

G protein-coupled receptors encoded by members of the cytomegalovirus UL33 gene family : characteristics of and structural requirements for constitutive signaling

Citation for published version (APA):

Gruijthuisen, Y. K. (2004). *G protein-coupled receptors encoded by members of the cytomegalovirus UL33 gene family : characteristics of and structural requirements for constitutive signaling*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20040408yg>

Document status and date:

Published: 01/01/2004

DOI:

[10.26481/dis.20040408yg](https://doi.org/10.26481/dis.20040408yg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2025

CHAPTER 6

Summary and General Discussion
Samenvatting en Algehele Discussie

Summary and General Discussion

Like all herpesviruses, CMVs have very large genomes and exhibit complex patterns of gene expression. The vast majority of herpesvirus genes produce unspliced transcripts of which the expression is regulated by promoter-control regions upstream of the transcription initiation site. Although nested transcripts which share either polyadenylation sites or cap sites are commonly found, spliced herpesvirus transcripts are rare. One of the few herpesvirus genes that expresses spliced transcripts is HSV-1 UL15 (8, 9). This gene is conserved among all herpesvirus genomes sequenced to date.

In the first chapter of this thesis, we demonstrated that the RCMV R89 counterpart of HSV-1 UL15 is expressed as a spliced transcript. Moreover, similar to HSV-1 UL15, the R89 gene contains additional genes within its intron sequence which are transcribed as mono- and polycistronic mRNAs in the direction opposite to that of R89 (Chapter 1). Among these RCMV genes are R93 and R94, which represent highly conserved herpesvirus genes as well (Chapter 1). The conserved nature of the R89, R93 and R94 genes implies that these genes play a crucial role in herpesvirus biology. In agreement with this notion, the HSV-1 homologs of UL15 as well as UL16 and UL17, which represent the homologs of R93 and R94, respectively, have been demonstrated to be of importance for virus replication (1, 2, 19, 20, 22, 23, 24, 29). In light of the similarities in sequences and genomic structure, it is anticipated that the RCMV R89, R93 and R94 genes serve similar, essential functions.

During herpesvirus replication, the viral DNA is synthesized at intranuclear sites as concatemers, which consist of long continuous chains of head to tail-linked viral genomes. Following the synthesis of concatemers, unit-length viral genomes are packaged into preformed capsids and subsequently cleaved from the concatemer by the herpesvirus-encoded terminase proteins. Mature nucleocapsids then proceed to become so-called viral assemblons, which constitute intracellular sites of advanced virion assembly. The small tegument/capsid-associated proteins encoded by members of the HSV-1 UL16 gene family, probably play a supplemental role during these latter stages of virion maturation. They facilitate the co-localization of various virion constituents, like nucleocapsids and tegument proteins, at the viral assemblons (2, 14, 17, 18, 33). The tegument associated-proteins encoded by members of the HSV-1 UL17 gene family, are essential at the earlier stages of nucleocapsid maturation. They target the major and minor capsid proteins as well as preformed capsids, to sites of viral DNA replication, cleavage and packaging (22, 23, 29). The HCMV UL89-encoded protein forms, together with the HCMV UL56-encoded protein, the herpesviral terminase. Both terminase subunits are responsible for the ATP-dependent translocation of the replicated DNA into pre-assembled capsids and the final cleavage of the viral genome from the concatemers (3, 4, 13, 26, 27, 31).

Since inhibitors of the terminase subunits would prevent the formation of new virions through an early block of capsid maturation, the proteins encoded by HSV-1 UL15 and HCMV UL89, are regarded as attractive anti-viral targets. Moreover, inhibitors of these terminase subunits are predicted to be safe and

highly selective therapeutic agents, since mammalian cell DNA replication does not involve the (sequence specific) cleavage of concatemeric DNA. At present, two sorts of such novel anti-HCMV agents have been developed. Both the benzimidazole ribonucleoside analogs and the BAY 38-466 compound appear to effectively inhibit HCMV DNA maturation through the involvement of the UL89 and UL56 gene products (5, 7, 11, 12, 13, 15, 21, 30, 31). However, it is not clear how these compounds affect the UL89- and UL56-encoded proteins. Furthermore, little is known about the putative interference of these compounds, either with each other or with the more traditional anti-CMV agents like foscarnet and ganciclovir, during combination therapies (10). Moreover, little information is currently available concerning the development of (multi)drug-resistance during treatment with these compounds *in vivo*. Since the RCMV R89-encoded protein shows 64.3% overall identity with the HCMV UL89-encoded protein (Chapter 1), the RCMV/rat model may be used to further elucidate the precise mechanism of action of these two novel classes of anti-viral agents, both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the RCMV/rat model may aid the ongoing research addressing the problems of (multidrug) resistance and interference with respect to benzimidazole, BAY 38-466 and more traditional anti-herpesvirus agents *in vivo*.

The herpesvirus-encoded GPCRs might represent yet another group of attractive anti-viral targets. As reviewed in Chapter 2, both the gamma- and betaherpesvirus genomes were found to comprise genes encoding GPCRs. Some of these genes are conserved among the genomes of all members of a specific herpesvirus subfamily. These include the ORF74-like genes from the rhadinoviruses, the BILF1-like genes from the lymphocryptoviruses and both the UL33- and UL78-like genes of the betaherpesviruses. By contrast, some other herpesvirus GPCR-encoding genes, such as HCMV US28 and US27, are only present on the genomes of closely related herpesvirus species.

By using recombinant, knock-out virus strains, it has been demonstrated that the GPCR-encoding members of the rhadinovirus ORF74 gene family, as well as the betaherpesvirus UL78 and UL33 families, are of vital importance for the establishment of productive infections (Chapter 2). This illustrates that the GPCRs encoded by these genes might indeed represent interesting pharmaceutical targets to prevent or control the development of herpesvirus-induced disease. In the past, GPCRs have already been proven to be successful drug targets, due to their ideal localization on cellular membranes and their ability to modulate defined (intra)cellular responses through interaction with highly selective ligands. At present, GPCRs belong to the most favored group of drug targets of pharmaceutical industries and approximately 50 % of the currently marketed drugs interact with these proteins.

As mentioned in the introduction of this thesis, herpesviruses can establish life-long persisting infections in otherwise healthy hosts. This indicates that herpesvirus replication, persistence and dissemination may take place in the face of a normal functioning immune system, which implies that herpesviruses are well-adapted to the antiviral strategies of this immune system. In this respect it is interesting to note that most of the herpesvirus-encoded GPCRs were found to show high levels of sequence similarity with members of the GPCR subfamily of

chemokine receptors (Chapter 2). Chemokine receptors are essential for the orchestration of cell-mediated immune responses. In accordance with the sequence similarities between the herpesvirus GPCRs and chemokine receptors, most of the currently characterized herpesvirus GPCRs were found to bind and respond to chemokines, either as broad spectrum or highly selective receptors (Chapter 2). These receptors include the KSHV ORF74-, HCMV US28-, HHV-7 U12-, HHV-6 U12 and U51-encoded GPCRs. It is tempting to speculate that these herpesvirus receptors function by subverting the host's immune defenses through interference with chemokine signaling pathways.

In addition to chemokine-mediated signaling, several herpesvirus GPCRs, including the KSHV ORF74- and HCMV US28-encoded receptors, were found to signal in a ligand-independent, constitutive fashion. This constitutive activity could be modulated either positively or negatively through binding of their respective chemokine ligands, which thus acted as agonists and inverse agonists, respectively. At present, the biological significance of constitutive signaling by the herpesvirus GPCRs still remains enigmatic. Since constitutive signaling by various endogenous mammalian GPCR mutants has been related to a variety of pathophysiological conditions (28), it has been suggested that constitutive signaling by herpesvirus GPCRs may likewise be involved in the development of herpesvirus-induced pathologies. Some of the GPCRs encoded by the ORF74-like genes of the oncogenic rhadinoviruses were found to possess tumorigenic properties. In addition, their ability to induce tumor formation was shown to be dependent on their constitutive as well as ligand-dependent signaling activities. However, none of the other identified (constitutively active) herpesvirus GPCRs have yet been directly associated with specific manifestations of herpesvirus-associated diseases. Furthermore, it is still unclear how the intrinsic properties of these receptors contribute to the pathogenesis of viral infection.

Since the majority of the herpesvirus-encoded GPCRs was still uncharacterized at the time the work presented in this thesis was initiated, we set out to investigate the putative GPCRs encoded by members of the betaherpesvirus UL33-like gene family. As described in Chapters 3 and 4, the RCMV R33 and HCMV UL33 genes were found to encode functional GPCRs that signal in a ligand-independent, constitutive fashion. The R33- and UL33-encoded proteins, pR33 and pUL33, respectively, were found to interact with G proteins of various classes and to constitutively modulate multiple intracellular signal transduction cascades. Both receptors were demonstrated to stimulate PLC through the activation of the G proteins of the $G_{q/11}$ class. In addition, each receptor was shown to regulate CRE-driven transcription. Interestingly, pR33 and pUL33 were found to modulate this activity in a different manner. While RCMV pR33 induced a downregulation, HCMV pUL33 invoked an upregulation of CRE-mediated transcription. This inhibitory activity of pR33 is mediated by constitutive activation of G proteins of the $G_{i/o}$ class. Like pR33, pUL33 activates the inhibitory $G_{i/o}$ proteins. In addition, pUL33 stimulates G_s - and RhoA-p38MAPK-mediated signaling pathways that are not activated by pR33. Therefore, the netto result of constitutive pUL33-mediated signaling is a strong upregulation of CRE-driven transcription.

Like the other members of the betaherpesvirus pUL33 receptor family, pR33 and pUL33 share the highest level of similarity with CC chemokine receptors (CCRs). In correspondence with this similarity to CCRs, both the HHV-6B and HHV-7 counterparts of HCMV pUL33 (pU12) were found to bind and respond to CC chemokines (CCLs). HHV-6B was reported to be a broad spectrum CCR and to mediate calcium mobilization upon binding of RANTES, Mip-1 α , Mip-1 β and MCP-1 (CCL5, CCL3, CCL4 and CCL2, respectively). However, RANTES-binding was not observed for pR33 and pUL33. In addition, neither RANTES nor other tested chemokines were able to modulate constitutive signaling by either receptor (Chapters 3 and 4). This indicated that, in contrast to HHV-6B pU12, pR33 and pUL33 may represent highly selective chemokine receptors. Interestingly, HHV-7 pU12 was recently shown to be a highly selective receptor, responding exclusively to CCL19 (Mip-3 β) (16). It is not yet known whether the other receptors from the pUL33 family are similarly able to interact with CCL19. Hitherto, however, no interaction of this or any other (chemokine) ligand has been reported for pR33 and pUL33. Both receptors are therefore still regarded as orphan GPCRs. One of the main challenges of future research is to 'de-orphanize' the CMV-encoded, pUL33-like GPCRs, and to establish whether these GPCRs represent true chemokine receptors.

In order to delineate the structural requirements for the constitutive behavior of pR33 on one hand, and to identify the structural basis for the differential constitutive signaling by pR33 and pUL33 on the other, mutagenesis studies were performed (Chapters 4 and 5). Part of these studies focused on the conserved DRY motif. This motif is found in most GPCRs analysed to date, and is known to be important for the coupling to and activation of G proteins (32). Although pUL33 possesses a 'normal' DRY motif, pR33 contains an NRY motif. It has been noted that mutation of the aspartic acid residue (D) of the DRY motif in some GPCRs, results in a constitutively active receptor (6, 25, 32). Nevertheless, the wild type signaling characteristics of the pR33 mutant containing a 'regular' DRY motif (N¹³⁰D) showed that the neutral asparagine residue (N) in the pR33 motif is not critical for its constitutive signaling and does not represent a structural determinant for differential signaling by pR33 and pUL33. Interestingly, we did find the asparagine of the NRY motif of pR33 to be critical for the constitutive activation of G proteins of the G_{q/11} class. By contrast, this residue was not essential for the pR33-mediated activation of the G proteins of the G_{i/o} class. The arginine residue (R) within the DRY or NRY motif, is the best conserved GPCR residue, and was found to be critical for G protein-coupling (32). In line with this, we found the pR33 mutant in which the arginine residue (R) of the NRY motif was mutated, was unable to modulate either PLC or CRE activation.

To further characterize which other intracellular regions of pR33 and pUL33 might be of structural importance for the (different) constitutive signaling profiles of these receptors, each of the intracellular domains were exchanged between pR33 and pUL33 (Chapters 4 and 5). Surprisingly, none of the previously identified differential constitutive signaling characteristics of pR33 or pUL33 could be specifically eliminated from one receptor nor transferred from one receptor to the other by substitution of a single intracellular loop. It was noted, however, that

the C-terminal tail of pUL33 might contain several domains that could be involved in the stimulation of $G_{i/o}$ proteins. By contrast, the C terminus of pR33 seemed to lack these domains, since the pUL33 domains could not be substituted by the (nonconserved) sequence of the pR33 C-terminal tail. Taken together, these data imply that the constitutive signaling characteristics of pR33 and pUL33 are the consequence of the concerted actions of multiple domains in the intracellular and perhaps also transmembrane regions.

Through the pR33 and pUL33 C-termini exchange studies, a membrane proximal region in the pR33 C terminus was identified that might govern pR33 cell surface expression (Chapter 4). This membrane proximal KRF motif is conserved between pR33 and pM33, but is absent from pUL33. A similarly located KRF motif was reported to be involved in proper expression of CCR5 on the cell surface. Nevertheless, a direct involvement of the KRF motif in cell surface expression of pR33 or pM33 has not yet been confirmed. A role in proper cell surface expression of pR33, however, was established for two consecutive arginine residues (RR) in the more distal part of the C terminus, as demonstrated by the analysis of point mutants in this dipeptide motif (Chapter 5). In light of the conserved nature of these residues among the highly divergent C-terminal sequences of the betaherpesvirus pR33 counterparts, it is likely that the RR motif of the other pUL33 family members plays a similar role as that of pR33.

The findings regarding the constitutive signaling properties, the regulation of subcellular expression and the differences between closely related CMV receptors with respect to these properties, are intriguing. Nevertheless, it remains to be investigated whether these *in vitro* activities reflect functional properties of pR33 and pUL33 that are of biological significance *in vivo*. Due to the strict species-specificity of CMVs as well as ethical considerations, it is difficult to evaluate the putative functions of the human herpesvirus-encoded GPCRs, like pUL33, *in vivo*. In addition, it is not useful to investigate the role of these proteins during *in vitro* infections, since these proteins are, in general, dispensable for viral replication in cell culture. Therefore, future studies aimed at further characterization of these and other herpesvirus-encoded receptors as well as the identification and evaluation of putative anti-viral compounds targeted at these GPCRs, will be confronted by the need to develop new *in vivo* assays. In the case of the HCMV pUL33 receptor, it could be envisaged that a recombinant RCMV strain which expresses pUL33 instead of pR33 may be very useful for *in vivo* (rat) studies. Another approach has been reported for the KSHV GPCR, which was expressed in transgenic mice (Chapter 2). Of course, each of these surrogate models suffer from specific shortcomings, such as the putative lack of proper ligands for a specific GPCR expressed by a transgene. Regardless, *in vitro* assays have proven to be and will remain to be of considerable value to increase our knowledge on the signaling characteristics, pharmacological profiles and structure-function relationships of these receptors.

Samenvatting en algehele discussie

Net als alle andere herpesvirussen, bezitten cytomegalovirussen een zeer groot genoom en vertonen een gecompliceerd gen expressiepatroon. De meeste herpesvirusgenen vormen ongesplitste transcripten waarvan de expressie gereguleerd wordt door direct stroomopwaarts van de transcriptiestart gelegen promotor-controle complexen. Overlappende transcripten worden ook gevonden en deze delen meestal of het poly-adenylatie- of het cappingsignaal. Gesplitste herpesvirustranscripten daarentegen zijn zeldzaam. Een van de weinige herpesvirusgenen dat als een gesplitst transcript tot expressie komt is het herpes simplex virus type 1 (HSV-1) UL15 gen (8, 9). Dit gen is geconserveerd op/voor alle herpesvirusgenomen waarvan de basevolgorden op dit moment bepaald zijn.

In het eerste hoofdstuk van deze thesis, hebben we aangetoond dat het aan HSV-1 UL15 verwante gen van rat CMV, het R89 gen, ook tot expressie komt als een gesplitst transcript. Bovendien bevat het R89 gen, evenals het HSV-1 UL15 gen, in zijn intronsequentie additionele genen, die in de aan R89-tegengestelde richting, als mono- en polycistronen mRNAs worden getranscribeerd (Hoofdstuk 1). Twee van deze genen, R93 en R94, vertegenwoordigen eveneens sterk geconserveerde herpesvirus genen (Hoofdstuk 1). De hoge mate van geconserveerbaarheid van de R89, R93 en R94 genen in de herpesvirusfamilie, geeft aan dat deze genen een cruciale rol vervullen in de biologie van herpesvirussen. In overeenstemming met dit idee is gevonden dat de HSV UL15, UL16 en UL17 genen, die homoloog zijn aan respectievelijk de RCMV R89, R94 en R93 genen, van belang zijn voor virus replicatie (1, 2, 19, 20, 22, 23, 24, 29). Het is te verwachten dat in verband met de overeenkomsten in sequentie en genomische structuur van deze genen, de RCMV R89, R93 en R94 genen vergelijkbare, essentiële functies vervullen.

Tijdens herpesvirusreplicatie wordt het virale DNA in de celkern gesynthetiseerd in de vorm van een concatemeer. Een concatemeer bestaat uit een lange continue aaneenschakeling van kop-staart gekoppelde virale genomen. Na synthese worden de afzonderlijke virale genomen verpakt in voorgevormde capsiden en uit de concatemeer geknipt door de zogenaamde herpesvirus terminases. De zo ontstane nucleocapsiden verwijderen zich van de plek van de nucleocapsidenmaturatie en verworden tot virale-assemblen. Deze assemblen vormen de intracellulaire centra waar de verdere virion assemblage plaatsvindt. De door de leden van de HSV-1 UL16 genfamilie gecodeerde, kleine tegument-/capside geassocieerde eiwitten, spelen waarschijnlijk een aanvullende rol tijdens deze laatste fasen van de virion maturatie. Deze eiwitten maken het namelijk mogelijk dat de verschillende virion bestanddelen, zoals de nucleocapsiden en tegument eiwitten, allemaal in de virale assemblen colocaliseren (2, 14, 17, 18, 33). De tegument geassocieerde eiwitten die door de leden van de HSV-1 UL17 genfamilie worden gecodeerd, zijn van essentieel belang tijdens eerdere stadia van de nucleocapside maturatie. Zij zorgen ervoor dat de major en minor capside eiwitten, zich net als de voorgevormde capsiden verzamelen op de locaties waar replicatie, restrictie en verpakking van het virale DNA plaatsvindt (22, 23, 29). Het HCMV UL89-gecodeerde eiwit vormt, tezamen met het HCMV UL56 gecodeerde

eiwit, het herpesvirus terminase. Deze beide terminase subunits zijn verantwoordelijk voor de ATP-afhankelijke translocatie van het gerepliceerde DNA in voorgevormende capsiden en het afsplitsen van de afzonderlijke virale genomen uit de concatemeer (3, 4, 13, 26, 27, 31).

De eiwitten die worden gecodeerd door HSV-1 UL15 en HCMV UL89, worden gezien als aantrekkelijke anti-virale aangrijpingspunten. Door een voortijdige blokkering van capsid maturatie zouden de eventuele remmers van herpesvirus terminases namelijk de vorming van nieuwe virionen kunnen voorkomen. Bovendien wordt verwacht dat zulke terminase remmers, veilige en zeer selectieve agentia zullen zijn omdat bij de DNA replicatie in zoogdiercellen het knippen van concatemerisch DNA niet voorkomt. Momenteel zijn twee van dit soort nieuwe anti-HCMV agentia ontwikkeld. Dit zijn de benzimidazol ribonucleosiden analogen en de stof BAY 38-466, en zij blijken in staat de HCMV DNA maturatie effectief te remmen door een interactie met de UL89 en UL56 genproducten (5, 7, 11, 12, 13, 15, 21, 30, 31). Het is echter nog onduidelijk hoe deze middelen de UL89 en UL56 gecodeerde eiwitten beïnvloeden. Ook is er nog slechts weining bekend over de mogelijke wisselwerking van deze stoffen met elkaar, of met de meer traditionele anti-CMV middelen zoals foscarnet en gancyclovir, wanneer deze tijdens combinatie therapieën met elkaar gebruikt zouden worden (10). Bovendien is er momenteel te weinig informatie beschikbaar met betrekking tot de ontwikkeling van (meervoudige) resistentie tegen deze agentia gedurende de behandeling met deze middelen *in vivo*. Aangezien de aminozuursequentie van het R89 gecodeerde eiwit voor 64% identiek is aan die van het HCMV UL89 gecodeerde eiwit (Hoofdstuk 1), zou het RCMV/rat model gebruikt kunnen worden om de precieze werkingsmechanismen van nieuwe soorten antivirale middelen zowel *in vitro* als *in vivo*, aan het licht te brengen. Verder zou het RCMV/rat model van dienst kunnen zijn in de lopende onderzoeken naar de ontwikkeling van meervoudige geneesmiddelen resistentie enerzijds en de wisselwerking tussen deze geneesmiddelen anderzijds, met betrekking tot benzimidazole, BAY 38-466 en de meer traditionele antiherpesvirusmiddelen, *in vivo*.

De herpesvirus gecodeerde G eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs) vormen mogelijk ook aantrekkelijke antivirale aangrijpingspunten. Zowel voor de genomen van de gamma- als de betaherpesvirussen, zijn genen geïdentificeerd die voor GPCRs coderen (Hoofdstuk 2). Een aantal van deze genen zijn geconserveerd op de genomen van alle leden van een specifieke herpesvirussubfamilie. Dit zijn onder meer de ORF74-achtige genen van de rhadinovirussen, de BILF-1-achtige genen van de lymfocryptovirussen en zowel de UL33- als de UL78-achtige genen van de betaherpesvirussen. Dit is in tegenstelling tot enkele andere, voor GPCRs coderende herpesvirusgenen, zoals HCMV US28 en US27, welke enkel voorkomen op genomen van nauw verwante herpesvirus species.

Door gebruik te maken van recombinante, knock-out viruslijnen, is aangetoond dat de GPCR coderende leden van de rhadinovirus ORF74 gen familie, alsook de betaherpesvirus UL78- en UL33 families, van vitaal belang zijn om productieve virale infecties te bewerkstelligen *in vivo* (Hoofdstuk 2). Dit

illustreert dat de GPCRs die door deze genen gecodeerd worden inderdaad interessante farmacologische aangrijpingspunten vormen waardoor de ontwikkeling van herpesvirus-geïnduceerde ziektes voorkomen zouden kunnen worden of onder controle gebracht. In het verleden is reeds bewezen dat GPCRs succesvolle therapeutische aangrijpingspunten vormen omdat zij gelegen zijn in de cellulaire membraan en door interactie met selectieve liganden vaststaande (intra-)cellulaire responsen kunnen moduleren. Op dit moment behoren GPCRs tot de meest favoriete therapeutische aangrijpingspunten van de farmacologische industrie, en ongeveer 50% van de geneesmiddelen op de huidige markt werkt in op deze eiwitten.

Zoals genoemd in de introductie van deze thesis, kunnen herpesvirussen levenslang-persisterende infecties bewerkstelligen in anderszins gezonde gastheren. Dit duidt erop dat herpesvirus replicatie, persistentie en disseminatie plaats vinden temidden van een normaal functionerend immuunsysteem. Dit impliceert dat herpesvirussen goed aan de antivirale strategieën van het immuunsysteem aangepast zullen zijn. Het is in dit opzicht interessant te vermelden dat de meeste herpesvirus GPCRs, de grootste overeenkomsten vertonen met leden van de GPCR subfamilie der chemokine receptoren. Chemokine receptoren zijn van cruciaal belang voor de regulering van cell-gemedieerde immuunresponsen. Voor de meeste, momenteel gekarakteriseerde herpesvirus GPCRs is aangetoond dat zij, overeenkomstig deze chemokine receptor gelijkenissen, chemokines binden en erop reageren, hetzij als breed spectrum hetzij als selectieve receptoren (Hoofdstuk 2). Dit geldt onder meer voor de KSHV ORF74, HCMV US28, HHV-7 U12, HHV6 U12 en U51 gecodeerde receptoren. Het is verleidelijk om te speculeren dat deze herpesvirus receptoren betrokken zijn bij het ondermijnen van het immuunsysteem van de gastheer, door verstoring van chemokine-geïnduceerde signaal transductie routes.

Naast de chemokine gemedieerde signalering, is gevonden dat verschillende herpesvirus GPCRs, waaronder de KSHV ORF74 en HCMV US28 gecodeerde receptoren, ook op een ligand onafhankelijke, zogenaamde constitutieve wijze signaleren (Hoofdstuk 2). Daarbij is aangetoond dat deze constitutieve signalering op zowel positieve als negatieve wijze gemoduleerd kan worden door binding met liganden die zich aldus respectievelijk als agonisten of inverse agonisten gedragen. Momenteel is echter nog altijd onduidelijk wat nu de biologische significantie van deze constitutieve herpesvirusreceptor activiteit is. Voor verschillende endogene GPCR mutanten is aangetoond dat de constitutieve activiteit die zij door hun mutaties ten toon spreiden, de oorzaak is van het ontstaan van verschillende pathofysiologische condities (28). Mede hierom wordt er gesuggereerd dat constitutieve signalering door herpesvirus GPCRs op een vergelijkbare wijze betrokken zou kunnen zijn bij de ontwikkeling van herpesvirus-geassocieerde pathologieën. Zo is voor de GPCRs, die door de ORF74- genen van enkele oncogene rhadinovirussen gecodeerd worden, vastgesteld dat zij tumorigene eigenschappen bezitten (Hoofdstuk 2). Daarbij is gevonden dat hun mogelijkheid tot tumorinductie afhankelijk is van zowel hun ligand-onafhankelijke, constitutieve als ligand-afhankelijke signaleringsactiviteiten. Voor de andere tot nu toe geïdentificeerde (constitutief actieve) herpesvirus GPCRs, is echter tot op

heden nog geen directe associatie gevonden met specifieke manifestaties van herpesvirus geassocieerde ziekten. daarbij blijft het nog altijd onduidelijk, hoe de intrinsieke eigenschappen van deze receptoren bijdragen aan de pathogenese van de virale infectie.

Aangezien het merendeel van de herpesvirus gecodeerde GPCRs nog niet gekarakteriseerd was, toen het werk welke in deze thesis wordt gepresenteerd, werd geïnitieerd, zijn wij begonnen met het onderzoek naar GPCRs die mogelijk door de leden van de betaherpesvirus UL33 genfamilie worden gecodeerd. Zoals beschreven in Hoofdstukken 3 en 4, is gevonden dat de RCMV R33 en de HCMV UL33 genen coderen voor functionele GPCRs welke op een ligand-onhankelijke, constitutieve wijze signaleren. De door R33 en UL33 gecodeerde receptoren, pR33 en pUL33 respectievelijk, gaan interacties aan met verschillende soorten G eiwitten en moduleren meerdere intracellulaire signaaltransductie cascades op constitutieve wijze. Aangetoond werd dat beide receptoren fosfolipase C (PLC) stimuleren door de activatie van G eiwitten die behoren tot de $G_{q/11}$ klasse. Bovendien werd voor beide receptoren aangetoond dat ze de CRE gemedieerde transcriptie reguleren. Het is opmerkelijk dat de modulatie van de CRE gemedieerde transcriptie door pR33 en pUL33, van elkaar verschilt. De CRE gemedieerde transcriptie wordt door pR33 geremd terwijl deze door pUL33 juist wordt gestimuleerd. De remmende invloed van pR33 wordt in gang gezet door de constitutieve activatie van G eiwitten die behoren tot de $G_{i/o}$ klasse. Net als pR33, activeert ook pUL33 deze remmende $G_{i/o}$ eiwitten. Daarnaast stimuleert pUL33 G_s eiwitten en RhoA-MAPK geassocieerde signaaltransductie routes, welke niet door pR33 geactiveerd worden. Dit zorgt ervoor dat het netto effect van de constitutieve signalering door pUL33 een sterke stimulatie van de CRE gemedieerde transcriptie is.

Net als de andere leden van de betaherpesvirus pUL33 receptorfamilie, vertonen pR33 en pUL33 de grootste overeenkomsten met de CC (beta) chemokine receptoren (CCRs). In overeenstemming met deze CCR gelijkenissen is gevonden dat de aan HCMV pUL33 verwante receptoren van zowel HHV-6, pU12, en HHV-7, pU12, op binding van CC chemokinen (CCLs) reageren. Zo werd voor HHV-6 bekend gemaakt dat deze een breed spectrum CCR is, die na binding van RANTES, Mip-1 α , Mip-1 β of MCP-1 (CCL5, CCL3, CCL4 en CCL2, respectievelijk), de mobilisatie van intracellulair calcium induceert. RANTES binding werd echter niet waargenomen voor de nauw verwante pR33 of pUL33 receptoren. Bovendien bleek noch RANTES, noch een van de andere geteste chemokines, in staat de constitutieve activiteit een van beide receptoren te moduleren (Hoofdstukken 3 en 4). Dit impliceert dat, in tegenstelling tot HHV-6 pU12, pR33 en pUL33 mogelijk zeer selectieve chemokine receptoren zijn. Het is in dit verband interessant te vermelden dat onlangs werd aangetoond dat HHV-7 pU12 een zeer selectieve receptor is, die enkel reageert op binding CCL19 (Mip-3 β) (16). Het is momenteel nog niet bekend of ook de andere receptoren van de pUL33 familie in staat zijn CCL19 te binden. Tot nu toe is er echter nog niets gepubliceerd met betrekking tot een mogelijke interactie tussen pR33 of pUL33 en hetzij CCL19 of enig ander (chemokine) ligand. Beide receptoren worden daarom nog altijd beschouwd als verweesde (orphan) GPCRs. Een van de grootste

uitdagingen voor toekomstige onderzoek ligt dan ook in het ont-wezen (to de-orphanize) van de CMV-gecodeerde, pUL33-achtige GPCRs en het vaststellen of deze GPCRs wel of niet tot de subfamilie der chemokine receptoren behoren.

Om de structurele eisen voor de constitutieve pR33 activiteit te ontrafelen en om de structurele basis van het verschil in constitutieve pR33 en pUL33 activiteit te achterhalen, werden mutagenese studies uitgevoerd (Hoofdstukken 4 en 5). Een deel van deze studies concentreerde zich op het geconserveerde DRY motief. Dit motief wordt in de aminozuur sequenties van de meeste tot nu toe geanalyseerde GPCRs gevonden en is van belang voor de koppeling met en de activatie van G eiwitten (32). Hoewel pUL33 een 'normaal' DRY motief bezit, bevat de pR33 sequentie een NRY motief. Het is opvallend dat bij sommige GPCRs de mutatie van het aspartaat residu (D) van het DRY motif resulteert in een constitutief actieve receptor (6, 25, 32). De wild type-achtige signaleringskarakteristieken van de pR33 mutant, welke een regulier DRY motief bezit (N¹³⁰D), laten echter zien dat het neutrale asparagine residu (N) in plaats van een aspartaat residu (D) niet de oorzaak is van de constitutieve signalerings activiteit van pR33. Bovendien laat dit zien dat dit residu niet de structurele determinant vormt voor het verschil in signalering tussen pR33 en pUL33. Opvallend genoeg vonden we dat de asparagine van het pR33 NRY motief wel betrokken is bij de constitutieve activatie van G eiwitten behorende tot de G_{q/11} klasse. Terwijl voor de pR33 gemedieerde activatie van de G eiwitten van de G_{i/o} klasse, dit residu weer niet van essentieel belang lijkt te zijn. Het arginine residu (R) in het DRY of NRY motief, is het meest geconserveerde GPCR residu en is essentieel voor G eiwit koppeling (32). In overeenstemming hiermee vonden we dat de pR33 mutant waarin het arginine residu (R) van het NRY motief was gemuteerd, niet meer in staat bleek te zijn de activatie van hetzij PLC, hetzij CRE, te moduleren.

Om vervolgens na te gaan welke andere intracellulaire regionen van pR33 en pUL33 van structureel belang zouden kunnen zijn voor (het verschil in) de constitutieve signaleringsprofielen van deze receptoren, werden verschillende intracellulaire domeinen tussen pR33 en pUL33 uitgewisseld (Hoofdstukken 4 en 5). Het was verrassend dat de voorheen geïdentificeerde differentiële constitutieve signaleringskarakteristieken, niet specifiek konden worden geëlimineerd voor pR33 of pUL33, en dat deze niet van de ene receptor op de andere overgedragen kon worden, door een substitutie van een enkele intracellulaire loop. Verder was het opvallend dat de C-terminale staart van pUL33 domeinen bevat die mogelijk betrokken zijn bij de activatie van G_{i/o} eiwitten. In de C-terminale staart van pR33, lijken deze domeinen niet aanwezig te zijn aangezien de pUL33 domeinen niet vervangen konden worden door de (niet-geconserveerde) sequentie van de pR33 C-terminale staart. Samenvattend lijken deze data erop te duiden dat de differentiële constitutieve signaleringskarakteristieken van pR33 en pUL33 nworden veroorzaakt door de gecoördineerde acties van meerdere domeinen, die mogelijk gelegen zijn in de intracellulaire, en eventueel zelfs de transmembrane regio's, van de deze receptoren.

Door de studies met betrekking tot de uitwisseling van de pR33 en pUL33 C-termini, werd ook een dicht bij de membraan gelegen pR33 regio

geïdentificeerd welke van belang is voor de expressie van pR33 op het celoppervlak (Hoofdstuk 4). Dit proximaal tot de membraan gelegen, KRF motief is geconserveerd voor de pR33 en MVMV pM33 sequenties, maar is niet aanwezig in de pUL33 sequentie. Voor een vergelijkbaar gelegen KRF motief werd voorheen gepubliceerd dat het noodzakelijk is voor de correcte expressie van CCR5 op het celoppervlak. Een directe betrokkenheid van het KRF motief voor de celoppervlakte expressie van pR33 of pM33, is echter nog niet bevestigd. We hebben wel vastgesteld dat voor de correcte expressie van pR33 op het celoppervlak, de twee opeenvolgende arginine residuen (RR) die meer distaal van het transmembrane domein in de C-terminus gelegen zijn, een belangrijker rol spelen. Dit werd bevestigd door puntmutatie analyses van dit betreffende dipeptide motief (Hoofdstuk 5). In het licht van de geconserveerdheid van deze residuen tussen de zeer divergente C-terminale sequenties van de betaherpesvirus pR33 verwanten, is het waarschijnlijk dat het RR motief ook voor de overige leden van de pUL33 GPCR familie een vergelijkbare rol speelt.

Deze bevindingen met betrekking tot de constitutieve signaleringseigenschappen, de regulatie van de subcellulaire expressie, en de verschillen tussen de nauw aan elkaar verwante CMV receptoren in relatie tot deze eigenschappen, zijn intrigerend. Desondanks blijft het de vraag of deze *in vitro* activiteiten, functionele eigenschappen van pR33 en pUL33 reflecteren die *in vivo* van biologische significantie zijn. Vanwege de strikte species-specificiteit van de CMVs, en vanwege ethische overwegingen, is het lastig om de mogelijke *in vivo* functies van de humane herpesvirus gecodeerde GPCRs, zoals pUL33, na te gaan. Bovendien is het niet erg zinvol gebleken, om de rol van deze eiwitten door middel van *in vitro* infecties verder te onderzoeken, aangezien deze eiwitten over het algemeen niet noodzakelijk lijken te zijn voor virale replicatie in cell cultuur. Hierdoor zullen toekomstige studies, gericht op het verder karakteriseren van deze en andere herpesvirus gecodeerde receptoren, en op de identificatie en evaluatie van mogelijke anti-virale middelen die op deze GPCRs aangrijpen, zich geconfronteerd zien met de noodzaak nieuwe *in vivo* testen te ontwikkelen. Men zou zich kunnen voorstellen dat in het geval van HCMV pUL33, een recombinante RCMV stam die in plaats van pR33, pUL33 tot expressie brengt, bruikbaar zou kunnen zijn voor *in vivo* (ratten) studies. Een andere benadering werd gepubliceerd voor de KSHV GPCR, welke door en in transgene muizen tot expressie werd gebracht (Hoofdstuk 2). Natuurlijk heeft ieder van deze surrogaat modelsystemen te leiden onder specifieke tekortkomingen, zoals het mogelijke gebrek aan correcte liganden voor een specifieke GPCR die door een transgeen, of in een andere niet-natuurlijke gastheerspecies, tot expressie wordt gebracht. De *in vitro* assays hebben echter, ondanks alle bezwaren, ook bewezen van aanzienlijk belang te zijn, en te zullen zijn, om onze kennis met betrekking tot de signaleringskarakteristieken, de farmacologische profielen, en de structuur-functie relaties van deze receptoren te blijven vergroten.