

Molecular biology of rat cytomegalovirus : genome-wide transcriptional program and molecular mimicry

Citation for published version (APA):

van Cleef, K. W. R. (2007). *Molecular biology of rat cytomegalovirus : genome-wide transcriptional program and molecular mimicry*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070302kc>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070302kc](https://doi.org/10.26481/dis.20070302kc)

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.

Although infections with human cytomegalovirus (HCMV) are usually not associated with clinical symptoms in immunocompetent individuals, they are a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised individuals, such as AIDS patients and organ transplant recipients. The severity of HCMV-induced pathologies in immunocompromised individuals and the high prevalence of HCMV infections in the general population make of HCMV an important human pathogen. Furthermore, the clinical outcome of the treatment of HCMV infections is threatened by the generation of viruses that are resistant to current anti-viral therapies. The search for new anti-viral compounds to prevent or control the development of HCMV-induced disease is therefore an important goal in the field of CMV research.

The identification of new targets for the generation of novel anti-viral agents requires a thorough knowledge of the molecular mechanisms that are associated with CMV-induced pathologies. However, as a consequence of the strict host species-specificity of the CMVs, it is not possible to study the pathogenesis of HCMV infections in physiologically relevant situations *in vivo*. In order to study the pathogenesis of CMV infections *in vivo*, animal infection models are required. For this purpose, a rat CMV (RCMV)/rat model was developed in our laboratory (Bruggeman et al., 1982). The RCMV/rat model is a highly suitable model to study CMV infections *in vivo*, since the pathogenesis of RCMV infections in rats is similar to that of HCMV infections in humans (Stals et al., 1990). Moreover, the genomic sequence of RCMV is highly similar to those of other CMVs, such as HCMV and murine CMV (MCMV) (Chee et al., 1990a; Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). In this thesis, the RCMV/rat model is used to study several aspects of RCMV gene expression and the role of a selected set of RCMV genes in the pathogenesis of infection.

The RCMV/rat model and the knowledge of the complete RCMV genomic sequence are powerful instruments to study the role of viral genes in CMV-induced pathologies. However, the extent of RCMV gene expression is still unknown. In order to study transcription of all RCMV genes simultaneously, we have generated an RCMV-specific DNA microarray. In **Chapter 2**, this microarray is employed to monitor the viral genome-wide transcription profiles in RCMV-infected cells in culture as well as in various organs and tissues of RCMV-infected rats. In this study, it is shown that the majority of the viral genes are transcribed during RCMV infection *in vitro* with only a few differences between different cell types. In contrast, transcription of viral genes during RCMV infection *in vivo* was found to be highly restricted and tissue-specific. Whereas 95 % of the viral genome is transcribed in RCMV-infected cells in culture, only 38 % of the viral genes is

transcriptionally active in spleens of RCMV-infected rats. Even a lower percentage of the RCMV genes is transcribed in other tissues, including the salivary glands (25 %). These observations indicate that the RCMV transcription profiles *in vitro* do not reflect those *in vivo*. Interestingly, many of the viral genes that are transcribed to high levels during RCMV infection *in vivo* are predicted to encode immunomodulatory proteins that may be involved in immune evasion. Among these genes are several members of the m145 glycoprotein gene family. An MCMV member of this family was shown to interfere with the major histocompatibility complex (MHC) class I pathway of antigen presentation (Ziegler et al., 1997). On the other hand, most of the viral genes that are known to encode proteins that are involved in virus replication are only transcribed at low levels during RCMV infection *in vivo*. One of these genes is immediate early 1 (IE1), which is crucial for RCMV replication. In accordance with these results, transcription of IE1 was previously also found to be restricted in various organs and tissues of RCMV-infected immunocompetent rats (Blok et al., 2001). The tightly regulated transcription of genes that play a role in either immune evasion or virus replication represents an effective and efficient way for RCMV to escape immune clearance. However, RCMV does not transcribe its full arsenal of immunomodulatory genes in each tissue, but it transcribes these genes in a tissue-specific manner. The tissue-specificity of the RCMV transcription profiles may reflect differences in the immune response of the host, which is probably not the same in each tissue. Consequently, the immunomodulatory mechanisms of RCMV need to be specific for each tissue as well. A good example is the tissue-specific transcription of the r138 gene, which encodes an Fc receptor homolog (Vink et al., 2000). This gene is only transcribed to high levels in spleen and lung. The tissue-specificity of the r138 transcription levels may be caused by differences in antibody-mediated immune responses against RCMV in different tissues. RCMV might be more prone to these responses in spleen and lung than in other tissues. The ability of RCMV to regulate transcription of its genes in a tissue-specific manner may result from specific regulatory motifs within the viral promoters that are active in some tissues but not in others. Additional studies, however, are required to identify these motifs. Nevertheless, the identification of the tissue-specificity of the RCMV transcription profiles underlines the complex nature of CMV gene expression.

The viral genome-wide transcription profiles have previously also been monitored in HCMV-infected cells in culture. In one study, the temporal transcription profiles of HCMV in infected fibroblasts were determined (Chambers et al., 1999). Interestingly, many viral genes of a specific kinetic class were found to contain common potential regulatory

motifs within their promoters (Chambers et al., 1999). This observation suggests that the HCMV genes are transcribed according to specific transcriptional programs. These specific transcriptional programs resemble the tissue-specificity of the RCMV transcription profiles. In two other studies, the transcription profiles of HCMV were determined in latently infected primary CD34⁺ hematopoietic progenitor cells (Goodrum et al., 2002, 2004). The HCMV transcription profiles in these cells were found to differ considerably from the profiles that were observed in productively infected fibroblasts (Goodrum et al., 2002). However, only the CD34⁺/CD38⁻ subpopulation of the heterogeneous CD34⁺ compartment was found to support an HCMV infection with the hallmarks of latency (Goodrum et al., 2004). HCMV infection in these cells initially results in transient transcription of many viral genes followed by viral transcriptional quiescence. Nevertheless, viral genomes are maintained in the absence of substantial virus replication. It is important to note that the CD34⁺/CD38⁻ cells can reactivate the virus when they are co-cultured with permissive fibroblasts. Interestingly, most of the viral genes that are transcribed in the CD34⁺/CD38⁻ cells during the initial burst of viral gene transcription are not required for efficient replication in fibroblasts (Goodrum et al., 2004). Some of these genes may have a role in the establishment of latency. However, latency-specific transcription profiles were not identified. Although the *in vitro* model system for studying HCMV latency in CD34⁺/CD38⁻ cells is attractive, it clearly has its limitations. It is not known whether the transcription profiles during HCMV infections *in vitro* indeed reflect the profiles that are observed during HCMV infections *in vivo*. However, the options for studying HCMV infections *in vivo* are very limited. For example, it is nearly impossible to analyze viral transcription profiles that contribute to HCMV-induced pathologies. This illustrates the strength of the RCMV/rat model, which allows us to investigate aspects of CMV infections that can only be studied *in vivo*. Future studies are necessary to identify specific viral transcription profiles that are associated with RCMV latency as well as with RCMV-induced pathologies.

In the majority of the previous studies on RCMV infections *in vivo*, rats were subjected to immune suppression prior to virus administration. As a consequence of the immune suppression, RCMV is able to replicate efficiently and induce a full-blown, severe infection (Stals et al., 1990). Nevertheless, natural CMV infections generally occur in immunocompetent hosts, which usually do not suffer from serious complications due to the infection. In order to study virus dissemination under 'natural' conditions *in vivo*, a study was initiated to monitor the course of RCMV infection within immunocompetent rats (Blok et al., 2001). Remarkably, while analyzing transcription of

IE1 in various organs and tissues of these rats, two antisense transcripts from the RCMV major IE (MIE) region were identified (**Chapter 3**). These transcripts, termed IE-AS1 and IE-AS2, were not detected in a previous study in which the RCMV MIE region was identified and characterized (Beisser et al., 1998a). In this previous study, the MIE region of RCMV was found to generate three different sense transcripts, i.e. IE1, IE2 and IE2A (Beisser et al., 1998a). These sense RCMV MIE transcripts are similar to those of other CMVs and they are likely to encode proteins that are involved in the initiation of the gene expression cascade during lytic infection. The inability to detect the IE-AS transcripts in this previous study can be explained by the sense strand-specificity of most of the experiments that were performed in this study as well as by the relatively low transcription levels of these transcripts. The inability to detect these transcripts by Northern blot analysis is consistent with our findings.

The identification of the novel IE-AS transcripts is intriguing, but the function of these transcripts during RCMV infection is yet to be determined. Although these transcripts may encode functional proteins, it is also possible that the transcripts themselves are involved in the modulation of IE1 expression. The IE-AS transcripts are partly complementary to the IE1 transcript and they may silence expression of IE1 by the formation of double-stranded RNA molecules with the complementary IE1 transcript. However, there is no direct evidence for this mechanism of post-transcriptional gene silencing of IE1 during RCMV infection.

Interestingly, an antisense transcript from the MIE region has previously also been identified for HCMV (Kondo et al., 1996). This transcript, which was found to be transcribed in latently infected granulocyte-macrophage progenitor cells in culture and in bone marrow of healthy seropositive individuals, was defined as a CMV latency-associated transcript (CLT) (Kondo et al., 1996). In light of the potential role of the HCMV antisense CLT in the regulation of latency, the identification of the RCMV IE-AS transcripts is fascinating. It is tempting to speculate that the HCMV antisense CLT as well as the RCMV IE-AS transcripts or their protein products are involved in either the establishment or maintenance of latency through post-transcriptional gene silencing of IE1. Interestingly, a comparable role in the regulation of latency has also been suggested for an antisense transcript from the HCMV UL81-82 region that has been identified recently in monocytes and bone marrow of healthy seropositive individuals (Bego et al., 2005). This transcript is partly complementary to the HCMV UL82 gene that encodes the pp71 tegument protein (upper matrix protein), a known transcriptional activator of the HCMV MIE promoter/enhancer (Bego et al., 2005). Therefore, it was hypothesized that

the HCMV antisense UL81-82 transcript or its protein product might be involved in the regulation of latency by restricting expression of the HCMV MIE region by post-transcriptional gene silencing of UL82. Although the potential role of antisense transcripts from lytic CMV genes in the regulation of latency is interesting, their function has not yet been established experimentally. To investigate their function, the RCMV/rat model might be extremely useful. An RCMV counterpart of the HCMV antisense UL81-82 transcript has thus far not been identified, but a more extensive characterization of the potential role of the RCMV IE-AS transcripts in the modulation of IE1 expression and the regulation of latency might lead to a better understanding of the potential function of the HCMV antisense CLT. However, it is currently unknown whether the IE-AS transcripts are actually transcribed during RCMV latency. To investigate this, a model of RCMV latency and reactivation should be developed. Although there are several data on RCMV latency, data on RCMV reactivation are very limited (Blok et al., 2001; Bruggeman et al., 1983; Bruning et al., 1986, 1988, 1989; Yagyu et al., 1992, 1993). It is expected that further experiments on the molecular mechanisms that regulate RCMV latency and reactivation can be done in the near future, when more precise data on these biological processes will become available. Especially the role of the IE-AS transcripts in the regulation of latency could be an interesting subject for further studies.

With regard to latency, the identification of a homolog of the *rep* genes of parvoviruses in the RCMV genome is intriguing (Vink et al., 2000). A homolog of these genes was previously also found at a congruent position in the genomes of human herpesvirus type 6A (HHV-6A) and 6B (HHV-6B) (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Thomson et al., 1991), but not in the genome of any other herpesvirus. The *rep* gene homologs of RCMV (r127) and HHV-6A and -6B (U94) are probably derived from a common ancestral betaherpesvirus gene, as they are conserved in sequence, genomic position as well as orientation (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Vink et al., 2000). The absence of *rep* gene homologs in the genomes of other betaherpesviruses is therefore remarkable. We hypothesize that the *rep* gene was acquired by an ancestral betaherpesvirus during a coinfection with an ancestral parvovirus and that it has developed a novel function in the replication cycles of RCMV and HHV-6A and -6B, but that it has been lost from the genomes of other betaherpesviruses due to lack of positive selective pressure. However, the role of the proteins that are encoded by the *rep* gene homologs of RCMV and HHV-6A and -6B in the pathogenesis of infection is still unclear. Nevertheless, U94 was found to be transcribed in latently infected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from

HHV-6A-infected individuals, whereas both virus replication and expression of viral genes were found to be restricted in HHV-6A-infected lymphocytes expressing HHV-6B U94 *in vitro* (Rotola et al., 1998). This led to the hypothesis that the U94-encoded protein (RepH6) is involved in either the establishment or maintenance of HHV-6A and -6B latency. Whether the r127-encoded protein (pr127) is involved in the regulation of RCMV latency is currently unknown. In order to begin and unravel the role of pr127 in the replication cycle of RCMV, we started experiments to characterize the RCMV r127 gene during lytic infection *in vitro* and during the acute phase of infection *in vivo* (**Chapter 4**). For this purpose, an RCMV r127 deletion mutant (RCMV Δ r127) was generated. In this deletion mutant, part of the r127 open reading frame (ORF) is replaced with a neomycin resistance gene (*neo*). The replication characteristics of RCMV Δ r127 were compared to those of wild-type RCMV (wt RCMV). This study shows that RCMV Δ r127 replicates with a similar efficiency as wt RCMV, both during lytic infection *in vitro* and during the acute phase of infection *in vivo*. These results indicate that r127 is dispensable for virus replication and raise the question whether pr127 could play a similar role as RepH6 in the regulation of latency. It is not unlikely that pr127 indeed has a conserved function with respect to RepH6, since these proteins were found to share several characteristics. For example, we have shown that pr127 possesses DNA-binding activity. This feature was previously also attributed to RepH6 (Dhepakson et al., 2002), although the DNA-binding activities of pr127 and RepH6 appear to be distinct. Whereas pr127 was found to bind to single- as well as double-stranded DNA, RepH6 was found to bind exclusively to single-stranded DNA (Dhepakson et al., 2002). Furthermore, when compared to RepH6, pr127 is severely truncated at its N terminus (Vink et al., 2000). Due to this truncation, it is highly unlikely that pr127 shares several other characteristics of RepH6, such as the ability to complement parvoviral Rep proteins (Thomson et al., 1994). It therefore remains speculative as to whether pr127 indeed represents the functional homolog of RepH6. Nevertheless, in addition to its potential role in the regulation of latency, pr127 is also hypothesized to have a function during productive infection. This hypothesis is based on the observation that this protein is expressed during lytic infection *in vitro* and during the acute phase of infection *in vivo*. Although we found pr127 to be dispensable for virus replication, the function of this protein may be subtle and may thus have been overlooked in our study.

To date, the regulation of CMV latency and reactivation is poorly understood. However, it is clear that the ability of the CMVs to maintain a life-long, stable relationship

with their hosts requires strategies to evade and manipulate the immune system. Interestingly, among the CMV genes that are involved in these strategies are genes that encode homologs of cellular G protein-coupled receptors (GPCRs) and chemokines (CKs). These genes have probably been pirated from the host genome during the long co-evolution of virus and host. In **Chapter 5**, the current state of knowledge on the CMV-encoded homologs of GPCRs and CKs is discussed. These proteins appear to interfere with CK signaling pathways, which are essential for proper functioning of the immune system. By interfering with these pathways, the CMV-encoded GPCRs and CKs may enable the virus to escape immune clearance by disrupting normal cellular migration patterns of leukocytes. Alternatively, the interference with CK signaling pathways might contribute to recruitment of susceptible leukocytes to initial sites of infection. These leukocytes could serve as vehicles for virus dissemination.

GPCR- and CK-encoding genes have been found within the genomes of all sequenced CMVs. Of particular interest are the UL33 and UL78 GPCR gene families, since members of these families are present in all sequenced betaherpesviruses, including HCMV, RCMV, MCMV, HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 (Beisser et al., 1998b, 1999; Chee et al., 1990a,b; Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Nicholas, 1996; Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). The UL33-like genes of the CMVs have been demonstrated to encode functional GPCRs with ligand-independent, constitutive signaling activities (Casarosa et al., 2003; Gruijthuisen et al., 2002; Waldhoer et al., 2002). Whether the UL78-like genes of the CMVs also encode functional GPCRs has not yet been reported. Nevertheless, as they are conserved among all sequenced betaherpesviruses, it was deemed likely that both the UL33- as well as the UL78-like genes would encode proteins with important roles in the pathogenesis of infection. Indeed, the generation and characterization of recombinant CMV strains has shown that the UL33- and UL78-like genes of RCMV and MCMV encode proteins that are of crucial importance in the pathogenesis of infection (Beisser et al., 1998b, 1999; Davis-Poynter et al., 1997; Kaptein et al., 2003; Oliveira and Shenk, 2001; Streblow et al., 2005). In light of their conservation among the betaherpesviruses, it is likely that other UL33- and UL78-like genes are of similar importance. Furthermore, the GPCRs that are encoded by these genes are readily accessible on the cell surface. The HCMV UL33- and UL78-encoded GPCRs are therefore interesting targets for the development of novel anti-viral therapies. This also holds true for the HCMV US27- and US28-encoded GPCRs (Chee et al., 1990a,b). While little is known about US27, US28 was found to encode a functional GPCR with both ligand-dependent as well as ligand-

independent, constitutive signaling activities (Billstrom et al., 1998; Casarosa et al., 2001; Gao and Murphy, 1994; McLean et al., 2004; Melnychuk et al., 2004; Streblow et al., 1999, 2003; Waldhoer et al., 2002). However, in contrast to UL33 and UL78, US27 and US28 do not have counterparts in RCMV and MCMV. The biological significance of these genes in the pathogenesis of infection is therefore not known. This also applies to the HCMV CXC CK-encoding genes UL146 and UL147 (Penfold et al., 1999). The CKs that are encoded by these genes are also potential targets for the development of novel anti-viral therapies. However, in analogy to US27 and US28, homologs of UL146 and UL147 are not present in RCMV and MCMV. The HCMV CC CK-encoding gene UL128, however, has a counterpart in RCMV (Akter et al., 2003). The UL128 homolog of RCMV was designated r129 (Kaptein et al., 2004). We are currently generating recombinant RCMV strains in order to study the biological significance of r129. These studies will not only shed more light on the role of the r129-encoded CK in the pathogenesis of RCMV infection, they will also indicate whether HCMV UL128 can be regarded as a potential target for the development of novel anti-viral compounds. Clearly, the exploitation of the RCMV/rat model will be of great importance for the design and evaluation of these compounds.

Taken together, several aspects of RCMV gene expression and a selected set of RCMV genes have been studied in this thesis. Although the role of most RCMV genes in the pathogenesis of infection remains to be elucidated, our data contribute to the knowledge of the complex molecular biology of the CMVs. Furthermore, the results described in this thesis underline the suitability of the RCMV/rat model to study the function of CMV genes during different stages of infection. Substantial data show that most RCMV properties are common to all CMVs, which make the RCMV/rat model an attractive model to study the mechanisms that are involved in CMV-induced pathologies. However, RCMV has also several unique properties that are not shared by other CMVs, such as the r127 parvoviral *rep* gene homolog. Due to these unique properties, it is sometimes difficult to extrapolate the results from RCMV studies in rats to HCMV infections in humans. Nevertheless, animal infection models offer the opportunity to study the interaction between virus and host. These models are therefore indispensable in the field of CMV research.

References

Akter P, Cunningham C, McSharry BP, Dolan A, Addison C, Dargan DJ, et al. Two novel spliced genes in human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2003;84:1117-22.

- Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St. Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol* 2005;79:11022-34.
- Beisser PS, Kaptein SJF, Beuken E, Bruggeman CA, Vink C. The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains. *Virology* 1998a;246:341-51.
- Beisser PS, Vink C, van Dam JG, Grauls G, Vanherle SJV, Bruggeman CA. The R33 G protein-coupled receptor gene of rat cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J Virol* 1998b;72:2352-63.
- Beisser PS, Grauls G, Bruggeman CA, Vink C. Deletion of the R78 G protein-coupled receptor gene from rat cytomegalovirus results in an attenuated, syncytium-inducing mutant strain. *J Virol* 1999;73:7218-30.
- Billstrom MA, Johnson GL, Avdi NJ, Scott Worthen G. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1998;72:5535-44.
- Blok MJ, Savelkoul KGM, Grauls GELM, Bruggeman CA, Vink C. Immediate early-1 mRNA expression and virus production are restricted during the acute phase of rat cytomegalovirus infection in immunocompetent rats. In: Blok MJ, editor. *Monitoring the course of CMV infection by detection of specific viral transcripts*. ANDI Press, Geleen, The Netherlands 2001:91-124.
- Bruggeman CA, Meijer H, Dormans PHJ, Debie WMH, Grauls GELM, van Boven CPA. Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Arch Virol* 1982;73:231-41.
- Bruggeman CA, Debie WMH, Grauls G, Majoor G, van Boven CPA. Infection of laboratory rats with a new cytomegalo-like virus. *Arch Virol* 1983;76:189-99.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Boven CP, van Breda Vriesman PJ. Passive transfer of cytomegalovirus by cardiac and renal organ transplants in a rat model. *Transplantation* 1986;41:695-8.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Breda Vriesman PJ. The transfer of cytomegalovirus infection in rats by latently infected renal allografts, and the role of various immunosuppressive regimens in virus reactivation. *Transplantation* 1988;46:623-4.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Boven CP, van Breda Vriesman PJ. Reactivation of latent rat cytomegalovirus by a combination of immunosuppression and administration of allogeneic immunocompetent cells. *Transplantation* 1989;47:917-8.
- Casarosa P, Bakker RA, Verzijl D, Navis M, Timmerman H, Leurs R, et al. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem* 2001;276:1133-7.
- Casarosa P, Gruijthuisen YK, Michel D, Beisser PS, Holl J, Fitzsimons CP, et al. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded receptor UL33 differs from that of its rat cytomegalovirus homolog R33 by promiscuous activation of G proteins of the G_q, G_i, and G_s classes. *J Biol Chem* 2003;278:50010-23.
- Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol* 1999;73:5757-66.

- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990a;154:125-69.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 1990b;344:774-7.
- Davis-Poynter NJ, Lynch DM, Vally H, Shellam GR, Rawlinson WD, Barrell BG, et al. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J Virol* 1997;71:1521-9.
- Dhepakson P, Mori Y, Jiang YB, Huang HL, Akkapaiboon P, Okuno T, et al. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 2002;83:847-54.
- Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999;73:8040-52.
- Gao JL, Murphy PM. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:28539-42.
- Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin MED, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995;209:29-51.
- Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16255-60.
- Goodrum F, Jordan CT, Terhune SS, High K, Shenk T. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood* 2004;104:687-95.
- Grujthuijsen YK, Casarosa P, Kaptein SJF, Broers JLV, Leurs R, Bruggeman CA, et al. The rat cytomegalovirus R33-encoded G protein-coupled receptor signals in a constitutive fashion. *J Virol* 2002;76:1328-38.
- Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999;73:8053-63.
- Kaptein SJF, Beisser PS, Grujthuijsen YK, Savelkoul KGM, van Cleef KWR, Beuken E, et al. The rat cytomegalovirus R78 G protein-coupled receptor gene is required for production of infectious virus in the spleen. *J Gen Virol* 2003;84:2517-30.
- Kaptein SJF, van Cleef KWR, Grujthuijsen YK, Beuken EVH, van Buggenhout L, Beisser PS, et al. The r131 gene of rat cytomegalovirus encodes a proinflammatory CC chemokine homolog which is essential for the production of infectious virus in the salivary glands. *Virus Genes* 2004;29:43-61.
- Kondo K, Xu J, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11137-42.

- McLean KA, Holst PJ, Martini L, Schwartz TW, Rosenkilde MM. Similar activation of signal transduction pathways by the herpesvirus-encoded chemokine receptors US28 and ORF74. *Virology* 2004;325:241-51.
- Melnychuk RM, Streblov DN, Smith PP, Hirsch AJ, Pancheva D, Nelson JA. Human cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor US28 mediates smooth muscle cell migration through G α 12. *J Virol* 2004;78:8382-91.
- Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. *J Virol* 1996;70:5975-89.
- Oliveira SA, Shenk TE. Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3237-42.
- Penfold MET, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, et al. Cytomegalovirus encodes a potent α chemokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9839-44.
- Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996;70:8833-49.
- Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13911-6.
- Stals FS, Bosman F, van Boven CPA, Bruggeman CA. An animal model for therapeutic intervention studies of CMV infection in the immunocompromised host. *Arch Virol* 1990;114:91-107.
- Streblov DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999;99:511-20.
- Streblov DN, Vomaske J, Smith P, Melnychuk R, Hall L, Pancheva D, et al. Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediated by focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 2003;278:50456-65.
- Streblov DN, Kreklywich CN, Smith P, Soule JL, Meyer C, Yin M, et al. Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is reduced with mutation of the chemokine-receptor R33. *Am J Transplant* 2005;5:436-42.
- Thomson BJ, Efstathiou S, Honess RW. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 1991;351:78-80.
- Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn R. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 1994;204:304-11.
- Vink C, Beuken E, Bruggeman CA. Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J Virol* 2000;74:7656-65.
- Waldhoer M, Kledal TN, Farrell H, Schwartz TW. Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *J Virol* 2002;76:8161-8.

- Yagyu K, Steinhoff G, Duijvestijn AM, Bruggeman CA, Matsumoto H, van Breda Vriesman PJ. Reactivation of rat cytomegalovirus in lung allografts: an experimental and immunohistochemical study in rats. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:1031-40.
- Yagyu K, van Breda Vriesman PJ, Duijvestijn AM, Bruggeman CA, Steinhoff G. Reactivation of cytomegalovirus with acute rejection and cytomegalovirus infection with obliterative bronchiolitis in rat lung allografts. *Transplant Proc* 1993;25:1152-4.
- Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 1997;6:57-66.

Samenvatting en algehele discussie

Infecties met het humaan cytomegalovirus (HCMV) gaan meestal niet gepaard met klinische symptomen in immuuncompetente personen, maar ze zijn een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in immuungecompromitteerde personen, zoals AIDS-patiënten en patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan. De ernst van de door HCMV geïnduceerde pathologieën in immuungecompromitteerde personen en de hoge prevalentie van HCMV-infecties in de algehele populatie maken van HCMV een belangrijk humaan pathogeen. De klinische uitkomst van de behandeling van HCMV-infecties wordt bovendien bedreigd door het ontstaan van virussen die resistent zijn tegen de huidige antivirale therapieën. Het zoeken naar nieuwe antivirale middelen om de ontwikkeling van de door HCMV geïnduceerde ziektebeelden te voorkomen of te genezen is daarom een belangrijk onderwerp in het CMV-onderzoek.

De identificatie van nieuwe aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe antivirale stoffen vereist een gedegen kennis van de moleculaire mechanismen die geassocieerd zijn met de door CMV geïnduceerde pathologieën. Door de strikte soortspecifiteit van de CMV's is het echter niet mogelijk om de pathogenese van HCMV-infecties te bestuderen in fysiologisch relevante situaties in vivo. Om de pathogenese van CMV-infecties in vivo te kunnen bestuderen zijn diersystemen vereist. Daarom werd in ons laboratorium een rat CMV (RCMV)/ratmodel ontwikkeld (Bruggeman et al., 1982). Het RCMV/ratmodel is een uitermate geschikt model voor het bestuderen van CMV-infecties in vivo, aangezien de pathogenese van RCMV-infecties in ratten gelijk is aan die van HCMV-infecties in mensen (Stals et al., 1990). Bovendien komt de sequentie van het genoom van RCMV sterk overeen met die van andere CMV's, zoals HCMV en muis CMV (MCMV) (Chee et al., 1990a; Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). In dit proefschrift wordt het RCMV/ratmodel gebruikt voor het bestuderen van verschillende aspecten van RCMV-genexpressie en de rol van een geselecteerde set van RCMV-genen in de pathogenese van infectie.

Het RCMV/ratmodel en de kennis van de complete sequentie van het genoom van RCMV zijn krachtige instrumenten voor het bestuderen van de rol van virale genen in de door CMV geïnduceerde pathologieën. De mate van RCMV-genexpressie is echter nog steeds onbekend. Om de transcriptie van alle RCMV-genen tegelijkertijd te kunnen bestuderen hebben we een RCMV-specifieke DNA-microarray ontwikkeld. In **Hoofdstuk 2** wordt deze microarray gebruikt voor het bepalen van de virale genoomwijde transcriptieprofielen in RCMV-geïnfecteerde cellen in kweek en in verschillende organen en weefsels van RCMV-geïnfecteerde ratten. In deze studie wordt aangetoond dat de meerderheid van de virale genen getranscribeerd wordt tijdens een

RCMV-infectie in vitro met slechts een beperkt aantal verschillen tussen verschillende celtypen. De transcriptie van virale genen tijdens een RCMV-infectie in vivo bleek daarentegen sterk beperkt en weefsel-specifiek te zijn. Terwijl 95 % van het virale genoom getranscribeerd wordt in RCMV-geïnficeerde cellen in kweek is slechts 38 % van de virale genen transcriptieel actief in de milt van RCMV-geïnficeerde ratten. Zelfs een lager percentage van de RCMV-genen wordt getranscribeerd in andere weefsels, waaronder de speekselklieren (25 %). Dit toont aan dat de RCMV-transcriptieprofielen in vivo niet gereflecteerd worden door die in vitro. Het is interessant dat veel van de virale genen die hoge transcriptieniveaus bereiken tijdens een RCMV-infectie in vivo lijken te coderen voor immuunmodulerende eiwitten die betrokken zouden kunnen zijn bij immuunevasie. Onder deze genen bevinden zich verschillende leden van de m145 glycoproteïne-genfamilie. Voor een MCMV-lid van deze familie is aangetoond dat het interfereert met de door 'major histocompatibility complex' (MHC) klasse I gemedieerde antigeenpresentatie (Ziegler et al., 1997). Daar staat tegenover dat de meeste virale genen waarvan bekend is dat ze coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij virusreplicatie slechts lage transcriptieniveaus bereiken tijdens een RCMV-infectie in vivo. Eén van deze genen is 'immediate early 1' (IE1), dat cruciaal is voor RCMV-replicatie. De eerdere bevinding dat transcriptie van IE1 ook beperkt is in verschillende organen en weefsels van RCMV-geïnficeerde immuuncompetente ratten is in overeenstemming met deze resultaten (Blok et al., 2001). De strikt gereguleerde transcriptie van genen die betrokken zijn bij immuunevasie en virusreplicatie vertegenwoordigt een effectieve en efficiënte manier voor RCMV om aan klaring door het immuunsysteem te ontsnappen. RCMV transcribeert echter niet zijn volledige arsenaal aan immuunmodulerende genen in elk weefsel, maar het transcribeert deze genen op een weefsel-specifieke manier. De weefsel-specificiteit van de RCMV-transcriptieprofielen is mogelijk een reflectie van verschillen in de immuunreactie van de gastheer, die waarschijnlijk niet hetzelfde is in elk weefsel. Hierdoor moeten de immuunmodulerende mechanismen van RCMV ook specifiek zijn voor elk weefsel. Een goed voorbeeld is de weefsel-specifieke transcriptie van het r138-gen, dat codeert voor een Fc-receptorhomoloog (Vink et al., 2000). Dit gen bereikt alleen hoge transcriptieniveaus in de milt en longen. De weefsel-specificiteit van de transcriptieniveaus van r138 wordt mogelijk veroorzaakt door verschillen in de door antilichamen gemedieerde immuunreacties tegen RCMV in verschillende weefsels. RCMV wordt mogelijk meer blootgesteld aan deze reacties in de milt en longen dan in andere weefsels. Het vermogen van RCMV om transcriptie van zijn genen op een

weefsel-specifieke manier te reguleren zou het resultaat kunnen zijn van specifieke regulatieve elementen in de virale promotors die actief zijn in sommige weefsels, maar niet in andere. Voor het identificeren van deze elementen zijn echter aanvullende studies noodzakelijk. De identificatie van de weefsel-specificiteit van de RCMV-transcriptieprofielen onderstreept desalniettemin de complexe aard van CMV-genexpressie.

De virale genomwijde transcriptieprofielen werden eerder ook bestudeerd in HCMV-geïnfekteerde cellen in kweek. In één studie werden de temporele transcriptieprofielen van HCMV in geïnfekteerde fibroblasten bepaald (Chambers et al., 1999). Interessant is dat veel virale genen van een bepaalde kinetische klasse gemeenschappelijke potentiële regulatieve elementen in hun promotors bleken te bevatten (Chambers et al., 1999). Dit suggereert dat de HCMV-genen worden getranscribeerd volgens specifieke transcriptieprogramma's. Deze specifieke transcriptieprogramma's lijken op de weefsel-specifieke transcriptieprofielen van RCMV. In twee andere studies werden de transcriptieprofielen van HCMV bepaald in latent geïnfekteerde primaire CD34⁺ hematopoïetische voorlopercellen (Goodrum et al., 2002, 2004). De HCMV-transcriptieprofielen in deze cellen bleken sterk te verschillen van de profielen die gezien werden in productief geïnfekteerde fibroblasten (Goodrum et al., 2002). Alleen de CD34⁺/CD38⁻-subpopulatie van het heterogene CD34⁺-compartiment bleek echter een HCMV-infectie met de kenmerken van latentie te ondersteunen (Goodrum et al., 2004). Een HCMV-infectie in deze cellen resulteert aanvankelijk in een kortstondige transcriptie van veel virale genen, waarna de virale transcriptie stil komt te liggen. Het virale genoom blijft echter behouden in de afwezigheid van substantiële virusreproductie. Het is belangrijk om te vermelden dat de CD34⁺/CD38⁻-cellen het virus kunnen reactiveren als ze worden gekweekt in de aanwezigheid van permissieve fibroblasten. Het is interessant dat de meerderheid van de virale genen die getranscribeerd worden in de CD34⁺/CD38⁻-cellen tijdens de aanvankelijke uitbraak van virale genexpressie niet noodzakelijk is voor efficiënte reproductie in fibroblasten (Goodrum et al., 2004). Sommige van deze genen zouden een rol kunnen spelen in het tot stand brengen van latentie. Latentiespecifieke transcriptieprofielen werden echter niet geïdentificeerd. Het in vitro modelsysteem voor het bestuderen van HCMV-latentie in CD34⁺/CD38⁻-cellen is aantrekkelijk, maar het heeft duidelijk zijn beperkingen. Het is niet bekend of de transcriptieprofielen tijdens HCMV-infecties in vitro daadwerkelijk de profielen reflecteren die gezien worden tijdens HCMV-infecties in vivo. De mogelijkheden voor het bestuderen van HCMV-infecties in vivo zijn echter erg beperkt. Het is bijvoorbeeld bijna onmogelijk om virale

transcriptieprofielen te analyseren die bijdragen aan de door HCMV geïnduceerde pathologieën. Dit illustreert de kracht van het RCMV/ratmodel, dat ons in staat stelt om aspecten van CMV-infecties te onderzoeken die alleen in vivo kunnen worden bestudeerd. Toekomstige studies zijn noodzakelijk om specifieke virale transcriptieprofielen die geassocieerd zijn met RCMV-latentie en met de door RCMV geïnduceerde pathologieën te identificeren.

In de meerderheid van de eerdere studies naar RCMV-infecties in vivo werden de ratten onderworpen aan immuunsuppressie voorafgaand aan de virustoediening. Door de immuunsuppressie is RCMV in staat om efficiënt te repliceren en een volledig ontwikkelde, ernstige infectie te induceren (Stals et al., 1990). Natuurlijke CMV-infecties vinden over het algemeen echter plaats in immuuncompetente gastheren die meestal niet lijden aan ernstige complicaties als gevolg van de infectie. Om virusdisseminatie onder 'natuurlijke' condities in vivo te bestuderen werd een studie opgezet om het verloop van een RCMV-infectie in immuuncompetente ratten te bepalen (Blok et al., 2001). Tijdens het analyseren van de transcriptie van IE1 in verschillende organen en weefsels van deze ratten werden twee antisense transcripten van het RCMV 'major IE' (MIE)-gebied geïdentificeerd (**Hoofdstuk 3**). Deze transcripten, die IE-AS1 en IE-AS2 werden genoemd, werden niet gedetecteerd in een eerdere studie waarin het RCMV MIE-gebied werd geïdentificeerd en gekarakteriseerd (Beisser et al., 1998a). In deze eerdere studie werd gevonden dat het MIE-gebied van RCMV drie verschillende sense transcripten genereert, namelijk IE1, IE2 en IE2A (Beisser et al., 1998a). Deze sense RCMV MIE-transcripten komen overeen met die van andere CMV's en ze coderen waarschijnlijk voor eiwitten die betrokken zijn bij de initiatie van de genexpressiecascade tijdens een lytische infectie. Het niet detecteren van de IE-AS-transcripten in deze eerdere studie kan verklaard worden door de specificiteit voor de sense streng van de meeste experimenten die werden uitgevoerd in deze studie en door de relatief lage transcriptieniveaus van deze transcripten. Het niet detecteren van deze transcripten met Northern blot analyse is in overeenstemming met onze bevindingen.

De identificatie van de nieuwe IE-AS-transcripten is intrigerend, maar de functie van deze transcripten tijdens een RCMV-infectie moet nog worden bepaald. Deze transcripten coderen mogelijk voor functionele eiwitten, maar het is ook mogelijk dat de transcripten zelf betrokken zijn bij de modulatie van IE1-expressie. De IE-AS-transcripten zijn deels complementair aan het IE1-transcript en ze zouden de expressie van IE1 kunnen onderdrukken door de formatie van dubbelstrengs RNA-moleculen met het complementaire IE1-transcript. Er is echter geen direct bewijs voor dit

posttranscriptionele mechanisme voor het onderdrukken van IE1-genexpressie tijdens een RCMV-infectie.

Het is interessant dat een antisense transcript van het MIE-gebied eerder ook geïdentificeerd is voor HCMV (Kondo et al., 1996). Dit transcript, dat getranscribeerd wordt in latent geïnfecteerde granulocyt-macrofaag voorlopercellen in kweek en in beenmerg van gezonde seropositieve personen, werd omschreven als een 'CMV latency-associated transcript' (CLT) (Kondo et al., 1996). In het licht van de potentiële rol van de HCMV antisense CLT in de regulatie van latentie is de identificatie van de RCMV IE-AS-transcripten fascinerend. Het is verleidelijk om te speculeren dat de HCMV antisense CLT en de RCMV IE-AS-transcripten of hun eiwitproducten betrokken zijn bij het tot stand brengen of het in stand houden van latentie door middel van posttranscriptionele onderdrukking van IE1-genexpressie. Interessant is dat een vergelijkbare rol in de regulatie van latentie ook is voorgesteld voor een antisense transcript van het HCMV UL81-82-gebied dat recent geïdentificeerd werd in monocyten en beenmerg van gezonde seropositieve personen (Bego et al., 2005). Dit transcript is deels complementair aan het HCMV UL82-gen dat codeert voor het pp71-tegumenteiwit ('upper matrix protein'), een bekende transcriptionele activator van de HCMV MIE-promoter/enhancer (Bego et al., 2005). Er werd daarom gesuggereerd dat het HCMV antisense UL81-82-transcript of zijn eiwitproduct betrokken zou kunnen zijn bij de regulatie van latentie door het beperken van de expressie van het HCMV MIE-gebied door posttranscriptionele onderdrukking van UL82-genexpressie. De potentiële rol van antisense transcripten van lytische CMV-genen in de regulatie van latentie is interessant, maar hun functie is nog niet experimenteel vastgesteld. Het RCMV/ratmodel zou zeer bruikbaar kunnen zijn bij het onderzoeken van hun functie. Een RCMV-tegenhanger van het HCMV antisense UL81-82-transcript is tot nog toe niet geïdentificeerd, maar een uitgebreidere karakterisatie van de potentiële rol van de RCMV IE-AS-transcripten in de modulatie van IE1-expressie en de regulatie van latentie zou kunnen leiden tot een beter begrip van de potentiële functie van de HCMV antisense CLT. Het is op dit moment echter onbekend of de IE-AS-transcripten ook daadwerkelijk getranscribeerd worden tijdens RCMV-latentie. Om dit te onderzoeken zal er een model voor RCMV-latentie en -reactivatie moeten worden ontwikkeld. Er zijn diverse data over RCMV-latentie, maar de data over RCMV-activatie zijn erg beperkt (Blok et al., 2001; Bruggeman et al., 1983; Bruning et al., 1986, 1988, 1989; Yagyū et al., 1992, 1993). Naar alle waarschijnlijkheid kunnen verdere experimenten naar de moleculaire mechanismen die RCMV-latentie en -reactivatie reguleren gedaan worden in de nabije toekomst, wanneer meer precieze

gegevens over deze biologische processen beschikbaar komen. Met name de rol van de IE-AS-transcripten in de regulatie van latentie zou een interessant onderwerp kunnen zijn voor verdere studies.

Met betrekking tot latentie is de identificatie van een homoloog van de *rep*-genen van parvovirussen in het RCMV-genoom intrigerend (Vink et al., 2000). Een homoloog van deze genen werd eerder ook gevonden op een vergelijkbare positie in de genomen van humaan herpesvirus type 6A (HHV-6A) en 6B (HHV-6B) (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Thomson et al., 1991), maar niet in het genoom van elk ander herpesvirus. De *rep*-gen homologen van RCMV (r127) en HHV-6A en -6B (U94) zijn waarschijnlijk ontstaan uit een gemeenschappelijk voorouderlijk bèta-herpesvirus-gen, aangezien ze geconserveerd zijn in sequentie, genomische positie en oriëntatie (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Vink et al., 2000). De afwezigheid van *rep*-gen homologen in de genomen van andere bèta-herpesvirussen is daarom opmerkelijk. Wij veronderstellen dat het *rep*-gen verkregen werd door een voorouderlijk bèta-herpesvirus tijdens een coïnfecatie met een voorouderlijk parvovirus en dat het een nieuwe functie heeft ontwikkeld in de replicatiecycli van RCMV en HHV-6A en -6B, maar dat het uit de genomen van andere bèta-herpesvirussen verloren is gegaan door een gebrek aan positieve selectiedruk. De rol van de eiwitten die gecodeerd worden door de *rep*-gen homologen van RCMV en HHV-6A en -6B in de pathogenese van infectie is echter nog steeds onduidelijk. Desalniettemin is gebleken dat U94 getranscribeerd wordt in latent geïnfecteerde perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC's) van HHV-6A-geïnfecteerde personen, terwijl zowel virusreplacatie als expressie van virale genen beperkt blijken te zijn in HHV-6A-geïnfecteerde lymfocyten die HHV-6B U94 tot expressie brengen in vitro (Rotola et al., 1998). Dit heeft geleid tot de hypothese dat het door U94 gecodeerde eiwit (RepH6) betrokken is bij het tot stand brengen of het in stand houden van HHV-6A- en -6B-latentie. Of het door r127 gecodeerde eiwit (pr127) betrokken is bij de regulatie van RCMV-latentie is op dit moment onbekend. Om een begin te maken met het ontrafelen van de rol van pr127 in de replicatiecyclus van RCMV hebben we experimenten opgezet om het RCMV r127-gen te karakteriseren tijdens een lytische infectie in vitro en tijdens de acute fase van infectie in vivo (**Hoofdstuk 4**). Hiertoe werd een RCMV r127-deletiemutant (RCMV Δ r127) gegenereerd. In deze deletiemutant is een deel van het 'open reading frame' (ORF) van r127 vervangen door een neomycine-resistentiegen (*neo*). De replicatiekarakteristieken van RCMV Δ r127 werden vergeleken met die van

wildtype RCMV (wt RCMV). Deze studie laat zien dat RCMV Δ r127 met dezelfde efficiëntie repliceert als wt RCMV, zowel tijdens een lytische infectie in vitro als tijdens de acute fase van infectie in vivo. Dit toont aan dat r127 niet noodzakelijk is voor virusrepletie en doet de vraag rijzen of pr127 mogelijk een vergelijkbare rol speelt als RepH6 in de regulatie van latentie. Het is niet onwaarschijnlijk dat pr127 inderdaad een geconserveerde functie heeft met betrekking tot RepH6, aangezien deze eiwitten verschillende karakteristieken blijken te delen. Zo hebben wij bijvoorbeeld laten zien dat pr127 een DNA-bindingsactiviteit bezit. Deze eigenschap werd eerder ook toegekend aan RepH6 (Dhepakson et al., 2002), hoewel de DNA-bindingsactiviteiten van pr127 en RepH6 verschillend lijken te zijn. Terwijl pr127 blijkt te binden aan zowel enkel- als dubbelstrengs DNA, blijkt RepH6 uitsluitend te binden aan enkelstrengs DNA (Dhepakson et al., 2002). In vergelijking met RepH6 is pr127 bovendien ernstig verkort aan zijn N-terminus (Vink et al., 2000). Door deze verkorting is het erg onwaarschijnlijk dat pr127 een aantal andere karakteristieken van RepH6 deelt, zoals het vermogen om parvovirale Rep-eiwitten te complementeren (Thomson et al., 1994). Het blijft daarom speculatief of pr127 inderdaad de functionele homolog van RepH6 vertegenwoordigt. Toch heeft pr127, naast zijn potentiële rol in de regulatie van latentie, waarschijnlijk ook een functie tijdens een productieve infectie. Deze hypothese is gebaseerd op de observatie dat dit eiwit tot expressie komt tijdens een lytische infectie in vitro en tijdens de acute fase van infectie in vivo. We hebben weliswaar gevonden dat pr127 niet noodzakelijk is voor virusrepletie, maar de functie van dit eiwit is mogelijk subtiel en is daardoor misschien niet opgemerkt in onze studie.

Over de regulatie van CMV-latentie en -reactivatie is op dit moment nog erg weinig bekend. Het is echter duidelijk dat het vermogen van de CMV's om een levenslange, stabiele relatie te onderhouden met hun gastheren strategieën vereist om het immuunsysteem te ontwijken en te manipuleren. Het is interessant dat onder de CMV-genen die betrokken zijn bij deze strategieën zich genen bevinden die coderen voor homologen van cellulaire G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR's) en chemokinen (CK's). Deze genen zijn waarschijnlijk geroofd uit het genoom van de gastheer tijdens de lange co-evolutie van virus en gastheer. In **Hoofdstuk 5** wordt de huidige staat van kennis over de door de CMV's gecodeerde homologen van GPCR's en CK's besproken. Deze eiwitten lijken te interfereren met CK-signaleringsroutes die essentieel zijn voor het goed functioneren van het immuunsysteem. Door te interfereren met deze routes stellen de door de CMV's gecodeerde GPCR's en CK's het virus mogelijk in staat om te

ontsnappen aan klaring door het immuunsysteem door de normale cellulaire migratiepatronen van leukocyten te verstoren. De interferentie met CK-signaleringsroutes zou ook kunnen bijdragen aan het aantrekken van ontvankelijke leukocyten naar de oorspronkelijke infectiehaarden. Deze leukocyten zouden kunnen dienen als dragers voor virusdisseminatie.

Voor GPCR's en CK's coderende genen zijn gevonden in de genomen van alle gesequente CMV's. Bijzonder interessant zijn met name de UL33 en UL78 GPCR-genfamilies, aangezien leden van deze families aanwezig zijn in alle gesequente bèta-herpesvirussen, waaronder HCMV, RCMV, MCMV, HHV-6A, HHV-6B en HHV-7 (Beisser et al., 1998b, 1999; Chee et al., 1990a,b; Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999; Nicholas, 1996; Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). Voor de UL33-achtige genen van de CMV's is aangetoond dat ze coderen voor functionele GPCR's met ligand-onafhankelijke, constitutieve signaleringsactiviteiten (Casarosa et al., 2003; Gruithuisen et al., 2002; Waldhoer et al., 2002). Of de UL78-achtige genen van de CMV's eveneens coderen voor functionele GPCR's is nog niet gerapporteerd. Toch werd het aannemelijk geacht dat zowel de UL33- als de UL78-achtige genen zouden coderen voor eiwitten met belangrijke functies in de pathogenese van infectie, aangezien ze geconserveerd zijn onder alle gesequente bèta-herpesvirussen. De generatie en karakterisatie van recombinante CMV-stammen heeft inderdaad aangetoond dat de UL33- en UL78-achtige genen van RCMV en MCMV coderen voor eiwitten die van cruciaal belang zijn in de pathogenese van infectie (Beisser et al., 1998b, 1999; Davis-Poynter et al., 1997; Kaptein et al., 2003; Oliveira en Shenk, 2001; Streblow et al., 2005). Gezien hun conservatie onder de bèta-herpesvirussen is het waarschijnlijk dat andere UL33- en UL78-achtige genen van vergelijkbaar belang zijn. De GPCR's die gecodeerd worden door deze genen zijn bovendien gemakkelijk toegankelijk op het celoppervlak. De door UL33 en UL78 gecodeerde GPCR's van HCMV zijn daarom interessante aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe antivirale therapieën. Dit geldt eveneens voor de door US27 en US28 gecodeerde GPCR's van HCMV (Chee et al., 1990a,b). Er is weinig bekend over US27, maar voor US28 is aangetoond dat het codeert voor een functionele GPCR met zowel ligand-afhankelijke als ligand-onafhankelijke, constitutieve signaleringsactiviteiten (Billstrom et al., 1998; Casarosa et al., 2001; Gao en Murphy, 1994; McLean et al., 2004; Melnychuk et al., 2004; Streblow et al., 1999, 2003; Waldhoer et al., 2002). In tegenstelling tot UL33 en UL78 hebben US27 en US28 echter geen tegenhangers in RCMV en MCMV. De biologische significantie van deze genen in de pathogenese van

infectie is daarom niet bekend. Dit geldt eveneens voor de voor CXC-CK coderende genen UL146 en UL147 van HCMV (Penfold et al., 1999). De CK's die gecodeerd worden door deze genen zijn eveneens potentiële aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe antivirale therapieën. In analogie met US27 en US28 zijn homologen van UL146 en UL147 echter niet aanwezig in RCMV en MCMV. Het voor een CC-CK coderende gen UL128 van HCMV heeft echter wel een tegenhanger in RCMV (Aker et al., 2003). De UL128-homoloog van RCMV werd r129 genoemd (Kaptein et al., 2004). Op dit moment zijn we recombinante RCMV-stammen aan het genereren om de biologische significantie van r129 te bestuderen. Deze studies zullen niet alleen meer duidelijkheid verschaffen over de functie van de door r129 gecodeerde CK in de pathogenese van een RCMV-infectie, maar ze zullen ook aantonen of HCMV UL128 gezien kan worden als een potentieel aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van nieuwe antivirale middelen. Het is duidelijk dat het RCMV/ratmodel van groot belang zal zijn voor de ontwikkeling en evaluatie van deze middelen.

Verskillende aspecten van RCMV-genexpressie en een geselecteerde set van RCMV-genen werden bestudeerd in dit proefschrift. De rol van de meeste RCMV-genen in de pathogenese van infectie moet nog worden opgehelderd, maar onze data dragen bij aan de kennis van de complexe moleculaire biologie van de CMV's. De resultaten die beschreven worden in dit proefschrift ondersteunen bovendien de geschiktheid van het RCMV/ratmodel voor het bestuderen van de functie van CMV-genen tijdens verschillende stadia van infectie. Aanzienlijk wat data laten zien dat de meeste eigenschappen van RCMV gedeeld worden door alle CMV's, waardoor het RCMV/ratmodel een aantrekkelijk model is voor het bestuderen van de mechanismen die betrokken zijn bij de door CMV geïnduceerde pathologieën. RCMV bezit echter ook een aantal unieke eigenschappen die niet gedeeld worden door de andere CMV's, zoals de parvovirale *rep*-gen homoloog r127. Door deze unieke eigenschappen is het soms moeilijk om de resultaten van RCMV-studies in ratten te extrapoleren naar HCMV-infecties in mensen. Desalniettemin bieden diermodellen de mogelijkheid om de interactie tussen virus en gastheer te bestuderen. Deze modellen zijn daarom onmisbaar in het CMV-onderzoek.

Referenties

Aker P, Cunningham C, McSharry BP, Dolan A, Addison C, Dargan DJ, et al. Two novel spliced genes in human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2003;84:1117-22.

-
- Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St. Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol* 2005;79:11022-34.
- Beisser PS, Kaptein SJF, Beuken E, Bruggeman CA, Vink C. The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains. *Virology* 1998a;246:341-51.
- Beisser PS, Vink C, van Dam JG, Grauls G, Vanherle SJV, Bruggeman CA. The R33 G protein-coupled receptor gene of rat cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J Virol* 1998b;72:2352-63.
- Beisser PS, Grauls G, Bruggeman CA, Vink C. Deletion of the R78 G protein-coupled receptor gene from rat cytomegalovirus results in an attenuated, syncytium-inducing mutant strain. *J Virol* 1999;73:7218-30.
- Billstrom MA, Johnson GL, Avdi NJ, Scott Worthen G. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1998;72:5535-44.
- Blok MJ, Savelkoul KGM, Grauls GELM, Bruggeman CA, Vink C. Immediate early-1 mRNA expression and virus production are restricted during the acute phase of rat cytomegalovirus infection in immunocompetent rats. In: Blok MJ, editor. *Monitoring the course of CMV infection by detection of specific viral transcripts*. ANDI Press, Geleen, The Netherlands 2001:91-124.
- Bruggeman CA, Meijer H, Dormans PHJ, Debie WMH, Grauls GELM, van Boven CPA. Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Arch Virol* 1982;73:231-41.
- Bruggeman CA, Debie WMH, Grauls G, Majoor G, van Boven CPA. Infection of laboratory rats with a new cytomegalo-like virus. *Arch Virol* 1983;76:189-99.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Boven CP, van Breda Vriesman PJ. Passive transfer of cytomegalovirus by cardiac and renal organ transplants in a rat model. *Transplantation* 1986;41:695-8.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Breda Vriesman PJ. The transfer of cytomegalovirus infection in rats by latently infected renal allografts, and the role of various immunosuppressive regimens in virus reactivation. *Transplantation* 1988;46:623-4.
- Bruning JH, Bruggeman CA, van Boven CP, van Breda Vriesman PJ. Reactivation of latent rat cytomegalovirus by a combination of immunosuppression and administration of allogeneic immunocompetent cells. *Transplantation* 1989;47:917-8.
- Casarosa P, Bakker RA, Verzijl D, Navis M, Timmerman H, Leurs R, et al. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem* 2001;276:1133-7.
- Casarosa P, Gruijthuisen YK, Michel D, Beisser PS, Holl J, Fitzsimons CP, et al. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded receptor UL33 differs from that of its rat cytomegalovirus homolog R33 by promiscuous activation of G proteins of the G_q, G_i, and G_s classes. *J Biol Chem* 2003;278:50010-23.
- Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol* 1999;73:5757-66.

- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990a;154:125-69.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 1990b;344:774-7.
- Davis-Poynter NJ, Lynch DM, Vally H, Shellam GR, Rawlinson WD, Barrell BG, et al. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J Virol* 1997;71:1521-9.
- Dhepakson P, Mori Y, Jiang YB, Huang HL, Akkapaiboon P, Okuno T, et al. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 2002;83:847-54.
- Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999;73:8040-52.
- Gao JL, Murphy PM. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:28539-42.
- Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin MED, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995;209:29-51.
- Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16255-60.
- Goodrum F, Jordan CT, Terhune SS, High K, Shenk T. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood* 2004;104:687-95.
- Grujthuijsen YK, Casarosa P, Kaptein SJF, Broers JLV, Leurs R, Bruggeman CA, et al. The rat cytomegalovirus R33-encoded G protein-coupled receptor signals in a constitutive fashion. *J Virol* 2002;76:1328-38.
- Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999;73:8053-63.
- Kaptein SJF, Beisser PS, Grujthuijsen YK, Savelkoul KGM, van Cleef KWR, Beuken E, et al. The rat cytomegalovirus R78 G protein-coupled receptor gene is required for production of infectious virus in the spleen. *J Gen Virol* 2003;84:2517-30.
- Kaptein SJF, van Cleef KWR, Grujthuijsen YK, Beuken EVH, van Buggenhout L, Beisser PS, et al. The r131 gene of rat cytomegalovirus encodes a proinflammatory CC chemokine homolog which is essential for the production of infectious virus in the salivary glands. *Virus Genes* 2004;29:43-61.
- Kondo K, Xu J, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11137-42.

-
- McLean KA, Holst PJ, Martini L, Schwartz TW, Rosenkilde MM. Similar activation of signal transduction pathways by the herpesvirus-encoded chemokine receptors US28 and ORF74. *Virology* 2004;325:241-51.
- Melnychuk RM, Streblov DN, Smith PP, Hirsch AJ, Pancheva D, Nelson JA. Human cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor US28 mediates smooth muscle cell migration through G α 12. *J Virol* 2004;78:8382-91.
- Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. *J Virol* 1996;70:5975-89.
- Oliveira SA, Shenk TE. Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3237-42.
- Penfold MET, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, et al. Cytomegalovirus encodes a potent α chemokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9839-44.
- Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996;70:8833-49.
- Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13911-6.
- Stals FS, Bosman F, van Boven CPA, Bruggeman CA. An animal model for therapeutic intervention studies of CMV infection in the immunocompromised host. *Arch Virol* 1990;114:91-107.
- Streblov DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999;99:511-20.
- Streblov DN, Vomaske J, Smith P, Melnychuk R, Hall L, Pancheva D, et al. Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediated by focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 2003;278:50456-65.
- Streblov DN, Kreklywich CN, Smith P, Soule JL, Meyer C, Yin M, et al. Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is reduced with mutation of the chemokine-receptor R33. *Am J Transplant* 2005;5:436-42.
- Thomson BJ, Efstathiou S, Honess RW. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 1991;351:78-80.
- Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn R. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 1994;204:304-11.
- Vink C, Beuken E, Bruggeman CA. Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J Virol* 2000;74:7656-65.
- Waldhoer M, Kledal TN, Farrell H, Schwartz TW. Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *J Virol* 2002;76:8161-8.

- Yagyu K, Steinhoff G, Duijvestijn AM, Bruggeman CA, Matsumoto H, van Breda Vriesman PJ. Reactivation of rat cytomegalovirus in lung allografts: an experimental and immunohistochemical study in rats. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:1031-40.
- Yagyu K, van Breda Vriesman PJ, Duijvestijn AM, Bruggeman CA, Steinhoff G. Reactivation of cytomegalovirus with acute rejection and cytomegalovirus infection with obliterative bronchiolitis in rat lung allografts. *Transplant Proc* 1993;25:1152-4.
- Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 1997;6:57-66.