

1. Einleitung

1.1 Das humane Zytomegalievirus

Infektionen mit dem humanen Zytomegalievirus (HCMV) verursachen schwere Erkrankungen bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem und sind die häufigste Ursache für infektionsbedingte Fehlbildungen bei Neugeborenen (Landolfo *et al.*, 2003). Das HCMV gehört zur Gruppe der humanen Herpesviren (HHV), dessen neun Vertreter in drei Familien, den α -, β - und γ -Herpesviren zusammengefaßt werden (Roizman und Pellett 2001). Sie sind für weltweit verbreitete Erkrankungen wie den namensgebenden Herpes simplex (HHV-1 und HHV-2) oder Windpocken und Gürtelrose (HHV-3 auch Varizellen-Zoster-Virus) verantwortlich (Arvin 2001; Whitley 2001). Das Epstein-Barr-Virus (HHV-4) und das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (HHV-8) sind zudem an der Ausbildung von malignen Tumoren beteiligt (Boshoff und Weiss 1998; Rickinson und Kieff 2001). Die Vermehrung der Viren erfolgt in einem lytischen Zyklus, während dessen es zu einer dreistufigen Abfolge der Proteinexpression von Virus-kodierten Genen kommt. Die Expression der sogenannten *immediate early*-Proteine (IE) erfolgt unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Zelle und hängt von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle ab. IE-Proteine dienen als Transaktivatoren für die Proteinbiosynthese der *early*-Proteine (E) und sind gemeinsam mit diesen an der Expression der späten (*late*) Proteine (L) beteiligt. L-Proteine werden gegen Ende des lytischen Zyklus gebildet und beinhalten viele Strukturproteine der Virione. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit nach einer primären Infektion lebenslang im Wirtsorganismus zu überdauern, ohne Erkrankungen zu verursachen (Roizman und Pellett 2001; Sissons *et al.*, 2002). Aus diesem Stadium der Latenz können die Viren wieder in den lytischen Vermehrungszyklus eintreten. Ein Vorgang, der als Reaktivierung bezeichnet wird und der zu einer sekundären oder zu wiederholten Virusinfektionen führen kann. Über die Mechanismen der Latenz und die Einleitung der Reaktivierung des HCMV ist noch wenig bekannt (Jarvis und Nelson 2002; Sissons *et al.*, 2002).

HCMV-Infektionen treten mit einer Häufigkeit von etwa 40 % in Industrieländern und bis zu 100 % in sich entwickelnden Ländern auf (Cinque *et al.*, 1997). Die Primärinfektion

erfolgt meistens in der Kindheit und bleibt in der Regel symptomlos. Auf der anderen Seite stellt HCMV die häufigste kongenitale Virusinfektion mit 0,3-2 % aller Neugeborenen dar, von denen 10 % unter ernstesten Erkrankungen leiden (Cinque *et al.*, 1997; Lazzarotto *et al.*, 1999). Besondere Komplikationen verursachen primäre und sekundäre HCMV-Infektionen bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem. Hierzu zählen vor allem AIDS-Patienten und Empfänger von Organ- und Knochenmarkstransplantaten, die unter anderem an schweren Formen einer Pneumonie, Retinitis, Enzephalitis und Hepatitis mit Todesfolge leiden können (Nichols und Boeckh 2000; Stocchi *et al.*, 1999). Daneben wird auch eine Beteiligung von HCMV-Infektionen an der Entwicklung der Arteriosklerose und von Restenosen der Herzkranzgefäße vermutet (Melnick *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996).

Das doppelsträngige DNA-Genom des humanen Zytomegalievirus besteht aus einer langen (UL: *unique long*) und einer kurzen (US: *unique short*) einmalig vorhandenen Genomregion. Mit etwa 230000 Basenpaaren und der Information für rund 200 Genprodukte besitzt das HCMV eines der größten, viralen Genome. Es wird angenommen, daß bis über 50 % der HCMV-Gene der Kontrolle der menschlichen Immunantwort dienen (Alcami und Koszminski 2000; Loenen *et al.*, 2001). Zu den Kontrollmechanismen zählen (i) die Hemmung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und natürlichen Killerzellen (NK), (ii) die Hemmung von Elementen des Chemokinsystems und (iii) die Stimulation der Zellproliferation, vermutlich um die Vollendung des viralen Replikationszyklus und/oder die Viruslatenz zu unterstützen (Übersichten in: Kotwal 2000; Lalani *et al.*, 2000; Murphy 2001; Ploegh 1998; Seet und McFadden 2002; Tortorella *et al.*, 2000). Insgesamt deutet die Tatsache, daß das HCMV nur in immungeschwächten Patienten schwere Erkrankungen auslöst, einen ausbalancierten Zustand zwischen den Abwehrmechanismen des gesunden Wirtes (Immunsystem) und den Überlebensstrategien des Virus an (Sweet 1999).

1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

Der Name der gegenwärtig bekannten knapp 50 humanen Chemokine und ihrer 19 Rezeptoren leitet sich von ihrer Funktion als Chemotaxis-induzierender Cytokine ab (Proudfoot *et al.*, 2003a; Yoshimura *et al.*, 1987). Ihre Klassifizierung in vier Familien erfolgt nach der Anordnung der ersten beiden Cysteinreste im Amino-Terminus der 70-125 Aminosäuren langen Chemokinliganden (Murphy *et al.*, 2000). Bei Mitgliedern der CC- oder auch β -Familie

| Rezeptor | Liganden | | Funktion/ Expression |
|--|-------------------------|---|-------------------------------------|
| | systematisch | Synonyme | |
| C (γ) Familie | | | |
| XCR1 | XCL1,2 | Lymphotactin α,β | i T, NK |
| CC (β) Familie | | | |
| CCR1 | CCL3,5,7,8,14,15,16,23 | MIP-1 α , RANTES, MCP-3,-2, HCC-1,-2,-4, MPIF-1 | i T, NK, DC, ϕ |
| CCR2 | CCL2,7,13 | MCP-1, -3, -4 | i T, NK, DC |
| CCR3 | CCL5,7,8,11,13,15,24,26 | RANTES, MCP-3, -2, Eotaxin, MCP-4, HCC-2, MPIF-2/Eotaxin-2, Eotaxin-3 | i Eos, Bas, Mast, T _{H2} |
| CCR4 | CCL17,22 | TARC, MDC | h T |
| CCR5 | CCL3,4,5 | MIP-1 α , - β , RANTES, | i T _{H1} , ϕ , DC, NK |
| CCR6 | CCL20 | MIP-3 α /LARC | h T, B, DC |
| CCR7 | CCL19,21 | ELC, SLC | h T, B, DC |
| CCR8 | CCL1,4 | I-309, MIP-1 β | i T _{H2} |
| CCR9 | CCL25 | TECK | h T, B |
| CCR10 | CCL27 | CTACK/ESkine | h T |
| CCR11 | CCL2,8,13 | MCP-1, -2, -4 | i |
| CXC (α) Familie | | | |
| CXCR1 | CXCL2,3,5,6,7,8 | GRO β , GRO γ , ENA78, GCP-2, NAP-2, IL-8 | i Neu, ϕ |
| CXCR2 | CXCL1,2,3,5,6,7,8 | GRO α , GRO β , GRO γ , ENA78, GCP-2, NAP-2, IL-8 | i Neu, ϕ , Eos |
| CXCR3 | CXCL9,10,11 | Mig, IP-10, I-TAC | i T, B |
| CXCR4 | CXCL12 | SDF-1 α/β | h T, B, ϕ , Mo, DC |
| CXCR5 | CXCL13 | BLC/BCA-1 | h B, T _{FH} |
| CXCR6 | CXCL16 | - | ? T |
| CX₃C (δ) Familie | | | |
| CX ₃ CR1 | CX ₃ CL1 | Fractalkine | i T, NK, DC, Mo, ϕ |

Tab. 1.1 Die humanen Chemokinrezeptoren, ihre Liganden und Expressionsmuster. ϕ : Makrophagen, B: B-Zellen, Bas: basophile Granulozyten, DC: dendritische Zellen, Eos: eosinophile Granulozyten, h: homöostatische Funktion, i: inflammatorische Funktion, Mast: Mastzellen, Mo: Monozyten, Neu: neutrophile Granulozyten, NK: natürliche *Killer*-Zellen, T: T-Zellen, T_{FH}: folliculäre T-Helferzellen; T_{H1}/T_{H2}: T-Helferzellen Typ1/Typ2. (nach: Murphy *et al.*, 2000; Lusso, 2000; Zlotnik und Yoshi, 2000; Moser und Loetscher, 2001; Mahalingam *et al.*, 2001; Olson und Ley, 2002)

folgen die Cysteine direkt aufeinander, bei CXC-(α -) Chemokinen sind die Cysteine durch eine und bei CX₃CL1 (δ -Chemokin) durch drei Aminosäuren getrennt. Die XCL-(γ)-Chemokine besitzen nur eines der zwei konservierten Cysteinreste. Die Funktionen der Chemokine werden von Rezeptoren vermittelt, die zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Allgemein sind die Rezeptoren spezifisch für Liganden aus einer der vier Chemokin-Familien und tragen die Bezeichnungen CCR1-11, für CC-Chemokinbindender Rezeptor 1-11 oder entsprechend CXCR1-6, CX₃CR1 oder XCR1 (Tab. 1.1).

Die Chemokinrezeptoren und ihre Liganden sind von zentraler Bedeutung für die Regulation entzündlicher Prozesse, indem sie die Wanderung und die Aktivierung von Leukozyten während einer Immunantwort steuern (Übersichten in: Luster 2002; Moser und Loetscher 2001; Murdoch und Finn 2000; Rossi und Zlotnik 2000). Funktionell wird zwischen den inflammatorischen und den homöostatischen Chemokinen und Rezeptoren unterschieden. Inflammatorische Chemokine, wie IL-8, RANTES oder MIP-1 α (CXCL8, CCL5, CCL3) werden nach Kontakt mit Pathogenen oder durch proinflammatorische Cytokine lokal freigesetzt. In der Folge wandern Leukozyten, die inflammatorische Chemokinrezeptoren tragen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, CTL, NK-Zellen) aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe ein. Dort werden über die Chemokinrezeptoren die Effektorfunktionen der Leukozyten aktiviert. Hierzu zählen beispielsweise die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Makrophagen und die Degranulierung von Granulozyten (Luther und Cyster 2001; Mackay 2001; Wong und Fish 2003). Die homöostatischen Chemokinrezeptoren sind unter anderem für die Rekrutierung der Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DC) und der unreifen T- und B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe verantwortlich, wo die T- und B-Zellen durch die DCs aktiviert werden. Darüber hinaus sind Chemokinrezeptoren an der Entwicklung und dem Aufbau sekundärer lymphatischer Organe (Finke *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002), der Wundheilung (Gillitzer und Goebeler 2001), der Organ- und Embryonalentwicklung (Doitsidou *et al.*, 2002; Knaut *et al.*, 2003; Tachibana *et al.*, 1998), der Metastasierung und Tumorbildung (Balkwill 2003) und der Angiogenese beteiligt (Bernardini *et al.*, 2003). Besonderes Interesse erlangten die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 aufgrund ihrer Funktion als Ko-Rezeptoren für das humane Immunschwächevirus (HIV). Für den Eintritt in die Zelle benötigen T-Zelllinien-infizierende HI-Viren (T-trope) eine gleichzeitige Bindung ihres Hüllproteins gp120 an CD4 und CXCR4. Monozyten/Makrophagen infizierende HI-Viren (M-trope) benötigen neben CD4 den Chemokinrezeptor CCR5. Die essentielle Bedeutung von CCR5 als HIV-Ko-Rezeptor wird durch ein natürlich auftretendes, defektes CCR5-Allel deutlich, das seinen Trägern Resistenz gegen M-trope HI-Viren verleiht (Samson *et al.*, 1996).

In den vergangenen Jahren konnten über zwei Dutzend virale Proteine identifiziert werden, durch die Viren in der Lage sind, die Aktivität der Chemokinrezeptoren und Chemokine zu hemmen oder sie für die eigene Replikation und Ausbreitung zu nutzen (Alcami 2003; Murphy 2001). Dabei können drei Hauptgruppen von Proteinen unterschieden werden (Tab. 1.2). Die viral kodierte Chemokin-homologe können als Agonisten oder Antagonisten auf

| Virus | Protein/Gen | Ligand/ Rezeptor | Funktion |
|--|-----------------------|--|--|
| Virale Chemokine | | | |
| HCMV / HHV-5 | vCXC-1/UL146 | CXCR2 | CXCR2 Agonist, Migration von Neutrophilen, Signalleitung |
| MCMV | MCK1,-2/ m131,m129 | CCR3 ? | Agonist, Migration + Signalleitung von Makrophagen, Virusausbreitung |
| KSHV / HHV-8 | vMIP-I/K6 | CCR8 | CCR8 Agonist, Th2 Migration, Angiogenese |
| | vMIP-II/K4 | CCR1,-2,-3,-5, CXCR4 | Rezeptor-Antagonist, Th2 Migration, Angiogenese |
| | vMIP-III/K4.1 | CCR4 | CCR4 Agonist, Th2 Migration, Angiogenese |
| Virale Chemokinrezeptoren | | | |
| HCMV / HHV-5 | US27 | RANTES, MCP-1 | unbekannt |
| | US28 | RANTES, MIP-1 α , -1 β , MCP-1,-3, Fractalkine | Migration von glatten Muskelzellen, Entfernung von Chemokinen aus Zellumfeld, Signalleitung, konstitutiv aktiv; Korezeptor für HIV |
| | UL33 | vermutlich CCL | Aktivierung von Signalwegen |
| | UL78 | vermutlich CCL | nicht bekannt |
| MCMV | M33 | vermutlich CCL | notwendig für Virusreplikation <i>in vivo</i> , konstitutiv aktiv |
| | M78 | vermutlich CCL | nicht bekannt |
| RCMV | R33 | vermutlich CCL | notwendig für Virusinfektion <i>in vivo</i> , konstitutiv aktiv |
| | R78 | vermutlich CCL | notwendig für Virusreplikation <i>in vivo</i> , |
| HHV-6 | U12 | RANTES, MIP-1 α , -1 β , MCP-1 | Bindung von CC-Chemokinen, Signalleitung |
| | U51 | RANTES, MCP1,3,4, Eotaxin, vMIP-II | Verminderung der RANTES-Expression |
| KSHV / HHV-8 | ORF74 | GRO α , IP-10, SDF-1 α , IL-8, ENA-78 | induziert Zellproliferation <i>in vitro</i> , Angiogenese und Tumorbildung <i>in vivo</i> , konstitutiv aktiv |
| Virale Chemokin-bindende Proteine | | | |
| Maus γ HV-68 | M3 | C-,CC-,CXC- Chemokine | sezerniert, bindet C-, CC- CXC-Chemokine, hemmt Lymphozytenmigration <i>in vivo</i> |

Tab. 1.2 Auswahl viraler Chemokine, Chemokinrezeptoren und Chemokin-bindender Proteine. CCL: CC-Chemokinligand, CMV: Zytomegalievirus, HCMV: humanes Zytomegalievirus, HHV: humanes Herpesvirus, γ HV-68: Maus γ -Herpesvirus 68, KSHV: Kaposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus, MCMV: Maus Zytomegalievirus, RCMV: Ratten Zytomegalievirus. (nach: Alcamì 2003; Beisser *et al.* 2002; Jensen *et al.* 2003; Lusso 2000; Murphy 2001; Murphy *et al.* 2000; Rosenkilde *et al.* 2001)

endogene Chemokinrezeptoren des Wirtes wirken und sind, wie das MCK-1 Molekül des murinen CMV (MCMV) und das vCXC-1 des HCMV, an der Virusausbreitung beteiligt (Fleming *et al.*, 1999; Penfold *et al.*, 1999; Saederup *et al.*, 1999). Eine zweite Gruppe von Molekülen sind sezernierte Proteine, die Chemokine binden und diese dadurch in ihrer Funktion hemmen. Das M3 Protein des Maus γ -Herpesvirus 68 ist ein Beispiel dieser Molekülgruppe (Jensen *et al.*, 2003). Schließlich wurden unter Herpesviren zahlreiche Chemokinrezeptoren beschrieben, die an Chemokine ihrer Wirte binden und die Chemotaxis und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermitteln. Ihre genauen Funktionen im Zusammenhang mit der Virusinfektion sind zur Zeit jedoch noch weitgehend unbekannt (Alcamì 2003; Ro-

senkilde *et al.*, 2001). Von den Chemokinrezeptoren M33 (MCMV) und R33 des Ratten CMV (RCMV) ist jedoch bekannt, daß sie für die Infektiosität und Replikation der Viren *in vivo* notwendig sind (Beisser *et al.*, 1998; Davis-Poynter *et al.*, 1997). Ein neuartiger Mechanismus für die *in vivo* Funktion eines viralen Chemokinrezeptors wurde kürzlich für den HCMV-kodierten US28-Rezeptor vorgeschlagen. Die US28-Expression ist für die Entfernung von inflammatorischen Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen verantwortlich (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998). Daher wurde vermutet, daß das Virus durch eine Beseitigung der Chemokine die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der viralen Infektion verhindert.

1.3 G-Protein gekoppelte Signalübertragung

1.3.1 Die Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Mit mehr als 1000 unterschiedlichen Mitgliedern bilden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) die größte bekannte Protein-Familie und machen in etwa 1-3 % der humanen Gene aus (Bockaert und Pin 1999; Marinissen und Gutkind 2001). Die Bezeichnung dieser Plasmamembran-Rezeptoren beruht auf ihrer Gemeinsamkeit über intrazelluläre Bereiche an heterotrimere G-Proteine zu binden. Obwohl zwischen den Rezeptoren keine allgemeine Sequenzhomologie besteht, zeichnen sie sich durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten aus. So besitzen alle GPCRs einen extrazellulären Amino- und einen intrazellulären Carboxyterminus, sowie sieben α -helikale Transmembrandomänen (TM), weshalb sie auch heptahelikale Rezeptoren oder 7TM-Rezeptoren genannt werden. Die Transmembrandomänen sind auf der Außenseite (E1-E3) und der zytoplasmatischen Seite (I1-I3) abwechselnd durch jeweils drei Schleifen miteinander verbunden (Abb. 1.1). Aufgrund der Schwierigkeiten komplexe Transmembranproteine zu kristallisieren, gelang es erst kürzlich für das Rhodopsin von Rindern die erste hochauflösende Kristallstruktur eines GPCRs aufzuklären (Palczewski *et al.*, 2000). Es kann gemeinsam mit Strukturdaten geringerer Auflösung für das Rhodopsin von Fröschen und Tintenfischen als Vorlage für die dreidimensionale Struktur von GPCRs dienen (Davies *et al.*, 1996; Unger *et al.*, 1997). Demnach sind die sieben Transmembrando-

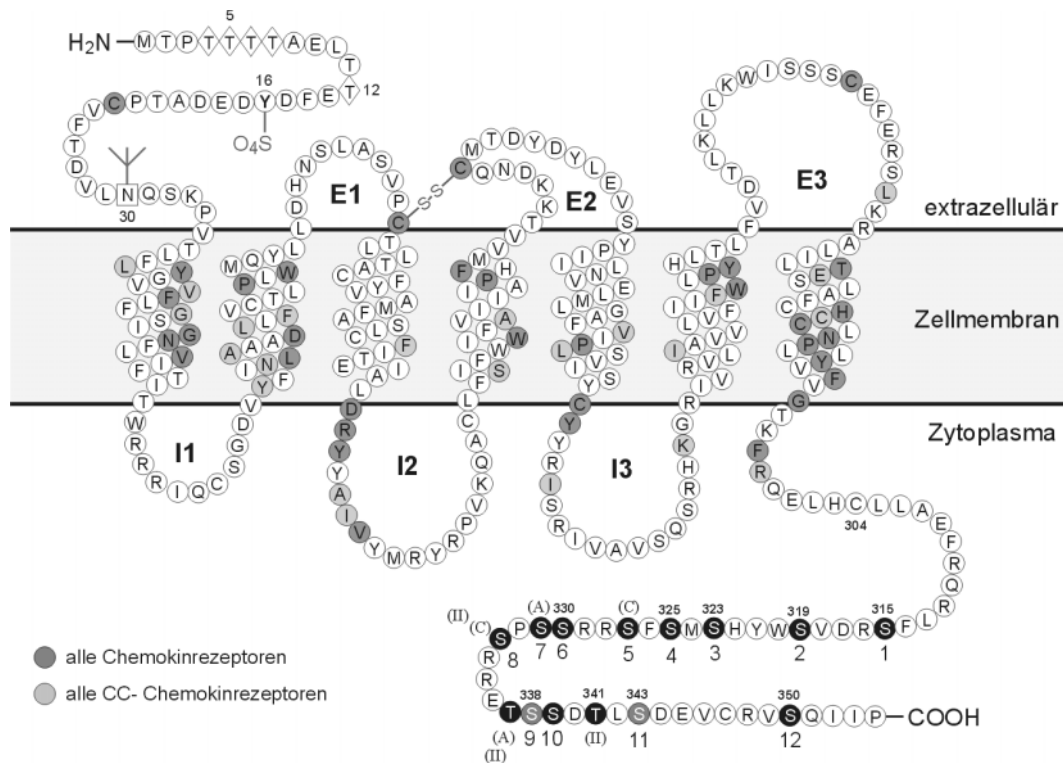


Abb. 1.1 Der HCMV-kodierte Chemokinrezeptor US28. Der virale Chemokinrezeptor US28 gehört zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Mit einer 33 %-igen Identität besitzt seine Aminosäuresequenz die größte Übereinstimmung mit dem humanen Chemokinrezeptor CCR1 (Beisser *et al.* 2002). Aminosäuren, die unter den humanen α - und β -Chemokinrezeptoren konserviert sind, wurden dunkelgrau unterlegt. Zusätzlich unter den humanen β -Chemokinrezeptoren konservierte Aminosäuren wurden hellgrau unterlegt (Baggiolini *et al.* 1997). Potentielle *O*-Glykosylierungsstellen befinden sich an den Positionen 4-7 und 12, eine potentielle *N*-Glykosylierungsstelle an Position 30 und eine potentielle Sulfatierungsstelle an Position 16. Mögliche C-terminale Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Buchstaben auf dunklem Grund gekennzeichnet, die C-terminalen Serinreste mit 1-12 nummeriert. Die Vorhersagen der *O*-Glykosylierung erfolgte mit Hilfe des „NetOGlyc 2.0 Prediction Server“, alle anderen Vorhersagen zur Membrantopologie und Proteinstruktur mit dem „HUSAR-Paket 6.0“. **E1-E3:** extrazelluläre Domänen 1-3; **I1-I3:** intrazelluläre Domänen 1-3; (C): potentielle PKC-Phosphorylierungsstelle; (A): potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle; (II): potentielle CK2-Phosphorylierungsstelle.

mänen in der extrazellulären Aufsicht entgegen den Uhrzeigersinn angeordnet, wobei die dritte TM in die Mitte der Gesamtstruktur eingerückt ist.

Innerhalb verschiedener GPCR-Familien bestehen signifikante Sequenzhomologien, aufgrund derer die Rezeptoren in drei Hauptfamilien eingeteilt werden (Gether 2000). Die Familie A umfasst die Rhodopsin-artigen Rezeptoren, die Glucagon-Rezeptor-ähnlichen bilden die Familie B und Familie C setzt sich aus Rezeptoren zusammen, die mit den metabotropen Neurotransmitter Rezeptoren verwandt sind. Familie D und E (STE2, STE3 Rezeptoren) schließen die Pheromonrezeptoren der Hefen und Familie F die vier cAMP Rezeptoren von

Dictyostelium discoideum ein. Die Rhodopsin-Familie (A) ist die mit Abstand größte GPCR-Familie. Zu ihr gehören neben Rhodopsin, den β -adrenergen und Angiotensin-Rezeptoren auch die Chemokinrezeptoren, inklusive des HCMV kodierten US28-Rezeptors. Mitglieder der Familie zeichnen sich durch eine Disulfidbrücke zwischen der ersten (E1) und der zweiten (E2) extrazellulären Schleife (s. Abb. 1.1), durch ein Glu/Asp-Arg-Tyr-(E/DRY)-Motiv an der zytoplasmatischen Seite der dritten Transmembrandomäne und durch ein oder mehrere Cysteinreste im C-Terminus aus, welche palmytiert sein können und dadurch eine vierte intrazelluläre Schleife bilden.

1.3.2 Aktivierung heterotrimerer G-Proteine

Die Aktivierung zellulärer Signalwege durch GPCRs wird durch heterotrimere G-Proteine vermittelt. Sie setzen sich aus einer α -Untereinheit und einem $\beta\gamma$ -Dimer zusammen, dessen Untereinheiten fest miteinander assoziiert sind und nur durch Denaturierung voneinander getrennt werden können. Allgemein wird ihre strukturelle und funktionelle Klassifizierung nach den $G\alpha$ -Untereinheiten in vier verschiedene Klassen, die $G\alpha_s$ -, $G\alpha_i$ -, $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12}$ -Familie, vorgenommen (Tab. 1.3). Die Aktivierungsprozesse von Rezeptor und G-Protein werden durch das sogenannte „Modell eines ternären Komplexes“ aus Ligand, Rezeptor und G-Protein beschrieben (De Lean *et al.*, 1980; Samama *et al.*, 1993). Grundlage des Modells ist die Ansicht, daß die Ligandenbindung eine Konformationsänderung des GPCRs von einer inaktiven in eine aktive Form induziert. Gestützt wird das Modell durch spektroskopische Analysen des β_2 -adrenergen Rezeptors und Rhodopsins, die nach Aktivierung eine relative Bewegung der Transmembrandomänen 3 und 6 zueinander vorhersagen (Farrens *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997). Als Folge wird eine Konformationsänderung der angrenzenden G-Protein bindenden Schleifen I2 und I3 (vergl. Abb. 1.1) angenommen. Zusammen mit einer Protonierung der Asparaginsäure im DRY-Motiv (TM3-I2-Übergang) wird die Konformationsänderung als Ursache für die Dissoziation des G-Proteins von dem Rezeptor angesehen (Gether 2000).

Das aus dem ternären Komplex entlassene G-Protein dissoziiert in eine GTP-bindende α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex, die unabhängig voneinander verschiedene Effektormoleküle der Zelle aktivieren können (Knall und Johnson 1998). Dabei ist die direkte Interaktion

| | Untereinheit | Vorkommen | Effektoren |
|--|--|-----------------------|--|
| Gα_s-Familie (Choleratoxin sensitiv) | G α_s | weit verbreitet | Adenylatzyklase \uparrow , Ca $^{2+}$ -, Na $^{+}$ -Kanäle \uparrow |
| | G α_{off} | olfaktorisches System | Adenylatzyklase \uparrow |
| Gα_i-Familie (Pertussistoxin sensitiv) | G α_{i1} | weit verbreitet | Adenylatzyklase \downarrow |
| | G α_{i2} | weit verbreitet | Ca $^{2+}$ -Kanäle \downarrow , K $^{+}$ -Kanäle \uparrow |
| | G α_{i3} | weit verbreitet | PLC \uparrow , PLA $_2$ \uparrow , PI3K γ \uparrow |
| | G $\alpha_{oA,B}$ | Gehirn | Ca $^{2+}$ -Kanäle \downarrow , K $^{+}$ -Kanäle \uparrow |
| | G $\alpha_{t1,2}$ | Retina | cGMP-Phosphodiesterase \uparrow |
| | G α_g | Geschmacksknospen | cGMP-Phosphodiesterase \uparrow |
| | G α_z | Gehirn, Nebenniere | |
| Gα_q-Familie | G α_q | weit verbreitet | PLC- β \uparrow |
| | G $\alpha_{11, 14}$ | weit verbreitet | PLC- β \uparrow |
| | G $\alpha_{15, 16}$ | hämatopoetisch | PLC- β \uparrow |
| Gα_{12}-Familie | G $\alpha_{12, 13}$ | weit verbreitet | RhoGEFs |
| Gβ-Familie | G $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ | weit verbreitet | G$\beta\gamma$-Effektoren PLC- β , PI3K, GRK, |
| | G β_5 | Retina, neuronal | |
| Gγ-Familie | G $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ | Retina / Gehirn | Src-Familien Kinasen, Rho-GTPasen, |
| | G $\gamma_4, \gamma_5, \gamma_7$ | weit verbreitet | Adenylatzyklasen, Phosduzin, |
| | G γ_6 | | Btk-Kinasen, K $^{+}$ -, Ca $^{2+}$ -, Na $^{+}$ -Kanäle |

Tab. 1.3 Die G-Proteinfamilien, ihre Verbreitung und eine Auswahl ihrer Effektoren. Choleratoxin von *Vibrio cholera* verlängert die Aktivität von G α_s -Untereinheiten. Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* hemmt spezifisch die Signalleitung über G α_i -Proteine. GRK: G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase, PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase, PLA: Phospholipase A, PLC: Phospholipase C, RhoGEF: Rho Guaninnukleotid Austauschfaktor, \uparrow : durch G-Protein aktiviert, \downarrow : durch G-Protein gehemmt (verändert nach: Dhanasekaran *et al.*, 1998; Knall und Johnson 1998; Morris und Malbon 1999)

bisher nur für einige Effektoren, wie die Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K), Phospholipase-C(PLC)- β und Adenylatzyklase gezeigt worden (Tab. 1.3; Übersichten in: Knall und Johnson 1998; Marinissen und Gutkind 2001; Morris und Malbon 1999). Der Aktivierungszyklus der G-Proteine wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit beendet. Sie bewirkt die Hydrolyse des gebundenen GTPs unter Abgabe eines Phosphatrestes zu GDP, worauf die α -Untereinheit einen inaktiven Zustand annimmt und erneut mit einem $\beta\gamma$ -Dimer zu einem heterotrimären G-Protein assoziiert. Nach der Bindung an einen inaktiven Rezeptor steht das G-Protein für einen weiteren Aktivierungszyklus zur Verfügung (Neer 1995).

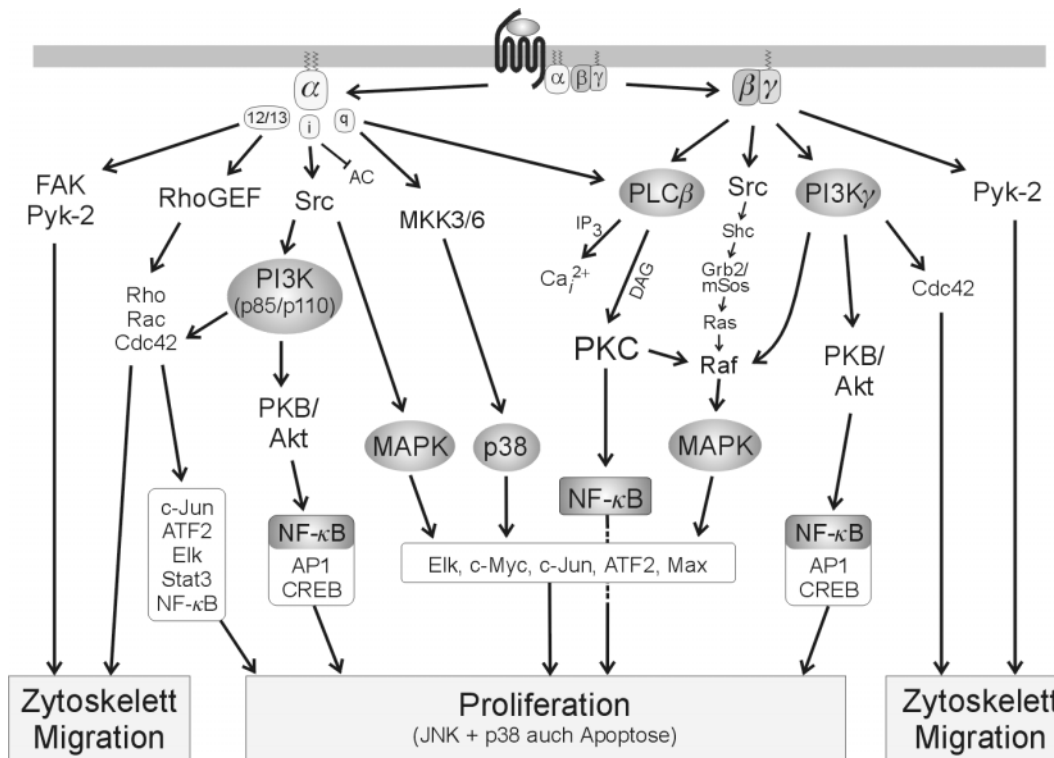


Abb. 1.2 Die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren. Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Signalkaskaden, die nach Liganden-Stimulation aktiviert werden. Schlüssel-moleküle sind grau unterlegt. Die verbundenen Pfeile stehen nur teilweise für eine direkte Interaktion der Partner. (nach: (Aznar und Lacal 2001; Curnock *et al.* 2002; Gutkind 2000; Ichijo 1999; Proudfoot *et al.* 2003a; Thelen 2001; Ye 2001)

1.3.3 Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren

Für viele humane Chemokinrezeptoren, wie CXCR1, CCR5, CXCR4, aber auch den HCMV-kodierten US28-Rezeptor ist eine Kopplung an G-Proteine der $G\alpha_i$ -Unterfamilie nachgewiesen worden (Billstrom *et al.*, 1998; Damaj *et al.*, 1996; Mellado *et al.*, 1998; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999). Neben der direkten Aktivierung von G-Protein-Effektoren ist eine große Anzahl indirekt aktivierter Moleküle aus verschiedenen Signalwegen beschrieben worden (s. Abb. 1.2; Übersichten in: Thelen 2001; Ward *et al.*, 1998; Wong und Fish 2003). Allgemein stehen die von Chemokinrezeptoren vermittelten Signalwege im Dienst der Zellmigration oder der Aktivierung und Proliferation von Zellen. Für die Vermittlung der Chemotaxis durch Chemokinrezeptoren scheinen die PI3K γ , die Rho-Familie kleiner GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) und die Fokalen Adhäsionskinasen FAK und

Pyk-2 von zentraler Bedeutung zu sein (del Pozo *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Die besondere Rolle der PI3K γ wird durch Untersuchungen an Mäusen mit fehlender PI3K γ deutlich, deren Leukozyten eine erheblich reduzierte Chemotaxis zeigten (Hirsch *et al.*, 2000).

An der Vermittlung von Zell-aktivierenden Signalen durch Chemokinrezeptoren sind die PI3K γ , die PLC- β und ihre Effektoren Proteinkinase B (PKB/Akt) beziehungsweise Proteinkinase C (PKC) beteiligt (Li *et al.*, 2000; Murga *et al.*, 1998; Sotsios *et al.*, 1999; Tilton *et al.*, 1997). Sowohl die PKC, als auch PKB sind in der Lage den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren, der an der Regulation der Zellproliferation, Schutz vor Apoptose und der Transkriptionsregulation immunregulatorischer Moleküle entscheidend mitwirkt (Downward 1998; May und Ghosh 1998). Proliferative Signale werden ebenfalls durch Mitglieder der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Familie, extrazellulär regulierte Kinasen (ERK)1/2, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38 weitergeleitet (Gutkind 2000; Kyriakis und Avruch 1996). In verschiedenen Studien konnte beispielsweise für CCR3, CCR5, CCR6, CXCR1/2 und CXCR4 eine Aktivierung von MAP-Kinasen nachgewiesen werden (Boehme *et al.*, 1999; Knall *et al.*, 1997; Kraft *et al.*, 2001; Sotsios *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1999). Ferner sind zwei G-Protein unabhängige Mechanismen der Signalleitung durch GPCRs bekannt. Zum einen ist die Aktivierung von MAPK über β -Arrestin-Moleküle bekannt, die an intrazelluläre Domänen der GPCRs binden (Pierce *et al.*, 2001). Zum anderen können die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR2 und CCR5 direkt Januskinasen binden und damit die Transkriptionsregulation über STAT-Moleküle induzieren (Mellado *et al.*, 2001).

1.3.4 Regulation der GPCR-Aktivität

Ein charakteristisches Merkmal der GPCRs ist die Regulation ihrer Aktivität durch Mechanismen der sogenannten Desensitivierung und Resensitivierung. Die Desensitivierung beschreibt eine verminderte Antwort von GPCRs bei wiederholten Stimulationen. Ausführliche Untersuchungen an β -adrenergen und Angiotensinrezeptoren als Modell-GPCRs führten zur Formulierung eines zweistufigen Modells der Desensitivierung (Übersichten in: Carman und Benovic 1998; Ferguson 2001; Lefkowitz 1998). Danach werden aktivierte GPCRs zunächst durch Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK)-Familie an intra-

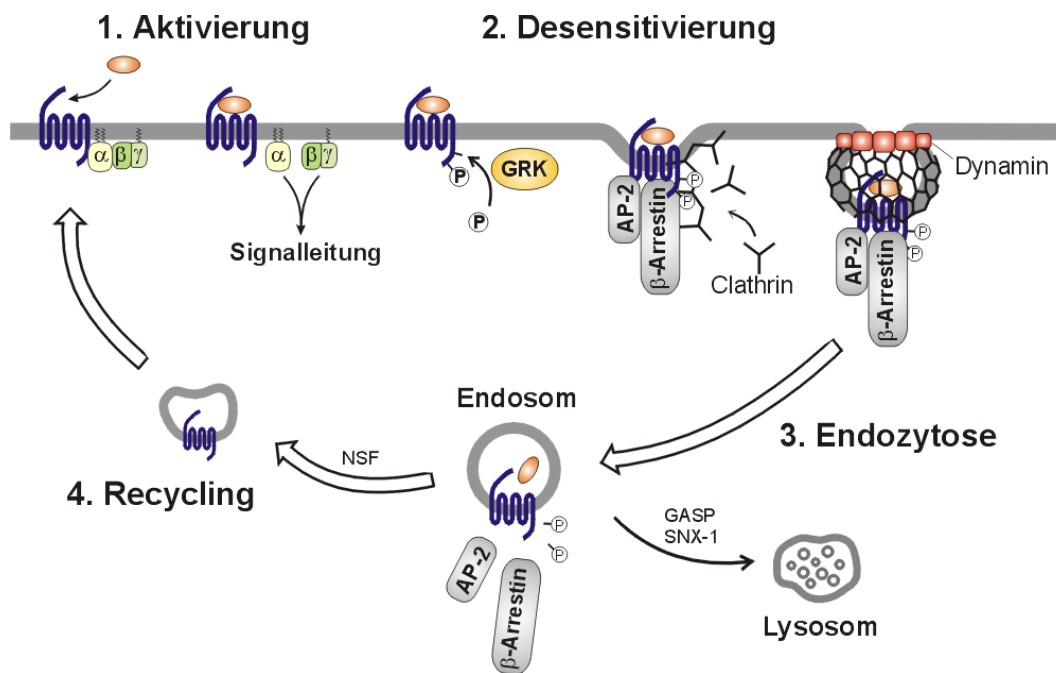


Abb. 1.3 Molekulare Mechanismen der GPCR-Internalisierung und des GPCR-Recyclings. Die Liganden-induzierte Dissoziation von G-Proteinen führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen (1.) und ermöglicht G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) die Phosphorylierung des GPCRs. Die Rezeptorphosphorylierung erleichtert die Bindung von Adaptermolekülen, welche die GPCRs von den G-Proteinen entkoppeln (2.) und gleichzeitig die Dynamin-abhängige Endozytose (3.) vermitteln. In Endosomen befindliche GPCRs können anschließend zurück an die Zelloberfläche transportiert werden (4.) oder einem lysosomalen Abbau unterliegen. **NSF**: *N-ethylmaleimide-sensitive factor*; **GASP**: *GPCR-associated sorting protein*; **SNX-1**: *sorting nexin-1*.

zellulären Domänen phosphoryliert, was in einem zweiten Schritt die Bindung von β -Arrestin ermöglicht (Abb. 1.3). Dessen Bindung bewirkt eine sterische Hinderung einer erneuten G-Protein-Kopplung und somit die Hemmung des Rezeptors (Desensitivierung). Über die Interaktion von β -Arrestin mit der β 2-Adaptin-Untereinheit des heterotetrameren Adapterprotein(AP)-2 Komplexes erfolgt die Einbindung von GPCRs in Clathrin-angereicherte Membranbereiche, sogenannte *clathrin coated pits* (Laporte *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996). Unter der Mitwirkung von Dynamin können entsprechende Membranbereiche abgeschnürt und als Clathrin-umhüllte Vesikel internalisiert werden, was zur Desensitivierung der GPCRs beiträgt. Nach der Internalisierung in Endosomen können die Rezeptor-Arrestin-Komplexe dissoziieren, die GPCRs dephosphoryliert und zurück an die Zelloberfläche transportiert werden, worauf sie für eine erneute Stimulation zur Verfügung stehen (Resensitivierung). Alternativ

können die Endozytosevesikel mit Lysosomen verschmelzen, was beispielsweise bei PAR- und Endothelinrezeptoren zu einem lysosomalen Abbau der Rezeptoren führt (Bremnes *et al.*, 2000; Trejo und Coughlin 1999). Kürzlich konnten Moleküle identifiziert werden, die mit den C-terminalen Bereichen internalisierter GPCRs interagieren und die Zielrichtung der Rezeptoren in Lysosomen (*GPCR-associated sorting protein/GASP* und *sorting nexin-1/SNX-1*) oder an die Zelloberfläche (*N-ethylmaleimide-sensitive factor/NSF*) steuern (Cong *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Whistler *et al.*, 2002). Für zahlreiche GPCRs konnte gezeigt werden, daß ihre Aktivität und Transportwege zumindest in Teilen dem Modell entsprechend reguliert werden, unter ihnen die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR2B und CXCR4 (Aragay *et al.*, 1998a; Kraft *et al.*, 2001; Signoret *et al.*, 1997). Ergänzend steigt die Anzahl von Berichten über alternative oder abgewandelte Mechanismen, wie der Arrestin- oder Clathrin-unabhängigen Internalisierung (Ferguson 2001; Nichols und Lippincott-Schwartz 2001).

Desweiteren kann die Funktion und Aktivität der GPCRs durch ko- und posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Zu diesen gehören neben der Phosphorylierung auch Glykosylierungen, Palmytylierungen und Tyrosin-Sulfatierungen. Glykosylierungen können für die hochaffine Ligandenbindung und für den Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche notwendig sein, wie für den β_2 -adrenergen und den Angiotensin 1_A Rezeptor beschrieben wurde (Deslauriers *et al.*, 1999; Rands *et al.*, 1990; Wheatley und Hawtin 1999). Tyrosinsulfatierungen sind bislang weniger untersucht, sind aber substantiell an der Ligandenbindung der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 beteiligt (Bannert *et al.*, 2001; Farzan *et al.*, 2002). Für die korrekte Phosphorylierung, Desensitivierung und Internalisierung von CCR5, β_2 -adrenergem und Lutropin Rezeptor zeigte sich eine C-terminale Palmytylierung verantwortlich (Kraft *et al.*, 2001; Moffett *et al.*, 1996; Munshi *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es Beobachtungen, daß Rezeptordimerisierungen beispielsweise die Funktion der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR2, CXCR4 und von GABA Rezeptoren regulieren (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Rodriguez-Frade *et al.*, 2001). Von besonderem pharmakologischen Interesse sind Rezeptoren mit Punktmutationen, die zu einer konstitutiv aktiven Form (*constitutively active mutants* - CAM) oder zum vollständigen Funktionsverlust eines Rezeptors führen (Parnot *et al.*, 2002). In beiden Fällen können schwere Erkrankungen des Betroffenen die Folge sein, wie eine Reihe von Krankheiten belegen, die durch defekte GPCRs hervorgerufen werden (Gerard und Rollins 2001; Spiegel 1996).

1.4 Der HCMV-kodierte β -Chemokinrezeptor US28

Die vier HCMV-Gene US27, US28, UL33 und UL78 kodieren für potentielle GPCRs mit Sequenzhomologie zu humanen Chemokinrezeptoren (Beisser *et al.*, 2002; Chee *et al.*, 1990). US28 ist in den vergangenen Jahren in das Zentrum des Interesses gerückt, da es der einzige funktionelle Rezeptor für die humanen β -Chemokine RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MCP-1 (CCL2) und MCP-3 (CCL7) ist (Bodaghi *et al.*, 1998; Gao und Murphy 1994). Zudem weist US28 neben charakteristischen Eigenschaften humaner Chemokinrezeptoren einige Besonderheiten auf, die im Zusammenhang mit der Viruspathogenität diskutiert werden (Beisser *et al.*, 2002). Nach einer Ligandenbindung vermittelt US28 einen Anstieg der zyttoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 über $\text{G}\alpha_i$ - und $\text{G}\alpha_{16}$ -abhängige Signalwege (Billstrom *et al.*, 1998; Gao und Murphy 1994). Daneben wurde die Liganden-unabhängige $\text{G}\alpha_q$ -vermittelte Aktivierung von PLC und der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) durch US28 beschrieben (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Sogenannte „konstitutiv“ aktive Chemokinrezeptoren sind für Säugetiere nicht bekannt, unter den Herpesviren aber interessanterweise weit verbreitet. Zu ihnen zählen der M33-Rezeptor des MCMV, der RCMV-kodierte R33-Rezeptor und der KSHV-kodierte Rezeptor ORF74 (Arvanitakis *et al.*, 1997; Gruijthuijsen *et al.*, 2002; Waldhoer *et al.*, 2002). Allgemein wird vermutet, daß die konstitutive Aktivität der viralen GPCRs die zelluläre Homöostase zum Vorteil der Viren verändert.

Gegenwärtig sind verschiedene Hinweise für eine Beteiligung von US28 an unterschiedlichen Erkrankungen des Menschen bekannt. Ähnlich wie der humane CCR5-Rezeptor kann US28 zusammen mit CD4 als Korezeptor für den Eintritt von HIV-1 und HIV-2 Stämmen in Zellen dienen und somit möglicherweise in den Verlauf einer AIDS-Erkrankung eingreifen (Pleskoff *et al.*, 1997). Ferner verstärkt US28 die Zellfusion, die durch Proteine des Vesikular-Stomatitis-Virus und des humanen T-Zell-Leukämie-Virus I vermittelt wird (Pleskoff *et al.*, 1998). Die Zellfusion wird möglicherweise über die hochaffine Bindung von US28 an das membranständige Chemokin Fractalkine (CX₃CL1) ermöglicht. Darüber hinaus könnte die US28-Fractalkine-Bindung auch an der Ausbreitung des HCMV im Wirtsorganismus beteiligt sein (Kledal *et al.*, 1998). In HCMV-infizierten arteriellen glatten Muskelzellen vermittelt US28 die Chemotaxis infizierter Zellen, was eine mögliche Ursache für die Beteili-

gung von HCMV-Infektionen an der Entwicklung von Arteriosklerosen und Restenosen von Herzkranzgefäßen darstellen könnte (Streblov *et al.*, 1999). Die Entfernung der inflammatorischen Chemokine RANTES und MIP-1 α aus der Umgebung HCMV-infizierter Zellen stellt eine bisher einzigartige Eigenschaft eines viral-kodierten GPCRs dar und wird als Teil des HCMV-Repertoires angesehen, die menschliche Immunantwort zum eigenen Vorteil zu manipulieren (Bodaghi *et al.*, 1998; Randolph-Habecker *et al.*, 2002).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die funktionelle Charakterisierung biochemischer und zellbiologischer Eigenschaften des vom humanen Zytomegalievirus (HCMV) kodierten Chemokinrezeptors US28. Zur Untersuchung des Rezeptors sollten monoklonale Antikörper hergestellt werden, die spezifisch das native US28-Protein erkennen. Mit ihrer Hilfe sollte die Expression des US28-Rezeptors in HCMV-infizierten Primärzellkulturen und transfizierten Zelllinien in der Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Posttranslationale Modifikationen sind häufig an der Regulation der Expression und der Signalleitungseigenschaften von Chemokinrezeptoren beteiligt. Unter Verwendung der hergestellten monoklonalen Antikörper sollte daher die Phosphorylierung, Glykosylierung und Tyrosinsulfatierung des US28-Moleküls analysiert werden. In Kombination von Mutagenesestudien mit biochemischen und zellbiologischen Methoden sollten mögliche Phosphorylierungsstellen und Kinasen des US28-Rezeptors identifiziert werden. Es wurde angestrebt die Bedeutung der posttranslationalen US28-Modifikationen für die Rezeptorexpression, zelluläre Transportwege, sowie für die Signalleitung des Rezeptors zu untersuchen.

