 41 % durch die ADAR-1 editiert. Diese Präferenzen der ADAR-1 wurden anhand der Zahl der tatsächlichen 5'-Nachbarn von Adenosin im untersuchten Bereich der S-RNA von LCMV umgerechnet. Damit ergeben sich 437 mutierte Adenosine im Bereich des Primerpaars seq up 29/seq low 4 mit den Nachbarn: 5'-A = 166, 5'-U = 101, 5'-C = 124 und 5'-G = 46. Die Zahl der 5'-Nachbarn wurde in Prozent der mutierten Adenosine umgerechnet und in Abb. 42 grafisch dargestellt (für 5'-A: $(166/437) * 100 \% = 37,9 \%$; 5'-U: $(101/437) * 100 \% = 23,1 \%$; 5'-C: $(124/437) * 100 \% = 28,4 \%$; 5'-G: $(46/437) * 100 \% = 10,5 \%$). Die Prozentangabe der 5'-Nachbarn in L929-, 293T-Zellen und der Maus, wurden aus dem Verhältnis der jeweiligen Zahl an 5'-Nachbarn der A→G mutierten Adenosine zur Gesamtzahl der mutierten Adenosine errechnet.

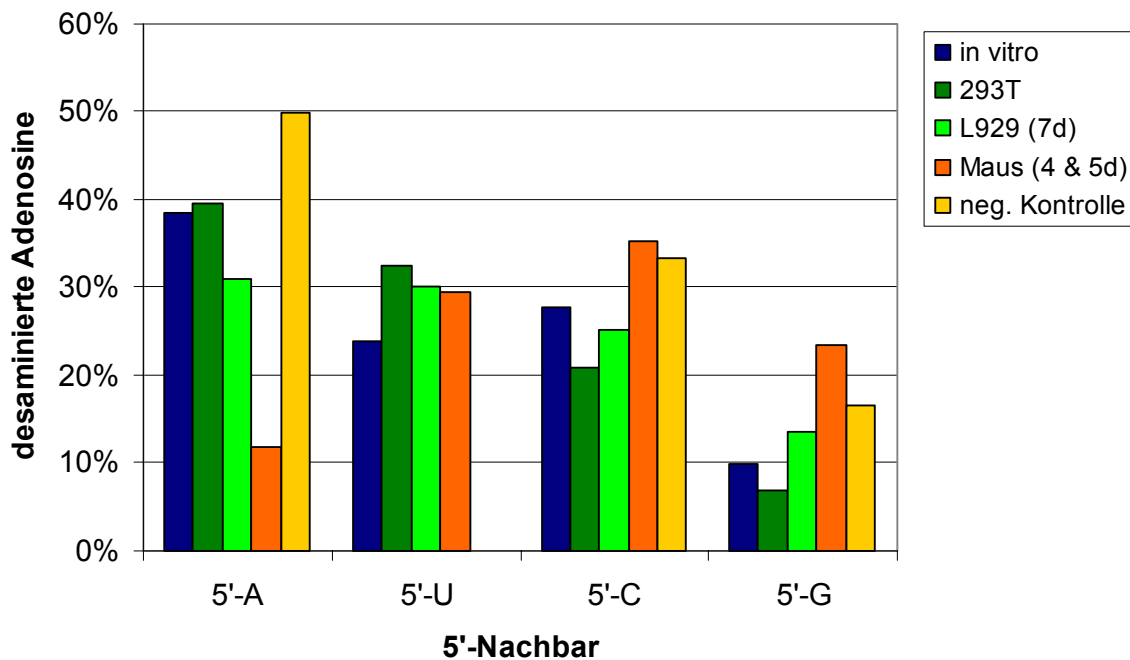


Abb. 42: 5'-Nachbarn der A→G Mutationen. Der blaue Balken zeigt die Wahrscheinlichkeit an mutierten Adenosinen mit entsprechendem Nachbarn an, wenn die ADAR-1 die Mutation *in vitro* hervorruft. Die Balken von 293T-, L929-Zellen (7 d), Maus (4 & 5 d) sowie der Negativkontrolle geben jeweils in Prozent die tatsächlich mutierten Adenosine mit entsprechendem 5'-Nachbarn an. Die Negativkontrolle stammt aus der Sequenzanalyse des PCR-Produktes einer S-RNA von LCMV, die von einem Plasmid transkribiert wurde (siehe Kapitel 5.2).

In L929-Zellen zeigten die 5'-Nachbarn der Adenosine, die zu Guanosin mutiert sind, eine hohe Identität mit den *in vitro* durch die iADAR-1 von A→I mutierten berechneten 5'-Nachbarn (Abb. 42). In 293T-Zellen waren ebenfalls die Adenosine mutiert, die *in vitro* von der iADAR-1 editiert würden. Die in der Negativkontrolle sowie die in der Maus mutierten Adenosine des LCMV-GP zeigten eher 5'-Nachbarn, die nicht der Präferenz der ADAR-1 *in vitro* ähneln. In den analysierten Maus-GP-Klonen wurden allerdings im Gegensatz zu den Klonen aus L929- und 293T-Zellen auch keine A→G hypermutierten Klone gefunden. Die 5'-Nachbarn der editierten Adenosine in den LCMV-GP-Klonen aus L929- und 293T-Zellen unterscheiden sich deutlich von den aus Mäusen isolierten Klonen. Allerdings war die absolute Zahl der gefundenen A→G Mutationen in den Mäusen (17 A→G Mutationen) und der Negativkontrolle (6 A→G Mutationen) deutlich niedriger als in den L929-Zellen (103 A→G Mutationen) und den 293T-Zellen (43 A→G Mutationen). Auch die relative A→G Mutationsrate des GPs ist in den Mäusen mit 2×10^{-4} Fehlern pro Basenpaar viel niedriger als in L929-Zellen mit 15×10^{-4} Fehlern pro Basenpaar. Somit konnte für infizierten 293T-Zellen und L929-Zellen gezeigt werden, dass die 5'-Nachbarn der A→G Mutationen im LCMV-GP weitgehend mit der 5'-Nachbar-Präferenz der iADAR-1 identisch sind.

6. Diskussion

Nach der akuten Phase der viralen Infektion mit hoher Virusreplikation und einer Ausbreitung des Virus im Wirt kommt es bei vielen Infektionen zu einer Persistenz. Der Replikation, Ausbreitung und Persistenz des Virus im Wirt wirkt das Immunsystem mit einer frühen unspezifischen und einer späteren spezifischen Immunantwort entgegen. Diese beiden Arme der Immunantwort führen meist zur Eliminierung des Virus oder zumindest zur Kontrolle der Virusreplikation. Am Beispiel des nicht zytopathischen LCM Virus (LCMV) wurden in der Vergangenheit viele Mechanismen der Immunabwehr gegen Viren aufgeklärt. LCMV kann im natürlichen Wirt sowohl eine akute, initiale als auch eine chronische, lebenslange und persistente Infektion entwickeln.

LCMV-Infektionen sind vor allem hinsichtlich der adaptiven humoralen, der T-Zell vermittelten sowie der zellvermittelten, angeborenen Immunantwort, z.B. durch NK-Zellen, untersucht worden [49, 128]. Die angeborene Immunantwort der einzelnen Zelle auf eine LCMV-Infektion durch IFN- α -induzierte Proteine ist bisher weniger untersucht. Auch inwieweit die antiviralen Mechanismen einer infizierten Zelle zur Persistenz des Virus beitragen, ist nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der IFN- α -induzierbaren ADAR-1 in der Immunantwort gegenüber LCMV näher untersucht. Damit soll auch die generelle Frage beantwortet werden, ob die iADAR-1 Bestandteil der antiviralen Mechanismen der Zelle ist.

Insbesondere wurde am Beispiel des LCMV-GPs die Hypothese überprüft, dass die IFN- α -induzierbare ADAR-1 das virale Genom editiert und es somit zu A \rightarrow G Mutationen kommt. Diese Mutationen vermindern dann die Funktionalität der fehlerhaften viralen Proteine und die Synthese von neuen Virionen. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

- Als Teil der Immunabwehr wird die iADAR-1 durch IFN- α -Stimulation verstärkt exprimiert. Die Infektion von Zellen und Mäusen mit LCMV führte ebenfalls zur Hochregulation der iADAR-1, was sowohl auf mRNA- und Proteinebene als auch in einem ADAR-1 Aktivitäts-Assay in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen wurde.

- Sowohl *in vitro* in L929-Zellen als auch *in vivo* in Mäusen konnte eine erhöhte A→G Mutationsfrequenz in der S-RNA von LCMV nachgewiesen werden. Dies zeigte sich vor allem in der späten Phase der Infektion, also dem Beginn der Persistenz. Insgesamt wurden zu diesem Zeitpunkt in L929-Zellen 27 % und in der Maus 15 % nicht funktionelles LCMV-GP synthetisiert. 62 % der nicht infektiösen GP werden durch A→G Mutationen in der RNA hervorgerufen (siehe Tabelle 12).
- A→G Mutationen in der S-RNA nahmen in iADAR-1-überexprimierenden 293T-Zellen um 40 % zu. Dadurch wurde die desaminierende Wirkung der iADAR-1 auf das virale Genom direkt gezeigt. Der Titer von LCMV im Überstand iADAR-1-überexprimierender Zellen war ebenfalls signifikant reduziert.
- Die virale Polymerase verursacht nicht das A→G Hypermutationsmuster, da in MEF^{-iADAR-1} sowohl A→G als auch in gleichem Maße G→A Mutationen in der S-RNA von LCMV auftraten. Da die iADAR-1-Expression in MEF wt deutlich geringer war als in L929-Zellen, konnte allerdings auch in diesen Zellen kein A→G Hypermutationsmuster beobachtet werden.

6.1. Gehäufte A→G Mutationen im viralen Genom von LCMV und deren Auswirkungen auf die Funktion des LCMV-GP

In der späten Phase der Infektion von LCMV kommt es zu einer Verringerung der GP-Expression in der Zelle, während NP weiterhin unverändert vorliegt [111, 129]. Um zu analysieren, ob Mutationen die Ursache der geringen GP-Expression sind, wurde die RNA für GP daraufhin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ein Großteil der Mutationen im GP von L929-Zellen und Mäusen A→G (U→C) Transitionen waren, die teilweise zu fehlerhaft exprimiertem, nicht pseudotypisierendem Protein führen. Mehr als die Hälfte aller mutierten GP-Klone, die zu diesem späten Zeitpunkt der Infektion untersucht wurden, waren nicht funktionell (siehe Tabelle 12).

Um effektiv an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert zu werden, muss die zelluläre Subtilase SKI-1/S1P LCMV-GP-C in GP-1 und GP-2 spalten [31]. Auch die Infektiosität von LCMV und die Fähigkeit Retroviren zu pseudotypisieren, ist bei ungespaltenem GP-C stark reduziert [30].

Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Alle GP-Klone deren GP-C nicht oder unvollständig in GP-1 und GP-2 gespalten wurde, zeigten kaum GP-Oberflächenexpression und bildeten keine Pseudotypen aus. Dies galt auch für die LCMV-GP-Klone, deren Mutationen ausschließlich im GP-1 lokalisiert waren. Weiterhin haben genauere Untersuchungen an einer LCMV-infizierten SKI-1/S1P defizienten Zelllinie gezeigt, dass sich in freigesetzten Virionen kaum inkorporiertes, ungespaltenes GP-C, aber sehr wohl NP nachweisen lässt [31]. Die Spaltung des GPs ist auch bei anderen Viren, wie dem Arenavirus LFV und dem Lentivirus HIV, eine Voraussetzung für die Bildung von infektiösen Virionen [32, 130, 131].

Die ungespaltenen GP-Klone der L929-Zellen und der Mäuse zeigten keine Übereinstimmung in ihren Mutationsstellen. Es war dadurch nicht möglich ein Sequenzmotiv zu bestimmen, das für die Faltung und Prozessierung essentiell ist. Die zwei GP-Klone L9 und 38 trugen aber beide je einen Aminosäureaustausch in einem der möglichen Glykolysierungsmotive. Die Klone wurden nicht gespalten und zeigten im Western Blot eine etwas schnellere Migration des GP-C. Die schnellere Migration im Gel konnte auch von W. Beyer (unveröffentlichte Daten) für die alleinige Mutation der Glykolysierungsstelle gezeigt werden. Hierbei wird das GP-C dann weiterhin gespalten und auch MLV-basierte Retroviren werden pseudotypisiert. Von daher müssten die anderen Mutationen in diesen Klonen daraufhin überprüft werden, ob sie für die mangelnde Prozessierung verantwortlich sind. Dies ist vor allem für Klon 38 relevant, dessen GP-Sequenz hypermutiert war.

Die Untersuchung der mutierten GP-Varianten ergab, dass mutationsbedingte defekte GP-Varianten für die verringerte Virionen-Bildung und GP-Oberflächenexpression mitverantwortlich sind. Dabei wird ein Großteil der defekten GP-Varianten in dieser späten Phase der Infektion durch A→G Mutationen im viralen Genom verursacht. Unklar bleibt jedoch weiterhin die Regulierung der GP-Expression, da hochgerechnet in infizierten Mäusen nur 15 % und in L929-Zellen 27 % aller untersuchten GP nicht funktionell waren. Da in Mäusen nur der GP-1 Bereich untersucht wurde, könnte sich bei der Betrachtung der gesamten GP-mRNA eine ähnliche Zahl an nicht funktionellen GP wie in den L929-Zellen ergeben. Eine Möglichkeit für die niedrige GP-Expression in der späten Phase der LCMV-Infektion wäre ein dominant negativer Effekt der defekten GP-Varianten. Durch die Integration eines defekten GP-1 bzw. GP-1/GP-2 in ein Homotetramer des GP-Spikes könnte dieser seine Infektiosität verlieren oder erst gar nicht auf der Oberfläche exprimiert werden.

Somit würden einzelne defekte GP die Expression des GPs insgesamt deutlich stärker reduzieren als errechnet. Ferner könnte zur verringerten GP-Expression in der späten Phase der Infektion außer den zellulären antiviralen Abwehrmechanismen auch das Virus selbst beitragen. So wurden z.B. in der persistenten Infektion von Mäusen terminal trunkierte, genomische RNA's von LCMV aus dem Gehirn von Mäusen isoliert [12, 25]. Diese konkurrieren mit vollständigen Genomen um die Replikation, sind aber transkriptions-inkompetent und verringern so die Menge an viraler mRNA, auch der des GPs. Ein weiterer Faktor könnte die Transkription viraler mRNA's in der späten Phase der Infektion reduzieren. Ein identisches Mutationsmuster wie im untersuchten Bereich der S-RNA tritt sicherlich auch in der L-RNA und dem NP-Gen auf, wodurch die Transkription viraler mRNA durch das L-Protein und das NP reduziert wird. Die verringerte Expression des GPs und der Abfall der Replikation am Ende der akuten Phase der Infektion wird wahrscheinlich von mehreren Faktoren bewirkt. Hieran haben Mutationen und insbesondere A→G Mutationen einen unzweifelhaften Anteil, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Die gehäuften A→G Mutationen in der S-RNA könnten durch die virale Polymerase oder durch einen zellulären Faktor verursacht werden. Die Polymerase von LCMV ist eine RNA-Polymerase, die wie alle anderen viralen RNA-Polymerasen keine „proof-reading“ Aktivität hat [113]. Dies erklärt die beobachtete hohe Fehlerrate im viralen Genom, die in den LCMV-infizierten L929-Zellen von 2,49 auf 20×10^{-4} Fehlern pro Basenpaar im Infektionsverlauf von Tag zwei zu Tag sieben anstieg. Eine ähnlich hohe Fehlerrate ist auch für andere RNA-Viren beschrieben [132]. Für LCMV wurde bisher nur eine Fehlerrate mit $1,4-2,6 \times 10^{-4}$ Fehlern pro Basenpaar für ein Teil des GP-Gens bei serieller Passage des Virusüberstandes alle zwei Tage bestimmt [114, 133]. Bei dieser seriellen Passagierung wird allerdings in jeder Passage auf weitgehend fehlerfrei Genome selektioniert, da Viren mit zu vielen Fehlern weniger replikationskompetent sind. In dieser Arbeit wurde dagegen die RNA-Spezies innerhalb von Zellen sieben Tage nach der Infektion betrachtet. Hier stehen mutierte Genome nicht unter Selektionsdruck, so dass sich Mutationen im Genom zur gemessenen 10-fach höheren Fehlerrate multiplizieren. Die hohe Fehlerrate im Genom von LCMV an Tag sieben nach der Infektion wurde hierbei zu 75 % durch ein spezifisches A→G Hypermutationsmuster verursacht.

In der Literatur ist bisher für die virale Polymerase von LCMV und auch für andere virale Polymerasen kein spezifisches Mutationsmuster beschrieben. Auch wurde in mit LCMV-infizierten iADAR-1 „knockout“ MEF kein A→G Hypermutationsmuster in der S-RNA nachgewiesen, so dass man die virale Polymerase als Verursacher der vermehrten A→G Mutationen ausschließen kann.

Im Genom anderer Viren tritt ebenfalls, wie im Genom von LCMV, ein A→G Hypermutationsmuster auf. Masernvirus, Parainfluenza Virus 3 und Respiratory-Syncytial-Virus zeigen in einem späten, persistenten Stadium der Infektion ein A→G Hypermutationsmuster [4, 87, 89, 90, 134]. Für diese Viren wurde postuliert, dass nicht die virale Polymerase, sondern die ADAR-1 A→G bzw. U→C Transversionen verursacht [4]. Die A→G bzw. die U→C Transversionen sind in diesen Viren meist unspezifisch im Genom verteilt. Zu beobachten ist aber in einzelnen Klonen die Akkumulation vieler Mutationen in einem kurzen Bereich des Genoms.

Bei LCMV häuften sich ebenfalls in vier isolierten GP-Klonen aus L929- und 293T-Zellen A→G Mutationen in einem kurzen Bereich. Beispielsweise waren in einem dieser Klone 38 % aller Adenosine zu Guanosin in einem 420 Basenpaar kurzen Bereich mutiert. Betrachtet man alle in den LCMV-GP-Klonen gefundenen A→G (U→C) Mutationen, die in muriner Milz, L929- und 293T-Zellen auftraten, fanden sich keine spezifischen A→G Mutationsstellen im viralen Genom (siehe Abb. 43).

Es sind zwar einzelne Stellen in drei verschiedenen Klonen mutiert, in diesem Bereich war allerdings auch die Zahl der sequenzierten Klone höher. Die Verteilung der A→G Mutationen lässt hierbei kein bestimmtes Muster erkennen, wie z.B. einen kurzen Abschnitt, der in allen Klonen besonders viele A→G Transversionen aufweist.

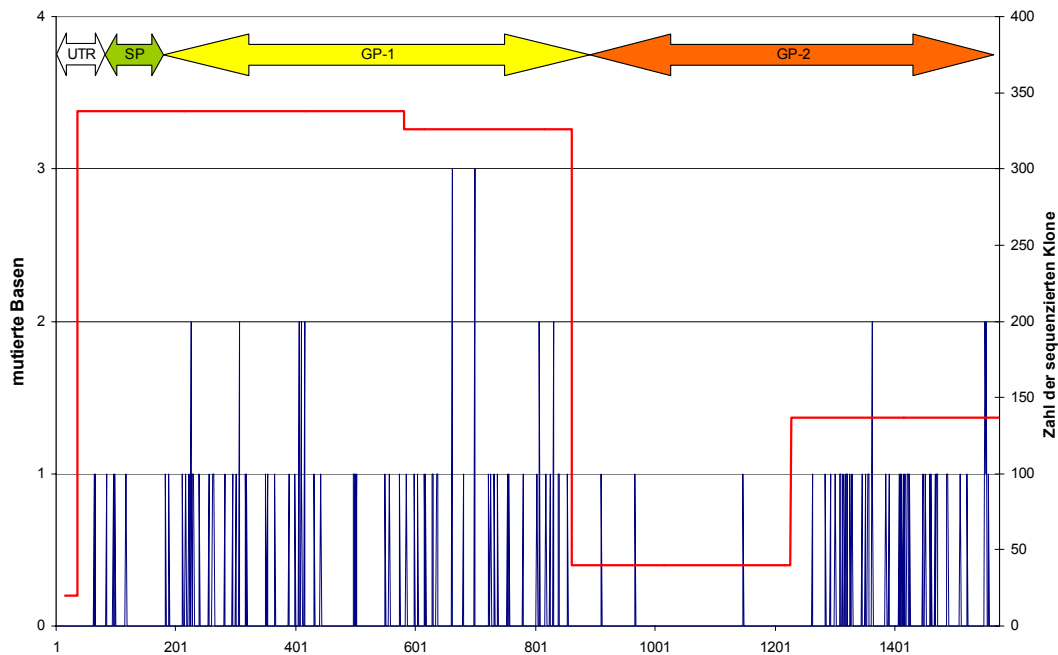


Abb. 43 Graphische Übersicht der A→G Mutationen im LCMV-GP. Die blauen Balken stehen für die Mutationen an der entsprechenden Stelle im LCMV-GP. Die rote Linie gibt die Zahl der sequenzierten Klone im entsprechenden Bereich wieder. In der Graphik sind alle Mutationen im LCMV-GP aus L929-Zellen, 293T-Zellen und den Mäusen eingetragen.

ADAR-1 könnte für dieses A→G Hypermutterationsmuster in Viren verantwortlich sein, wie hier auch für LCMV beobachtet. Da LCMV im Zytoplasma repliziert, kommt hierfür nicht die konstitutiv exprimierte kurze Form der ADAR-1 in Betracht, sondern ausschließlich die lange, zytoplasmatische und IFN- α -induzierbare ADAR-1. Diese Hypothese wurde anhand der 5'-Nachbarn der gefundenen, gehäuft auftretenden A→G Transversionen überprüft. Die ADAR-1 präferiert bei der Desaminierung bestimmte 5'-Nachbarnukleotide des Adenosins der editierten Stelle [71, 72]. In der S-RNA, die aus L929- und 293T-Zellen isoliert wurde, fand sich eine Präferenz der 5'-Nachbarnukleotide der A→G Mutationsstellen, die man bei einer Desaminierung durch die iADAR-1 erwarten würde (siehe Abb. 42). Dies spricht dafür, dass die iADAR für die Entstehung der A→G Mutationen verantwortlich ist. Ein ähnliches Muster der 5'-Nachbarnukleotide konnte auch in A→G hypermutierten Polyomaviren festgestellt werden, die vermutlich von der ADAR-1 verursacht sind [134]. Die 5'-Nachbarnukleotide der 17 A→G Mutationen in aus der Maus isolierten GP-Klonen entsprachen hingegen nicht der Präferenz der iADAR-1. Allerdings war die A→G Fehlerrate der S-RNA in Mäusen mit $3,2 \times 10^{-4}$ Fehlern pro Basenpaar an Tag vier und fünf nach der Infektion deutlich niedriger als in den L929-Zellen mit 16×10^{-4} Fehlern pro Basenpaar oder den 293T-Zellen mit 12×10^{-4} Fehlern pro Basenpaar.

Durch die niedrige A→G Fehlerrate in den LCMV-GP-Klonen aus der Maus könnte das Muster der 5'-Nachbarn nicht repräsentativ sein. Hierfür müsste eine größere Anzahl von GP-Klonen genauer analysiert werden. Auch wäre es hierdurch möglich potentiell hypermutierte Klone der S-RNA auch in Mäusen zu finden, die sowohl in L929-Zellen als auch in 293T-Zellen einen Großteil der A→G Mutationen ausmachen.

Es ist davon auszugehen, dass die Regulation der angeborenen Immunantwort in der Maus komplexer und damit verschieden vom *in vitro* Zellkulturmodell abläuft. Möglicherweise werden dadurch hypermutierte mRNA-Klone *in vivo* schneller abgebaut. Werden die gefundenen A→G Hypermutationen durch die iADAR-1 verursacht, ist die editierte RNA hochgradig inosinhaltig und wird spezifisch von RNasen abgebaut [60, 61]. Diese RNase-Aktivität könnte *in vivo* im Vergleich zur Situation *in vitro* erhöht sein, wodurch die inosinhaltige RNA in Mäusen schneller degradiert wird als in L929- bzw. 293T-Zellen. Die RNase L wird z.B. über die Oligoadenylat-Synthetase (OAS) während der IFN- α -abhängigen Immunantwort aktiviert und degradiert virale RNA. Dass *in vitro* andere Verhältnisse herrschen als *in vivo*, wurde am IFN- α ELISAs deutlich. Bei der LCMV-Infektion war im Blut von Mäusen IFN- α bestimmbar, nicht aber im Zellkulturüberstand infizierter Zellen. *In vivo* wird allerdings eine systemische Immunreaktion durch die LCMV-Infektion induziert und dabei synthetisieren bestimmte Zellpopulationen, wie natürliche IFN- α/β -produzierende Zellen (IPC), große Mengen an IFN [135]. Dieses höhere IFN- α -Niveau *in vivo* könnte nicht nur Auswirkungen auf die Stimulation der iADAR haben, sondern auch auf RNasen, die durch IFN- α ebenfalls aktiviert werden. Damit würde die inosinhaltige hypermutierte RNA *in vivo* schneller abgebaut als *in vitro* und hypermutierte Klone wären schlechter isolierbar. Der schnelle Abbau von inosinhaltiger RNA durch RNasen verstärkt den antiviralen Effekt der iADAR-1. Einerseits wird durch die induzierten Mutationen die Funktionalität viraler Proteine und die Replikation gestört. Andererseits wird die als viral markierte inosinhaltige RNA degradiert.

Die im LCMV-GP gefundenen A→G Hypermuationen stimmen mit dem aus anderen Viren bekannten Muster überein und werden offenbar nicht durch die virale Polymerase, sondern eher durch die iADAR-1 erzeugt. Diese These wird durch die Analyse der entsprechenden 5'-Nachbarn der A→G Mutationen in L929- und 293T-Zellen gestützt, da diese mit der Präferenz der iADAR-1 übereinstimmen ein bestimmtes Adenosin zu editieren.

6.2. Induktion der iADAR-1 durch LCMV

Proteine der angeborenen Immunabwehr sind in ihrer Aktivität und Expression meist strikt reguliert, um die normalen zellulären Funktionen nicht zu stören, solange keine Infektion vorliegt [64]. Wie Studien gezeigt haben, wird auch die iADAR-1, wie andere antivirale Mediatoren durch IFN- α/β sowie IFN- γ hochreguliert [80, 84]. Ebenso führt eine akute Entzündungsreaktion, vermittelt durch TNF- α und IFN- γ , zu einer erhöhten iADAR-1-Aktivität [120]. Bei Virusinfektionen wird häufig IFN- α sezerniert, ob jedoch durch eine Infektion die iADAR-1 induziert wird ist bisher kaum untersucht. Nur für eine Adenovirus-infizierte Makrophagenzelllinie wurde eine virale iADAR-1-Induktion beschrieben [120].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der Milz von LCMV-infizierten Mäusen die iADAR-1 induziert wird. Die Kinetik der iADAR-1-Expression korrelierte hierbei mit dem Level des IFN- α im Serum und der Expression eines weiteren IFN-induzierbaren, antiviralen Enzyms, der PKR. Die Infektion der Mäuse mit LCMV stimulierte demnach wie erwartet die angeborene Immunantwort und damit auch die iADAR-1. Diese Ergebnisse konnten auch *in vitro* durch die LCMV-Infektion von SH-SY5Y-Zellen und von L929-Zellen bestätigt werden. Das Niveau der iADAR-1-mRNA-Expression war allerdings in den infizierten Zellen niedriger als in IFN- α -stimulierten Kontrollzellen. Die Ursache könnte die geringe, im ELISA nicht nachweisbare, IFN- α -Induktion durch LCMV *in vitro* sein. Es ist bekannt, dass LCMV im Gegensatz zu anderen Viren wie NDV in der Zellkultur ein schlechter IFN- α -Induktor ist [121, 136].

Auch auf Proteinebene konnte eine Hochregulierung der iADAR-1 nach der LCMV-Infektion in 293- und in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden.

Allerdings wurde in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu 293-Zellen noch eine weitere Bande unterhalb der iADAR-1-Bande von 150 kD detektiert. Diese könnte durch eine „Splice“-Variante der iADAR-1 entstehen, da die drei verschiedenen „Splice“-Varianten a, b und c je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert werden [84]. 293-Zellen sind Nierenepithelzellen [100], während SH-SY5Y-Zellen aus einem Neuroblastom generiert wurden [99].

Die Induktion der iADAR-1 durch die LCMV-Infektion konnte demnach sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Damit ist eine Voraussetzung für die Editierung des viralen Genoms durch die iADAR-1 gegeben. Aber die Aktivität der iADAR-1 wird von anderen Viren, wie dem Vaccinia Virus mit dem E3L Protein [6] und dem Adenovirus mit der VAI-RNA [5], erheblich inhibiert. Um sicherzustellen, dass dies bei einer LCMV-Infektion nicht der Fall ist, wurde ein Editierungs-Assay etabliert. Dieser beruht auf der Messung der iADAR-1-Aktivität anhand der Editierung an der GluR/B +60 Stelle. Damit konnte für LCMV keine inhibierende Wirkung auf die iADAR-1 in SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden. Die GluR/B +60 Editierungsstelle wurde bei der Überexpression der iADAR-1 in infizierten wie in nicht infizierten Zellen gleichermaßen zu 70-80 % editiert, was mit den Daten von Seeburg et al. [75] übereinstimmt. Durch IFN- α -Gabe wurde die Editierungs-Aktivität der iADAR-1 ebenfalls deutlich erhöht, auch wenn die Zellen zusätzlich mit LCMV-infiziert wurden. Eine alleinige LCMV-Infektion der Zellen führte allerdings nur zu einer schwachen Erhöhung der Editierungs-Aktivität.

Auf der einen Seite könnte hierfür die nur halb so hohe Expression der iADAR in LCMV-infizierten Zellen im Vergleich mit IFN- α -behandelten verantwortlich sein (siehe Abb. 24). Auf der anderen Seite erfolgte die Messung der Editierungs-Aktivität mit dem GluR/B +60 RNA-Element, das im Zellkern editiert wird [95]. Diese Messmethode hatte den Nachteil, dass die gemessene Editierungs-Aktivität nicht ausschließlich durch die iADAR-1 hervorgerufen wird, die nach der Synthese in den Zellkern transportiert wird und anschließend wieder ins Zytoplasma lokalisiert [137]. Zusätzlich wird durch die nukleäre, konstitutiv exprimierte cADAR-1 Editierungs-Aktivität verursacht, so dass geringe Mengen an iADAR-1 mit diesem Assay schlecht erfasst werden können. Um ausschließlich die Aktivität der iADAR-1 im Zytoplasma zu messen, wurde von Wong et al. [138] ein System beschrieben. In diesem wird ein editierbares HDV-Antigenom im Zytoplasma von einer transfizierten Semliki Forest Virus (SFV) mRNA mit inseriertem HDV-Genom transkribiert.

Hiermit war es ihm möglich, die alleinige Aktivität der iADAR-1 im Zytoplasma anhand des HDV-Antigenoms zu ermitteln. Dieses System könnte in Zukunft auch zur genaueren Messung der iADAR-1-Aktivität in LCMV-infizierten Zellen eingesetzt werden.

Die iADAR-1 wurde folglich durch die Infektion von Zellen und Mäusen mit LCMV verstärkt exprimiert und dies führte zu einer schwachen Induktion der Editierungs-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen. Demnach wird die iADAR-1 als Teil der IFN- α -abhängigen Immunantwort gegen LCMV aktiviert. Hiermit ist die Voraussetzung gegeben, dass das im Genom von LCMV gefundene A \rightarrow G Hypermutterationsmuster durch die iADAR-1 hervorgerufen wird. Ungeklärt bleibt jedoch, ob die iADAR-1 hierbei ausschließlich durch IFN- α/β aktiviert wird oder ob auch eine direkte Induktion durch einen viralen Faktor von LCMV wie z.B. der dsRNA erfolgt. Diese Frage könnte in Zukunft mit der Infektion von IFN- α/γ -Rezeptor „knockout“ Mäusen und Zellen beantwortet werden.

6.3. Wechselwirkung zwischen der iADAR-1 und LCMV

Um die direkte Interaktion zwischen der iADAR-1 und dem viralen Genom von LCMV zu zeigen, wurde die iADAR-1 in 293T-Zellen überexprimiert. Dadurch stiegen die A \rightarrow G Mutationen im viralen Genom um 40 % an. Die Editierungs-Aktivität der iADAR-1-überexprimierenden Zellen war im Vergleich zu Kontrollzellen ebenfalls doppelt so hoch. Damit konnte direkt nachgewiesen werden, dass A \rightarrow G Mutationen im LCMV-Genom durch die iADAR-1 induziert werden. Dies wurde für Viren bisher nur für die spezifische Desaminierung des viralen Antigenoms vom HDV durch die iADAR-1 nachgewiesen [138]. Allerdings traten auch in den Kontrollzellen A \rightarrow G Transversionen von allen Mutationstypen in der S-RNA am häufigsten auf, wenn auch mit eindeutig niedriger Frequenz als in den iADAR-1-überexprimierenden Zellen. Eine endogene Aktivierung der iADAR-1 durch die LCMV-Infektion war zu erwarten, was sowohl im Western Blot als auch im Editierungs-Assay erkennbar war (siehe Kapitel 6.2). Im Editierungs-Assay war die GluR/B +60 Stelle in den mit LCMV-infizierten 293T-Zellen zu 40 % editiert. Demgegenüber war die +60 Stelle in uninfizierten 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen nur zu 20 % editiert. Zudem wird die iADAR-1 in 293-Zellen in geringen Mengen konstitutiv exprimiert.

Diese konstitutive Expression führt zu einer 7 %-igen Editierung eines transfizierten HDV-Antigenoms in 293-Zellen [139]. Folglich könnte schon die basale Expression der iADAR-1 zur Editierung des viralen Genoms beitragen und diese Expression wird bei der Infektion mit LCMV noch verstärkt. Es wird durch die Überexpression der iADAR-1 also eine generell höhere iADAR-1-Menge in 293T-Zellen erzeugt, jedoch nur zusätzlich zur endogenen iADAR-1.

Die LCMV-GP-Oberflächenexpression auf LCMV-infizierten 293T-Zellen wurde durch die iADAR-1-Überexpression nicht wesentlich reduziert. Dies könnte zum einen aus der endogenen iADAR-1-Hochregulation durch die LCMV-Infektion resultieren. Hierdurch kommt der Effekt der zusätzlich exprimierten iADAR-1 nicht in dem Maße zum Tragen. Zum anderen kann LCMV-GP auf der Oberfläche mit dem KL25-Antikörper detektiert werden, obwohl das GP nicht mehr funktionell ist und auch nicht zu infektiösen Virionen führt (siehe Kapitel 5.2.1, [30, 31]). Selbst das GP des hypermutierten Klons 38 konnte auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden, obwohl das mutierte GP-C des Klon 38 nicht in GP-1 und GP-2 gespalten wurde.

Der Titer von LCMV im Überstand der iADAR-1 exprimierenden Zellen hingegen war deutlich niedriger als in den Kontrollzellen. Die iADAR-1 verursachte demnach nicht nur A→G Mutationen im Genom, sondern diese vermindern auch die Vermehrungsfähigkeit des Virus. Die Passagierung von LCMV auf Zellen die mit 5-Fluorouracil behandelt werden, führt nicht nur zu einer Verminderung der viralen Replikation, sondern es kommt zur „Fehlerkatastrophe“ im viralen Genom [133]. Um zu klären, ob die iADAR-1-Überexpression ebenfalls zu einer „Fehlerkatastrophe“ des Virus führt, müsste LCMV auf den iADAR-1-überexprimierenden Zellen passagiert werden. Dadurch wäre es möglich die Frage zu klären, ob A→G Mutationen das Genom von LCMV und die mRNA betreffen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern war es nicht möglich zwischen Genom und mRNA zu unterscheiden. Es könnte sein, dass das Genom und Antigenom nicht als dsRNA-Substrat für die iADAR-1 zur Verfügung steht, da es durch die Assoziation an NP geschützt ist. Wäre das Genom weitgehend geschützt, käme es bei der Passagierung auf iADAR-1 exprimierenden Zellen nicht zu einer Fehlerkatastrophe. Da es aber nicht gelang die iADAR-1 stabil überzuexprimieren, wurde ein alternatives System gesucht, in dem keine basale iADAR-1 Aktivität vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden erstmals ADAR-1 „knockout“ MEF aus Embryonen isoliert und immortalisiert.

Die Immortalisierung der MEF^{-/-ADAR-1} war allerdings nicht mit dem 3T3-Protokoll [102] möglich, da die Zellen im Gegensatz zu den wt MEF abstarben oder in den Ruhezustand übergingen. Neuere Untersuchungen haben in Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ergeben, dass MEF^{-/-iADAR-1} früher apoptotisch werden als MEF wt [140]. Die MEF^{-/-iADAR-1} Zellen wurden dann im Folgenden erfolgreich mit dem large T-Antigen von SV40 [141] immortalisiert.

Um die Mutationsrate des LCMV-GP ohne basale iADAR-1-Aktivität zu bestimmen, wurden sowohl primäre als auch immortalisierte MEF^{-/-iADAR-1} mit LCMV-infiziert. Es wurden keine vermehrten A→G Mutationen in der viralen RNA festgestellt. In den wt MEF konnte ebenfalls keine vermehrte A→G Mutationsrate des viralen Genoms nachgewiesen werden. Auch bei der Expression des GPs von LCMV auf der Zelloberfläche und dem Titer von LCMV im Zellkulturüberstand waren keine Unterschiede zwischen den wt und iADAR-1 „knockout“ MEF zu beobachten. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen des antiviralen Effektes des promyelozytischen Leukämie Proteins (PML), STAT-1 und der IFN- α/β -Rezeptoren, die ebenfalls in „knockout“ MEF oder Mäusen durchgeführt wurden [121, 136, 142]. Diese generellen Mediatoren der Immunantwort inhibieren die Replikation von LCMV deutlich. Die ADAR-1 hingegen hatte in den wt MEF im Vergleich zu MEF^{-/-ADAR-1} keinen Einfluss auf die Replikation und das virale Genom von LCMV, obwohl die iADAR-1 in MEF wt ebenso wie in L929-Zellen und Mäusen durch die Infektion mit LCMV hochreguliert wird. Allerdings ist die basale Expression der iADAR-1 in den MEF wt um das 10-fache niedriger als in Mäusen (siehe Abb. 42). Selbst nach der Infektion mit LCMV ist die Expression der iADAR-1 in MEF wt nur doppelt so hoch wie die basale Expression in L929-Zellen. Hierdurch könnte die Expression und Aktivität der iADAR-1 nicht ausreichend sein, um das Genom von LCMV zu editieren.

Zudem ist die Expression der ADAR-1 in Embryonen, aus denen die MEF isoliert wurden, strikt reguliert. Homozygote ADAR-1 „knockout“ Embryonen sterben zwischen Tag 11,5 und 12,5 der Embryogenese [78, 140]. Die Embryonen haben eine gestörte Erythropoese und die Leber ist fehlentwickelt; hier finden sich viele apoptotische Zellen ab Tag zehn nach der Befruchtung. Die ADAR-1 selbst ist also an der Regulation der Apoptose während der Embryogenese beteiligt. Das zeigte sich ebenfalls beim Entzug von Serum, da primäre ADAR-1 „knockout“ MEF schneller apoptotisch werden als wt MEF [140].

Deshalb könnten die normalen immunregulatorischen Mechanismen in MEF, zumindest die iADAR-1 betreffend, außer Kraft gesetzt sein. Dies zeigte sich auch an der höheren basalen Expression der PKR im Verhältnis zur iADAR-1-Expression in MEF wt. Sowohl in L929-Zellen als auch in Mäusen wurde die iADAR-1 im Verhältnis zur PKR stärker exprimiert. Dies würde die geringe Expression der iADAR-1 in wt MEF erklären, wodurch der Unterschied zwischen MEF^{-iADAR-1} und MEF wt in Bezug auf die LCMV-Infektion so gering war. Zudem wurden die „knockout“ MEF-Zellen schon an Tag zehn der Embryogenese aus den Mäusen isoliert, da nach diesem Zeitpunkt die homozygot ADAR-1 deletierten Embryonen absterben [78]. Bis zu Tag sieben der Embryogenese reagiert embryonales Gewebe auf virale Stimulation nicht mit einer IFN-Produktion [143-145]. Auch danach ist die IFN-abhängige Immunantwort nicht vollständig ausgebildet und auf ausdifferenzierte Gewebe beschränkt. Dies zeigte sich in Studien mit embryonalen Karzinom-Zelllinien, die nur ausdifferenziert IFN- α/β sezernieren [143, 146]. Durch die frühe Isolation der MEF aus den Embryonen, könnte demnach das IFN-System der MEF noch nicht vollständig ausgebildet und aktiviert sein.

Um den Einfluss der iADAR-1 auf LCMV künftig auf der Basis des MEF^{-iADAR-1} Systems zu untersuchen, könnte in Zukunft die iADAR-1 in diesen Zellen durch die stabile Transfektion eines iADAR-1-Expressionsplasmides exprimiert werden. Damit würde sichergestellt, dass ausreichend iADAR-1 in den Zellen vorhanden ist, um das Genom von LCMV zu editieren. Mit diesem verbesserten Modellsystem wäre es weiterhin möglich, auch für andere Viren den Einfluss der iADAR-1 zu untersuchen.

6.4. Modell der antiviralen Aktivität der iADAR-1

In dieser Arbeit wurde die antivirale Funktion der iADAR-1 bei der angeborenen Immunabwehr genauer definiert. LCMV diente hierbei als Beispiel eines nicht zytopathischen RNA-Virus, dessen Genom durch die iADAR-1 desaminiert wird, wodurch dessen Infektiosität abnimmt. Folgendes Modell beschreibt die angeborene Immunabwehr der Zelle gegen LCMV unter Einbeziehung der Rolle der iADAR-1.

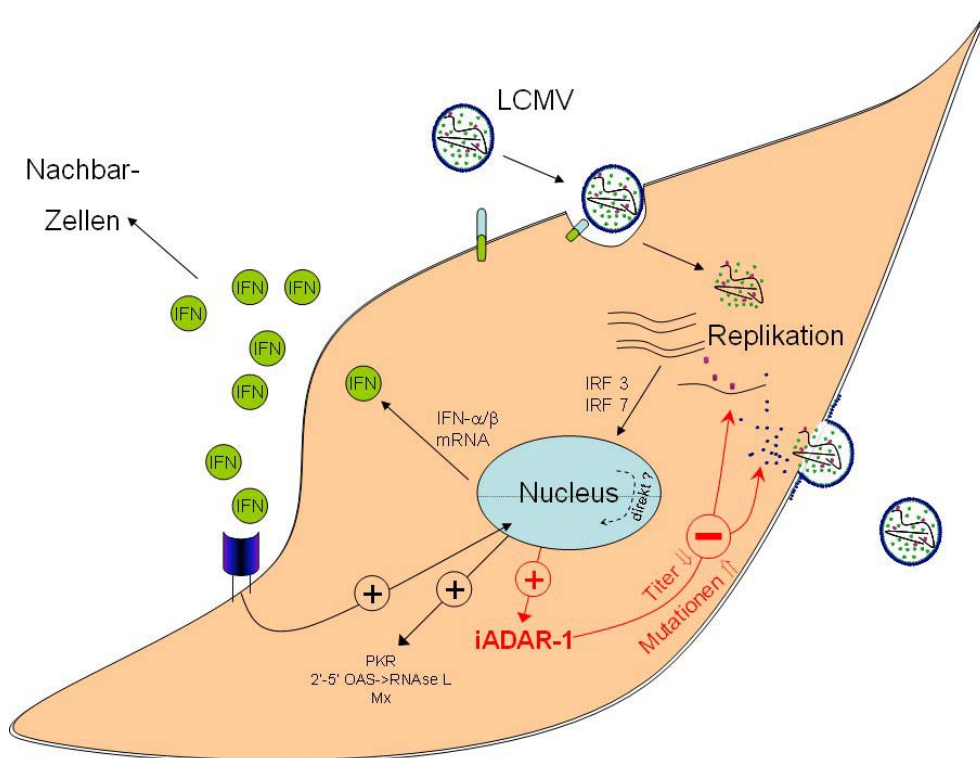


Abb. 44: Schema der Wechselwirkung zwischen iADAR und LCMV in einer infizierten Zelle.

Die Infektion einer Zelle durch LCMV verläuft über die Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor α -DG und anschließender Endozytose. Nach Freisetzung des viralen Genoms beginnt die Replikation, die Transkription und es werden die ersten Proteine von der viralen mRNA translatiert. Dabei entstehen bei der Replikation und Transkription dsRNA und andere virale Faktoren, wodurch die Synthese von IFN- α/β angeregt wird. Dieses wird ausgeschüttet und wirkt para- wie auch autokrin. Verschiedene antivirale Proteine wie die PKR werden dadurch aktiviert oder neu von der Zelle transkribiert und inhibieren die Virusreplikation. Die iADAR-1 wird dabei ebenfalls durch IFN- α/β hochreguliert und desaminiert im Zytoplasma doppelsträngige virale RNA. Hierdurch wird das virale Genom sowie die mRNA editiert und A \rightarrow G mutagenisiert. Die iADAR-1 reduziert somit die Synthese von neuen infektiösen Virionen und die Funktion der viralen Proteine. Zusätzlich degradieren spezifische, endogene RNasen inonsinhaltige, editierte RNA.

Die iADAR-1 editiert demzufolge die RNA von LCMV und hemmt damit als ein antivirales Protein der angeborenen Immunabwehr die virale Replikation. Die Bedeutung der antiviralen Aktivität der iADAR-1 für andere RNA-Viren muss jedoch in Zukunft noch näher analysiert werden.

7. Literatur

1. JK Richmond, DJ Baglole: **Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences.** *Bmj* 2003, **327**:1271-5.
2. SJ Winder: **The complexities of dystroglycan.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:118-24.
3. MG Katze, Y He, M Gale, Jr.: **Viruses and interferon: a fight for supremacy.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:675-87.
4. BL Bass: **RNA editing and hypermutation by adenosine deamination.** *Trends Biochem Sci* 1997, **22**:157-62.
5. M Lei, Y Liu, CE Samuel: **Adenovirus VAI RNA antagonizes the RNA-editing activity of the ADAR adenosine deaminase.** *Virology* 1998, **245**:188-96.
6. Y Liu, KC Wolff, BL Jacobs, CE Samuel: **Vaccinia virus E3L interferon resistance protein inhibits the interferon-induced adenosine deaminase A-to-I editing activity.** *Virology* 2001, **289**:378-87.
7. RM Zinkernagel, PC Doherty: **MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness.** *Adv Immunol* 1979, **27**:51-177.
8. RM Zinkernagel: **The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens.** *Scand J Immunol* 1997, **46**:421-36.
9. C Armstrong, RD Lillie: **Experimental of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic.** *Publ Health Rep* 1934, **49**:1019-1027.
10. SM Buckley, J Casals, WG Downs: **Isolation and antigenic characterization of Lassa virus.** *Nature* 1970, **227**:174.
11. JD Frame, JM Baldwin, Jr., DJ Gocke, JM Troup: **Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings.** *Am J Trop Med Hyg* 1970, **19**:670-6.
12. JB McCormick, PA Webb, JW Krebs, KM Johnson, ES Smith: **A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever.** *J Infect Dis* 1987, **155**:437-44.
13. JB McCormick, IJ King, PA Webb, KM Johnson, R O'Sullivan, ES Smith, S Trippel, TC Tong: **A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever.** *J Infect Dis* 1987, **155**:445-55.
14. LL Barton, NJ Hyndman: **Lymphocytic choriomeningitis virus: reemerging central nervous system pathogen.** *Pediatrics* 2000, **105**:E35.
15. M Bruns, W Zeller, H Rohdewohld, F Lehmann-Grube: **Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid.** *Virology* 1986, **151**:77-85.
16. M Bruns, J Cihak, G Muller, F Lehmann-Grube: **Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization.** *Virology* 1983, **130**:247-51.
17. BA van der Zeijst, N Bleumink, LV Crawford, EA Swyryd, GR Stark: **Viral proteins and RNAs in BHK cells persistently infected by lymphocytic choriomeningitis virus.** *J Virol* 1983, **48**:262-70.

18. MJ Buchmeier, MB Oldstone: **Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides.** *Virology* 1979, **99**:111-20.
19. M Salvato, E Shimomaye, MB Oldstone: **The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase.** *Virology* 1989, **169**:377-84.
20. MJ Buchmaier, MD Bowen, CJ Peters: **Arenaviridae: The Viruses and Their Replication.** Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001.
21. DD Auperin, RW Compans, DH Bishop: **Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses.** *Virology* 1982, **121**:200-3.
22. H Jin, RM Elliott: **Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus.** *J Virol* 1993, **67**:1396-404.
23. SR Shih, RM Krug: **Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins.** *Virology* 1996, **226**:430-5.
24. R Raju, L Raju, D Hacker, D Garcin, R Compans, D Kolakofsky: **Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs.** *Virology* 1990, **174**:53-9.
25. BJ Meyer, PJ Southern: **Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs.** *J Virol* 1994, **68**:7659-64.
26. DD Pinschewer, M Perez, JC de la Torre: **Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication.** *J Virol* 2003, **77**:3882-7.
27. M Perez, RC Craven, JC de la Torre: **The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:12978-83.
28. MS Salvato, KJ Schweighofer, J Burns, EM Shimomaye: **Biochemical and immunological evidence that the 11 kd zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus.** *Virus Res* 1992, **22**:185-98.
29. KE Wright, RC Spiro, JW Burns, MJ Buchmeier: **Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus.** *Virology* 1990, **177**:175-83.
30. WR Beyer, D Popplau, W Garten, D von Laer, O Lenz: **Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P.** *J Virol* 2003, **77**:2866-72.
31. S Kunz, KH Edelmann, JC de la Torre, R Gorney, MB Oldstone: **Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions.** *Virology* 2003, **314**:168-78.
32. O Lenz, J ter Meulen, HD Klenk, NG Seidah, W Garten: **The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:12701-5.
33. WR Beyer, H Miletic, W Ostertag, D von Laer: **Recombinant expression of lymphocytic choriomeningitis virus strain WE glycoproteins: a single amino acid makes the difference.** *J Virol* 2001, **75**:1061-4.

34. P Borrow, MB Oldstone: **Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus.** *J Virol* 1992, **66**:7270-81.
35. BS Parekh, MJ Buchmeier: **Proteins of lymphocytic choriomeningitis virus: antigenic topography of the viral glycoproteins.** *Virology* 1986, **153**:168-78.
36. MJ Buchmeier: **Arenaviruses: protein structure and function.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **262**:159-73.
37. W Cao, MD Henry, P Borrow, H Yamada, JH Elder, EV Ravkov, ST Nichol, RW Compans, KP Campbell, MB Oldstone: **Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus.** *Science* 1998, **282**:2079-81.
38. CF Spiropoulou, S Kunz, PE Rollin, KP Campbell, MB Oldstone: **New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor.** *J Virol* 2002, **76**:5140-6.
39. C Di Simone, MJ Buchmeier: **Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex.** *Virology* 1995, **209**:3-9.
40. C Di Simone, MA Zandonatti, MJ Buchmeier: **Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike.** *Virology* 1994, **198**:455-65.
41. M Salvato, P Borrow, E Shimomaye, MB Oldstone: **Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence.** *J Virol* 1991, **65**:1863-9.
42. SC Smelt, P Borrow, S Kunz, W Cao, A Tishon, H Lewicki, KP Campbell, MB Oldstone: **Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics.** *J Virol* 2001, **75**:448-57.
43. MN Teng, P Borrow, MB Oldstone, JC de la Torre: **A single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with the ability to cause growth hormone deficiency syndrome.** *J Virol* 1996, **70**:8438-43.
44. S Kunz, N Sevilla, JM Rojek, MB Oldstone: **Use of alternative receptors different than alpha-dystroglycan by selected isolates of lymphocytic choriomeningitis virus.** *Virology* 2004, **325**:432-45.
45. BA van der Zeijst, BE Noyes, ME Mirault, B Parker, AD Osterhaus, EA Swyryd, N Bleumink, MC Horzinek, GR Stark: **Persistent infection of some standard cell lines by lymphocytic choriomeningitis virus: transmission of infection by an intracellular agent.** *J Virol* 1983, **48**:249-61.
46. M Popescu, H Schaefer, F Lehmann-Grube: **Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: detection and measurement of interference focus-forming units.** *J Virol* 1976, **20**:1-8.
47. L Martinez Peralta, F Lehmann-Grube: **Properties of lymphocytic choriomeningitis virus interfering particles.** *Arch Virol* 1983, **77**:61-9.
48. P Klenerman, H Hengartner, RM Zinkernagel: **A non-retroviral RNA virus persists in DNA form.** *Nature* 1997, **390**:298-301.
49. CA Biron, KB Nguyen, GC Pien: **Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **263**:7-27.

50. CM Walsh, M Matloubian, CC Liu, R Ueda, CG Kurahara, JL Christensen, MT Huang, JD Young, R Ahmed, WR Clark: **Immune function in mice lacking the perforin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:10854-8.
51. MF van den Broek, D Kagi, RM Zinkernagel, H Hengartner: **Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo.** *Eur J Immunol* 1995, **25**:3514-6.
52. SA Kalams, BD Walker: **The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses.** *J Exp Med* 1998, **188**:2199-204.
53. A Ciurea, L Hunziker, P Klenerman, H Hengartner, RM Zinkernagel: **Impairment of CD4(+) T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants.** *J Exp Med* 2001, **193**:297-305.
54. A Ciurea, P Klenerman, L Hunziker, E Horvath, BM Senn, AF Ochsenbein, H Hengartner, RM Zinkernagel: **Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody-escape variants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:2749-54.
55. O Planz, S Ehl, E Furrer, E Horvath, MA Brundler, H Hengartner, RM Zinkernagel: **A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4(+) T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:6874-9.
56. P Seiler, BM Senn, MA Brundler, RM Zinkernagel, H Hengartner, U Kalinke: **In vivo selection of neutralization-resistant virus variants but no evidence of B cell tolerance in lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice expressing a transgenic virus-neutralizing antibody.** *J Immunol* 1999, **162**:4536-41.
57. M Matsumoto, K Funami, H Oshiumi, T Seya: **Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses.** *Microbiol Immunol* 2004, **48**:147-54.
58. L Malmgaard: **Induction and regulation of IFNs during viral infections.** *J Interferon Cytokine Res* 2004, **24**:439-54.
59. S Goodbourn, L Didcock, RE Randall: **Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures.** *J Gen Virol* 2000, **81 Pt 10**:2341-64.
60. AD Scadden, CW Smith: **Specific cleavage of hyper-edited dsRNAs.** *Embo J* 2001, **20**:4243-52.
61. AD Scadden, CW Smith: **A ribonuclease specific for inosine-containing RNA: a potential role in antiviral defence?** *Embo J* 1997, **16**:2140-9.
62. A Alcami, UH Koszinowski: **Viral mechanisms of immune evasion.** *Trends Microbiol* 2000, **8**:410-8.
63. M Chawla-Sarkar, DJ Lindner, YF Liu, BR Williams, GC Sen, RH Silverman, EC Borden: **Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis.** *Apoptosis* 2003, **8**:237-49.
64. CE Samuel: **Antiviral actions of interferons.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:778-809, table of contents.
65. DS Cho, W Yang, JT Lee, R Shiekhata, JM Murray, K Nishikura: **Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA.** *J Biol Chem* 2003, **278**:17093-102.

66. MS Paul, BL Bass: **Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA.** *Embo J* 1998, **17**:1120-7.
67. CX Chen, DS Cho, Q Wang, F Lai, KC Carter, K Nishikura: **A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains.** *Rna* 2000, **6**:755-67.
68. SH Chen, G Habib, CY Yang, ZW Gu, BR Lee, SA Weng, SR Silberman, SJ Cai, JP Deslypere, M Rosseneu, et al: **Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon.** *Science* 1987, **238**:363-6.
69. LM Powell, SC Wallis, RJ Pease, YH Edwards, TJ Knott, J Scott: **A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine.** *Cell* 1987, **50**:831-40.
70. KA Lehmann, BL Bass: **The importance of internal loops within RNA substrates of ADAR1.** *J Mol Biol* 1999, **291**:1-13.
71. KA Lehmann, BL Bass: **Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities.** *Biochemistry* 2000, **39**:12875-84.
72. AG Polson, BL Bass: **Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase.** *Embo J* 1994, **13**:5701-11.
73. A Herbert, J Alfken, YG Kim, IS Mian, K Nishikura, A Rich: **A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:8421-6.
74. SK Wong, S Sato, DW Lazinski: **Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2.** *Rna* 2001, **7**:846-58.
75. PH Seeburg, M Higuchi, R Sprengel: **RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology.** *Brain Res Brain Res Rev* 1998, **26**:217-29.
76. M Higuchi, S Maas, FN Single, J Hartner, A Rozov, N Burnashev, D Feldmeyer, R Sprengel, PH Seeburg: **Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2.** *Nature* 2000, **406**:78-81.
77. H Lomeli, J Mosbacher, T Melcher, T Hoger, JR Geiger, T Kuner, H Monyer, M Higuchi, A Bach, PH Seeburg: **Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing.** *Science* 1994, **266**:1709-13.
78. JC Hartner, C Schmittwolf, A Kispert, AM Muller, M Higuchi, PH Seeburg: **Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:4894-902.
79. EY Levanon, E Eisenberg, R Yelin, S Nemzer, M Hallegger, R Shemesh, ZY Fligelman, A Shoshan, SR Pollock, D Sztybel, et al: **Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:1001-5.
80. CX George, CE Samuel: **Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4621-6.
81. KL Kuhlen, CE Samuel: **Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes.** *Virology* 1997, **227**:119-30.

82. K Kawakubo, CE Samuel: **Human RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) gene specifies transcripts that initiate from a constitutively active alternative promoter.** *Gene* 2000, **258**:165-72.
83. H Poulsen, J Nilsson, CK Damgaard, J Egebjerg, J Kjems: **CRM1 mediates the export of ADAR1 through a nuclear export signal within the Z-DNA binding domain.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:7862-71.
84. Y Liu, CX George, JB Patterson, CE Samuel: **Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase.** *J Biol Chem* 1997, **272**:4419-28.
85. AG Polson, BL Bass, JL Casey: **RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase.** *Nature* 1996, **380**:454-6.
86. KN Shih, YT Chuang, H Liu, SJ Lo: **Hepatitis D virus RNA editing is inhibited by a GFP fusion protein containing a C-terminally deleted delta antigen.** *J Gen Virol* 2004, **85**:947-57.
87. R Cattaneo, A Schmid, D Eschle, K Baczko, V ter Meulen, MA Billeter: **Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections.** *Cell* 1988, **55**:255-65.
88. TC Wong, M Ayata, A Hirano, Y Yoshikawa, H Tsuruoka, K Yamanouchi: **Generalized and localized biased hypermutation affecting the matrix gene of a measles virus strain that causes subacute sclerosing panencephalitis.** *J Virol* 1989, **63**:5464-8.
89. DG Murphy, K Dimock, CY Kang: **Numerous transitions in human parainfluenza virus 3 RNA recovered from persistently infected cells.** *Virology* 1991, **181**:760-3.
90. P Rueda, B Garcia-Barreno, JA Melero: **Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations).** *Virology* 1994, **198**:653-62.
91. PJ O'Hara, ST Nichol, FM Horodyski, JJ Holland: **Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions.** *Cell* 1984, **36**:915-24.
92. A Schambach, H Wodrich, M Hildinger, J Bohne, HG Krausslich, C Baum: **Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors.** *Mol Ther* 2000, **2**:435-45.
93. WR Beyer, M Westphal, W Ostertag, D von Laer: **Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range.** *J Virol* 2002, **76**:1488-95.
94. M Hildinger, KL Abel, W Ostertag, C Baum: **Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use.** *J Virol* 1999, **73**:4083-9.
95. M Higuchi, FN Single, M Kohler, B Sommer, R Sprengel, PH Seeburg: **RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency.** *Cell* 1993, **75**:1361-70.
96. TM Kinsella, GP Nolan: **Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus.** *Hum Gene Ther* 1996, **7**:1405-13.
97. WS Pear, GP Nolan, ML Scott, D Baltimore: **Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:8392-6.

98. K Sanford: **The growth in vitro of single isolated tissue cells.** *J Natl Cancer Inst* 1948, **9**:229-246.
99. JL Biedler, S Roffler-Tarlov, M Schachner, LS Freedman: **Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones.** *Cancer Res* 1978, **38**:3751-7.
100. FL Graham, J Smiley, WC Russell, R Nairn: **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J Gen Virol* 1977, **36**:59-74.
101. RM McAllister, H Isaacs, R Rongey, M Peer, W Au, SW Soukup, MB Gardner: **Establishment of a human medulloblastoma cell line.** *Int J Cancer* 1977, **20**:206-12.
102. GJ Todaro, H Green: **Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.** *J Cell Biol* 1963, **17**:299-313.
103. J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis: **Molecular cloning : a laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
104. GE Houts, M Miyagi, C Ellis, D Beard, JW Beard: **Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus.** *J Virol* 1979, **29**:517-22.
105. ML Kotewicz, JM D'Alessio, KM Driftmier, KP Blodgett, GF Gerard: **Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli.** *Gene* 1985, **35**:249-58.
106. ML Kotewicz, CM Sampson, JM D'Alessio, GF Gerard: **Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:265-77.
107. RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis, HA Erlich: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**:487-91.
108. F Sanger, S Nicklen, AR Coulson: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-7.
109. PY Muller, H Janovjak, AR Miserez, Z Dobbie: **Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR.** *Biotechniques* 2002, **32**:1372-4, 1376, 1378-9.
110. UK Laemmli, F Beguin, G Gujer-Kellenberger: **A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation.** *J Mol Biol* 1970, **47**:69-85.
111. M Bruns, T Kratzberg, W Zeller, F Lehmann-Grube: **Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells.** *Virology* 1990, **177**:615-24.
112. SJ Francis, MK Singh, MB Oldstone, PJ Southern: **Analysis of lymphocytic choriomeningitis virus gene expression in acutely and persistently infected mice.** *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1986, **175**:105-8.
113. DA Steinhauer, E Domingo, JJ Holland: **Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase.** *Gene* 1992, **122**:281-8.
114. CM Ruiz-Jarabo, C Ly, E Domingo, JC de la Torre: **Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV).** *Virology* 2003, **308**:37-47.
115. JK Lackovich, JE Lee, P Chang, A Rashtchian: **Measuring Fidelity of PLATIMUM Pfx DNA Polymerase.** *Focus* 2001, **23**:7-8.

116. MA Bracho, A Moya, E Barrio: **Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity.** *J Gen Virol* 1998, **79** (Pt 12):2921-8.
117. C Schneeberger, P Speiser, F Kury, R Zeillinger: **Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain.** *PCR Methods Appl* 1995, **4**:234-8.
118. JB Patterson, CE Samuel: **Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA- specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:5376-88.
119. H Tanaka, CE Samuel: **Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:7995-9.
120. JH Yang, X Luo, Y Nie, Y Su, Q Zhao, K Kabir, D Zhang, R Rabinovici: **Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation.** *Immunology* 2003, **109**:15-23.
121. L Malmgaard, TP Salazar-Mather, CA Lewis, CA Biron: **Promotion of alpha/beta interferon induction during in vivo viral infection through alpha/beta interferon receptor/STAT1 system-dependent and - independent pathways.** *J Virol* 2002, **76**:4520-5.
122. IL Campbell, MV Hobbs, P Kemper, MB Oldstone: **Cerebral expression of multiple cytokine genes in mice with lymphocytic choriomeningitis.** *J Immunol* 1994, **152**:716-23.
123. GA Dabiri, F Lai, RA Drakas, K Nishikura: **Editing of the GLuR-B ion channel RNA in vitro by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase.** *Embo J* 1996, **15**:34-45.
124. MV Matz, AF Fradkov, YA Labas, AP Savitsky, AG Zaraisky, ML Markelov, SA Lukyanov: **Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**:969-73.
125. Y Liu, CE Samuel: **Mechanism of interferon action: functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in the interferon-inducible, double-stranded RNA- specific adenosine deaminase.** *J Virol* 1996, **70**:1961-8.
126. D Röhme: **Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**:5009-13.
127. HS Kim, JY Shin, JY Yun, DK Ahn, JY Le: **Immortalization of human embryonic fibroblasts by overexpression of c-myc and simian virus 40 large T antigen.** *Exp Mol Med* 2001, **33**:293-8.
128. RM Zinkernagel: **Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **263**:1-5.
129. MB Oldstone, MJ Buchmeier: **Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice.** *Nature* 1982, **300**:360-2.
130. HD Klenk, W Garten: **Host cell proteases controlling virus pathogenicity.** *Trends Microbiol* 1994, **2**:39-43.
131. M Moulard, S Hallenberger, W Garten, HD Klenk: **Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface.** *Virus Res* 1999, **60**:55-65.
132. E Domingo, L Menendez-Arias, JJ Holland: **RNA virus fitness.** *Rev Med Virol* 1997, **7**:87-96.

133. A Grande-Perez, S Sierra, MG Castro, E Domingo, PR Lowenstein: **Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:12938-43.
134. M Kumar, GG Carmichael: **Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:3542-7.
135. N Kadowaki, S Antonenko, JY Lau, YJ Liu: **Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity.** *J Exp Med* 2000, **192**:219-26.
136. M Djavani, J Rodas, IS Lukashevich, D Horejsh, PP Pandolfi, KL Borden, MS Salvato: **Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus.** *J Virol* 2001, **75**:6204-8.
137. Y Nie, Q Zhao, Y Su, JH Yang: **Subcellular distribution of ADAR1 isoforms is synergistically determined by three nuclear discrimination signals and a regulatory motif.** *J Biol Chem* 2004, **279**:13249-55.
138. SK Wong, S Sato, DW Lazinski: **Elevated activity of the large form of ADAR1 in vivo: very efficient RNA editing occurs in the cytoplasm.** *Rna* 2003, **9**:586-98.
139. SK Wong, DW Lazinski: **Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:15118-23.
140. Q Wang, M Miyakoda, W Yang, J Khillan, DL Stachura, MJ Weiss, K Nishikura: **Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene.** *J Biol Chem* 2004, **279**:4952-61.
141. M Brown, M McCormack, KG Zinn, MP Farrell, I Bikel, DM Livingston: **A recombinant murine retrovirus for simian virus 40 large T cDNA transforms mouse fibroblasts to anchorage-independent growth.** *J Virol* 1986, **60**:290-3.
142. MF van den Broek, U Muller, S Huang, M Aguet, RM Zinkernagel: **Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors.** *J Virol* 1995, **69**:4792-6.
143. H Harada, K Willison, J Sakakibara, M Miyamoto, T Fujita, T Taniguchi: **Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated.** *Cell* 1990, **63**:303-12.
144. DP Barlow, BJ Randle, DC Burke: **Interferon synthesis in the early post-implantation mouse embryo.** *Differentiation* 1984, **27**:229-35.
145. F Wianny, M Zernicka-Goetz: **Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:70-5.
146. MK Francis, JM Lehman: **Control of beta-interferon expression in murine embryonal carcinoma F9 cells.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**:3553-6.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

8.1.1. Aminosäuren

A	Alanin	S	Serin	R	Arginin
G	Glycin	T	Threonin	K	Lysin
V	Valin	C	Cystein	H	Histidin
L	Leucin	M	Methionin	F	Phenylalanin
I	Isoleucin	N	Asparagin	W	Tryptophan
P	Prolin	Q	Glutamin	Y	Tyrosin
D	Aspartat	E	Glutamat		

8.1.2. Abkürzungen

5-HT _{2c} R	Serotonin-Rezeptoren
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADAR	RNA-abhängige Adenosin Desaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
APC	Allophycocyanin
APOBEC	Apo-B-mRNA editierende Cytidin Desaminase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytidin
CMV	Cytomegalusvirus
CTL	cytotoxische T Zelle
d	Tage
DC	dendritischen Zellen
DDT	Dithiothreitol
DI	<i>defective interfering</i>
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribolnukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DRAF	dsRNA-activated factor
dsRNA	doppelsträngige RNA
dsRNB	doppelsträngigen RNA Bindungsdomänen
<i>E. coli</i>	<i>escherichia coli</i>
ECS	der Editierungstelle komplementäre Sequenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein (Envelope)
FACS	Fluoreszenaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanosin
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GHDS	Wachstumshormon Defizienz Syndrom
GluR	glutamatgesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HDV	Hepatitis δ Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
I	Inosin
IFN	Interferon
IGR	intergenische Region
IRF	<i>IFN response factor</i>
ISG	immunstimulierbare Gene
ISGF	IFN stimulierter Genfaktor
ISRE	IFN stimulierbares Antwort-Element
IU	infektiöse Einheiten
JAK	Januskinase
KCS	Kinase konservierte Sequenz
kD	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LFV	Lassa Fieber Virus
MEF	murine embryonale Fibroblasten
Met	Methionin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes
min	Minuten
MLV	Murines Leukämievirus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
nAb	Neutralisierende Antikörper
neg.	negativ
NES	Nukleäre Export Sequenz
NF- κ B	Nukleären Faktors κ B
NK	natürliche Killerzellen
NLS	Nukleäre Import Sequenz
NP	Nukleokapsid Protein
OAS	2'-5' Oligoadenylat Synthetase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKR	dsRNA bindende Protein Kinase
PML	promyelozytische Leukämie

pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidifluorid
qPCR	Quantitative PCR
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	Semiliki Forest Virus
SSPE	subakut sklerosierenden Panenzephalitis
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TLR	<i>Toll-like receptor 3</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>TNF-α related apoptosis ligand</i>
TU	<i>GFP transfer units</i>
TYK	Tyrosine kinase
U	Uridin
VSV	Vesikuläre Stomatitis Virus
wt	wild Typ
α -DG	α -Dystroglykan

8.2. Sequenzen der hypermutierte Klone

Gezeigt ist jeweils nur der hypermutierte Bereich des Klons.

Sequenzvergleich zwischen LCMV-GP WE (HPI) und Klon 38 isoliert aus L929:

```

Klon 38      (    1) CTAATGGCTCCTACTTGAATGAGGCCCACTTTGGTGATCGGATCGAACGGGAGGCGGATG
LCMV GP      (  1261) CTAATGGCTCCTACTTGAATGAGACCCACTTTAGTGATCAAATCGAACGAAGCAGATA

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++ ++ +++
Klon 38      (    61) GCATGGTCGCAGAGATGTTGAGGAGGACTGCATGGGAAGACAAGGGAGTACTCCTTTAG
LCMV GP      (  1321) ACATGATCACAGAGATGTTGAGGAAGACTACATAAAAAGACAAGGGAGTACTCCTTTAG

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 38      (   121) CCTTGGTGGATCTTTTGATGTTTTTCAGCATCGGCGTGTCTGGTCCGCATCTTTCTGCATC
LCMV GP      (  1381) CCTTAATGGATCTTTTGATGTTTTCAACATCAGCATATCTAATCAGCATCTTTCTGCATC

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 38      (   181) TTGTGAGGATGCCAACACGTGGACACGTGGGGGGCGGTTTCATGTCCGGGGCCACACCGCT
LCMV GP      (  1441) TTGTGAAGATACCAACACATAGACACATAAAGGGCGGTTTCATGTCCAAAGCCACACCGCT

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 38      (   241) TGACCAACGGGGGATCTGTGGTGTGGTGCATTCAAGGTGCCTGGTGTGGGGACTGTC-
LCMV GP      (  1501) TGACCAACAAGGGGATCTGTAGTGTGGTGCATTCAAGGTGCCTGGTGTAAAACTATCt

          ++++++
Klon 38      (   253) -----TGGAGAGTCAGG
LCMV GP      (  1561) ggaaaagacgctgagcagcgcctccctgactctccacctcgaaagaggTGGAGAGTCAGG

          ++++++ ++++++ ++++++ ++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 38      (   313) GAGGCCAGTGGGTCTTGGAGTGTGCGAGCATTGGGTCTCTGAAGATTAATCATGTGG
LCMV GP      (  1621) GAGGCCAGCGGGTCTTAGAGTGTCAACATTGGGTCTCTGAAGATCAAATCATGTGG

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++
Klon 38      (   373) CAGGATGTTGTGAACGGTTTTTAGATCGGGGGTCTTGCCTTGGAAGCACTCTCAAAAAT
LCMV GP      (  1681) CAGGATGTTGTGAACGGTCTTTAGATCAGGGAGTCTTGCCTTGGAAGCACTCTCAAAGAT

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 38      (   433) GATGCAGTCCATGGGTGCACAGTGTGGGTGATCTCTTTCTTCTTTTGTCTCTCGCTAC
LCMV GP      (  1741) GATGCAGTCCATGAGTGCACAGTGTGGGTGATTTCTTCTTCTTTTGTCTCTCACTAC

          ++++++
Klon 38      (   493) CCCAGTGTGCATTTTG-----
LCMV GP      (  1801) CCCAGTGTGCATTTTGcatagccagccatatttgtcccacactttatcttcatattctct

```

Sequenzvergleich zwischen LCMV GP WE (HPI) und Klon 17 isoliert aus L929:

```

Klon 17      (    1) -----CCGACATCTATAAAGGGGTTTACCAGTTCA
LCMV GP      (   241) ggtcctgtggcatgtacgccttaatggtcCCGACATCTATAAAGGGGTTTACCAGTTCA

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 17      (    31) AATCAGTGGAGTTTGATATGTCTCACTTAAATCTGACGATGCCAATGCGTGCTCAGCCA
LCMV GP      (   301) AATCAGTGGAGTTTGATATGTCTCACTTAAATCTGACGATGCCAATGCGTGCTCAGCCA

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 17      (    91) ACAACTCTCATCACTACATCAGTATGGGAAGCTCTGGACTGGAGCCAACCTCACCAACG
LCMV GP      (   361) ACAACTCTCATCACTACATCAGTATGGGAAGCTCTGGACTGGAGCTAACTTTCACCTAACG

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 17      (   151) ACTCCATCCTCAATCACAATTTCTGCAACTTAACCTCCGCTTTCAACAAAAGACCTTTG
LCMV GP      (   421) ACTCCATCCTCAATCACAATTTCTGCAACTTAACCTCCGCTTTCAACAAAAGACTTTTG

```

```

          ++++++
Klon 17   ( 211) ACCATACACTCATGAGCATAGTCTCGAGTCTGCACCTCAGTATTAGAGGGAATTCCAACC
LCMV GP  ( 481) ACCATACACTCATGAGTATAGTCTCGAGTCTGCACCTCAGTATTAGAGGGAATTCCAACC

          ++++++
Klon 17   ( 271) ACAAAGCAGCGTCTTGTGATTTTAACAATGGCATCACCATTCAATACAACCTTGTCAATTT
LCMV GP  ( 541) ACAAAGCAGTGTCTTGTGATTTTAACAATGGCATCACCATTCAATACAACCTTGTCAATTT

          ++++++ ++++++ ++++++
Klon 17   ( 331) CGGACCCACAGAGCGCCACAAGCCAGTGTAGGACTCCCAGAGGTAGAGTCTTGGACATGT
LCMV GP  ( 601) CGGACCCACAGAGCGCTATAAGCCAGTGTAGGACTTTCAGAGGTAGAGTCTTGGACATGT

          ++++++
Klon 17   ( 391) TTAGAACTGCCTTTGGAGGAAAATACATGAGAAGTGGCCGGGGCTGGGCAGGTTTCAGATG
LCMV GP  ( 661) TTAGAACTGCCTTTGGAGGAAAATACATGAGAAGTGGCTGGGGCTGGGCAGGTTTCAGATG

          ++++++
Klon 17   ( 451) GCAAGACCACTTGGTGCAGCCAAACAAGCTATCAGTACCC-----
LCMV GP  ( 721) GCAAGACCACTTGGTGCAGCCAAACAAGCTATCAGTACCTaatcatacaaaacaggactt

```

Sequenzvergleich zwischen LCMV GP WE (HPI) und Klon 6 isoliert aus 293T:

```

          + ++++++
Klon 6    ( 1) -----TGGAGACTATCT
LCMV GP  (1501) tgaccaacaaggggatctgtagttgtggtgcattcaaggtgcctggtgTAAAACTATCT

          ++++++
Klon 6    ( 13) GGAAAAGACGCTGATCAGCAGCGCCTCCCTGACTCTCCACCTCGAAAGAGGTGGAGAGTC
LCMV GP  (1561) GGAAAAGACGCTGATCAGCAGCGCCTCCCTGACTCTCCACCTCGAAAGAGGTGGAGAGTC

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 6    ( 73) GGGGAGGCCAGTGGGTCTTGGAGTGTACACAGCATTTGGTCTCTGAGGATTGGATCATG
LCMV GP  (1618) AGGGAGGCCAGCGGGTCTTAGAGTGTACAAACATTTGGTCTCTGAAGATCAAATCATG

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 6    (133) TGGCGGGATGTTGTGGCGGTTTTTGGATCGGGGAGTCTGCCTTGGAGGCACTCTCAGG
LCMV GP  (1678) TGGCAGGATGTTGTGAACGGTCTTTAGATCAGGGAGTCTGCCTTGGAAAGCACTCTCAA

          ++++++
Klon 6    (193) AATGAT-----
LCMV GP  (1738) GATGATgcagtcctgagtgccagtggtggtgatttctttcttcttttctctctcac

```

Sequenzvergleich zwischen LCMV GP WE (HPI) und Klon 138 isoliert aus 293T:

```

          + ++++++
Klon 138  ( 1) -----CCTCCTTGGCTGGTA
LCMV GP  ( 181) tgtacaatttcgccacctgtgggatattagcactggtcagcttccTTTTTTGGCTGGTA

          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 138  ( 16) GGTCTGTGGCATGTACGGCCCAATGGTCCCACATCTACAAAGGGTTACCAGTTCA
LCMV GP  ( 241) GGTCTGTGGCATGTACGGCCTTAATGGTCCCACATCTATAAAGGGTTACCAGTTCA

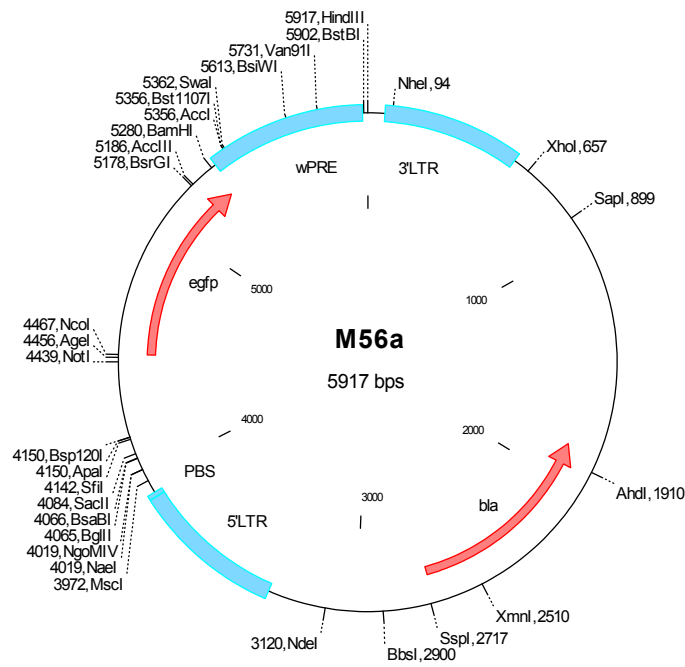
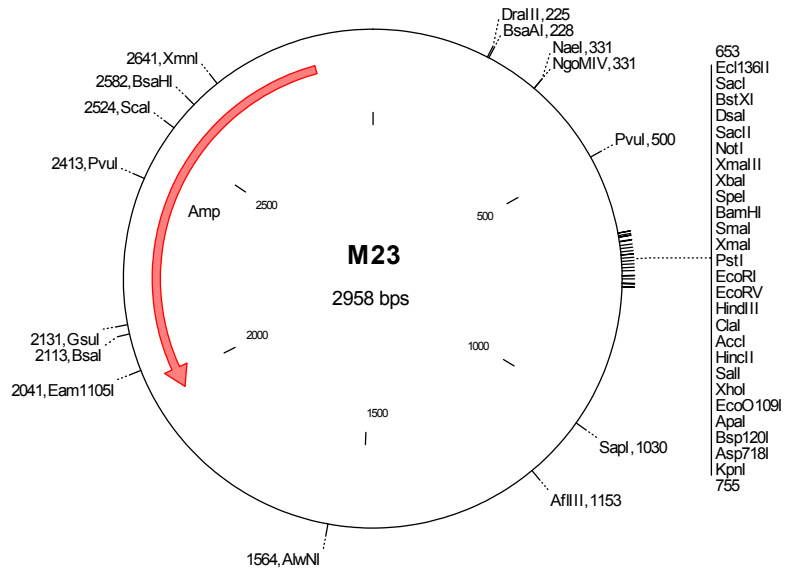
          ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
Klon 138  ( 76) AATCAGTGGAGTTTGTACACGTCTCACTTAAATCTGACGATGCCCAATGCGTGCTCAGCCA
LCMV GP  ( 301) AATCAGTGGAGTTTGTATATGTCTCACTTAAATCTGACGATGCCCAATGCGTGCTCAGCCA

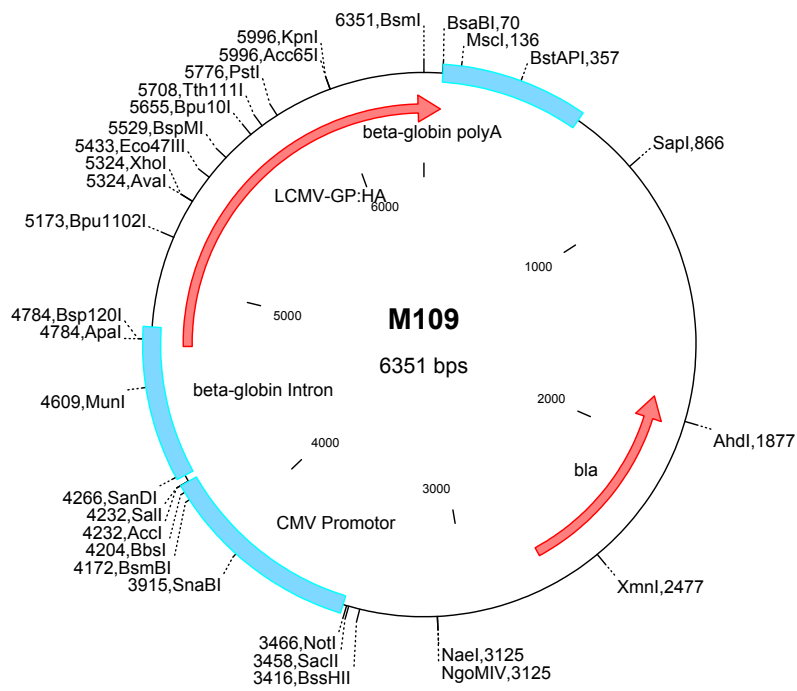
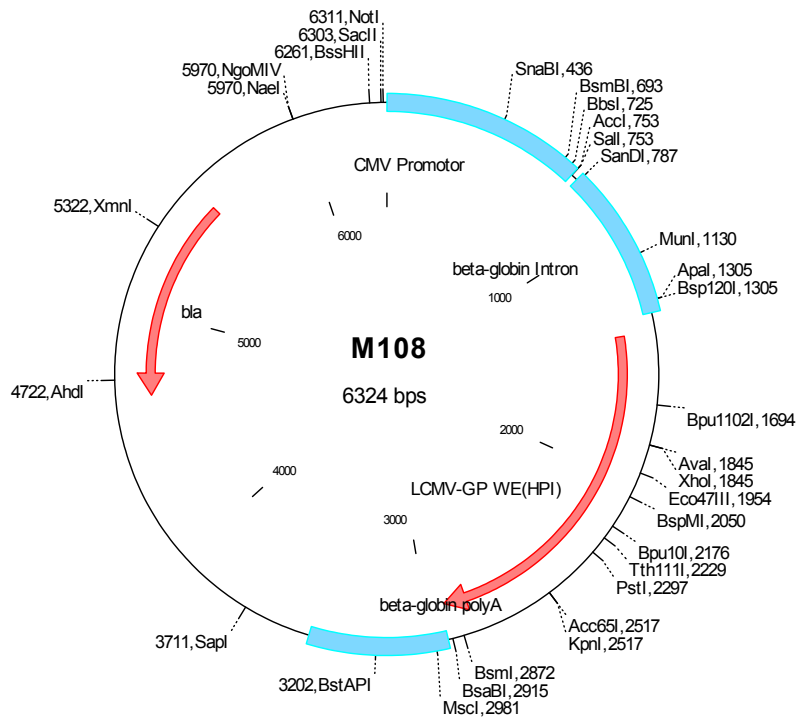
          ++++++ ++++++
Klon 138  (136) ACAACTCTCATCACTACATCAGTATGGGAAGCTCTGGACTGGAGCCAACCTTCACTAACG
LCMV GP  (361) ACAACTCTCATCACTACATCAGTATGGGAAGCTCTGGACTGGAGCTAACTTCACTAACG

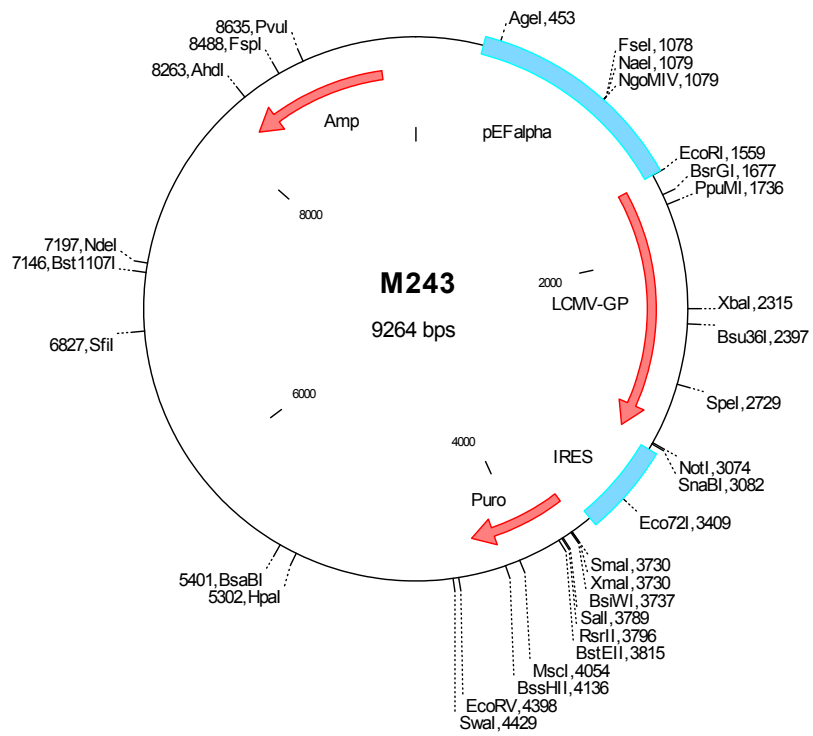
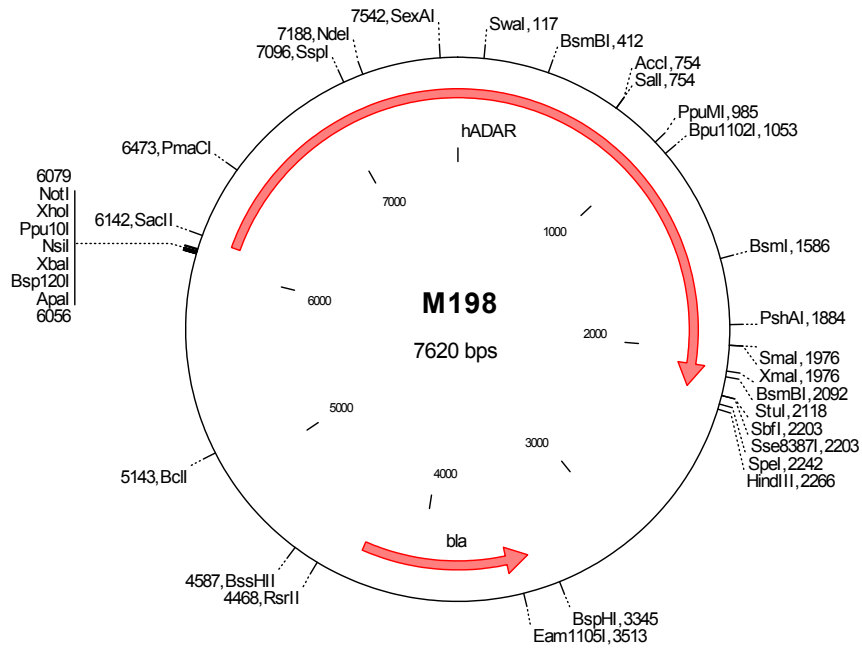
          ++++++
Klon 138  (196) ACTCCATCCTTA-----
LCMV GP  (421) ACTCCATCCTTAatcacaatttttgcaacttaacctccgctttcaacaaaagacttttg

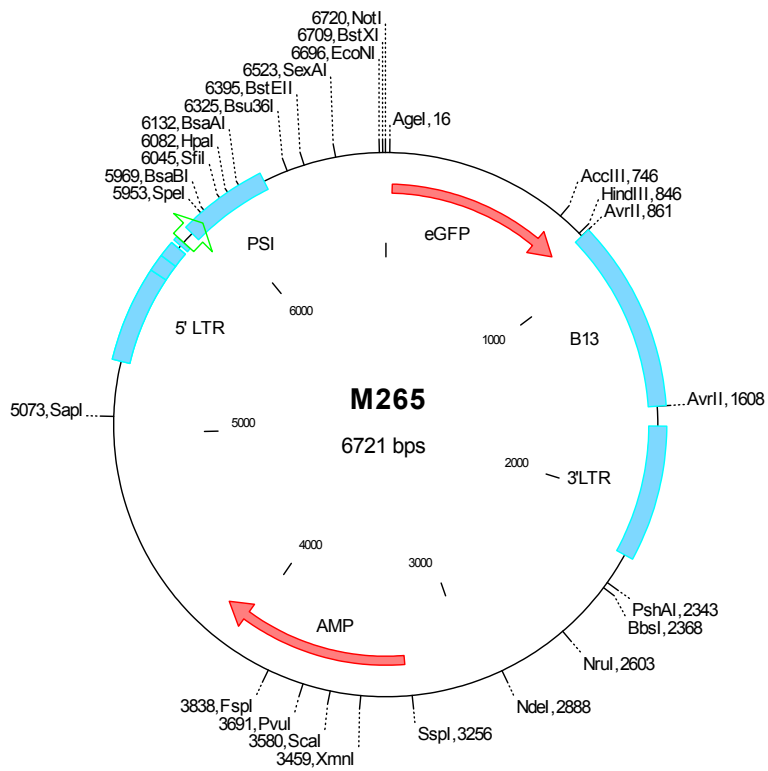
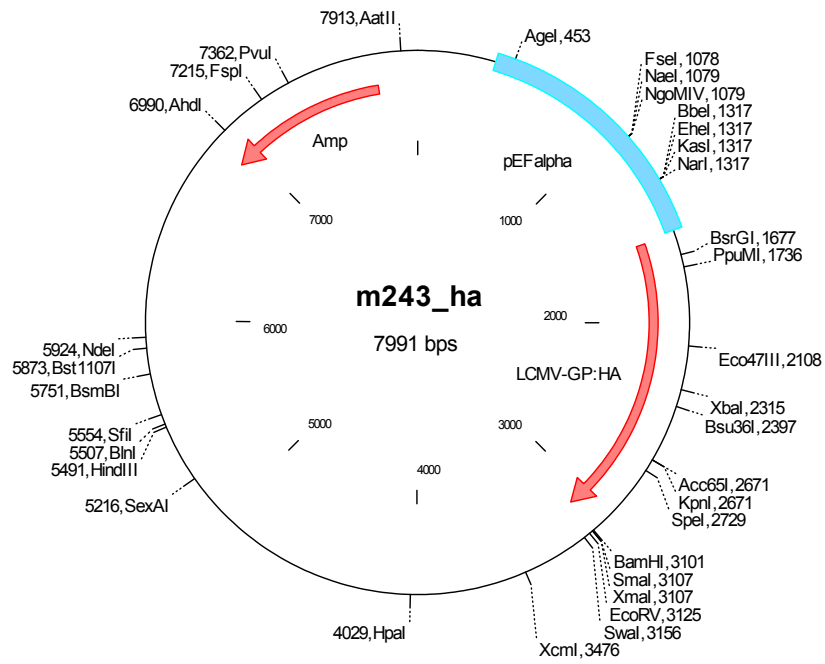
```

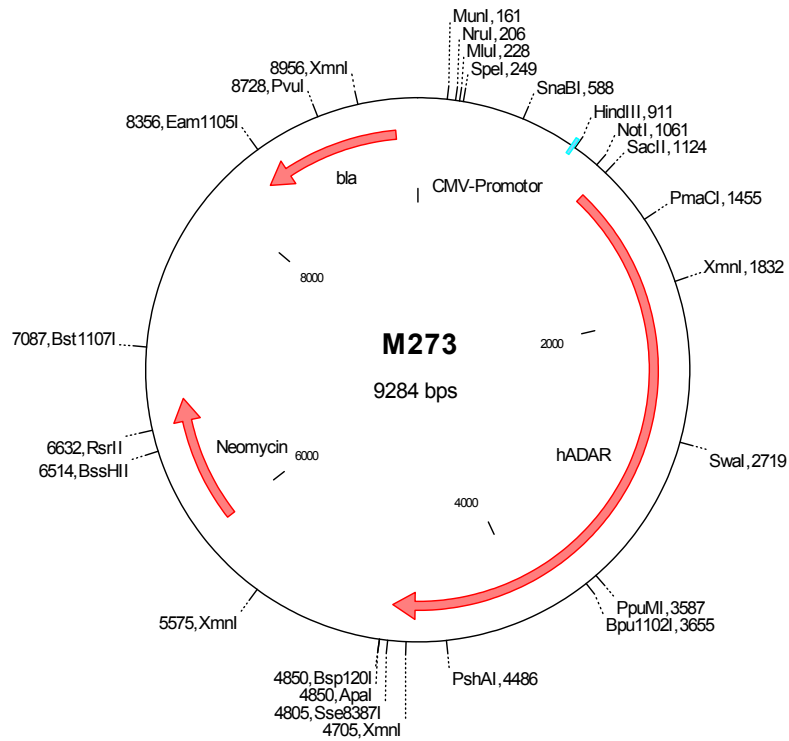
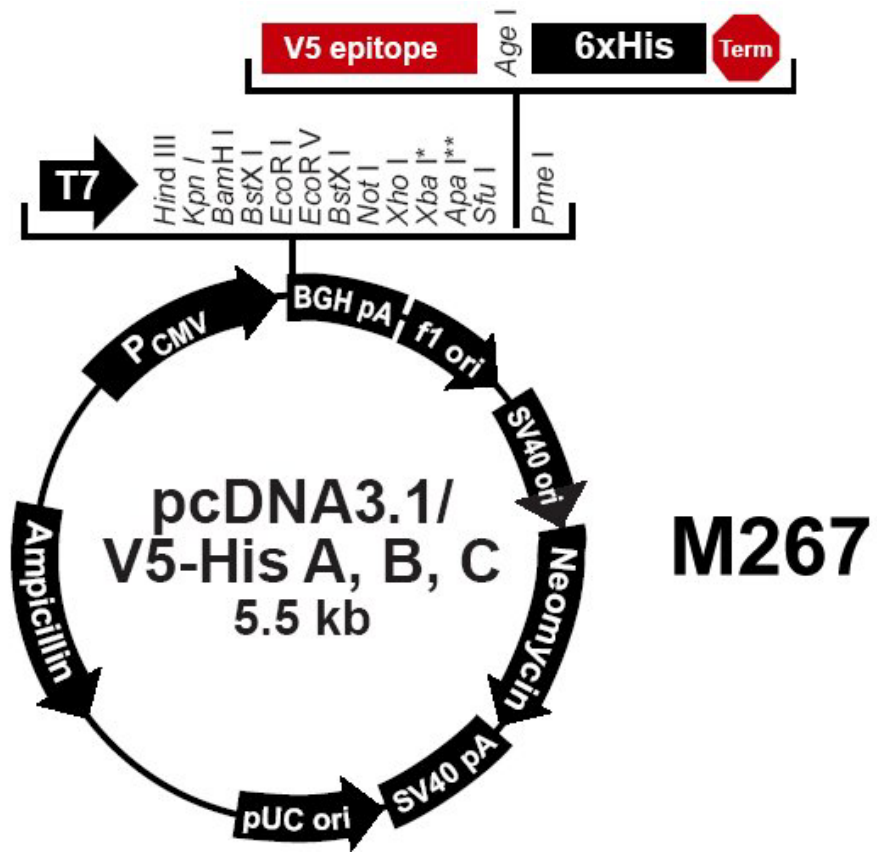
8.3. Plasmidkarten

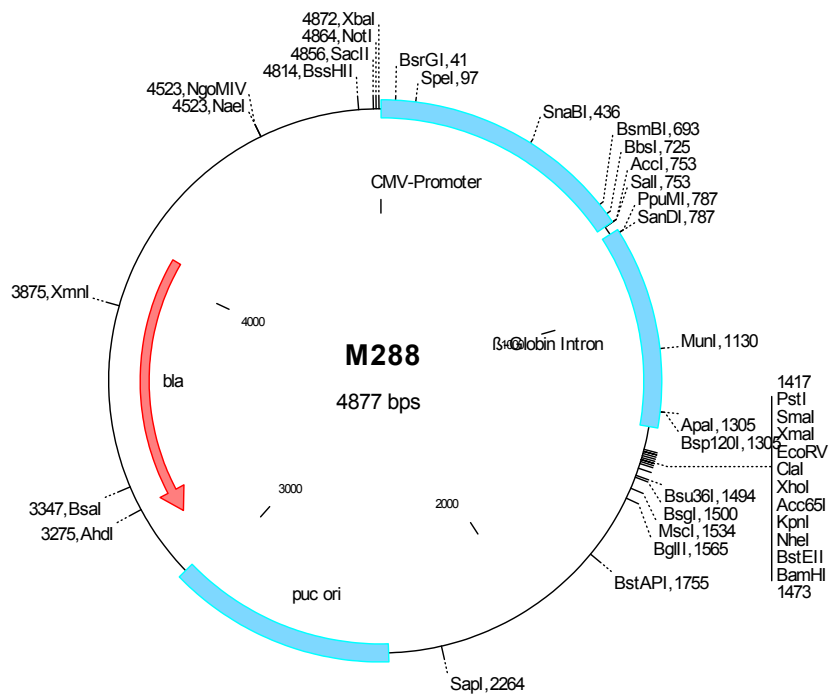
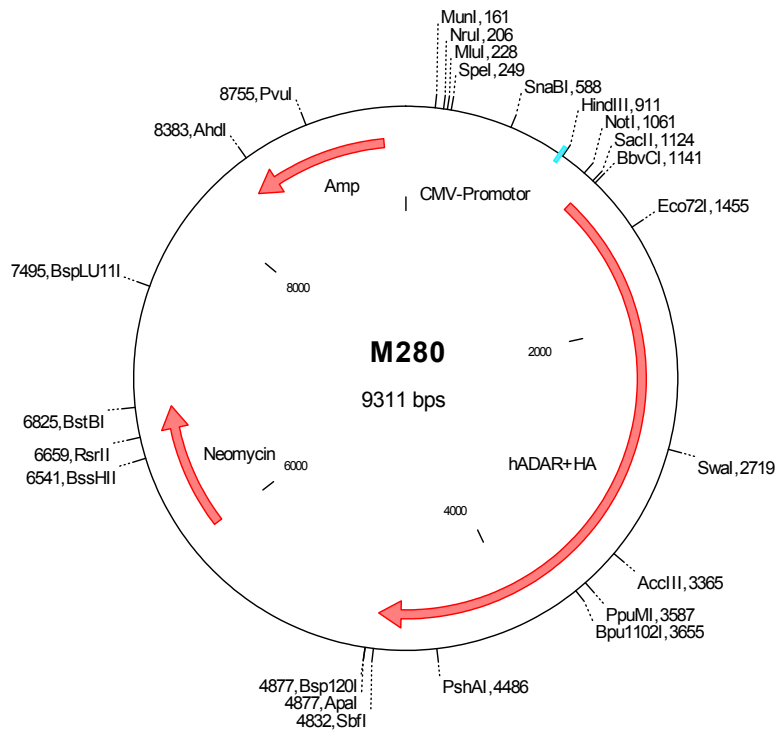


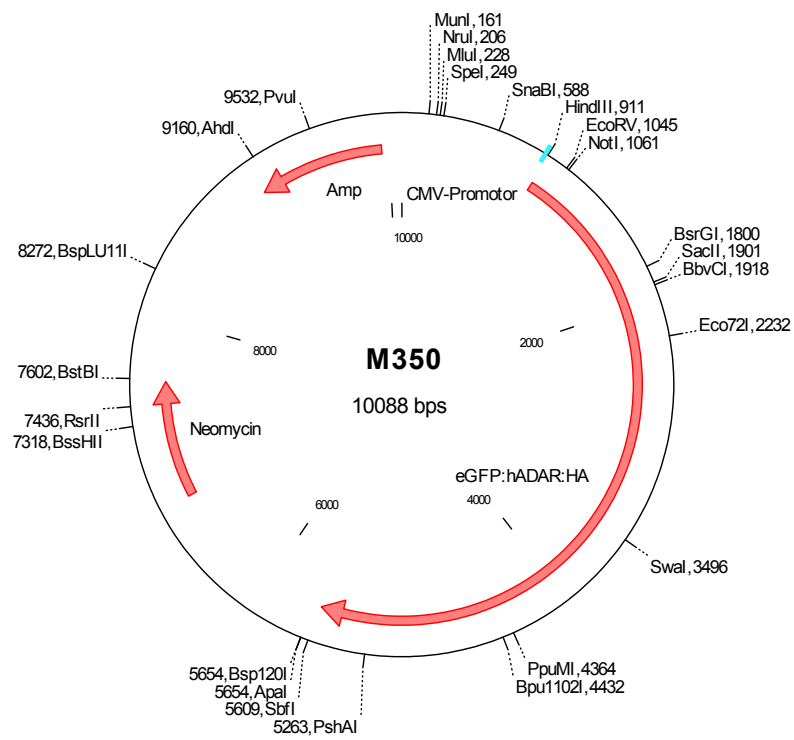
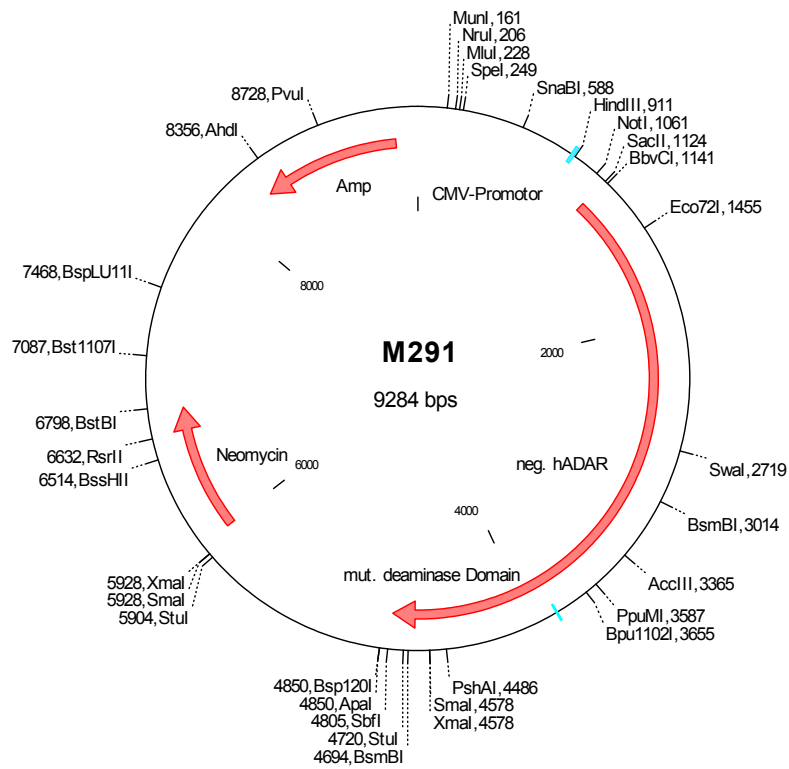


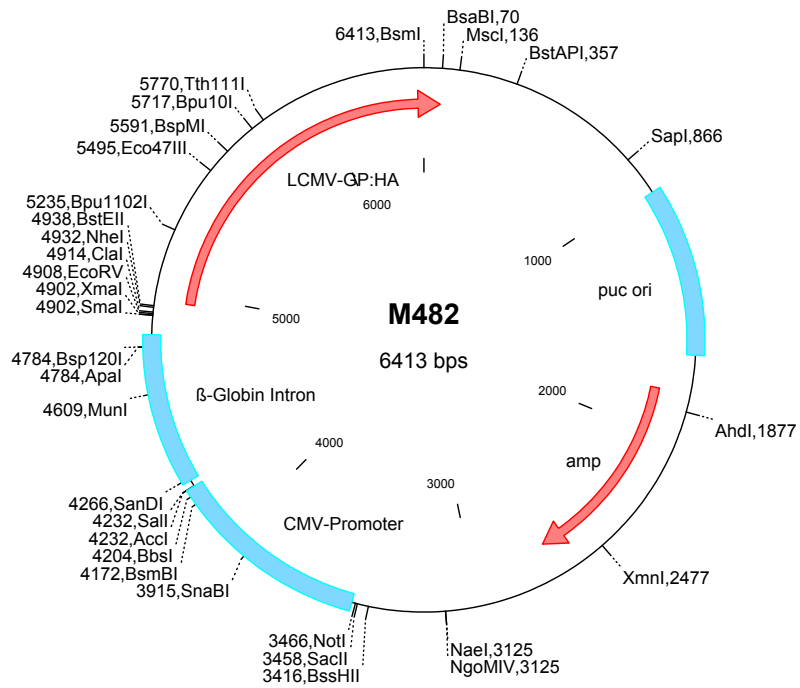
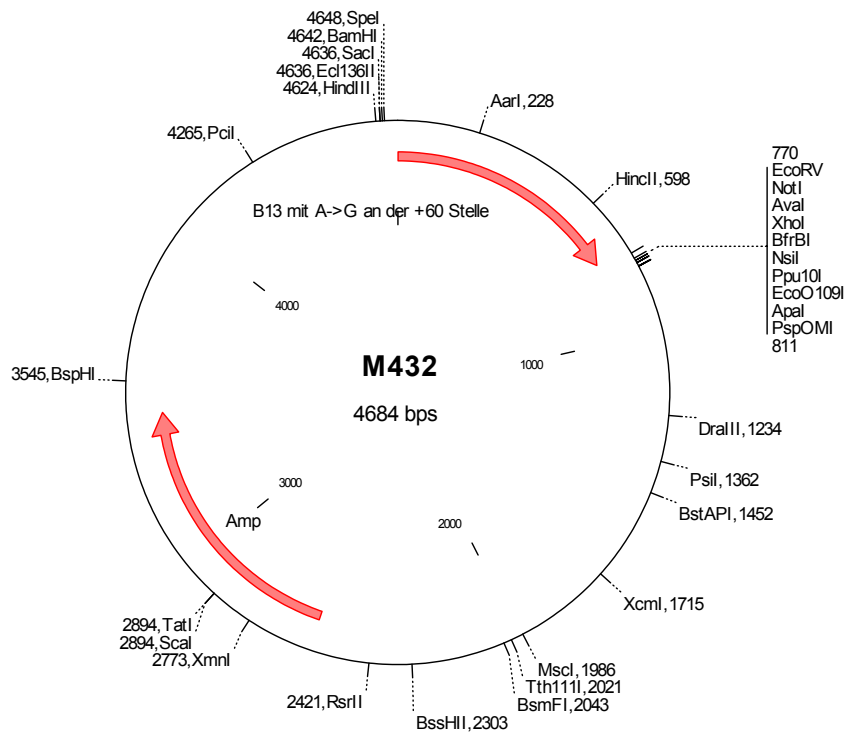


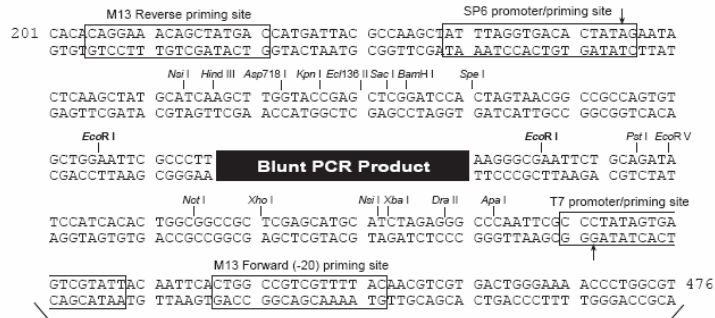






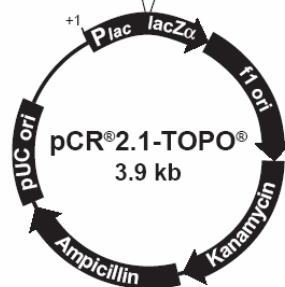
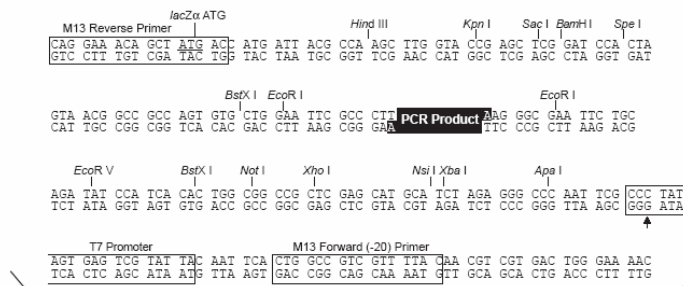






Comments for pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]
3519 nucleotides

- lac* promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZ-alpha ORF: bases 217-576
- SP6 promoter priming site: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-399
- TOPO[®]-Cloning site: bases 336-337
- T7 promoter priming site: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- Fusion joint: bases 577-585
- ccdB* lethal gene ORF: bases 586-888
- kan* gene: bases 1099-2031
- kan* promoter: bases 1099-1236
- Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
- Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
- pUC origin: bases 2724-3397



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

Publikationen

Publikationen in denen Teile dieser Arbeit veröffentlicht werden

- Roland, Z., Utermöhlen, O., Giroglu, T. and von Laer, D. ADAR-1 inhibits the replication of LCMV. In Vorbereitung.

Poster

- Roland, Z., Beyer, W., Giroglu, T., Beck, C., and von Laer, D. (2002). Variability of arenavirus glycoproteins: Origin of mutations and their biological relevance. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Erlangen, 08.-11.04.2002.
- Roland, Z., Beyer, W., Giroglu, T. and von Laer (2003). Variability of arenavirus glycoproteins: Origin of mutations and their biological relevance. Poster presentation; Gordon research conference on RNA editing, Ventura USA, 19.-24.06.2003
- Roland, Z., Giroglu, T., and von Laer, D. (2004). LCMV. ADAR-1 interferes with LCMV replication. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Tübingen, 17.-20.03.2004.

Sonstige wissenschaftliche Publikationen

- Götting C., Kuhn J., Zahn R., Brinkmann T., Kleesiek K. (2000): Molecular Cloning and Expression of Human UDP-d-Xylose: Proteoglycan Core Protein beta-d-Xylosyltransferase and its First Isoform XT-II. *J Mol Biol* **304**, 517-528

Lebenslauf

Roland Zahn

Adresse: Taunusstraße 27
65760 Eschborn

Geburtsdaten: 1. Mai 1975 in Karlsruhe

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1981 - 1984 Besuch der Grundschule in Linkenheim-Hochstetten

1984 - 1985 Besuch der Jefferson High School in Oak Ridge, USA

1985 - 1994 Besuch des Fichte-Gymnasiums in Karlsruhe mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1994-1999 Biochemie-Studium an der Universität Bielefeld

1994-1997 Grundstudium mit Diplomvorprüfung

1997-1999 Hauptstudium mit Diplomprüfung

1999 Diplomarbeit im Herz- und Diabeteszentrum NRW in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Kleesiek mit dem Titel:
„TFPI: Klonierung der Mutante [P151L] und der drei Kunitz-Typ-Domänen“

2001-2004 Promotionsstudiengang an der Universität Frankfurt

Beschäftigung

Feb – Mrz Werksstudent im Bereich Thermische Abfallbehandlung im
1995 Forschungszentrum Karlsruhe

Jan – Jun Schadstoffsammlung bei der Firma Wiebe in Bielefeld
1999 (Sachkunde-Lehrgang gemäß TRGS 520)

2000 - 2001 Zivildienst im Herz- und Diabeteszentrum NRW und beim
Malteser Hilfsdienst Osnabrück

2001-2004 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Georg-Speyer-
Haus in der Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. D. von Laer