

4. DISKUSSION

Zur Bildung infektiöser retroviraler Viruspartikel ist es essentiell, daß während des Knospungsvorgangs die in der Membran verankerten viralen Glykoproteine mit in das entstehende Partikel eingebaut werden. Während man im allgemeinen davon ausgeht, daß diese gegenüber den zellulären Membranproteinen präferentiell in das sich abschnürende Virus integriert werden, ist bislang noch kein allgemeiner Konsens darüber gefunden worden, wie dies erreicht wird (Weldon und Hunter, 1997). Aufgrund zum Teil konträrer experimenteller Ergebnisse sind derzeit zwei verschiedene Theorien für den Einbau der Hüllproteine in das Viruspartikel verbreitet (Swanstrom und Wills, 1997). Das Modell der passiven Verpackung [„passive packaging“, (Hunter, 1994; Young et al., 1990)] geht davon aus, daß keine spezifischen Interaktionen zwischen Gag und Env stattfinden und stützt sich zum Teil auf Ergebnisse von Pseudotypisierungsexperimenten. Das Phänomen der Pseudotypenbildung tritt auf, wenn eine Zelle gleichzeitig von zwei Viren infiziert wird und ist gekennzeichnet durch die Entstehung von phänotypisch gemischten Viren, bei denen interne Strukturen des einen Virus, eine Hülle erwerben, in die Glykoproteine des anderen Virus eingebaut sind (Hunter, 1997; Swanstrom und Wills, 1997). Diese Fähigkeit, fremde Hüllproteine [sogar Glykoproteine anderer Virusfamilien, wie z.B. das Glykoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV-G) oder das Hämagglutinin Protein von Influenza; Rhabdo- bzw. Orthomyxoviren] zu verpacken, ist innerhalb der Retroviren weit verbreitet (Dong et al., 1992; Friedmann und Yee, 1995; Lindemann et al., 1997; Yee et al., 1994). Weitere Hinweise, die gegen eine obligatorische Env-Gag-Interaktion sprechen, wurden durch Experimente gewonnen, die zeigten, daß signifikant große Teile der zytoplasmatischen Domänen der HIV-, SIV- und ASLV Env-Proteine deletiert werden können, ohne den Einbau dieser trunkierten Glykoproteine in die jeweiligen Viruspartikel zu verlieren (Freed und Martin, 1996; Freed und Martin, 1995; Johnston et al., 1993; Mammano et al., 1995; Perez et al., 1987). Nach dem Modell von Hunter und Young werden die viralen Hüllproteine deshalb vermehrt in das knospende Partikel eingebaut, weil sie im Gegensatz zu anderen zellulären Membranproteinen, die über zelluläre Interaktionspartner (z.B. Zytoskelett, Signaltransduktionsproteine) gebunden sind, frei zu den Orten der Partikelbildung diffundieren können. Nach dieser Vorstellung wären Gag-Env-Interaktionen möglich, aber nicht zwingend nötig.

Das Modell der aktiven Verpackung [„active packaging“, (Hunter, 1994)] sieht vor, daß Env über spezifische Interaktionen mit den Gag-Proteinen während des Knospens in die entstehenden Viren

gelangt, und wird von Daten gestützt, die eine solche Interaktion nahelegen. So wurde zum Beispiel gezeigt, daß Mutationen im Bereich der MA Domäne von Gag die Verpackung der Glykoproteine verhindert, während die Partikelfreisetzung nicht gestört ist (Freed und Martin, 1996; Freed und Martin, 1995; Lee und Linial, 1994; Wang et al., 1993; Yu et al., 1992). Zudem wurden auch Deletionen in der zytoplasmatischen Domäne von TM beschrieben, welche die Verpackung beeinflussen (Brody et al., 1994; Dubay et al., 1992; Freed und Martin, 1996; Freed und Martin, 1995; Yu et al., 1993). In polarisierten Zellen konnte gezeigt werden, daß die Expression der Glykoproteine die Partikelmorphogenese und -freisetzung spezifisch zur basolateralen Plasmamembran lenkt (Owens et al., 1991). Die beiden Modelle, die sich nicht gegenseitig ausschließen, sind in Abb. 28 dargestellt.

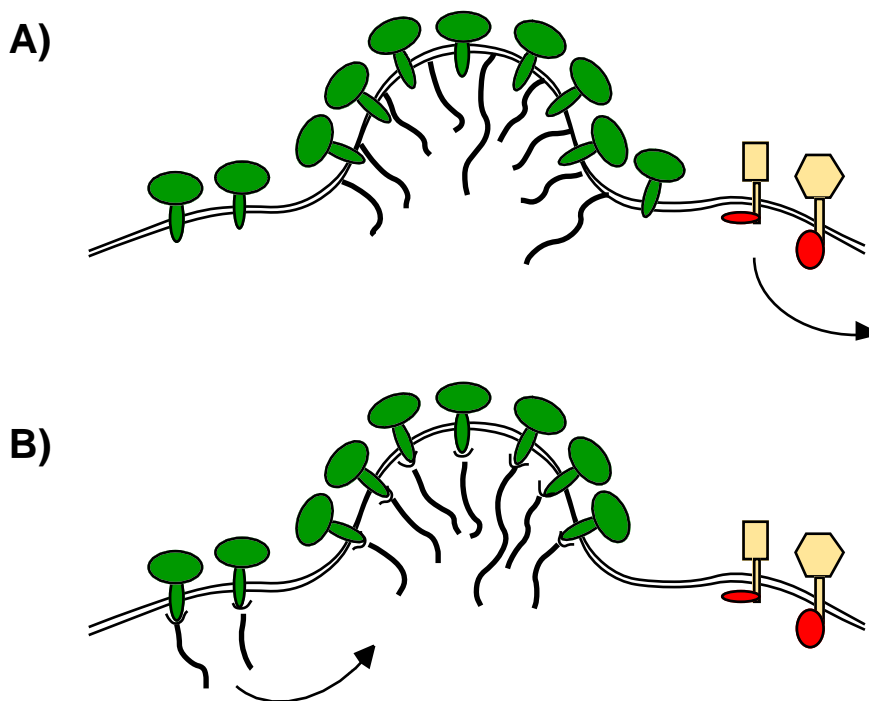


Abb. 28: Modelle zur Verpackung der Glykoproteine in das retrovirale Partikel.

(A) Passive Verpackung: Zelluläre Membranproteine interagieren mit anderen zellulären Proteinen und werden deshalb von der Partikelbildung ausgeschlossen. Die Hüllproteine können dagegen frei zur Stelle der Virusbildung diffundieren und in das Viruspartikel integriert werden (B) Aktive Verpackung: Spezifische Interaktionen zwischen der zytoplasmatischen Domäne von Env und Teilen des Gag-Proteins führen zur Verpackung der Hüllproteine. Die Figur wurde in modifizierter Form aus (Hunter, 1994) übernommen.

4.1. Rolle des HFV Hüllproteins bei der Viruspartikelfreisetzung

Auf welche Weise die Foamyviren ihre Hüllproteine in das entstehende Virus einbauen und ob es in diesem Zusammenhang zu einer spezifischen Interaktion zwischen Gag und Env kommt, ist im einzelnen noch nicht geklärt. Allerdings sind die Foamyviren, wie bereits mehrfach erwähnt, für den Morphogenese-prozeß in ganz besonderer Weise auf ihr Hüllprotein angewiesen, da sie im Gegensatz zu allen anderen Retroviren ohne ihr Env-Protein keine Viruspartikel freisetzen können (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998), was auf besonders enge Wechselwirkungen zwischen Gag und Env schließen läßt. Ferner zeigt dieser Befund, daß das HFV Env-Protein daran beteiligt ist, die Membranhüllung der FV Kapsidstrukturen einzuleiten sowie die Abschnürung der Partikel an der Plasmamembran oder in interne Kompartimente zu ermöglichen. Dadurch fallen dem HFV Env-Protein Aufgaben zu, die üblicherweise von den retroviralen Gag-Proteinen erfüllt werden (Swanstrom und Wills, 1997). Neueste Experimente, die darauf hinweisen, daß die zelluläre Expression von HFV Env zur Abschnürung von vesikulären Strukturen führt, die das HFV Hüllprotein enthalten, stützen diese Hypothese (Goepfert, unpublizierte Ergebnisse).

Die Pseudotypisierungsexperimente dieser Arbeit zeigten, daß weder das Hüllprotein von MLV noch das Glykoprotein von VSV in der Lage sind, die Freisetzung von HFV Kapsiden zu ermöglichen (vgl. Abb. 11). Dies mag zunächst ein überraschender Befund sein, da für beide Proteine gezeigt wurde, daß sie andere Retroviren sehr effizient pseudotypisieren können (Rizvi und Panganiban, 1992; Yee et al., 1994). Allerdings ist bekannt, daß Foamyviren vornehmlich an intrazellulären Membranen knospen, während MLV Env und VSV-G über den sekretorischen Syntheseweg der Zelle zur Plasmamembran gelangen, so daß es sein könnte, daß die FV Kapside nicht an den gleichen Ort in der Zelle gelangen wie die fremden Hüllproteine und daß es deshalb nicht zur Partikelfreisetzung kommt. Alternativ wäre es denkbar, daß FV Kapside für ihre Umhüllung und Freisetzung auf ein Hüllprotein angewiesen sind, das Funktionen bei der Membranhüllung übernimmt und daß diese Aufgaben weder von MLV Env noch von VSV-G erfüllt werden.

Um in diesem Zusammenhang funktionelle Domänen innerhalb des HFV Env-Proteins zu charakterisieren, wurden Deletionsanalysen durchgeführt, die nachweisen, daß die kurze zytoplasmatische Domäne sowie das ER-Retentionssignal in diesem Bereich, offenbar weder für die spezifische Verpackung des Hüllproteins noch für die Membranhüllung, die Freisetzung und die Infektiosität der Viren benötigt werden (vgl. Abb. 14 und Tabelle 4). Die Experimente zur Deletionsmutante EM31 zeigten, daß auch der C-terminale Bereich der langen putativen

membranspannenden Domäne für diese Funktionen entbehrlich ist, da auch dieses Protein, das trotz der deutlich verkürzten MSD mit der Plasmamembran assoziierte (vgl. Abb. 26), spezifisch in HF Viren eingebaut wurde, die aus der Zelle freigesetzt werden konnten. Allerdings büßte diese Mutante aufgrund der Deletion ihre Fusionsaktivität ein, so daß die mit diesem Hüllprotein gebildeten Viruspartikel nicht infektiös waren (vgl. Abb. 24 und Tabelle 4 und Diskussion weiter unten). Aus den Ergebnissen, die mit den übrigen Deletionsmutanten sowie den heterolog verankerten HFV Hüllproteinen gewonnen wurden, geht hervor, daß zumindest der N-terminale Teil der vorgeschlagenen HFV Env-MSD spezifisch für die Partikelumhüllung und -freisetzung benötigt wird. So ist es einerseits nicht möglich, diesen Bereich ohne Funktionsverlust des resultierenden Proteins zu entfernen (vgl. Abb. 14 und Tabelle 4), andererseits waren HFV Env-Mutanten mit heterologer Membranverankerung über die entsprechenden Teile eines anderen retroviralen Hüllproteins oder in Form eines Gpi-Ankers nicht in der Lage, die Funktion der HFV Env-MSD in bezug auf die Partikelmorphogenese zu übernehmen (vgl. Abb. 17 und Tabelle 5). Ob dieser Bereich der HFV Env-MSD für direkte Interaktionen, die im Zusammenhang mit der Partikelbildung wichtig sind, benötigt wird oder ob er eine besondere Struktur ausbildet, die Voraussetzung für die FV Partikelfreisetzung ist, kann anhand dieser Ergebnisse nicht entschieden werden.

Obwohl die bezüglich auf die HFV Partikelfreisetzung defekten Mutanten mit Ausnahme eines Proteins (HFME-2, vgl. Diskussion weiter unten) gegenüber den funktionellen Mutanten keine signifikanten Prozessierungs- und Transportdefekte aufwiesen (vgl. Abb. 13, Abb. 16 und Abb. 21), kann desweiteren nicht ausgeschlossen werden, daß sich die eingeführten Mutationen in diesen Fällen derart auf die Struktur der jeweiligen Env-Proteins auswirkt, daß alleine diese Änderungen schon dazu führen, daß die FV Partikelfreisetzung nicht mehr unterstützt wird. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur FV Morphogenese stimmten mit den biochemisch gewonnenen Ergebnissen überein. So konnte man bei allen HFV Env-Mutanten, welche die Freisetzung infektiöser Viren unterstützten, die charakteristischen Morphogenesestadien beobachten [vorgeformte, im Zytoplasma liegende Kapside; Kapsid-Membran-Interaktionen; Knospungszwischenstufen an intrazellulären Membranen sowie an der Plasmamembran; abgeschnürte und umhüllte Viruspartikel mit regelmäßigen Hüllproteinstacheln („spikes“) in intrazellulären Kompartimenten und außerhalb der Zelle]. Entsprechend wurden bei den Mutanten, die keine HFV Kapside freisetzen können, jeweils nur unumhüllte Kapside im Zytoplasma gefunden.

In dieser Hinsicht ist die HFME-2 Mutante, bei der die HFV Env-MSD gegen die entsprechende Domäne des MLV Env ausgetauscht wurde, eine interessante Ausnahme. Während wie bei der biochemischen Analyse der Partikelfreisetzung auch elektronenmikroskopisch keine extrazellulären Viren zu sehen waren, traten abgeschnürte und umhüllte Viruspartikel mit „Hüllproteinspikes“ in intrazellulären Kompartimenten auf (vgl. Abb. 22). Offenbar ist die MSD des MLV Hüllproteins zumindest teilweise in der Lage die Funktion der HFV Env-MSD hinsichtlich der Partikelmorphogenese zu erfüllen, da die elektronenmikroskopischen Daten dafür sprechen, daß sowohl die Hüllproteinverpackung als auch der Knospungsprozeß stattfinden können. Allerdings scheint bei diesem chimären Hüllprotein ein späterer Reifungs- und Transportprozeß der abgeschnürten Viren blockiert zu sein, da diese Partikel nicht freigesetzt wurden und selbst wenn sie künstlich über „Freeze-thaw-Lyse“ aus den Zellen gelöst wurden, nicht infektiös waren (vgl. 3.1.5). Eine Besonderheit des elektronenmikroskopischen Phänotyps der HFME-2 Mutante ist das Auftreten kleiner zellulärer Vesikel, die jeweils nur ein umhülltes Viruspartikel umschließen (vgl. Abb. 22). Möglicherweise sind diese Strukturen nur aufgrund des angesprochenen Transportdefektes nachweisbar und repräsentieren Viruspartikel, die auf ihrem Exportweg nicht weiter vorankommen. Diesem morphogenetischen Befund entsprechen auch die biochemischen Daten zu dieser Mutante. So zeichnete sich das HFME-2 Protein in den „Pulse-Chase“-EndoH Experimenten im Unterschied zu allen anderen analysierten Mutanten durch eine stark erhöhte Stabilität des Vorläuferproteins und durch das Fehlen von SU und TM Spaltprodukten sowie EndoH resistenter Formen des gp130 Vorläufers aus, was auf eine Transportblockierung des Proteins schließen läßt (vgl. Abb. 21). Möglicherweise ist die Struktur dieses chimären Proteins soweit gestört, daß es den üblichen intrazellulären Transportweg und Reifungsprozeß nicht vollständig durchläuft, was letztendlich auch den beobachteten Phänotyp bezüglich der Partikelbildung und Reifung zur Folge hat. Dagegen trat bei den HFME-3 und HFME-2-SSS Proteinen, die auf der HFME-2 Mutante basieren und die zytoplasmatischen Anteile des Proteins bzw. das ER-Retentionssignal verloren haben, weder eine Transportblockierung in der biochemischen Analyse noch die Umhüllung und Abschnürung von Viruspartikeln an intrazellulären Membranen auf. Daraus geht hervor, daß das besondere Verhalten der HFME-2 Mutante davon abhängig ist, daß dieses Protein die unveränderte zytoplasmatische Domäne des HFV Hüllproteins mit einem intakten ER-Retentionssignal enthält.

Die Ergebnisse aus der Analyse der MSD Punktmutanten zeigen, daß dieser Bereich des Proteins sensibel auf Mutationen reagiert und unterstützen die Vorstellung, daß der HFV Env-MSD hinsichtlich der Viruspartikelfreisetzung eine besondere Bedeutung zukommt. Zwar waren alle Punktmutanten noch in der Lage die HFV Partikelfreisetzung zu unterstützen, jedoch führte die

Veränderung des konservierten Lysins bzw. des konservierten Prolins im Zentrum der langen MSD zum Teil zu einer deutlich reduzierten Effizienz dieses Prozesses. Vor allem der Austausch des Lysins gegen Alanin oder Aspartat sowie die Mutation des Prolins in Alanin und der Wechsel beider Aminosäuren in Alanine, bedingte einen stark verringerten Viruspartikelexport. Unter anderem blieb der konservative Austausch des Lysins in ein Arginin dagegen weitgehend ohne Folgen (vgl. Abb. 19). Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Daten zum Einbau der jeweiligen Hüllproteine in die abgeschnürten Viren. Wie die Analyse des relativen Env-Gehalts der Partikel im Überstand ergab, haben die verschiedenen Punktmutationen keinen entscheidenden Einfluß auf die Effizienz mit der die Hüllproteine in die Viren eingebaut werden (vgl. Abb. 19). Trotz des vergleichbaren Env-Gehalts in den Partikeln zeigten die mit den unterschiedlichen Punktmutanten gebildeten Viren mit Ausnahme der Mutante mit dem konservativen Austausch, deutlich reduzierte relative Infektiosität (vgl. Abb. 20), was unter Umständen mit dem Einfluß der Mutationen auf die Fusionsaktivität der jeweiligen Proteine zusammenhängt (vgl. Abb. 24 und Diskussion weiter unten).

Die Ergebnisse der Pseudotypisierungsexperimente hatten gezeigt, daß das HFV Hüllprotein offenbar Funktionen ausführen kann, die für die Umhüllung und Freisetzung der HFV Kapside benötigt werden, und die durch die MLV Env bzw. VSV-G-Proteine nicht bereitgestellt werden. Die darauf aufbauenden Analysen mit HFV Env-Deletionsmutanten, heterolog verankerten HFV Hüllproteinen und MSD Punktmutanten erbrachten Hinweise, daß spezifische Teile der HFV Env-MSD benötigt werden, um die HFV Partikelfreisetzung zu ermöglichen. Mit einer Reihe von chimären MLV-HFV Env und VSV-G-HFV Env-Proteinen wurde geprüft, ob es durch den Transfer dieser HFV Env-Domäne gelingt, die heterologen Proteine so zu verändern, daß sie die HFV Partikelbildung unterstützen. Die biochemischen und elektronenmikroskopischen Analysen zu diesen Chimären zeigten, daß keines der konstruierten Proteine, welche jeweils Domänen enthielten, die vorher als wichtig für die Partikelfreisetzung identifiziert worden waren, trotz guter zellulärer Expression, HFV Partikel freisetzen konnte (vgl. Abb. 11). In Verbindung mit den weiter oben besprochenen Experimenten zeigen diese Befunde, daß die HFV Env-MSD zwar essentiell an diesem Prozeß beteiligt ist, daß sie aber nicht hinreichend ist, um die nötigen Funktionen auf heterologe Hüllproteine zu übertragen. Es könnte sein, daß die chimären Proteine zwar alle relevanten Domänen des HFV Env-Proteins enthalten, daß diese aber durch die konstruierte Zusammenstellung mit den übrigen Teilen der fremden Hüllproteine, nicht funktionell sind und daß es deswegen nicht zur HFV Partikelabschnürung kommt. So ist es denkbar, daß durch die artifizielle Fusionierung von Teilen zweier fremder Proteine eine korrekte Oligomerisierung verhindert wird, die aber für die Partikelfreisetzung bei HFV nötig sein könnte, und daß aus diesem

Grund die Funktionalität der Chimären gestört ist. Alternativ werden im Zusammenhang mit der HFV Morphogenese eventuell noch andere Domänen des HFV Hüllproteins benötigt, die bisher noch nicht charakterisiert sind und die in den untersuchten chimären Proteinen nicht enthalten sind. Diese Vorstellung wird von neuesten Daten gestützt, die zeigen, daß tatsächlich noch andere Teile des HFV Env-Proteins für die Partikelfreisetzung benötigt werden (Lindemann, unpublizierte Ergebnisse). So haben neue Deletionsmutanten und weitere chimäre Konstrukte erwiesen, daß das HFV Signalpeptid im Zusammenhang mit der HFV Partikelumhüllung und Freisetzung eine zentrale Rolle spielt.

Wie bereits zu Beginn der Diskussion angesprochen, sind die Foamyviren für ihre Partikelfreisetzung auf eine besonders enge Wechselwirkung ihrer Env- und Gag-Proteine angewiesen. Möglicherweise sind bei den Foamyviren die Partikelumhüllung und die Verpackung der Env-Proteine direkt aneinander gekoppelt und voneinander abhängig. Zwar gibt es für dieses Modell bislang keine hinreichenden experimentellen Beweise, allerdings legen verschiedene Befunde diese Folgerung nahe. Zum einen ist schon seit längerem bekannt, daß es ohne die Expression der Hüllproteine nicht zur Freisetzung von Foamyviruspartikeln kommt (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Ergänzend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß heterologe Hüllproteine (MLV Env und VSV-G), die effizient in andere retrovirale Partikel eingebaut werden, nicht mit FV Kapsiden zusammenarbeiten. Ferner waren bei allen in dieser Arbeit analysierten Mutanten, die Partikelumhüllungsfunktion und der Einbau der Hüllproteine jeweils gleichzeitig entweder negativ betroffen oder unbeschadet. Selbst bei der chimären HFME-2 Mutante, bei der offenbar eine Blockierung der Virusreifung auftritt, enthielten die intrazellulär abgeschnürten, umhüllten Viruspartikel „Spikestrukturen“, die vermutlich auf den Einbau des chimären Proteins zurückgehen. Angesichts dieser experimentellen Daten könnte man spekulieren, daß die HFV Hüllproteine spezifisch mit den Gag-Proteinen interagieren und dabei die Abschnürung der Partikel einleiten. Ob es dabei allerdings zu einer direkten Interaktion zwischen Gag und Env kommt oder ob andere zelluläre Komponenten eine Brückenfunktion übernehmen und diese Interaktion vermitteln sowie ob andere zelluläre Faktoren beim Knospungsprozeß mitwirken, ist nicht klar. Im Zusammenhang mit diesen Prozessen haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, daß der N-terminale Bereich der membranspannenden Domäne des HFV Hüllproteins eine besondere Rolle spielt. Möglicherweise ist dieser Teil des Proteins für die Interaktion mit den Gag-Proteinen wichtig, indem er entweder direkt oder indirekt über zelluläre Komponenten den Kontakt mit dem viralen Kapsid herstellt. Alternativ ist es denkbar, daß die HFV Env-MSD insofern kritische strukturelle Bedeutung hat, als daß sie benötigt wird, um eine zweite Domäne (das HFV

Signalpeptid) so zu positionieren, daß sie ihre Aufgaben bezüglich der HFV Morphogenese erfüllen kann.

4.2. Fusionsaktivität des HFV Hüllproteins

Die Feinanalyse der Funktion der HFV Env-MSD deckte neben dem Einfluß der Punktmutationen auf die Partikelfreisetzung noch drastische Effekte auf die Fusionsaktivität und den intrazellulären Transport der jeweiligen Proteine auf. So zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Fusionsassays, daß das zentral in der vorgeschlagenen membranspannenden Domäne liegende Lysin-Prolin Motiv (959, 960) an der Regulation der Fusionsaktivität von HFV Env beteiligt ist. Ein Ladungswechsel an dieser Stelle (EM28 K₅₅₉>E und EM29 K₉₅₉>D) sowie Mutationen, bei denen Lysin₉₅₉ bzw. Prolin₉₆₀ gegen hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht wurden (EM21 K₉₅₉>A, EM30 K₉₅₉>L bzw. EM22 P₉₆₀>A), führten zu Proteinen, deren Fusionsaktivität gegenüber dem unveränderten HFV Hüllprotein um ein vielfaches gesteigert war (20-40x, vgl. Abb. 24). Einzig ein konservativer Austausch des Lysins an Position 959 in ein Arginin hatte keine signifikante Veränderung der Fusionsaktivität des Proteins zur Folge. Diese Mutante verhielt sich auch in den Versuchen zur Viruspartikelfreisetzung und zur Oberflächenexpression weitgehend wie das wildtypische Protein. Ferner zeigten auch die Messungen zur Infektiosität keinen abweichenden Phänotyp, so daß zumindest in diesen in vitro Versuchen offenbar nicht das Lysin an sich, sondern die positive Ladung in diesem Bereich funktionelle Bedeutung hat. Selbst während einer Kultivierungsphase von sechs Wochen kam es nicht zur Reversion. Trotz dieser in vitro Befunde scheint in vivo jedoch ein Selektionsdruck zu existieren, der dazu führt daß ein Lysin an dieser Stelle des Proteins auftritt, da man bei allen bekannten Foamyvirus-Isolaten ein Lysin an dieser Position findet.

Wie bereits erwähnt, verfügen die Hüllproteine der Lentiviren ebenfalls über eine auffällig lange membranspannende Domäne, die von Aminosäuren mit positiven Ladungen unterbrochen wird. Allerdings wurde für das Env von HIV im Gegensatz zu HFV gezeigt, daß die Mutation zweier Arginine innerhalb der HIV Env-MSD zur Inaktivierung der Fusionsaktivität des Proteins führt (Helseth et al., 1990; Owens et al., 1994). Die Ergebnisse zur Oberflächenexpression der unterschiedlichen HFV Env-Punktmutanten weisen auf eine mögliche Erklärung für die zum Teil dramatisch erhöhte Fusionsaktivität dieser Proteine hin. Fast alle hochfusogenen Mutanten wurden gegenüber dem unveränderten HFV Env-Protein deutlich stärker an der Zelloberfläche exprimiert (vgl. Abb. 25). Da der angewandte Fusionsassay die durch das Hüllprotein ausgelöste Fusion zwischen Zellen mißt, die naturgemäß von der Expression der Hüllproteine an der Oberfläche der

Zellen abhängt, ist es höchstwahrscheinlich, daß die für einige Punktmutanten beobachtete starke Fusionsaktivität zumindest zum Teil durch die gesteigerte Oberflächenexpression der jeweiligen Proteine bedingt ist. Die schwachfusogenen Proteine (HFE-wt und z.B. EM27) waren entsprechend durch deutlich niedrigere Oberflächenexpression gekennzeichnet. In bezug auf die beobachtete Korrelation zwischen Fusionsaktivität und Oberflächenexpression war die EM30 Mutante (K₉₅₉>L) eine Ausnahme, da sie trotz einer gegenüber dem wildtypischen Protein weitgehend unveränderten Expression an der Plasmamembran, eine stark erhöhte Fusionsaktivität zeigte (vgl. Abb. 24 und Abb. 25). Offenbar kommt es bei diesem Protein durch die Einführung eines Leucins an der Position 959 zu strukturellen Änderungen, die eine Aktivierung der Fusionsaktivität nach sich ziehen.

Die über den intrazellulären Transport anderer Typ-I-Membranproteine gewonnenen Erkenntnisse geben Hinweise darauf, warum es durch die Mutationen im Bereich der HFV Env-MSD zum Teil zu einer deutlich erhöhten Oberflächenexpression kommt. Während die Mutation einzelner basischer Aminosäuren innerhalb der MSD des HIV Hüllproteins nicht zur veränderten Oberflächenexpression der jeweiligen Proteine führt (Helseth et al., 1990; Owens et al., 1994), weiß man von anderen Typ-I-Membranproteinen, daß polare Aminosäuren innerhalb der Transmembranbereiche den Transport nachhaltig beeinflussen können (Letourneur und Cosson, 1998). Bei verschiedenen aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rezeptoren (T-Zell Rezeptor, CD8, B-Zell Rezeptor) sind Determinanten innerhalb der membranspannenden Domänen bekannt, welche die Retention der unvollständig assemblierten Ketten im ER sicherstellen und so zur Qualitätskontrolle innerhalb des ER beitragen (Letourneur und Cosson, 1998). Ein typisches Kennzeichen dieser Motive ist jeweils das Auftreten mehrerer hydrophiler Aminosäuren innerhalb der hydrophoben MSD (Letourneur und Cosson, 1998). Entsprechend konnte gezeigt werden, daß die Einführung einer polaren Aminosäure in das hydrophobe Segment eines Typ-I-Membranproteins, das sonst an die Plasmamembran transportiert wird, zu dessen Retention im ER führt (Bonifacino et al., 1991). Kürzlich wurde bei Hepatitis C Viren, die in Zisternen des ER knospen, nachgewiesen, daß die Glykoproteine E1 und E2 jeweils Signale innerhalb ihrer Transmembrandomänen enthalten, welche dafür verantwortlich sind, daß die Proteine im ER zurückgehalten werden (Cocquerel et al., 1999; Duvet et al., 1998). Angesichts dieser Befunde und der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, die zeigen, daß Mutationen des KP Motivs in der MSD des HFV Env-Proteins zu einer stark erhöhten Expression an der Zelloberfläche führen, ist es möglich, daß dieses Motiv Teil eines ER Retentionssignal ist, dessen Funktion durch die verschiedenen Mutanten ausgeschaltet wird.

Überraschenderweise führte die Inaktivierung des von Goepfert et al. beschriebenen „ER-retrieval“ Signals in den Biotinylierungsexperimenten nicht zu einer erhöhten Oberflächenexpression. Die in dieser Arbeit durchgeführten „Pulse-Chase“-EndoH Versuche zeigten eine verstärkte Prozessierung der HFE-SSS Mutante (vgl. Abb. 21) und reproduzierten damit die Beobachtung von Goepfert et al., die anhand vergleichbarer Daten auf einen beschleunigten Transport des mutierten Proteins schlossen (Goepfert et al., 1997). Da man im allgemeinen davon ausgeht, daß es in distalen Kompartimenten des Golgi Apparats – also intrazellulär – zur Prozessierung in SU und TM kommt, schließen sich diese Befunde nicht notwendigerweise gegenseitig aus. Außerdem sind inzwischen neben der MSD noch andere Domänen innerhalb des HFV Env-Proteins entdeckt worden, deren Mutation trotz eines intakten „ER-retrieval“ Signals zu dramatisch erhöhter Oberflächenexpression führt (Lindemann, unpublizierte Beobachtung). Also scheint das „ER-retrieval“ Signal in der zytoplasmatischen Domäne des HFV Env-Proteins die intrazelluläre Verteilung des Hüllproteins, nicht aber die Oberflächenexpression zu beeinflussen.

Neben der Auswirkung von Punktmutationen innerhalb der MSD des HFV Env-Proteins auf die Oberflächenexpression und die Fusionsaktivität der Hüllproteine deckten die Analysen zur Infektiosität der mit diesen Mutanten freigesetzten Viruspartikel weitere Folgen auf die Funktion der mutierten Hüllproteine auf. Bei diesen Versuchen wurden die in SU und TM spaltbaren Konstrukte verwendet und die relative Infektiosität der Partikel bezogen auf gleiche Mengen Virus im Überstand der transfizierten Zellen bestimmt (vgl. Abb. 20). Mit Ausnahme der konservativen Mutation des Lysins an Position 959 zu Arginin führten alle weiteren Mutationen, welche das KP Motiv betrafen, zu deutlich reduzierter relativer Infektiosität. Der Grund für die verminderte Infektiosität dieser Viruspartikel ist nicht klar ersichtlich, da die Partikelfreisetzungsanalyse, die mit diesen Punktmutanten (vgl. Abb. 19) durchgeführt wurden, bei keiner der Mutanten ein gegenüber dem wildtypischen Protein verringertes Env- zu Gag-Verhältnis in den sekretierten Partikeln aufdeckten. Entsprechend scheint der Einbau der Hüllproteine in die entstehenden Viruspartikel nicht gestört zu sein, so daß die verringerte Infektiosität nicht durch eine gestörte Inkorporation der Glykoproteine zu erklären ist. Alternativ wäre es denkbar, daß die Mutationen innerhalb der HFV Env-MSD die Assoziation der SU mit den TM Untereinheiten schwächen, so daß es vermehrt zur Abgabe der rezeptorbindenden SU Untereinheit („shedding“) und dadurch zum Verlust an relativer Infektiosität der Partikel kommt. Allerdings zeigten die mit den spaltbaren Formen der in der MSD mutierten Hüllproteine freigesetzten Viruspartikel gegenüber dem wildtypischen Protein kein verschobenes SU zu TM Verhältnis (Daten nicht gezeigt), so daß auch vermehrtes „shedding“ als Erklärung für die verringerte Infektiosität ausscheidet. Möglicherweise kommt es durch die Entfernung der positiven Ladung in der MSD bzw. durch die Mutation des

Prolins in diesem Bereich zu strukturellen Änderungen in den Hüllproteinen, die sich negativ auf die Stabilität der freigesetzten Viruspartikel und damit auf deren Infektiosität auswirkt.

Von anderen retroviralen Hüllproteinen ist bekannt, daß ihre jeweilige Fusionsaktivität über die zytoplasmatische Domäne reguliert wird (Brody et al., 1994; Mulligan et al., 1992; Rein et al., 1994; Ritter et al., 1993). So werden die Hüllproteine von MLV und MPMV in eine fusogene Konformation überführt, indem die virale Protease während oder kurz nach dem Knospen jeweils eine in C-terminale Bereichen der zytoplasmatischen Domänen enthaltene inhibitorische Domäne abspaltet (Brody et al., 1994; Rein et al., 1994). Bei Lentiviren, deren Hüllproteine eine außergewöhnlich lange zytoplasmatische Domäne besitzen, beobachtet man keine derartige Prozessierung. Allerdings führen künstliche Trunkationen der zytoplasmatischen Teile der Hüllproteine von HIV und auch von SIV zu einer deutlich gesteigerten Fusionsaktivität (Mulligan et al., 1992; Ritter et al., 1993). Die in dieser Arbeit mit den HFV Env-Trunkationsmutanten durchgeführten Analysen zur Fusionsaktivität und zur Oberflächenexpression ergaben eine Reihe weiterer interessanter Ergebnisse. So erwiesen die Experimente mit den Deletionsmutanten HFE-1 und HFE-2, daß die kurze zytoplasmatische Domäne des Hüllproteins ebenso wie das in ihr vorhandene ER-Retentionssignal für die Fusionsaktivität nicht essentiell benötigt werden (vgl. Abb. 24) und bestätigten somit die zu diesen Mutanten gewonnenen Infektionsdaten (vgl. Tabelle 4). Die Biotinylierungsversuche deckten nur einen geringen Einfluß dieser Deletionen auf die Oberflächenexpression auf, wobei die Expression der jeweiligen Proteine an der Oberfläche ungefähr mit ihrer Fusionsaktivität im Verhältnis zum wildtypischen HFV Hüllprotein korrelierte (vgl. Abb. 24 und Abb. 26). So wurde für das HFE-1 Protein eine gegenüber HFE-wt leicht erhöhte bzw. für das HFE-2 Protein eine verringerte Oberflächenexpression gemessen. Entsprechend waren diese Proteine fusogener bzw. weniger fusogen als das unveränderte HFV Hüllprotein. Wie bereits oben besprochen, führte die Inaktivierung des ER-Retentionssignals des HFV Env-Proteins nicht zu einer signifikant gesteigerten Oberflächenexpression. Entsprechend zeichnete sich auch eine dem wildtypischen Protein vergleichbare Fusionsaktivität ab. Ferner zeigte die Fusionsanalyse zur EM31 Deletionsmutante, daß dieses Protein keine Fusionsaktivität besitzt, und klärte dadurch auf, warum die mit diesem Hüllprotein freigesetzten Viruspartikel nicht infektiös sind (vgl. Abb. 24 und Tabelle 4). Aus diesen Ergebnissen lassen sich unterschiedliche minimale Voraussetzungen für die Fusions- bzw. die Partikelfreisetzungsfunktion des HFV Hüllproteins ableiten. Während die EM31 Mutante, die alle zytoplasmatischen Teile des Hüllproteins verloren hat und nur über eine trunkierte Transmembrandomäne verfügt, noch mit der Plasmamembran assoziiert ist (vgl. Abb. 25 und Abb. 26) und auch die Freisetzung von Foamyviruspartikeln zuläßt (vgl. Abb. 14), ist dieses

Protein nicht mehr fusogen (vgl. Abb. 24). Offenbar werden für die Fusionsfunktion des Proteins noch weitere, C-terminal liegende Bereiche der langen vorgeschlagenen MSD benötigt.

In dieser Hinsicht gibt es Parallelen bei anderen Retroviren. So wurde für die Hüllproteine von HIV und MLV nachgewiesen, daß Deletionsmutanten, welche die Proteine bis in die membranspannende Domäne hinein trunkieren, noch an der Zelloberfläche exprimiert wurden, daß sie aber wie auch die EM31 Mutante des HFV Hüllproteins nicht mehr fusionsfähig sind (Owens et al., 1994; Ragheb und Anderson, 1994a). Möglicherweise verleiht der verkürzte Transmembranbereich der EM31 Mutante dem Protein keine ausreichend stabile Membranverankerung, um den engen Kontakt der beiden zu fusionierenden Membranen herzustellen, der die Zell-Zell-Fusion bzw. die Virus-Zell-Fusion ermöglicht. Eine solche Erklärung wurde von Salzwedel *et al.* für fusionsdefekte HIV Env-Mutanten vorgeschlagen, die analog zur HFE-3Pi Mutante organisiert und deshalb ebenfalls über eine Gpi-Verankerung mit der Membran verbunden sind (Salzwedel et al., 1993). Die Autoren beobachteten diesen Defekt trotz eines weitgehend normalen zellulären Transports und trotz unveränderter Expression an der Zelloberfläche (Salzwedel et al., 1993). Bei der HFE-3Pi Mutante, bei welcher der intrazelluläre Transport leicht beschleunigt und die Stabilität etwas herabgesetzt war, trat der Fusionsdefekt trotz erhöhter Oberflächenexpression auf (vgl. Abb. 21 und Abb. 26). Für das Hämagglutinin Protein (HA) von Influenzaviren, bei denen die Fusionsprozesse am intensivsten untersucht sind, sind ähnlich aufgebaute Gpi-verankerte Fusionsproteine hergestellt und hinsichtlich ihrer Fusionsaktivität untersucht worden. Auch bei diesen Versuchen waren die so modifizierten Hüllproteine jeweils nicht fusogen (Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995). Die Feinanalyse des Fusionsvorgangs zeigte, daß es bei diesen Gpi-verankerten HA Proteinen zur sogenannten „Hemifusion“, einer Vorstufe der eigentlichen Membranfusion kommt, bei der die jeweils äußere Schicht der benachbarten Doppellipidmembranen miteinander verschmelzen (Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995). Da diese Proteine allerdings nicht zur Bildung von Fusionsporen in der Lage waren, was die Fusion beider Schichten der Doppellipidmembranen miteinander voraussetzt, kam es entsprechend nicht zur Vollendung des Fusionsvorgangs. Vermutlich wird für den Abschluß der Zell-Zell- bzw. Virus-Zell-Fusion ein Fusionsprotein benötigt, das die Lipidmembran mit einer proteinösen Transmembrandomäne durchspannt (Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995). Im Hinblick auf diese Theorie wäre es denkbar, daß das EM31 Hüllprotein mit der verkürzten MSD nicht die komplette Doppellipidschicht überbrückt und deshalb keine Fusion auslösen kann.

Im Zusammenhang mit den Analysen zur Fusionsaktivität unterschiedlicher HFV Hüllproteine fiel auf, daß das wildtypische HFV Env-Protein in den verwendeten Assays nur eine relativ schwache

Fusionsaktivität zeigte. Angesichts der Tatsache, daß die Foamyvirus Replikation in den meisten Zellkultursystemen bedingt durch das virale Hüllprotein zu massiver Synzytienbildung führt, waren diese Beobachtungen in dieser Form nicht erwartet worden. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, daß die Messung der Fusionsaktivität der nach Transfektion in 293T Zellen separat exprimierten Hüllproteine nicht direkt vergleichbar mit den Phänomenen sind, die auftreten, wenn replikationsfähiges Foamyvirus in Zellkultur gehalten wird. Demgemäß ist es wahrscheinlich, daß die relativ niedrige Oberflächenexpression des wildtypischen HFV Proteins dafür verantwortlich ist, daß die Fusionsassays, die von der Oberflächenexpression des Fusionsproteins abhängen, für das HFE-wt Protein verhältnismäßig niedrige Werte ergaben (vgl. Abb. 24 und Abb. 26). Die Fusionsassays, bei denen das HFV Hüllprotein mit dem pMH62 Foamyvirusvektor kotransfiziert wurde, kommen der Situation eines in Zellkultur replizierenden Foamyvirus näher und führten zur Messung einer deutlich erhöhten Fusionsaktivität, die offenbar von der Koexpression der übrigen HFV Proteine abhängig ist (vgl. Abb. 27). Bei diesen Koexpressionsexperimenten findet man in Biotinylierungen deutlich mehr HFV Hüllprotein an der Zelloberfläche als wenn man HFV Env unabhängig von den übrigen HFV Proteinen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Offenbar wird auf diese Weise die intrazelluläre Retention des HFV Hüllproteins aufgehoben, wodurch es vermutlich auch zur deutlichen Zunahme der meßbaren Fusionsaktivität kommt. Da unter diesen experimentellen Bedingungen HF Viruspartikel gebildet werden, ist es denkbar, daß die Virusfreisetzung dazu beiträgt, daß mehr Hüllprotein an der Zelloberfläche biotinyliert werden kann. Zudem ist es möglich, daß auch die erhöhte Fusionsaktivität zumindest zum Teil auf freigesetzte Viruspartikel zurückzuführen ist, die bei engem Kontakt zwischen Virus freisetzender Zelle und Fusionspartnerzelle gebildet, lokal in ausreichend hohen Mengen auftreten könnten, um die Fusion zwischen den Zellen zu erleichtern.

Zusammenfassend haben die Experimente dieser Arbeit ergeben, daß die HFV Partikelbildung und -freisetzung spezifisch auf das homologe HFV Hüllprotein angewiesen ist. So waren fremde virale Hüllproteine nicht in der Lage, HFV Kapside zu pseudotypisieren. Weitere Untersuchungen ergaben, daß der N-terminale Bereich der langen vorgeschlagenen membranspannenden Domäne in diesem Zusammenhang besondere Aufgaben erfüllt, die nicht von heterologen Membranankern übernommen werden können. Möglicherweise wird diese Domäne direkt oder indirekt zur Herstellung des Kontakts zu den viralen Kapsiden benötigt. Die Mutation konservierter Aminosäuren in diesem Bereich beeinflusste verschiedene Funktionen des Hüllproteins. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die MSD des HFV Hüllproteins nicht nur zur Membranverankerung dient, sondern weiterreichende strukturelle Bedeutung hat, welche für unterschiedliche biologische Funktionen des Proteins benötigt werden.