

6. ANHANG

6.1. Zusammenfassung

Aufgrund verschiedener Charakteristika ihrer Replikationsstrategie nehmen die Foamyviren innerhalb der Familie der Retroviren eine Sonderstellung ein. Entsprechend dieser Besonderheiten, welche zum Beispiel die virale Genexpression oder den Zeitpunkt der Reversen Transkription im Replikationszyklus betreffen, werden diese Viren zu einem eigenen Genus zusammengefaßt. Im Hinblick auf die virale Morphogenese grenzen sich die Foamyviren durch zweierlei Merkmale von den anderen Retroviren ab. Zum einen knospen sie im Gegensatz zu allen anderen exogenen Retroviren nicht nur an der Plasmamembran, sondern vor allem an intrazellulären Membranen. Zum anderen sind die Foamyviren zur Freisetzung ihrer Viruspartikel essentiell auf die Expression ihres Hüllproteins angewiesen, während alle anderen exogenen Retroviren auch ohne ihr jeweiliges Hüllprotein sogenannte „virus like particles“ freisetzen. Offenbar enthält das Hüllprotein der Foamyviren bisher noch nicht näher charakterisierte Strukturen, die für die Membranhüllung der internen viralen Komponenten sowie für die Freisetzung der Partikel benötigt werden und erfüllt damit neben der Rezeptorbindung und der Zellfusion noch eine weitere für das Virus essentielle Funktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das humane Foamyvirus (HFV), den am besten untersuchten Vertreter dieser Virusgruppe, gezeigt, daß fremde virale Hüllproteine wie das Env-Protein der murinen Leukämieviren (MLV) oder das Glykoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) nicht in der Lage sind, die Funktion des homologen FV Hüllproteins zu übernehmen und entsprechend die Freisetzung von Foamyviren zu unterstützen. Da von diesen Glykoproteinen bekannt ist, daß sie andere Retroviren effizient pseudotypisieren, weisen diese Befunde darauf hin, daß HFV Kapside auf ganz spezifische Interaktionen mit ihrem Hüllprotein angewiesen sind. Angesichts dieser Tatsache wurden mit Hilfe von Deletions- und Punktmutanten sowie mit chimären Proteinen untersucht, welche Domänen des HFV Env-Proteins in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, daß der kurze zytoplasmatische Teil des Proteins sowie das am C-Terminus liegende „ER-retrieval signal“ weder für die Freisetzung der Viren, noch für deren Infektiosität benötigt wird. Im Gegensatz dazu erwies die Analyse von Deletionsmutanten und von chimären Hüllproteinen, die über heterologe Domänen in der Membran verankert waren, daß der ausgedehnte Transmembranbereich des HFV Hüllproteins wichtige

Aufgaben in bezug auf die Partikelfreisetzung übernimmt. Die in dieser Beziehung wichtigen Strukturen scheinen in den N-terminal liegenden Bereichen der langen membranspannenden Domäne (MSD) zu liegen, da Deletionen bis weit in die MSD hinein toleriert werden. Allerdings enthält die membranspannende Domäne offensichtlich nicht alle für die HFV Partikelfreisetzung benötigten Informationen, da chimäre Proteine, die über diese Domäne des HFV Hüllproteins verfügen, dennoch den HFV Partikelexport nicht unterstützen.

Die Analyse der Fusionsaktivität der HFV Hüllproteinmutanten zeigte, daß der zytoplasmatische Teil des Proteins nicht essentiell für die Fusion benötigt wird. Allerdings verlor das Hüllprotein seine Fusogenität sobald der C-terminale Bereich der MSD entfernt wurde. Da Untersuchungen zur Oberflächenexpression ergaben, daß das auf diese Weise deletierte Protein mit der Zellmembran verbunden bleibt, genügt offenbar der N-terminale Teil der MSD für die Membranverankerung. Das wildtypische HFV Hüllprotein zeigte in den Fusionsanalysen nur relativ schwache Fusionsaktivität. Dieser Befund wird wahrscheinlich durch die schwache Oberflächenexpression des Proteins bedingt. Bei Koexpression von HFV Gag/Pol kam es zur Partikelfreisetzung und damit auch zu deutlich gesteigerter Fusionsaktivität. Mit Hilfe von Punktmutanten wurde die Bedeutung eines zentral in der MSD liegenden Lysin-Prolin Motivs charakterisiert. Die Mutation dieser konservierten Aminosäuren führte zu einer drastischen Erhöhung der Fusionsaktivität des Hüllproteins, welche für die meisten Mutanten im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression der jeweiligen Proteine an der Zelloberfläche steht. Entsprechend ist das konservierte Lysin-Prolin Motiv innerhalb der MSD vermutlich Teil eines Transportsignals, dessen Inaktivierung zu erhöhter Oberflächenexpression und damit zu gesteigerter meßbarer Zellfusion führt. Lediglich eine Punktmutante, bei der das Lysin konservativ in ein Arginin getauscht wurde, zeigte ein Verhalten, das dem wildtypischen Protein glich. Eine Punktmutante des Lysins in der MSD war trotz unverändertem zellulären Transport deutlich fusogener, was darauf schließen läßt, daß es bei diesem Protein zu strukturellen Änderungen kommt, welche die Fusionseigenschaft des Proteins aktivieren.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeichnet sich ab, daß die lange membranspannende Domäne des HFV Hüllproteins nicht nur als Membranverankerung dient. Vielmehr bildet dieser Teil des Proteins offenbar eine Struktur aus, die sensibel auf Mutationen reagiert, nicht von einer fremden Transmembrandomäne imitiert werden kann und unterschiedliche Funktionen des Hüllproteins beeinflusst.

6.2. Summary

Due to several peculiarities with respect to their replication strategy foamy viruses (FVs) constitute a separate genus within the family of retroviruses. Regarding their morphogenetic pathway these viruses differ from all other retroviruses in two aspects. First, whereas all other exogenous retroviruses bud at the plasma membrane, foamy viruses mainly bud into intracellular compartments. Furthermore, unlike members of other subclasses of retroviruses FVs depend on the expression of their envelope protein for the export of virus particles. Therefore, it is believed that the foamy virus envelope protein contains information that is needed for the membrane envelopment of the internal viral structures as well as for budding and release of the viral particles.

In the course of these studies we examined whether capsids of the so called human foamy virus (HFV), which is the prototype member of the FV genus, can be pseudotyped with other viral glycoproteins. Neither the glycoprotein of VSV nor the envelope protein of MLV were able to support the export of FV capsids, despite they have been shown to efficiently pseudotype other retroviruses. These data suggest that FV capsids require specific interactions with their homologous envelope protein in order to be enveloped and released from the cell. To address this issue in further detail, several deletion- and pointmutants as well as chimeric proteins of the HFV envelope protein were designed and analyzed for their ability to allow FV particle release. The experiments with these mutants revealed that the cytoplasmic domain (CyD) of HFV Env as well as the C-terminal ER-retrieval signal are dispensable for capsid envelopment, and export as well as for the infectivity of the released viruses. In contrast to this, the long membrane-spanning domain (MSD) of the HFV Env was shown to play a key role in this respect since neither deletionmutants lacking this domain nor chimeric HFV Env proteins with alternative membrane anchors allowed virus release. The structures that are of particular importance in this respect appear to reside in the N-terminal part of the MSD, since truncation of the C-terminal moiety did not abrogate the function of the protein in virus morphogenesis. Despite the importance of the MSD in the context of the HFV Env protein the fusion of C-terminal parts of the HFV Env protein including the MSD to the ectodomain of other viral envelope protein did not confer the particle release function on these chimeric proteins, arguing that some other domain of the HFV Env might be involved in capsid envelopment and release.

The analysis of fusion activity of various HFV Env mutants revealed that the CyD is not required to mediate membrane fusion. However, fusogenicity was lost when the C-terminal part of the

MSD was deleted, despite the surface expression of this mutant and its ability to release virus particles. In our assays, wildtype HFV Env displayed rather weak fusion activity, which is probably due to its low surface expression level mediated by intracellular retention of the protein. Coexpression of FV Gag/Pol seemed to alleviate intracellular retention of HFV Env, and resulted in a dramatic increase of fusion activity which is probably at least in part caused by released viruses that contribute to the measurable fusion activity. Several pointmutants were designed to study the biological role of a lysine-proline motif within the HFV Env-MSD. Among these, solely a conservative exchange of the lysine residue to an arginine did not result in a changed phenotype in comparison to wildtype HFV Env. The remaining mutations of these conserved residues caused a strong increase of fusogenicity, which for most of the mutants correlated with increased surface expression. According to these data, the KP motif appears to be part of a transport signal, whose inactivation causes increased surface expression and as a consequence enhanced fusion activity. One mutant was exceptional in this respect since it displayed strong fusogenicity independent of increased surface expression, arguing that for this protein structural changes caused by the pointmutation lead to the activation of its fusion potential.

In summary, the data of our studies show that the MSD of the HFV Env protein not only serves the function of connecting the protein with cellular membranes. Instead, it appears to adopt a specific conformation that is required to mediate different functions of the Env protein and which cannot be imitated by homologous foreign domains.

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur und Genexpression eines einfachen Retrovirus.	4
Abb. 2: Der retrovirale Replikationszyklus.....	7
Abb. 3: Retrovirale Morphogenese.....	9
Abb. 4: Genom und Genexpression der Foamyviren.....	12
Abb. 5: Schematische Darstellung des HFV Hüllproteins.....	15
Abb. 6: Replikationszyklus der Foamyviren.....	18
Abb. 7: Der pSFG-NLS-LacZ retroviraler Vektor.....	55
Abb. 8: Vektorsysteme zur Herstellung rekombinanter HFV Überstände.....	57
Abb. 9: Heterologe und chimäre Hüllproteine.	63
Abb. 10: Zelluläre Expression der chimären und heterologen Hüllproteine.....	65
Abb. 11: HFV Partikelfreisetzung bei Koexpression heterologer und chimärer Hüllproteine.....	68
Abb. 12: HFV Env-Deletionsmutanten.	70
Abb. 13: Zelluläre Expression der HFV Env-Deletionsmutanten.....	71
Abb. 14: HFV Partikelfreisetzung bei Koexpression von HFV Env-Deletionsmutanten.....	72
Abb. 15 : Hüllproteine mit heterologer Membranverankerung.....	74
Abb. 16: Zelluläre Expression heterolog verankerter HFV Hüllproteine.....	75
Abb. 17: Partikelfreisetzung bei Koexpression heterolog verankerter HFV Env-Proteine.....	76
Abb. 18: Punktmutanten innerhalb des HFV Env-Transmembranbereichs.....	78
Abb. 19: Partikelfreisetzung bei Koexpression der HFV Env-MSD-Punktmutanten.....	80
Abb. 20: Relative Infektiosität der Viruspartikel mit HFV Env-MSD-Punktmutanten.....	81
Abb. 21: Stabilität und intrazellulärer Transport ausgewählter HFV Env-Mutanten.	83
Abb. 22: EM-Aufnahmen zur Viruspartikelmorphogenese.....	86
Abb. 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Fusionsassays.....	89
Abb. 24: Fusionsaktivität verschiedener HFV Hüllproteinmutanten.....	91
Abb. 25: Oberflächenexpression fusionsinkompetenter HFV Env-Mutanten.	93
Abb. 26: Oberflächenexpression fusionskompetenter HFV Env-Mutanten.	95
Abb. 27: Fusionsaktivität von HFV Hüllproteinen mit und ohne HFV-Gag/Pol.....	96
Abb. 28: Modelle zur Verpackung der Glykoproteine in das retrovirale Partikel.....	99

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren.....	2
Tabelle 2: Übersicht zu den Aminosäuresequenzen verschiedener Hüllproteine	64
Tabelle 3: Relative Transduktionseffizienz chimärer und heterologer Hüllproteine.....	66
Tabelle 4: Relative Transduktionseffizienz der HFV Env-Deletionsmutanten	72
Tabelle 5: Relative Transduktionseffizienz heterolog verankerter HFV Env-Proteine.....	75

6.5. Abkürzungsverzeichnis

α -	anti	ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
°C	Grad Celsius	ori	„origin of replication“
μ	mikro	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
A	Ampere	PBS	„phosphate buffered saline“
Abb:	Abbildung	pbs	Primerbindungsstelle
APS	Ammoniumpersulfoxid	PCR	Polymerasekettenreaktion
Bp	Basenpaar	Pol	Polymerase
BSA	Bovines Serum Albumin	PPP	Protein Probenpuffer
bzw.	beziehungsweise	PR	Protease
CA	Kapsid	psi	Verpackungssignal
CIAP	„calf intestinal alkaline phosphatase“	ptt	Polypurintrakt
CMV	Zytomegalievirus	RIPA	Radioimmunopräzipitation
Cys	Cystein	RNA	Ribonukleinsäure
dFCS	dialysiertes Fötale Kälberserum	Rnase	Ribonuklease
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“	rpm	Rotationen pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Deoxyribonukleinsäure	RT	Reverse Transkriptase
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat	SDS	Sodiumdodecylsulfat
E. coli	Escherichia Coli	SP	Signalpeptid
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“	SU	„surface“, Untereinheit des Hüllproteins
EndoH	Endoglykosidase-H	TEMED	N,N,N',N',- Tetramethylethylendiamin
Env	Envelope, Hüllprotein	TM	„transmembrane“, Untereinheit des Hüllproteins
EtOH	Ethanol	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ER	Endoplasmatisches Retikulum	tRNA	Transfer-RNA
FACS	„fluorescence activated cell sorter“	U	„unit“, Enzymeinheit
FCS	Fötale Kälberserum	V	Volt
FP	Fusionspeptid	VLPs	„virus like particles“
Gag	„group specific antigen“	V/V	Volumen/Volumen
Gpi	Glykosylphosphatidylinositol	VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
HFV	Humanes Foamyvirus	VSV-G	Glykoprotein von VSV
hPLAP	„human placental alkaline phosphatase“	W/V	Gewicht/Volumen
HSRV	„Human Spuma Retrovirus“	z.B.	zum Beispiel
IN	Integrase	ZyD	Zytoplasmatische Domäne
kD	Kilodalton		
LTR	„long terminal repeat“		
M	Molar		
MA	Matrix		
MEM	„modified Eagle’s medium“		
Meth	Methionin		
MLV	„Murine Leukemia Virus“		
MSD	Membranspannende Domäne		
NC	Nukleokapsid		
Neo	Neomycin		
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal		
OD	Optische Dichte		

6.6. Erklärungen

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion des Hüllproteins des Humanen Foamyvirus“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre zudem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Thomas Pietschmann)

6.7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Thomas Pietschmann

Geboren am: 10. Juli 1971 in Würzburg
Familienstand ledig
Eltern: Johannes Pietschmann, Gymnasiallehrer
Helga Pietschmann, Hausfrau

Schulausbildung:

09/1978-07/1982 Grundschule Estenfeld
09/1982-07/1991 Wirsberg-Gymnasium Würzburg
07/1991 Abitur

Studium:

11/1991-11/1996 Biologie an der Universität Würzburg und
an der Duke University, Durham, North Carolina, USA
Hauptfach: Biochemie
Nebenfächer: Tierphysiologie, Virologie und Immunbiologie
Diplomarbeit: „Epitope-tagging of the SIV_{mac239} Nef and its expression
and intracellular localization in CD4⁺ T-lymphocytes“
11/1996 Diplom

Dissertation:

02/1997-03/2000 am Institut für Virologie der Universität Würzburg,
AG Prof. A. Rethwilm und Dr. D. Lindemann
Thema: Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion des
Hüllproteins des Humanen Foamyvirus

Würzburg,

(Thomas Pietschmann)

6.8. Publikationsliste

Heinkelein, M., **Pietschmann, T.**, Jarmy, G., Dressler, M., Thurow, J., Imrich, H., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O., and Rethwilm, A. (2000). Highly efficient intra-cellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus. *EMBO J.*, Zur Publikation eingereicht.

Herchenröder, O., Moosmayer, D., Bock, M., **Pietschmann, T.**, Rethwilm, A., Bieniasz, P. D., McClure, M. O., Weis, R., and Schneider, J. (1999). Specific binding of recombinant foamy virus envelope protein to host cells correlates with susceptibility to infection. *Virology* 255, 228-36.

Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 73, 2613-21.

Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2000). An evolutionary conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning-domain of the foamy virus envelope protein regulates fusion activity. *J. Virol.*, Im Druck.