

3. DISKUSSION

Da die Produktion von Typ I - Interferonen eine entscheidende Rolle in der antiviralen Immunabwehr einnimmt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Interaktionen zwischen MCMV und der IFN α / β -Induktion zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, inwiefern virale Inhibitoren mit den IFN α / β -induzierenden Signalwegen interferieren. Zusätzlich sollten MCMV-Genprodukte identifiziert werden, die in die Inhibition involviert sind, um molekulare Werkzeuge für weiterführende detaillierte Untersuchungen der viralen und zellulären Mechanismen bereit zu stellen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MCMV nach einer initialen Induktionsphase die IFN α / β -Genexpression inhibiert. Die ausgeprägte Effektivität dieser Inhibition beruht darauf, dass alle IFN α / β -induzierenden Signalkaskaden aktiv antagonisiert werden. Mit Hilfe von MCMV-Deletionsmutanten wurde gefunden, dass Genprodukt(e) der *M43*-Region in die Hemmung der IFN β -Genexpression involviert sind. Diese Befunde stellen die ersten Kenntnisse bezüglich MCMV-kodierter Inhibitoren der IFN β -Transkription dar.

3.1. Aktivierung der IFN α / β -induzierenden Signalwege

Obwohl die zellulären Mechanismen zur Erkennung einer CMV-Infektion durch infizierte Zellen (vor allem DCs) bereits mehrfach untersucht wurden (Compton et al., 2003; Krug et al., 2004; Szomolanyi-Tsuda et al., 2006), bestehen noch grundlegende offene Fragestellungen, wie z.B. die Frage nach den Signaltransduktionswegen, die durch eine CMV-Infektion aktiviert werden. TLR3 und TLR9 wurden als Mediatoren der MCMV-Detektion beschrieben (Tabeta et al., 2004), doch es mehren sich Anhaltspunkte, die auf TLR-unabhängige und sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Mechanismen hinweisen, die in die Initiation der Immunantwort gegen MCMV involviert sind (Andoniou et al., 2005; Delale et al., 2005). Daraus lässt sich schließen, dass es mindestens einen unbekanntem zellulären Sensor der MCMV-Infektion gibt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten einen Beitrag zu den Kenntnissen hinsichtlich der molekularen Prozesse, die nach einer MCMV-Infektion in permissiven Fibroblasten stattfinden. Die Daten zeigen, dass eine Infektion mit MCMV die Transkriptionsfaktoren IRF3, NF- κ B und ATF-2/c-Jun aktiviert. Dadurch wird die Transkription des IFN β -Gens

DISKUSSION

initiiert. In Abb. 3.1 sind die Aktivierungsprofile der untersuchten Transkriptionsfaktoren schematisch zusammengefasst.

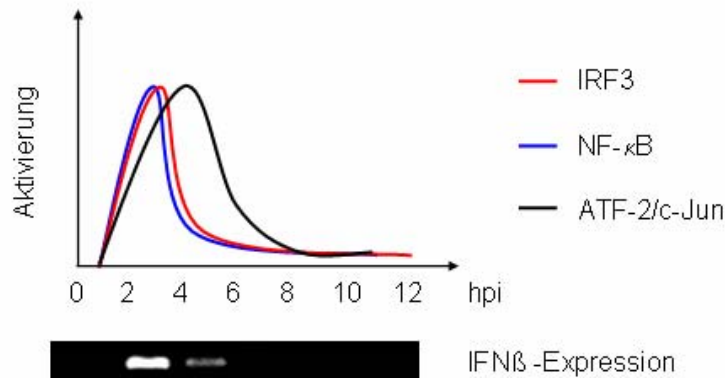


Abb. 3.1: Aktivierungsprofile der im IFN β -Enhanceosom enthaltenen Transkriptionsfaktoren

Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Aktivierungsprofile der Transkriptionsfaktoren IRF3, NF- κ B und ATF-2/c-Jun nach MCMV-Infektion von Fibroblasten. Die aus der Aktivierung resultierende IFN β -Expression ist in den Zeitverlauf mit aufgetragen.

Da das IFN α 4-Gen der Maus ebenfalls direkt (d.h. ohne positive IFN β -abhängige Rückkopplung) durch die Aktivierung von IRF3 induziert wird (Marie et al., 1998), kann zu diesen frühen Zeitpunkten nach Infektion auch IFN α 4-Transkription nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Mutante Δ M27 zeigte, dass die initiale IFN β -Expression in Fibroblasten bei fehlender Inhibition des Jak/STAT-Signalweges nicht verändert wird. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete Induktion der Typ I - Interferone nach MCMV-Infektion unabhängig von der positiven *Feedback*-Schleife stattfindet. Daher konnten nur IFN β - und IFN α 4-Transkripte nachgewiesen werden. Der Versuch, die Expression anderer IFN α -Subtypen ebenfalls zu detektieren, war nicht erfolgreich. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass es zu keiner positiven Rückkopplung in MCMV-infizierten Fibroblasten kommt.

Die Stimulation der Transkriptionsfaktoren IRF3, NF- κ B und ATF-2/c-Jun verläuft über distinkte, nicht vernetzte Signalwege, da die Aktivierung der betroffenen Faktoren mit unterschiedlicher Kinetik und durch verschiedene Stimuli stattfindet. ATF-2 und c-Jun sind Teil des gleichen Signalweges und werden beide durch die MAP-Kinase JNK (*Jun-N-*

DISKUSSION

terminal kinase) phosphoryliert (Davis, 2000). Daher war zu erwarten, dass sie mit gleicher Kinetik aktiviert werden. Die Stimulation von IRF3 und NF- κ B dagegen verläuft offensichtlich über andere Signaltransduktionswege, da bereits 2 hpi die Aktivierung von IRF3 und NF- κ B nachweisbar war, während die Phosphorylierung von ATF-2/c-Jun erst 3 bis 4 hpi detektiert wurde. Doch auch die IRF3 und NF- κ B aktivierenden Signalkaskaden scheinen zumindest teilweise unabhängig voneinander zu sein. Diese Schlussfolgerung beruht auf den Befunden bezüglich der Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV. Im Gegensatz zu replikationskompetentem MCMV stimuliert UV-inaktiviertes MCMV nur den IRF3-Signalweg, während NF- κ B und ATF-2/c-Jun nicht aktiviert werden. Dies zeigt, dass IRF3 und NF- κ B nach MCMV-Infektion durch unterschiedliche Kaskaden aktiviert werden. Betrachtet man die Daten hinsichtlich der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in ihrer Gesamtheit, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Infektion mit MCMV verschiedene zelluläre Rezeptoren aktiviert und nachfolgende distinkte IFN α / β -induzierende Signalwege stimuliert. Eine eingehende Analyse dieser Signaltransduktionswege ist notwendig, um den Beitrag und die Bedeutung der einzelnen Komponenten und Kaskaden zu verstehen.

Bemerkenswerterweise wurde nach einer Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV keine Aktivierung von NF- κ B oder ATF-2/c-Jun beobachtet, obwohl unter diesen Bedingungen eine erhöhte Expression von IFN β und IFN α 4 stattfindet. Das klassische Modell der IFN β -Induktion wurde von Maniatis et al. aufgestellt (Maniatis, 1986; Maniatis et al., 1998). Dieses besagt, dass der Synergismus der transkriptionellen Aktivierung des IFN β -Promotors der koordinierten Assemblierung des gesamten IFN β -Enhanceosoms aus seinen Einzelkomponenten bedarf. Die Experimente mit UV-inaktiviertem MCMV zeigten dagegen, dass IFN β -Genexpression auch durch die Aktivierung von IRF3 ohne nachweisbare Stimulierung von NF- κ B und ATF-2/c-Jun initiiert werden kann. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die von Stetson und Medzhitov beschriebene Fähigkeit von IRF3, ohne detektierbare Aktivierung von NF- κ B oder MAP-Kinasen in Makrophagen effektiv IFN β -Transkription zu induzieren (Stetson und Medzhitov, 2006), auch in Fibroblasten vorhanden ist. Die IRF3-Phosphorylierung und Dimerisierung, die nach Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV zu beobachten ist, ist möglicherweise die zelluläre Antwort auf die Detektion von viralen Partikeln und/oder viraler DNA. Die Abwesenheit von viraler Genexpression legt den Schluss nahe, dass die IRF3-Aktivierung Teil einer durch MCMV-Bindung und Eintritt stimulierten Signalkaskade ist. HCMV-Studien haben gezeigt, dass durch das Hüllprotein gB eine

DISKUSSION

antivirale Antwort ausgelöst wird (Boehme et al., 2004). Die Etablierung dieses antiviralen Status wird durch die Aktivierung von IRF3 initiiert. Doch im Gegensatz zu der zellulären Antwort auf MCMV-Virionen wird in humanen Zellen als Antwort auf HCMV-Virionen (und ebenfalls auf gB allein) neben IRF3 auch NF- κ B aktiviert (Yurochko et al., 1997). Diesen Unterschied könnte man durch anders wirkende Mechanismen in humanen und murinen Zellen erklären. Alternativ könnte man postulieren, dass MCMV-Partikel im Vergleich zu HCMV-Partikeln weniger aktivierende Bestandteile enthalten und somit weniger Signalkaskaden stimulieren.

3.2. Inhibition der IFN α/β -induzierenden Signalkaskaden

Die semi-quantitativen RT-PCR Analysen infizierter Fibroblasten haben gezeigt, dass MCMV die IFN α/β -Expression nach einer initialen Induktionsphase abschaltet. Diese effektive Inhibition ist abhängig von viraler Genexpression, da UV-inaktiviertes MCMV nicht in der Lage ist, den gleichen Effekt zu vermitteln. Dieser Befund zeigt in Verbindung mit den Koinfektionsexperimenten mit Sendai-Virus deutlich, dass MCMV die zellulären Mechanismen der IFN-Induktion aktiv antagonisiert und die ausbleibende IFN β -Transkription nicht Folge eines nachlassenden Stimulus ist. Diese Evasionsstrategie scheint für die virale Replikation wesentlich zu sein, da die IFN α/β -abhängige Immunantwort für die Kontrolle der MCMV-Infektion *in vivo* unerlässlich ist (Banks et al., 2005; Presti et al., 1998; Zimmermann et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die ersten Daten bezüglich MCMV-vermittelter Inhibition der Induktion von Typ I – Interferonen dar. Bisher wurde nur gezeigt, dass eine MCMV-Infektion die Produktion von IFN α/β stimulieren kann (Andoniou et al., 2005; Delale et al., 2005; Krug et al., 2004; Tabeta et al., 2004). Ein Grund für die bis dato fehlende Beobachtung der inhibitorischen Fähigkeit von MCMV könnte die Auswahl der analysierten Zelltypen sein. Die MCMV-vermittelte Hemmung der IFN-Antwort ist in den von Krug et al. und Andoniou et al. untersuchten dendritischen Zellen (DCs) vermutlich nicht ausgeprägt, weil DCs deutlich weniger permissiv sind als die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten. Da für die Inhibition der IFN α/β -Produktion die virale Genexpression bzw. Neusynthese von MCMV-Proteinen notwendig ist, spielt die Permissivität der infizierten Zellen eine große Rolle. In Anbetracht dieser klaren Unterschiede zwischen permissiven Fibroblasten einerseits und Immunzellen wie DCs andererseits könnte die erfolgreiche IFN-Inhibition eine Voraussetzung für die Bildung von „MCMV-Replikationsfabriken“ gegenüber

DISKUSSION

nicht-permissiven Zellen darstellen. Berücksichtigt man die virale Situation der Koexistenz mit dem Wirt, wird durch den gezielten, nur in spezifischen Zielzellen stattfindenden Eingriff bezüglich der IFN-Antwort ein Gleichgewicht zwischen Virus und Wirt eingestellt und ein globaler Schaden verhindert. Für den Fall einer Infektion des Wirtsorganismus mit anderen Pathogenen ist das Immunsystem daher nicht völlig außer Gefecht gesetzt. Dies ist bedeutend für die Aufrechterhaltung einer lebenslangen Koexistenz mit dem Wirt.

Die ausgeprägte Effektivität der MCMV-vermittelten Inhibition der IFN α/β -Transkription basiert auf der Interferenz mit allen IFN α/β -induzierenden Signalwegen. In Abb. 3.2 sind die in dieser Arbeit beschriebenen MCMV-vermittelten antagonisierenden Effekte schematisch dargestellt, um die Auswirkungen auf die IFN-Induktion in einer Übersicht zusammenzufassen.

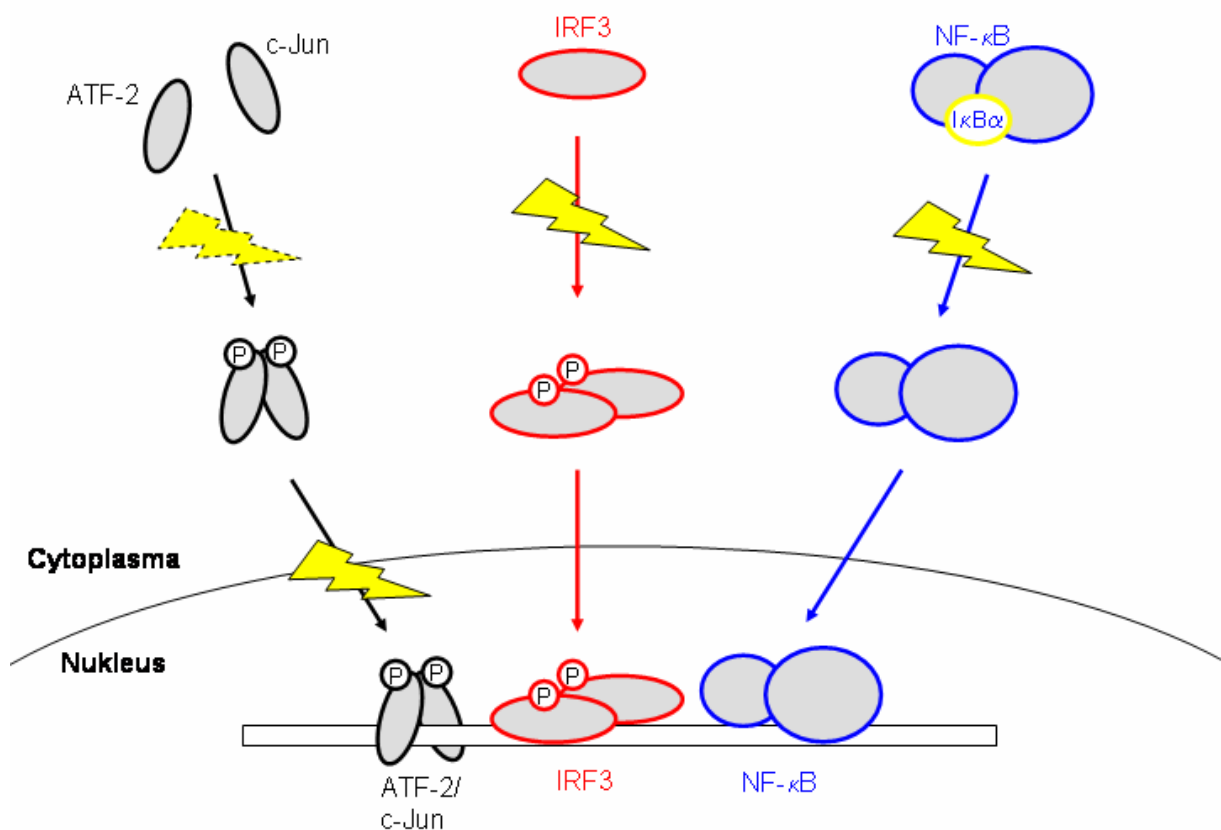


Abb. 3.2: MCMV-vermittelte Inhibition der IFN β -induzierenden Signalwege

Modell der MCMV-vermittelten Inhibition der ATF-2/c-Jun, IRF3 und NF- κ B aktivierenden Signalwege. Die einzelnen Aktivierungsschritte der betreffenden Transkriptionsfaktoren (z.B. Phosphorylierung, Dimerisierung) sind durch Pfeile verbunden. Die antagonisierende Wirkung der MCMV-Inhibitoren ist gelb hervorgehoben.

DISKUSSION

Die frühzeitige Abschaltung der IFN α/β -Expression in infizierten Fibroblasten beruht auf der sehr effizienten und raschen Antagonisierung der IRF3 und NF- κ B Aktivierung. Die Menge an phosphoryliertem und dimerisiertem IRF3 nimmt bereits 4 hpi deutlich ab und ist 6 hpi nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf früh exprimierte MCMV-Genprodukt(e) als Inhibitoren des IRF3-Signalweges. Der genaue Mechanismus der IRF3-Inhibition muss noch aufgeklärt werden. Die Daten bezüglich der IRF3-Aktivierung weisen auf eine Hemmung der IRF3-Phosphorylierung ohne Veränderung der zellulären IRF3-Menge hin. Da IRF3 auch durch nicht-replikationsfähige Virionen aktiviert wird, scheint die Phosphorylierung unausweichlich zu sein bei einem MCMV-Eintritt in die infizierte Zelle. Umso wichtiger ist es daher für MCMV, einen schnellen und effektiven Inhibitor der IRF3-Signalkaskade zu besitzen, um die potente IFN-Induktion durch aktiviertes IRF3 zu umgehen. Der NF- κ B Signalweg wird durch MCMV ebenfalls kontrolliert, obwohl aktiviertes NF- κ B nicht nur nachteilhaft für die Virusreplikation zu sein scheint. Es gibt Studien, die zeigen, dass HCMV-Promotorelemente durch Bindung von NF- κ B induziert werden (DeMeritt et al., 2004; Sambucetti et al., 1989). Da der NF- κ B Signalweg nicht durch UV-inaktiviertes, aber durch replikationskompetentes MCMV stimuliert wird, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass MCMV NF- κ B-Aktivität induziert und für eine gewisse Zeitspanne zulässt, bevor virale Inhibitionsmechanismen greifen und die Signalkaskade kontrollieren, damit die NF- κ B-abhängige Antwort keine antiviralen (z.B. proinflammatorische) Abwehrmechanismen auslöst. In Hinblick auf die MCMV-kodierten Inhibitionsmechanismen des NF- κ B Signalweges erlauben die Befunde der vorliegenden Arbeit erste Einblicke. Es konnte gezeigt werden, dass MCMV den Abbau von I κ B α verhindert, indem sowohl die intrinsische Halbwertszeit maßgeblich verlängert wird als auch die durch externe Stimuli induzierte Degradation verhindert wird. Interessanterweise scheinen HCMV und MCMV unterschiedliche Strategien zu verfolgen. Für HCMV wurde gezeigt, dass die Hemmung der TNF α -induzierten Aktivierung von NF- κ B erst in der *late*-Phase der Virusreplikation stattfindet (Jarvis et al., 2006). Im Gegensatz zu MCMV, das bereits sehr früh die NF- κ B Signalkaskaden stört, könnte für HCMV die Vorteile einer länger anhaltenden NF- κ B-Aktivierung überwiegen, so dass die Inhibitionsmechanismen erst *late* in Gang gesetzt werden. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B Schnittstelle vieler wichtiger Signalkaskaden mit diversen biologischen Effektorprogrammen ist (z.B. Immunantwort, Zellzyklus, Apoptose), müssen Viren die NF- κ B-Aktivierung auf vielen Ebenen steuern, um eine optimale Replikation zu erreichen. Für Vaccinia-Virus ist beschrieben, dass es den NF- κ B Signalweg

DISKUSSION

durch verschiedene Mechanismen kontrolliert, darunter die Hemmung der TNF α -induzierten Degradation von I κ B α (N1L; DiPerna et al., 2004) sowie des I κ B α -Abbaus nach Vaccinia-Infektion ohne externen Stimulus (K1L; Shisler und Jin, 2004). Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch MCMV mit dem NF- κ B Signalweg auf etlichen Ebenen interferiert und die virus-relevanten Aspekte der NF- κ B Signaltransduktion kontrolliert. Die Expression der MCMV-kodierten NF- κ B-Inhibitoren könnte selbst NF- κ B reguliert sein, um den richtigen Moment der viralen Interferenz abzugleichen und die Balance zwischen proviralen und antiviralen Effekten zu erhalten. Eine weitere interessante Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist die scheinbar I κ B α -unabhängige Aktivierung von NF- κ B zu späten Zeitpunkten der Infektion (48 hpi). Diese Aktivierung könnte Resultat der zweiten viralen Replikationsrunde sein. In Anbetracht relativ neuer Befunde bezüglich der bedeutenden Rolle von NF- κ B Aktivität in der Latenz-Etablierung von Gamma-Herpesviren (Krug et al., 2007) könnte man aber auch die Hypothese ableiten, dass die MCMV-vermittelte Aktivierung der NF- κ B Signaltransduktion, die in der späten Replikationsphase detektierbar ist, in Zellkultur und für die akute Infektion keine Bedeutung hat und nur *in vivo* bei der Etablierung von Latenz wichtig ist. Für die Klärung dieser Frage sind Zellkultur-Systeme jedoch nicht ausreichend, sondern es müssten Latenz- und Reaktivierungsexperimente in der Maus durchgeführt werden.

Die Interaktionen zwischen MCMV und der Aktivierung von ATF-2/c-Jun scheinen weniger rigoros zu sein als es bei IRF3 und NF- κ B zu beobachten ist. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass zu frühen Zeitpunkten nach Infektion hauptsächlich die Kernlokalisation und nicht die Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun verhindert wird und erst zu späteren Zeitpunkten des Replikationszyklus auch die Phosphorylierung gehemmt wird. Die scheinbar weniger ausgeprägte Inhibition des ATF-2/c-Jun Signalweges durch MCMV könnte bedeuten, dass die IRF3- und NF- κ B-abhängige Signaltransduktion deutlich mehr antivirales Potential aufweist als der ATF-2/c-Jun Signalweg. Es gibt in der Tat Berichte, die besagen, dass ATF-2/c-Jun Aktivität im Kontext einer Influenza-Infektion proviral wirken kann (Ludwig et al., 2001). Daraus könnte man schließen, dass die im Gegensatz zu IRF3 und NF- κ B nicht vollständige Inhibition der ATF-2/c-Jun Aktivierung nicht auf der fehlenden Möglichkeit einer absoluten Antagonisierung beruht, sondern dass die Restaktivität von ATF-2/c-Jun vorteilhaft für die Virusreplikation ist.

Zusätzlich zu den Aspekten bezüglich der beteiligten Signalwege zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die virale Interferenz mit der IFN-Induktion sehr früh nach Infektion vonstatten

DISKUSSION

gehen kann. Unter Beachtung dieser Befunde sollte man die Aktivierung relevanter Transkriptionsfaktoren auch schon zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion untersuchen, wenn man die IFN-Induktion durch Virusinfektionen analysiert. Vor dem Hintergrund der erhobenen MCMV-Daten könnte es vielleicht notwendig sein, schon früher als 12 hpi die Aktivierung der betreffenden Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, bevor die Schlussfolgerung einer kompletten Abwesenheit von IFN-Induktion nach einer Infektion mit Maus-Hepatitis-Virus gezogen wird (Zhou und Perlman, 2007).

3.3. Suchstrategien für die Identifikation MCMV-kodierter IFN β -Inhibitoren

Bei der Suche nach MCMV-kodierten IFN β -Inhibitoren wurde zunächst der Weg der positiven Selektion (basierend auf dem Replikationsdefizit von Δ NS1-Influenza im Vergleich zu wt-Influenza) eingeschlagen, um die essentiellen MCMV-Gene nicht aus der Analyse auszuschließen. Doch dieses scheinbar vielversprechende Screening-System mittels neun-segmentiger Influenza A-Viren hat sich in der Praxis als nicht realisierbar erwiesen. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass der Versuch der Generation neun-segmentiger Influenza-Viren auf nicht zu bestätigenden Annahmen basierte. Zum Zeitpunkt der Planung und Ausführung dieses Projekts war der Verpackungsmechanismus der Influenza-Viren nicht geklärt. Es gab zwei verschiedene Modelle: Das eine besagte, dass die Influenza-Segmente spezifisch in das Kapsid verpackt werden, während das andere von einer zufälligen Auswahl der im Virion inkorporierten Segmente ausging. Um trotz der nicht-selektiven Verpackung die acht notwendigen Segmente in einem Viruspartikel zu vereinigen, wurde eine größere Verpackungskapazität als 8 Segmente vorausgesetzt. Die allgemein vorherrschende Annahme besagte, dass bis zu 11 Segmente in ein Viruspartikel verpackt werden können und dass diese Segmente mehr oder weniger zufällig in die neu entstehenden Partikel gelangen, so dass neben replizierenden Virionen auch viele Partikel mit unvollständigem Genom entstehen (Bancroft und Parslow, 2002). Doch vor kurzem wurde experimentell belegt, dass jedes Influenza-Virion genau acht Segmente enthält und die Verpackung somit koordiniert erfolgt (Noda et al., 2006).

Nachdem die Konstruktion neun-segmentiger Influenza A-Viren fehlgeschlagen war und sich dieser Screening-Ansatz als nicht realisierbar herausstellte, wurde ein System mit ähnlichen Eigenschaften, aber besser etablierten Techniken ausgesucht, um MCMV-kodierte Inhibitoren der IFN β -Induktion zu identifizieren. Die Vaccinia-Deletionsmutante Δ E3L sollte anstelle

DISKUSSION

von Influenza Δ NS1 verwenden, da E3L ebenfalls als dsRNA-bindendes Protein die IFN β -Induktion inhibiert (Chang et al., 1992). Im Gegensatz zu Influenza A ist auf der Basis von Vaccinia-Virus ein etabliertes rekombinantes Expressionssystem entwickelt worden (Moss, 1996). Daher bestanden hier weniger technische Risiken. Wir haben von Prof. Jacobs (Arizona, USA), der die Δ E3L-Mutante konstruiert, charakterisiert und publiziert hat (Chang et al., 1995), eine Zusage für eine Kooperation erhalten. Doch es stellte sich heraus, dass diese Zusage trotz zahlreicher Briefwechsel nicht eingehalten wurde und wir die für unser Screening-System notwendige Δ E3L-Mutante nicht erhielten. Eine Publikation, die einige Zeit später erschien (Child et al., 2004), belegte, dass das Konzept des Screenings mit Hilfe von Vaccinia Δ E3L erfolgreich sein kann. Mit diesem Ansatz wurden die HCMV-Genprodukte TRS1/IRS1 als E3L-komplementierende Proteine identifiziert. Mittlerweile wurde gezeigt, dass diese HCMV-Proteine und deren MCMV-Homologe (m142/m143) ebenfalls dsRNA binden (Child et al., 2006; Hakki und Geballe, 2005).

Da die positive Selektion der MCMV-kodierten IFN β -Inhibitoren nicht durchgeführt werden konnte, wurde auf „*loss of function*“ getestet. Ein großer Vorteil war dabei, dass für CMV bereits rekombinante Systeme etabliert waren und daher verfügbare Techniken verwendet werden konnten. Seit der ersten Klonierung eines CMV-Genoms in einen BAC (Messerle et al., 1997) wurden die Methoden zur Mutagenese des viralen Genoms beständig weiterentwickelt und verfeinert (Brune et al., 2000; Hobom et al., 2000; Wagner et al., 1999). Diese Entwicklung hat sich auch bei den im Rahmen dieser Arbeit generierten MCMV-Mutanten bemerkbar gemacht, da bei der Herstellung der linearen PCR-Fragmente für die homologe Rekombination das anfangs verwendete Plasmid pACYC177 durch ein Template mit *frt*-Sequenzen ersetzt wurde. Dadurch wurde das Entfernen der ersten Resistenz-Kassette ermöglicht und zusätzliche Veränderungen bereits mutierter Genome vereinfacht.

Die Analyse der MCMV-Deletionsmutanten zeigte, dass ein Großteil der für die virale Replikation nicht-essentiellen ORFs für die Inhibition der IFN β -Expression entbehrlich ist. Diese klare Definition nicht-involvierter Genprodukte hätte man in einem „*gain of function*“ - Ansatz nicht erbringen können, da ein negatives Ergebnis in einer positiven Selektion nicht eindeutig auf eine Nicht-Funktion schließen lässt. Das in dieser Arbeit durchgeführte Screening war letztendlich erfolgreich, da die erste MCMV-Mutante identifiziert wurde, die einen „*loss of function*“ - Phänotyp in der IFN β -Expression aufweist.

DISKUSSION

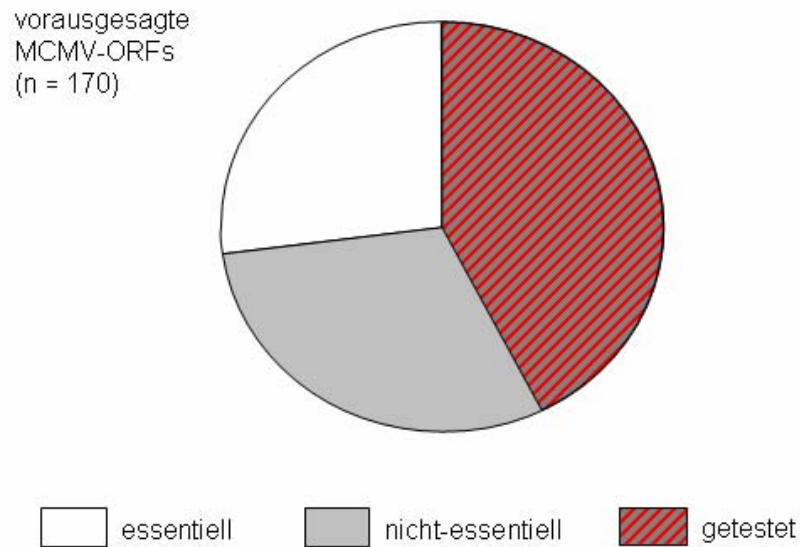


Abb. 3.3: Verteilung der getesteten und nicht-getesteten MCMV-ORFs

Schematische Darstellung der Gesamtheit vorausgesagter MCMV-ORFs. Essentielle ORFs sind in weiß gehalten, während nicht-essentielle grau eingefärbt sind. Die bereits auf IFN β -Inhibition getesteten ORFs sind rot schraffiert.

Das bisherige Screening der MCMV-Deletionsmutanten beschränkte sich hauptsächlich auf diejenigen, die in Fibroblasten kein drastisches Wachstumsdefizit aufweisen, da für die eindeutige und unverfälschte Beurteilung eines eventuell vorhandenen IFN β -Phänotyps eine ausreichend große Menge und Reinheit (d.h. möglichst wenig zelluläre Restbestandteile) an Virusstock generierbar sein muss. Aus technischen Gründen ist es sehr schwierig, Mutanten zu testen, die schlecht replizieren, obwohl kein für die Replikation essentielles Gen betroffen ist. Betrachtet man die Gesamtheit der vorausgesagten ORFs, verbleibt ca. ein Drittel der nicht-essentiellen ORFs für die weitere Suche nach Kandidaten (Abb. 3.3). Durch die Etablierung eines verbesserten Testsystems für schlecht replizierende Virus-Mutanten (wie z.B. durch die Verwendung von IFNAR1^{-/-} Fibroblasten für die Anzucht der Mutanten) können wahrscheinlich weitere MCMV-kodierte IFN β -Inhibitoren gefunden werden. Eine weitere bemerkenswerte Errungenschaft stellen die Mutanten an sich dar, da im Zuge dieser Arbeit MCMV-Mutanten generiert bzw. zusammen getragen wurden, die so gut wie alle nicht-essentiellen ORFs abdecken.

3.4. HCMV-UL83: Ein IFN β -Antagonist?

Das HCMV-Tegumentprotein pp65 (pUL83) wurde von verschiedenen Gruppen auf seine Wirkung als cytomegalaler IFN β -Inhibitor untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind inkonsistent und zum Teil widersprüchlich. Es wurden drei verschiedene Mechanismen der pp65-Funktion in der IFN β -Antagonisierung vorgeschlagen: (a) pp65 hemmt die IFN β -Induktion durch die Beeinflussung des NF- κ B Signalweges (Browne und Shenk, 2003). (b) pp65 verhindert die IRF3-Aktivierung und dadurch die Stimulation der IFN β -Expression (Abate et al., 2004). (c) Die Deletion des *UL83*-ORFs führt zu einer verzögerten Expression von pp72 (pUL82) und den *immediate early*-Genen und somit auf indirekte Weise zu einer verzögerten Inhibition der IFN β -Produktion (Taylor und Bresnahan, 2006b).

Die MCMV-kodierten Homologe sind *M83* und *M84* mit jeweils ca. 20% Aminosäure-Sequenz-Identität zu *UL83* (Cranmer et al., 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Beteiligung von *M83* und *M84* an der Inhibition der IFN β -Genexpression zeigten, dass die Deletion dieser ORFs keinen erkennbaren Effekt auf die MCMV-vermittelte Abschaltung der IFN β -Transkription in infizierten Fibroblasten hat. Weder die Antagonisierung der IRF3-Phosphorylierung und Dimerisierung noch die Wiederherstellung der zellulären I κ B α -Proteinmenge sind bei fehlender *M83*- bzw. *M84*-Expression beeinflusst. Geht man davon aus, dass die Homologie zwischen *M83/M84* und *UL83* ausreichend ist, um ähnliche Funktionen der betreffenden Genprodukte zu postulieren, unterstützen die erhobenen MCMV-Daten die neueste der drei Hypothesen bezüglich der pp65-Funktion in der IFN β -Antagonisierung: Die erhöhte IFN β -Induktion nach der Infektion mit Δ UL83 ist nicht Folge des fehlenden pp65-Proteins, sondern beruht auf der veränderten und verzögerten Expression anderer nicht deletierter HCMV-Gene (Taylor und Bresnahan, 2006b). Man kann allerdings nicht ausschließen, dass die homologen MCMV- und HCMV-Genprodukte sich in ihrer Funktion völlig unterscheiden und die MCMV-Befunde daher keinen Schluss auf HCMV-Proteine erlauben. In jedem Fall können die beiden „offensichtlichen“ Kandidaten *M83* und *M84* als MCMV-kodierte, nicht-redundante IFN β -Inhibitoren ausgeschlossen werden.

3.5. Beteiligung der *M43*-Genregion an der IFN β -Inhibition

In der vorliegenden Arbeit wurde die erste MCMV-Genregion beschrieben, die eine beeinträchtigte Inhibition der IFN β -Genexpression vermittelt. Mit diesen Befunden sind die ersten genetischen Informationen bezüglich MCMV-kodierter IFN β -Inhibitoren gewonnen worden. $\Delta M43$ wurde in Hinblick auf die IFN α/β -Expression und die an der Induktion beteiligten Signalwege untersucht. Die dabei erhobenen Daten besagen, dass nach Substitution des *M43*-ORFs durch eine unbeteiligte Sequenz (Resistenz-Kassette) die Fähigkeit zur effektiven Abschaltung der IFN β -Transkription beeinträchtigt wird. Dieser IFN β -Phänotyp könnte ursächlich für das beschriebene Replikationsdefizit *in vitro* in IC-21 Makrophagen und *in vivo* in der Speicheldrüse von MCMV-Mutanten mit einer Transposon-Insertion im *M43*-ORF sein (Menard et al., 2003; Xiao et al., 2000). Ein drastischer IFN β -Phänotyp wie z.B. bei Influenza- $\Delta NS1$ wurde bei $\Delta M43$ jedoch nicht beobachtet. Dies ist aber vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gefundenen unterschiedlichen MCMV-vermittelten Inhibitionsmechanismen nicht verwunderlich, da das Fehlen eines viralen Inhibitors durch die Wirkung anderer, zum Teil redundanter Inhibitoren kompensiert werden könnte. Interessanterweise wird die Inhibition der IFN $\alpha 4$ -Expression nicht beeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass unabhängige MCMV-vermittelte Mechanismen der IFN α/β -Inhibition existieren müssen. Die Deletion des *M43*-ORFs hat einen selektiven Effekt auf die IFN β -Inhibition, sie verändert jedoch nicht die Fähigkeit zur Hemmung der IFN $\alpha 4$ -Expression. Dieser Befund grenzt die möglichen zellulären Zielmoleküle dieses Inhibitionsmechanismus ein: Alle Signalwege, die sowohl an der Induktion von IFN β als auch IFN $\alpha 4$ beteiligt sind, können ausgeschlossen werden. Hierzu gehören vorrangig IRF-aktivierende Kaskaden, da IRF3 und IRF7 eine wichtige Rolle in der Induktion von sowohl IFN β als auch IFN $\alpha 4$ einnehmen (Civas et al., 2006; Juang et al., 1998; Schafer et al., 1998). Die Ergebnisse bezüglich der IRF3-Aktivierung in wt-MCMV und $\Delta M43$ -infizierten Zellen bestätigten diese Vermutung. Es konnte keine Veränderung der IRF3-Inhibition in $\Delta M43$ -infizierten Zellen nachgewiesen werden. Doch auch die Untersuchung der Aktivierung von NF- κB und ATF-2/c-Jun brachte keinen offensichtlichen Hinweis auf den betroffenen Wirkmechanismus. Die ersten Befunde bezüglich molekularer Effekte deuten auf eine Beeinträchtigung der Feinregulierung des NF- κB Signalweges, die besonders unter Bedingungen inhibierter Proteinsynthese deutlich wird. Doch die Beobachtungen hinsichtlich der veränderten I $\kappa B\alpha$ -Proteinmenge, der Caspase 3 - Aktivität und der Apoptose müssen nicht ursächlich mit der

DISKUSSION

gestörten Inhibition der IFN β -Expression zusammenhängen, da bei genauerer Analyse der *M43*-Genregion deutlich wird, dass die bisher vorgeschlagenen Annotationen nicht die Komplexität der während der Replikation exprimierten Genprodukte widerspiegeln und somit unabhängige und sekundäre Effekte durch die *M43*-Deletion verursacht werden können. In Abb. 3.4 sind die annotierten (Brocchieri et al., 2005; Rawlinson et al., 1996) und zusätzliche *in silico* vorausgesagte ORFs der *M43*-Genregion schematisch dargestellt, um einen Überblick über mögliche, bei der Konstruktion der Mutante nicht in Betracht gezogene Effekte der *M43*-Deletion zu erhalten.

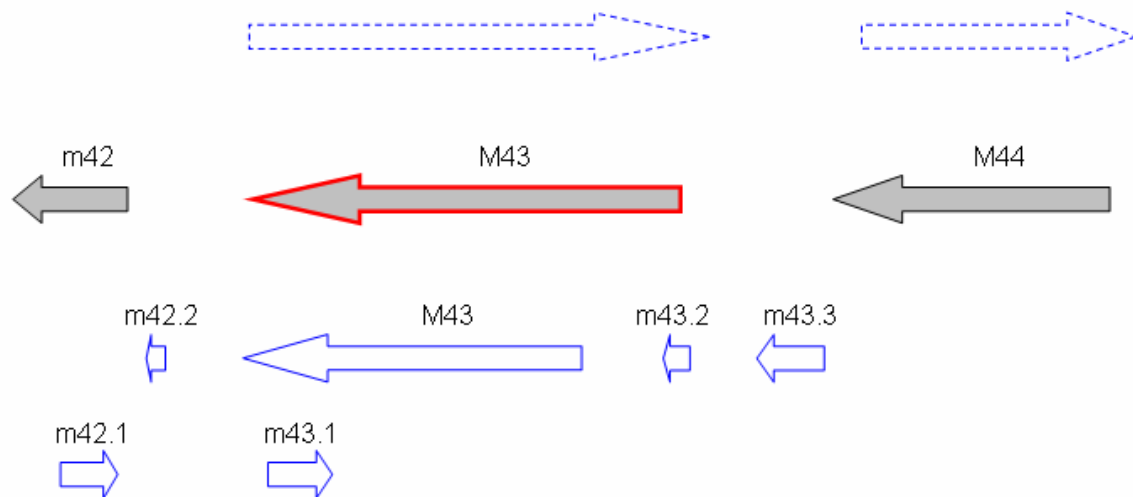


Abb. 3.4: *In silico* – Analyse der ORFs in der *M43*-Genregion

Schematische Darstellung der vorausgesagten ORFs in der *M43*-Genregion. Die grauen Pfeile stellen die von Rawlinson et al. annotierten ORFs dar, die blau umrandeten Pfeile die von Brocchieri et al. neu annotierten ORFs dieser Region. Die beiden größten zusätzlich vom NCBI ORF Finder vorausgesagten ORFs sind blau gestrichelt dargestellt. Das in $\Delta M43$ deletierte ORF ist rot markiert.

Wie man der Abb. 3.4 entnehmen kann, wird durch die Deletion der rot markierten *M43*-Sequenz wahrscheinlich die Expression von mindestens drei weiteren Genprodukten verhindert. Mit Hilfe der MCMV-Mutante M43-HA wurde bereits experimentell gezeigt, dass das von Rawlinson et al. annotierte pM43 nicht das einzige *M43*-Genprodukt ist. Es werden zwei unterschiedlich große *M43*-Proteine exprimiert, die mit dem gleichen Stop-Kodon enden. Die neueren von Brocchieri et al. vorgenommenen Annotationen stellen sicherlich eine

DISKUSSION

Verbesserung der Voraussagen dar, aber wahrscheinlich geben auch sie noch nicht die Realität wieder. Die Zuordnung der beobachteten $\Delta M43$ -Phänotypen in Hinsicht auf die verantwortlichen Genprodukte wird durch die Komplexität der *M43*-Genregion deutlich erschwert, da durch die Deletion der gesamten *M43*-Sequenz nicht nur mehrere *M43*-Genprodukte direkt betroffen sind, sondern möglicherweise auch die Expression benachbarter ORFs beeinträchtigt wird. Um wirklich definierte Aussagen über den Effekt einzelner Genprodukte machen zu können, müssten MCMV-Mutanten mit Punkt- bzw. *frame shift*-Mutationen generiert werden. Unter Beachtung der überlappenden ORFs sollen Mutanten hergestellt werden, die nur für ein einzelnes Genprodukt defekt sind. Auf diese Weise könnten gegebenenfalls die unterschiedlichen bei $\Delta M43$ beobachteten Phänotypen definierten Proteinen zugeordnet werden und die Funktionen der verschiedenen Genprodukte detaillierter untersucht werden. Nach der Identifizierung ursächlicher Genprodukte mit Hilfe von MCMV-Mutanten müssten die beobachteten Phänotypen durch die Reinsertion des intakten betreffenden ORFs (Revertante) wieder aufgehoben werden können. Dadurch wird sichergestellt, dass die planmäßig generierte Mutation Ursache für den beobachteten Phänotyp ist und nicht eine unbeabsichtigte Mutation. Wichtige zusätzliche Informationen könnten durch die isolierte ektopische Expression der einzelnen Genprodukte und „*gain of function*“-Untersuchungen erzielt werden.

Mit der gefundenen Interaktion des größeren der beiden *M43*-Proteine mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist ein wichtiger Hinweis für die Richtung weiterführender Arbeiten hinsichtlich des molekularen *M43*-Mechanismus gegeben. Die in $\Delta M43$ fehlende $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Interferenz könnte sowohl den $\text{IFN}\beta$ -Phänotyp als auch die CHX- bzw. Actinomycin D-induzierte Apoptose erklären (Kucharczak et al., 2003), auch wenn kein offensichtlicher Verlust der NF- κ B-Inhibition in den EMSA- und Reporteragen-Analysen zu beobachten war. Doch da Verbindungen zwischen $\text{IFN}\beta$ und Apoptose beschrieben sind (z.B. ISRE-abhängige Expression von p53, Takaoka et al., 2003; Vilcek, 2003), sind diese beiden $\Delta M43$ -Phänotypen möglicherweise kausal verbunden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bisher durchgeführten Untersuchungen mit NF- κ B *consensus*-Sequenzen in wt- und $\Delta M43$ -infizierten Zellen nur einen Teil der NF- κ B Signaltransduktion widerspiegeln, so dass eine Feinmodulation spezifischer NF- κ B-abhängiger Signalkaskaden nicht detektierbar war. Aufgrund des komplexen Wirkspektrums NF- κ B-abhängiger Signalwege ist es für ein Virus wie MCMV, das langsam und in sehr unterschiedlichen Zielzellen repliziert, wahrscheinlich sinnvoller,

DISKUSSION

nicht die gesamte NF- κ B Signaltransduktion zu verhindern, sondern die Feinregulation zu modellieren.

Eine *in silico* - Analyse mit Hilfe des NCBI ORF Finders ergab interessanterweise noch ein zusätzliches vorausgesagtes Protein, welches durch einen ORF kodiert wird, der komplementär zum annotierten *M43*-ORF verläuft. Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, da bei einem möglichen experimentellen Nachweis der Existenz dieses nicht-annotierten *M43*-Genproduktes gezeigt werden kann, dass in MCMV-infizierten Zellen komplementäre mRNAs entstehen, die dsRNA-Moleküle bilden können. Da dsRNA bekanntermaßen ein potenter Stimulator der IFN β -Antwort ist, wären solch komplementären Transkripte ein einleuchtender Grund für die evolutionäre Entwicklung von MCMV-vermittelten Inhibitionsmechanismen gegen die zelluläre dsRNA-abhängige Immunantwort. Untersucht man die Lage aller annotierten MCMV-Gene, findet man eine große Anzahl an ORFs, die relativ kurze komplementäre Sequenzen aufweisen. Sehr lange annotierte komplementäre Transkripte findet man auf den ersten Blick kaum, doch bei genauerer *in silico* - Analyse fallen viele putative nicht-annotierte komplementäre Transkripte auf. In der Literatur findet man zwar immer wieder das Argument, dass auch DNA-Viren aufgrund von komplementären viralen Transkripten dsRNA erzeugen (auch im Zusammenhang mit MCMV; Child et al., 2006). Doch experimentell nachgewiesen wurde bisher nur für sehr wenige DNA-Viren, dass während der Infektion dsRNA entsteht (Ludwig et al., 2006; Weber et al., 2006). Genaueres zu diesen dsRNA-Molekülen weiß man jedoch nicht. Die Ergebnisse der MCMV-Koinfektionsexperimente mit Sendai-Virus haben klar gezeigt, dass MCMV effektive Inhibitoren besitzt, die die dsRNA-abhängige, RIG-I vermittelte (Kato et al., 2006) IFN β -Antwort antagonisieren. Außerdem wurden bereits mehrere dsRNA-bindende Genprodukte von DNA-Viren beschrieben, darunter auch die MCMV-Genprodukte m142/m143 (Child et al., 2006; Valchanova et al., 2006). Dies belegt, dass auch DNA-Viren die dsRNA-abhängige Immunantwort inhibieren. Mit der Untersuchung der komplementären *M43*-Transkripte könnten zum ersten Mal Analysen definierter MCMV-abhängiger dsRNA-Moleküle durchgeführt werden und somit grundlegende mechanistische Kenntnisse zur Notwendigkeit der Inhibition dsRNA-abhängiger Immunantwort durch DNA-Viren gewonnen werden.

3.6. MCMV-kodierte IFN-Inhibitoren als molekulare Wegweiser und Werkzeuge

In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich der erste MCMV-kodierte Antagonist der Jak/STAT-Signalkaskade identifiziert und charakterisiert. Mittels dieses viralen Genproduktes pM27 wurde eine neue Verbindung zwischen STAT2 und IFN γ nachgewiesen (Zimmermann et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass – entgegen der Lehrbuchmeinung – die IFN γ -Antwort in IFNAR1-unabhängiger Weise, dafür IFNGR- und STAT2-abhängig verstärkt wird. Diese neuen Einblicke in sowohl virus- als auch wirtsspezifische Funktionen wurden mit Hilfe eines viral-kodierten Inhibitors erhalten. Folglich sind MCMV-kodierte Immunevasionsstrategien gut geeignete Werkzeuge, um komplexe Signalwege und virale sowie wirtsspezifische molekulare Mechanismen zu untersuchen.

Im Bereich der immunologischen Forschung wurden kürzlich diverse wesentliche Befunde zu den zellulären Erkennungsmechanismen viraler RNA gemacht. So wurde z.B. das neue Adaptormolekül IPS-1/MAVS/Cardif/VISA identifiziert, welches eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsweg der Fremd-RNA-Erkennung einnimmt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Dagegen steht die Erforschung der zellulären Detektion von Fremd-DNA noch am Anfang. Der bis dato einzige beschriebene Rezeptor für Fremd-DNA ist TLR9 (Hemmi et al., 2000). Aber es gibt etliche experimentelle Resultate, die zeigen, dass weitere TLR-unabhängige DNA-Sensoren existieren müssen (Ishii und Akira, 2006). Bei der Klärung dieser grundlegenden immunologischen Fragestellungen nimmt das Maus-System sicherlich die wichtigste Rolle aller verfügbaren Tiermodelle ein. Die offensichtlichen Vorteile dieses Systems liegen vor allem in der Möglichkeit von *in vivo* - Experimenten und der stetig steigenden Anzahl an Knockout-Tieren. Nicht nur unter diesen Gesichtspunkten ist MCMV eines der geeignetsten Infektionsmodelle, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass MCMV eine hohe Adaptation an den Wirtsorganismus aufweist gepaart mit einer für Viren sehr großen Kodierungskapazität, die es erlaubt, zahlreiche, daher sehr spezifische und feinregulierende Interferenzen mit den zellulären Abwehrmechanismen einzugehen. Kenntnisse bezüglich der Interaktionen zwischen MCMV und der IFN α/β -Induktion können wichtige Wegweiser für die Klärung der zellulären Antwort auf eine Infektion mit DNA-Viren darstellen. Bei den bereits gut untersuchten RNA-Viren hat die Identifizierung viraler Antagonisten der RIG-I und MDA-5 Signalwege die Bedeutung dieser zellulären RNA-Sensoren für die antivirale Abwehr bestärkt (Barral et al., 2007; Meylan et al., 2005; Mibayashi et al., 2007). Die spezifische Wirkung viraler Inhibitoren auf ihre

DISKUSSION

zellulären Zielmoleküle ist von besonderem Vorteil für die Bestimmung und Untersuchung von Mechanismen und Signalkaskaden. Da die Annahme nahe liegt, dass DNA-Viren Inhibitoren exprimieren, die auch oder sogar vor allem die DNA-abhängige Immunabwehr antagonisieren, könnte die Identifikation und Charakterisierung der MCMV-kodierten IFN-Antagonisten wesentliche Werkzeuge für die Analyse zellulärer Mechanismen der Detektion von DNA-Viren bereitstellen und somit einen weiteren Schritt auf dem nun 50 Jahre langen Weg der IFN-Forschung darstellen.

3.7. Ausblick

Mit dieser Arbeit sind wichtige Schritte zur Klärung der Interaktionen zwischen MCMV und der IFN α / β -Induktion gemacht. Für weiterführende, auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierende Untersuchungen sind mehrere verschiedene Aspekte interessant.

Die Analysen der IFN α / β -induzierenden Signalkaskaden, die nach einer Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV-Virionen stimuliert werden, ergaben, dass es zu einer Aktivierung von IRF3, aber nicht von NF- κ B kommt. Dies steht im Gegensatz zu publizierten HCMV-Ergebnisse, die besagen, dass die Bindung von HCMV-gB eine Aktivierung von sowohl IRF3 als auch NF- κ B auslöst (Boehme et al., 2004; Yurochko et al., 1997). Um zu klären, ob für die verschiedenen Befunde der Unterschied zwischen humanem und murinem System oder zwischen HCMV und MCMV zugrunde liegt, können Experimente mit HCMV-Virionen auf murinen Fibroblasten und *vice versa* durchgeführt werden. Eine detailliertere Untersuchung der IFN α / β -Antwort auf MCMV-Virionen wäre auch mit dem von Dr. Cassandra James (Perth, Australien) zur Verfügung gestellten Expressionsplasmid für MCMV-gB möglich. So könnten die Effekte von HCMV-gB und MCMV-gB direkt miteinander verglichen werden.

In Bezug auf die Charakterisierung der *M43*-Funktion(en) sind die ersten weiterführenden Schritte bereits gemacht: Die Planung der Punktmutanten. Um sekundäre Effekte möglichst gering zu halten, soll die Expression beider *M43*-Genprodukte, deren Vorhandensein durch die Mutante *M43*-HA bereits bewiesen wurde, mittels Mutation der betreffenden Start-Kodons verhindert werden, wobei jeweils nur eines der beiden Genprodukte betroffen sein soll. Zusätzlich soll durch die Generation einer MCMV-Mutante mit HA-Markierung des nicht-annotierten komplementären *M43*-ORFs geklärt werden, ob dieses Gen existiert, bevor auch die Expression dieses Genprodukts durch gezielte Mutation des betreffenden Start-Kodons verhindert wird. Mit Hilfe der drei unterschiedlichen *M43*-Mutanten könnten die

DISKUSSION

verschiedenen $\Delta M43$ -Phänotypen möglicherweise einzelnen definierten Genprodukten zugeordnet und eine fokussierte Analyse der molekularen Mechanismen durchgeführt werden. Hierbei soll der Schwerpunkt auf die Inhibition der IFN β -Transkription und die Interferenz mit dem NF- κ B-System gesetzt werden.

Da die Befunde dieser Arbeit nahe legen, dass MCMV für ein ganzes Arsenal an IFN α/β -Inhibitoren kodiert, soll weiterhin nach MCMV-Mutanten gesucht werden, die einen Verlust der Inhibition aufweisen. In Anbetracht der vielen verschiedenen Ebenen der Inhibition kann man das Screening anhand der direkten Effekte wie IRF3-Aktivierung, I κ B α -Degradation und Phosphorylierung von ATF-2/c-Jun durchführen. Hierbei sind vor allem die Mutanten interessant, die in IFN β -defizienten Zellen besser replizieren als in wt-Zellen. Auch die Abschaltung der IFN $\alpha 4$ -Expression, die zumindest zum Teil unabhängig von der IFN β -Inhibition abläuft, soll einer genaueren Analyse unterzogen werden.

Bei erfolgreicher Suche nach weiteren MCMV-kodierten IFN α/β -Inhibitoren wären gute Werkzeuge für die Bestimmung der zellulären Sensoren einer MCMV-Infektion vorhanden. Da eine Infektion mit wt-MCMV in IFN β -Reportermäusen nur geringe Antworten auslöst (nicht publizierte Daten, Dr. Stefanie Scheu, HHU, Düsseldorf), würde eine Mutante mit defizienter Inhibition und somit erhöhter Induktion die Untersuchungen nicht nur *in vitro*, sondern gegebenenfalls auch *in vivo* erleichtern (falls sie noch *in vivo* replikationsfähig sein sollte). Mit Hilfe der betreffenden MCMV-Mutante und spezifischer Knockout-Mäuse ließen sich die zellulären Rezeptoren und Signalwege, die neben TLR9 und TLR3 in die Erkennung einer MCMV-Infektion involviert sind, eingrenzen und analysieren.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Bedeutung der IFN-Induktion und die IFN-abhängige Expression von Effektorgenen für die virale Replikation. Für diese Fragestellung ist die verbesserte Technologie der BAC-Mutagenese von Vorteil, weil durch die Möglichkeit der *frt*-Rekombination die Generation von Mutanten mit mehreren unabhängigen Mutationen vereinfacht wird. Der Vergleich einer MCMV-Mutante, die sowohl ein Inhibitor der Jak-STAT-Signalkaskade (*M27*) als auch ein Inhibitor der IFN-Induktion (eventuell *M43*) fehlt, mit Mutanten, die nur für eines der beiden Inhibitoren defizient sind, könnte aufschlussreiche Einblicke bringen.

Zusammenfassend ist für zukünftige Untersuchungen weiterhin das Ziel gesetzt, MCMV-kodierte Inhibitoren und Mechanismen zu finden und zu untersuchen, um ein vollständiges Bild der Interaktionen zwischen MCMV und dem IFN-System zu erhalten. Es war auf keinen Fall möglich, dieses große übergeordnete Gesamtziel im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu

DISKUSSION

erreichen. Doch mit den in dieser Arbeit beschriebenen Befunden sind wichtige Erkenntnisse in Hinblick auf das Verständnis der MCMV-vermittelten Interferenz mit den wirtseigenen Abwehrsystemen gewonnen worden. Damit wurde ein Fortschritt bezüglich des Verständnisses zellulärer Mechanismen der Pathogenerkennung und Immunantwort erzielt, der die Basis für die weiteren genetischen und molekularen Analysen bildet.