

Characterization of rat cytomegalovirus genes that play a crucial role in the pathogenesis of virus infection

Citation for published version (APA):

Kaptein, S. J. F. (2004). *Characterization of rat cytomegalovirus genes that play a crucial role in the pathogenesis of virus infection*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20041215sk>

Document status and date:

Published: 01/01/2004

DOI:

[10.26481/dis.20041215sk](https://doi.org/10.26481/dis.20041215sk)

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.

Summary and General Discussion

Human cytomegalovirus (HCMV) constitutes a major cause of morbidity and mortality amongst immunocompromised subjects, particularly in transplant recipients and patients suffering from AIDS. Additionally, HCMV was reported to be implicated in various vascular disease processes, as reviewed in Chapter 1. Evidence regarding a potential involvement of CMV in the development or exacerbation of vessel wall pathologies was provided by experiments using the RCMV (Maastricht strain)/rat model (Chapter 1). Moreover, this animal model has also proven to be a highly suitable model to examine whether or not (novel) antiviral agents are efficacious in controlling CMV infections.

HCMV infections are generally treated using antiviral agents that inhibit viral DNA synthesis, such as ganciclovir, cidofovir, or foscarnet. Ganciclovir (GCV) or 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanide (DHPG) represents an acyclic analogue of the natural nucleoside 2-deoxyguanoside. Following intracellular phosphorylation of ganciclovir to ganciclovir-triphosphate by the HCMV-encoded protein kinase pUL97, the compound competes with deoxyguanoside triphosphate, resulting in an inhibition of viral DNA synthesis [11, 25, 29]. Cidofovir (CDV) forms an acyclic analogue of the corresponding monophosphate of deoxycytidine. In contrast to GCV, CDV does not require CMV-mediated initial phosphorylation. In fact, CDV is directly converted to the active triphosphate, after which it competes with deoxycytosine-5'-triphosphate in the incorporation process during viral DNA synthesis [23]. Lastly, foscarnet (FOS) or trisodium phosphonoformic acid (PFA) constitutes a pyrophosphate analogue. Contrarily to the mechanism of action of GCV and CDV, FOS directly inhibits the viral DNA polymerase by reversibly associating to the pyrophosphate binding site of DNA polymerases of herpesviruses, including the DNA polymerase encoded by HCMV [7]. However, current antiviral drug therapy was reported to concomitantly cause considerable toxic side effects, such as a deteriorated function of the central nervous system, renal function impairment, bone marrow hypoplasia, and leukopenia [17, 21, 33]. Moreover, the increased emergence of (multiple) drug resistant CMV strains nowadays represents a major menace to a successful treatment of CMV infections [9, 14, 24, 40]. Resistance to current antiviral compounds is associated with the occurrence of mutations in either the HCMV UL97 and/or the UL54 gene, which encodes the catalytic subunit of the viral DNA polymerase [2, 15, 22, 41, 42, 46]. Therefore, finding novel targets for the generation of antiviral agents is considered to be one of the main priorities in CMV research to date.

An interesting target for antiviral drug therapy development concerns the essential HCMV UL44-encoded DNA polymerase accessory protein (DPAP), also designated infected cell protein 36 (ICP36). This protein represents the other subunit of the CMV-encoded DNA polymerase [15, 22]. DPAP was reported to bind double-stranded DNA, to interact specifically with pUL54, to promote long-chain DNA synthesis, and to be required for viral replication [10, 26, 35, 37, 45]. Interestingly, it was recently demonstrated that pUL44 is phosphorylated by HCMV pUL97, implying that pUL97 might play a coregulatory role in CMV genome replication [28]. Like all sequenced herpesvirus genomes to date, the RCMV genome was also found to harbour a cognate UL44 gene [43]. This so-called R44 gene is expressed during the early and late phases

of RCMV infection *in vitro*, yielding a potentially highly phosphorylated protein that localizes to the nucleus of RCMV-infected cells both *in vitro* and *in vivo* [19; Chapter 2]. Due to the relatively high overall identity between pR44 and pUL44 (Chapter 2), the RCMV/rat model may be employed to investigate the effectiveness of novel antiviral drugs which are directed against the pUL44 protein.

As a consequence of the increased emergence of CMV strains that are resistant to the viral replication inhibitors GCV, CDV and/or FOS, it may be critical to develop antiviral compounds that, in contrast to current antiviral agents, do not seize the viral DNA polymerase but, instead, act at different targets. Hence, the membrane-associated and, thus, readily accessible CMV-encoded GPCRs may constitute more attractive antiviral targets. As to the putative GPCR genes present within the genome of HCMV, UL33 forms a highly eligible drug target, since this gene is conserved within the genomes of all known betaherpesviruses, suggestive of its biological relevance. Indeed, the UL33-encoded homologues expressed by RCMV and MCMV (pR33 and pM33, respectively) were found to exert pivotal roles in virus replication *in vivo*. This was established by studying recombinant viruses in which either the R33 or M33 gene was disrupted or in which the R33 gene was fused to the EGFP (enhanced green fluorescent protein) gene. Unlike the wild type virus, these recombinants were unable to establish a high-titer infection in the salivary glands of infected animals [4, 8, 18; Chapter 3]. Furthermore, both pR33 and pM33 were reported to play an important role in the pathogenesis of CMV infection [4, 8]. Intriguingly, it has recently become clear that the R33 gene as well as its counterparts within the genome of HCMV and MCMV indeed encode functionally active GPCRs, which are capable of triggering several signal transduction pathways in an agonist-independent, constitutive fashion [5, 12, 13, 44]. Also, when cells were transfected with EGFP-tagged versions of above-mentioned proteins, these proteins were found to co-localize with the cell membrane [13, 44]. Moreover, UL33-like genes present within the genomes of human herpesvirus 6 (HHV-6) and 7 (HHV-7), both designated U12, were reported to encode proteins capable of binding various CC (or β) chemokines, such as RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MIP-3 β [16, 32].

In addition to UL33, the HCMV genome contains yet another GPCR-like gene, termed UL78, that is conserved in the genomes of all currently known betaherpesviruses, and, hence, may serve as a candidate for targeting anti-CMV drug therapy. However, contrarily to UL33, direct proof regarding UL78's GPCR nature is still lacking. Hitherto, researchers have been unsuccessful in their attempts to demonstrate that pUL78, or either one of its rodent CMV homologues, is capable of activating signaling pathways. The assumption that the UL78-like genes might putatively encode GPCRs was based on the following structurally conserved features that are present within the predicted amino acid sequences: (i) a central core domain consisting of seven transmembrane helices; (ii) two conserved cysteine residues within the predicted first and second extracellular loop, which may be involved in proper folding of the alleged GPCR; and (iii) a conserved (D/E)R(L/I) motif within the predicted second intracellular loop that is thought to be required for G protein-coupling [3]. Indirectly, however, there are indications that the UL78-like genes found in the different CMV genomes may indeed represent GPCR genes. The UL78-like protein encoded by HHV-6 U51, denoted pU51, was expressed in and transported to the cell surface of productively infected cord blood mononuclear cells as well as in several T-lymphocytic cell lines [30]. Additionally, when stably expressed in K562 cells, pU51 was shown to specifically bind RANTES [31].

Moreover, in competitive binding assays, the host chemokines MCP-1, MCP-3, MCP-4, and eotaxin, as well as the HHV-8 expressed chemokine vMIPII were capable of competing for RANTES binding by pU51 [31]. Altogether, these data imply that, analogous to the putative HHV-6 pU51 GPCR, the pUL78 homologues may display similar properties.

In order to monitor the expression of pR78 *in vitro* and *in vivo*, and because antibodies against this protein were lacking, a recombinant RCMV strain was generated that expresses an EGFP-tagged version of pR78 instead of its native counterpart [18; Chapter 3]. This recombinant virus strain was denoted RCMV78G. Interestingly, the R78-EGFP gene was able to only partially functionally replace its native R78 gene *in vitro* as well as *in vivo*. RCMV78G as well as strain RCMV Δ R78a, which carries a disrupted R78 gene, replicated with a lower efficiency than WT RCMV *in vitro*. When spleens were examined for the presence of infectious virus, virus could not be detected in spleen samples from any of the RCMV78G- or RCMV Δ R78a-infected rats at day 5 post infection (p.i.), whereas virus replicated productively in the spleen from wildtype (WT) RCMV-infected rats. Similarly, in spleen samples from RCMV Δ R78a-infected rats, the titers of infectious virus were also below detection level. Intriguingly, contrarily to the virus titers, the viral genomic DNA levels in the spleen were not found to differ significantly between either RCMV78G- and RCMV Δ R78a-infected rats on the one hand and WT RCMV-infected rats on the other, as determined by real-time, quantitative PCR. Moreover, expression of pR78-EGFP could easily be detected in the spleen (as well as the liver) of RCMV78G-infected rats. Altogether, these data suggest that, although both R78 mutant strains appear to enter the spleen as efficiently as WT RCMV, neither RCMV78G nor RCMV Δ R78a is capable of replicating with an efficiency similar to that of WT RCMV. Correspondingly, an M78-deleted MCMV strain was also reported to be defective in replication in the spleen [34]. In contrast to both RCMV78G and RCMV Δ R78a, however, this strain was also demonstrated to replicate less efficiently than WT MCMV in the salivary glands as well as liver of infected mice [34]. In conclusion, the UL78-like genes in RCMV and MCMV play an important role in the production of infectious virus, at least in the spleen. Moreover, these genes likely also fulfil other important, more general functions in the pathogenesis of CMV infection. This was inferred from the observation that R78- and M78-deleted mutant strains induced a significantly lower mortality amongst infected animals than did their respective WT viruses [3, 34]. Thus, these CMV-encoded GPCRs indeed constitute very attractive drug targets.

Additionally, the HCMV-encoded chemokines may represent yet other interesting targets for anti-CMV drug development, since chemokines represent one of the major constituents of the immune system. Initially, HCMV was reported to harbour two genes, UL146 and UL147, that both encode homologues of CXC (or α) chemokines and show the highest level of similarity with the host chemokine IL-8 [6, 36]. To date, homologues of UL146 and UL147 have not been found within the genomes of the rodent CMVs. Instead, the MCMV genome encloses a gene, denoted m131/129, that expresses a putative CC chemokine [27]. As expected, the RCMV genome was shown to possess a gene that was conserved in sequence as well as in position with the MCMV m131/129 gene, which was designated r131 [43]. Furthermore, it was recently predicted that RCMV may harbour an additional gene encoding a CC chemokine homologue. This gene, which was termed r129, is localized immediately downstream of r131 [1].

Intriguingly, the amino acid sequence predicted to be encoded by r129 was demonstrated to display the highest level of similarity with the sequence encoded by the recently identified UL128 gene of HCMV. UL128 represents the only HCMV gene that has currently been identified as a gene encoding a CC chemokine homologue [1]. Thus, RCMV r129 and HCMV UL128 constitute the first putative chemokine genes that may have been conserved between rodent and primate CMVs.

A study was initiated to further characterize the two adjacent CC chemokine-like genes that are present within the RCMV genome [20; Chapter 4]. As discussed above, the RCMV r131- and r129-encoded proteins were found to show the highest level of similarity with MCMV pm131/129 and HCMV pUL128, respectively. Furthermore, RCMV pr131 also showed similarity with a protein potentially encoded by the recently discovered HCMV UL130 gene. Although the UL130-encoded amino acid sequence is predicted to possess an N-terminal signal peptide, it does not contain additional features typical of chemokines.

To determine the biological relevance of the CC chemokine genes of RCMV, we have first focused our attention to the elucidation of the role of the r131 gene in the pathogenesis of RCMV infection. For this purpose, two different knockout strains were created in which the r131 gene was disrupted by a neomycin expression cassette (Chapter 4). These were designated RCMV Δ r131a, containing the *neo* gene in the opposite orientation as the r131 gene, and RCMV Δ r131b, containing the *neo* gene in the same orientation as the r131 gene. *In vitro*, the r131 gene was found to be dispensable for replication, as exemplified by the similarities in growth characteristics of WT RCMV, RCMV Δ r131a and RCMV Δ r131b in REF cells. *In vivo*, however, pronounced differences were observed between WT RCMV on the one hand, and RCMV Δ r131a and RCMV Δ r131b on the other. Neither RCMV Δ r131a, nor RCMV Δ r131b managed to replicate efficiently in the salivary glands of infected rats, whereas WT RCMV replicated productively in this organ. Similar results were found when virus was subcutaneously administered in the hind paw of rats. Interestingly, an additional difference was observed in the spleen from locally infected rats. Although infectious virus could not be detected in the spleen from any of the wild-type or recombinant virus-infected rats, a significantly higher viral DNA load was detected in the spleen from rats infected with WT RCMV than in those infected with either of the r131-knockout viruses. Moreover, during local infection, RCMV Δ r131a as well as RCMV Δ r131b induced significantly less paw swelling than did WT RCMV. Finally, when paws were examined further using immunohistochemistry, a higher number of inflammatory macrophages were observed in the WT RCMV-infected paws than in the r131 null mutant-infected paws. Similar data were previously reported for the MCMV m131/129 gene [27, 38, 39], which indicates that RCMV r131 and MCMV m131/129 indeed represent functional homologues. Both genes appear to enhance the inflammation process at the initial sites of inoculation, and, subsequently, efficient virus dissemination to or infection of the salivary glands. Also, these chemokine genes might be involved in the persistent replication of virus in the spleen.

This leaves us with the question regarding the function of the r129 gene and its HCMV counterpart, UL128. It was suggested that UL128, and thus possibly r129, might be involved in endothelial cell and leukocyte tropism (Chapter 4). To investigate this issue, and to determine the general role of the r129 CC chemokine gene in the pathogenesis of RCMV infection, we are currently generating r129-knockout viruses.

In light of the homology between the r129 and UL128 genes, it is likely that the study of these recombinant viruses will also allow us to propose a function for the HCMV UL128 gene. Once again, this demonstrates the strength of the availability of the RCMV/rat model, which allows us to study specific HCMV-like functions that can otherwise only be investigated in *in vitro* model systems.

Samenvatting en Algehele Discussie

Het humaan cytomegalovirus (HCMV) is een belangrijke veroorzaker van morbiditeit en mortaliteit onder immuungecompromitteerde personen, in het bijzonder in transplantatie- en AIDS-patiënten. Daarnaast is gemeld dat HCMV betrokken is bij verscheidene vasculaire ziekteprocessen, hetgeen uitvoerig besproken is in Hoofdstuk 1. Bewijs betreffende een mogelijke betrokkenheid van CMV in de ontwikkeling of verergering van vaatwandpathologieën is onder andere geleverd in experimenten waarbij gebruik is gemaakt van het RCMV (Maastricht stam)/rat model (Hoofdstuk 1). Bovendien is bewezen dat dit diersmodel een zeer geschikt model is om te onderzoeken of (nieuwe) antivirale agentia al dan niet doeltreffend zijn in het bedwingen van CMV-infecties.

HCMV-infecties worden normaliter behandeld met antivirale middelen die de virale DNA-synthese inhiberen, zoals ganciclovir, cidofovir, of foscarnet. Ganciclovir (GCV), ookwel 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanide (DHPG) genoemd, is een acyclische analoog van het in de natuur voorkomende nucleoside 2-deoxyguanoside. Na de intracellulaire fosforylering van ganciclovir naar ganciclovir-trifosfaat, welke gemedieerd wordt door het HCMV-gecodeerde proteïne kinase pUL97, gaat de verbinding een competitie aan met deoxyguanoside trifosfaat, resulterend in een remming van de virale DNA-synthese [11, 25, 29]. Cidofovir (CDV) vertegenwoordigt een acyclische analoog van de overeenkomende monofosfaatvorm van deoxycytidine. In tegenstelling tot GCV vereist CDV geen CMV-gemedieerde initiële fosforylering. In feite wordt CDV rechtstreeks omgezet in de actieve trifosfaatverbinding, waarna het een competitie aangaat met deoxycytosine-5'-trifosfaat in het incorporatieproces tijdens de virale DNA-synthese [23]. Ten slotte vormt foscarnet (FOS) of trisodium fosfonofosfaat (PFA) een pyrofosfaat-analoog. In tegenstelling tot het werkingsmechanisme van GCV en CDV inhibeert FOS rechtstreeks het virale DNA-polymerase door een reversibele binding aan te gaan met de pyrofosfaat-bindingsplaats van de DNA-polymerases van herpesvirussen, inclusief het DNA-polymerase dat gecodeerd wordt door HCMV [7]. Echter, van de huidige antivirale therapie is bekend dat deze gepaard gaat met aanzienlijke toxische bijwerkingen, zoals een verslechterde functie van het centraal zenuwstelsel, een aangetaste nierfunctie, beenmerg hypoplasie en leukopenie [17, 21, 33]. Bovendien vormt de alsmaar toenemende hoeveelheid (meervoudig) resistente CMV-stammen tegenwoordig een grote bedreiging voor een succesvolle behandeling van CMV-infecties [9, 14, 24, 40]. Resistentie tegen de huidige antivirale middelen is geassocieerd met het voorkomen van mutaties in het HCMV UL97 en/of UL54 gen, welke codeert voor de katalytische subeenheid van het virale DNA-polymerase [2, 15, 22, 41, 42, 46]. Aldus wordt het vinden van nieuwe aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van antivirale middelen heden ten dagen beschouwd als één van de voornaamste prioriteiten in het CMV-onderzoek.

Een interessant aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van antivirale therapie vormt het essentiële HCMV UL44-gecodeerde DNA-polymerase 'accessory protein' (DPAP), ookwel 'infected cell protein 36' (ICP36) genoemd. Dit eiwit vertegenwoordigt de andere subeenheid van het CMV-gecodeerde DNA-polymerase [15, 22]. Van DPAP is gerapporteerd dat het dubbelstrengs-DNA bindt, een specifieke interactie aangaat met pUL54, lange-keten DNA-synthese bevordert en vereist is voor de virale replicatie [10, 26, 35, 37, 45]. Interessant is dat recentelijk is aangetoond dat pUL44 gefosforyleerd

wordt door HCMV pUL97, wat inhoudt dat pUL97 een co-regulerende rol zou kunnen spelen in de CMV-genoomreplicatie [28]. Net als alle herpesvirusgenomen waarvan de basenvolgorde op dit moment bepaald zijn, is aangetoond dat het RCMV-genoom ook een homoloog van het UL44-gen bevat [43]. Dit zogenaamde R44-gen komt tot expressie tijdens de vroege en late fases van een RCMV-infectie *in vitro*, waarbij een mogelijk sterk gefosforyleerd eiwit ontstaat dat gelokaliseerd is in de kern van RCMV-geïnfecteerde cellen, zowel *in vitro* als *in vivo* [19; Hoofdstuk 2]. Omdat pR44 in relatief sterke mate identiek is aan pUL44 (Hoofdstuk 2), kan het RCMV/rat model aangewend worden om de werkzaamheid van nieuwe antivirale middelen die gericht zijn tegen het pUL44-eiwit te bestuderen.

Als gevolg van de toegenomen hoeveelheid CMV-stammen die resistent zijn tegen de virale replicatierepressoren GCV, CDV en/of FOS kan het van belang zijn om antivirale middelen te ontwikkelen die, in tegenstelling tot de huidige antivirale agentia, niet op het virale DNA-polymerase aangrijpen, maar in plaats daarvan op andere aangrijpingspunten inwerken. Vandaar dat de membraan-geassocieerde en dus direct toegankelijke CMV-gecodeerde GPCR's aantrekkelijkere antivirale aangrijpingspunten kunnen vormen. Wat betreft de vermeende GPCR-genen die aanwezig zijn in het genoom van HCMV vertegenwoordigt UL33 een zeer geschikt aangrijpingspunt, aangezien dit gen geconserveerd is in de genomen van alle bekende betaherpesvirussen, wat erop wijst dat dit gen biologisch relevant is. Van de UL33-gecodeerde homologen die door RCMV en MCMV tot expressie worden gebracht (respectievelijk pR33 en pM33), is inderdaad aangetoond dat ze een voorname rol vervullen in de virusreplicatie *in vivo*. Dit is vastgesteld aan de hand van studies met recombinantvirussen waarin hetzij het R33- of M33-gen verstoord is, hetzij het R33-gen gefuseerd is met een 'enhanced green fluorescent protein' (EGFP) -gen. In tegenstelling tot het wildtype virus waren deze recombinanten niet in staat om een hoge titer-virusinfectie tot stand te brengen in de speekselklieren van geïnfecteerde dieren [4, 8, 18; Hoofdstuk 3]. Bovendien is er gerapporteerd dat zowel pR33 als pM33 een belangrijke rol spelen in de pathogenese van een CMV-infectie [4, 8]. Intrigerend is dat recentelijk duidelijk is geworden dat het R33-gen, alsook equivalenten van het R33-gen in het HCMV- en MCMV-genoom, inderdaad coderen voor functioneel actieve GPCR's die in staat zijn om verscheidene signaaltransductieroutes op een ligand-onafhankelijke, constitutieve manier te activeren [5, 12, 13, 44]. Bovendien, wanneer cellen getransfekteerd worden met EGFP-gelabelde versies van bovengenoemde eiwitten, blijken deze eiwitten te colocaliseren met de celmembraan [13, 44]. Daarnaast is gemeld dat de UL33-achtige genen die zich bevinden in de genomen van humaan herpesvirus 6 (HHV-6) en 7 (HHV-7), beiden aangeduid met U12, coderen voor eiwitten die in staat zijn verscheidene CC- (of β -) chemokines te binden, zoals RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, en MIP-3 β [16, 32].

Naast UL33 bevat het HCMV-genoom nog een GPCR-achtig gen, UL78 genoemd, dat geconserveerd is in de genomen van alle tot nu toe bekende betaherpesvirussen en aldus zou kunnen dienen als een kandidaat waartegen men anti-CMV therapie zou kunnen richten. Echter, in tegenstelling tot UL33 is er een gebrek aan direct bewijs betreffende de GPCR-aard van UL78. Tot dusver zijn onderzoekers zonder resultaat geweest in hun pogingen om aan te tonen dat pUL78 of een van de knaagdier-CMV homologen in staat is om signaaltransductieroutes te activeren. De aanname dat de UL78-achtige genen mogelijk zouden kunnen coderen voor GPCR's was gebaseerd

op de volgende structureel geconserveerde kenmerken die aanwezig zijn in de voorspelde aminozuursequenties: (i) een centraal kerndomein bestaande uit zeven transmembraanhelices; (ii) twee geconserveerde cysteïne-residuen in de voorspelde eerste en tweede extracellulaire lus, die betrokken kunnen zijn bij de juiste vouwing van de zogenaamde GPCR; en (iii) een geconserveerd (D/E)R(L/I)-motief in de voorspelde tweede intracellulaire lus, waarvan gedacht wordt dat het vereist is voor G-eiwit-koppeling [3]. Echter, indirect zijn er aanwijzingen dat de UL78-achtige genen, die gevonden zijn in de verschillende CMV-genomen, inderdaad GPCR-genen kunnen vertegenwoordigen. Het UL78-achtige eiwit dat gecodeerd wordt door HHV-6 U51, aangeduid met pU51, wordt tot expressie gebracht in en naar het celoppervlak getransporteerd van productief geïnfecteerde 'cord blood' mononucleaire cellen en in verscheidene cellijnen van T-lymfocyten [30]. Daarnaast is aangetoond dat pU51 specifiek RANTES bindt wanneer het stabiel tot expressie wordt gebracht in K562-cellen [31]. Bovendien waren de gastheerchemokines MCP-1, MCP-3, MCP-4 en eotaxine, alsook het door HHV-8 tot expressie gebrachte chemokine vMIPII, in staat om met RANTES een competitie aan te gaan voor binding met pU51 [31]. Over het geheel genomen houden deze gegevens in dat, in analogie met de vermeende HHV-6 pU51 GPCR, de pUL78-homologen soortgelijke eigenschappen kunnen vertonen.

Ten einde de expressie van pR78 *in vitro* en *in vivo* kritisch te volgen en omdat antilichamen tegen dit eiwit ontbreken, is er een recombinante RCMV-stam gegenereerd die een EGFP-gelabelde versie van pR78 tot expressie brengt in plaats van z'n natuurlijke equivalent [18; Hoofdstuk 3]. Deze recombinant virusstam wordt aangeduid met RCMV78G. Interessant is dat het R78-EGFP-gen slechts gedeeltelijk in staat is z'n natuurlijke equivalent functioneel te vervangen zowel *in vitro* als *in vivo*. RCMV78G, alsook stam RCMV Δ R78a dat een verstoord R78-gen bevat, vermenigvuldigde zich met een lagere efficiëntie dan het wildtype (WT) RCMV *in vitro*. Wanneer de milt onderzocht werd op de aanwezigheid van infectieus virus kon er geen virus gedetecteerd worden in miltmonsters van elk van de RCMV78G- of RCMV Δ R78a-geïnfecteerde ratten op dag 5 na infectie (n.i.), terwijl virus zich productief vermenigvuldigde in de milt van WT RCMV-geïnfecteerde ratten. Evenzo, in miltmonsters van RCMV Δ R78a-geïnfecteerde ratten bevonden de virustiters zich onder het detectieniveau. Opmerkelijk is dat, in tegenstelling tot de virustiters, de niveaus van virale genomisch-DNA in de milt niet significant bleken te verschillen tussen hetzij RCMV78G-, of RCMV Δ R78a-geïnfecteerde ratten aan de ene kant en WT RCMV-geïnfecteerde ratten aan de andere kant, zoals vastgesteld door middel van een 'real-time', kwantitatieve PCR. Bovendien kon de expressie van pR78-EGFP gemakkelijk gedetecteerd worden in de milt (alsook in de lever) van RCMV78G-geïnfecteerde ratten. Alles samengenomen, wijzen deze gegevens erop dat, ofschoon beide R78-mutantstammen net zo efficiënt de milt binnendringen als het WT RCMV, noch RCMV78G, noch RCMV Δ R78a in staat is zich met een soortgelijke efficiëntie als WT RCMV te vermenigvuldigen. In overeenstemming hiermee is de rapportage van een M78-gedeleteerde MCMV-stam met een gebrekkige replicatie in de milt [34]. Echter, in tegenstelling tot zowel RCMV78G als RCMV Δ R78a, is aangetoond dat deze stam minder efficiënt replicateert in de speekselklieren, alsook de lever van geïnfecteerde muizen dan WT MCMV [34]. Concluderend, de UL78-achtige genen in het RCMV- en MCMV-genoom spelen een belangrijke rol in de productie van infectieus virus, ten minste in de milt. Bovendien vervullen deze genen waarschijnlijk ook andere belangrijke, meer algemene functies in de pathogenese van een CMV-

infectie. Dit is afgeleid uit de waarneming dat R78- en M78-gedeleteerde mutantstammen een significant lagere mortaliteit onder geïnfecteerde dieren veroorzaakten dan hun respectievelijke WT-virussen [3, 34]. Aldus vormen deze CMV-gecodeerde GPCR's inderdaad zeer aantrekkelijke aangrijpingspunten voor antivirale therapie.

Daarnaast vormen de HCMV-gecodeerde chemokines mogelijk nog andere interessante aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van anti-CMV therapie, aangezien chemokines één van de voornaamste bestanddelen vertegenwoordigen van het immuunsysteem. Aanvankelijk is gemeld dat HCMV twee genen herbergt, UL146 en UL147, die beiden coderen voor homologen van CXC- (or α -) chemokines en de meeste overeenkomst vertonen met het gastheerchemokine IL-8 [6, 36]. Tot op heden zijn er geen homologen van UL146 en UL147 gevonden in de genomen van de knaagdier-CMV's. In plaats daarvan bevat het MCMV-genoom een gen, aangeduid met m131/129, dat een vermeend CC-chemokine tot expressie brengt [27]. Zoals verwacht, is er aangetoond dat het RCMV-genoom een gen bevat, r131 genaamd, dat zowel in sequentie als in positie geconserveerd is met het m131/129-gen [43]. Bovendien is er recentelijk voorspeld dat het RCMV-genoom nog een gen zou kunnen herbergen dat codeert voor een CC-chemokine homoloog. Dit gen, dat r129 is genoemd, is onmiddellijk stroomafwaarts van r131 gelegen [1]. Opmerkelijk is dat de voorspelde aminozuursequentie die door r129 gecodeerd wordt de hoogste mate van overeenkomst laat zien met de sequentie die gecodeerd wordt door het recentelijk geïdentificeerde UL128-gen van HCMV. UL128 vertegenwoordigt het enige HCMV-gen dat thans geïdentificeerd is als een gen dat codeert voor een CC-chemokine homoloog [1]. Dus, RCMV r129 en HCMV UL128 vormen de eerste veronderstelde chemokine-genen die mogelijk geconserveerd zijn gebleven tussen de knaagdier- en primate-CMV's.

Om de twee aangrenzende CC-chemokine-achtige genen, die in het RCMV-genoom aanwezig zijn, verder te karakteriseren, is er een studie geïnitieerd [20; Hoofdstuk 4]. Zoals hierboven beschreven, laten de RCMV r131- en r129-gecodeerde eiwitten de hoogste mate van overeenkomst zien met respectievelijk MCMV m131/129 en HCMV UL128. Daarnaast vertoonde RCMV pr131 ook een overeenkomst met een eiwit dat mogelijk gecodeerd wordt door het recentelijk ontdekte HCMV UL130-gen. Ofschoon voorspeld is dat de UL130-gecodeerde aminozuursequentie een N-terminaal signaalpeptide bevat, bezit het geen additionele eigenschappen die kenmerkend zijn voor chemokines.

Ten einde de biologische relevantie van de CC-chemokine genen van het RCMV vast te stellen, hebben we onze aandacht eerst gericht op de rol van het r131-gen in de pathogenese van een RCMV-infectie. Met dit doel werden er twee verschillende 'knockout'-stammen gecreëerd waarin het r131-gen verstoord wordt door een neomycine expressie cassette (Hoofdstuk 4). Ze worden aangeduid met RCMV Δ r131a, waarbij de oriëntatie van het *neo*-gen tegengesteld is aan die van het r131-gen, en RCMV Δ r131b, met het *neo*-gen in dezelfde oriëntatie als het r131-gen. *In vitro* is aangetoond dat het r131-gen ontbeerlijk is voor de replicatie, zoals de overeenkomsten in de groeikarakteristieken van WT RCMV, RCMV Δ r131a en RCMV Δ r131b in REF-cellen lieten zien. Echter, *in vivo* zijn er uitgesproken verschillen waargenomen tussen WT RCMV aan de ene kant en RCMV Δ r131a en RCMV Δ r131b aan de andere kant. Noch RCMV Δ r131a, noch RCMV Δ r131b slaagde er in om zich efficiënt te vermenigvuldigen in de speekselklieren van geïnfecteerde ratten, terwijl WT RCMV

zich productief vermenigvuldigde in dit orgaan. Soortgelijke resultaten werden gevonden wanneer het virus subcutaan werd toegediend in het achterpootje van ratten. Nog een interessant verschil werd waargenomen in de milt van lokaal-geïnfekteerde ratten. Ofschoon infectieus virus niet gedetecteerd kon worden in de milt van elk van de wildtype- of recombinantvirus-geïnfekteerde ratten, werd er een significant hogere virale 'DNA-load' gevonden in de milt van ratten geïnfekteerd met WT RCMV dan in die van ratten geïnfekteerd met een van de r131-knockoutvirussen. Bovendien veroorzaakte zowel RCMV Δ r131a als RCMV Δ r131b tijdens een plaatselijke infectie significant minder zwelling van het pootje dan WT RCMV. Ten slotte, wanneer de pootjes met behulp van immunohistochemie verder onderzocht werden, werd er een groter aantal inflammatoire macrofagen geobserveerd in de WT RCMV-geïnfekteerde pootjes dan in de r131-deletiemutant-geïnfekteerde pootjes. Soortgelijke data zijn eerder gerapporteerd voor het MCMV m131/129-gen [27, 38, 39], wat erop wijst dat RCMV r131 en MCMV m131/129 inderdaad elkaars functionele homologen vertegenwoordigen. Beide genen lijken het ontstekingsproces op de initiële plaasten van inoculatie te bevorderen met daaruit volgend een efficiëntere virusdisseminatie naar of infectie van de speekselklieren. Ook zouden deze chemokine-genen betrokken kunnen zijn bij de aanhoudende vermenigvuldiging van virus in de milt.

Dat brengt ons bij de kwestie betreffende de functie van het r129-gen en z'n HCMV-equivalent, UL128. Er is gesuggereerd dat UL128, en dus mogelijk r129, betrokken zou kunnen zijn bij endotheelcel- en leukocytropisme (Hoofdstuk 4). Om deze kwestie te onderzoeken en om de algemene rol van het r129 CC-chemokine gen in de pathogenese van een RCMV-infectie vast te stellen, worden er op dit moment r129-knockoutvirussen gegenereerd. In het licht van de homologie tussen de r129- en UL128-genen is het waarschijnlijk dat het bestuderen van deze recombinantvirussen ons in staat stelt om een suggestie te doen omtrent de functie van het HCMV UL128-gen. Dit toont wederom de kracht van de bruikbaarheid van het RCMV/rat model, dat ons in staat stelt om specifieke HCMV-achtige functies te bestuderen die anders alleen in *in vitro* modelsystemen onderzocht kunnen worden.

References

1. Akter, P., Cunningham, C., McSharry, B.P., Dolan, A., Addison, C., Dargan, D.J., Hassan-Walker, A.F., Emery, V.C., Griffiths, P.D., Wilkinson, G.W.G., Davison, A.J. (2003). Two novel spliced genes in human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 84, 1117-1122.
2. Baldanti, F., Underwood, M.R., Talarico, C.L., Simoncini, L., Sarasini, A., Biron, K.K., Gerna, G. (1998). The Cys607 \rightarrow Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to two human cytomegalovirus strains recovered from two immunocompromised patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 444-446.
3. Beisser, P.S., Grauls, G.E.L.M., Bruggeman, C.A., Vink, C. (1999). Deletion of the R78 G protein-coupled receptor gene from rat cytomegalovirus results in an attenuated, syncytium-inducing mutant strain. *J. Virol.* 73, 7218-7230.
4. Beisser, P.S., Vink, C., van Dam, J.G., Grauls, G.E.L.M., Vanherle, S.J.V., Bruggeman, C.A. (1998). The R33 G protein-coupled receptor gene of rat

- cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J. Virol.* 72, 2352-2363.
5. Casarosa, P., Gruijthuisen, Y.K., Michel, D., Beisser, P.S., Holl, J., Fitzsimons, C.P., Verzijl, D., Bruggeman, C.A., Mertens, T., Leur, R., Vink, C., Smit, M.J. (2003). 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 Gq, Gi, and Gs classes. *J. Biol. Chem.* 278, 50010-50023.
 6. Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* 70, 78-83.
 7. Chrisp, P., Clissold, S.P. (1991). Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* 41, 104-129.
 8. Davis-Poynter, N.J., Lynch, D.M., Vally, H., Shellam, G.R., Rawlinson, W.D., Barrell, B.G., Farrell, H.E. (1997). Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 71, 1521-1529.
 9. Erice, A., Chou, S., Biron, K.K., Stanat, S.C., Balfour Jr, H.H., Jordan, M.C. (1989). Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N. Engl. J. Med.* 320, 289-293.
 10. Ertl, P.F., Powell, K.L. (1992). Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ICP36) expressed in insect cells. *J. Virol.* 66, 4126-4133.
 11. Faulds, D., Heel, R.C. (1990). Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* 39, 597-638.
 12. Gruijthuisen, Y.K., Beuken, E.V.H., Smit, M.J., Leurs, R., Bruggeman, Vink, C. (2004). Mutational analysis of the R33-encoded G protein-coupled receptor of rat cytomegalovirus: identification of amino acid residues critical for cellular localization and ligand-independent signaling. *J. Gen. Virol.* 85, 897-909.
 13. Gruijthuisen, Y.K., Casarosa, P., Kaptein, S.J.F., Broers, J.L.V., Leurs, R., Bruggeman, C.A., Smit, M.J., and Vink, C. (2002). The rat cytomegalovirus R33-encoded G protein-coupled receptor signals in a constitutive fashion. *J. Virol.* 76, 1328-1338.
 14. Harada, K., Eizuru, Y., Isashiki, Y., Ihara, S., Minamishima, Y. (1997). Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir. *Arch. Virol.* 142, 215-225.
 15. Heilbronn, R., Jahn, G., Burkle, A., Freese, U.K., Fleckenstein, B., zur Hausen, H. (1987). Genomic localization, sequence analysis, and transcription of the putative human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J. Virol.* 61, 119-124.
 16. Isegawa, Y., Ping, Z., Nakano, K., Sugimoto, N., Yamanishi, K. (1998). Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional β -chemokine receptor. *J. Virol.* 72, 6104-6112.
 17. Jacobson, M.A. (1992). Review of the toxicities of foscarnet. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, S11-S17.

18. Kaptein, S.J.F., Beisser, P.S., Gruijthuisen, Y.K., Savelkouls, K.G.M., van Cleef, K.W.R., Beuken, E., Grauls, G.E.L.M., Bruggeman, C.A., Vink, C. (2003). The rat cytomegalovirus R78 G protein-coupled receptor gene is required for production of infectious virus in the spleen. *J. Gen. Virol.* **84**, 2517-2530.
19. Kaptein, S.J.F., Beuken, E., Grauls, G.E.L.M., Bruggeman, C.A., Vink, C. (2001). Rat cytomegalovirus open reading frame R44 is an early-late gene that encodes a nuclear protein. *Arch. Virol.* **146**, 2211-2218.
20. Kaptein, S.J.F., van Cleef, K.W.R., Gruijthuisen, Y.K., Beuken, E.V.H., Van Buggenhout, L., Beisser, P.S., Stassen, F.R.M., Bruggeman, C.A., Vink, C. (2004). 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* **29**, 43-61.
21. Kendle, J.B., Fan Havard, P. (1998). Cidofovir in the treatment of cytomegaloviral disease. *Ann. Pharmacother.* **32**, 1181-1192.
22. Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S.C., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B.G. (1987). Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J. Virol.* **61**, 125-133.
23. Lea, A.P., Bryson, H.M. (1996). Cidofovir. *Drugs* **52**, 225-230.
24. Lepout, C., Puget, S., Pepin, J.M., Levy, S., Perronne, C., Brun-Vezinet, F., Vilde, J.L. (1993). Cytomegalovirus resistant to foscarnet: clinicovirologic correlation in a patient with human immunodeficiency virus [letter]. *J. Infect. Dis.* **168**, 1329-1330.
25. Littler, E., Stuart, A.D., Chee, M.S. (1992). Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**, 160-162.
26. Loregian, A., Rigatti, R., Murphy, M., Schievano, E., Palu, G., Marsden, H.S. (2003). Inhibition of human cytomegalovirus DNA polymerase by C-terminal peptides from the UL54 subunit. *J. Virol.* **77**, 8336-8344.
27. MacDonald, M.R., Li, X.-Y., Virgin IV, H.W. (1997). Late expression of a β chemokine homolog by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **71**, 1671-1678.
28. Marschall, M., Freitag, M., Suchy, P., Romaker, D., Kupfer, R., Hanke, M., Stamminger, T. (2003). The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology* **311**, 60-71.
29. Martin, J.C., Dvorak, C.A., Smee, D.F., Matthews, T.R., Verheyden, J.P. (1983). 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J. Med. Chem.* **26**, 759-761.
30. Menotti, L., Mirandola, P., Locati, M., Campadelli-Fiume, G. (1999). Trafficking to the plasma membrane of the seven-transmembrane protein encoded by human herpesvirus 6 U51 gene involves a cell-specific function present in T lymphocytes. *J. Virol.* **73**, 325-333.
31. Milne, R.S.B., Mattick, C., Nicholson, L., Devaraj, P., Alcami, A., Gompels, U.A. (2000). RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 β chemokine receptor. *J. Immunol.* **164**, 2396-2404.
32. Nakano, K., Tadagaki, K., Isegawa, Y., Aye, M.M., Zou, P., Yamanishi, K. (2003). Human herpesvirus 7 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J. Virol.* **77**, 8108-8115.

33. Noble, S., Faulds, D. (1998). Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 56, 115-146.
34. Oliveira, S.A., Shenk, T.E. (2001). 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* 98, 3237-3242.
35. Pari, G.S., Kacica, M.A., Anders, D.G. (1993). Open reading frames UL44, IRS1/TRS1, and UL36-UL38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus *ori*Lyt-dependent DNA synthesis. *J. Virol.* 67, 2575-2582.
36. Penfold, M.E.T., Dairaghi, D.J., Duke, G.M., Saederup, N., Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Schall, T.J. (1999). Cytomegalovirus encodes a potent α chemokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9839-9844.
37. Ripalti, A., Bocconi, M.C., Campanini, F., Landini, M.P. (1995). Cytomegalovirus-mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in astrocytoma cell line: identification of an essential gene. *J. Virol.* 69, 2047-2057.
38. Saederup, N., Aguirre, S.A., Sparer, T.E., Bouley, D.M., Mocarski, E.S. (2001). Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection. *J. Virol.* 75, 9966-9976.
39. Saederup, N., Lin, Y.C., Dairaghi, D.J., Schall, T.J., Mocarski, E.S. (1999). Cytomegalovirus-encoded β chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10881-10886.
40. Sarasini, A., Baldanti, F., Furione, M., Percivalle, E., Brerra, R., Barbi, M., Gerna, G. (1995). Double resistance to ganciclovir and foscarnet of four human cytomegalovirus strains recovered from AIDS patients. *J. Med. Virol.* 47, 237-244.
41. Smith, I.L., Cherrington, J.M., Jiles, R.E., Fuller, M.D., Freeman, W.R., Spector, S.A. (1997). High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J. Infect. Dis.* 176, 69-77.
42. Sullivan, V., Biron, K.K., Talarico, C., Stanat, S.C., Davis, M., Pozzi, L.M., Coen, D.M. (1993). A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 19-25.
43. Vink, C., Beuken, E., Bruggeman, C.A. (2000). Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 74, 7656-7665.
44. Waldhoer, M., Kledal, T.H., Farrell, H., Schwartz, T.W. (2002). Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *J. Virol.* 76, 8161-8168.
45. Weiland, K.L., Oien, N.L., Homa, F., Wathen, M.W. (1994). Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein. *Virus Res.* 34, 191-206.
46. Wolf, D.G., Lee, D.J., Spector, S.A. (1995). Detection of human cytomegalovirus mutations associated with ganciclovir resistance in cerebrospinal fluid of AIDS

patients with central nervous system disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2552-2554.