

6. Zusammenfassung

Das Genom des ubiquitären humanen Zytomegalievirus kodiert mit US27, US28, UL33 und UL78 für vier G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit Sequenzhomologie zu humanen Chemokinrezeptoren. US28 ist der einzige funktionelle Rezeptor für die inflammatorischen, humanen Chemokine RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MCP-1 (CCL2) und MCP-3 (CCL7) und vermittelt die Liganden-abhängige Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) ERK2, die Erhöhung zytoplasmatischer Calciumkonzentrationen und die Chemotaxis glatter Muskelzellen. Daneben induziert die US28-Expression die konstitutive Aktivierung von Phospholipase C und der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB. Die US28-abhängige Entfernung von Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen wurde als Mechanismus zur Abwehr der menschlichen Immunantwort gedeutet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die gegenwärtig einzigen US28-spezifischen monoklonalen Antikörper hergestellt. Sie erlaubten die Charakterisierung von US28 als *late* Protein, da es in der späten Phase der Virusreplikation 24-48 Stunden nach einer Infektion primärer humaner Fibroblasten mit dem humanen Zytomegalievirus exprimiert wurde. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper wurden posttranslationale Modifikationen des US28-Moleküls untersucht. In transient transfizierten HEK293A Zellen unterlag der US28-Rezeptor einer starken Liganden-unabhängigen Phosphorylierung, wurde jedoch nicht durch N-Glykosylierungen oder Tyrosinsulfatierungen modifiziert. Überexpressionsexperimente zeigten, daß US28 ein Substrat der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 war. Zudem waren die Proteinkinase C und die Caseinkinase 2 an der Regulation der konstitutiven US28-Phosphorylierung in HEK293A Zellen beteiligt. Die Analyse der Phosphoaminosäuren ergab für den unstimulierten und den RANTES-stimulierten US28-Rezeptor eine vorwiegende Phosphorylierung an Serinresten und eine geringe Threoninphosphorylierung. Durch Untersuchungen von Rezeptorvarianten, deren carboxyterminale Serin- und Threoninreste durch Alaninreste ersetzt wurden, konnten Serinreste zwischen Position 323 und 350 als Akzeptorstellen der Phosphorylierung identifiziert werden. Weder die konstitutive Aktivierung von NF- κ B, noch die RANTES-induzierte Aktivierung der MAPK waren von der Rezeptorphos-

phorylierung abhängig. Allerdings war die MAPK-Aktivierung bei dem US28 Wildtyprezeptor durch Pertussistoxin hemmbar, bei der nicht phosphorylierten Rezeptorvariante jedoch unempfindlich gegenüber Pertussistoxin, was die Notwendigkeit der US28-Phosphorylierung für die Kopplung an Proteine der $G\alpha_i$ -Familie andeutet. Zusätzlich zu der beschriebenen ERK2-Aktivierung führte die Stimulation des US28-Rezeptors mit RANTES zu einer Aktivierung der ERK1- und p38-MAPK. Durchflußzytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit den US28-spezifischen Antikörpern zeigten eine geringe Expression des US28-Rezeptors an der Oberfläche transfizierter HEK293A, COS-7 und HeLa Zellen. Gleichzeitig konnte die Ansammlung des Rezeptors in intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden. Der Austausch der Phosphorylierungsstellen führte zu einer verstärkten Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche und war zudem für eine stark verlangsamte und reduzierte Endozytose des US28-Rezeptors verantwortlich. Somit reguliert die bisher einzigartige konstitutive Phosphorylierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors sowohl die Zelloberflächenexpression als auch die Endozytose des US28-Moleküls. Da die Rezeptorendozytose die mechanistische Grundlage der Ligandeninternalisierung darstellt, kann angenommen werden, daß die Phosphorylierung des US28-Rezeptors eine wichtige strukturelle Voraussetzung für die Beseitigung inflammatorischer Chemokine aus der Umgebung virusinfizierter Zellen darstellt.