

1. EINLEITUNG

1.1. Retroviren

Die Familie der Retroviren wird von einer diversen Gruppe von Viren gebildet, die aufgrund besonderer taxonomischer Charakteristika, wie Struktur, Zusammensetzung und Eigenheiten des Replikationsverhaltens, zusammengefaßt werden (Coffin, 1992a; Coffin, 1996; Coffin, 1992b). Retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von 80-100 nm und enthalten ein 7-12 kB langes, in diploider Form vorliegendes, unsegmentiertes + Strang RNA Genom. Bezüglich ihrer Replikationsstrategie zeichnen sie sich vor allem durch zwei Besonderheiten aus, die sich im Auftreten der beiden Schlüsselenzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) widerspiegeln (Vogt, 1997). Nach der Infektion der Zielzelle wird das virale RNA Genom durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, ein Vorgang, der als er seinerzeit beschrieben wurde (Baltimore, 1970; Temin, 1964; Temin und Mizutani, 1970), das bis dahin anerkannte, zentrale Dogma vom unidirektionalen Fluß genetischer Information (DNA-RNA-Protein) ablöste und der dafür verantwortlich ist, daß die gesamte Virusfamilie als "Retro"-Viren bezeichnet wurde. Als zweiter essentieller und charakteristischer Schritt schließt sich im Replikationszyklus der Retroviren die Integration des nun in Form von DNA vorliegenden Genoms an.

Nach funktionellen Gesichtspunkten teilt man die Vertreter in die Gruppe der einfachen bzw. der komplexen Retroviren ein (Coffin, 1992a,b). Während die simplen Retroviren nur die Gene für die strukturellen Komponenten der Viruspartikel (*gag*, *env*) sowie die Gene für die viralen Enzyme besitzen (*pro*, *pol*; Beschreibung siehe unten), verfügen die komplexen Vertreter der Familie zusätzlich über akzessorische Gene, die regulatorische Funktionen erfüllen. Parallel zu dieser groben Einteilung der Familie besteht eine auf evolutionäre Verwandtschaft basierende Gliederung in sieben Genera, die in Tabelle 1 gezeigt ist.

Tabelle 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren

Genus	Beispiel	Virusmorphologie	Genom
1. Alpharetroviren	„Avian Leukosis Virus“ (ALV)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	einfach
2. Betaretroviren	„Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV), „Mason-Pfizer Monkey Virus“ (MPMV)	Exzentrisch liegende, sphärische Kapside „B-Partikel“ (MMTV) oder Zylindrische Kapside „D-Partikel“ (MPMV)	einfach
3. Gammaretroviren	„Murine Leukemia Virus“ (MLV)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	einfach
4. Deltaretroviren	„Bovine Leukemia Virus“ BLV, „Human T-cell Leukemia Virus“ (HTLV)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	komplex
5. Epsilonretroviren	„Walleye Dermal Sarcoma Virus“ (WDSV)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	komplex
6. Lentiviren	„Human Immunodeficiency Virus 1“ (HIV-1)	Konusförmige Kapside	komplex
7. Foamyviren	„Humanes Foamy Virus“ (HFV)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	komplex

1.1.1. Aufbau und Genexpression

Alle internen strukturellen Komponenten des Viruspartikels eines einfachen Retrovirus werden durch *gag* kodiert, das sich am 5' Ende des viralen Genoms befindet. Im Laufe der Viruspartikelreifung wird Gag, das ausgehend von der genomischen RNA zunächst als Polyprotein synthetisiert wird, durch die virale Protease (PR) in verschiedene, im reifen Virus vorliegende Proteine, prozessiert. Bei diesem Proteolyseprozeß entstehen neben dem Matrix (MA), Kapsid (CA) und dem Nukleokapsid (NC) Protein zum Teil noch weitere kleinere Spaltprodukte, deren Funktion allerdings bislang nur ungenau charakterisiert ist. Das Matrix Protein, das aufgrund einer Myristylierung und einer basischen Domäne am N-Terminus intrazellulär mit der Plasmamembran assoziiert, bildet im reifen Partikel eine Proteinschicht, die eng mit der viralen Membran verbunden ist. Weiter innen im Viruspartikel befindet sich eine Proteinkapsel, die durch CA Proteine aufgebaut und als Kapsid bezeichnet wird. Diese Kapside, treten je nach Virusgruppe als konusförmige (z.B. HIV, Lentiviren), zylindrische (z.B. MPMV, Typ D Viren) oder sphärische Gebilde (z.B. HFV, Foamyviren) in Erscheinung. Diese Struktur umschließt jeweils einen Ribonukleoproteinkomplex, der aus den basischen NC Proteinen und der diploid vorliegenden genomischen RNA gebildet wird. Neben den Strukturproteinen werden zudem noch zelluläre t-RNA Moleküle, die als Primer für die Reverse Transkription dienen sowie die vom viralen *pol* und

pro Leseraster kodierten Enzyme und bei den komplexen Retroviren zum Teil noch andere akzessorische Proteine mit in das Viruspartikel verpackt.

Die verschiedenen von *pol* und *pro* kodierten Enzyme – Reverse Transkriptase mit RNase H Funktion, Integrase und Protease – werden zusammen mit Gag als Fusionsprotein von der genomischen RNA translatiert (lediglich die Foamyviren, bei denen Pol unabhängig von Gag, über eine separate mRNA translatiert wird, bilden in dieser Hinsicht eine Ausnahme, vgl. 1.2.1) und im Laufe der Virusreifung autokatalytisch durch die Protease aus dem Polyprotein gelöst. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß sie den Ort der Partikelbildung gemeinsam mit den Strukturproteinen erreichen und so in das entstehende Virus gelangen. Bei den meisten Retroviren wird das Gag-Pol (bzw. Gag-Pro-Pol bei MMTV, HTLV und MPMV) Fusionsprotein über einen Leserasterwechsel am Ende von Gag gebildet (bzw. einen doppelten Leserasterwechsel am Ende von Gag und Pro bei MMTV, HTLV und MPMV), der aufgrund spezieller cis-aktiver Sequenzen auf der RNA ausgelöst wird und dazu führt, daß statt des Stop Kodons, das anschließende Gen abgelesen wird. Die MLV Gruppe von Viren, bei denen sich Gag, Pro und Pol im gleichen Leseraster befinden, bedient sich eines anderen Mechanismus, bei dem das Gag Stop Kodon ignoriert (Stop Kodon Suppression), statt dessen Glutamin eingebaut, und in das nachfolgende Leseraster weiter gelesen wird. Da beide Mechanismen relativ ineffizient sind (nur in etwa 5% der Fälle wird das Fusionsprotein gebildet), wird gleichzeitig ein sinnvolles Verhältnis zwischen Strukturproteinen und Enzymen eingestellt. Das virale Hüllprotein (Env) wird am rauhen Endoplasmatischen Retikulum (rER) von einer gespleißten subgenomischen mRNA gebildet und gelangt über den sekretorischen Syntheseweg der Zelle in die Plasmamembran. Während des Transports durch die einzelnen zellulären Kompartimente (ER, Cis-, Medial- und Trans-Golgi) wird das Protein glykosiliert und durch eine zelluläre Protease (Furin oder ein furinähnliches Enzym) in die „Surface“ und „Transmembrane“ Untereinheiten (SU bzw. TM) gespalten, die je nach Virusgruppe meist nonkovalent miteinander verbunden bleiben. In oligomerer Form wird es, wenn die Kapside beim Verlassen der Wirtszelle durch die Membran knospen und ihre Hülle erwerben, mit in das Viruspartikel eingebaut. Abb. 1 zeigt ein integriertes retrovirales Provirus, die verschiedenen viralen Transkripte sowie ein reifes Viruspartikel.

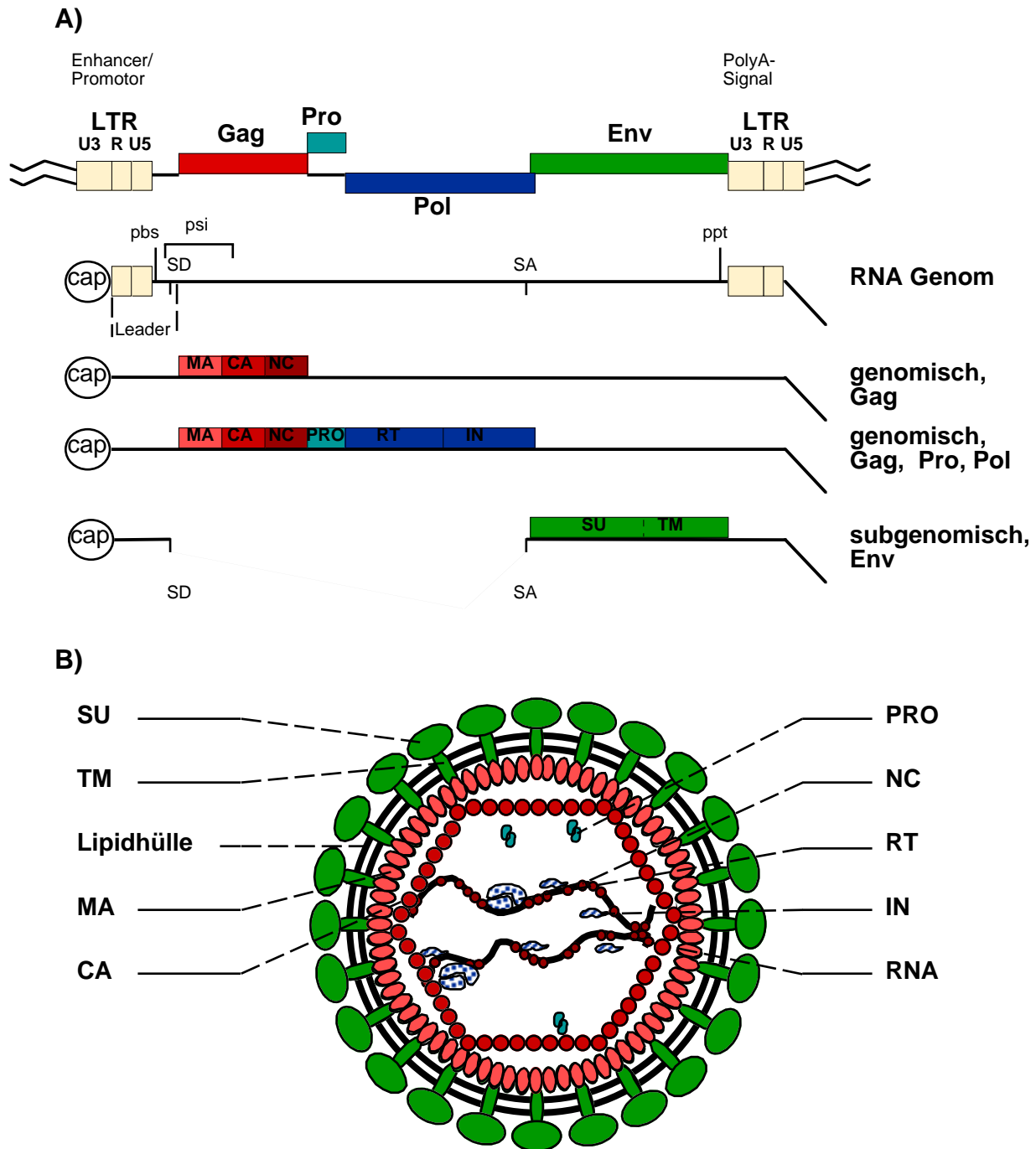


Abb. 1: Struktur und Genexpression eines einfachen Retrovirus.

(A) Genetische Organisation eines generalisierten retroviralen Provirus vom einfachen Typus. Das Provirus wird zu beiden Seiten von den im Laufe der Reversen Transkription gebildeten „long terminal repeats“ (LTR) abgeschlossen und ist in das zelluläre Genom eingebettet. In den LTRs enthaltene Sequenzen, die für die Expression der viralen Gene benötigt werden, sind gekennzeichnet (Enhancer/Promotor, PolyA Signal). Voneinander unabhängige Gene, die je nach Virus in zueinander unterschiedlichen Leserastern kodiert werden, sind durch eigene Rechtecke dargestellt. Die Gene für Gag, Pro, Pol und Env treten immer in der angedeuteten Reihenfolge auf und werden von genomischen (Gag, Gag-Pro-Pol) bzw. subgenomischen (Env) mRNAs exprimiert. Die jeweils exprimierten Proteine sind durch Rechtecke angedeutet. Die Farbkodierung entspricht der Darstellung in (B). Direkt unterhalb des Provirus ist die genomische RNA gezeigt. Für Replikation und Genexpression bedeutsame Sequenzen sind an den Stellen eingezeichnet, an denen sie üblicherweise zu finden sind (SA bzw. SD, Spleißakzeptor bzw. -donor; pbs, „Primer Binding Site“; psi, Verpackungssignal; ppt, Polypurintrakt). (B) Modell eines typischen reifen Viruspartikels. Die Farbkodierung entspricht der Darstellung in (A). Das Kapsid wurde als sphärische Struktur eingezeichnet, wie sie z.B. in der MLV Gruppe von Viren auftritt.

1.1.2. Replikation

Die Prozesse im Zusammenhang mit dem Eintritt des Virus in die Zielzelle stellen den ersten Schritt des viralen Replikationszyklus dar. Zunächst wird hierbei der Kontakt zwischen Virus und Zellmembran über eine spezifische Interaktion der viralen Hüllproteine mit zellulären Rezeptormolekülen hergestellt. Für diese initiale Bindung ist auf der Seite des Retrovirus der aus SU und TM Untereinheiten gebildete oligomere Komplex verantwortlich. Wie in jüngster Zeit röntgenkristallographisch gewonnene Erkenntnisse zeigen, liegt das meist über nonkovalente Wechselwirkungen stabilisierte SU-TM Heterodimer vermutlich als trimerer Komplex vor (Chan und Kim, 1998), der über die TM Untereinheiten in die Virusmembran eingebettet ist und über die stark glykosilierten SU Untereinheiten Kontakt zum zellulären Rezeptor herstellt. Da die angesprochene Interaktion hochspezifisch ist, bestimmt sie größtenteils die Wirtsspezifität und den Gewebetropismus des Virus. Entsprechend sind Viren ohne die Env-Glykoproteine nicht infektiös, und Zellen, die nicht über den spezifischen Rezeptor verfügen, nicht infizierbar. Während der Kontakt des Virus mit der Zelle über die spezifische Erkennung und Bindung des Rezeptors eine essentielle Voraussetzung für die Aufnahme in die Zielzelle darstellt, ist diese Interaktion jedoch keinesfalls hinreichend, um den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen. Vielmehr ist das Virus darauf angewiesen, daß im Anschluß an die Bindung an die Zelle das Fusionspotential der TM Untereinheit aktiviert wird, die dann das Verschmelzen der Virus- und der Zellmembran vermittelt. Die molekularen Ereignisse in diesem Zusammenhang sind bislang nur ungenau verstanden, jedoch wurde in letzter Zeit vor allem basierend auf neueste Strukturinformationen über die HIV TM Untereinheit ein Fusionsmodell vorgeschlagen (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997). Für die meisten Retroviren geht man davon aus, daß der Fusionsprozeß in pH unabhängiger Weise über eine Konformationsänderung der Hüllproteinoligomere, die durch die Rezeptorbindung ausgelöst wird, direkt an der Plasmamembran stattfindet (McClure et al., 1988; McClure et al., 1990). Lediglich das MMT Virus scheint in dieser Hinsicht eine Ausnahme darzustellen und erst nach der Aufnahme in Endosomen, ausgelöst durch eine pH Veränderung, mit der Membran zu verschmelzen (Redmond et al., 1984). Unabhängig davon welcher Fusionsmechanismus zugrunde liegt, führt die Vereinigung der Virusmembran mit der zellulären Membran zur Aufnahme des Kapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle.

Bei den meisten Retroviren (eine Ausnahme bilden die Foamyviren, vgl. 1.2.3) setzt nun die Reverse Transkription ein. Dabei schreibt die Reverse Transkriptase (RT) die genomische RNA, die zu diesem Zeitpunkt als Nukleoproteinkomplex im Zytoplasma vorliegt, in einer komplexen Reaktionsfolge in doppelsträngige DNA um. Wie viele andere zelluläre Polymerasen, ist auch die

RT von einem Primer abhängig. Für die Synthese des DNA Minusstrangs wird diese Aufgabe von einem zellulären t-RNA Molekül, das im Viruspartikel mitgeführt wird und an die Primer Bindungsstelle („Primer Binding Site“, pbs, vgl. Abb. 1) bindet, erfüllt. Die + Strang Synthese wird vom sogenannten Polypurintrakt aus gestartet. Das Endprodukt der Reversen Transkription ist ein lineares doppelsträngiges DNA Molekül, das zu beiden Seiten von den LTR Sequenzen abgeschlossen wird und in einem Nukleoproteinkomplex vorliegt. Diese Struktur, die man auch als Präintegrationskomplex bezeichnet, wird schließlich zur Integration in den Zellkern transportiert. Dort katalysiert die Integrase die Insertion des Provirus in das zelluläre Genom. Die Retroviren sind die einzigen Vertreter innerhalb der Animalviren, deren Replikation essentiell auf die Integration ihres Genoms in die DNA der Wirtszelle angewiesen ist und die über ein eigenes Enzym verfügen, das diese Aufgabe mit hoher Effizienz erfüllt (Brown, 1997). In bezug auf die Replikation der Retroviren erfüllt die Integration in das Genom der Wirtszelle eine Doppelfunktion. Da sich retrovirale DNA nicht autonom replizieren kann, wird durch die Integration zum einen sichergestellt, daß das Provirus auch in sich teilenden Zellen nicht verloren geht und statt dessen auf genetischem Wege bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Zum anderen ist das Provirus als regulärer Bestandteil der zellulären DNA der Proteinexpressionsmaschine der Wirtszelle zugänglich, so daß diese zur eigenen Vermehrung ausgenutzt werden kann. Dazu sind allerdings eine Reihe cis-aktiver Sequenzen nötig, die sich vor allem in den LTR Regionen befinden, die während der Reversen Transkription entstanden sind. So enthält die 5'U3 Region Promotor und Enhancer Elemente, die zum Teil über ubiquitär und konstitutiv exprimierte zelluläre Transkriptionsfaktoren, zum Teil aber auch durch gewebsspezifische Faktoren und (bei komplexen Retroviren) über virale Transaktivatoren angesteuert werden, und die Genexpression treiben. Ferner befindet sich im 3' Bereich des Genoms (je nach Virus in der 3'U3 oder R Region) ein PolyA Signal, das zur Polyadenylierung der viralen RNA führt. Die RNAs werden mit einer 5'Cap Struktur versehen und in das Zytoplasma transportiert. Dort werden die Genprodukte translatiert und anschließend im Laufe eines komplexen Morphogeneseprozesses zu Viruspartikeln zusammengefügt, die dann die Zelle verlassen.

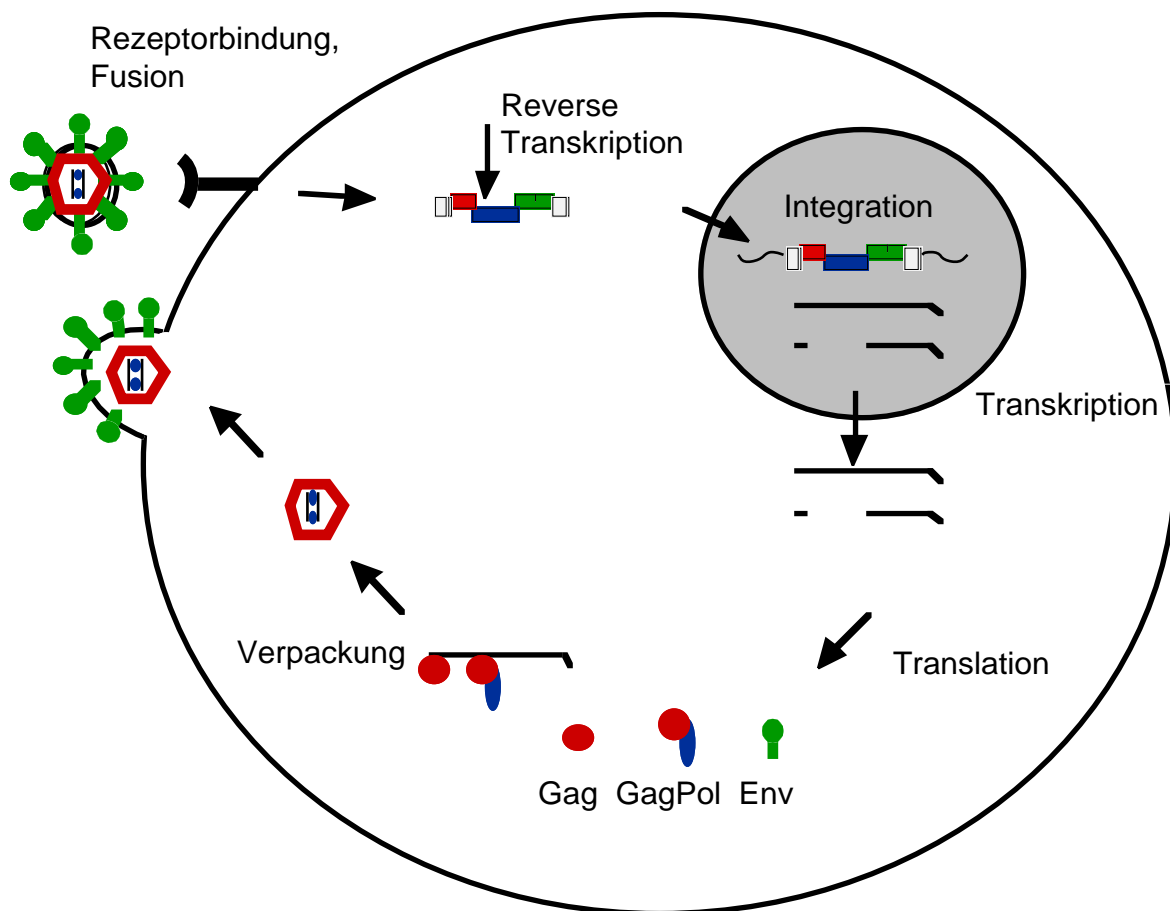


Abb. 2: Der retrovirale Replikationszyklus.

Zusammenfassung der Vorgänge während eines typischen retroviralen Replikationszyklus. Nach der Bindung an den Rezeptor und der Fusion mit der Zellmembran, gelangt das Virus in das Zytoplasma, wo sich die Reverse Transkription anschließt. Der Präintegrationskomplex wird in den Zellkern transportiert und dort in das zelluläre Genom integriert. Nach Transkription und Translation werden die verschiedenen viralen Komponenten zu Partikeln zusammengefügt, die an der Plasmamembran knospen und so ihre Hülle mit den Env-Proteinen erwerben.

1.1.3. Morphogenese

Um den Replikationszyklus zu schließen, müssen im Laufe der Virusmorphogenese infektiöse Viren gebildet werden, die das RNA Genom aus der infizierten Zelle tragen und neue Zellen infizieren (Swanstrom und Wills, 1997). Diesem Prozeß, an dem die Gag, Gag-Pro-Pol und Env-Polyproteine beteiligt sind, liegt die zeitlich und räumlich genau regulierte Abfolge zahlreicher molekularer Interaktionen zugrunde, die zum Teil nur unvollständig verstanden sind. Wie bereits oben erwähnt, stellt die Synthese der retroviralen Strukturkomponenten in der Form von Polyproteinen, gerade im Zusammenhang mit der Morphogenese, eine besonders elegante Strategie dar. So ermöglicht sie zum Beispiel auf einfache Weise durch die sequentielle Prozessierung der Vorläuferproteine, die zeitlich regulierte Funktion unterschiedlicher viraler Komponenten im

Verlauf des Reifungsprozesses. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Abfolge der einzelnen Proteine in den Polyproteinen, die genau der räumlichen Anordnung der unterschiedlichen Bestandteile im reifen Partikel entspricht. Ferner wird die Anzahl an Signalen, die nötig ist, um alle Elemente des Viruspartikels an den Synthesort zu befördern, durch die Verwendung von Polyproteinen auf ein Minimum beschränkt. Eine zentrale Rolle spielt im Zusammenhang mit der retroviralen Morphogenese das Gag-Polyprotein, alleine schon deswegen, weil es bei fast allen Retroviren (eine Ausnahme bilden die Foamyviren, vgl. 1.2.2) unabhängig von der Expression anderer viraler Proteine in der Lage ist, die Freisetzung von „virus like particles“ (VPLs) zu ermöglichen. Zudem ist dieses Protein an der Verpackung der meisten anderen Komponenten des Viruspartikels direkt beteiligt.

Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, daß man die Retroviren hinsichtlich ihrer Reifung grob in zwei Gruppen einteilen kann. Auf der einen Seite stehen Viren wie MMTV, MPMV (also Typ B und D Viren), die aus Gag-Polyproteinen frei im Zytoplasma der Zelle liegende, als intrazytoplasmatische A-Partikel bezeichnete, sphärische Strukturen bilden, die zur Plasmamembran transportiert werden und dort knospen. Auf der anderen Seite beobachtet man bei Viren wie ASLV, HIV oder MLV keine vorgefertigten Kapside im Zytoplasma der Zelle. Dieser Morphogenesetyp, der als Typ C bezeichnet wird, ist durch das Auftreten makromolekularer, elektronendichter Aggregate an der Plasmamembran charakterisiert, die sich zu halbmondförmigen, direkt unter der sich kuppelförmig vorwölbenden Plasmamembran liegenden Strukturen ausweiten. Im weiteren Verlauf schnüren sich die Partikel als unreife Viren von der Zellmembran ab, die nach der Ausreifung die jeweils charakteristischen Kapsidstrukturen zeigen. Eine diesem Morphogenesetyp ähnliche Reifung wurde für eine bestimmte Gruppe endogener Retroviren beschrieben, denen ein funktionelles Hüllprotein fehlt. Auch diese Viren bauen ihre Partikel während der Umhüllungsphase zusammen – allerdings knospen sie nicht an der Plasmamembran, sondern in Zisternen des ER (intrazisternale A Partikel, IAPs). Trotz der unterschiedlichen Morphogeneseabläufe scheint der Prozeß bei dem aus den Gag-Vorläufermolekülen Kapside gebildet werden bei den Typ B/D und Typ C Retroviren sehr ähnlich zu sein, da eine einzige Punktmutation im Gag-Proteins von MPMV dieses Virus vom Typ D in den Typ C Morphogeneseweg lenkt (Rhee und Hunter, 1990). Die Einzelheiten der unterschiedlichen retroviralen Morphogeneseabläufe sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

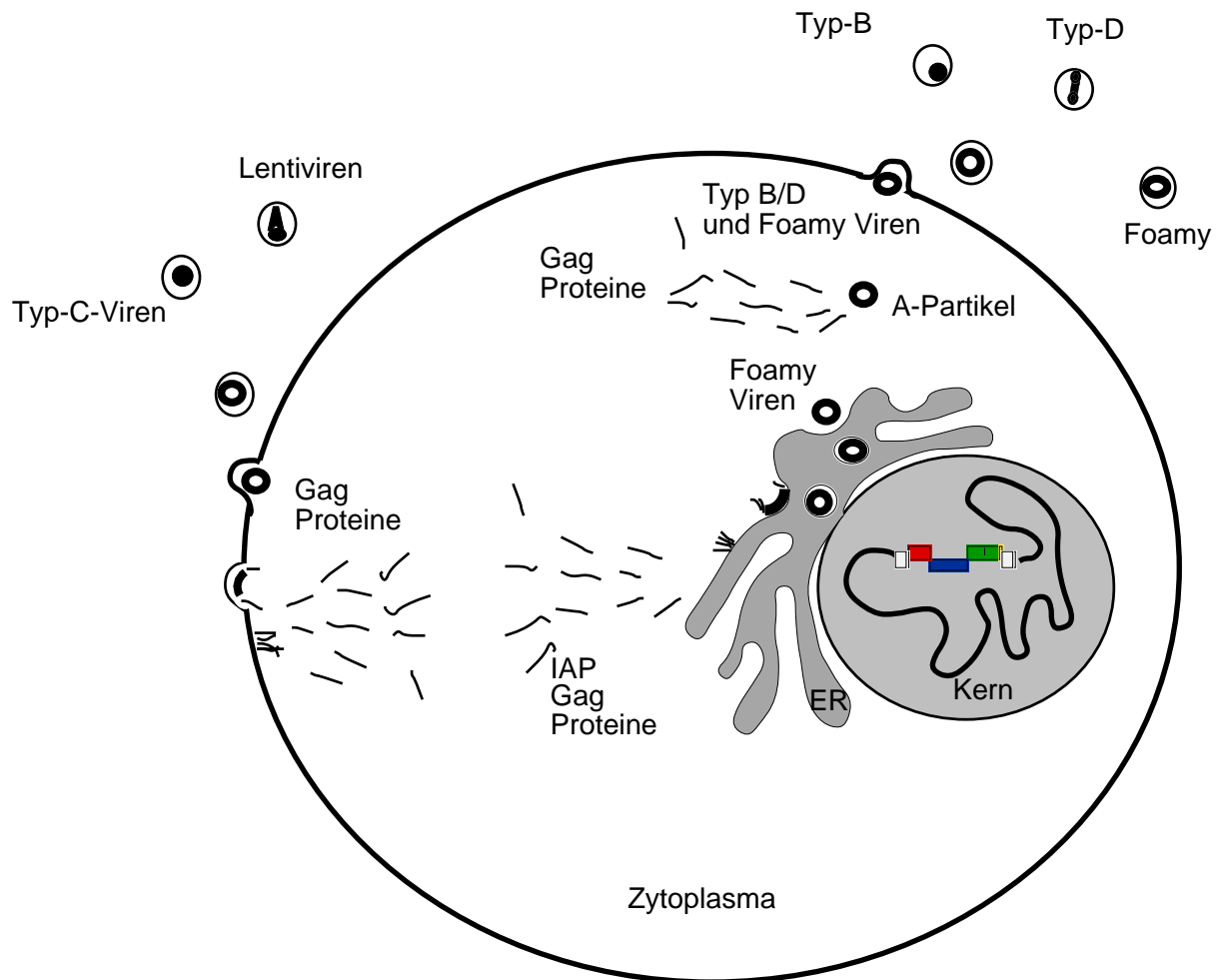


Abb. 3: Retrovirale Morphogenese.

Retroviren vom Morphogenesetyp-C (Lentiviren, MLV) bilden ihre internen Strukturen während der Umhüllung an der Plasmamembran. Während IAPs nach einem ähnlichen Vorgang gebildet werden, allerdings in das ER knospen, werden bei Typ-B bzw. Typ-D Viren sowie bei den Foamyviren zunächst frei im Zytoplasma liegende, sphärische Strukturen gebildet, die dann zur Plasmamembran gelangen, dort umhüllt werden und die Zelle verlassen. Extrazellulär stellt sich nach der Prozessierung des Gag-Polyproteins jeweils die reife Morphologie ein. Nur bei den Foamyviren, die sowohl an der Plasmamembran, als auch in intrazelluläre Kompartimente knospen (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998), läßt sich keine offensichtliche Reifung beobachten. Die Figur wurde in leicht veränderter Form aus (Swanstrom und Wills, 1997) übernommen.

Durch das Knospen der viralen Partikel an zellulären Membranen, werden umhüllte Partikel, in deren Membran die Env-Proteine eingelassen sind, freigesetzt. Die Morphogenese wird durch einen Reifungsprozeß abgeschlossen, der bei den meisten Viren elektronenmikroskopisch deutlich sichtbar ist. Dieser Vorgang, der für die Bildung infektiöser Viren unerlässlich ist, wird durch die Aktivität der Protease (PR) vermittelt.

1.2. Foamyviren

Aufgrund einer Reihe besonderer Merkmale, auf die weiter unten genauer eingegangen wird, bilden die Foamyviren (oder lat. Spumaviren) eine eigene Unterfamilie innerhalb der Retroviren. Im Laufe der Zeit sind Vertreter dieser Virusgruppe aus verschiedenen Primatenspezies und anderen Säugetieren (z.B. Katzen, Rindern) isoliert worden, so daß man davon ausgeht, daß die Foamyviren weitverbreitet vorkommen (Linial, 1999). Das molekularbiologisch am intensivsten untersuchte Foamyvirus wird als Humanes Foamyvirus (HFV) bezeichnet und wurde ursprünglich aus einem Patienten mit Nasopharynx-Karzinom gewonnen (Achong et al., 1971). Allerdings deuten neue seroepidemiologische Studien daraufhin, daß der Mensch kein natürlicher Wirt für Foamyviren zu sein scheint (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995). Zudem haben Sequenzanalysen gezeigt, daß HFV verschiedenen SFV („simian foamy virus“) Isolaten aus Schimpansen (SFVcpz, SFV-6 und SFV-7) nahezu identisch ist (Herchenröder et al., 1994). Angesichts dieser Befunde ist es höchstwahrscheinlich, daß es sich bei HFV eigentlich um ein Schimpansenvirus handelt, das zoonotisch auf den Menschen übertragen wurde. In Anbetracht dessen ist die Bezeichnung des in dieser Arbeit untersuchten Virus als HFV strenggenommen nicht korrekt. Dennoch ist aus historischen Gründen und da bislang noch kein allgemeingültiger Konsens über eine Neubenennung gefunden wurde nach wie vor diese Nomenklatur in Gebrauch.

Im natürlichen Wirt etablieren die Foamyviren trotz hoher Antikörpertiter persistierende Infektionen, die allerdings ohne erkennbare pathologische Folgen bleiben. Die benigne Natur der Foamyviren bei natürlichen Infektionen steht im scharfen Kontrast zu der in vitro beobachteten Zytopathogenität, die durch das Auftreten großer, vielkerniger, vakuolisierter Zellverbände (Synzytien) charakterisiert ist und letztendlich sogar ausschlaggebend für die Benennung der Virusgruppe war. Gerade wegen des apathogenen Infektionsverlaufs, der für den Einsatz in der somatischen Gentherapie ein wichtiges Kriterium ist, hat diese Gruppe der Retroviren in den letzten Jahren zunehmend mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen, was zur Entdeckung zahlreicher molekularbiologischer Besonderheiten geführt hat.

1.2.1. Genexpression und Genprodukte

Genexpression

Auf den ersten Blick charakterisiert der Genomaufbau die Foamyviren als einen typischen Vertreter der komplexen Retroviren, der neben den *gag*, *pol* und *env* Genen am 3' Ende noch über akzessorische Leseraster verfügt (vgl. Abb. 4, Tas und Bet). Im Gegensatz zu konventionellen Retroviren besitzen die Foamyviren allerdings neben dem U3 Promotor einen zusätzlichen internen Promotor (IP) im 3' Bereich des *env* Gens (Löchelt et al., 1993). Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator (Tas) reguliert. Während der LTR Promotor/Enhancer ohne Tas Expression vollkommen stumm ist (Baunach et al., 1993; Yu et al., 1993), hat der interne Promotor eine schwache Basalaktivität (Yang et al., 1997), die zur Anhäufung von Tas und Bet führt. Erreicht Tas ein bestimmtes Expressionslevel, spricht auch der LTR Promotor/Enhancer an, so daß auch Gag, Pol und Env exprimiert werden. Im Hinblick auf die Genexpression zeichnen sich die Foamyviren noch durch eine weitere Besonderheit aus: Während das Pol-Polyprotein bei allen anderen Retroviren als Fusionsprotein zusammen mit Gag exprimiert wird (vgl. Aufbau und Genexpression und Abb. 1), findet sich bei Foamyviren eine eigene gespleißte mRNA, die zur Synthese von Pol genutzt wird (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996a). In dieser Hinsicht erinnern die Foamyviren an die Hepadnaviren, die ihre Polymerase (P-Protein) ebenfalls unabhängig von ihrem Strukturprotein (Core-Protein) bilden (Bonneville und Hohn, 1993; Loeb und Ganem, 1993). Als Folge dieser Gag unabhängigen Pol-Expression müssen die Foamyviren im Zusammenhang mit der Morphogenese gegenüber den anderen Retroviren alternative Lösungen gefunden haben, ihre Polymerase zu verpacken (Rethwilm, 1996). Denkbar wäre eine Interaktion von Pol mit der genomischen RNA oder dem Gag-Protein. Allerdings ist diese Frage bisher experimentell noch nicht gelöst.

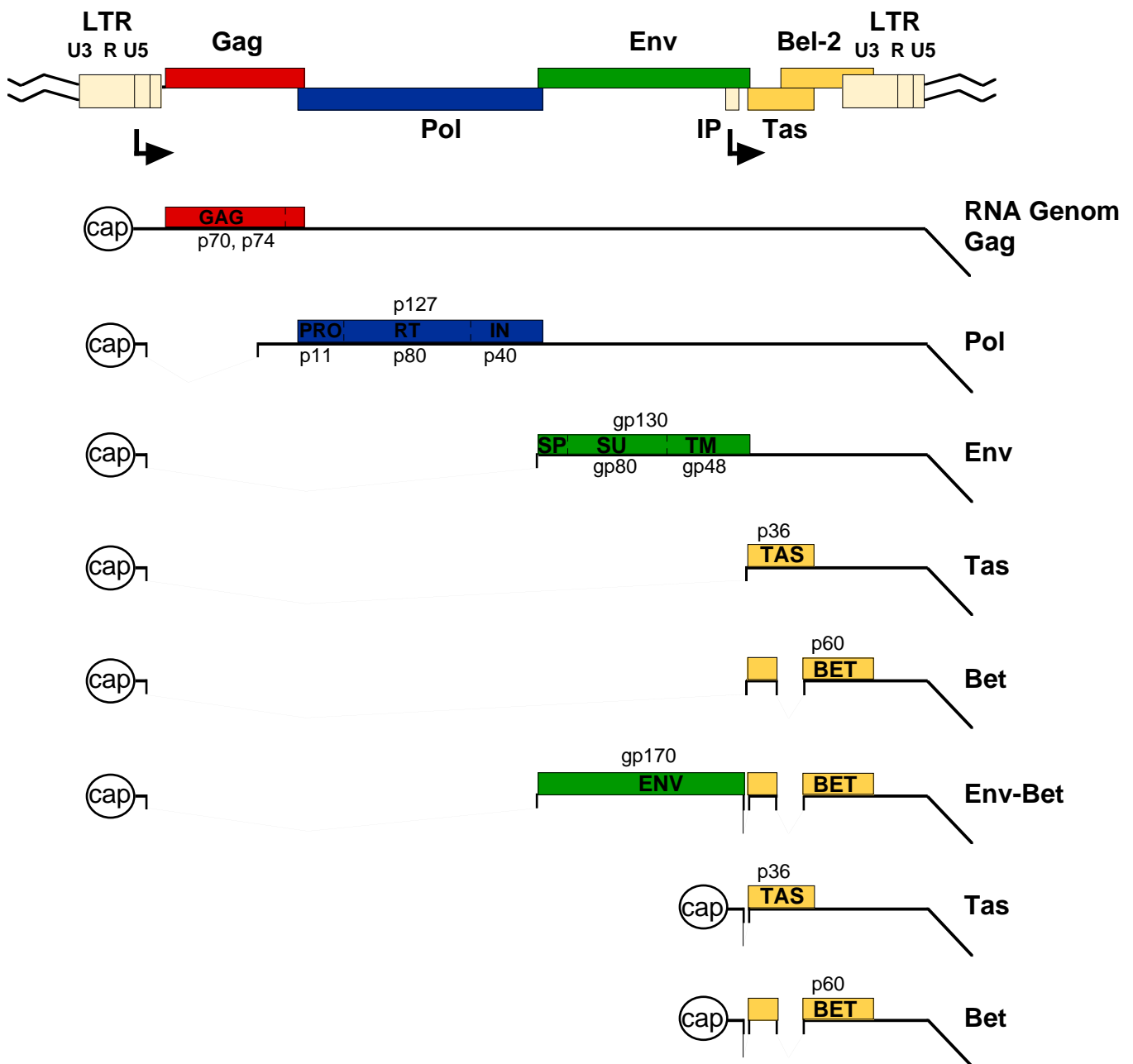


Abb. 4: Genom und Genexpression der Foamyviren.

(A) Genetische Organisation eines HFV Provirus, das zu beiden Seiten von den im Laufe der Reversen Transkription gebildeten „long terminal repeats“ (LTR) abgeschlossen und in das zelluläre Genom eingebettet ist. Voneinander unabhängige Gene, die in zueinander unterschiedlichen Leserastern kodiert werden, sind durch eigene Rechtecke dargestellt. Neben dem LTR Promotor enthält HFV einen internen Promotor (IP) im 3' Bereich des env Gens. Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator (Tas) stimuliert. Die verschiedenen Transkripte werden polyadenyliert, mit einer Cap Struktur versehen und zum Teil mehrfach gespleißt. Die von den jeweiligen mRNAs exprimierten Proteine, sind durch Rechtecke angedeutet. Die Molekulargewichte der Vorläuferproteine bzw. der unterschiedlichen Spaltprodukte sind angegeben.

Akzessorische Proteine

Der foamyvirale transkriptionelle Transaktivator (Tas), der im Gegensatz Tat (HIV) oder Tax (HTLV) direkt an die DNA bindet, weist keine Sequenzhomologien zu anderen retroviralen Transaktivatoren auf und agiert somit über einen eigenen Mechanismus (Linial, 1999). Entsprechend seiner Funktion, wurde eine interne DNA Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich des 36 kD Proteins entdeckt (Blair et al., 1994; He et al., 1996; Venkatesh et al., 1993). Wie aus Abb. 4 hervorgeht, exprimieren die Foamyviren neben Tas noch ein weiteres akzessorisches Protein, das ausgehend von einer mehrfach gespleißten mRNA, die Teile des *tas* Exons mit dem bel-2 Leseraster verbindet, gebildet und als Bet Protein bezeichnet wird (Muranyi und Flügel, 1991). Die genaue Funktion dieses, für die Replikation in vitro entbehrlichen Proteins, ist bisher noch unklar. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, daß Zellen, die Bet stabil exprimieren, gegen HFV Superinfektion geschützt sind (Bock et al., 1998). Im Zusammenhang mit Bet ist noch ein weiteres Genprodukt charakterisiert worden, das sich aus den extrazellulären Teilen des Hüllproteins und Bet zusammensetzt (Env-Bet) (Lindemann und Rethwilm, 1998). Dieses 170kD große Fusionsprotein, das aufgrund eines im Env ORF liegenden, konservierten Spleißdonor-, Spleißakzeptorpaars über einen Spleißvorgang gebildet wird, assoziiert nicht mit FV Partikeln und wird auch nicht für deren Infektiosität und Freisetzung benötigt. Da sich Env-Bet auch nicht direkt auf das Replikationsverhalten in vitro auswirkt, konnte ihm bislang keine Funktion zugewiesen werden.

Strukturproteine

Das FV Gag-Protein wird wie bei anderen Retroviren auch von einer ungespleißten RNA gebildet und weist eine Reihe von Besonderheiten auf. Während alle retroviralen Gag-Proteine über sogenannte Cys-His Boxen in den NC Domänen verfügen, welche an der Erkennung des Verpackungssignals auf der genomischen RNA beteiligt sind (Berkowitz et al., 1996), fehlen den Foamyviren diese Sequenzen. Statt dessen hat man bei Foamyviren in diesem Bereich sogenannte Glycin-Arginin Boxen (GR-Boxen) gefunden, die Nukleinsäurebindung ermöglichen, aber auch dafür verantwortlich sind, daß das Foamy Virus Gag-Polyprotein in den Nukleus der Zelle wandert (Schliephake und Rethwilm, 1994). Die Bedeutung der transienten Kernlokalisierung der Gag-Proteine ist bisher nicht bekannt. Die Fähigkeit des FV Gag-Proteins über die GR-Boxen, sowohl RNA als auch DNA zu binden (Yu et al., 1996b), erinnert an das Core Protein der Hepadnaviren, das über spezifische Arginine im C-Terminus ebenfalls RNA und DNA binden kann (Hatton et al., 1992; Nassal, 1992). Im Verlauf der Viruspartikelreifung wird der Gag-Vorläufer üblicherweise durch die Protease in MA, CA und NC gespalten, so daß man in extrazellulären Viren die jeweiligen Proteine mit den entsprechenden Molekulargewichten nachweisen kann. Bei Foamyviren dagegen

findet man sowohl intrazellulär als auch in extrazellulären Viren nur zwei Formen des Gag-Proteins (p70 und p74), die jeweils ungefähr äquimolar auftreten (Netzer et al., 1990). Diese Prozessierung, bei der die virale Protease einen ca. 3 kD großen Teil vom C-Terminus des Proteins schneidet, ist essentiell wichtig für die Bildung infektiöser Viren (Enssle et al., 1997; Konvalinka et al., 1995; Pfrepper et al., 1997). Aufgrund der zentralen Stellung des HFV Hüllproteins in der Thematik dieser Arbeit, wird dieses im Anschluß gesondert besprochen.

1.2.2. Das HFV Hüllprotein

Das HFV Hüllprotein, dessen funktionelle Charakterisierung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, ist ein 988 Aminosäuren langes Protein, das ausgehend von einer einfach gespleißten mRNA synthetisiert wird. Computeranalysen, Sequenzvergleiche und experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, daß es funktionell und strukturell, den übrigen retroviralen Hüllproteinen gleicht. Zwei prominente hydrophobe Bereiche gliedern das ca. 130 kD große Protein in unterschiedliche Domänen. Die erste hydrophobe Region gehört zum N-terminal liegenden Signalpeptid des HFV Env-Proteins, das dafür verantwortlich ist, daß das Protein am rauhen Endoplasmatischen Retikulum (rER) gebildet wird und in den sekretorischen Syntheseweg der Zelle gelangt. Während der Synthese am rER werden diese Signalsequenzen meist durch ein zelluläres Enzym (Signalase) abgespalten. Die durch Computerprogramme vorhergesagte Schnittstelle für die Signalase definiert das HFV Env-Signalpeptid als eine außergewöhnlich lange Domäne (86 Aminosäuren) (Wang und Mulligan, 1999). Vermutlich wird dieses Peptid auch bei HFV Env abgespalten, allerdings ist dies bislang noch nicht experimentell belegt. Die zweite stark hydrophobe Region von HFV Env liegt am C-Terminus des Proteins und verankert es in zellulären Membranen (ER, Plasmamembran). Obwohl gezeigt worden ist, daß dieser Bereich für die Assoziation mit der Zellmembran benötigt wird (Wang und Mulligan, 1999), sind die genauen Ausmaße dieser membranspannenden Domäne noch nicht kartiert worden. In zwei unabhängigen Publikationen wurden die N- und C-terminalen Grenzen dieser Region leicht unterschiedlich definiert (Flügel et al., 1987; Wang und Mulligan, 1999) (vgl. Abb. 5). Den Lentiviren ähnlich, ist diese Domäne auch bei HFV von einer geladenen Aminosäure in der Mitte und am 3'Ende (jeweils Lysin) gekennzeichnet (Wang und Mulligan, 1999).

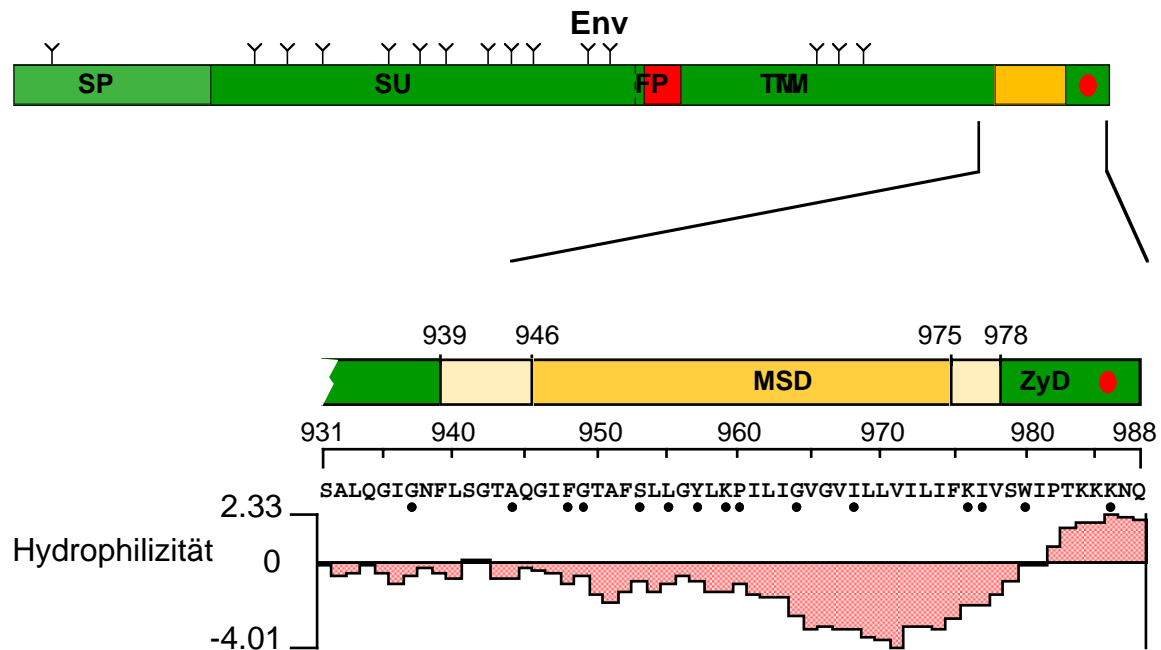


Abb. 5: Schematische Darstellung des HFV Hüllproteins.

Die Übersicht zeigt den Aufbau HFV Hüllproteins. Die unterschiedlichen Domänen sind eingezeichnet und benannt (SP, Signalpeptid; SU, „Surface“ Untereinheit; TM, „Transmembrane“ Untereinheit; FP, Fusionspeptid; MSD, membranspannende Domäne; ZyD, zytoplasmatische Domäne). Die verschiedenen N-Glykosilierungsstellen sind angedeutet. Das von Goepfert et al. beschriebene ER-Retentionssignal ist durch einen roten Punkt angedeutet. Der C-terminale Bereich des Proteins ist vergrößert dargestellt. Die Aminosäuresequenz sowie ein Hydrophilizitäts Plot der mit Hilfe der Protean Software erstellt wurde, sind eingezeichnet. Zwischen allen bekannten FV Isolaten konservierte Aminosäuren, sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Der Bereich der von Flügel et al. bzw. Wang et al. angenommenen membranspannenden Domäne ist farblich hervorgehoben (Aminosäuren 939-975 bzw. 946-978).

Wie andere retrovirale Hüllproteine, wird auch HFV Env auf dem Weg durch die sekretorischen Kompartimente der Zelle in die zwei Untereinheiten SU und TM geschnitten. Diese Prozessierung, die essentiell für die Aktivierung der Fusogenität retroviraler Hüllproteine ist und dadurch eine zwingende Voraussetzung für die Entstehung infektiöser Viruspartikel darstellt, wird normalerweise von zellulären Proteasen aus der Furin Familie ausgeführt (Hallenberger et al., 1992; Hosaka et al., 1991). Vermutlich macht das HFV Env-Protein, dessen Sequenz an der Spaltstelle homolog zu der entsprechenden Sequenz anderer retroviraler Envs ist, in dieser Hinsicht keine Ausnahme. Während die Surface Untereinheit über zahlreiche potentielle N-Glykosilierungsstellen verfügt, kann die TM Untereinheit an drei verschiedenen Positionen glykosiliert werden. Ob diese auch alle genutzt werden und welche Bedeutung ihnen im einzelnen zukommt, ist noch ungeklärt. In SDS-PAGE Gelen treten SU und TM aufgrund des komplexen und heterogenen Glykosilierungsmusters als mehr oder weniger breite Banden bei 80 kD bzw. 48 kD in Erscheinung.

Analog zur Situation bei anderen Retroviren, geht man davon aus, daß der SU Teil von HFV Env für die Rezeptorerkennung und die TM Untereinheit für die Fusion benötigt werden. Entsprechend findet man auch im HFV TM Protein kurz nach der SU/TM Spaltstelle eine Aminosäurefolge, die den von White geforderten Kriterien für Fusionspeptide entspricht (White, 1992; White, 1990) und deshalb von Wang und Mulligan als das putative HFV Fusionspeptid angesprochen wurde (Wang und Mulligan, 1999). Die strukturelle Verwandtschaft des HFV TM Proteins zu den anderen retroviralen TM Proteinen wird noch durch das Auftreten von langen α -helikalen Bereichen am N- und C-Terminus der Ektodomäne erweitert, die man bei allen bislang bekannten retroviralen Hüllproteinen an vergleichbaren Positionen finden kann (Wang und Mulligan, 1999). Neue kristallographische Erkenntnisse haben gezeigt, daß diese Helizes die Kernstruktur des retroviralen Fusionskomplexes bilden (Chan et al., 1997; Chan und Kim, 1998; Weissenhorn et al., 1999; Weissenhorn et al., 1997). Entsprechend liegt die Vermutung nahe, daß die Foamyviren den gleichen Fusionsmechanismus verwenden.

Neben den bisher angesprochenen Homologien weist das HFV Env-Protein aber auch einige Besonderheiten auf. So enthält die sehr kurze zytoplasmatische Domäne des Proteins ein Trilysin Motiv, das als „ER-retrieval-signal“ wirkt und den Transport des HFV Hüllproteins an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al., 1997). Kürzlich haben die gleichen Autoren gezeigt, daß dieses Signal auch dafür mitverantwortlich ist, daß Foamyviren hauptsächlich an intrazytoplasmatischen Membranen knospen (Goepfert et al., 1999). Ein fundamentaler Unterschied zu allen anderen retroviralen Hüllproteinen ist seit kurzem im Zusammenhang mit der viralen Morphogenese aufgedeckt worden. Während alle anderen Retroviren auch ohne die Expression ihrer Hüllproteine sogenannte „virus like partikles“ (VLPs) freisetzen können, sind Foamyviren dazu ohne die Expression von Env nicht in der Lage (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Offenbar enthält das Foamy Virus Hüllprotein bisher noch nicht näher charakterisierte Strukturen, die für die Membranhüllung der internen viralen Komponenten sowie für die Freisetzung der Partikel benötigt werden.

1.2.3. Besonderheiten der foamyviralen Replikation

Die neuesten experimentellen Ergebnisse haben dazu geführt, daß sich unsere Vorstellung von den molekularen Abläufen während der FV Replikation deutlich präzisiert hat. Die Besonderheiten, die auf verschiedenen Ebenen entdeckt wurden, ergeben das Bild einer gemischten Replikationsstrategie, die Elemente von Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren vereinigt und aufgrund derer die Foamyviren eine Sonderstellung innerhalb der Familie der Retroviren einnehmen (Heinkelein et al., 2000). Neben den bereits oben angesprochenen FV Charakteristika

bezüglich ihres Gag-Proteins und ihrer Genexpression gründet sich diese neue Betrachtungsweise vor allem auf den ungewöhnlichen Zeitpunkt zu dem die reverse Transkription im FV Replikationszyklus abläuft. Während bei allen anderen Retroviren die DNA Synthese zu Beginn des Replikationszyklus, also direkt nach der Infektion der Zelle, abgewickelt wird, führen die Foamyviren ihre Reverse Transkription spät im Replikationszyklus, also direkt bevor die infizierte Zelle verlassen wird, aus. Dieses Modell wird von dreierlei experimentellen Befunden gestützt: Zum einen war schon seit geraumer Zeit aufgefallen, daß in FV infizierten Zellen große Mengen unintegrierter viraler DNA auftreten (Mergia und Luciw, 1991; Moebes et al., 1997). Ferner konnte gezeigt werden, daß sich auch in extrazellulären Viruspartikeln bereits (zumindest teilweise) DNA befindet (Yu et al., 1996a). Schließlich erwies sich dieses Genom auch als funktionell, da Experimente mit RT-Inhibitoren (AZT) zeigten, daß Foamyviren im Gegensatz zu anderen Retroviren, Zellen auch in der Gegenwart von RT-Inhibitoren infizieren konnten, was eine bereits vorher weitgehend abgeschlossene DNA Synthese voraussetzt (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999). Dieser den Zeitpunkt der Reversen Transkription betreffende Unterschied, dessen aufwendige Charakterisierung auf den ersten Blick etwas formalistisch erscheinen mag, hat für die Replikationsstrategie der Foamyviren allerdings weitreichende Konsequenzen. Entsteht nämlich bereits in der infizierten Zelle ein funktionelles DNA Genom, besteht die Möglichkeit für einen internen Replikationszyklus, bei dem das Virus, statt die Zelle zu verlassen, wieder in das Genom reintegrieren kann. Für die Gruppe der Hepadnaviren ist ein solcher „Kurzschluß“ der Replikation bereits seit längerer Zeit bekannt (Ganem, 1996; Nassal und Schaller, 1993; Tuttleman et al., 1986). Dadurch daß auf diese Weise virale DNA wieder in den Zellkern getragen wird, sind die Hepadnaviren, die ja nicht integrationsfähig sind, zur Persistenz in der Lage (Ganem, 1996; Nassal und Schaller, 1993). Während es bislang nur Hinweise gab (z.B. durch das Auftreten zahlreicher Integrate bei persistent infizierten Zelllinien), daß ein ähnlicher Mechanismus auch bei Foamyviren möglich ist, gelang es kürzlich, intrazelluläre Reintegration bei Foamyviren experimentell zu messen (Heinkelein et al., 2000).

Da Foamyviren integrieren können und dies für ihre Replikation auch müssen (Enssle et al., 1999; Neves et al., 1998), ist der Evolutionsvorteil, der durch diesen alternativen Replikationsweg entsteht, zunächst nicht offensichtlich. Durch eine effiziente Reintegration kommt es zwangsläufig zu einer Erhöhung der Viruskopien im Wirtsgenom. Möglicherweise wirkt sich das dadurch erhöhte Expressionslevel oder die dadurch entstehende Unabhängigkeit von zellulären Inaktivierungsmechanismen (Demethylierung) positiv aus (Heinkelein et al., 2000). Da die Zelle durch fortlaufende Retrotransposition auf Dauer massiv geschädigt werden könnte, wäre es alternativ auch denkbar, daß dieser Mechanismus, der letztendlich zum Zelltod durch Apoptose

führen könnte, die Freisetzung von fertig gebildeten Viruspartikeln erleichtert und damit die Verbreitung der Viren fördert (Foamyviren schnüren sich hauptsächlich in intrazelluläre Kompartimente ab, vgl. 1.2.2) (Heinkelein et al., 2000). In Abb. 6 ist der foamyvirale Replikationszyklus in einer Übersicht zusammengefasst. Besonderheiten gegenüber dem klassischen retroviralen Zyklus sind farblich hervorgehoben.

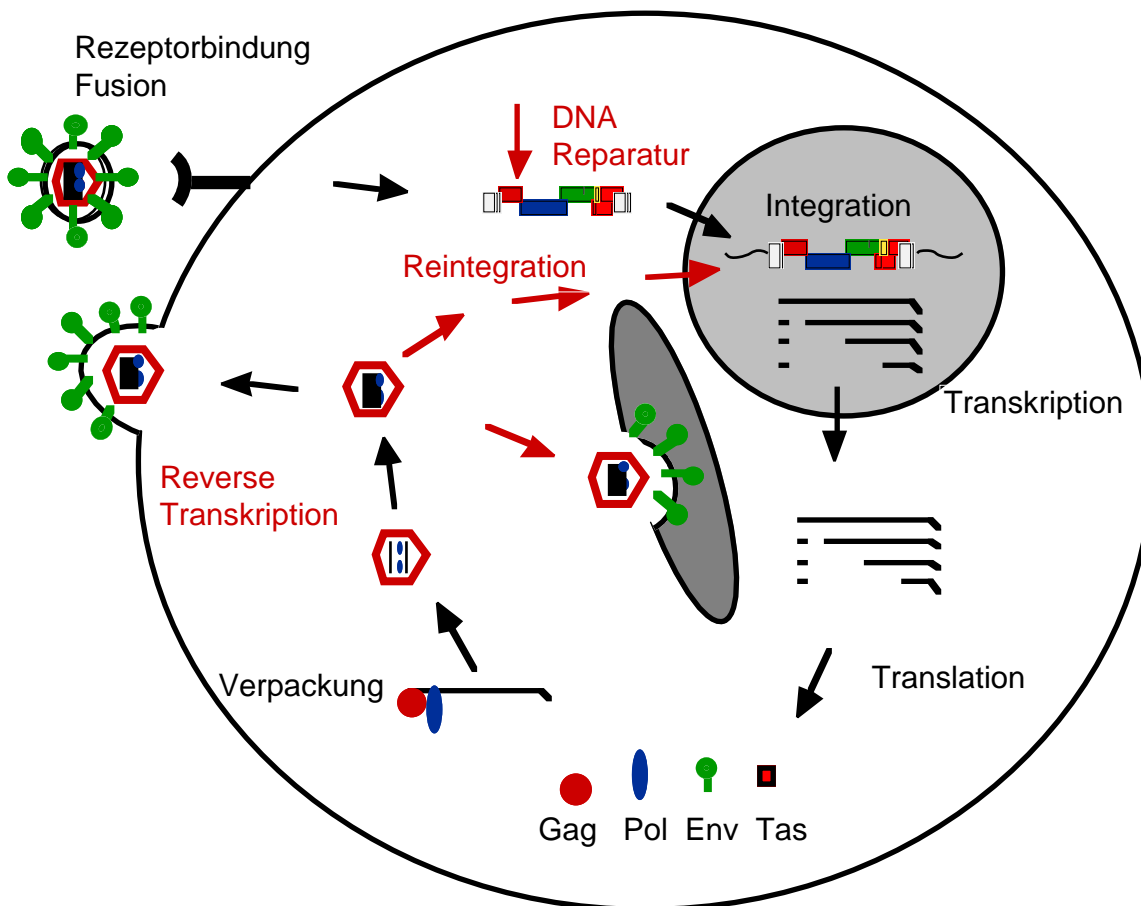


Abb. 6: Replikationszyklus der Foamyviren.

Zusammenfassung der Vorgänge während der Replikation der Foamyviren. Besonderheiten gegenüber dem typischen retroviralen Replikationszyklus sind farblich gekennzeichnet. Das Genom der Foamyviren ist extrazellulär bereits weitgehend in DNA umgeschrieben. Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle werden möglicherweise noch letzte unvollständig synthetisierte Bereiche über DNA Reparaturmechanismen komplettiert. Der Präintegrationskomplex gelangt in den Zellkern, wo das FV Genom integriert. Anschließend kommt es zur Transkription und Translation der verschiedenen viralen Genprodukte. Im Zytoplasma werden fertige virale Kapsidstrukturen ausgebildet, die entweder an der Plasmamembran oder an intrazellulären Membranen knospen und so eine Membranhülle mit den Env-Proteinen erwerben. Alternativ findet ein interner Replikationszyklus statt, bei dem FV erneut in den Zellkern gelangt und reintegriert.

1.3. Fragestellung

Neben der Rezeptorbindung und der Zellfusion ist das Hüllprotein bei Foamyviren auch am Prozeß der Viruspartikelfreisetzung beteiligt und erfüllt so noch eine weitere für das Virus essentielle Funktion. Während bei allen anderen Retroviren die Expression der Gag-Strukturproteine ausreicht, um „virus like particles“ freizusetzen, benötigen Foamyviren zudem noch ihr homologes Hüllprotein zur Virusfreisetzung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob andere (retro-) virale Hüllproteine die Funktion des Env-Proteins in bezug auf die FV Morphogenese übernehmen können. Ferner sollten spezifische Domänen im Hüllprotein charakterisiert werden, die im Zusammenhang mit der Partikelbildung und anderen Funktionen besondere Aufgaben erfüllen.