

1. EINLEITUNG

Viren (lat.: Schleim, Gift) bilden extrazelluläre Partikel aus Nukleinsäuren (DNA oder RNA) und Proteinen, die als Fremdelemente eine geeignete Wirtszelle infizieren können und repliziert werden, indem die Organellen der Zelle als Replikationsmaschinerie verwendet werden. Viren findet man daher entweder in Form genetischer Information und abgeleiteter Genprodukte innerhalb der Wirtszellen oder als freie Viruspartikel (Virionen). Virionen besitzen zusätzlich zu den Nukleinsäuren sogenannte Kapside, die das genetische Material als Protein- oder Lipoproteinhülle umschließen. In der Form des Virions verbreitet sich das Virus, indem es weitere Wirtszellen erreicht und infiziert. Da Viren ein eigener Stoffwechselapparat und somit auch eine autarke Vermehrung fehlen, ist die Einordnung der Viren als Lebewesen umstritten, auch wenn sie Eigenschaften wie Replikation, Vererbung, Evolution und Kommunikation aufweisen. Unumstritten ist dagegen der evolutionsgeschichtliche Einfluss von Viren auf ihre komplexen Wirtsorganismen, da durch Selektionsdruck und Koevolution Virus und Wirt sich gegenseitig in Bezug auf ihre evolutionäre Entwicklung beeinflussen. Die Wirtszelle muß Abwehrsysteme etablieren, um die Virusreplikation zu unterbinden. Alle Viren, vor allem aber persistierende Viren, müssen dagegen die Ausgewogenheit zwischen Virusreplikation einerseits und Aufrechterhaltung elementarer Wirtsfunktionen andererseits sicherstellen, bis für die weitere Virusvermehrung neue Wirtsorganismen erreicht sind. Im Folgenden wird das Interferon-System, eines der wichtigsten antiviralen Abwehrmechanismen vorgestellt, um später die viralen Evasionsstrategien gegen dieses zu beleuchten.

1.1. Das Interferon – System

Bereits im Jahre 1957 wurde am Londoner *National Institute for Medical Research* von den Wissenschaftlern Isaacs und Lindenmann eine biologische Aktivität entdeckt, welche von Hühnerembryonen-Zellen, die mit Influenza-Virus infiziert waren, freigesetzt wurde und ihrerseits andere nicht-infizierte Zellen schützte (Isaacs und Lindenmann, 1957). Diese Substanz wurde ihrer „Interferenz“ wegen Interferon (IFN) genannt. Es dauerte über 20 Jahre, bis es gelang, das erste humane IFN-Gen zu klonieren und größere Mengen dieses Moleküls herzustellen (Nagata et al., 1980; Taniguchi et al., 1980). Mittlerweile ist das Forschungsfeld

EINLEITUNG

der Interferone sehr stark angewachsen und es werden wöchentlich neue Erkenntnisse bezüglich der molekularen und immunologischen Relevanz der Interferone veröffentlicht.

Interferone sind eine Familie von sekretierten Proteinen, die innerhalb des Immunsystems vielfältige Aufgaben haben. Sie regulieren das Zellwachstum, die Immunaktivierung und die Pathogenabwehr, insbesondere die antiviralen Abwehrmechanismen. Dabei wirken sie selbst nicht antiviral, sondern induzieren vielmehr als Signalmoleküle die Synthese verschiedenster antiviral agierender Proteine. Unser heutiges Verständnis in Bezug auf die Bedeutung der Interferone hat sich seit der euphorischen Anfangsphase in den ersten Jahrzehnten nach ihrer Entdeckung gewandelt. Anstatt als selektive antivirale „Wunderwaffe“ werden Interferone nun als multifunktionale Signalmoleküle betrachtet, die eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Pathogenen einnehmen, aber auch schädlich sein können, wenn sie zur falschen Zeit oder an der falschen Stelle produziert bzw. appliziert werden.

1.1.1. Typ I und Typ II - Interferone

Interferone werden klassischerweise in zwei Gruppen eingeteilt, die sich in ihrer Funktion unterscheiden, weil sie durch Bindung an zwei verschiedene Rezeptorkomplexe (Branca und Baglioni, 1981) unterschiedliche Signalwirkungen erzielen. Die Gruppe der Typ I – Interferone umfasst die IFN α -Multigenfamilie mit mindestens 13 Mitgliedern, die hauptsächlich von Leukocyten sekretiert wird, und IFN β , das nur von einem Gen kodiert wird und von fast allen Zellen synthetisiert wird. Vor einiger Zeit wurde eine neue Gruppe von Zellen entdeckt, die (nach entsprechendem Stimulus) große Mengen Typ I – Interferone produziert (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Diese professionell IFN α/β produzierenden Zellen wurden daher IPCs (*interferon producing cells*) genannt. Da die IPCs anhand ihrer Oberflächenmarker als dendritische Zellen eingeordnet wurden und sie morphologisch wie Plasmazellen aussehen, werden sie in der Literatur auch als pDCs bezeichnet (Asselin-Paturel et al., 2001). Der einzige Vertreter der Typ II – Interferone ist IFN γ , das auch als Immun-Interferon bezeichnet wird, da es von Immunzellen wie Natürlichen Killer (NK) - Zellen und aktivierten T-Lymphocyten generiert wird (Farrar und Schreiber, 1993). Die Typ I – Interferone werden als direkte Antwort auf Virusbefall durch die infizierte Zelle selbst oder durch benachbarte Zellen produziert, während die IFN γ -Synthese die Reaktion auf die Erkennung von infizierten Zellen durch spezialisierte Immunzellen darstellt. Die Funktionen der Typ I – und Typ II – Interferone sind nur partiell redundant, auch wenn sie eine sich

EINLEITUNG

überschneidende Menge an Genprodukten induzieren und einen „antiviralen Status“ etablieren. Die unterschiedliche Wirkung von $IFN\alpha/\beta$ oder $IFN\gamma$ zeigt sich z.B. in der Spezifität der Pathogenabwehr. Manche Viren werden durch Typ I – Interferone effizienter inhibiert, während andere durch $IFN\gamma$ kontrolliert werden. Daher reagieren Knockout-Mäuse, denen entweder der Rezeptor für $IFN\alpha/\beta$ oder der Rezeptor für $IFN\gamma$ fehlt, auf verschiedene Gruppen von Viren/Pathogenen überempfindlich (Hwang et al., 1995; Muller et al., 1994). Allgemein kann man sagen, dass die Virus-induzierte Expression von speziellen IFN -, Cytokin- und Chemokin-Profilen die Rekrutierung und Aktivierung von Immun-Effektor-Zellen und somit das spezifische Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen bestimmt. Vor einiger Zeit wurden weitere Interferone beschrieben, die man unter der relativ neuen Gruppe der Typ III – Interferone zusammenfasst. Diese Klasse beinhaltet $IFN\lambda 1$, $IFN\lambda 2$ und $IFN\lambda 3$ (Kotenko et al., 2003). Die Typ III – Interferone werden als Antwort auf die meisten Virus-Infektionen produziert und induzieren ebenfalls einen antiviralen Status. Diese antivirale Wirkung ist *in vivo* jedoch deutlich ausgeprägter als in Zellkultur, was darauf hinweist, dass Typ III – Interferone wohl eher als Stimulatoren des Immunsystems fungieren und weniger als Induktoren antiviraler Gene (Ank et al., 2006).

1.1.2. Detektion fremder, pathogen-assoziiertes Elemente

Klassischerweise teilt man die Mechanismen der Immunabwehr in zwei Verteidigungslinien ein: die nicht-spezifische, angeborene Immunität und die spezifische, adaptive Immunantwort. Die adaptiven Immunreaktionen erkennen und eliminieren spezifische Pathogene mit Hilfe der Antikörper-produzierenden B-Zellen, der T-Helferzellen und der cytotoxischen T-Lymphocyten. Doch da der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht bei der adaptiven Immunantwort liegt, wird nicht näher darauf eingegangen. Die molekularen Sensoren des angeborenen Immunsystems zur Erkennung von Pathogenen umfasst zwei Gruppen von Rezeptoren: die membrangebundenen Toll like-Rezeptoren (TLR) und die löslichen cytoplasmatischen Rezeptoren. In Abb. 1.1 sind die bisher bekannten Rezeptoren mit ihren Liganden als Übersicht dargestellt.

Extrazelluläre fremde Komponenten (wie z.B. Lipopolysaccharide der Bakterien und Zymosan von Pilzen) werden von TLRs in der Zellmembran gebunden und erkannt, während die endosomalen TLRs distinkte Typen viral-abgeleiteter Nukleinsäuren wie doppel/einzelsträngige RNA und CpG-DNA detektieren (Alexopoulou et al., 2001; Heil et al.,

EINLEITUNG

2004; Hemmi et al., 2000; Medzhitov und Janeway, 2002). Diese Rezeptoren befinden sich in der Endosomenmembran, da viele Viren durch Endocytose in die Zelle eindringen.

Die Gruppe der löslichen Rezeptoren beinhaltet die Proteine RIG-I (*retinoic acid inducible gene I*) und MDA-5 (*melanoma differentiation associated gene 5*). Beide Proteine agieren als cytosolische Rezeptoren intrazellulärer dsRNA und positive Regulatoren der antiviralen Immunantwort (Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2004). Für RIG-I wurde kürzlich gezeigt, dass 5'-Triphosphate viraler RNA ebenfalls als Liganden dienen (Hornung et al., 2006). Es wird angenommen, dass weitere Rezeptoren zur Erkennung intrazellulärer fremder DNA in verschiedenen Zellkompartimenten existieren (Ishii und Akira, 2006; Stetson und Medzhitov, 2006), wobei bis dato kein weiteres Protein als Sensor für cytoplasmatische DNA beschrieben worden ist.

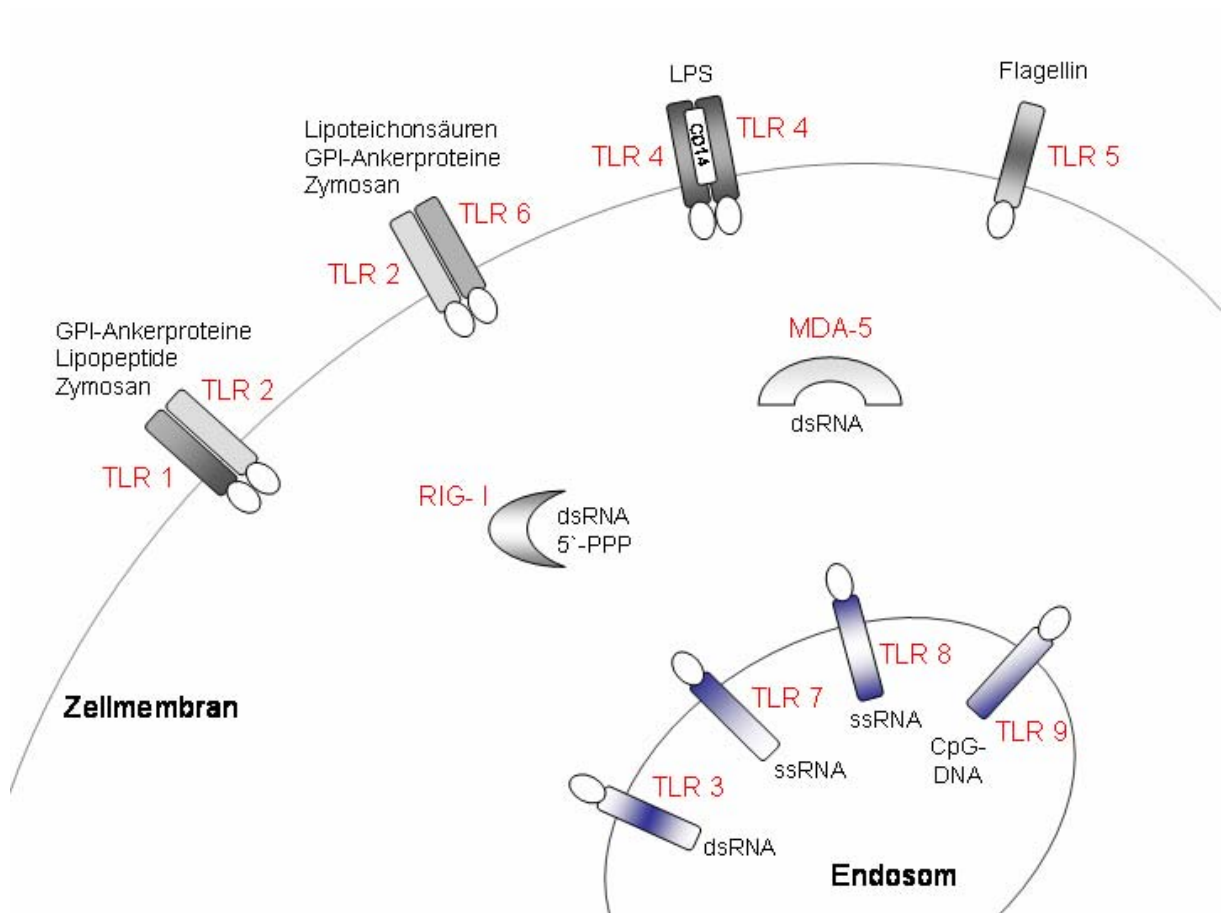


Abb. 1.1: Rezeptoren zur Erkennung pathogen-assoziiertes Elemente

Schematische Darstellung der membrangebundenen Toll-like-Rezeptoren (TLR) sowie der cytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 mit ihren spezifischen Liganden.

1.1.3. Regulation der IFN-Genexpression

Da die Produktion von Interferonen die betroffenen Zellen in einen Ausnahmezustand versetzt, unterliegt die transkriptionelle Aktivierung der IFN-Gene rigorosen Regulationsmechanismen. Hierbei nimmt IFN β eine besonders wichtige Rolle ein, weil es als direkte Reaktion infizierter Zellen auf die Pathogenerkennung sehr schnell produziert und sekretiert wird und somit die „*first line of defense*“ der Pathogenabwehr darstellt. Die Virus-induzierte Produktion von Typ I - Interferonen verläuft biphasisch, wobei in der frühen Phase die IFN β -Transkription angestoßen wird. Bei diesem Vorgang nimmt der *IFN regulatory factor* (IRF) 3 eine Hauptrolle ein. Sekretiertes IFN β bindet an den IFN-Rezeptor benachbarter Zellen und initiiert durch nachgeschaltete Signalkaskaden die Produktion von IRF7. Die späte Phase der IFN-Produktion wird durch eine positive Rückkopplung gekennzeichnet, bei der IRF3 und IRF7 gemeinsam die Transkription von IFN α und IFN β amplifizieren. Daher ist die Regulation der initialen IFN β -Genexpression von sehr großer Bedeutung für eine effiziente und ausgewogene IFN-Anwort.

Die Detektion fremder Elemente führt zu der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die die schnelle Transkription des IFN β -Gens induzieren. Hierbei unterscheidet man in Bezug auf die TLR-induzierte Aktivierung TRIF- und MyD88-abhängige Signalwege. Diese beiden Adaptormoleküle agieren als Mediatoren der Signaltransduktion durch die Bindung an die intrazelluläre TIR (Toll/IL1-Rezeptor) – Domäne der TLRs. TLR3 ist der einzige ausschließlich TRIF-abhängige Rezeptor, während alle anderen TLRs auch bzw. nur MyD88 rekrutieren (Yamamoto et al., 2003). Die RIG-I und MDA-5 – abhängige Aktivierung wird durch das erst kürzlich identifizierte Adaptormolekül IPS-1/Cardif/MAVS/VISA vermittelt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Alle diese Transduktionswege haben gemeinsam, dass sie Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche die IFN β -Transkription induzieren.

Die Expression des IFN β -Gens wird durch die Bindung eines höhergeordneten Transkriptions-Enhancer-Komplexes, auch Enhanceosom genannt, initiiert. Dieser Komplex besteht aus verschiedenen Komponenten, die kooperativ an den IFN β -Promotor binden und synergistisch die Genexpression einleiten (Abb. 1.2). Das IFN β -Enhanceosom beinhaltet die Transkriptionsfaktoren IRF3 bzw. IRF7, NF- κ B und ATF-2/c-Jun sowie das DNA-strukturierende Protein HMG-I(Y) (Wathelet et al., 1998). Nach Rekrutierung der Kofaktoren p300 und *CREB binding protein* (CBP) wird die Transkription des IFN β -Gens gestartet.

EINLEITUNG

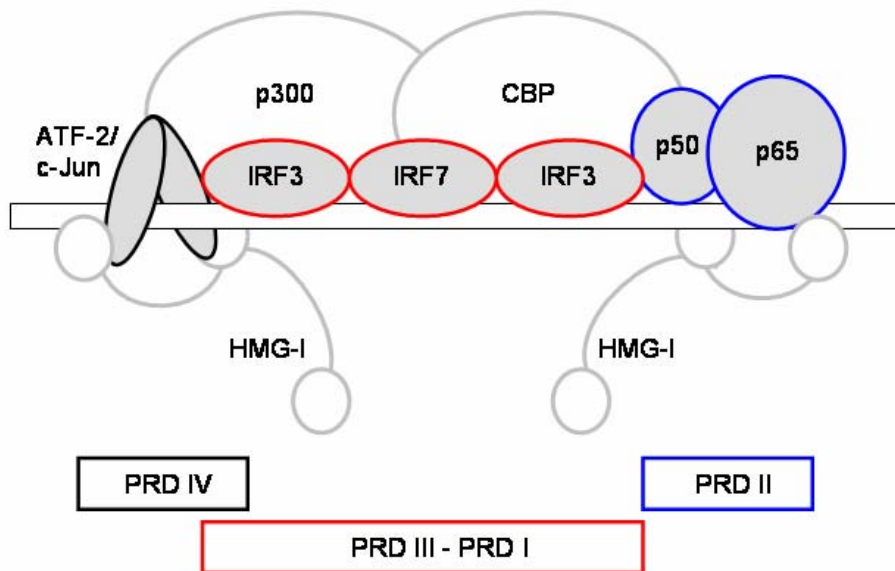


Abb. 1.2: Das IFN β -Enhanceosom

Komponenten des IFN β -Enhanceosoms mit ihren Bindestellen im Promotor. Beschreibung der Funktionen und Erklärung der verwendeten Abkürzungen im Text. Darstellung angelehnt an Maniatis et al. (1998)

Der IFN β -Promotor enthält sogenannte *positive regulatory domains* (PRD), die Bindestellen für die aktivierten Transkriptionsfaktoren darstellen (Goodbourn und Maniatis, 1988). PRD I und PRD III sind verwandte Sequenzelemente, die von Mitgliedern der IRF-Familie gebunden werden. Der bei der IFN-Genexpression wichtige Transkriptionsfaktor IRF3 liegt in der Zelle in nicht aktivierter Form vorwiegend im Cytoplasma als Monomer vor, während er nach Aktivierung im Kern akkumuliert. Eine Virusinfektion stimuliert die Serin-Phosphorylierung von IRF3, die mit einer Dimerisierung einhergeht, da die Phosphorylierung eine Konformationsänderung herbeiführt, die eine Dimerbildung erlaubt (Lin et al., 1998; Mori et al., 2004). Diese aktivierten IRF3-Dimere translozieren in den Kern und assoziieren mit den Kofaktoren CBP und p300, um an den IFN β -Promotor zu binden und die Transkription einzuleiten.

PRD II ist die Bindungsstelle für den nukleären Faktor κ B. NF- κ B bezeichnet eine Klasse von Transkriptionsfaktoren, die aus Homo- und Heterodimeren der Rel/NF- κ B-Proteinfamilie besteht (Chen und Ghosh, 1999). Die in den meisten Zellen häufigste NF- κ B-Form ist das

EINLEITUNG

Heterodimer aus den Untereinheiten p50 und p65/RelA. Im inaktiven Zustand findet man NF- κ B im Cytoplasma als Komplex mit einem inhibitorischen Protein (I κ B). Durch die Bindung von I κ B wird die *nuclear localization site* (NLS) maskiert und somit eine Translokation in den Kern verhindert. Zusätzlich wird im Kern befindliches p50/p65 von I κ B ins Cytoplasma transportiert und dort festgehalten. Obgleich verschiedene Formen von I κ B existieren, scheint I κ B α der wichtigste Regulator einer schnell induzierbaren Aktivierung von NF- κ B zu sein. Bei einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wird I κ B α phosphoryliert, ubiquitiniert und dadurch für den Abbau durch das 26S Proteasom gekennzeichnet (Karin und Ben Neriah, 2000). Die Degradation von I κ B α erlaubt dem freigesetzten NF- κ B-Komplex die Translokation in den Nukleus und die transkriptionelle Induktion von Zielgenen. Bei Entfernen des NF- κ B-aktivierenden Signals suprimiert neu synthetisiertes I κ B α , welches als NF- κ B-Zielgen vermehrt produziert wird, die NF- κ B-Aktivität. Damit besitzt das System einen Selbstregulierungsmechanismus, der das Gleichgewicht kontrolliert und eine sehr schnelle Umschaltung von inaktiver Transkription auf aktiv und *vice versa* erlaubt.

Der dritte Transkriptionsfaktor, der wichtig für die IFN β -Genexpression ist, bindet an PRD IV. Diese Bindungsstelle wird von dem Heterodimer aus ATF-2 und c-Jun erkannt. Die Orientierung dieses Heterodimers bestimmt die Struktur des Enhanceosoms (Falvo et al., 2000). Die Phosphorylierung und Aktivierung von ATF-2 und c-Jun erfolgt durch MAPK (*mitogen activated protein kinases*) (Davis, 2000; Kyriakis und Avruch, 2001). Im inaktiven Zustand befindet sich c-Jun überwiegend im Kern, während ATF-2 zwischen Nukleus und Cytoplasma pendelt. Nach Phosphorylierung und Aktivierung wird ATF-2 durch die Heterodimerisierung mit c-Jun im Kern gehalten, wo der ATF-2/c-Jun – Komplex transkriptionell aktivierend wirkt (Liu et al., 2006).

In Fibroblasten, die Replikationsorte vieler Viren darstellen, wird die IFN-Antwort durch eine positive *Feedback*-Schleife amplifiziert, so dass nach einer Infektion ein effektives Anschalten der antiviralen Abwehrmechanismen erzielt wird (Marie et al., 1998; Sato et al., 1998). In diesem System spielt IRF7 zusammen mit IRF3 die Hauptrolle. Als Antwort auf eine Virusinfektion synthetisiertes IFN β induziert die Produktion von IRF7, welches durch den vorhandenen Stimulus der Infektion selbst aktiviert wird und im Zusammenspiel mit IRF3 die Synthese von IFN α und IFN β hervorruft. Dadurch wird bei Bedarf die initiale IFN-Antwort verstärkt und ein dauerhafter antiviraler Status aufrechterhalten. Die Transkription der IFN α -Gene wird nicht direkt durch Virusinfektion initiiert, sondern ist Teil der positiven Rückkopplung. Hierbei stellt das IFN α 4 der Maus eine Ausnahme dar, da es als bisher

EINLEITUNG

einziges bekanntes IFN α -Gen unabhängig von einer vorausgegangenen IFN β -Antwort direkt durch Infektionen induziert werden kann (Marie et al., 1998).

Die Regulation der IFN γ -Expression in Immunzellen ist völlig anders organisiert als die Regulation der IFN β -Produktion. Die molekularen Mechanismen der Initiation der IFN γ -Transkription sind weniger gut aufgeklärt als die Induktion der Typ I – Interferone, da wegen der Zelltypabhängigkeit der IFN γ -Produktion keine allgemeinen Mechanismen bestehen. IFN γ spielt z.B. eine essentielle Rolle in der pathogen-induzierten Differenzierung CD4-positiver T-Zellen. Die Aktivierung naiver T-Zellen resultiert in der Differenzierung zu Th1- oder Th2-Zellen, die sich in ihrer Wirkung unterscheiden und sich während ihrer Differenzierung wechselseitig hemmen. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN γ und eliminieren intrazelluläre Viren, Bakterien und Protozoen, während Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 synthetisieren und extrazelluläre Parasiten beseitigen (Farrar et al., 2002). Erst kürzlich wurden neue Sequenzelemente des IFN γ -Promotors beschrieben, die für die IFN γ -Produktion in NK- und T-Zellen wichtig sind (Hatton et al., 2006; Lee et al., 2004; Shnyreva et al., 2004).

1.1.4. Jak/STAT-Signaltransduktionsweg

Die Wirkung von IFN α/β und IFN γ beruht auf der Induktion von vielen verschiedenen Effektorgenen, die für die Pathogenabwehr zuständig sind. Die sekretierten Interferone stimulieren durch die Interaktion mit dem extrazellulären Teil der spezifischen Interferon-Rezeptoren (Transmembranproteine der Cytokin-Rezeptor-Klasse) die Signaltransduktion, die zur Initiierung der Transkription von Zielgenen führt. Die Bindung der Interferone an ihren Rezeptor führt zu der Aktivierung einer Signalkaskade, die aus sukzessiven Phosphorylierungen der Rezeptoren, der rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (Jak) und der betreffenden Mediatoren der Transkription besteht. Diese Transkriptionsfaktoren gehören der Familie der *signal transducers and activators of transcription* (STAT) an. Daher trägt die Kaskade den Namen Jak/STAT-Signaltransduktionsweg (Darnell et al., 1994; Velazquez et al., 1992). Auch wenn die Signalwege der Typ I – und Typ II – Interferone viele Gemeinsamkeiten aufweisen, stellen sie doch zwei distinkte Wege mit unterschiedlichen Zielgenen und daraus resultierend verschiedenen Funktionen dar. In Abb. 1.3 werden diese beiden Signalkaskaden schematisch gegenübergestellt.

EINLEITUNG

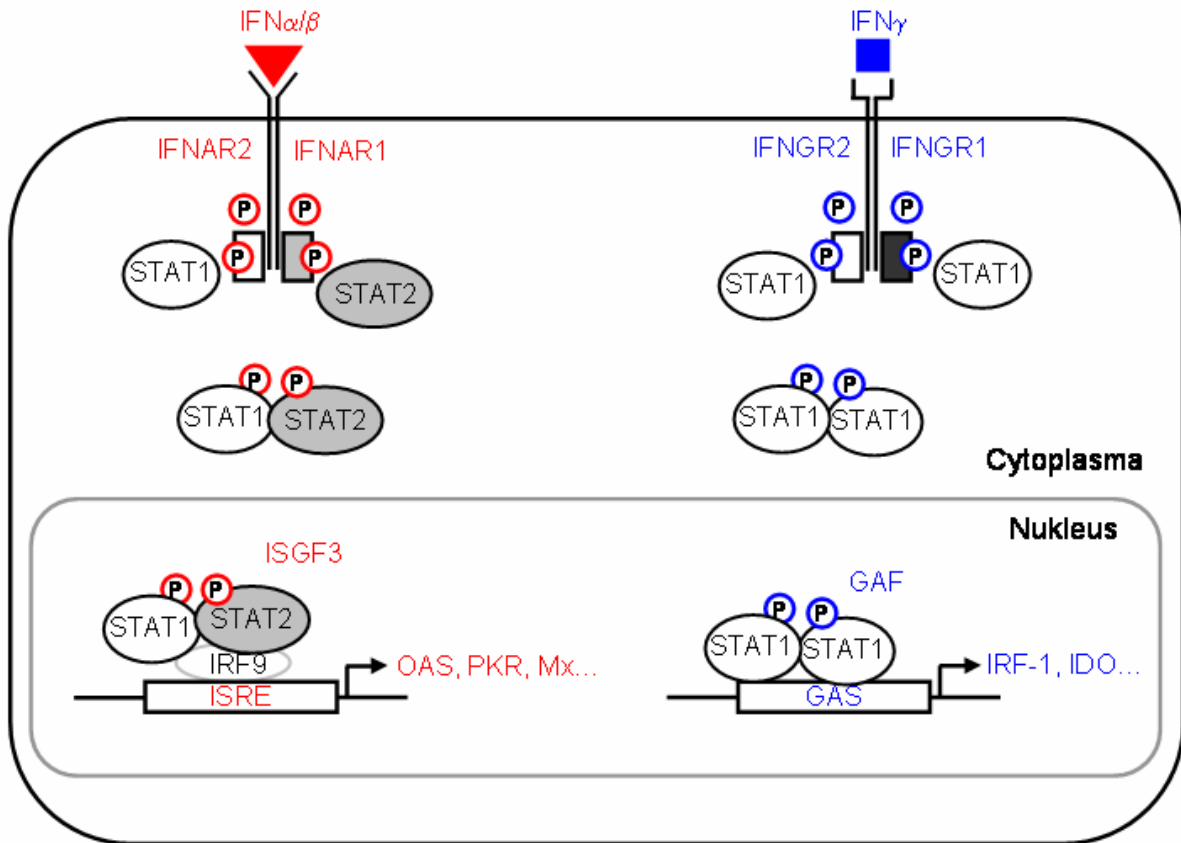


Abb. 1.3: Die Jak/STAT-Signalkaskaden

Schematische Darstellung der IFN-Signaltransduktionswege. Typ I – IFN abhängige Kaskade in rot, Typ II – IFN abhängige Kaskade in blau hervorgehoben. Beschreibung der Funktionen und Erklärung der verwendeten Abkürzungen im Text.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist der wichtigste Unterschied zwischen beiden Wegen die Bildung zweier verschiedener Komplexe, die transkriptionell aktivierend wirken. Der IFN α/β -Weg führt zu der Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT1 und STAT2. Dieses Heterodimer transloziert in den Kern, wo es IRF9 rekrutiert, um den sogenannten *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) zu bilden. ISGF3 bindet an ISRE-Boxen (*interferon stimulated response element*), die man in der Promotor-Region IFN α/β -regulierter Gene findet (Friedman und Stark, 1985). Typische ISRE-abhängige Gene sind z.B. PKR, OAS und Mx (siehe 1.1.4). IFN γ dagegen induziert die Bildung von STAT1-Homodimeren, welche die Expression von Genen mit GAS-Boxen (*gamma activated sequence*) initiieren, zu denen z.B. IRF1 gehört. Die IFN-Zielgene werden somit durch den Besitz von ISRE- bzw. GAS-Motiven definiert, wobei auch beide Elemente in der Promotor-Region eines einzelnen Gens vorhanden sein können. Daraus ergibt sich ein zum Teil überlappender Satz an

EINLEITUNG

Zielgenen für Typ I – und Typ II – Interferone. Zusätzlich zu den beiden klassischen Signalwegen wurde vor kurzem ein dritter Weg beschrieben, der eine direkte Verbindung der beiden Signalwege darstellt (Zimmermann et al., 2005). IFN γ ist in der Lage, auf direktem Weg über den IFN γ -Rezeptor STAT2 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig vom IFN α/β -Rezeptor. Interessanterweise kann die IFN γ -vermittelte STAT2-Aktivierung in infizierten Zellen akkumulieren. Infektionsexperimente in Mäusen mit spezifischen Deletionen in Teilen der IFN-Signalkaskade zeigten, dass zumindest für den Schutz gegen Cytomegaloviren diese Verbindung von essentieller Bedeutung für den Wirt ist.

1.1.5. Antivirale IFN-Antwort

Die exklusive Bedeutung der IFN-abhängigen Immunantwort wird durch die erhöhte Pathogen-Sensitivität von Gen-defizienten Mäusen mit gezielter Ausschaltung einzelner Komponenten der IFN-Kaskade deutlich. *In vivo* – Studien haben gezeigt, wie essentiell der IFN-Signalweg vor allem für die Abwehr von viralen Infektionen ist (Durbin et al., 1996; Muller et al., 1994). Diese antivirale Potenz der IFN-Antwort beruht auf der Induktion von antiviral wirkenden Proteinen, die Replikation und Ausbreitung von Viren eindämmen oder verhindern. Zu den wichtigsten antiviralen Abwehrfunktionen gehören folgende Faktoren und Mechanismen:

a) PKR

Die Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase R (PKR) ist ein zelluläres Protein, dessen Expression von IFN α/β induziert wird. Diese Serin/Threonin-Kinase besitzt wichtige Funktionen in Bezug auf Regulation der Transkription und Translation (Clemens und Elia, 1997). Das Protein enthält zwei gut charakterisierte Domänen: eine regulatorische Domäne am N-Terminus, die eine dsRNA-Bindungsstelle enthält, und eine katalytische C-terminale Domäne, die für die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität verantwortlich ist (Meurs et al., 1990). Das PKR-Protein befindet sich in der Zelle im inaktiven Zustand, bis es durch die Bindung von dsRNA aktiviert wird. Durch die Aktivierung findet eine Konformationsänderung statt, die zur Freisetzung der katalytischen Domäne führt (Wu und Kaufman, 1997). Die aktivierte PKR phosphoryliert die α -Untereinheit des eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor eIF2 und verhindert somit das Recycling dieses Faktors. Da eIF2 nur in limitierten Mengen

EINLEITUNG

zur Verfügung steht, wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α die Proteinsynthese in der Zelle gestoppt. Im normalen Zustand enthalten eukaryontische Zellen keine dsRNA; unter Virusinfektion aber wird dsRNA generiert, so dass die Aktivierung der PKR eine Antwort auf virale Infektionen darstellt. Durch die generelle Inhibition der Proteinsynthese werden in infizierten Zellen die Expression von viralen Proteinen und die virale Replikation verhindert. Neben der Funktion als Regulator der Translation übt das PKR-Protein eine weitere antivirale Wirkung als Induktor von Apoptose aus (Balachandran et al., 1998; Der et al., 1997). Obwohl das PKR-Protein mehrere Funktionen im antiviralen Abwehrsystem ausfüllt, zeigen PKR-Knockout-Mäuse keinen gänzlichen Verlust von Resistenz gegen Virusinfektionen (Abraham et al., 1999).

b) OAS

Die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS) stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die ebenfalls durch Typ I – Interferone induziert und durch dsRNA aktiviert werden. Aktivierte OAS katalysieren die Synthese von Oligoadenylaten mit der unüblichen 2'-5'-Verknüpfung (Kerr und Brown, 1978). Die 2'-5'-Nukleinsäuren binden mit hoher Affinität monomere Endoribonuklease L (RNase L), wodurch diese aktiviert wird und dimerisiert (Jacobs und Langland, 1996). Aktivierte RNase L spaltet cytoplasmatische Einzelstrang-RNA. Somit werden mRNA und rRNA geschnitten und die Translation und Proteinsynthese inhibiert (Player und Torrence, 1998). Da 2'-5'-Nukleinsäuren sehr instabil sind, hängt die Aktivierung der RNase L von der lokalen Präsenz aktivierter OAS ab. Dadurch wird gewährleistet, dass vorzugsweise virale Transkripte abgebaut werden und nicht zelluläre mRNA, weil in einer infizierten Zelle virale Transkripte sich üblicherweise in der Umgebung von dsRNA (den Aktivatoren der OAS) befinden (Nilsen und Baglioni, 1979). Dies stellt somit einen Mechanismus zur Unterscheidung viraler und zellulärer mRNA dar.

c) Mx-Proteine

Die Familie der IFN-induzierbaren Mx-Proteine beinhaltet hochkonservierte GTPasen, die zur Dynamin-Superfamilie großer GTPasen gehören. Mx-Proteine wirken antiviral gegen viele RNA-Viren, z.B. gegen Bunya- und Orthomyxoviren. Der antivirale Mechanismus scheint darauf zu beruhen, dass virale Infektionen anhand von Nukleokapsid-Strukturen detektiert werden und die virale Replikation inhibiert wird, indem diese Virus-Komponenten abgefangen werden und ihr intrazellulärer Transport blockiert wird, so dass sie für die Generation von neuen Virionen nicht zur Verfügung stehen (Haller und Kochs, 2002). Im

EINLEITUNG

Fälle der Bunyaviren verhindert MxA den Transport des viralen Nukleokapsid-Proteins in das Golgi-Kompartiment, dem Ort der Virus-Assemblierung (Kochs et al., 2002). Influenza-Viren werden durch die Wirkung von Mx-Proteinen sehr früh im Replikationszyklus inhibiert. Hierbei assoziiert MxA mit der ER-Membran und dem viralen Target, so dass sich diese viralen Proteine dislokalisiert in großen intrazellulären Aggregaten befinden (Kochs et al., 2005).

d) Kontrolle der Apoptose

Interferone können, abhängig von verschiedenen Faktoren wie z.B. Zelltyp oder Differenzierungszustand der Zelle, sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken. Es ist z.B. beschrieben, dass Caspase-1 (Chin et al., 1997) und Caspase-8 (Balachandran et al., 2000) durch Interferone induziert werden. Dadurch wird die Sensitivität der Zelle auf die virus-induzierte Apoptose verstärkt. Experimentell wurde gezeigt, dass neutralisierende Antikörper gegen IFN α/β Virus-induzierte Apoptose verhindern (Tanaka et al., 1998). Von IFN γ wird berichtet, dass es die Apoptose-Sensitivität durch Induktion von Fas und Fas-Ligand beeinflusst (Xu et al., 1998). Über die genauen molekularen Mechanismen ist noch nicht viel bekannt, aber allgemein kann man sagen, dass die selektive Induktion von Apoptose durch Interferone in Virus-infizierten Zellen die Ausbreitung der Viren eindämmt, während die Interferonwirkung in nicht-infizierten Zellen in der Etablierung eines antiviralen Status resultiert.

e) Immunmodulatorische Wirkung

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Funktionen wirken Interferone immunmodulatorisch und stimulieren die adaptive Immunantwort (Le Bon et al., 2001; Le Bon et al., 2003). Damit stellen die Interferone ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar und sind, wie Studien mit Knockout-Mäusen zeigen, unerlässlich für das Überleben des Wirts nach einer Infektion mit Pathogenen (Durbin et al., 1996; Muller et al., 1994). So induzieren sowohl TLR-abhängig produzierte Typ I – Interferone als auch IFN γ z.B. die T-Zell-Aktivierung (Kamath et al., 2005). Hierbei spielen Interaktionen zwischen NK- und dendritischen Zellen (DCs) eine wichtige Rolle: Die pathogen-induzierte Sekretion von Cytokinen durch DCs aktiviert NK-Zellen. Diese beeinflussen wiederum die Maturation der DCs und selektionieren die passenden DCs für die Migration in die Lymphknoten, wo beide Zelltypen das T-Zell-Priming regulieren (Della Chiesa et al., 2005; Moretta, 2005).

1.2. Cytomegaloviren

Cytomegaloviren (CMV) gehören zu der Familie der *Herpesviridae* und stellen prototypische Vertreter der *Beta-Herpesvirinae* dar. Sie weisen die charakteristischen Merkmale der Herpesviren auf, wie z.B. die Virionstruktur und die Fähigkeit zu einer persistierenden latenten Infektion. Der Name Cytomegalovirus reflektiert sowohl den Virus-induzierten cytopathischen Effekt infizierter Zellen mit den charakteristischen cytoplasmatischen Inklusionen als auch die Rolle dieses Virus als Erreger der cytomegalen Einschlusskörperchen-Krankheit, einer Speicheldrüsenerkrankung (Weller et al., 1960). Ein typisches Merkmal von CMV ist die strikte Speziespezifität. Diese Eigenschaft zeigt sich in dem Befund, dass viele Säugetiere ihr „eigenes“ charakteristisches CMV aufweisen. Eine weitere Auffälligkeit ist die für Viren enorme Genomgröße von über 200 kb. Damit besitzt CMV die größte potentielle Kodierungskapazität unter den Herpesviren.

1.2.1. Das humane Cytomegalovirus

Zur Zeit sind acht Herpesviren bekannt, für die der Mensch der natürliche Wirt ist. Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist eines dieser acht Viren und wird daher auch als humanes Herpesvirus Nr. 5 (HHV-5) bezeichnet. HCMV weist, wie alle Cytomegaloviren, die für Herpesviren typische Virionstruktur auf. Das Viruspartikel besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches das virale Genom aus dsDNA umschließt und von einer Protein-Matrix, dem Tegument, umgeben ist. Diese Matrix besteht zum größten Teil aus phosphorylierten Proteinen, wobei pp65 (pUL83) die Mehrheit der Tegumentproteine ausmacht. Das Tegument wird durch eine membranöse Hülle (*envelope*) begrenzt, auf deren Oberfläche eine Vielzahl von Glykoproteinen zu finden sind. Abb. 1.4 zeigt anhand von EM-Bildern den Aufbau eines CMV-Partikels.

Die Genomstruktur von HCMV unterscheidet sich von denen anderer Cytomegaloviren, da die *unique long*- und *unique short*-Regionen, welche den größten Teil der HCMV-Gene kodieren, von terminalen und internen *Repeat*-Regionen flankiert werden.

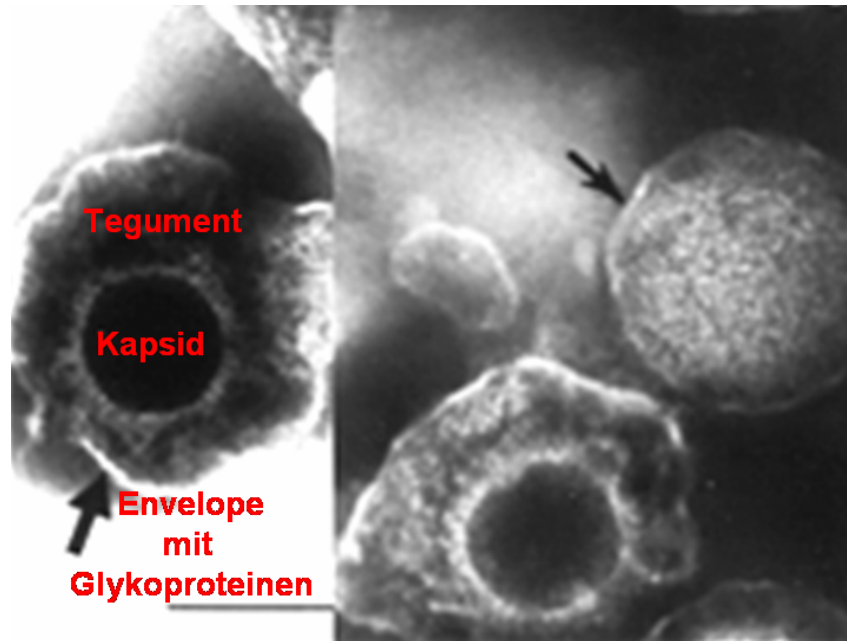


Abb. 1.4: Aufbau eines CMV-Partikels

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CMV-Partikeln (aus *Cytomegalovirus and its replication*; M.F. Stinski, Raven Press 1990). Lage von Kapsid und Tegument ist durch Beschriftung gekennzeichnet. Pfeile weisen auf *envelope* mit eingelagerten Glykoproteinen.

Aufgrund der Genomgröße von ca. 230 kb und der damit verbundenen Kodierungskapazität von über 200 offenen Leserastern (*open reading frame*, ORF) kann auf hochspezifisch wirkende Protein geschlossen werden, da diese Proteine nur für eine Funktion selektiert wurden und nicht – wie bei vielen anderen Virusproteinen – einen Kompromiss aus verschiedenen Funktionen realisieren müssen.

Die Expression der viralen Gene ist hoch koordiniert und erfolgt in drei Phasen: (1) die sehr frühe Phase (*immediate early*; IE) (2) die frühe Phase (*early*; E) (3) die späte Phase (*late*; L). Die IE-Genexpression beginnt quasi sofort nach Eintritt des Virus in die Zelle und ist dadurch charakterisiert, dass sie keine virale *de novo* – Proteinsynthese benötigt, d.h. die Expression der IE-Gene wird durch zelluläre Transkriptionsfaktoren initiiert und findet durch zelluläre RNA-Polymerasen statt. Die *early*-Phase wird durch IE-Genprodukte eingeleitet, so dass sich IE- und E-Gene experimentell durch eine Blockade der Proteinsynthese unterscheiden lassen. Die Einteilung der *late*-Gene beruht auf der Abhängigkeit von der viralen DNA-Synthese, daher lässt sich die *late*-Expression durch Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase hemmen. Zu den *late*-exprimierten Genen zählen vor allem Strukturproteine (Tegument, *envelope*), die für die Generation neuer Viruspartikel benötigt werden.

EINLEITUNG

1.2.2. Klinische Bedeutung

Humane Cytomegaloviren sind die Erreger der cytomegalen Einschlusskörperchen-Krankheit oder Cytomegalie. Die Pathogenese einer CMV-Infektion hängt kritisch vom Immunstatus des infizierten Wirts ab. In immunkompetenten Wirten stellt HCMV einen Erreger ohne unmittelbaren Krankheitswert dar, der lebenslang unauffällig und symptomlos im Körper verbleibt. Angeborene und adaptive Immunmechanismen kontrollieren die akute Primärinfektion. Gedächtnis-Zellen der adaptiven Immunantwort überdauern die latente Infektionsphase, so dass das Virus während der Reaktivierung in Schach gehalten werden kann. Dagegen besitzen immundefiziente Individuen (wie z.B. Transplantatempfänger und AIDS-Patienten) die höchsten Risiken für eine CMV-Erkrankung, da die Resistenz gegenüber einer CMV-Infektion von dem erfolgreichen Zusammenspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunität abhängt. Aufgrund der ubiquitären Verbreitung und der effizienten Transmission via direkten Kontakt (Speichel, Urin, genitale Ausscheidungen oder Schmierinfektionen) liegt die Durchseuchungsrate weltweit bei 50% in entwickelten Ländern und bis zu 100% in Entwicklungsländern.

Bei einer Primärinfektion während der Schwangerschaft kann es zu einer diaplazentaren Infektion der Feten kommen, die in ca. zehn Prozent der Fälle zu Erkrankungen führt, welche sich zu systemischen Infektionen entwickeln. Die Spätschäden solch angeborener CMV-Infektionen sind z.B. Taubheit und geistige Retardation.

Die Bedeutung von HCMV als Pathogen ist in den letzten Jahrzehnten mit der steigenden Zahl an Organtransplantationen, immunsuppressiven posttransplantationalen Therapien und dem weltweiten Anstieg von AIDS-Erkrankungen gewachsen. Diese Patienten sind predisponiert für primäre HCMV-Infektionen oder Reaktivierungen des Virus aus der Latenz, welche zu teilweise lebensbedrohlichen Krankheitssymptomen wie Retinitis, Hepatitis und Hirnhautentzündung führen können und mit den vorhandenen antiviralen Medikamenten nur bedingt zu behandeln sind.

1.2.3. Maus-CMV als Modellsystem

Aufgrund der strikten Speziesspezifität können Cytomegaloviren nur in ihren natürlichen Wirten untersucht werden. Daher ist es nicht möglich, *in vivo*-Studien mit HCMV durchzuführen. Da *in vitro*-Untersuchungen allein viele Fragestellungen nur initial

EINLEITUNG

beantworten, müssen weiterführende *in vivo*-Experimente mit Tiermodellen durchgeführt werden. Für CMV existieren verschiedene Tiermodelle, die für die zu beantwortenden Fragestellungen unterschiedlich gut geeignet sind. So sind die Cytomegaloviren der Primaten (z.B. Rhesus-CMV, Chimpansen-CMV) gute Modelle für Testungen von behandlungsnahen Problemstellungen, d.h. für Projekte, die bereits grundlegend bearbeitet wurden und deren Eignung für das humane System geklärt werden soll. Sie sind dagegen infolge der mit Primatenversuchen verbundenen ethischen Einschränkungen und der hohen Kosten weniger geeignet für rein grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen. Für diese sind Tiermodelle mit einfacher Handhabung, geringen Kosten sowie zahlreichen zur Verfügung stehenden methodischen Mitteln das System der Wahl. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist das Mausmodell eines der adäquatesten, wenn nicht sogar das am besten geeignete Modellsystem. Das Mausmodell weist nicht nur den Nutzen eines *in vivo*-Systems auf, sondern es bietet zusätzliche Vorteile aufgrund der bereits vorhandenen generellen Expertise und der Fülle methodischer und technischer Möglichkeiten, wie z.B. die stetig steigende Anzahl verfügbarer Knockout-Mäuse. Mauscytomegalovirus (MCMV) ist daher nicht nur ein geeignetes Modellsystem für CMV, sondern es stellt eines der adäquatesten Infektionsmodelle überhaupt dar. Die große Kodierungskapazität und die daraus resultierende spezifische Interferenz mit den zellulären Abwehrmechanismen bilden zusammen mit der ausgeprägten Adaptation an den Wirt die vorteilhaften Grundlagen für die Beantwortung immunologischer, molekularer sowie virusgenetischer Fragestellungen. Ein weiterer beachtenswerter Punkt ist die natürliche Virus-Wirt-Situation, die erlaubt, evolutionär gewachsene Interaktionen zu studieren.

1.3. Virale Strategien der IFN-Evasion

Viren stellen infektiöse Pathogene dar, die für ihre Replikation und Vermehrung die wirtseigene zelluläre Maschinerie benötigen. Die meisten viralen Infektionen werden effektiv vom Immunsystem in Schach gehalten, wie z.B. bei einer Erkältung aufgrund einer Rhinovirus-Infektion. Somit stellt die angeborene Immunantwort mit dem IFN-System die erste Hürde für Viren dar. Millionen von Jahren der Koevolution zwischen Wirt und Pathogen führten zu der Entwicklung von viralen Evasionsmechanismen, um teilweise dem zellulären Abwehrsystem zu entkommen und eine effiziente Viruszirkulation in der Population zu erreichen. Interessanterweise entwickelten sich verschiedenste Mechanismen der IFN-Inhibition, deren wichtigste Wirkweisen im folgenden Abschnitt zusammengefasst werden.

1.3.1. Inhibition der IFN-Produktion

Die Anwesenheit von dsRNA in einer Zelle weist auf die Gegenwart von Viren hin. Daher besitzen viele Viren dsRNA-bindende Proteine, die einerseits die Induktion von IFN α/β verhindern und andererseits die dsRNA-abhängige Aktivierung antiviraler Proteine wie z.B. PKR und OAS unterbinden. Prominente Vertreter solcher viraler Proteine sind Influenza-NS1 (Lu et al., 1995) und Vaccinia-E3L (Chang et al., 1992). Da die Fähigkeit der dsRNA-Bindung dieser beiden Proteine recht früh gefunden wurde, sind die Mechanismen relativ gut untersucht (Garcia-Sastre, 2001; Geiss et al., 2002; Smith et al., 2001; Wang et al., 2000; Xiang et al., 2002). Mittlerweile wurden zahlreiche weitere virale Proteine identifiziert, die die Wirkung des IFN-Systems durch dsRNA-Bindung inhibieren (Fenner et al., 2006; Hakki und Geballe, 2005; Vende et al., 2002). Die Charakterisierung rekombinanter Viren, denen die Fähigkeit zur dsRNA-Bindung fehlt, hat gezeigt, welche kritische Rolle diese Proteine in der Antagonisierung des zellulären Abwehrsystems einnehmen. So hat z.B. die Deletion des NS1-Gens aus dem Influenza A-Genom zur Folge, dass dieses Virus in IFN-kompetenten Systemen attenuiert ist, während es in IFN-nichtkompetenten Zellen deutlich besser repliziert (Bergmann et al., 2000; Garcia-Sastre et al., 1998).

Einige Viren blockieren die IFN-Produktion durch die direkte Inhibition von Signaltransduktionswegen, die an der IFN-Induktion beteiligt sind. Da IRF3 eine bedeutende Rolle in der IFN α/β -Synthese spielt, werden von vielen Viren IRF3-inhibitorische Proteine kodiert. Hierbei sind Mechanismen zur Verhinderung der IRF3-Phosphorylierung (Basler et al., 2003; Unterstab et al., 2005), der Akkumulation im Kern (Melroe et al., 2004) sowie der Bindung an CBP/p300 (Arany et al., 1995; Lundblad et al., 1995) bekannt. Die Inhibition NF- κ B-abhängiger Signaltransduktion ist ebenfalls ein Mittel, nicht nur IFN α/β -induzierende Signalwege, sondern auch andere proinflammatorische Immunkaskaden zu stören. Daher ist es nicht überraschend, dass viele viral-kodierte Antagonisten des NF- κ B-Weges gefunden wurden. Beispiele hierfür sind das I κ B-Homolog des *African Swine Fever Virus* (Powell et al., 1996; Revilla et al., 1998), der Vaccinia-kodierte NF- κ B-Inhibitor K1L, der die Degradation von I κ B α verhindert (Shisler und Jin, 2004), sowie das Core-Protein von Hepatitis C, welches die I κ B Kinase-Aktivität suprimiert (Joo et al., 2005).

Vor kurzem wurde ein neues Adaptorprotein identifiziert, das neben den bereits bekannten Adaptoren MyD88 und TRIF eine wichtige Rolle in der Erkennung molekularer pathogen-assoziiertes Elemente einnimmt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu

EINLEITUNG

et al., 2005). Da es von mehreren Gruppen fast zeitgleich beschrieben wurde, ist es unter verschiedenen Namen bekannt (Cardif, IPS-1, MAVS, VISA). Die Signalkaskade, die nach Detektion fremder RNA durch die zellulären Rezeptoren RIG-I und MDA-5 aktiviert wird, ist abhängig von der Funktion dieses Adaptormoleküls. Die IFN β -Induktion als Antwort auf die Infektion mit RNA-Viren ist in MAVS-Knockout-Mäusen stark beeinträchtigt (Sun et al., 2006). Zusätzlich wurde die Bedeutung dieses Proteins für die antivirale Immunantwort durch die Identifizierung viraler Inhibitoren unterstrichen. So besitzt z.B. Hepatitis C das Protein NS3-4A, welches Cardif proteolytisch von der Mitochondrien-Oberfläche spaltet (Meylan et al., 2005). Dadurch wird die Signalkaskade gestört und die Induktion von IFN β inhibiert.

1.3.2. Inhibition der IFN-abhängigen Signalkaskade

Die virale Interferenz mit der IFN-Induktion minimiert zwar die Wirkung der Interferone auf benachbarte Zellen; aber ein Virus sollte auch solche Zielzellen produktiv infizieren können, die durch die Interferone bereits „vorgewarnt“ wurden. Folgt man dieser Überlegung, ist die Inhibition der IFN-Synthese nicht ausreichend, um das IFN-System auszuschalten. Daher sind die IFN-abhängigen Signaltransduktionswege oftmals Ziel viraler Antagonisten. Die Inhibition der IFN α/β -Signalkaskade kann auf mehreren Ebenen erfolgen. Interessanterweise sind alle wichtigen Komponenten des IFN α/β -Signalweges (IFN α/β -Rezeptor, Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2, IRF9) als Zielstrukturen viraler Inhibitoren beschrieben. So besitzen z.B. Vaccinia-Viren (wie die meisten Orthopoxviren) einen löslichen IFN α/β -Rezeptor, der gegen die zellulären Rezeptoren kompetitiert und die Wirkung von IFN α/β drastisch verringert (Colamonici et al., 1995; Symons et al., 1995). Im Gegensatz zu den natürlichen zellulären Rezeptoren weisen die löslichen IFN α/β -Rezeptoren der Poxviren wie auch die viralen Homologe der IFN γ -Rezeptoren in der Erkennung ihrer Liganden eine breite Spezifität auf, so dass die viralen Abwehrmechanismen in verschiedenen Wirten wirken, was mit dem relativ breiten Wirtstropismus vieler Poxviren einhergeht. Auf Ebene der Rezeptor-assoziierten Kinasen gibt es sowohl virale Inhibitoren, die Jak1 als Ziel haben (Miller et al., 1998), als auch viral-kodierte Proteine, die mit Tyk2 interferieren (Li et al., 1999; Lin et al., 2004). Die Komponente des Jak/STAT-Signalweges, welche am häufigsten Ziel viraler Antagonisten ist, ist der ISGF3-Komplex. Da die Expression IFN α/β -abhängiger Gene direkt vom Transkriptionsfaktor ISGF3 abhängt, erscheint es sinnvoll, an diesem Punkt der Kaskade zu interferieren, um die transkriptionelle Aktivierung zu unterbinden. Alle drei Komponenten

EINLEITUNG

des ISGF3-Komplexes sind als Zielmolekül viraler Inhibitoren beschrieben. Es gibt einige Beispiele für virale Proteine, welche die Jak/STAT-Signaltransduktion stören, indem sie die Aktivierung von STAT1 oder STAT2 verhindern. Dabei können unterschiedliche Strategien beobachtet werden. Von der Degradation der Proteine selbst (Andrejeva et al., 2002; Elliott et al., 2007) über die Hemmung der Phosphorylierung (Malur et al., 2005) bis hin zur Verhinderung der nukleären Translokation (Brzozka et al., 2006) sind viele verschiedene Wirkweisen viraler Antagonisten beschrieben. Ein Beispiel für einen IRF9-Antagonisten ist das E7-Protein des humanen Papillomavirus. Dieser virale Inhibitor bindet IRF9 und verhindert somit die Bildung des ISGF3-Komplexes (Barnard und McMillan, 1999). Zusätzlich zu diesen Mechanismen findet man auch weiter *downstream* agierende Inhibitoren, die nicht die Bildung des ISGF3-Komplexes verhindern, sondern dessen DNA-Bindung oder die ISGF3-abhängige Genexpression (Paulus et al., 2006).

Da nicht nur die Viren während der Koevolution sich an die Immunantwort der Zelle angepasst und Wege gefunden haben, die IFN-Kaskade zu durchbrechen, sondern auch das Immunsystem viel Zeit hatte, sich auf virale Infektionen einzustellen, wäre es nicht verwunderlich, wenn es neben den IFN-abhängigen Signalkaskaden weitere Wege gibt, einen antiviralen Status zu etablieren, selbst wenn die IFN-Signaltransduktion blockiert ist. Es gibt in der Tat kompensatorische Alternativstrategien, die es einer infizierten Zelle ermöglichen, trotz inhibierter IFN-Antwort antivirale Effektormechanismen anzustoßen. Hierbei könnte IRF1 eine wichtige Funktion einnehmen, da gezeigt wurde, dass IRF1 an Promotoren bindet und aktiviert, die normalerweise IFN-responsiv sind (Au et al., 1992; Henderson et al., 1997; Nguyen et al., 1997). Die IRF1-Produktion wird durch eine Anzahl verschiedener Cytokine aktiviert, die während einer Infektion hochreguliert werden, z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 (Fujita et al., 1989; Harroch et al., 1994). Diese IFN-unabhängigen Signalwege können im Falle eines blockierten IFN-Systems zur Aktivierung antiviraler Gene führen, um trotz effizienter viraler IFN-Inhibitoren dem Virus nicht ausgeliefert zu sein.

1.3.3. Inhibition der IFN-induzierten antiviralen Proteine

Obwohl die meisten Viren bereits die IFN-Produktion und die IFN-Signalkaskade inhibieren, interferieren sie zusätzlich noch mit IFN-abhängigen, antiviral wirkenden Proteinen. Da die Inhibition der IFN-Antwort klare Vorteile für die Virusreplikation und Verbreitung mit sich bringt, findet man auf allen Ebenen virale Inhibitoren, um eine Signalverstärkung zu

EINLEITUNG

unterbinden und eine möglichst vollständige Blockierung zu erreichen. Als Paradebeispiel eines Zielproteins viraler Antagonisten ist die Proteinkinase R zu nennen. Da nicht nur die Expression von PKR IFN-induzierbar ist, sondern auch die Aktivierung von der Anwesenheit von dsRNA abhängig ist (siehe 1.1.5.a), gibt es verschiedene Wege, die antivirale Wirkung zu inhibieren. Viele Viren hemmen nicht nur die dsRNA-abhängige IFN-Induktion, sondern gleichzeitig auch die Aktivierung der antiviralen Proteine PKR und OAS. Ein Beispiel hierfür ist das Vaccinia-Protein E3L, das nicht nur dsRNA bindet, sondern auch direkt mit PKR interferiert und somit diesen Abwehrmechanismus ausschaltet (Romano et al., 1998; Sharp et al., 1998). Andere Viren exprimieren kleine RNA-Moleküle, die an PKR und OAS binden, diese aber nicht aktivieren (Gunnery et al., 1990; Mathews und Shenk, 1991). Eine weitere Strategie ist die Aktivierung des zellulären PKR-Inhibitors p58IPK (Gale et al., 1996), der PKR bindet und die Dimerisierung und Aktivierung hemmt (Polyak et al., 1996; Tan et al., 1998). Andere Viren interferieren *downstream* von der PKR-Aktivierung und exprimieren PKR-Pseudosubstrate, die mit eIF2 α um die Bindung an der aktivierten PKR konkurrieren (Dever et al., 1998; Roy et al., 1990; Taylor et al., 1999). Zusätzlich zu diesen Mechanismen findet man ebenfalls häufig virale Inhibitoren, die das OAS/RNaseL-System stören. So induziert z.B. Herpes simplex die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylat-Derivaten, die RNase L binden und inhibieren (Cayley et al., 1984). Andere Viren wie EMCV und HIV nutzen den zellulären RNaseL-Inhibitor RLI, um die RNaseL-Aktivität zu hemmen (Martinand et al., 1998; Martinand et al., 1999).

1.3.4. Immunevasion durch Cytomegaloviren

Aufgrund der lebenslangen Persistenz im Wirt müssen Cytomegaloviren mit allen Phasen der Immunantwort zurechtkommen, um ihre Koexistenz mit dem Wirt zu sichern. Diese Situation hat zu der Entwicklung von einer erstaunlich hohen Zahl effektiver Immunevasionsmechanismen geführt (Hengel et al., 1998; Hengel et al., 2005). Durch die Etablierung einer latenten Infektion mit restringierter viraler Genexpression wird die Antigenproduktion und -präsentation auf ein Minimum reduziert, um die adaptive Immunantwort möglichst nicht in Gang zu setzen. Gegen die Abwehrreaktionen während der Primärinfektion und bei einer Reaktivierung besitzen Cytomegaloviren multiple Faktoren, welche die wirtseigenen Schutzmechanismen außer Gefecht setzen, um die notwendige Zeit für die Replikation zu gewinnen. Die Anzahl beschriebener CMV-kodierter Inhibitoren und Evasionsmechanismen

EINLEITUNG

steigt stetig an, aber nichtsdestotrotz ist nur ein Bruchteil dieser Funktionen bekannt. Es wird immer deutlicher, wie komplex nicht nur die zellulären Abwehrmechanismen sind, sondern auch wie genau und raffiniert die viralen Immunevasionsstrategien wirken. Durch den hohen Adaptationsgrad wurde ein Gleichgewicht zwischen Wohlergehen des Wirts und Überleben des Virus erreicht, welches durch veränderte Faktoren (wie z.B. eine Immuninkompetenz des Wirts) gestört wird. Eine solche Störung des Gleichgewichts führt zu den weder für den Wirt noch für das Virus vorteilhaften Krankheitsbildern, die in 1.2.2. beschrieben wurden.

Da die Präsentation viraler Antigene durch MHC-Komplexe folgenschwere Auswirkungen für die Virusreplikation hat, müssen Cytomegaloviren diese zellulären Funktionen antagonisieren, um zu überleben. Die MHC-Inhibitoren von HCMV und MCMV sind bereits gut charakterisiert. Die verantwortlichen viralen Proteine und deren Mechanismen sind eingehend untersucht worden (z.B. m04, m06, US6, US11). Sowohl HCMV als auch MCMV kodieren für Proteine, die die Antigenpräsentation durch MHC I-Moleküle hemmen, indem sie verhindern, dass die MHC I-Moleküle die Plasmamembran erreichen (Hengel et al., 1997; Ahn et al., 1996; Jones et al., 1996; Ziegler et al., 1997). Die zugrunde liegenden HCMV- und MCMV-kodierten Funktionen unterscheiden sich bemerkenswerterweise beträchtlich. Daraus lässt sich ersehen, dass die Notwendigkeit der MHC-Inhibition zur Entwicklung konvergenter HCMV- bzw. MCMV-eigener Mechanismen geführt hat.

Für die Immunantwort spielen Antikörper ebenfalls eine wichtige Rolle. Hierbei nimmt der Fc-Teil der Antikörper eine bedeutende Funktion ein, da er mit verschiedenen Komponenten des Immunsystems interagiert und Abwehrmechanismen initiiert (z.B. die Komplement-Kaskade). Die zellulären Fc γ -Rezeptoren wirken dabei als Verknüpfung zwischen zellvermittelter und humoraler Immunantwort. Durch die Bindung von Antikörpern an die Fc γ -Rezeptoren werden Effektormechanismen ausgelöst wie Phagozytose, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), Freisetzung von Cytokinen oder verstärkte Antigenpräsentation. CMV antagonisiert diese Funktionen durch die Expression viraler Fc γ -Rezeptoren, die mit den zellulären Fc γ -Rezeptoren um die Bindung an den Fc-Teil der Antikörper konkurrieren können (Atalay et al., 2002; Budt et al., 2004; Thale et al., 1994). Mittlerweile wurden zusätzliche Antikörper-unabhängige Funktionen der MCMV-kodierten Fc γ -Rezeptoren gefunden (Lenac et al., 2006). Diese Funktionen sind ebenfalls immunmodulatorisch, da die viralen Fc γ -Rezeptoren durch die Herabregulation von NK-Zell-Liganden die Erkennung und Eliminierung MCMV-infizierter Zellen durch NK-Zellen verhindert.

EINLEITUNG

Wie im ersten Teil dieser Einleitung bereits ausführlich dargelegt, stellt das IFN-System die erste Hürde für virale Infektionen dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Cytomegaloviren Wege gefunden haben, diese Schutzmechanismen zu umgehen. In den letzten Jahren wurden zur Aufklärung dieses Themenkomplex erste erfolgreiche Schritte unternommen. So wurde in unserer Arbeitsgruppe der erste CMV-kodierte Inhibitor der Jak/STAT-Signalkaskade identifiziert und charakterisiert (M27 von MCMV; Zimmermann et al., 2005). Mittlerweile sind weitere IFN-Antagonisten von HCMV und MCMV beschrieben worden. Für das HCMV *immediate early* 1 (IE1) Genprodukt wurde gezeigt, dass es mit STAT-Proteinen interagiert und dadurch die DNA-Bindung von ISGF3 verhindert (Paulus et al., 2006). HCMV TRS/IRS1 und MCMV m142/m143 binden dsRNA und reduzieren die Aktivierung dsRNA-abhängiger antiviraler Proteine (PKR, RNaseL; Child et al., 2004; Child et al., 2006; Valchanova et al., 2006). Für eine HCMV-Mutante, der das *UL83*-ORF fehlt, wurde beschrieben, dass sie nicht mehr in der Lage ist, die IFN β -Genexpression zu inhibieren. Als Inhibitionsmechanismen wurde sowohl eine Interferenz mit IRF3 als auch mit NF- κ B vorgeschlagen (Abate et al., 2004; Browne und Shenk, 2003). Eine neuere Arbeit dagegen zeigt, dass die Deletion von *UL83* eine Veränderung der viralen Genexpression zur Folge hat (Taylor und Bresnahan, 2006b). Daher könnte die erhöhte IFN β -Produktion in Δ UL83-infizierten Zellen ein indirekter Effekt sein. HCMV IE2, welches in Δ UL83-infizierten Zellen verzögert exprimiert wird, wurde in der Tat als Inhibitor der NF- κ B vermittelten IFN β -Induktion identifiziert (Taylor und Bresnahan, 2006a). Diese Befunde zeigen, dass trotz der ersten erfolgreichen Einblicke in die Interaktionen zwischen CMV und dem IFN-System noch viele offene Fragen und Ungereimtheiten bestehen. Vor allem im Hinblick auf die MCMV-vermittelten Inhibitionsstrategien der IFN α/β -Induktion ist so gut wie nichts bekannt.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Da die IFN-Antwort einer der ersten Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen darstellt, müssen Viren Gegenmaßnahmen entwickeln, um eine produktive Infektion zu erreichen. Aufgrund der extremen Koevolution mit ihren Wirten und der für Viren enormen Genomgröße, die es erlaubt, hochselektiv wirkende Proteine zu kodieren, sind Cytomegaloviren gut geeignet, um molekulare Virus-Wirt-Interaktionen zu studieren. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Interferenz zwischen MCMV und der IFN α/β -Induktion (der

EINLEITUNG

frühen Phase der IFN-Antwort) zu untersuchen und MCMV-kodierte Inhibitoren der IFN-Induktion zu identifizieren. MCMV wurde als Infektionssystem ausgewählt, um bei einer Charakterisierung gefundener Inhibitoren die Vorteile des Mausmodells (besonders *in vivo*-Experimente und Knockout-Zellen/Tiere) nutzen zu können. Zusätzlich bietet das MCMV-System aufgrund der bekannten annotierten Genomsequenz die Möglichkeit der gezielten rekombinanten Mutagenese, so dass zahlreiche experimentelle Situationen ermöglicht werden können. Durch diese Arbeit sollen einerseits neue Einblicke in die virale Strategie der Immunevasion geschaffen und andererseits molekulare Werkzeuge für weiterführende Analysen zellphysiologischer Funktionen zur Verfügung gestellt werden.