

Membranfusion

Die komplexe Fusionsmaschinerie der Herpesviren

MELINA VALLBRACHT, BARBARA G. KLUPP, THOMAS C. METTENLEITER
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, GREIFSWALD – INSEL RIEMS

Enveloped viruses enter cells by fusion between viral and cellular membranes which is catalyzed by specialized fusogenic glycoproteins (g) on the viral surface. Many viruses use a single fusion protein for entry. In contrast, herpesviruses depend on a complex fusion machinery. Here, we discuss the role of the individual herpesvirus fusion machinery components and answer two basic questions: why does the herpesvirus fusion protein gB depend on other glycoproteins for fusion, and can gB be transformed to function autonomously?

DOI: 10.1007/s12268-022-1718-5
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Die Fusion biologischer Membranen ist ein grundlegender Prozess des Lebens. Tatsächlich beginnt unser Leben mit einer Membranfusion. Auch behüllte Viren sind für den Eintritt in die Wirtszelle auf Membranfusion angewiesen. Dieser Prozess wird durch hoch spezialisierte virale Fusionsproteine katalysiert, die in der Virushülle verankert sind.

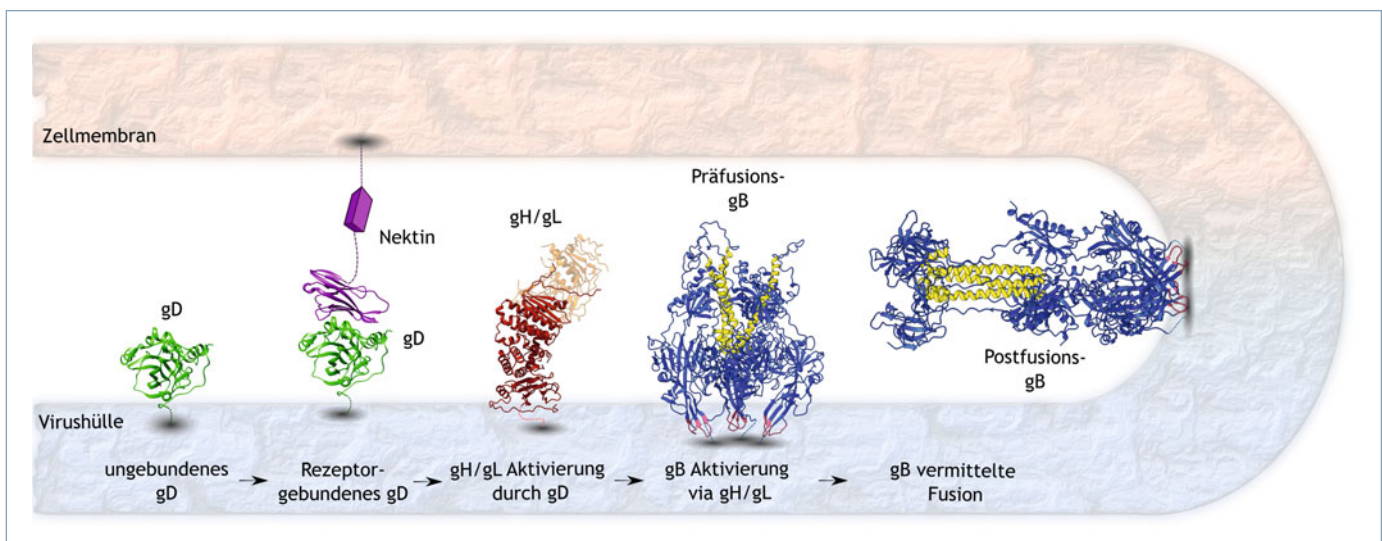
Molekulare Gymnastik der Fusionsproteine

Obwohl die molekulare Architektur viraler Fusionsproteine divers ist, läuft der Fusionsprozess nach einem einheitlichen Muster ab. Vor der Fusion liegt das Protein in einer metastabilen Präfusionsform auf der Virushülle vor. Durch spezifische Signale, die mit der Interaktion zwischen Virus und Wirts-

zelle einhergehen, wird das Fusionsprotein durch Exposition eines hydrophoben Bereichs aktiviert und in die Zielmembran inseriert. Das nun in beiden Membranen verankerte Fusionsintermediat faltet sich in eine energetisch günstige Postfusionsform. Dadurch gelangen virale und zelluläre Membran in räumliche Nähe und verschmelzen. Anhand struktureller Unterschiede werden Fusionsproteine in drei Klassen (I–III) unterteilt [1].

Herpesvirus gB – ein ungewöhnliches Fusionsprotein

Für Bindung und Fusion benötigen viele Viren lediglich ein einziges Protein. Herpesviren, eine erfolgreiche Gruppe umhüllter DNA-Viren, aber verwenden eine komplexe Maschinerie aus mindestens drei Glykoproteinen (g). Während die Rezeptorbindung durch speziesspezifische Bindeproteine – wie das gD der Alphaherpesviren – erfolgt, wird der Fusionsprozess durch einen Komplex aus gH und gL (gH/gL) sowie gB gesteuert. gB und gH/gL sind bei allen Herpesviren konserviert und bilden zusammen

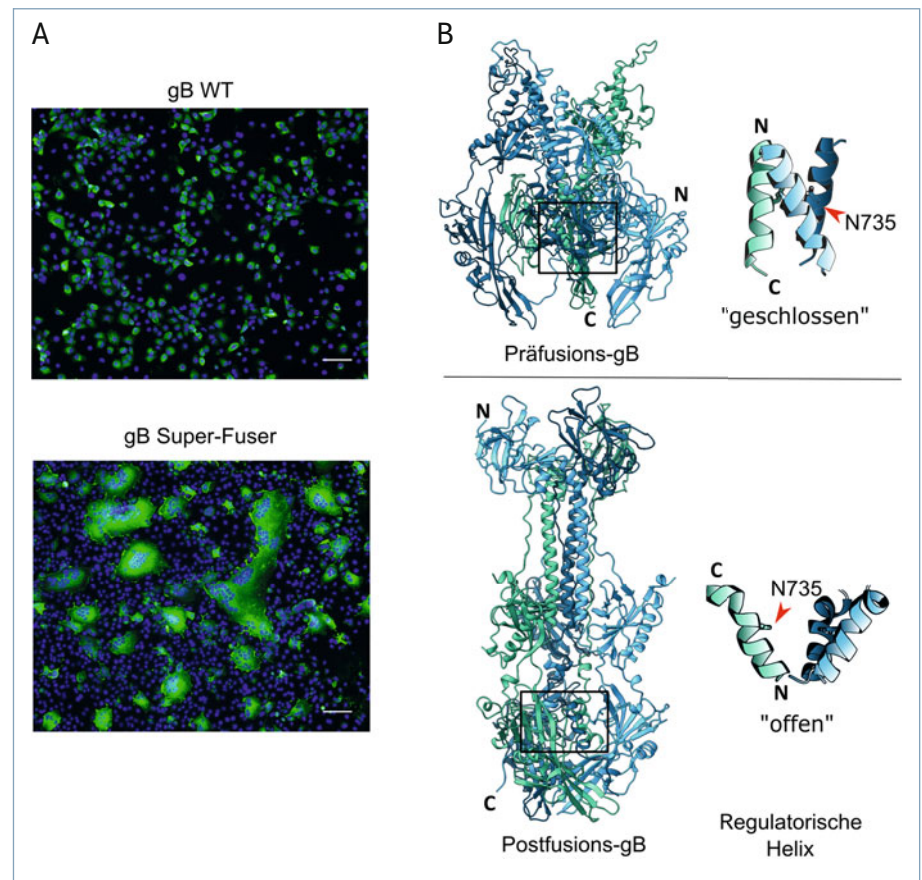


▲ **Abb. 1:** Kaskadenartige Aktivierung der PrV-Fusionsmaschinerie. Die Bindung von gD (grün) an seinen zellulären Rezeptor Nektin-1 (violett) initiiert den Fusionsprozess. Rezeptorgebundenes gD interagiert mit dem regulatorischen gH/gL-Komplex (rot), welcher daraufhin gB (blau) aktiviert. Die Fusion der viralen und zellulären Membran wird durch Konformationsänderung von gB von einer Prä- zur Postfusionsform katalysiert. *Fusion loops* (rosa), *coiled-coil*-Motiv (gelb).

die Fusionsmaschinerie, die es diesen Viren erlaubt, eine Vielzahl unterschiedlichster Zellen und Organismen zu infizieren. Bekannte Vertreter sind die humanen Alpha-Herpesviren Herpes-simplex-Virus (HSV) 1 und 2 (Lippen- und Genitalherpes), das Variella-Zoster-Virus (Windpocken/Gürtelrose) sowie das von uns untersuchte porcine Pseudorabies-Virus (PrV). Das aktuelle Modell des Eintrittsmechanismus geht von einer kaskadenartigen Aktivierung aus. Durch die Bindung von gD an einen zellulären Rezeptor wird eine Konformationsänderung in gD initiiert, die dann eine Interaktion mit gH/gL ermöglicht, wodurch dieser regulatorische Komplex aktiviert wird. Zuletzt wird gB durch direkte Interaktion mit gH/gL fusionskompetent (**Abb. 1**, [2]).

Lange Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob gH/gL selbst fusogen ist. Mit der Entschlüsselung der Kristallstrukturen von gH/gL und gB zeigte sich jedoch, dass gH/gL keine Ähnlichkeit mit bekannten Fusionsproteinen aufweist. gB hingegen besitzt alle strukturellen Eigenschaften eines Fusionsproteins der Klasse III [3, 4], welche Eigenschaften der Klassen I und II vereinen. So zeichnet sich gB u. a. durch zwei interne, hydrophobe Bereiche (*fusion loops*; **Abb. 1**, rosa), die charakteristisch für die Klasse II sind, und eine zentrale trimere *coiled-coil*-Struktur, die dem 6-Helixbündel der Klasse I ähnelt, aus (**Abb. 1**, gelb). Die Ähnlichkeit von gB mit Klasse-III-Fusionsproteinen wirft jedoch eine grundlegende Frage auf. Denn anders als gB sind alle bisher bekannten Vertreter dieser Klasse, wie das Rhabdovirus-G, Baculovirus-gp64 oder Thogotovirus-Gp, nicht auf akzessorische Proteine angewiesen, sondern in der Lage, autonom durch Aktivierung über einen niedrigen pH-Wert zu fungieren [5]. Warum ist also gB auf weitere Proteine angewiesen und was tragen gD und gH/gL zum Fusionsprozess bei?

Eine Strategie für die Entschlüsselung solcher komplexen Mechanismen ist es, diese zunächst auf die grundlegendsten Teile zu reduzieren. In diesem Zusammenhang erwiesen sich Reversionsanalysen als wertvoll. Hierbei werden ansonsten wichtige Komponenten der Fusionsmaschinerie mutiert oder entfernt, und durch serielle Zellkulturpassagen infektiöse Revertanten selektiert. Mithilfe von Reversionsanalysen gD- oder gL-defizienter PrV-Mutanten konnten wir Revertanten isolieren, die auch ohne gD oder gL infektiös waren. Die Funktionen von gD bzw. gL wurden dabei durch Mutationen in gH



▲ **Abb. 2:** Fusionsaktivität und Regulierung des autonom fusionierenden gB. **A**, Zellrasen nach Transfektion mit Wildtyp (WT) oder autonom fusionierendem gB (Super-Fuser). WT-gB ist alleine nicht in der Lage, Zellfusionen zu induzieren. Die Expression des gB-Super-Fusers führt hingegen zu einer starken Synzytienbildung. Färbung von PrV-gB (grün) und Zellkernen (blau). Maßstabsbalken: 100 µm. **B**, Durch Mutation des konservierten Asparagins (N735) in der regulatorischen Helix wird diese in einer geschlossenen Konformation gehalten und die Präfusionsform (oben) stabilisiert. In der Postfusionsform (unten) liegt die Helix in einer offenen Konformation vor.

und/oder gB kompensiert. Eine transiente Expression dieser gH- und gB-Varianten reichte in Zellkultur aus, um eine effiziente Zell-Zell-Fusion zu erreichen. gD und gL können demnach den Fusionsprozess modulieren, sind jedoch nicht essenziell dafür verantwortlich. Ein Vier-Komponenten-System (gD, gH/gL, gB) konnte also mithilfe dieser Strategie auf zwei Komponenten (gH, gB) reduziert werden [6–8]. Im Gegensatz zu gD und gL führt die Deletion von gH oder gB zu irreparablen, nicht kompensierbaren Defekten, wodurch eine Reversionsanalyse ausgeschlossen ist. Letztlich blieb die Frage, ob es möglich ist, gB in ein autonomes Fusionsprotein zu konvertieren.

Identifizierung eines Super-Fusers

Ein Vergleich zwischen gB und anderen Klasse-III-Fusionsproteinen zeigt, dass gB eine besonders lange und strukturierte cytoplasmatische Domäne (ZD) aufweist, deren

Deletion zu einem vollständigen Funktionsverlust führt. C-terminal verkürzte gB Varianten hingegen zeigen eine gesteigerte Fusionsaktivität. Interessanterweise liegen isoliert exprimierte gB-Ektodomänen ausschließlich in der Postfusionsform vor, was auf eine Funktion der ZD für die Stabilisierung der Präfusionsform hindeutet. So könnte die gB-ZD als eine Art „Klemme“ fungieren, die durch Interaktion mit der Membran die Präfusionsform stabilisiert [2]. Tatsächlich konnte mittels Kryoelektronenmikroskopie erstmals die Präfusionsform des HSV-1-gB nahezu vollständig entschlüsselt werden [9].

Zur Aufklärung der Rolle der ZD für die Stabilisierung der Präfusionsform führten wir Reversionsanalysen mit PrV-Mutanten durch, die C-terminal verkürztes gB exprimieren. Erste Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen großer Teile der ZD durch Veränderungen in der Ektodomäne kompensiert wer-

den kann, was auf eine intramolekulare Kommunikation zwischen der Ektodomäne und der ZD hindeutet, die für die Regulierung der Fusionsaktivität essenziell ist [10]. Tatsächlich konnten wir eine gB-Variante isolieren, die in Zellfusionsexperimenten einen gH/gL-unabhängigen Hyperfusionsphänotyp aufwies (**Abb. 2A**), der auf eine einzige Punktmutation (Position 735, N zu S) in einer zentral in der Ektodomäne gelegenen, hoch konservierten Helix zurückzuführen war (**Abb. 2B**, [11]). Dieser Phänotyp konnte auch auf gB-Proteine anderer Herpesviren übertragen werden. Funktionelle Daten und die Lage dieser Mutation im Zentrum der gB-Präfusionsform sprechen dafür, dass hierdurch eine fusionsaktive Konformation stabilisiert wird, was sonst die ZD übernimmt. Auf Basis dieser Daten konnten wir ein Modell für die gB-vermittelte Membranfusion postulieren, in dem die fusogene Konformationsänderung der gB-Ektodomäne unter der allosterischen Kontrolle der ZD steht. Dabei wird der Übergang von der Prä- zur Postfusionsform über die neu identifizierte zentrale Helix in der gB-Ektodomäne gesteuert. Diese fungiert als molekularer Schalter zwischen den Domänen und übermittelt den strukturellen Status der ZD zur Ektodomäne durch Umfaltung von einer geschlossenen in eine offene Konformation (**Abb. 2B**). Insgesamt zeigten diese Ergebnisse erstmals eindeutig, dass gB in der Tat als autonomes Klasse-III-Fusionsprotein fungieren kann und das alleinige Fusionsprotein der Herpesviren darstellt.

Ausblick

Mit der Aufklärung der Strukturen der Fusionsmaschinerie verstehen wir zunehmend auch die molekularen Abläufe bei der Herpesvirus-induzierten Fusion. Offene Fragen betreffen u. a. die Aktivierung von gB durch gH und den Auslöser der Fusion durch den Super-Fuser. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass gB nicht nur die Fusion katalysiert, sondern selbst eine direkte Rolle bei der Auslösung der Fusion spielt, möglicherweise über die Bindung an einen bisher unbekannt gB-Rezeptor. Letztlich stellt

sich die Frage, ob auch zelluläre Vertreter der Klasse III existieren, denn bisher sind ausschließlich zelluläre Fusionsproteine der Klassen I und II bekannt.

Danksagung

Wir danken Walter Fuchs, Felix A. Rey, Marija Backovic, Kay Grünwald und Benjamin Vollmer für die exzellente und freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonders danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die essenzielle Förderung. ■

Literatur

- [1] Rey FA, Lok SM (2018) Common features of enveloped viruses and implications for immunogen design for next-generation vaccines. *Cell* 172: 1319–1334
- [2] Vallbracht M, Backovic M, Klupp BG et al. (2019) Common characteristics and unique features: a comparison of the fusion machinery of the alphaherpesviruses pseudorabies virus and herpes simplex virus. *Adv Virus Res* 104: 225–281
- [3] Vallbracht M, Brun D, Tassinari M et al. (2018) Structure-function dissection of pseudorabies virus glycoprotein B fusion loops. *J Virol* 92: e01203-17
- [4] Heldwein EE, Lou H, Bender FC et al. (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313: 217–220
- [5] Backovic M, Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 19:189–196
- [6] Klupp BG, Mettenleiter TC (1999) Glycoprotein gL-independent infectivity of pseudorabies virus is mediated by a gD-gH fusion protein. *J Virol* 73: 3014–3022
- [7] Schmidt J, Gerds V, Beyer J et al. (2001) Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus results in an alteration of in vivo host range and correlates with mutations in glycoproteins B and H. *J Virol* 75: 10054–10064
- [8] Schröter C, Vallbracht M, Altmenschmidt J et al. (2015) Mutations in pseudorabies virus glycoproteins gB, gD, and gH functionally compensate for the absence of gL. *J Virol* 90: 2264–2272
- [9] Vollmer B, Prazak V, Vasishan Det al. (2020) The prefusion structure of herpes simplex virus glycoprotein B. *Sci Adv* 6: eabc1726
- [10] Nixdorf R, Klupp BG, Mettenleiter TC (2001) Restoration of function of carboxy-terminally truncated pseudorabies virus glycoprotein B by point mutations in the ectodomain. *J Virol* 75: 11526–11533
- [11] Vallbracht M, Löttsch H, Klupp BG et al. (2021) In vitro viral evolution identifies a critical residue in the alphaherpesvirus fusion glycoprotein B ectodomain that controls gH/gL-independent entry. *mBio* 12: e00557-21

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter
 Friedrich-Loeffler-Institut
 Südufer 10
 D-17493 Greifswald – Insel Riems
 thomas.mettenleiter@fli.de
 www.fli.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Melina Vallbracht, Barbara G. Klupp und Thomas C. Mettenleiter (v. l. n. r.)

Melina Vallbracht

2009–2015 Studium der Biowissenschaften an der Universität Münster. 2015–2018 Promotion und 2018–2021 Postdoktorandin am Institut für Molekulare Virologie und Zellbiologie (IMVZ) am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Insel Riems. Seit 2021 Postdoktorandin am Zentrum für Infektiologie-Virologie, Universitätsklinikum Heidelberg.

Barbara G. Klupp

1982–1988 Biologiestudium an der Universität Tübingen. 1989–1992 Promotion und 1992–1994 Postdoktorandin an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen (BFAV, heute: FLI). Seit 1994 Arbeitsgruppenleiterin am IMVZ, FLI, Insel Riems und seit 2020 stellvertretende (kommissarisch) Leiterin des Instituts.

Thomas C. Mettenleiter

1977–1982 Biologiestudium an der Universität Tübingen. 1982 Beginn der Arbeiten an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV, heute: FLI). 1985 Promotion. 1986–1987 Postdoktorand am Department of Microbiology, Medical School, Vanderbilt University, Nashville, USA. 1991 Habilitation in Tübingen. 1994–2020 Leiter des IMVZ, seit 1997 Präsident des FLI.