

## 5. Diskussion

Das Genom des humanen Zytomegalievirus besitzt mit US27, US28, UL33 und UL78 vier Gene mit Sequenzhomologien zu humanen Chemokinrezeptoren. US28 ist der einzige funktionelle Chemokinrezeptor, der nach Liganden-Stimulation und unabhängig von einer Liganden-Bindung intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Billstrom *et al.*, 1998; Casarosa *et al.* 2001). Zudem ist der Rezeptor in der Lage Chemokine aus der Umgebung infizierter Zellen zu entfernen, weshalb vermutet wurde, daß US28 an der Manipulation der menschlichen Immunabwehr durch das HCMV beteiligt ist (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die gegenwärtig einzigen US28-spezifischen monoklonalen Antikörper hergestellt werden. Mit ihrer Hilfe wurden molekulare Eigenschaften des viral kodierten Rezeptors, insbesondere posttranslationale Modifikationen analysiert und deren Bedeutung für die Rezeptorexpression, zelluläre Transportwege und die Signalleitung untersucht. So konnte die Expressionskinetik des nativen US28-Proteins in infizierten Zellen ermittelt und in transienten Überexpressionssystemen eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors nachgewiesen werden. Für die geringe Zelloberflächenexpression des US28-Moleküls war eine hohe Liganden-unabhängige Phosphorylierung des Rezeptors verantwortlich. Die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2, Proteinkinase C und Caseinkinase 2 wurden als potentielle US28-Kinasen und Serinreste des intrazellulären US28 C-Terminus als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die Phosphorylierung des US28-Rezeptors war für die effektive Rezeptorinternalisierung notwendig. Demgegenüber war sowohl die Liganden-unabhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung, als auch die Liganden-induzierte Aktivierung von MAP Kinasen unabhängig von der Rezeptorphosphorylierung. Gleichwohl scheint die US28-Phosphorylierung den Weg der MAP Kinasen Aktivierung über  $G\alpha_i$  Proteine zu regulieren.

### 5.1 US28-Phosphorylierung

Bei der transienten Expression von US28 in den Zelllinien HEK293A, COS-7 oder HeLa war überraschenderweise nur eine sehr geringe Expression des Rezeptors an der Zelloberflä-

che feststellbar (Abb. 4.7 und 4.8). Dagegen weisen humane Chemokinrezeptoren eine hohe Expression an der Zelloberfläche auf. Erst die Bindung eines Liganden führt bei diesen Rezeptoren zu einer Verminderung ihrer Oberflächenexpression. Verantwortlich für die Abnahme der Oberflächenexpression ist die Endozytose des aktivierten Rezeptors, welche bei zahlreichen GPCRs durch eine Liganden-induzierte Rezeptorphosphorylierung eingeleitet wird (Ferguson 2001). Daher wurde untersucht, ob die geringe US28-Oberflächenexpression möglicherweise mit einer Liganden-unabhängigen Rezeptorphosphorylierung verbunden ist. Hohe basale Phosphorylierungen sind lediglich für wenige Wildtypformen von GPCRs, wie dem Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptor und CXCR4, sowie für konstitutiv aktive Mutanten (CAM) des LH-Rezeptors,  $\alpha_{1B}$ -adrenergem und  $\beta_2$ -adrenergem Rezeptor bekannt (Blaukat *et al.*, 2001; Mhaouty-Kodja *et al.*, 1999; Min und Ascoli 2000; Orsini *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 1994). Erwartungsgemäß wird die basale Phosphorylierung dieser Rezeptoren durch eine Liganden-Stimulation noch weiter verstärkt.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weist US28 eine starke basale Phosphorylierung auf. Das hohe basale Niveau der Phosphorylierung wurde jedoch weder durch eine spezifische Stimulation mit den US28-Liganden RANTES oder MIP-1 $\alpha$ , noch durch eine Aktivierung der PKC durch Phorbol ester verstärkt (Abb 4.12). Eine derartige konstitutive, das heißt Liganden-unabhängige, Phosphorylierung ist für GPCRs bisher nicht beschrieben worden. Das Chemokin Fractalkine ist ein hochaffiner Ligand für US28 und wurde als ein sogenannter inverser Agonist für die konstitutive PLC und NF- $\kappa$ B Aktivierung durch US28 beschrieben (Casarosa *et al.*, 2001; Kledal *et al.*, 1998). Inverse Agonisten hemmen die Wirkung von Agonisten und sind ebenfalls in der Lage die basale Aktivität von Rezeptoren zu vermindern (Leurs *et al.*, 1998). In transient transfizierten HEK293A Zellen war Fractalkine in der Lage die basale US28-Phosphorylierung in konzentrationsabhängiger Weise abzuschwächen, so daß Fractalkine als partieller inverser Agonist bezüglich der US28-Phosphorylierung wirkte (Abb 4.13). Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß auch die basale CCR5-Phosphorylierung durch Fractalkine gehemmt wurde, obwohl Fractalkine kein Ligand für CCR5 ist. Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Fractalkine hatten für CCR5 exprimierende, stabile HEK293 Zellklone keine Fractalkine-Bindung oder Signalaktivierung durch Fractalkine ergeben (Combadiere *et al.*, 1998; Haskell *et al.*, 2000). Die Untersuchungen zeigen ferner die Abwesenheit eines endogenen Fractalkine-Rezeptors in HEK293 Zellen. Daher kann eine indirekte Wirkung Fractalkines auf die US28- und CCR5-Phosphorylierung durch die Stimulation eines möglicherweise endogen exprimierten Fractalkine Rezeptors

weitgehend ausgeschlossen werden. Über den Wirkmechanismus von Fractalkine mittels bisher nicht bekannter Rezeptoren oder unspezifische Effekte vor allem bei hohen Konzentrationen von über 50 nM kann gegenwärtig nur spekuliert werden.

Wie die Analyse von Phosphoaminosäuren ergab, wird der überwiegende Anteil der US28-Phosphorylierungsstellen von Serinresten und nur ein geringer Anteil von Threoninresten repräsentiert (Abb 4.16). Ein ähnliches Muster phosphorylierter Aminosäuren ist von dem C3a Rezeptor und Rhodopsin bekannt (Langkabel *et al.*, 1999; Ohguro *et al.*, 1993). Die Serin-/Threoninphosphorylierung stellt jedoch keinen Regelfall für GPCRs dar. Vielmehr ist die ausschließliche Phosphorylierung an Serinresten wie im Fall von CCR5, dem C5a,  $\alpha_{1B}$ -adrenergem, Parathormon, Bradykinin B<sub>2</sub> und LH-Rezeptor deutlich häufiger dokumentiert und auch die alleinige Threoninphosphorylierung ist von dem Ratten A<sub>3</sub> Adenosinrezeptor bekannt (Blaukat *et al.*, 2001; Diviani *et al.*, 1997; Giannini *et al.*, 1995; Hipkin *et al.*, 1995; Malecz *et al.*, 1998; Oppermann *et al.*, 1999; Palmer und Stiles 2000). Die wenigen Hinweise für eine mögliche Phosphorylierung von GPCRs an Tyrosinresten sind kontrovers. Für die Chemokinrezeptoren CCR2B und CCR5 wurde eine Tyrosinphosphorylierung mit den Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern 4G10 und PY20 in der monozytären Zelllinie Mono Mac 1, beziehungsweise der T-Zelllinie PM1 beobachtet (Mellado *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2001). Dem stehen detaillierte Untersuchungen an CCR5 in der basophilen Leukämie-Zelllinie RBL-2H3 gegenüber. Hier konnten weder mit Phosphoaminosäure-Analysen, noch mit spezifischen Antikörpern gegen potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen oder mit dem PY20 Antikörper Tyrosinphosphorylierungen nachgewiesen werden (Oppermann *et al.*, 1999; Pollok-Kopp *et al.*, 2003).

Mit Hilfe von Serin→Alanin Austauschmutationen konnten Serinreste zwischen Serin<sup>323</sup> und Serin<sup>350</sup> im Carboxyterminus von US28 als Phosphoakzeptoren identifiziert werden (Abb. 4.17, Abb. 1.1). Die C-terminale Lokalisation ist unter Rezeptoren mit kurzer dritter intrazellulärer Schleife (I3) und langem C-Terminus verbreitet. Rezeptoren mit langer I3 und kurzem C-Terminus, wie der  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor und der m2 Acetylcholinrezeptor, werden hingegen häufig an Aminosäureresten der I3 phosphoryliert (Eason *et al.*, 1995; Nakata *et al.*, 1994). Die Höhe der US28-Phosphorylierung hing von der Anzahl der potentiellen Phosphoakzeptorstellen der verschiedenen Ser→Ala-Varianten ab. Daraus kann eine unabhängige und nicht sequenzielle Phosphorylierung der einzelnen Positionen gefolgert werden. Ähnliche Ergebnisse sind von der GRK-abhängigen Phosphorylierung des CCR5, des  $\alpha_{1B}$ -

adrenergen und des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors bekannt (Diviani *et al.*, 1997; Eason *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist für Rhodopsin, dem N-Formylpeptid-Rezeptor, C5a-Rezeptor und Ratten A3 Adenosinrezeptor ein hierarchischer Mechanismus der Phosphorylierung einzelner Serin- und Threoninreste beschrieben (Giannini *et al.*, 1995; Ohguro *et al.*, 1993; Palmer und Stiles 2000; Prossnitz *et al.*, 1995a). Bei diesen Rezeptoren ist die initiale Phosphorylierung einer „regulatorischen“ Phosphoakzeptorstelle Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung weiterer Aminosäurereste.

## 5.2 US28 phosphorylierende Kinasen

Die Phosphorylierung von GPCRs kann allgemein durch zwei Gruppen von Kinasen erfolgen (Lefkowitz 1998). Eine Familie bilden die GPCR-spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK), die andere Gruppe sind Kinasen, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden, wie die Proteinkinase A und C (PKA, PKC). Nach ihrer Aktivierung sind letztere Kinasen in der Lage sowohl Liganden-gebundene Rezeptoren, wie auch freie Rezeptoren zu phosphorylieren. Voraussetzung ist, daß der Rezeptor eine Kinasen-spezifische Konsensussequenz für eine Phosphorylierung besitzt und diese zugänglich ist. Die Aktivierung von PKC führt zu einer Phosphorylierung zahlreicher  $G_i$ - und  $G_q$ -gekoppelter GPCRs, während der  $G_s$ -gekoppelte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor durch PKA phosphoryliert wird (Daaka *et al.*, 1997; Ferguson 2001). Von US28 wurde kürzlich die konstitutive Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über  $G_q$ -Moleküle in COS-7 Zellen beschrieben (Casarosa *et al.*, 2001). Ferner liegen die C-terminalen Serinreste Serin<sup>327</sup> und Serin<sup>333</sup> innerhalb von potentiellen PKC-Konsensussequenzen (S-R-R). Daher konnte eine PLC-abhängige Aktivierung von PKC als Ursache der konstitutiven US28-Phosphorylierung vermutet werden. Die PKC-Inhibitoren Staurosporin und Bisindolylmaleimid verminderten die basale US28-Phosphorylierung auf 59 % beziehungsweise 63 % (Abb. 4.14). Sie waren jedoch nicht in der Lage, die basale Phosphorylierung vollständig zu verhindern. Somit kann die US28-abhängige, konstitutive Aktivierung von PLC und eine folgende Aktivierung von PKC nur teilweise an der konstitutiven US28-Phosphorylierung beteiligt sein. Zusätzlich zu der PKC- und PKA-vermittelten Phosphorylierung von GPCRs ist für den m3 muscarinergen Acetylcholinrezeptor eine Phosphorylierung durch Caseinkinase 1a bekannt (Budd *et al.*, 2000; Tobin *et al.*, 1997). Im Car-

boxyterminus von US28 befinden sich mit Serin<sup>333</sup>, Threonin<sup>337</sup> und Threonin<sup>341</sup> drei Aminosäuren in Konsensussequenzen für die Caseinkinase 2 (CK2). Die spezifische Hemmung von CK2 führte zu einer Abschwächung der basalen US28-Phosphorylierung auf 68 % der nicht behandelten Kontrollzellen. In ähnlicher Weise führte die CK2-Hemmung und der Austausch potentieller CK2-Phosphorylierungsstellen des TRH-Rezeptors (*Thyrotropin-releasing Hormon*) zu einer verringerten Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors (Hanyaloglu *et al.*, 2001). Sequenzmotive für die Phosphorylierung durch Caseinkinasen sind unter den GPCRs weit verbreitet, deren mögliche Funktionen sind bisher jedoch noch kaum verstanden (Ferguson 2001). Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß verschiedene sekundäre Botenstoff-abhängige Kinasen an der Regulation der konstitutiven US28-Phosphorylierung beteiligt sind. Die Annahme wird durch die hemmende Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors AG490 auf die US28-Phosphorylierung gestützt. Wie die Analyse der Phosphoaminosäuren ergab, wurde der US28-Rezeptor jedoch nicht an Tyrosinresten phosphoryliert (Abb. 4.16). Daher scheint der Einfluß der Tyrosinkinasen auf die basale US28-Phosphorylierung auf indirektem Wege zu erfolgen.

Unter den Säugetieren umfasst die Familie der GRKs sieben bekannte Mitglieder von Serin/Threoninkinasen (Penn *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Kinasen, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden, phosphorylieren die GRKs spezifisch Liganden-gebundene oder aktivierte GPCRs. Die meisten GRKs sind ubiquitär verbreitet. Ausnahmen bilden GRK1 und GRK7, die fast ausschließlich in der Retina und GRK4, die in Hoden exprimiert wird (Pitcher *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2001). Gegenwärtig sind keine Reagenzien bekannt, die die Aktivität von GRKs aktivieren oder hemmen. Auch besitzen die GRKs keine substratspezifischen Konsensussequenzen. Daher sind Untersuchungen zur Phosphorylierung durch GRKs auf indirekte Verfahren angewiesen. Zu ihnen zählen die Rezeptorphosphorylierung durch eine Überexpression der GRKs oder die Kolo-kalisation von GRK und Rezeptor, da eine direkte Interaktion der Moleküle Voraussetzung für die Phosphorylierung ist. Ko-Immunpräzipitationen haben für die Chemokinrezeptoren CCR2B und CCR5 eine direkte Interaktion mit endogener GRK2 in Monozyten beziehungsweise RBL-2H3 Zellen nachgewiesen (Aragay *et al.*, 1998a; Oppermann *et al.*, 1999). Allgemein wird für GRK2 eine Schlüsselrolle bei der Phosphorylierung von Chemokinrezeptoren angenommen (Aragay *et al.*, 1998b). Die Koexpression von US28 mit GRK2 in HEK293A Zellen führte zu einem starken Anstieg der US28-Phosphorylierung (Abb. 4.15). Überraschenderweise wurde die GRK2-abhängige US28-Phosphorylierung nicht durch eine RANTES-Stimulation verstärkt.

Untersuchungen zahlreicher GPCRs, einschließlich von CCR2B und CCR5, führten zu der Ansicht, daß GRKs spezifisch für Liganden-gebundene oder aktivierte GPCRs sind (Bunemann und Hosey 1999). Im Gegensatz dazu scheinen der Liganden-gebundene, wie der freie US28-Rezeptor gleichermaßen als Substrat für die GRK2 zu dienen. Über die Ursachen der Liganden-unabhängigen Phosphorylierung kann auf der Basis vorhandener Daten nur spekuliert werden. Als mechanistische Grundlage der GRK/GPCR-Interaktion wird allgemein eine Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors angesehen, welche die GRK-Bindung an den Rezeptor ermöglicht (Pitcher *et al.*, 1998; Samama *et al.*, 1993). Es ist möglich, daß der unstimulierte US28-Rezeptor strukturelle Eigenschaften eines aktivierten GPCRs aufweist und daher Liganden-unabhängig durch GRK2 phosphoryliert werden kann. Ein weiterer Hinweis für eine strukturelle Grundlage der konstitutiven US28-Phosphorylierung liefern konstitutiv aktive Mutanten (CAM) verschiedener GPCRs. So werden die CAMs des LH-Rezeptors oder adrenerger Rezeptoren ebenfalls Liganden-unabhängig phosphoryliert (Mhaouty-Kodja *et al.*, 1999; Min *et al.*, 1998; Min und Ascoli 2000; Pei *et al.*, 1994). Als Ursache wurde vermutet, daß die Rezeptor-Mutationen eine Konformation begünstigt, die von spezifischen GRKs oder unspezifischen Kinasen erkannt wird (Gether 2000; Parnot *et al.*, 2002).

Insgesamt deuten vier Beobachtungen auf eine Rolle der GRK2 und möglicherweise anderer GRKs als US28-Kinase hin. Zum einen ergab die gemeinsame Überexpression von US28 und GRK2 in HEK293A Zellen (Abb. 4.15), daß US28 ein Substrat für GRK2 in intakten Zellen ist. Zweitens ist GRK2 in HEK293 Zellen endogen exprimiert (Menard *et al.*, 1997), wodurch GRK2 auch ohne Überexpression als Kinase der konstitutiven US28-Phosphorylierung in Frage kommt. Ein drittes Indiz wird durch die Lage der US28-Phosphorylierungsstellen zwischen Threonin<sup>337</sup> und Serin<sup>343</sup> im US28 Carboxyterminus geliefert. Die Phosphoakzeptorstellen sind in einer Umgebung aus sauren Glutaminsäure- (E) und Asparaginsäureresten (D) eingebettet (<sup>336</sup>ETSSDTLSDE<sup>345</sup>, vergl. Abb. 1.1). Untersuchungen an synthetischen Peptiden hatten für die GRK2 eine Präferenz für Serin- und Threoninreste ergeben, die von sauren Aminosäuren umgeben wurden (Onorato *et al.*, 1991). Weitere Unterstützung für die Bevorzugung eines sauren Umfelds durch GRK2 erbrachte die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen des N-Formylpeptid Rezeptors, C5a-Rezeptors, sowie der  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptoren (Diviani *et al.*, 1997; Eason *et al.*, 1995; Giannini *et al.*, 1995; Prossnitz *et al.*, 1995a). Allerdings scheinen Glutamin- oder Asparaginsäurereste in unmittelbarer Nachbarschaft keine unabdingbare Voraussetzung für die GRK2-

abhängige Phosphorylierung zu sein, wie das Beispiel von CCR5 zeigt (Pollok-Kopp *et al.*, 2003). Schließlich spricht für die GRK2 als US28-Kinase die Beobachtung, daß Kinasen sekundärer Botenstoffe (PKC, CK2) nur teilweise für die US28-Phosphorylierung verantwortlich gemacht werden konnten (Abb. 4.14). Der Einfluß der PKC könnte durch eine direkte Rezeptorphosphorylierung, wie bei CCR5 oder dem  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptoren, erfolgen (Diviani *et al.*, 1997; Pollok-Kopp *et al.*, 2003). Bei beiden Rezeptoren liegen die PKC-Phosphorylierungsstellen N-terminal von den GRK-Phosphorylierungsstellen. Analog dazu sind die potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen bei US28 (S<sup>327</sup>, S<sup>333</sup>) ebenfalls N-terminal des Abschnittes vermutlicher GRK-Phosphorylierungsstellen (T<sup>337</sup>-S<sup>343</sup>) vorzufinden (vergl. Abb. 1.1). Neben der direkten Wirkung bestehen Hinweise für eine indirekte Beteiligung der PKC an der GPCR-Phosphorylierung. So wurde die Phosphorylierung von GRK2 durch PKC in HEK293 Zellen beschrieben, die zu einer Aktivierung und Membrantranslokation der GRK2 führte (Chuang *et al.*, 1995; Winstel *et al.*, 1996). Interessanterweise ist die GRK2-Aktivierung durch einen sogenannten „*protein kinase cross-talk*“ auch für Src Tyrosinkinasen bekannt (Sarnago *et al.*, 1999). Ein derartiger Mechanismus könnte auch die reduzierte US28-Phosphorylierung nach Hemmung von Tyrosinkinasen der Jak-Familie durch AG490 erklären.

### 5.3 Zelluläre Lokalisation und Transportwege des US28-Rezeptors

Die zelluläre Lokalisation und Transportwege werden bei vielen GPCRs abhängig von der Rezeptorphosphorylierung gesteuert. Nach einem allgemeinen Modell der GPCR-Aktivierung induziert die Ligandenbindung neben der Signalleitung auch die Rezeptorphosphorylierung durch GRKs, welche die Interaktion mit Arrestinmolekülen ermöglicht (Übersichten in: Ferguson 2001; Perry und Lefkowitz 2002; Tsao *et al.*, 2001). Die direkte oder durch AP-2 vermittelte Bindung von  $\beta$ -Arrestin an Clathrin ermöglicht die Internalisierung über den zentralen zellulären Endozytoseweg in Clathrin-umhüllten Vesikeln (Goodman *et al.*, 1996; Krupnick *et al.*, 1997; Laporte *et al.*, 1999). Anschließend können die GPCRs in Endozytosevesikeln (Endosomen) von spezifischen Phosphatasen dephosphoryliert und über sogenannte Recycling-Endosomen zurück an die Zelloberfläche transportiert oder lysosomal abgebaut werden (vergleiche Abb. 1.3). Zu den GPCRs, bei denen eine GRK-abhängige Phosphorylierung und Arrestinbindung die Liganden-induzierte Endozytose vermittelt, gehö-

ren CCR5, CXCR1, CXCR4, der  $\beta_2$  adrenerge, Angiotensin II<sub>1A</sub> und der FSH-Rezeptor (Barlic *et al.*, 1999; Ferguson 2001; Kraft *et al.*, 2001; Orsini *et al.*, 1999). Phosphorylierungs-unabhängige Internalisierungen des  $\beta_2$  adrenergen, PTH und des Thrombin Rezeptors deuten daneben die Existenz weiterer Regulationsmechanismen an (Bouvier *et al.*, 1988; Hausdorff *et al.*, 1989; Malecz *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 1996).

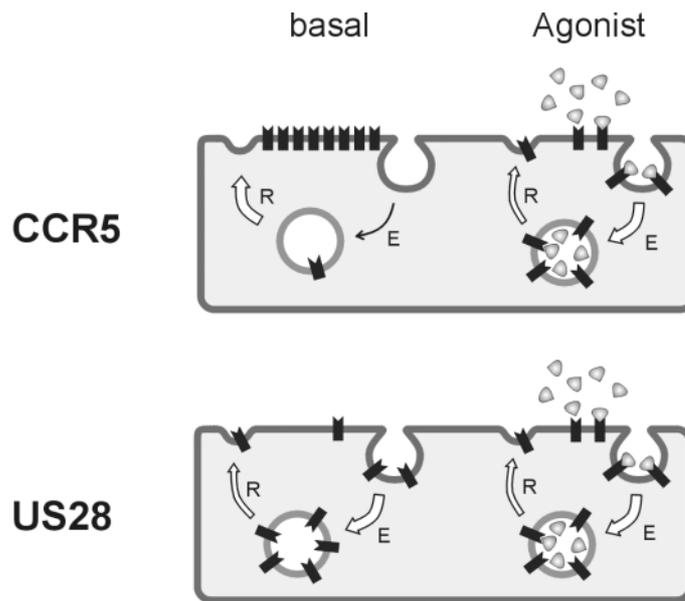
### 5.3.1 Die zelluläre Verteilung des US28-Rezeptors

Untersuchungen mit Hilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper gegen US28 zeigten, daß sowohl die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, als auch die Endozytose des Rezeptors durch seine Phosphorylierung reguliert werden. Durchflußzytometrische Analysen von transient transfizierten HEK293A, COS-7 und HeLa Zellen zeigten die überwiegend intrazelluläre Expression des US28 Rezeptors (Abb. 4.7). Mutagenesestudien, bei denen die Phosphorylierungsstellen ausgetauscht wurden, erbrachten den Nachweis, daß die geringe Oberflächenexpression von US28 durch die konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors reguliert wurde. Dabei war die Höhe der Zelloberflächenexpression umgekehrt mit der Anzahl der ausgetauschten Phosphorylierungsstellen korreliert. Lediglich 10 % der US28wt exprimierenden Zellen besaßen eine schwache Zelloberflächenexpression (Abb. 4.22). Demgegenüber war bei 54 % der US28<sup>ST/A</sup> exprimierenden Zellen eine hohe Expression an der Oberfläche nachweisbar. In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie war der US28wt in intrazellulären Vesikeln lokalisiert, die gehäuft in Kernnähe auftraten (Abb. 4.8, 4.21). Eine ähnliche subzelluläre Verteilung wurde kürzlich für chimäre US28-Moleküle in HeLa Zellen beschrieben, bei denen US28 mit dem „grün fluoreszierenden Protein“ (GFP) gekoppelt wurde (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Die US28-GFP-Proteine kolokalisierten mit Referenzmolekülen für frühe und späte Endosomen und teilweise mit lysosomalen Proteinen. Im Gegensatz zu US28 wird bei den humanen Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR4 und CCR2B die Umverteilung von der Zelloberfläche in zytoplasmatische Endosomen erst durch eine Ligandenstimulation ausgelöst (Mack *et al.*, 1998; Signoret *et al.*, 1997; Signoret *et al.*, 2000). Demnach wich das subzelluläre Verteilungsmuster des unstimulierten US28-Moleküls deutlich von dem Muster der zellulären GPCRs ab und ähnelte der endosomalen Lokalisation stimulierter Rezeptoren.

### 5.3.2. Die Internalisierung des US28-Rezeptors

Als Ursache der geringen US28-Oberflächenexpression konnte eine hohe basale Internalisierung vermutet werden, die durch die konstitutive Phosphorylierung vermittelt wurde. Zwei experimentelle Beobachtungen stützen diese Ansicht. Ein Hinweis liefert eine Untersuchung mit chimären Rezeptoren aus einem CD4-Anteil und dem US28-Molekül (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Die CD4-US28 Moleküle wurden auch ohne Liganden-Stimulation internalisiert und mittels Recycling wieder an die Oberfläche transportiert. Vergleichbare basale Internalisierungen sind ebenfalls von dem Thrombin, Cholecystokinin und dem  $\alpha_{1D}$  adrenergen Rezeptor bekannt (McCune *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 1996; Tarasova *et al.*, 1997). Zum anderen konnte in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von US28 für eine effiziente und schnelle Rezeptor-Internalisierung notwendig war. Die Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -markiertem RANTES durch US28 exprimierende Zellen folgte einer Internalisierungskinetik, wie sie für die humanen GPCRs CCR5 und CXCR4 kennzeichnend ist (Kraft *et al.*, 2001; Signoret *et al.*, 1997). Charakteristisch ist der schnelle Verlauf, bei dem nach zehn Minuten bereits 64 % und nach einer Stunde 80 % des gebundenen Liganden aufgenommen waren (Abb. 4.24). Demgegenüber war die  $^{125}\text{I}$ -RANTES Internalisierung bei der nicht phosphorylierten US28<sup>ST/A</sup>-Variante stark verlangsamt (23 % aufgenommenes  $^{125}\text{I}$ -RANTES nach 10 Minuten) und erreichte nach 60 Minuten maximal 47 %.

Zusammenfassend kann die subzelluläre Lokalisation des US28-Rezeptors durch ein Modell beschrieben werden, bei dem die Verteilung im wesentlichen das Ergebnis von Rezeptorinternalisierung und Recycling ist (Abb. 5.1). Die basalen Internalisierungsraten humaner GPCRs liegen im allgemeinen unter ihrer Recyclingrate, wodurch es zu einer Anhäufung der Rezeptoren an der Zelloberfläche kommt. Die Liganden-Stimulation führt zu einer stark erhöhten Internalisierungsrate und vermittelt dadurch eine Umverteilung von der Oberfläche in intrazelluläre Vesikel. Im Gegensatz dazu besitzt US28 bereits im basalen Zustand eine vergleichsweise hohe Internalisierungsrate, die über der Recyclingrate liegt. Daher akkumuliert US28 in endosomalen Vesikeln und ist an der Zelloberfläche nur in geringen Mengen nachweisbar. Die Abhängigkeit der effizienten Internalisierung von der Phosphorylierung deutet an, daß die konstitutive US28-Phosphorylierung Ursache der basalen Internalisierung ist und darüber die geringe Zelloberflächenexpression des nativen US28-Rezeptors steuert. Ein ähnliches Modell wurde kürzlich für den Angiotensin II AT<sub>1A</sub>-Rezeptor und konstitutiv aktive Mutanten des Rezeptors vorgeschlagen (Miserey-Lenkei *et al.*, 2002). Die Wildtypform



**Abb. 5.1 Modell der zellulären Verteilung des US28-Rezeptors.** Der humane Chemokinrezeptor CCR5 ist an der Zelloberfläche exprimiert und wird nach Ligandenbindung internalisiert. Demgegenüber besitzt der HCMV-kodierte Chemokinrezeptor US28 eine hohe basale Internalisierungsrate, wodurch er sich Ligandenunabhängig in intrazellulären Vesikeln anhäuft. Die unterschiedliche Dicke der Pfeile repräsentiert unterschiedlich hohe Raten mit denen die Endozytose (E) und das Recycling (R) der GPCRs verlaufen. Für nähere Erläuterungen siehe Text. (Verändert nach: Miserey-Lenkei *et al.*, 2002)

des Rezeptors unterliegt keiner nennenswerten basalen Endozytose und ist an der Oberfläche von Zellen lokalisiert. Die konstitutiv aktiven Mutanten wurden hingegen sehr schnell internalisiert (innerhalb von 5-10 Minuten). Da das Recycling gleichzeitig deutlich langsamer verlief (2-3 Stunden), akkumulierten die konstitutiv aktiven Mutanten in intrazellulären Vesikeln. Die Phosphorylierung der  $AT_{1A}$ -Rezeptormutanten wurde nicht untersucht, so daß nicht gesagt werden kann, ob die bei US28 festgestellte konstitutive Phosphorylierung eine allgemeine Bedeutung für die intrazelluläre Ansammlung von GPCRs haben könnte.

Ein alternativer Mechanismus für die unterschiedliche Zelloberflächenexpression von US28 und US28<sup>ST/A</sup> bestand in der Möglichkeit, daß der US28-Rezeptor nach erfolgter Endozytose lysosomal abgebaut wird, der US28<sup>ST/A</sup>-Rezeptor hingegen über den Recyclingweg an die Zelloberfläche zurückkehrt. Verschiedene Studien haben kürzlich die Bedeutung carboxy-terminaler Determinanten für die Sortierung zwischen lysosomalem Abbau und Recycling von GPCRs dokumentiert. Für die Sortierung in Lysosomen zeigte sich im Falle des Protease aktivierten Rezeptors (PAR) die C-terminale Interaktion mit dem *sorting nexin1*

(SNX1) und bei dem  $\delta$ -opioid Rezeptor (DOR) mit dem GPCR-assoziertem *sorting protein* (GASP) verantwortlich (Wang *et al.*, 2002; Whistler *et al.*, 2002). Für das schnelle Recycling des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors war andererseits die carboxyterminale Interaktion mit dem N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor (NSF) notwendig (Cong *et al.*, 2001). Nach dem Austausch der C-terminalen Bereiche von PAR (lysosomale Degradation) und dem Substanz P Rezeptor (Recycling an die Oberfläche) beschrieben die chimären Rezeptoren den Transportweg des jeweils anderen Rezeptors (Trejo und Coughlin 1999). Das regulierende Signal war mit dem C-terminalen Abschnitt übertragen worden und erwies sich als ausreichend für die Zielsteuerung der GPCRs. Der Austausch der C-terminalen Serin- und Threoninreste bei den US28 Ser/Thr $\rightarrow$ Ala Austauschvarianten könnte in ähnlicher Weise die Transportwege des Rezeptors von lysosomalem Abbau in Richtung Recycling verändert haben. Da die biologische Halbwertszeit der US28<sup>ST/A</sup>-Moleküle ( $t_{1/2} \approx 2\text{h}$ ) jedoch sogar kürzer war als die des US28-Rezeptors ( $t_{1/2} \approx 4\text{h}$ ), kann die erhöhte Oberflächenexpression der US28<sup>ST/A</sup>-Variante nicht auf einen Gewinn an Stabilität zurückgeführt werden (Abb. 4.23).

Die US28-Internalisierung war bei den nicht phosphorylierten US28-Varianten stark reduziert, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Die Internalisierung und der intrazelluläre US28-Transport scheinen demnach nicht ausschließlich durch die Rezeptorphosphorylierung reguliert zu werden. Die hier verwendeten Zelltypen (HEK293, HeLa, COS-7) und die schnelle Kinetik der Internalisierung weisen darauf hin, daß US28 wie humane GPCRs primär auf einem Clathrin-abhängigen Weg internalisiert wird. Für einzelne GPCRs wurde zusätzlich eine Internalisierung durch Caveolae vermutet (Chun *et al.*, 1994; Feron *et al.*, 1997) und bei dem Angiotensin II AT<sub>1A</sub>- und dem m2 muscarinergen Acetylcholin-Rezeptor eine Arrestin- und Clathrin-unabhängige Internalisierung beschrieben (Roseberry und Hosey 2001; Zhang *et al.*, 1996). Neben den phosphorylierten Serin- und Threoninresten der GPCRs sind zwei weitere Sequenz-Motive bekannt, die eine Clathrin-abhängige Endozytose vermitteln, Dileucin-Motive und Tyrosin-basierende Signale des FXNPXY oder Ypp $\phi$  Typs (p steht für einen polaren Aminosäurerest und  $\phi$  für einen hydrophoben) (Kirchhausen 2000). Die Bindung zwischen den Rezeptoren und Clathrin-Molekülen wird durch heterotetramere AP-2 Komplexe vermittelt. Dessen  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Adaptin Untereinheiten sind an der Clathrin-Bindung beteiligt,  $\beta$ -Arrestin-Moleküle binden ebenfalls an die  $\beta_2$ -Adaptin Untereinheit und die  $\mu_2$ -Untereinheit bindet die Tyrosin-basierenden und Dileucin-Motive (Boll *et al.*, 2002; Kirchhausen

1999; Laporte *et al.*, 2000). In den intrazellulären Schleifen 2 und 3 des US28-Moleküls befinden sich Yppφ-Motive und in der C-terminalen Domäne befindet sich an Position 305/306 ein Dileucin-Motiv, das über eine direkte AP-2 Kopplung möglicherweise zur US28-Endozytose beiträgt (vergleiche Abb. 1.1). C-terminale Dileucin-Motive waren an der Endozytose der humanen Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR4 und CCR5 beteiligt (Fan *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2001; Orsini *et al.*, 1999). Im Fall des CXCR2-Rezeptors konnte gezeigt werden, daß über das Dileucin-Motiv eine direkte Bindung an AP-2 Komplexe stattfand, die für die Clathrin-vermittelte Rezeptorendozytose und die Chemotaxis notwendig war. Die CXCR2-Internalisierung verlief in den verwendeten HEK293 Zellen unabhängig von einer β-Arrestin Bindung. In einem anderen Expressionssystem mit 3AsubE Zellen wurden hingegen Hinweise auf eine β-Arrestin-vermittelte CXCR2-Internalisierung beobachtet (Mueller *et al.*, 1997). Zelltyp-spezifische Unterschiede bestanden ebenfalls bei der Internalisierung von CXCR1 in RBL-2H3 und HEK293 Zellen, die vermutlich auf unterschiedlich hohen Niveaus an endogenem β-Arrestin basierten (Barlic *et al.*, 1999). Die Mechanismen einer Rezeptorinternalisierung scheinen demnach zumindest teilweise von den untersuchten Zelltypen und deren spezifischen Ensembles an Adaptermolekülen bestimmt zu sein. Interessanterweise deuten die Untersuchungen an CXCR1 und CXCR2 ebenfalls darauf hin, daß GPCRs mehr als nur einen bestimmten Typ von Adaptermolekül nutzen können, um ihre Internalisierung zu gewährleisten. Kürzlich wurde von einer β-Arrestin-unabhängigen, aber AP-2-abhängigen Internalisierung chimärer US28-GFP-Moleküle in Mausfibroblasten berichtet (Fraile-Ramos *et al.*, 2003). Die Beobachtung deutet eine mögliche direkte AP-2 Kopplung des US28-Moleküls über sein C-terminales Dileucin-Motiv (<sup>305</sup>LL<sup>306</sup>) an, wie es für CXCR2 beschrieben wurde. Auf diese Weise könnte die verbleibende Internalisierung des US28<sup>ST/A</sup>-Rezeptors in HEK293A Zellen erklärt werden (Abb. 4.24).

Schließlich kann auch die Palmytylierung von C-terminalen Cysteinresten an der Regulation der GPCR-Endozytose beteiligt sein. Die Palmytylierung ist eine unter GPCRs weit verbreitete posttranslationale Modifikation (Übersichten in: Bijlmakers und Marsh 2003; Morello und Bouvier 1996). Über die carboxyterminale Palmytylierung wird der C-Terminus unter Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife zusätzlich in der Plasmamembran fixiert. Es wird vermutet, daß die entstehende Rezeptorkonformation an der spezifischen Kooperation mit intrazellulären Bindungspartnern beteiligt ist. Im Unterschied zu anderen Lipidmodifikationen, wie der Myristylierung, Farnesylierung und Geranylgeranylierung, ist die Palmytylierung reversibel und kann damit die Aktivität und Lokalisation eines GPCRs in der Plasma-

membran vorübergehend ändern. Bei CCR5 führte die Aufhebung der carboxyterminalen Palmytylierung zu einer Beeinträchtigung in der Rezeptorinternalisierung, Phosphorylierung und Signalleitung (Blanpain *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2001; Percherancier *et al.*, 2001). Eine mögliche Palmytylierung des Cysteinrestes an Position 304 könnte auch bei US28 zur Regulation der Internalisierung beitragen.

### 5.3.3 Der anterograde Rezeptortransport

Die intrazelluläre Akkumulation von US28 kann zusätzlich durch ein Zurückhalten (Retention) der Moleküle auf ihrem anterograden Weg vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Zelloberfläche oder durch eine nicht korrekte Prozessierung des Rezeptors begünstigt sein. Die Retention im ER wird bei Typ I Membranproteinen (Carboxyterminus im Zytoplasma) häufig durch ein Di-Lysin-Motiv vermittelt und bei Typ II Rezeptoren (Aminoterminus im Zytoplasma) durch ein Di-Arginin-Motiv (Gomord *et al.*, 1999; Teasdale und Jackson 1996). Notwendig für die ER-Retention scheint in beiden Fällen die Lokalisation der Motive innerhalb der fünf terminalen zytoplasmatischen Aminosäuren zu sein (Nilsson und Warren 1994; Teasdale und Jackson 1996). Andererseits gibt es Hinweise, daß ähnliche Motive bei GPCRs nicht am unmittelbaren Carboxyterminus stehen müssen, um eine ER-Retention zu bewirken. Mutagenesestudien des  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)<sub>B1</sub>-Rezeptors hatten ergeben, daß der GPCR durch ein carboxyterminales Di-Arginin-Motiv (RSR) an Position -39/-37 im ER zurückgehalten wird (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Pagano *et al.*, 2001). Erst eine Dimerisierung mit dem GABA<sub>B2</sub>-Rezeptor über helikale Bereiche innerhalb des langen C-Terminus führt zu einer Maskierung des RSR-Motives und ermöglicht so den Transport eines funktionellen GABA<sub>B1</sub>/GABA<sub>B2</sub>-Heterodimers an die Zelloberfläche. Ein RXR-Motiv ist auch bei dem K<sub>ATP</sub>-Kanal als ER-Retentionssignal identifiziert worden (Zerangue *et al.*, 1999), weshalb für GPCRs und Ionenkanäle gleiche Kontrollmechanismen für die Oberflächenexpression vermutet wurden. US28 besitzt im Carboxyterminus einen RQR-Abschnitt an Position 310-312 (-43/-45). Es gibt jedoch nach Strukturanalysen (HUSAR-Paket Version 6.0) keine Anhaltspunkte für die Ausbildung von helikalen Strukturen im C-Terminus der nicht phosphorylierten US28-Varianten, die eine Homo- oder Heterodimerisierung wie im Falle der GABA-Rezeptoren erwarten ließen.

*N*-Glykosylierungen stellen eine weitere, unter GPCRs verbreitete posttranslationale Modifikation dar und sind an der korrekten Faltung, Stabilität, dem Transport und der Ligandenbindung einzelner GPCRs beteiligt (Wheatley und Hawtin 1999). Bei manchen GPCRs ist die *N*-Glykosylierung zudem für die Expression an der Zelloberfläche wichtig. Hierzu zählen der Ratten Lutropin- und Angiotensin<sub>1A</sub> Rezeptor, Hamster  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor und die humanen Rezeptoren für PAF, TSH und Dopamin D5 (Deslauriers *et al.*, 1999; Garcia Rodriguez *et al.*, 1995; Karpa *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1993; Nagayama *et al.*, 2000; Rands *et al.*, 1990). US28 besitzt im extrazellulären Aminoterminus eine Konsensussequenz für eine *N*-Glykosylierung (<sup>30</sup>NQS<sup>32</sup>). Weder mit der Hydrolyse durch glykosidische Enzyme (Endoglykosidase H), noch mit der Hemmung der *N*-glykosidischen Biosynthesewege durch Tunicamycin war eine Zuckermodifikation von US28 nachweisbar (Abb. 4.9, 4.10). Die Präsenz eines Konsensusmotives (NXS/T) stellt eher die Voraussetzung für eine *N*-Glykosylierung dar, sie muß aber nicht verwirklicht sein. Bei dem FSH-Rezeptor sind beispielsweise zwei von drei möglichen und bei dem V<sub>1a</sub> Vasopressin Rezeptor lediglich drei von vier potentiellen Positionen glykosyliert (Davis *et al.*, 1995; Wheatley und Hawtin 1999). Die Abwesenheit einer *N*-Glykosylierung deutet jedoch nicht notwendigerweise auf einen verminderten Transport zur Plasmamembran hin, wie Untersuchungen der PTH-, Vasopressin V2,  $\alpha_{1B}$ -adrenergen und Histamin H2 Rezeptoren zeigen (Bisello *et al.*, 1996; Bjorklof *et al.*, 2002; Fukushima *et al.*, 1995; Innamorati *et al.*, 1996). Ein Austausch der *N*-Glykosylierungsstellen hatte keine Auswirkung auf die Oberflächenlokalisierung dieser GPCRs. Die Möglichkeit einer *O*-Glykosylierung an aminoterminalen Threoninresten des US28-Rezeptors, wie sie von dem CCR5-Rezeptor bekannt ist (Farzan *et al.*, 1999), konnte nicht abschließend geklärt werden. Da US28 jedoch nicht *N*-glykosidisch modifiziert war, deuten vorläufige Untersuchungen eines Einbaus von [<sup>3</sup>H]Glucosamin in das US28-Molekül eine *O*-Glykosylierung des Rezeptors an (Daten nicht gezeigt). Neben der ER-Retention und Glykosylierungen können ER-Exportsignale, wie das FX<sub>3</sub>FX<sub>3</sub>F-Signal des Dopamin D1 Rezeptors oder akzessorische Proteine, wie die RAMP-Moleküle im Falle der Calcitoninrezeptor-artigen Rezeptoren, den Transport von GPCRs an die Zelloberfläche regulieren (Bermak *et al.*, 2001; McLatchie *et al.*, 1998). Ob die zuletzt genannten Mechanismen eine allgemeine Rolle in der GPCR-Superfamilie spielen oder ihre Wirkung vielmehr auf die untersuchten Rezeptoren beschränkt ist, ist gegenwärtig noch nicht bekannt.

## 5.4 Die Signalleitung des US28-Rezeptors

Rezeptorphosphorylierungen sind neben der Regulation der Internalisierung an der Regulation der Signalleitung durch GPCRs beteiligt. Nach einem allgemeinen Modell führt die Ligandenbindung zur schnellen Phosphorylierung von GPCRs, die eine Bindung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen an intrazelluläre Bereiche des Rezeptors erleichtert (Lefkowitz 1998). Aufgrund der Bindung von GRKs und  $\beta$ -Arrestin werden die signalleitenden G-Proteine sterisch an der Rezeptorbindung gehindert und dadurch die Stimulierbarkeit des GPCRs unterbunden (Desensitivierung). Die nach der Endozytose erfolgende Rezeptor-Dephosphorylierung und Ligandendissoziation in Endosomen sind Voraussetzungen für die Rückführung des GPCRs in einen inaktiven Zustand und den Rücktransport an die Zelloberfläche (Ferguson 2001; Koenig und Edwardson 1997). Danach können die Rezeptoren erneut durch ihre Liganden aktiviert werden. Die Zellen erlangen dadurch wieder ihre Stimulierbarkeit, ein Vorgang, der als Resensitivierung bezeichnet wird. Die Rezeptorphosphorylierung und -internalisierung werden dementsprechend als Regulationsmechanismen zur Signalbeendigung und der Wiederverwertung des Rezeptors in einem molekularen Recyclingweg angesehen. Es wurde daher untersucht, ob die US28-vermittelte Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch die Rezeptorphosphorylierung reguliert wird.

US28 vermittelt nach einer Stimulation mit den Liganden RANTES, MCP-3 und MIP-1 $\alpha$  den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und die Aktivierung der „Mitogen aktivierten Proteinkinase“ (MAPK) ERK2 (Billstrom *et al.*, 1998; Gao und Murphy 1994). GPCRs können MAPK über die Kopplung an G<sub>i</sub>- oder G<sub>q</sub>-Proteine aktivieren. Die intrazellulären Wege der MAPK-Aktivierung durch GPCRs sind vielfältig und umfassen die Aktivierung von PKC, Src-Tyrosinkinasen, Shc/Grb2-Komplexe, PI3 kinase  $\gamma$ , die Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor und die Fokalen Adhäsionskinasen FAK und Pyk2 (vergl. Abb. 1.2; Belcheva und Coscia 2002; Gutkind 2000). Im Falle des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors war die MAPK-Aktivierung zudem von der Serin/Threonin-Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors abhängig (Daaka *et al.*, 1998; Luttrell *et al.*, 1999). Notwendig für die MAPK-Aktivierung schien die Bildung von Proteinkomplexen mit  $\beta$ -Arrestin und MAPK in den Endosomen zu sein (Luttrell und Lefkowitz 2002; Perry und Lefkowitz 2002). Demgegenüber zeigen die hier vorgelegten Daten, daß die US28-vermittelte

MAPK-Aktivierung nicht von der Rezeptorphosphorylierung abhing. Wie erstmalig gezeigt werden konnte, führte die RANTES-Stimulation US28 exprimierender HEK293A Zellen nicht nur zu einer schnellen Aktivierung der ERK2 MAPK, sondern darüber hinaus auch zur Aktivierung der ERK1 und p38 MAPK (Abb. 4.19). Sie war mit der Aktivierung durch den humanen RANTES-Rezeptor CCR5 vergleichbar, der als Kontrolle diente. Während p38 bereits nach einer Minute aktiviert und nach zehn Minuten wieder deaktiviert war, wurden ERK1 und ERK2 nach zehn Minuten aktiviert. Wie der Wildtyp-Rezeptor war jedoch auch die nicht phosphorylierte Variante US28<sup>ST/A</sup> in der Lage ERK1 und ERK2 zu aktivieren (Abb. 4.20). Demnach war die RANTES-stimulierte MAPK-Signalleitung unabhängig von der US28-Phosphorylierung und wurde auch nicht durch die verminderte Endozytose des US28<sup>ST/A</sup>-Rezeptors (Abb. 4.24) beeinträchtigt. In ähnlicher Weise fand die Aktivierung von MAPK durch CCR5, CXCR4 und Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptor unabhängig von der Phosphorylierung der Rezeptoren statt (Blaukat *et al.*, 1999; Kraft *et al.*, 2001; Roland *et al.*, 2003).

Interessanterweise schien die US28-Phosphorylierung notwendig für die Kopplung des Rezeptors an G-Proteine des G<sub>i</sub>-Typs zu sein. Die Signalleitung von GPCRs über G<sub>i</sub>-Proteine kann durch Pertussistoxin von *Bordetella pertussis*, einem spezifischen Hemmstoff der G<sub>α<sub>i</sub></sub>-Untereinheiten, blockiert werden (Morris und Malbon 1999; Ui und Katada 1990). In HEK293A Zellen verhinderte Pertussistoxin die RANTES-induzierte Aktivierung von ERK1 und 2 durch den US28-Rezeptor, was auf eine ERK-Aktivierung über eine US28-Kopplung an G<sub>i</sub>-Proteine hinweist (Abb. 4.20). Im Gegensatz dazu war die ERK1/2-Aktivierung durch den US28<sup>ST/A</sup>-Rezeptor unempfindlich gegenüber einer Hemmung durch Pertussistoxin. Die nicht phosphorylierte US28<sup>ST/A</sup>-Variante vermochte die MAP-Kinasen demnach über einen G<sub>i</sub>-unabhängigen Weg zu aktivieren. Aufgrund der vorliegenden Daten kann über den Weg der US28<sup>ST/A</sup>-vermittelten MAPK-Signalleitung nur spekuliert werden. Zwei Indizien deuten auf die Beteiligung von G-Proteinen des G<sub>q</sub>-Typs hin. Zum einen ist die Kopplung des US28-Moleküls an G<sub>q</sub>-Proteine bekannt. In COS-7 Zellen verlief die US28-abhängige Aktivierung von PLC und NF-κB über G<sub>q</sub>-Proteine (Casarosa *et al.*, 2001). Zweitens können G<sub>q</sub>-gekoppelte ebenso wie G<sub>i</sub>-gekoppelte GPCRs effektiv die Aktivierung von MAPK induzieren (Gutkind 2000). Von dem viralen Chemokinrezeptor ORF74 des humanen Herpesvirus 8 ist bekannt, daß er MAPK sowohl über G<sub>q</sub>- als auch über G<sub>i</sub>-Moleküle aktiviert (Smit *et al.*, 2002). Allgemein ist die Signalvermittlung von GPCRs über verschiedene G-Proteine verbreitet. So koppeln die humanen Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR2 in COS-7 Zellen so-

wohl an  $G_q$ - als auch an  $G_i$ -Moleküle (Arai und Charo 1996). Häufig werden die über unterschiedliche G-Proteine verlaufenden Signalwege unabhängig voneinander und parallel aktiviert, wie bei ORF74 und Gonadotropin-*Releasing-Hormone* Rezeptor (Liu *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2002). Andererseits konnten für den Thyreotropin und den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor molekulare „Umschaltmechanismen“ für die G-Protein-Kopplung identifiziert werden (Biebermann *et al.*, 1998; Daaka *et al.*, 1997). Im Falle des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde gezeigt, daß die Änderung der G-Protein-Kopplung von  $G_s$ -Proteinen zu  $G_i$ -Proteinen durch eine PKA-abhängige Rezeptorphosphorylierung reguliert wurde. Die Unterschiede der Pertussistoxin-Hemmbarkeit der US28- und US28<sup>ST/A</sup>-vermittelten MAPK-Aktivierung deuten ein vergleichbares, Phosphorylierungs-abhängiges „Umschalten“ der Signalwege auch für den US28-Rezeptor an.

Neben der Liganden-abhängigen Signalleitung induzierte die Expression von US28 in COS-7 Zellen die konstitutive Aktivierung von Phospholipase C (PLC) sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und dem „cyclic AMP response element binding protein“ (CREB) (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Die Eigenschaft der konstitutiven Signalleitung teilt US28 mit den konstitutiv aktiven Mutanten (CAM, *constitutively active mutants*), die von zahlreichen GPCRs bekannt sind (Gether 2000; Parnot *et al.*, 2002). Bei den CAMs des LH-,  $\alpha_{1B}$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ging die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden mit einer konstitutiven Rezeptorphosphorylierung einher (Mhaouty-Kodja *et al.*, 1999; Min und Ascoli 2000; Pei *et al.*, 1994). Daher wurde untersucht, ob die US28-Phosphorylierung eine mögliche Voraussetzung für die konstitutive Aktivität ist. In einem Reporter-Assay zeigten die nicht phosphorylierten US28<sup>S1-12A</sup>- und US28<sup>ST/A</sup>-Moleküle eine dem Wildtyp-Rezeptor vergleichbare konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Abb. 4.18). Somit kann gefolgert werden, daß die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht durch die konstitutive US28-Phosphorylierung reguliert wurde. Fractalkine wurde in Bezug auf die Aktivierung von PLC und NF- $\kappa$ B als partieller inverser Agonist für US28 beschrieben, der die US28-induzierte PLC-Aktivität in COS-7 Zellen um ein Drittel verminderte (Casarosa *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnte in HEK293A Zellen weder für die Wildtypform des Rezeptors, noch für die US28<sup>S1-12A</sup>- oder US28<sup>ST/A</sup>-Varianten eine statistisch signifikante Hemmung (*t*-Test nach Student) der US28-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Fractalkine beobachtet werden (Abb. 4.18). Die abweichenden Beobachtungen können möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher

Zelllinien oder auf die Verwendung unterschiedlicher NF- $\kappa$ B-Reporterplasmide zurückgeführt werden (vergleiche Abschnitt 2.3).

Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß die carboxyterminale US28-Phosphorylierung keine strukturelle Voraussetzung für die RANTES-abhängige MAP-Kinasen und die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung darstellt. Die Phosphorylierung scheint jedoch für die spezifische Kopplung des US28-Rezeptors an  $G_i$ -Proteine notwendig zu sein. Allgemein sind an der Bindung und Aktivierung von G-Proteinen strukturelle Eigenschaften der zweiten und dritten intrazellulären Schleifen (I2, I3) der GPCRs beteiligt (Wess 1997; Wess 1998). Eine zentrale Bedeutung bei der G-Protein-Aktivierung kommt dem Liganden-induzierten Übergang von einer inaktiven in die aktive GPCR-Konformation zu. Ein Schlüsselschritt bei dem Übergang in die aktive Konformation scheint bei GPCRs der Familie A die Protonierung des Asparaginsäurerests des konservierten DRY-Motivs am Übergang von der Transmembrandomäne 3 zur I2 zu sein (Gether 2000). So führte der Austausch des Asparaginsäurerests des DRY-Motivs bei dem  $\alpha_{1B}$ -adrenergen,  $\beta_2$ -adrenergen, Histamin  $H_2$  und dem M1 muscarinergen Rezeptor zu konstitutiv aktiven Varianten der Rezeptoren (Alewijns *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1997; Mhaouty-Kodja *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu führte der Austausch des Argininrestes aus dem DRY-Motiv beispielsweise bei dem *N*-Formyl Peptidrezeptor und dem Histamin  $H_2$  Rezeptor zu inaktiven Rezeptor-Varianten (Alewijns *et al.*, 2000; Prossnitz *et al.*, 1995b). Bei US28 scheint das DRY-Motiv sowohl für die Liganden-abhängige, wie die konstitutive Signalleitung von Bedeutung zu sein. Der Austausch des Argininrestes an Position 129 führte zu einem Verlust der RANTES-abhängigen MAPK-Aktivierung und der konstitutiven Aktivierung von NF- $\kappa$ B (persönliche Mitteilung Jana Droese, MDC, Berlin, AG Dr. Armin Rehm) und PLC (Waldhoer *et al.*, 2003).

## 5.5 Die Rolle des US28-Rezeptors während einer HCMV-Infektion

Für den US28-Rezeptor werden gegenwärtig drei mögliche biologische Funktionen im Verlauf einer HCMV-Infektion diskutiert. Zum einen wird angenommen, daß die Entfernung inflammatorischer Chemokine aus dem Umfeld infizierter Zellen einen HCMV-induzierten Mechanismus zur Abwehr der menschlichen Immunantwort darstellt (Bodaghi *et al.*, 1998; Billstrom *et al.*, 1999). Zweitens ist die Aktivierung proliferativer Signalkaskaden, wie

MAPK, NF- $\kappa$ B und CREB möglicherweise für die Virusreplikation oder die Etablierung der Viruslatenz notwendig (Billstrom *et al.*, 1998; Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Schließlich könnten die US28-abhängige Zell-Migration und die durch US28-vermittelten Zell-Zell-Kontakte zur Ausbreitung des Virus im Körper beitragen (Beisser *et al.*, 2002).

Erste Hinweise auf eine Funktion von US28 als Modulator der Immunantwort wurden in Untersuchungen an HCMV-infizierten humanen Fibroblasten und Endothelzellen beschrieben. Nach einer HCMV-Infektion führte die Expression des US28-Rezeptors zu einer Entfernung der inflammatorischen Chemokine RANTES und MCP-1 aus dem Kulturüberstand infizierter Zellen (Bodaghi *et al.*, 1998; Billstrom *et al.*, 1999). Allgemein lösen inflammatorische Chemokine im Verlauf einer Infektion die Migration von T-Zellen, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen an die Orte der Infektion aus und aktivieren dort die Effektorfunktionen der Zellen (Luster 2002; Murphy *et al.*, 2000). Es wurde angenommen, daß das HCMV durch die Chemokin-Entfernung die Anlockung der Leukozyten unterbindet und dadurch eine effektive Immunantwort verhindert. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten belegen diese Ansicht in mehrfacher Hinsicht. Zum einen konnte mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern gezeigt werden, daß die Expression des US28-Rezeptors in HCMV-infizierten humanen Fibroblasten 24-48 Stunden nach der Infektion beginnt und über 96 Stunden anhält (Abb. 4.5). Damit korreliert die US28-Expression zeitlich genau mit der beschriebenen Chemokin-Entfernung durch infizierte Zellen (Bodaghi *et al.*, 1998; Billstrom *et al.*, 1999). Ferner stellt die hier untersuchte Endozytose des US28-Rezeptors einen möglichen molekularen Mechanismus der Chemokin-Entfernung aus dem Umfeld infizierter Zellen bereit (Abb. 4.24). Da die Internalisierung bei der nicht phosphorylierten US28-Variante (US28<sup>ST/A</sup>) stark vermindert war, scheint die C-terminale US28-Phosphorylierung zudem eine wichtige strukturelle Voraussetzung für die effiziente Chemokin-Entfernung zu sein. Daß die lokale Absenkung der Chemokinkonzentration eine wichtige Rolle während einer HCMV Infektion spielt, wird durch eine weitere Beobachtung gestärkt. Schaarschmidt *et al.* (1999) haben eine verminderte Transkription von Proteoglykanen in HCMV-infizierten Zellen beschrieben. Allgemein binden viele Chemokine an Proteoglykane der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche, was zu einer lokalen Erhöhung ihrer Konzentration und infolgedessen zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten führt (Ali *et al.*, 2000; Kuschert *et al.*, 1999; Proudfoot *et al.*, 2003b). Es wurde vermutet, daß sich während einer HCMV-Infektion sezernierte Chemokine an nicht infizierten, das heißt Proteoglykaneproduzierenden Zellen anreichern. HCMV-infizierte Zellen könnten demzufolge ihre Beseiti-

gung durch einwandernde Leukozyten aufgrund der verminderten Proteoglykan-Expression verhindern (Beisser *et al.*, 2002).

In HCMV-infizierten Zellen werden die MAPK ERK1, ERK2 und p38 zu frühen Zeitpunkten der Infektion (6 - 8 Stunden) aktiviert (Johnson *et al.*, 2000; Rodems und Spector 1998). Dabei konnte die MAPK-Aktivierung in dieser frühen Phase der Infektion auf eine Virus-verursachte Hemmung von zellulären Proteinphosphatasen zurückgeführt werden. Im Fall der p38 MAPK wurde jedoch eine zweite Phase der Aktivierung beschrieben, die 24-48 Stunden nach der Infektion humaner Lungenfibroblasten begann und bis mindestens 72 Stunden nach der Infektion anhielt (Johnson *et al.*, 2000). Wie gezeigt wurde, führte die Stimulation des US28-Rezeptors mit RANTES zu einer schnellen Aktivierung der p38 MAPK (Abb. 4.19). Aufgrund von Beobachtungen, nach denen HCMV-infizierte Zellen die Chemokine RANTES und MCP-1 sezernieren (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998; Michelson *et al.*, 1997), kann spekuliert werden, ob die späte p38-Aktivierung auf eine autokrine Stimulation des US28-Rezeptors in HCMV-infizierten Zellen zurückgeführt werden kann. Die Möglichkeit wird durch das zeitliche Zusammentreffen der US28-Expression (Abb. 4.5) und der p38-Aktivierung (Johnson *et al.*, 2000) im Zeitraum von etwa 48-96 Stunden nach der HCMV-Infektion gestützt. In HCMV-infizierten Zellen wurde eine p38-abhängige Aktivierung des Hitzeschockproteins (HSP) 27 beobachtet (Johnson *et al.*, 2000). Das HSP27 ist an dem Schutz von Zellen vor Apoptose durch zellulären Stress beteiligt (Ciocca *et al.*, 1993; Georgopoulos und Welch 1993). Daher wurde vermutet, daß die Aktivierung von p38 dazu beiträgt die vollständige Virusreplikation zu ermöglichen, bevor die Wirtszelle im Zuge des lytischen Zyklus abstirbt. Allgemein werden in HCMV-infizierten Zellen zahlreiche Signalwege mit proliferativem Charakter aktiviert, die für die Vollendung der Virusreplikation oder die Etablierung der Latenz notwendig sind (Fortunato *et al.*, 2000). Unter ihnen sind neben der p38 MAPK auch die MAPK ERK1, -2 und NF- $\kappa$ B (Johnson *et al.*, 2000; Rodems und Spector 1998; Shibutani *et al.*, 1997).

Alle bisher vermuteten Funktionen des US28-Rezeptors wurden von *in vitro* Versuchen abgeleitet, da für die Untersuchung der *in vivo* Funktionen gegenwärtig keine geeigneten Tiermodelle zur Verfügung stehen (Übersichten in: Beisser *et al.*, 2002; Holst *et al.*, 2003; Vink *et al.*, 2001). Zudem besitzen die Zytomegalieviren der Maus (MCMV) und der Ratte (RCMV) keine US28-homologen Chemokinrezeptoren und können somit nicht als Modell für die Rolle des US28-Rezeptors während einer HCMV-Infektion des Menschen dienen. Zusammenfassend beschreiben die in dieser Arbeit vorgelegten Daten die molekularen Mecha-

nismen US28-vermittelter Funktionen. Insbesondere stellt die Phosphorylierungs-abhängige RANTES-Internalisierung einen Mechanismus zur Entfernung inflammatorischer Chemokine dar und dient damit möglicherweise dem Schutz infizierter Zellen vor den Effektorzellen des Immunsystems. Des weiteren kann die Aktivierung proliferativer Signalwege die Lebensdauer infizierter Zellen verlängern und somit einen notwendigen Beitrag zur effizienten Virusreplikation und der Etablierung der Virus-Persistenz leisten.

