

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

**Interaktion des Envelope-Proteins
des humanen endogenen Retrovirus W (HERV-W)
mit dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Bec1**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von: Michael Glas
geboren am: 16.06.1982 in Freyung

Meiner Familie
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	8
II.	Verzeichnis der Abkürzungen	11
1.	Zusammenfassung	14
2.	Abstract	16
3.	Einleitung	18
3.1	Retroviren	18
3.1.1	Klassifikation von Retroviren	19
3.1.2	Struktur des Virions	20
3.1.3	Genomstruktur und Provirus	21
3.1.4	Penetration und Integration	23
3.1.5	Proteinsynthese und Reifung neuer Viruspartikel	24
3.2	Humane endogene Retroviren	25
3.2.1	Klassifizierung humaner endogener Retroviren	26
3.2.2	Das humane endogene Retrovirus W (HERV-W)	28
3.2.2.1	Identifikation von HERV-W	28
3.2.2.2	Genomstruktur von HERV-W	28
3.2.2.3	Plazentare Expression des HERV-W-Oberflächenproteins	29
3.2.2.4	Pathophysiologische Bedeutung von HERV-W	31
3.3	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	33
3.4	Das Kaliumkanalprotein Bec1	35
3.4.1	Klassifizierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle	35
3.4.2	Aufbau und Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle	36
3.4.3	Steuerung der Permeabilität spannungsabhängiger Kaliumkanäle	38
3.5	Ziele dieser Arbeit	42
4.	Material	43
4.1	Bakterienstämme	43

4.1.1	<i>E. coli</i> pMOS-blue	43
4.1.2	<i>E. coli</i> BL21DE3	43
4.2	Größenmarker	43
4.2.1	DNA-Größenmarker	43
4.2.2	Proteingrößenmarker	43
4.3	Antikörper	44
4.3.1	Monoklonale Antikörper	44
4.3.2	Polyklonale Antikörper	44
4.3.3	Peroxidasekonjugierte Zweitantikörper	44
4.3.4	Farbstoffmarkierte Zweitantikörper	44
4.4	Puffer und Medien	44
4.5	Vektoren	48
4.5.1	pGEM-T-Vektor	48
4.5.2	pGBKT7-Vektor	48
4.5.3	pGEX-4T-1-Vektor	49
4.5.4	pEGFP-C1-Vektor	49
4.5.5	pSG5-Vektor	49
4.5.6	pHCMV-pA-Vektor	49
4.6	Oligonukleotide	50
4.7	Enzyme und dNTPs	50
4.8	Chemikalien und andere Materialien	51
4.8.1	Chemikalien	51
4.8.2	Photochemikalien	51
4.8.3	Radiochemikalien	51
4.8.4	Kits	51
4.8.5	Papiere und Membranen	51
4.8.6	Zellkulturmedien	51
4.8.7	Nährmedium für Bakterien	52
4.9	Konstrukte	52
4.10	Zelllinien	52
4.10.1	Adhärente Zellen	52
4.10.2	Suspensionszellen	53
4.10.3	Weitere Zellen	53
4.11	Computersoftware	53

5.	Methoden	55
5.1	Bakterienkultur	55
5.1.1	Transformation und Kultivierung von Bakterien	55
5.2	DNA-Techniken	55
5.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	55
5.2.2	Agarosegelelektrophorese	57
5.2.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	58
5.2.4	Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen	58
5.2.5	Dephosphorylierung von Vektoren	59
5.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	59
5.2.7	Analytische Plasmidaufarbeitung	59
5.2.8	Präparative Plasmidaufarbeitung	60
5.2.9	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Proben	61
5.2.10	DNA-Sequenz-Analysen	61
5.3	Proteintechniken	61
5.3.1	Extraktion von Proteinen aus Zellen für SDS-PAGE	61
5.3.2	Konzentrationsbestimmung von Protein-Proben	61
5.3.3	Techniken zum Nachweis von Proteinen	62
5.3.3.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
5.3.3.2	Westernblot (Immunoblot)	62
5.3.3.3	Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen	63
5.3.3.4	Immunpräzipitation (IP) und Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	64
5.3.3.5	<i>In vivo</i> -Nachweis von Proteinen durch Fluoreszenztechniken	64
5.3.3.6	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	65
5.3.4	GST-Pulldown-Assay	66
5.3.4.1	Expression von GST-Fusionsproteinen	66
5.3.4.2	Proteinsynthese durch <i>in vitro</i> -Transkription und <i>in vitro</i> -Translation	67

5.3.4.3	Nachweis der Protein-Protein-Interaktion durch Autoradiographie	67
5.4	Zellkulturtechniken	68
5.4.1	Kultivierung von Suspensionszellen	68
5.4.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen	68
5.4.3	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zählers	68
5.4.4	Transfektion von Zellen	68
6.	Ergebnisse	70
6.1	Interaktion von HERV-W Env mit Bec1	70
6.1.1	Herstellung von GST-Fusionsproteinen	70
6.1.2	Pulldown-Analyse der Interaktion von HERV-W Env und Bec1	71
6.1.3	Analyse der Bindungsstelle von HERV-W SU an Bec1	72
6.1.3.1	Klonierung von SU1 und SU2	72
6.1.3.2	Pulldown-Analyse der Interaktion von HERV-W SU1 und SU2 mit Bec1	73
6.1.4	Charakterisierung der Bindungsstelle von Bec1 an HERV-W SU	74
6.2	Bindungsanalyse der Gag-Proteine verschiedener Retroviren mit Bec1	76
6.2.1	Klonierung von HERV-W <i>gag</i> in pGBKT7	76
6.2.2	Klonierung von HIV <i>gag</i> in pGBKT7	77
6.2.3	Bindungsanalyse der Interaktion retroviraler Gag-Proteine mit Bec1	78
6.3	Analyse der Interaktion von HERV-W SU mit Bec1 durch Immunfluoreszenz	80
6.3.1	Analyse der Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1 durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie	80
6.3.1.1	Lokalisation von HERV-W SU	80
6.3.1.2	Lokalisation von Bec1	81
6.3.1.3	Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1	82
6.3.2	Analyse der Kolokalisation von HERV-W SU und	84

	Bec1 durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie	
6.4	Darstellung der Interaktion von HERV-W SU mit Bec1 durch Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation	86
6.4.1	Co-Immunpräzipitation mit Anti-Bec1	87
6.4.2	Co-Immunpräzipitation mit Anti-HERV-W Env	88
6.5	Nachweis von Bec1 in verschiedenen Zelllinien	89
6.5.1	Nachweis von Bec1 in adhärenenten Zelllinien	90
6.5.2	Nachweis von Bec1 in Suspensionszelllinien	91
7.	Diskussion	93
7.1	Interaktion zwischen HERV-W SU und TM mit Bec1	93
7.2.	Bindung der Gag-Proteine verschiedener Retroviren an das Bec1-Protein	94
7.3	Darstellung der Kolo-kalisation von HERV-W SU und Bec1 durch Immunfluoreszenz	96
7.4	Darstellung der <i>in vivo</i> -Interaktion von HERV-W SU und Bec1 durch Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation	97
7.5	Nachweis des Kaliumkanals Bec1 in verschiedenen Zellen und Zelllinien	98
7.6	Funktionelle Bedeutung von HERV-W Env	99
7.7	Funktionelle Bedeutung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle	101
7.7.1	Maturation von Kaliumkanalproteinen	101
7.7.2	Interaktion spannungsgesteuerter Kaliumkanäle mit zellulären Proteinen	103
7.7.3	Wechselwirkung zwischen Kaliumkanälen und retroviralen Proteinen	104
7.8	Schlussfolgerung	106
8.	Literaturverzeichnis	107
9.	Publikationen	120
10.	Danksagung	121
11.	Lebenslauf	122

I. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

- Abb. 3.1 Phylogenetische Einteilung von Retroviren (nach Weiss, 2006)
- Abb. 3.2 Schematischer Aufbau eines retroviralen Partikels (nach Coffin et al., 1997)
- Abb. 3.3 Genomschema einfacher Retroviren, am Beispiel von ALV (avian leucosis virus) (nach Coffin et al., 1997)
- Abb. 3.4 Genomschema komplexer Retroviren, am Beispiel von HTLV (nach Coffin et al., 1997)
- Abb. 3.5 Proviralear HERV-W-Locus auf Chromosom 7 (nach Mallet et al., 2004)
- Abb. 3.6 Heterotype Ausbildung von Syncytien bei TELac2-Rhabdomyosarkomzellen und Hela-Zellen (nach Blond et al., 2000)
- Abb. 3.7 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems am Beispiel des Kaliumkanalproteins Bec1 mit HERV-W Env
- Abb. 3.8 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsabhängigen Kaliumkanäle der "Ether-à-go-go"-Familie (Eag) (nach Gutman et al., 2005)
- Abb. 3.9 Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (nach Yellen, 2002)
- Abb. 3.10 Schematischer Aufbau eines eag- / erg-Kaliumkanals mit C-terminaler Sensordomäne und zusätzlicher N-terminaler PAS-Sensordomäne (nach Yellen, 2002)
- Abb. 3.11 Schließmechanismen bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen (nach Yellen, 2002)
- Abb. 3.12 Modell des bakteriellen MthK-Kanals (nach Yellen, 2002)
- Abb. 6.1 Kontrolle der Expression des GST-Bec1-Fusionsproteins nach Induktion im Westernblot
- Abb. 6.2 Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W SU und TM mit Bec1 im Pulldown
- Abb. 6.3 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifizierung von SU1 und SU2

- Abb. 6.4 Schema der im Pulldown mit Bec1 getesteten HERV-W *env* Fragmente
- Abb. 6.5 Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W SU1 und SU2 mit Bec1 im Pulldown
- Abb. 6.6 Schema der trunkierten Bec1-Klone (AG Ruprecht)
- Abb. 6.7 Autoradiographie der Bindungsanalyse der trunkierten Bec1-Klone mit HERV-W SU
- Abb. 6.8 Agarose-Gelelektrophorese der Nested-PCR zur Amplifikation von HERV-W *gag*
- Abb. 6.9 Agarose-Gelelektrophorese des amplifizierten HIV *gag* Fragments
- Abb. 6.10 (a) Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W Gag und MSRV Gag mit Bec1 im Pulldown
- Abb. 6.10 (b) Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-K Gag und HIV Gag mit Bec1 im Pulldown
- Abb. 6.11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Hela-Zellen, die mit pHCMV oder pHCMV-HERV-W SU transfiziert wurden (1000x Vergrößerung)
- Abb. 6.12 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Hela-Zellen, die mit pEGFP oder pEGFP-Bec1 transfiziert wurden (1000x Vergrößerung)
- Abb. 6.13 Immunfluoreszenzmikroskopie von Hela-Zellen, die mit pEGFP-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert wurden (400x Vergrößerung)
- Abb. 6.14 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie einer Hela-Zelle, die mit pEGFP-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert wurde (1000x Vergrößerung)
- Abb. 6.15 Co-Immunpräzipitation von HERV-W SU und Bec1
- Abb. 6.16 Co-Immunpräzipitation von HERV-W SU und Bec1
- Abb. 6.17 Nachweis von Bec1 in unterschiedlichen adhärenen Zelllinien ((a): Cos1, Gos3, Hela, Hela CD4⁺; (b): 293, LN405, Humane Fibroblasten, HCAT) durch Immunpräzipitation des Kaliumkanalproteins

Abb. 6.18 Untersuchung von Jurkat-, A 3.01-, PBMC- und BLCL-Zellen durch Immunpräzipitation auf ihre endogene Expression von Bec1

Tabellen

Tab. 3.1 Humanpathogene Vertreter der Familie der Retroviren und assoziierte Erkrankungen (nach Goff, 2001)

Tab. 3.2 Klassifikation der humanen endogenen Retroviren (nach Nelson et al., 2003)

Tab. 4.1 Für die Herstellung von PCR-Produkten und anschließende Klonierungen benutzte Oligonukleotide

Tab. 4.2 Für diese Arbeit verwendete klonierte Vektorkonstrukte

II. Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampère
α	alpha
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
β	beta
Bec1/2/3	brain specific eag like channel type 1/2/3
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Kapsidprotein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
CNB	cyclic nucleotid binding domain
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
C-Terminus	Carboxylterminus
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Eag / eag	Ether-à-go-go- / ether-à-go-go-Kanäle
EBV	Epstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
elk	ether-à-go-go like Kanäle

Env	Envelope Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
erg	ether-à-go-go related gene Kanäle
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GST	Glutathionsepharose-Transferase
h	Stunde
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus K
HERV-W	humanes endogenes Retrovirus W
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HTLV-1/2	humanes T-Zell Leukämie Virus 1/2
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Immunserum
kb / kbp	Kilobasen / Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LMP	latent membrane protein (EBV)
LTR	long terminal repeat
m	Meter, milli
μ	micro
MA	Matrixprotein
MCS	multiple cloning site
min	Minute
mink	minimal potassium channel protein
MiRP1	minK related peptide 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MSRV	Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus
n	nano
NC	Nucleocapsid Protein
NP40	Nonidet P40
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prä-IS	Prä-Immunsrum
RCK	regulator of K ⁺ conductance
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase / Transkription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SU	Oberflächenprotein
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

1. Zusammenfassung

Humane endogene Retroviren und ihre Funktionen sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung, sowohl in ihrer physiologischen Funktion als auch hinsichtlich der Entstehung von Krankheiten. Insbesondere HERV-W, für dessen Hüllprotein eine funktionelle Rolle während der Plazentaentwicklung gezeigt wurde, als auch dessen mögliche pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung der Multiplen Sklerose rückte dabei ins Zentrum des Interesses.

In Hefe-Zwei-Hybrid-Screens konnte das Kaliumkanalprotein Bec1 (brain specific eag like channel type 1) als Bindungspartner des HERV-W Envelope (Env)-Proteins identifiziert werden (AG Müller-Lantsch). Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die vorliegende Arbeit, in der diese Interaktion mittels *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungstechniken genauer charakterisiert werden sollte.

In GST-Pulldownanalysen konnte *in vitro* die Bindung des HERV-W-Oberflächenproteins (surface = SU) an die 223 carboxyterminalen Aminosäuren des spannungsabhängigen Kaliumkanals Bec1 gezeigt werden, während der transmembrane Anteil des Env-Proteins (TM) nicht mit Bec1 interagiert. In weiteren Pulldownanalysen mit unterschiedlich trunkierten Bec1-Klonen zeigte sich, dass die Bindungsregion auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren des Kaliumkanals begrenzt ist. Des Weiteren wurde die Assoziation retroviraler Gag-Proteine (HERV-W, MSR, HERV-K und HIV-1) mit Bec1 durch Pulldown analysiert. Während für HERV-W und MSR eine Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden konnte, ließ sich diese nicht für HERV-K und HIV-1 zeigen.

Immunfluoreszenzaufnahmen mit Hilfe von konventioneller und konfokaler Mikroskopie konnten HERV-W SU und Bec1 in denselben zellulären Kompartimenten darstellen. Als weitere *in vivo*-Untersuchungsmethode diente die Co-Immunopräzipitation. Hierbei konnte im Westernblot die spezifische Bindung beider Proteine demonstriert werden.

Die Expression des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Bec1 wurde bisher in Zellen des humanen Telenzephalons und in hämatopoetischen Zelllinien gezeigt. In dieser Arbeit wurde Bec1 zudem in verschiedenen adhärenz Zelllinien (Cos1, Gos3, HeLa, 293, LN405, HCAT und einer humanen Fibroblasten-Zelllinie) und Suspensionszellen (Jurkat, A 3.01 und BLCL) durch Immunopräzipitation nachgewiesen. In den für BLCL-Zellen zugrunde liegenden PBMC-Zellen (mononukleäre Zellen) konnte der Kaliumkanal auf Proteinebene jedoch nicht dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch unterschiedliche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungstechniken die Interaktion zwischen HERV-W SU und Bec1 veranschaulicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Die funktionellen Bedeutungen dieser Interaktion sind derzeit noch unbekannt und könnten Gegenstand weiterer retroviraler Forschung sein, möglicherweise hinsichtlich der Pathogenese der Multiplen Sklerose oder plazentarer Entwicklungsstörungen.

2. Abstract

Interaction of the human endogenous retrovirus W (HERV-W) envelope protein with the voltage gated potassium channel Bec1.

Human endogenous retroviruses and their functional properties are current subjects of intensive investigation, both concerning their physiological roles and pathogenesis of diseases. In particular the HERV-W envelope protein could be shown to play a major part during placental morphogenesis and its pathophysiological aspects in development of multiple sclerosis were also hypothesized.

In previous studies, a yeast-two-hybrid-screen with the envelope protein of HERV-W as bait identified the voltage gated potassium channel Bec1 (brain specific eag like channel type 1) as an interacting protein (workgroup Müller-Lantzsch). These results served as a basis for this dissertation, characterising this interaction more precisely by using various scientific *in vitro* and *in vivo* methods.

GST pulldown assays demonstrated that the surface of HERV-W (SU) interacts with the last 223 carboxy terminal amino acids of Bec1 *in vitro*, whereas the transmembrane part of the envelope protein (TM) doesn't. Further pulldown assays using variant truncated Bec1 clones indicated that the interacting domain is terminated to the last 110 C-terminal amino acids. Additionally the association of retroviral Gag proteins (HERV-W, MSRV, HERV-K and HIV-1) with Bec1 was analyzed by pulldown. While specific bands were detected for HERV-W and MSRV, indicating an interaction of both proteins, we could not prove a linking of HERV-K nor HIV-1 to Bec1.

Conventional and confocal microscopy techniques confirmed that Bec1 and HERV-W proteins colocalize in the same cellular compartments. As an additional *in vivo* method of investigation co-immunoprecipitation showed the interaction of both proteins by detecting specific bands in western blot.

Until today the expression of Bec1 potassium channel has been proved in human telencephalon and in haematopoetic cells. In this dissertation expression of Bec1 protein was demonstrated in different adherent (Cos1, Gos3, Hela, 293, LN405, HCAT and human fibroblasts) and suspension (Jurkat, A 3.01 and BLCL) cell cultures by immunoprecipitation. In PBMC (mononuclear progenitor cells of BLCL), the potassium channel protein was not detectable.

In sum, our data suggest an *in vitro* and *in vivo* interaction of HERV-W SU and Bec1. The results of this dissertation could serve as a basis for further studies. The

functional effects of this interaction are currently unknown and remain to be investigated, especially with regard to the pathogenesis of multiple sclerosis or placental developmental disorders.

3. Einleitung

3.1 Retroviren

1908 konnten die beiden Dänen Vilhelm Ellermann und Oluf Bang zeigen, dass Hühner-Leukose, eine Leukämie- und Lymphomerkkrankung, durch ein Virus übertragen wird und beschrieben mit ihrer Entdeckung erstmals eine durch ein Retrovirus (avian leucosis virus, ALV) hervorgerufene Erkrankung (Ellermann und Bang, 1908). Drei Jahre später berichtete Peyton Rous über die zellunabhängige Transmission einer Sarkomerkkrankung bei Hühnern, die durch das heute als RSV (Rous sarcoma virus) bekannte Virus verursacht wird (Rous, 1911).

Mit diesen Entdeckungen wurde der Grundstein der retroviralen Forschung gelegt, die heute, nicht zuletzt durch die humanpathogenen Retroviren HTLV-1 und HIV und ihre Auswirkungen auf unsere Gesellschaft, einen bedeutenden Platz in der medizinischen / biologischen Forschung einnimmt.

Nach der Beschreibung von ALV und RSV bei Vögeln war die Entdeckung des "mouse mammary tumor virus" (MMTV) durch John Bittner der erste Nachweis von tumorinduzierenden Viren bei Säugetieren (Bittner, 1936). Mit der Isolation weiterer solcher Viren bei Säugetieren in den darauf folgenden Jahren und der Beschreibung von Onkogenen, die eine bedeutende Rolle in der zellulären Signaltransduktion und der Tumorentstehung spielen, wurden die Grundlagen für die heutige Tumorforschung geschaffen (Huebner und Todaro, 1969).

Mit der Entdeckung der reversen Transkriptase konnte das bis dahin geltende Dogma, dass DNA in RNA, aber RNA nicht in DNA überschrieben wird, widerlegt und der retrovirale Lebenszyklus sowie das RNA-Genom nun intensiv erforscht werden (Temin und Mizutani, 1970). Mit Temins Provirus-Theorie, die die Integration einer stabilen intermediären Virusform in das Genom der Wirtszelle beschreibt, konnten die Entdeckungen der ersten endogenen Retroviren in den späten 60er und frühen 70er Jahren verstanden werden (Temin, 1964). Bei der Infektion von Keimbahnzellen wird das virale Genom zum festen Bestandteil des Wirtsgenoms und von diesem Zeitpunkt an vertikal auf die folgenden Generationen übertragen. Die Bedeutung von endogenen Retroviren wurde durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms offensichtlich, die zeigte, dass dieses zu ca. 8% aus endogener retroviraler DNA besteht (international human genome sequencing consortium, 2001).

3.1.1 Klassifikation von Retroviren

Aufgrund von Sequenzhomologien und phylogenetischen Analysen unterteilt man Retroviren in sieben Familien (Abb. 3.1, nach Weiss, 2006).

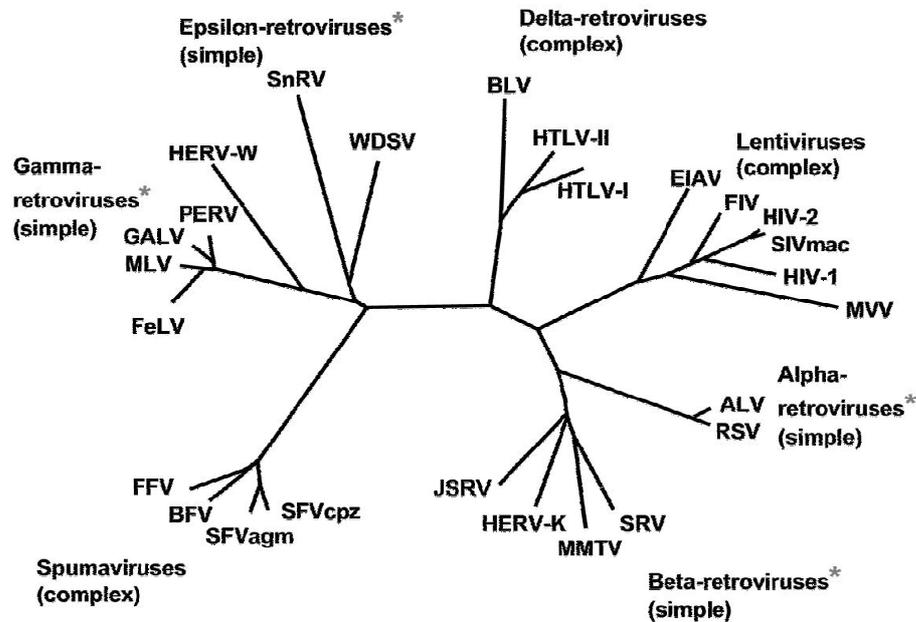


Abb. 3.1 Phylogenetische Einteilung von Retroviren (nach Weiss, 2006). Endogene Retroviren sind mit einem Stern gekennzeichnet (ALV = avian leucosis virus, RSV = Rous sarcoma virus, SRV = simian retrovirus, MMTV = mouse mammary tumor virus, HERV-K = human endogenous retrovirus K, JSRV = Jaagsiekte sheep retrovirus, FeLV = feline leukemia virus, MLV = murine leukemia virus, GALV = gibbon ape leukemia virus, PERV = porcine endogenous retrovirus, HERV-W = human endogenous retrovirus W, BLV = bovine leukemia virus, HTLV = human T-cell leukemia virus, SnRV = simian endogenous retrovirus, WDSV = walleye dermal sarcoma virus, EIAV = equine infectious anemia virus, FIV = feline immunodeficiency virus, HIV = human immunodeficiency virus, SIVmac = simian immunodeficiency virus, MVV = Maedi-Visna virus, SFV = simian foamy virus, BFV = bovine foamy virus, FFV = feline foamy virus).

Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Retroviren wurden aufgrund ihres Potentials bei der Entstehung von Tumoren früher als onkogene Viren oder Onkoviren bezeichnet, während Lenti- und Spumaviren bis heute nicht in Zusammenhang mit spezifischen Tumoren gebracht werden konnten (Coffin et al., 1997). Die Subfamilie der Spumaviren beinhaltet pathogene Retroviren, die Auslöser persistierender Infektionen sind, während die Subfamilie der Lentiviren mit den beiden humanpathogenen Retroviren HIV-1 und HIV-2 in Verbindung mit Infektionen gebracht werden kann, die anfangs inapparent, schleichend, aber letztendlich meist tödlich für ihren Wirtsorganismus enden.

In Tabelle 3.1 sind wichtige Vertreter der Familie der Retroviren dargestellt, die mit humanpathogenen Erkrankungen assoziiert werden.

Subfamilie	Humanpathogene Viren	Assoziierte Erkrankung
Alpha-Retroviridae	-	-
Beta-Retroviridae	HERV-K *	Keimzelltumoren (Sauter et al., 1995)
Gamma-Retroviridae	HERV-W *	Multiple Sklerose (Garson et al., 1998; Blond et al., 1999)
Delta-Retroviridae	HTLV-I HTLV-II	T-Zell-Leukämie (Yoshida et al., 1982)
Epsilon-Retroviridae	-	-
Lentiviridae	HIV-1 HIV-2	Erworbene Immundefizienz (Barré-Sinoussi et al., 1983)
Spumaviridae	-	-

Tab. 3.1 Humanpathogene Vertreter der Familie der Retroviren und assoziierte Erkrankungen (nach Goff et al., 2001). Humane endogene Retroviren sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.2 Struktur des Virions

Der Aufbau eines retroviralen Partikels ist schematisch in Abb. 3.2 dargestellt (nach Coffin et. al, 1997).

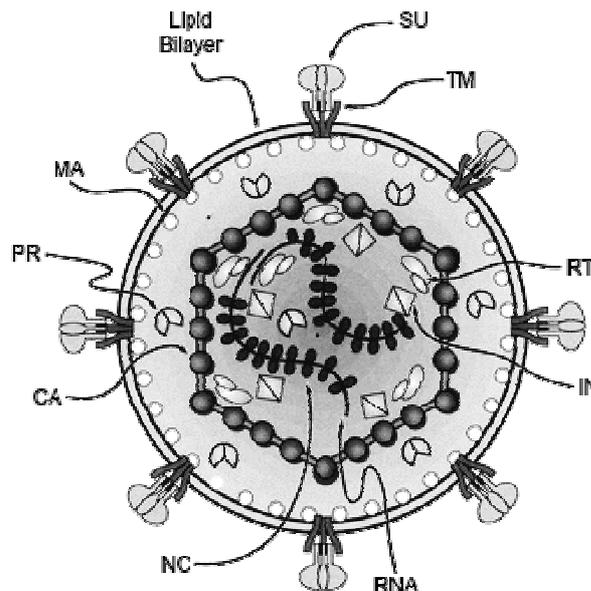


Abb. 3.2 Schematischer Aufbau eines retroviralen Partikels (TM = Transmembranprotein, SU = Oberflächenprotein, CA = Kapsidprotein, NC = Nukleokapsidprotein, RT = reverse Transkriptase, IN = Integrase, PR = Protease).

Der Durchmesser eines retroviralen Partikels beträgt zwischen 80nm und 100nm. In die das Kapsid umgebende Hüllmembran sind Glykoproteine eingelagert, die durch die *env*-Domäne des viralen Genoms kodiert werden. Diese Oberflächen- und Transmembranproteine des Virions, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, vermitteln den Kontakt zu Rezeptoren der Zielzelle und spielen damit für die Penetration des Virus in die Zielzelle eine entscheidende Rolle. Bei der Gruppe der komplexen Retroviren sind in die Hüllmembran außerdem weitere, akzessorische Proteine eingelagert (in Abb. 3.2 nicht dargestellt), deren Funktionen noch nicht vollständig verstanden sind.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Struktur des Virus-Kapsids bei Retroviren nicht einheitlich zu sein scheint. So wird für die Subfamilie der Gamma-Viridae eine ikosaedrische Kapsidstruktur beschrieben, während man für andere Retroviren eine konische oder sogar nicht-sphärische Kapsid-Struktur annimmt (Nermut et al., 1972). Die Kapsidproteine werden zusammen mit den Nukleokapsidproteinen und Matrixproteinen als gruppenspezifische Antigene bezeichnet und durch die *gag*-Domäne des Virus-Genoms kodiert. Das Kapsid beinhaltet die 7-12 Kilobasen große RNA des Virions, die bei Retroviren stets als lineare, nicht-segmentierte und positiv-orientierte Einzelstrang-RNA vorliegt (Coffin et al., 1997). Pro Virion finden sich zwei identische Kopien des Genoms, die zusammen mit den Nukleokapsidproteinen als Komplex vorliegen. Des Weiteren befinden sich im Virion-Kapsid Proteine, die durch den *pol*-Leserahmen kodiert werden und für das Umschreiben der Virus-RNA in DNA und die Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle verantwortlich sind – reverse Transkriptase und Integrase.

3.1.3 Genomstruktur und Provirus

Die Erbinformation der Retroviridae liegt im Virion als lineare, nicht-segmentierte und positiv-orientierte Einzelstrang-RNA vor. Die Orientierung der viralen RNA entspricht damit der eukaryotischer mRNA und ist wie diese durch eine 5'-CAP-Struktur vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen geschützt. Des Weiteren befindet sich am 3'-Ende ein Poly-Adenosin-Schwanz, der eine Nutzung der Translationsmaschinerie der eukaryotischen Zelle ermöglicht.

Aufgrund der Organisation ihrer Genome kann die Familie der Retroviren in zwei Gruppen unterteilt werden: Retroviren mit einfachem Genom und solche mit komplexem Genom (Abb. 3.3 und 3.4, nach Coffin et al., 1997).

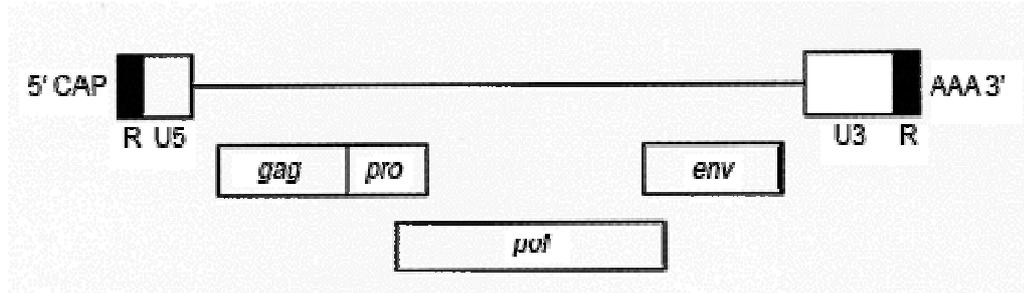


Abb. 3.3 Genomschema einfacher Retroviren, am Beispiel von ALV (avian leucosis virus) (nach Coffin et al., 1997).

Alle Retroviren besitzen drei Domänen, die für die Proteine des Virions kodieren (siehe Kapitel 3.1.3). *Gag* kodiert für die Kapsidproteine, *env* für die Transmembran- und Oberflächenproteine des Virions, während *pol* die Informationen für die Enzyme reverse Transkriptase und Integrase enthält. Zusätzlich weisen alle Retroviren eine *pro*-Domäne auf, die für die Protease des Virions kodiert.

Komplexe Retroviren haben neben dem minimalen Satz retroviraler Gene, bestehend aus *gag*, *pro*, *pol* und *env* noch zusätzliche Leseraster für die Expression von regulatorischen oder akzessorischen Genen (z.B. *rex* oder *tax*). Zur Gruppe der komplexen Retroviren werden die Subfamilien der Lenti- und Spumaviren sowie die Delta-Retroviren gezählt, wobei HTLV-I, HTLV-II sowie BLV (bovine leukemia virus) die einzigen Vertreter der Onkoviren darstellen, die ein komplexes Genom besitzen.

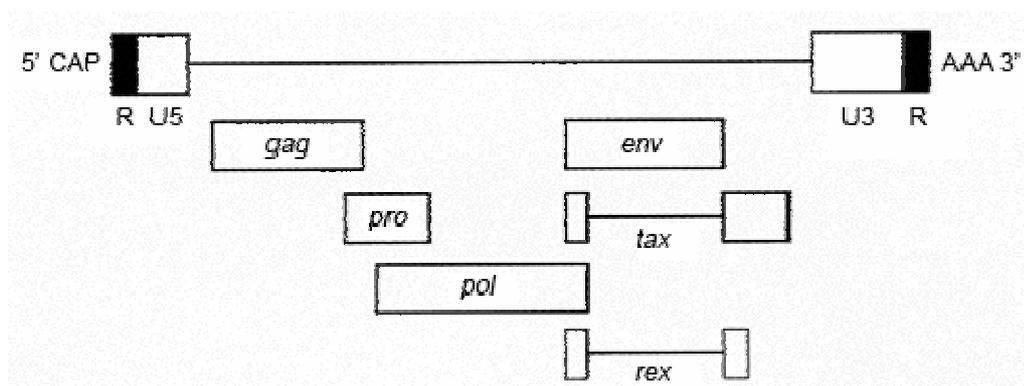


Abb. 3.4 Genomschema komplexer Retroviren, am Beispiel von HTLV. In diesem Fall liegen *gag*, *pro* und *pol* jeweils in verschiedenen Leserahmen. Die zusätzlichen Leseraster ermöglichen durch multiples Spleißen komplexe mRNA-Muster und damit eine enorme Vielfalt an Genprodukten (nach Coffin et al., 1997).

Die für die retroviralen Proteine kodierenden Sequenzen werden von terminalen nicht-kodierenden Kontrollsequenzen flankiert, die für die Abläufe der reversen

Transkription und die Integration in das Wirtsgenom essentiell sind. Bei der Umschreibung der RNA in die doppelsträngige DNA des Provirus mittels der reversen Transkriptase werden diese Kontrollelemente zu den sogenannten "long terminal repeats" (LTRs) vervollständigt. Die identischen 3'- und 5'-LTRs stellen Promotor- und Bindungssequenzen für transaktivierende zelluläre und virale Proteine dar und lassen sich in U3 (unique regulatory sequences at the 3' end), U5 (unique regulatory sequences at the 5' end) und R (terminal direct repeat) unterteilen.

3.1.4 Penetration und Integration

Die Penetration des Virions ist eng an die Funktion der Hüll-Glykoproteine SU (Oberflächenprotein) und TM (Transmembranprotein) geknüpft, wobei diese durch den *env*-Leserahmen des viralen Genoms als Vorläuferproteine kodiert werden. SU und TM bilden einen oligomeren Komplex auf der Virion-Oberfläche, der für die rezeptorabhängige Penetration des Virus essentiell ist. Die Interaktion der SU-Domäne mit dem Rezeptormolekül der Zielzelle scheint zu einer Konformationsänderung des TM-Moleküls zu führen, die die Fusion von Virion-Hüllmembran und Membran der Zielzelle zur Folge hat. Das virale Kapsid kann nun direkt in das Zytoplasma der Zielzelle eingeschleust werden (McClure et al., 1988 und Gilbert et al., 1990). Neben dieser Theorie wird auch eine endosomenvermittelte Penetration bei Alpha-Retroviren diskutiert. Nach der Bindung der Oberflächenproteine an das Rezeptormolekül nimmt die Wirtszelle das Virion demnach durch Endozytose auf, wo nach einer pH-Änderung das Kapsid aus dem Endosom freigegeben wird.

Im Zytoplasma erfolgt mittels reverser Transkriptase (mit RNase-H-Aktivität) die Umschreibung der linearen, nicht-segmentierten und positiv-orientierten Einzelstrang-RNA in die provirale Doppelstrang-DNA, wobei als Primer eine tRNA der vorherigen Wirtszelle dient.

Die Translokation der Provirus-DNA durch die Kernpore der Wirtszelle zur Integrationsstelle wird durch den sog. Präintegrationskomplex (PIC) vermittelt, wobei die Translokation bei HIV unabhängig von der Teilungsaktivität, bei Onkoviren dagegen in der Mitosephase des Zellzyklus stattfindet (Bukrinsky und Haffar, 1999; Lewis und Emermann, 1994; Roe et al., 1993).

Im Zellkern wird die Integration der proviralen dsDNA durch die Integrase vermittelt, die mit ihre Endonukleaseaktivität zunächst zwei Basen an den 3'-Enden der viralen

dsDNA abspaltet und somit ein überhängendes CA-Motiv schafft. Die Integrase spaltet anschließend die genomische DNA auf und verbindet die überhängenden Enden der genomischen und proviralen DNA. Die beiden fehlgepaarten Nukleotide werden von der zellulären Reparaturmaschinerie entfernt und die meist vier bis sechs Basen große Lücke mit homologen Nukleotiden aufgefüllt. Aufgrund dieses Mechanismus flankieren duplizierte DNA-Bereiche aus vier bis sechs Basenpaaren stets die inserierte Provirus-DNA (Coffin et al., 1997).

3.1.5 Proteinsynthese und Reifung neuer Viruspartikel

Als in das Genom der Wirtszelle integrierte DNA nutzt das Provirus die Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle. Die Transkription durch den zellulären RNA-Polymerase-II-Komplex wird durch die Rekrutierung verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Die anfangs mehrfach gespleißten Transkriptionsprodukte werden im Zytoplasma mit Hilfe der zellulären tRNAs in Proteinsequenzen umgeschrieben. Die Produkte der Proteinsynthese können im Zellkern wiederum als Transkriptionsfaktoren wirken. Bei einfachen Retroviren wird hier die U3-Region der LTR beschrieben, die aus zwei Teilen besteht, welche als Promotor- bzw. Enhancer-Sequenz auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie wirken und den Export ungespleißter bzw. einfach gespleißter mRNA ins Zytoplasma anregen (Laimins et al., 1984; Graves et al., 1985). An der Zytoplasmamembran (bei Gamma-Retroviridae) bzw. im Zytoplasma (bei Beta- und Delta-Retroviridae) erfolgt der autokatalytische Zusammenbau des Kapsids aus den viralen Strukturproteinen sowie dem ungespleißten Virus-Genom (Coffin et al., 1997). Das Ausknospen des Virions findet durch Assoziation mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle statt. Als letzter Schritt auf dem Weg vom Provirus zum infektiösen Virion erfolgen strukturelle Veränderungen, wie die Spaltung von Gag- oder Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteinen, die durch virale Proteasen vermittelt werden (Coffin et al., 1997).

3.2 Humane endogene Retroviren

Mit Howard M. Temins Provirus-Hypothese und der Entdeckung von "endogenen" Rous Sarkoma Virus *env*-Genen in Abwesenheit eines Helfervirus in embryonalen Hühnerzellen durch Robin A. Weiss wurden die Grundsteine für das Verständnis und die Erforschung von (humanen) endogenen Retroviren gelegt (Temin, 1964; Weiss et al., 1969).

Humane endogene Retroviren zeichnen sich durch ihre Genompersistenz, die ausschließlich vertikale Übertragung auf nachkommende Generationen gemäß den Mendelschen Regeln sowie durch das Fehlen infektiöser Viruspartikel aus. Eine Ausnahme könnte nach dem heutigen Wissensstand HERV-W / MSRNV darstellen, von dem die Existenz einer exogenen Form diskutiert wird, die jedoch noch nicht bewiesen ist (Perron et al., 1997; Blond et al., 1999). Humane endogene Retroviren stellen somit das Überbleibsel retroviraler Infektionen unserer Vorfahren dar. Altersbestimmungen endogener retroviraler Sequenzen anhand der Mutationsrate der nicht kodierenden LTR-Sequenzen zeigten, dass viele Retroviren sich vor ca. 40 Millionen Jahren in das Genom von Altweltprimaten integrierten, als die Abspaltung der Neuweltprimaten von diesen stattfand (Hayashida und Miyata, 1983). Durch die Infektion von Keimbahnzellen und die fortdauernde Vererbung der nun endogenen Retroviren an folgende Generationen wurde ihr Genom stabiler Bestandteil des menschlichen Erbguts. Mit der Entwicklung neuer Computer-Programme (z.B. RetroTector, Jern et al., 2005) zur Detektierung retroviraler Sequenzen konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass das menschliche Genom zu mehr als 8% aus fossilen retroviralen Elementen besteht (international human genome sequencing consortium, 2001; Griffiths, 2001; Villesen et al., 2004). Dieser hohe Anteil retroviraler Elemente wird darüber hinaus durch weitere Transposon-Elemente wie LINE- und Alu-Elemente sowie DNA-Transposons ergänzt, die ihre proviralen Sequenzen verloren haben und so zusammen insgesamt 45% des menschlichen Genoms einnehmen (international human genome sequencing consortium, 2001; Venter et al., 2001). Obwohl viele Retrotransposon-Elemente mit der Zeit inaktiviert wurden, stellt die Integration von Retroviren in das Primatengenom einen bedeutenden Einfluss auf die Evolution des humanen Genoms dar, der vermutlich noch bis heute andauert (Hughes und Coffin, 2005).

Auch wenn der überwiegende Teil humaner endogener Retroviren durch stattgefundenen Mutationen nicht mehr zur Proteinsynthese fähig ist, haben einige

Vertreter während der Evolution wichtige physiologische und pathophysiologische Bedeutung für den Menschen erlangt.

3.2.1 Klassifizierung humaner endogener Retroviren

Die Erforschung humaner endogener Retroviren durch verschiedene Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren zeigte die Mannigfaltigkeit der HERV-Familien im menschlichen Genom. So sind in der Datenbank für humane endogene Retroviren "HERVd" über 350 HERV-Familien und retrovirale Elemente aufgelistet (Paces et al., 2004). Diese große Zahl retroviraler Elemente erschwert das Erstellen einer einheitlichen Nomenklatur für HERV-Familien erheblich. Üblicherweise wurden HERV-Familien nach der Aminosäure (Einbuchstaben-Code) der zugehörigen tRNA benannt, die als Primer für die reverse Transkription der retroviralen RNA durch Bindung an die Primer-Bindungsstelle (primer binding site, PBS) diene. Diese Nomenklatur ist an die Präsenz einer PBS gebunden. Daher können bei Mutationen der Primer-Bindungsstelle Probleme bei der Kategorisierung der HERV-Elemente entstehen. Da durch diese Nomenklatur viele Familien mit unterschiedlicher Homologie zusammengefasst wurden, führten verschiedene Arbeitsgruppen weitere, simultan verwendete Bezeichnungen ein, was für zusätzliche Nomenklaturprobleme sorgte. Aufgrund dieser Problematik werden humane endogene Retroviren heute üblicherweise in drei große Klassen unterteilt (Tab. 3.2, nach Nelson et al., 2003). Die in Klasse I der HERV zusammengefassten sechs Gruppen zeigen Verwandtschaft zu den Gamma-Retroviren. "Berühmte" Mitglieder dieser Klasse sind u.a. HERV-H, HERV-I und HERV-R (ERV9). Die zur Klasse II gehörenden humanen endogenen Retroviren leiten sich von den Beta-Retroviren ab und lassen sich weiter in zehn Gruppen unterteilen. HERV-K stellt dabei die wohl biologisch aktivste Familie der humanen endogenen Retroviren dar und kann wiederum in Typ 1 und Typ 2 unterteilt werden (Tönjes et al., 1996). Diese Unterteilung leitet sich vom Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines 292bp großen Segments im Übergangsbereich zwischen *pol*- und *env*-Gen ab (Barbulescu et al., 1999). Zur Klasse III der humanen endogenen Retroviren zählt lediglich HERV-L, welches eine Homologie zum foamy virus aufweist.

Klasse I HERV (verwandt mit Gamma-Retroviren)

Gruppe 1 , HERV-HF	HERV-H (RTVL-H, RGH) HERV-F
Gruppe 2 , HERV-RW	HERV-W HERV-R (ERV9) HERV-P (HuERS-P, HuRRS-P)
Gruppe 3 , HERV-ERI	HERV-E (4-1, ERVA, NP-2) 51-1 HERV-R (ERV3) RRHERV-I
Gruppe 4 , HERV-T	HERV T (S71, CRTK1, CRTK6)
Gruppe 5 , HERV-IP	HERV-I (RTVL-I) HERV-IP-T47D (ERV-FTD)
Gruppe 6 , ERV-FRD	ERV-FRD

Klasse II HERV (verwandt mit Typ Alpha-, Beta- und Delta-Retroviren)

Gruppe 1 , HERV-K (HML-1)	HERV-K (HML-1.1)
Gruppe 2 , HERV-K (HML-2)	HERV-K10 HERV-K-HTDV
Gruppe 3 , HERV-K (HML-3)	HERV K (HML3.1)
Gruppe 4 , HERV-K (HML-4)	HERV-K-T47D
Gruppe 5 , HERV-K (HML-5)	HERV -K-NMWW2
Gruppe 6 , HERV-K (HML-6)	HERV K (HML-6p)
Gruppe 7 , HERV-K (HML-7)	HERV-K-NMWW7
Gruppe 8 , HERV-K (HML-8)	HERV-K-NMWW3
Gruppe 9 , HERV-K (HML-9)	HERV-K-NMWW9
Gruppe 10 , HERV-K (HML-10)	HERV-KC4

Klasse III HERV (mit foamy virus verwandte HERV)

HERV-L

Tab. 3.2 Klassifikation der humanen endogenen Retroviren. Klasse I HERV werden weiter in sechs Gruppen unterteilt und zeigen eine Homologie zu Typ C Säugerretroviren. Die zur Klasse II gehörenden HERV hingegen besitzen Verwandtschaft zu Typ B (z.B. MMTV) und Typ D Säugerretroviren und werden in zehn Gruppen gegliedert. HERV-L stellt das einzige Mitglied der Klasse III HERV dar, welche eine Ähnlichkeit zum foamy virus aufzeigt (nach Nelson et al., 2003)

3.2.2 Das humane endogene Retrovirus W (HERV-W)

3.2.2.1 Identifikation von HERV-W

HERV-W wurde zum ersten Mal von Jean-Luc Blond im Jahr 1999 im Rahmen von Expressionsstudien an Sequenzen entdeckt, die verwandt waren zum Multiplen Sklerose assoziierten Retrovirus (MSRV) (Blond et al., 1999). MSRV wurde bereits 1997 von Hervé Perron beschrieben, dessen Arbeitsgruppe Partikel mit reverser-Transkriptase-Aktivität aus Zellen des Leptomeninx, des Plexus choroideus und EBV-infizierten immortalisierten B-Zellen von Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt waren, nachweisen konnte (Perron et al., 1997). Blond et al. untersuchten die Expression von MSRV-Partikeln in verschiedenen gesunden Geweben an Hand von Northernblot-Analysen und beschrieben eine neue Familie humaner endogener Retroviren, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer PBS zu primer binding sites von Vogel-Retroviren mit ihrer zugehörigen tRNA^{Trp}, als HERV-W bezeichnet wurde. Die Expression von Elementen der HERV-W-Multicopy-Familie konnte Blonds Arbeitsgruppe mittels Northernblot-Analysen nur in Plazenta-Gewebe nachweisen. Kürzlich konnten jedoch auch HERV-W *pol* Transkripte im gesamten Gehirn, sowie in der Nebenniere und im Hoden nachgewiesen werden (Forsman et al., 2005).

Phylogenetische Analysen zeigten, dass die Integration von HERV-W-Proviren in das Primatengenom vor ca. 63 Millionen Jahren stattfand, also vor der Abspaltung der Neuwelt-Primaten von den Altwelt-Primaten (Kim et al., 2008). Des Weiteren wurde die Existenz von drei HERV-W-Unterfamilien und weiteren Subfamilien beschrieben, die sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in das Primatengenom integrierten, wobei Subfamilie 1 die älteste darstellt, während sich die beiden anderen Subfamilien unabhängig später in unser Genom integrierten (Costas, 2002).

3.2.2.2 Genomstruktur von HERV-W

Aufgrund von Stop-Codons und Rasterverschiebungen im Bereich der offenen Leserahmen für *gag* und *pol* sind Mitglieder der HERV-W-Familie nicht zur Replikation und zur Ausbildung infektiöser Partikel fähig. Das menschliche Genom enthält mindestens 70 *gag*-, 100 *pro* -und 30 *env*-Regionen von HERV-W (Voisset et al., 2000). Allerdings ist heute nur ein einzelner proviraler Locus auf Chromosom 7 bekannt, der einen offenen Leserahmen für ein 80kDa großes Vorläuferhüllprotein besitzt, das auch als "Syncytin" bekannt ist (Blond et al., 1999; Mi et al., 2000) (Abb. 3.5).

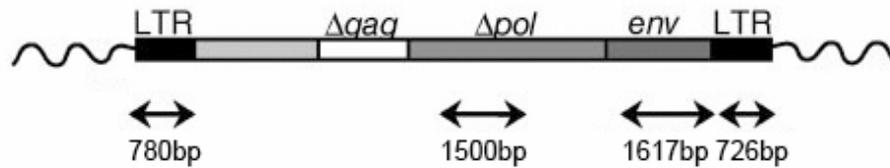


Abb. 3.5 Proviralear HERV-W-Locus auf Chromosom 7 (nach Mallet et al., 2004). Der Locus wird von nicht-retroviralen Sequenzen flankiert (Wellenlinie). Die "Long Term Repeats" des 5'- und 3'-Endes sind schwarz gekennzeichnet, ein 2kb großes, nicht-retrovirales Insert ist hellgrau dargestellt. Die Leserahmen für *gag* und *pol* sind durch Leserahmenverschiebungen bzw. Stopcodons unterbrochen (gekennzeichnet durch Δ), lediglich für ein Vorläuferhüllprotein ist ein offener Leserahmen (*env*) auf Chromosom 7 vorhanden.

Das Vorläuferhüllprotein wird nach seiner Expression durch zelluläre *trans*-Golgi-Proteasen in seine Unterheiten SU (surface) und TM (transmembrane) gespalten.

3.2.2.3 Plazentare Expression des HERV-W-Oberflächenproteins

Während viele endogene Retroviren durch Verlust oder Leserasterverschiebungen im Bereich des *env*-Gens nicht zur Expression des Hüllproteins fähig sind, enthält der ERVWE1-Locus von Chromosom 7q 21-22 einen ORF für ein Vorläuferprotein des HERV-W-Oberflächenproteins (Griffiths, 2001; Blond et al., 1999; Mi et al., 2000). Die Tatsache, dass andere HERV-W-Gene inaktiviert sind, führte zu der Annahme, dass die Funktion des *env*-Gens selektiv erhalten wurde (Blond et al., 1999). Die Arbeitsgruppen von Blond und Mi konnten zeigen, dass das HERV-W-Oberflächenprotein eine entscheidende Rolle bei der plazentaren Morphogenese einnimmt (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Die wesentlichen plazentaren Funktionen wie Ionen- und Nährstoffaustausch sowie die Synthese von Steroid- und Peptidhormonen werden dabei durch die Syncytiotrophoblastenschicht vermittelt. Durch Fusion und Differenzierung von Cytotrophoblasten, die u.a. unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen wie hCG (humanes Choriongonadotropin), Östradiol sowie Glucokortikoiden stehen, entstehen dabei die mehrkernigen, nicht proliferativen Syncytiotrophoblasten. Es konnte gezeigt werden, dass neben den oben genannten hormonellen Faktoren das 80kDa Produkt des *env*-Gens von ERVWE1, das als "Syncytin" bezeichnet wurde, entscheidend bei der Fusion der fetalen Trophoblasten und der Bildung von Syncytien-Riesenzellen beteiligt ist.

Die Fusionsaktivität von Syncytin und seine physiologische Bedeutung während der plazentaren Morphogenese wurden von Mi et al. folgendermaßen gezeigt: Die

Arbeitsgruppe transfizierte COS-Zellen mit Syncytin-Expressions-Plasmiden und untersuchte die Wirkung von Syncytin in Zellkulturen und in *in situ*-Hybridanalysen von humanem Plazentagewebe. Die Transfektion von COS-Zellen mit Syncytin-Expressions-Plasmid führte zur Bildung großer COS-Syncytien mit mehr als 30 Zellkernen. Um zu bestätigen, dass diese Syncytien aus der Fusion von Zellen und nicht aus Fehlern in der Zellteilung stammten, wurde folgendes Experiment herangezogen: COS-Zellen wurden entweder mit dem p35-Gen für Interleukin (IL) 12, dem p40-Gen für IL12 oder dem Syncytin-Gen transfiziert und die transfizierten Zellen anschließend vermischt. Hatte eine Fusion der COS-Zellen mittels Syncytin stattgefunden, konnte dies durch die Analyse der IL12-Aktivität nachgewiesen werden. Es zeigte sich unerwartet, dass die IL12-Aktivität in den Syncytien höher war als in p35/40-Gen-cotransfizierten COS-Zellen (Mi et al., 2000).

Die Aktivität von Syncytin als fusogenes Glykoprotein konnte *in vitro* auch an TELac2-Rhabdomyosarkom-Zellen gezeigt werden, die kontinuierlich β -Galaktosidase exprimierten und mit HERV-W *env* Expressionsvektorkonstrukten transfiziert wurden (Blond et al., 2000). Die transfizierten TELac2-Zellen wurden anschließend mit Hela-Zellen überschichtet. 36 Stunden nach Transfektion konnte in den Zellkokulturen die Ausbildung mehrkerniger Riesenzellen beobachtet werden, während dieser Effekt bei der Negativkontrolle (Transfektion von TELac2-Zellen mit Antisense-Plasmid-Konstrukt) nicht stattfand (Abb. 3.6).

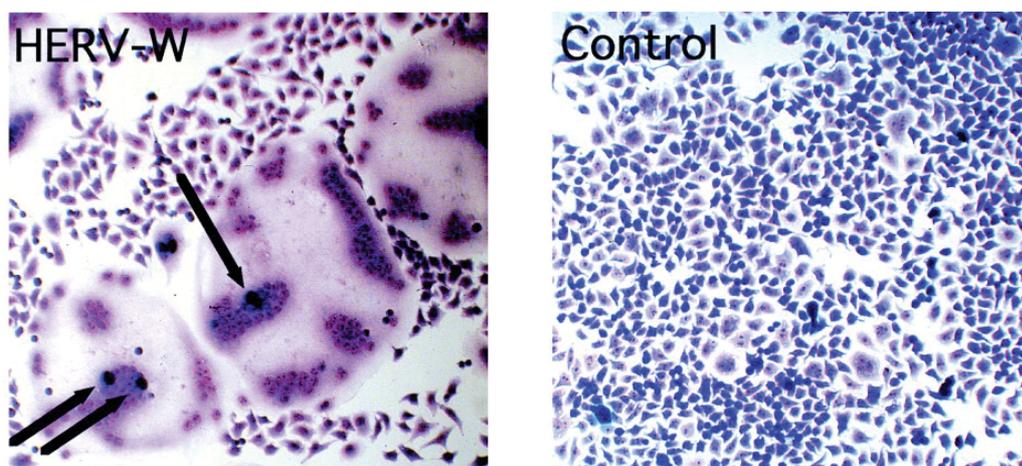


Abb. 3.6 Heterotype Ausbildung von Syncytien (Pfeile) bei TELac2-Rhabdomyosarkomzellen (36 Stunden nach Transfektion mit HERV-W *env* Plasmidkonstrukt) und Hela-Zellen. Zur besseren Darstellung der Zellkerne der Syncytin produzierenden Zellen (li.) diente die Umsetzung von X-Gal durch β -Galaktosidase. Es erfolgte zusätzlich die Färbung mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung. Als Kontrolle (re.) wurden TELac2-Zellen mit Antisense-Plasmidkonstrukt transfiziert, welche 36 Stunden nach Transfektion keine Syncytinproduktion und damit keine Zellfusion aufwiesen (nach Blond et al., 2000).

Zur besseren Darstellung der Zellkerne der Syncytin produzierenden Zellen erfolgte die Anfärbung mit X-Gal, welches durch die β -Galaktosidase umgesetzt wurde, sowie die Überschichtung mit May-Grünwald- und Giemsa-Färbelösung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HERV-W Env mit Typ D Säugetier-Retrovirus-Rezeptoren interagiert. Eine spezifische Blockade dieser Rezeptoren bei TE671-Zellen, die mehrere Retrovirus-Rezeptoren besitzen, bewirkte eine starke Verminderung der Fusionsaktivität der Zellen (Blond et al., 2000).

Die Wirkung von Syncytin steht dabei in engem Zusammenhang mit der Regulation von hCG und cAMP. Frendo et al. konnten einen co-linearen Anstieg von hCG und cAMP mit der Expression von HERV-W Env in der Plazenta zeigen, während eine verminderte Syncytin-Expression auch zur Inhibition der hCG-Ausschüttung führte (Frendo et al., 2003).

Während viele Viren in ihrer Evolution zahlreiche Wirtsgene in ihr Genom integrierten und davon profitierten, wurde mit der Entdeckung von Syncytin die entgegengesetzte Situation dargestellt. Mit dessen Bedeutung für die humane Plazentogenese konnte gezeigt werden, wie die Physiologie des Wirts durch virale Infektion in der Art beeinflusst wird, dass sich für diesen daraus ein Nutzen entwickelt.

3.2.2.4 Pathophysiologische Bedeutung von HERV-W

Neben seiner wichtigen physiologischen Bedeutung für die Fusion von Cytotrophoblasten zu mehrkernigen Syncytiotrophoblasten in der Plazenta, die durch Syncytin vermittelt wird, können bei der Deregulation von HERV-W und seiner Expression pathophysiologische Effekte beobachtet werden.

So wurde bei Schwangeren, die an Präeklampsie oder am HELLP-Syndrom (HELLP = hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) erkrankten, eine verminderte Transkriptionsrate von Syncytin-mRNA festgestellt. Es wird angenommen, dass die verminderte Syncytin-Expression einen Risikofaktor für eine verringerte Syncytiotrophoblastenbildung darstellt und zur verminderten Bildung von intakten Plazenta-Villi führt. Verringerte Trophoblasten-Differenzierung sowie vaskuläre Dysfunktionen, die zu Hypoperfusion und Hypoxie führen, sind charakteristische Symptome von Präeklampsie (Knerr et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, führte die Suche nach einem Retrovirus, das in Zusammenhang mit der Präsenz von extrazellulären Partikeln mit reverser-Transkriptase-Aktivität bei Patienten mit Multipler Sklerose steht, zur Entdeckung

von HERV-W (Perron et al., 1997). Einen weiteren Hinweis für eine verstärkte Expression von HERV-W-Elementen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen konnten Antony et al. geben (Antony et al., 2004, 2007). Die Arbeitsgruppe untersuchte die durch eine verstärkte Expression von Syncytin bei Multiple-Sklerose-Patienten bedingten Effekte auf Gliazellen. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte bei MS-Patienten eine drei- bis vierfach erhöhte Syncytin-Expression in Astrozyten und Mikroglia-Zellen beobachtet werden. *In vitro* konnte die Arbeitsgruppe eine Aktivierung von proinflammatorischen Molekülen wie iNOS (induzierbare Stickoxid-Synthase), Interleukin-1 β sowie Redox-Stress zeigen, die zu zytotoxischen Effekten bei Oligodendrozyten und damit zu demyelinisierenden Schäden führten. Außerdem konnte *in vivo* und *in vitro* ein positiver Effekt von Folsäure und pflanzlicher Phenocarboxylsäure auf das neurologische Outcome bei redoxabhängiger Schädigung von Oligodendrozyten beschrieben werden. Trotz des Nachweises von MSR-V / HERV-W-Antigenen bei MS-Patienten konnte durch Ruprecht et al. gezeigt werden, dass diese im Sinne einer immunologischen Toleranz keine spezifische zelluläre oder humorale Immunantwort gegen MSR-V / HERV-W-Proteine hervorrufen (Ruprecht et al., 2008).

HERV-W konnte auch in Zusammenhang mit bestimmten Schizophrenie-Erkrankungen gebracht werden (Karlsson et al., 2001; Perron et al., 2008). Karlsson et al. beschrieben die Identifizierung von retroviralen Sequenzen im zellfreien zerebrospinalen Liquor von Patienten mit Recent-Onset-Schizophrenie, die Homologien zu *pol*-Sequenzen von HERV-W aufwiesen. Außerdem zeigte die postmortem-Untersuchung des Frontalkortex von Schizophrenie-Patienten eine erhöhte Transkriptionsrate von HERV-W Elementen im Vergleich zu Kontroll-Patienten (Karlsson et al., 2001).

Erst kürzlich wurde über die Transaktivierung von HERV-W-Elementen durch virale Infektionen mit Herpes Simplex Virus Typ I sowie Influenzavirus A/WSN/33 berichtet (Lee et al., 2003; Nellåker et al. 2006). Bei *in vitro*-Infektionen von U937-, CCF-STTG1- und 293F-Zellen mit A/WSN/33 konnte ausgeschlossen werden, dass die vermehrte Aktivierung von HERV-W-Elementen durch eine antivirale Antwort hervorgerufen wurde. Die Transaktivierung von *gag*- und *env*-Transkripten wurde auf zellulären Stress durch die Virusinfektion zurückgeführt. Welche pathophysiologischen Effekte aus einer vermehrten Aktivierung von HERV-W-Elementen bei Virusinfektion mit Influenzavirus A/WSN/33 oder HSV-I resultieren, ist momentan noch unklar.

3.3 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System stellt eine *in vivo*-Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen dar. Das System macht sich die Eigenschaften des Gal4-Proteins von *Saccharomyces cerevisiae* zunutze, das einen Transkriptionsfaktor darstellt. Dieser leitet die Expression von Genen ein, die für Enzyme des Galaktosestoffwechsels kodieren (Fields und Song, 1989; Toby und Golemis, 2001; Johnston, 1987). Gal4 besteht aus zwei funktionellen Domänen: die N-terminale Domäne bindet an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion des Zielgens (UAS = "upstream activating sequence"), die C-terminale Domäne aktiviert die Transkription des Zielgens. Das Prinzip des Hefe-Zwei-Systems beruht auf der Separation dieser beiden Domänen und deren Fusionierung mit Proteinen, die auf ihre gegenseitige Interaktion getestet werden. Das Fusionsprotein mit der Gal4-Bindungsdomäne (BD) stellt das Fängerprotein dar, während das Protein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) als Beuteprotein bezeichnet wird. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Fänger- und Beuteprotein werden die Domänen des Gal4-Proteins wieder vereint, so dass Gal4 die Transkription eines nachgeschalteten Transportergens einleiten kann. Die anschließende Translation des kodierten Enzyms kann entsprechend seiner Eigenschaft durch eine Farbreaktion oder Wachstumsanalyse der Hefen in einem bestimmten Mangelmedium nachgewiesen werden.

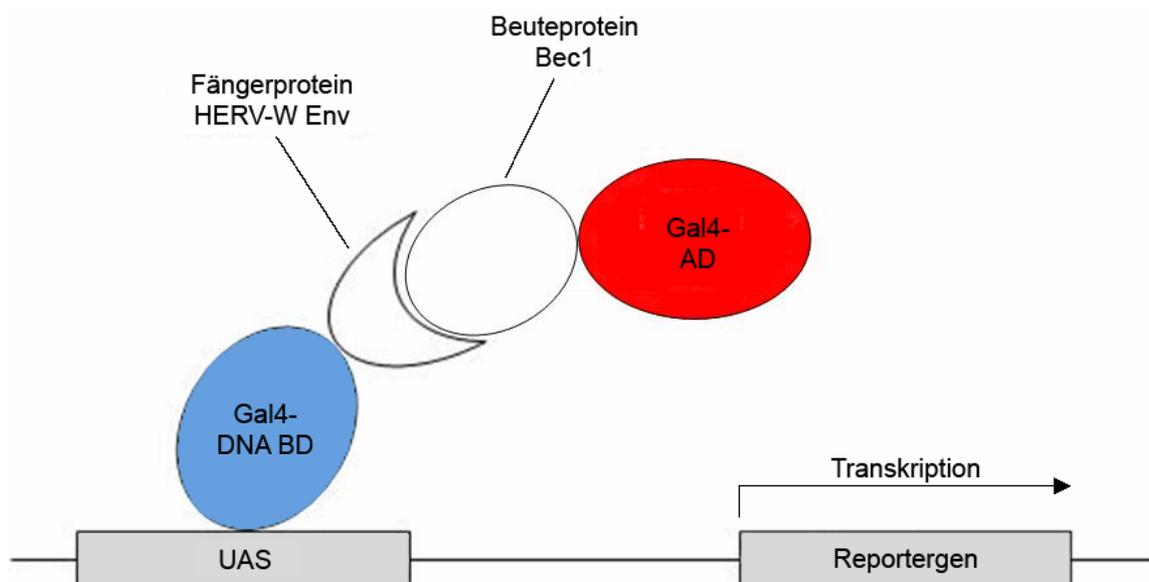


Abb. 3.7 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems am Beispiel des Kaliumkanalproteins Bec1 mit HERV-W Env. Durch die Interaktion von HERV-W Env (Fängerprotein) und Bec1 (Beuteprotein) kommt es zur Aktivierung des Reportergens.

Zur Charakterisierung des Proteins und zur Untersuchung seiner Funktion wurde in der AG Müller-Lantzsch nach zellulären Interaktionspartnern des Oberflächenproteins von HERV-W gesucht. Dafür wurde das Gal4-basierte Hefe-Zwei-Hybrid-System der Fa. Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) eingesetzt. Für das "Screening" wurde eine Datenbank von cDNA aus dem Gehirn eines erwachsenen Menschen verwendet (Fa. Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA). Bei der Suche nach mit HERV-W Env interagierenden Proteinen konnte u.a. das Kaliumkanalprotein Bec1 identifiziert werden, was die Grundlage dieser Arbeit darstellt.

3.4 Das Kaliumkanalprotein Bec1

1999 beschrieben Miyake et al. einen neuen spannungsabhängigen Kaliumkanal, den die Arbeitsgruppe durch Northernblot-Analyse zu diesem Zeitpunkt ausschließlich im menschlichen Gehirn identifizieren konnte (Miyake et al., 1999). Aus diesem Grund wurde der neue Kanal, der der Familie der "Ether-à-go-go"-Kaliumkanäle zugeordnet (siehe unten) und als gehirnspezifisch angenommen wurde, als "Bec1" ("brain specific eag like channel type 1") titulierte. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass sich die Expression von Bec1 auf die Regionen des Telencephalons wie dem cerebralen Kortex, dem Corpus amygdaloideum, der Hippocampus-Region sowie dem Corpus striatum konzentrierte. Durch *in situ*-Hybridisierung konnte das Vorkommen des neuen Kaliumkanals im Hippocampus auf die Pyramidenzellschichten CA1-CA2 und die Schichten des Gyrus dentatus eingegrenzt werden.

Als Locus für Bec1 wurde mit Hilfe einer BLAST Suche in der Datenbank von GenBank und RACE (rapid amplification of cDNA ends) Chromosom 12q13 mit dem Gen *KCNH3* (accession number NM_012284) identifiziert. Diese Region kodiert für den 1083 Aminosäuren großen offenen Leserahmen von Bec1.

Drei Jahre nach der erstmaligen Beschreibung von Bec1 wies man den *ether-à-go-go*-Kanal auf mRNA-Ebene in weiteren Zellen und Geweben nach. Smith et al. konnten die Expression des als gehirnspezifisch angenommenen Bec1-Kanals in verschiedenen Zellen des Immunsystems zeigen. Die Expression von Bec1 wurde mit Hilfe von RT-PCR in allen untersuchten primären Leukämiezellen, peripheren Blutzellen, aktivierten Tonsillenzellen, Lymphozyten von Patienten mit Sjögren-Syndrom und EBV-transformierten B-Zellen dargestellt. Bei hämatopoetischen Zelllinien hingegen konnte Bec1 lediglich auf niedrigem Level in CEM- und MOLT-4-Zellen nachgewiesen werden (Smith et al., 2002).

3.4.1 Klassifizierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Die heute bekannten spannungsabhängigen Kaliumkanäle, die eine Schlüsselrolle bei der normalen zellulären Aktivität, aber auch bei Krankheitsprozessen einnehmen, stellen Mitglieder der Superfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle dar. Diese Superfamilie umfasst zwei große Gruppen spannungsabhängiger Kaliumkanäle – die Familie der "Shaker"-Kanäle sowie die Familie der "Ether-à-go-go-Kanäle" (Eag). Die "Shaker"-Familie stellt eine heterogene Gruppe dar und umfasst die Subfamilien Kv1 bis Kv4. "Shaker"-Kanäle

besitzen lediglich eine relativ geringe Sequenzhomologie zu den "Ether-à-go-go"-Kanälen. Diese weisen eine gewisse Verwandtschaft zu Kationenkanälen auf, die durch zyklische Nukleotide gesteuert werden (cyclic nucleotide-gated cation channels), sowie zu den durch Hyperpolarisation aktivierten Kaliumkanälen. Die "Ether-à-go-go-Familie" (Eag) umfasst vier Subfamilien, zu denen die "ether-à-go-go"-Kanäle (eag), die "ether-à-go-go related gene"-Kanäle (erg) sowie die "ether-à-go-go like"-Kanäle (elk) gezählt werden. Bec1 sowie die von Miyake et al. ebenfalls beschriebenen Bec2 und Bec3 stellen nach dem Kompendium der "International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) für spannungsabhängige Ionenkanäle 2005" eine weitere Subfamilie der "Ether-à-go-go"-Kanäle dar (Miyake et al. 1999; Smith et al., 2002; Gutman et al., 2005). Abb. 3.8 gibt einen Überblick über die phylogenetische Einteilung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle der "Ether-à-go-go"-Familie (nach IUPHAR Kv10 bis Kv12), welche nach ihren Genloci auch mit *KCNH* bezeichnet werden.

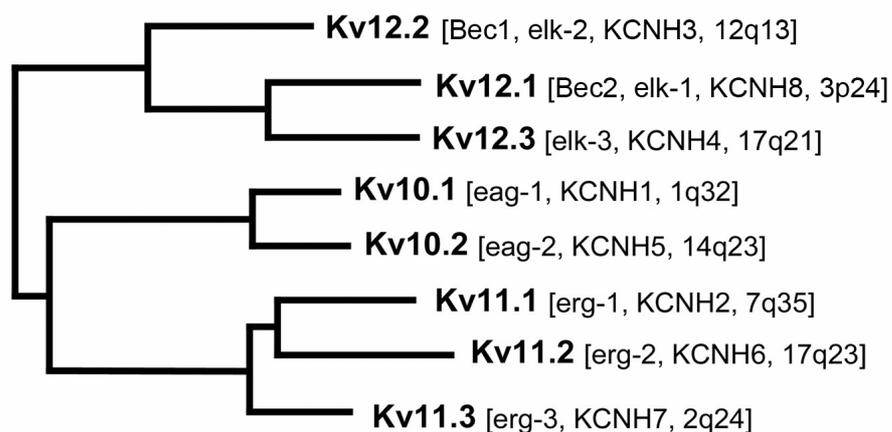


Abb. 3.8 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsabhängigen Kaliumkanäle der "Ether-à-go-go"-Familie (Eag). Bec1 (IUPHAR-Name Kv12.2) wird synonym mit "elk-2" bezeichnet und wird durch den Genlocus *KCNH3* auf Chromosom 12q13 lokalisiert (nach Gutman et al., 2005).

3.4.2 Aufbau und Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Ionenkanäle sind Membranproteine, die die Passage von Ionen über Zellmembranen steuern und somit eine bedeutende Rolle für den Ablauf und die Steuerung von elektrophysiologischen Prozessen haben. Durch gentechnische und röntgenkristallographische Methoden gelang es in den letzten Jahren immer besser, Aufbau und Funktion dieser Proteine zu verstehen und zu

entschlüsseln. Spannungsabhängige Kaliumkanäle stellen den Prototyp spannungsabhängiger Ionenkanäle dar. Sie sind homotetramerische Kanäle, deren vier Untereinheiten jeweils aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) bestehen, wobei C- und N-Terminus jeweils in den Intrazellulärraum gerichtet sind. Jede Untereinheit besitzt einen Spannungssensor (S1-S4), der vielfach positiv geladen ist und eine zentrale Rolle für die Steuerung des Kanals einnimmt. Die Transmembrandomänen S5 und S6 sind über einen sog. P-Loop miteinander verbunden und stellen den Selektivitätsfilter der Kanalpore dar.

Abb. 3.9 zeigt den schematischen Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (Yellen, 2002).

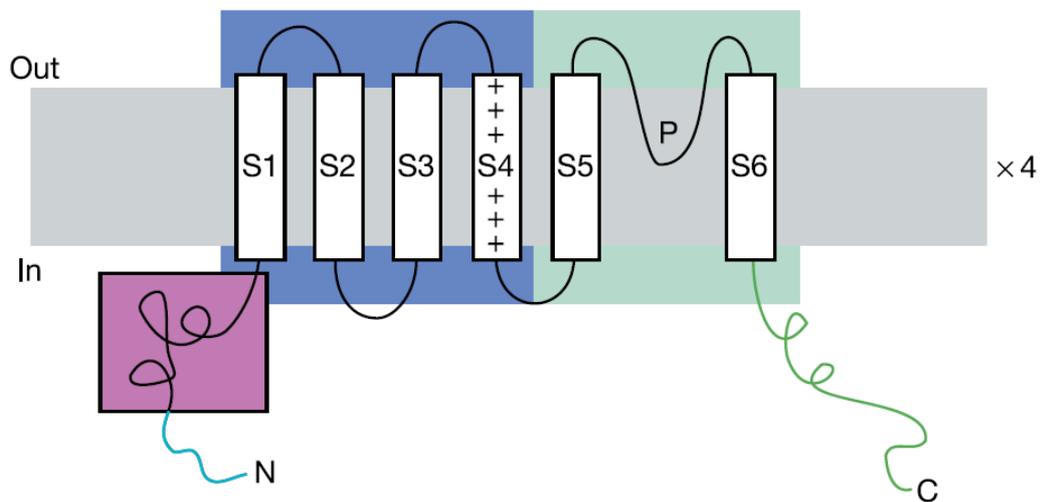


Abb. 3.9 Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (nach Yellen, 2002).

Während alle spannungsabhängigen Kaliumkanäle aus sechs Transmembrandomänen mit S1-S4 als Spannungssensor und S5-S6 als Pore aufgebaut sind, gibt es weitreichende Unterschiede bzgl. der N- und C-terminalen Domänen der Kanäle. Die "Shaker"-Kanäle Kv1-Kv4 besitzen an ihrem N-Terminus eine sog. T1-Tetramer-Domäne, die für die spezifische Anordnung der Untereinheiten sowie für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Dem C-Terminus hingegen ist bei dieser Familie keine spezifische Funktion zugeschrieben, obwohl sich an diesem bei Shaker-Kanälen ein PDZ-Bindungsmotiv befindet, das für die Lokalisation des Kanals verantwortlich und in komplexe Signalprozesse eingebunden ist (Kreusch et al., 1998; Gulbis et al., 2000; Doyle et al., 1998). Andere Familien spannungs-

abhängiger Kaliumkanäle, die aus einem Tetramer von jeweils sechs transmembranen Domänen aufgebaut sind, wie u.a. eag- / erg-Kanäle, besitzen keine T1-Domäne, zeichnen sich jedoch durch das Vorhandensein einer Sensordomäne am C-terminalen Ende aus. Am N-Terminus findet sich bei einigen Familien eine weitere Transmembrandomäne S0 oder eine zusätzliche Sensordomäne (Wallner et al., 1996; Morais et al., 1998).

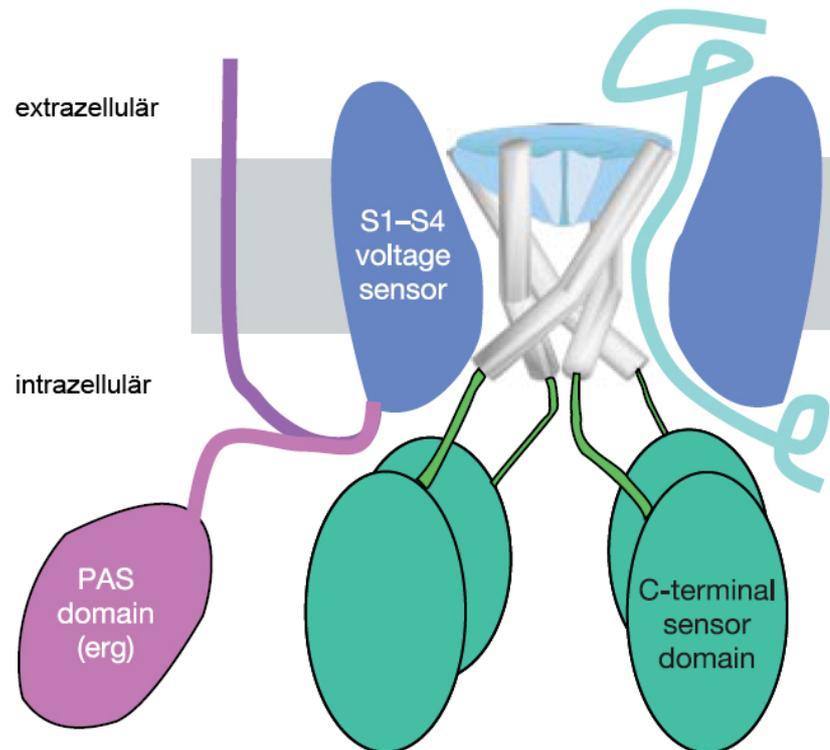


Abb. 3.10 Schematischer Aufbau eines eag- / erg-Kaliumkanals mit C-terminaler Sensordomäne und zusätzlicher N-terminaler PAS-Sensordomäne (nach Yellen, 2002).

3.4.3 Steuerung der Permeabilität spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Um die Steuerung von Signalprozessen oder die Regulation des Ionenmilieus zu gewährleisten, muss die Permeabilität des Kanals für Kalium schnell regulierbar sein. Es sind drei Modelle beschrieben, die durch Konformationsänderung des Kanalproteins zur unmittelbaren Schließung der Pore und damit zur Unterbrechung des nach extrazellulär gerichteten Kaliumstroms führen (Yellen, 2002).

Für einige spannungsgesteuerte Kaliumkanäle wurde der Schluss der Kanalpore mittels der nach intrazellulär ragenden Teile der S6-Transmembrandomänen,

welche eine Art rechtsgewundenes Bündel ("S6 bundle crossing") darstellen, beschrieben (Liu et al., 1997; del Camino et al., 2001). Die Funktion dieses Bündels aus den nach intrazellulär gerichteten S6-Anteilen scheint eng an das Vorhandensein von Prolinsequenzen gebunden sein, die sich an den intrazellulären Verlängerungen von S6 befinden und bei den meisten spannungsabhängigen Kaliumkanälen, jedoch nicht bei bakteriellen Kaliumkanälen zu finden sind. Zum Schließen des Kanals nähern sich die vier S6-Transmembransegmente gegenseitig an und führen so zum Abreißen des Ionenflusses.

Ein weiterer Schließmechanismus, der u.a. für Shaker-Kanäle beschrieben wurde, ist die sog. "N-Typ-Inaktivierung". Es handelt sich hierbei um den Mechanismus eines autoinhibitorischen N-terminalen Peptids, das einen Teil des Kanalproteins darstellt, durch ein von den S6-Domänen gebildetes Tor ("S6 gate") reguliert wird und vermutlich direkt im Inneren des Kanals bindet. Dieser Schlussmechanismus wird allerdings nur durch ein vorheriges Öffnen des S6 gates und somit einem kurzen Öffnen des Kanals ermöglicht, wodurch die Blockade durch das N-terminale Peptid erst ermöglicht wird (Yellen, 2002). Die Wirkung des autoinhibitorischen N-terminalen Peptids ist somit mit der von intrazellulär wirksamen Kanalblockern vergleichbar, welche ebenfalls im Innenraum des Kanals binden und so den Transport von Kaliumionen hemmen (Choi et al., 1991).

Als dritter Regulationsmechanismus der Kaliumpermeation ist das direkte Schließen des Selektivitätsfilters und somit der Kanalpore bekannt. In Anlehnung an die "N-Typ-Inaktivierung" wird dieser Mechanismus auch als "C-Typ-Inaktivierung" bezeichnet. Dieser Inaktivierungsprozess des Kanals, der in der Regel langsamer vonstattengeht als die "N-Typ-Inaktivierung", wurde bei "Skaker"-Kanälen beobachtet, bei denen durch Mutation das autoinhibitorische N-terminale Peptid fehlte (Hoshi et al., 1991). Obwohl auch während der normalen Aktivierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle eine gewisse Bewegung des Selektivitätsfilters beobachtet werden konnte, scheint die "C-Typ-Inaktivierung" im Gegensatz zu CNG-Kaliumkanälen, welche durch zyklische Nukleotide reguliert werden, nicht den primären Schließmechanismus darzustellen. Gemäß dem "C-Typ-Inaktivierungs"-Modell ist es wahrscheinlich, dass die grundlegenden Funktionen des "S6 gate" und des Selektivitätsfilters bei den unterschiedlichsten Kanälen an der Regulation der Permeabilität beteiligt sind (Flynn et al., 2001). Das "S6 gate" übt dabei seine Funktion in Abhängigkeit des Spannungssensors und der intrazellulären Sensordomänen aus, während der Selektivitätsfilter auf Veränderungen des "S6

gate" mit Öffnen oder Schließen der Kanalpore reagiert (Yellen, 2002). Die drei oben beschriebenen Mechanismen sind in Abb. 3.11 zusammengefasst.

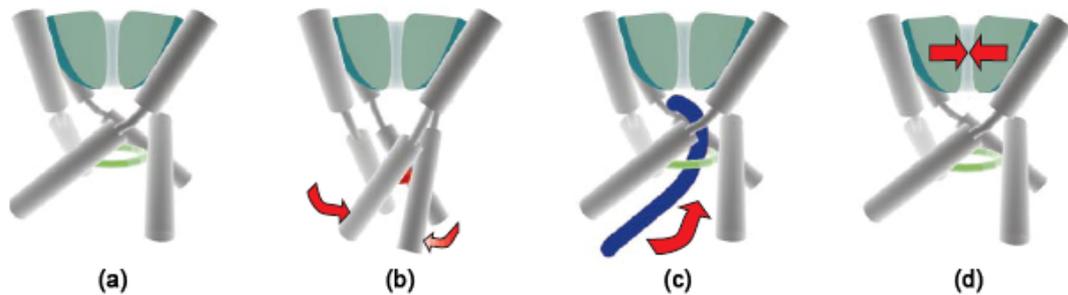


Abb. 3.11 Schließmechanismen bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen (nach Yellen, 2002). Geöffneter Kanal (a), "S6 bundle crossing" (b), "N-Typ-Inaktivierung" (c), "C-Typ-Inaktivierung" (d).

Die Schließmechanismen des Kanals und seine Rolle in der Signaltransduktion unterliegen, wie im Falle der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, der Kontrolle durch Veränderung des Membranpotentials oder durch Ligandenbindung.

Mit Hilfe des MthK-Kanals, einem aus zwei Transmembrandomänen aufgebauten, bakteriellen Kaliumkanal, konnten kürzlich neue Erkenntnisse bezüglich der Sensormechanismen von ligandenabhängigen, spannungsabhängigen 6TM-Kaliumkanälen gewonnen werden. Auch der MthK-Kanal besitzt C-terminale Sensordomänen mit insgesamt acht sog. RCK ("regulator of K⁺ conductance")-Domänen. Diese RCK-Domänen sind zu je vier Dimeren zusammengelagert, die zusammen einen Ring bilden und der Steuerung durch Kalziumionen unterliegen. Ist Ca²⁺ an den MthK-Kanal gebunden, so führt dies zur Öffnung des Kaliumkanals, während es in Abwesenheit von Ca²⁺ durch den aus RCK-Domänen gebildeten Ring zur Schließung des Kaliumkanals durch "S6 bundle crossing" (s.o.) kommt (Yellen, 2002). Dieses Modell ist in Abb. 3.12 (s.u.) dargestellt.

Einen weiteren Ca²⁺-gesteuerten Typ spannungsabhängiger Kaliumkanäle stellen die SK-Kanäle dar, die eine Calmodulin-Bindungssequenz (CaMBD) besitzen, welche eine unmittelbare Verbindung zur S6-Domäne des Kaliumkanals aufweist. Calmodulin bildet zusammen mit CaMBD einen stabilen Komplex, der in Abwesenheit von Ca²⁺ als Monomer vorliegt und bei Anwesenheit von Ca²⁺ dimerisiert. Dies führt zu Änderungen der Quartärstruktur und letztendlich zum Öffnen der Kanalpore (Yellen, 2002).

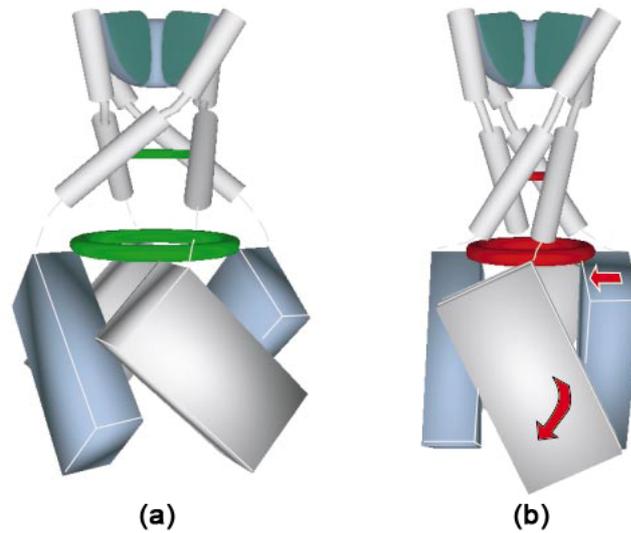


Abb. 3.12 Modell des bakteriellen MthK-Kanals (nach Yellen, 2002). Geöffneter Kanal in Anwesenheit von Ca^{2+} (a), Schließen des Kanals nach Dissoziation von Ca^{2+} (b).

Die beiden zuletzt genannten Mechanismen stellen zusammen mit den CNG-Kanälen und weiteren Vertretern wichtige Beispiele für ligandengesteuerte spannungsabhängige Kaliumkanäle dar, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion einnehmen und therapeutische Zielproteine bei pathologischen Prozessen darstellen könnten.

3.5 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Interaktion des Oberflächenproteins des humanen endogenen Retrovirus W (HERV-W Env) mit dem C-terminalen Teil des Kaliumkanalproteins Bec1 (brain specific eag like channel type 1) charakterisiert werden. Bec1 wurde in der AG Müller-Lantzsch im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens als Interaktionspartner von HERV-W Env identifiziert. Zur Darstellung der Interaktion der beiden Proteine wurden verschiedene molekulargenetische *in vitro*- und *in vivo*-Techniken wie Pulldown-Assays, Westernblot-Techniken, Immunfluoreszenzen und Immunpräzipitationen angewandt. Zunächst erfolgte die Klonierung verschiedener HERV-W *env*- und Bec1-Fragmente in entsprechende Vektoren. In GST-Pulldown-Analysen sollte die Interaktion der Proteine verifiziert und in weiteren Versuchen mit Hilfe unterschiedlich trunkierter Proteine die Bindung eingegrenzt werden. Die Bindungsdomänen sollten sowohl auf HERV-W Env als auch auf dem C-terminalen Teil von Bec1 lokalisiert werden. Außerdem sollten weitere retrovirale Proteine auf ihre Bindung mit dem Kaliumkanalprotein untersucht werden. Um eine mögliche Interaktion mit Bec1 zu zeigen, war geplant, die Gag-Proteine von HERV-W und weiteren endogenen und exogenen Retroviren wie MSRV, HERV-K und HIV-1 nach *in vitro*-Translation ebenfalls mittels Pulldown-Assay zu untersuchen. Neben diesen *in vitro*-Techniken sollte die Protein-Protein-Bindung auch *in vivo* dargestellt werden. Dazu sollten HeLa-Zellen mit HERV-W *env*- und Bec1-Expressionsvektorkonstrukten transfiziert und ihre Expression mittels konventioneller und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden, um die Lokalisierung und Koloalysierung der Proteine zu untersuchen. Weiterhin sollte die *in vivo*-Interaktion beider Proteine durch Immun- und Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Abschließend möchte diese Arbeit die Daten von Miyake und Smith zum Vorkommen von Bec1 in verschiedenen Zellen ergänzen (Miyake et al., 1999; Smith et al., 2002). Dafür sollten mittels Immunpräzipitation unterschiedliche Zelllinien auf die Expression von endogenem Bec1 untersucht und verglichen werden.

4. Material

4.1 Bakterienstämme

4.1.1 *E. coli* pMOS-blue

Ein *Escherichia coli*-Bakterienstamm (pMOS-blue T-vector Kit, Amersham), der für Transformationen sowie Klonierungen mit dem pGEM-T-Vektor-System benutzt wurde.

4.1.2 *E. coli* BL21DE3 (Studier und Moffatt, 1986)

Dieser *E. coli*-Bakterienstamm wurde bei der Induktion zur Proteinexpression benutzt.

4.2 Größenmarker

4.2.1 DNA-Größenmarker

"1kb plus DNA Ladder" (Invitrogen):

Dieser DNA-Marker besteht aus Vektor-DNA-Fragmenten der Größen 12, 11, 20, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,85, 0,65, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 und 0,1kb.

"1kb DNA Ladder" (Invitrogen):

Dieser DNA-Marker besteht aus Vektor-DNA-Fragmenten der Größen 12, 11, 20, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,85, 0,65, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 und 0,075kb.

4.2.2 Proteingrößenmarker

Low-Molecular-Weight-Marker (LMW-Marker, von AG Müller-Lantzsch selbst hergestellt) mit folgenden Molekulargewichten:

Phosphorylase b	94kDa
Kälberserumalbumin	67kDa
Ovalbumin	43kDa
Carboanhydrase	30kDa
Trypsin Inhibitor II-S	20,1kDa
Lactalbumin	14,4 kDa

¹⁴C-Marker:

Marker aus Proteinen der Molekulargewichte 200, 97, 66, 46, 30 und 14kDa, welche mit dem radioaktiven Kohlenstoff-Isotop ^{14}C markiert wurden (Amersham).

4.3 Antikörper

4.3.1 Monoklonale Antikörper

Anti-GST-Antikörper aus der Ratte (Kooperation Dr. E. Kemmer, GSF, München)

4.3.2 Polyklonale Antikörper

Anti-Bec1 Antikörper:

Zur Gewinnung des entsprechenden Serums wurden Kaninchen mit den letzten 223 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Bec1-Proteins geimpft, gegen welche dieser Antikörper gerichtet ist (AG Müller-Lantsch).

Anti-HERV-W Env Antikörper:

Zur Gewinnung des entsprechenden Serums wurden Kaninchen mit Teilprodukten des HERV-W Env Proteins geimpft, gegen welche dieser Antikörper gerichtet ist (AG Müller-Lantsch).

4.3.3 Peroxidasekonjugierte Zweitantikörper

Anti-Ratte-IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert, aus Kaninchen

Anti-Maus-IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert, aus Ziege

Anti-Maus-IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert, aus Ziege

(alle drei Sigma & Aldrich)

4.3.4 Farbstoffmarkierte Zweitantikörper

Alexa Fluor 568 Tritc Anti-Maus-IgG Antikörper, Ziege (Invitrogen)

4.4 Puffer und Medien

50 fach TAE-Puffer

242,18g Tris-Puffer (2M); 20,5g Natriumacetat (0,25M); 18,6g EDTA; 50ml Essigsäure; pH 7,8

1 fach TAE-Puffer

50 fach TAE-Puffer 1:50 mit Aqua dest. verdünnt

LB-Medium	12,5g LB-Bouillon (Becton & Dickinson) auf 500ml mit Aqua dest.
LB-Medium oder LB-Agar mit Ampicillin	100mg Ampicillin-Stammlösung pro ml Medium; Endkonzentration 0,1% [w/v]
LB-Medium oder LB-Agar mit Kanamycin	10mg Kanamycin-Stammlösung pro ml Medium; Endkonzentration 0,01% [w/v]
LB-Agar	20g LB-Agar (Becton & Dickinson) auf 500ml Aqua dest.
Stet-Puffer	5ml Tris-HCl (1M, pH 8); 10ml EDTA (0,5M, pH 8); 5ml Triton X-100, 8g Saccharose, 80ml Aqua dest.
Tris-HCl	60,55g Tris-Puffer auf 500ml Aqua dest., mit HCl auf pH 8
TE(Tris-EDTA)-Puffer	1ml Tris-HCl (1M); 0,5ml EDTA (0,2M); auf 100ml mit Aqua dest.; pH 7,6
TE-RNase-Puffer	19ml TE-Puffer; 1ml RNase A; pH 7,6
Lysozym	0,05g Lysozym-Pulver auf 1ml Aqua dest.
Probenpuffer ("Samplebuffer")	6ml SDS (10%); 2,5ml Uppergelstock-Lösung; 1ml Mercaptopropandiol; 1,05ml Glycerin

Probenpuffer mit Bromphenolblau	Probenpuffer, blau gefärbt mit einer Spatelspitze Bromphenolblau
APS-Lösung	0,1g Ammoniumperoxidsulfat auf 1ml Aqua dest.
Coomassie-Blau (für Polyacrylamidgele)	125ml Isopropanol; 50ml Essigsäure; 325ml Aqua dest.; 0,1g Coomassie-Blau-Pulver
Entfärbelösung	2l Aqua dest.; 250ml Isopropanol; 250ml Essigsäure
Laufpuffer ("Running Buffer")	72g Glycin; 15g Tris; 25ml SDS (20%); Aqua dest. ad 5l
Transferpuffer	72g Glycin; 15g Tris; 12,5ml SDS (20%); 1l Methanol; Aqua dest. ad 5l
Lysispuffer	1ml Tris-HCl (1M, pH 7,5); 2,8ml NaCl-Lösung (5M); 0,3ml MgCl ₂ -Lösung (1M); 0,5ml NP40 (Igepal); Puffer wird frisch angesetzt mit: PMSF; Aprotinin; Dithiothreitol (je 1µl/ml Lösung); Lysozym (10µl/ml Lösung)
Kopplungspuffer ("low salt")	5ml Tris-HCl (1M, pH 7,5) 1ml EDTA (0,2M, pH 8); 10ml NaCl-Lösung (5M); 0,5ml NP40
Kopplungspuffer ("high salt")	5ml Tris-HCl (1M, pH 7,5); 1ml EDTA (0,2M, pH 8); 20ml NaCl-Lösung (5M); 0,5ml NP40

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	140mM NaCl; 25mM KCl; 0,5mM MgCl ₂ ; 1mM NaKPO ₄ ; pH 7,5
Amidoschwarz-Färbelösung	0,1g Amidoschwarz-Pulver; 50ml Propanol; 20ml Essigsäure; Aqua dest. ad 200ml
Fixierlösung (für SDS-Gele)	500ml Methanol; 400ml Aqua dest.; 100ml Essigsäure
Natrium-Salicylat	Für 1M Lösung: 160,11g auf 1l Aqua dest.
Uppergelstock-Lösung	Tris-HCl (0,5M); Natriumdodecylsulfat (SDS, 0,4%); pH 6,8
Bottomgelstock	Tris-HCl (1,5M); Natriumdodecylsulfat (SDS, 20%); pH 8,8
Blaumarker	Glycerin (50%); EDTA (50mM); Bromphenolblau (0,25%)
Trenngel	Tris-HCl (375mM, pH 8,8); SDS (0,1%); Tetramethylethylendiamin (TEMED, 0,025%); APS-Lösung (0,03%); variabel: Acrylamid, Bisacrylamid
Sammelgel	Tris-HCl (125mM, pH 6,8); SDS (0,1%); Tetramethylethylendiamin (TEMED, 0,025%); APS-Lösung (0,03%); Acrylamid (4%); Bisacrylamid (0,12%)
Antibody-Puffer (AB-Puffer)	2ml Tris-HCl (1M, pH 7,4); 2ml NaCl

(5M); 0,5ml EDTA (0,2M); 0,5ml NP40 (Igepal); 5ml Desoxycholat (10%); 2,5ml SDS (20%); Aqua dest. ad 100ml

frisch ansetzen mit:

PMSF; Aprotinin; Iodoacetamid (je 1µl pro ml AB-Puffer)

T4-DNA-Ligase-Puffer

ATP (10mmol/l); MgCl₂ (50mmol/l); Dithiothreitol (DTT, 10mmol/l); Tris-HCl (600mmol/l, pH 7,5)

4.5 Vektoren

4.5.1 pGEM-T-Vektor (Promega)

Der pGEM-T-Vektor der Fa. Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten der Taq-Polymerase verwendet, da diese Polymerase allen Amplifikaten am 3'-Ende ein Desoxyadenosin anhängt. Diese DNA-Fragmente können ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Für die Ligation von Konstrukten ohne überhängende Desoxythymidinenden steht alternativ eine Multiple-Cloning-Site mit Erkennungssequenzen für mehrere Restriktionsenzyme zur Verfügung. Die klonierten Fragmente integrieren in das *lacZ*-Gen des Plasmids, welches ausgeschaltet wird, so dass ein "Blue-White-Screening" möglich ist: Bakterienkolonien, die das Vektorkonstrukt mit dem gewünschten Insert enthalten und das zugehörige Protein exprimieren, erscheinen auf der Agarplatte weiß, während Bakterienkolonien, die Plasmide mit intaktem *lacZ*-Gen enthalten, auf dem Agar bläulich schimmern (Sambrook et al., 1989).

Der Vektor kodiert außerdem für ein Ampicillin-Resistenzgen, das der Selektion transformierter Bakterien dient.

4.5.2 pGBKT7-Vektor (Clontech Biosciences)

Der Expressionsvektor pGBKT7 wird zur Herstellung von DNA-Konstrukten benutzt, die zur *in vitro*-Translation, u.a. für den Nachweis von Protein-Protein-Bindungen, eingesetzt werden können. Der Vektor kodiert für einen T7-Promoter, der Transkription und Translation reguliert. Die exprimierten Proteine sind mit der GAL4-

DNA Bindungsdomäne des Vektors fusioniert. Als Selektionsmarker besitzt dieser Vektor ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin.

4.5.3 pGEX-4T-1-Vektor (Amersham)

Dieser Expressionsvektor ermöglicht die Herstellung von Fusionsproteinen mit der Glutathion-S-Transferase (GST). Nach Induktion des *tac*-Promotors mit IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactosid) entsteht so ein 26kDa großes GST-Molekül, welches durch Bindung an Glutathionsepharose eluiert werden kann.

4.5.4 pEGFP-C1-Vektor (Clontech Biosciences)

Dieser Vektor dient zur Herstellung von Vektorkonstrukten, die zur Expression von Fusionsproteinen mit dem grün-fluoreszierenden Protein EGFP ("enhanced green fluorescent protein") benutzt werden können, oder zur alleinigen Expression von EGFP-Protein zur Kontrolle von Transfektionen. Als Selektionsmarker besitzt pEGFP-C1 eine Kanamycin-Resistenz.

4.5.5 pSG5-Vektor (Stratagene)

Der von Stratagene vertriebene eukaryotische pSG5-Vektor dient zur *in vivo*- sowie *in vitro*-Expression von Proteinen und zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus, die große Mengen an doppelsträngiger DNA liefert. Der SV40 Promotor des Vektors erleichtert die *in vivo*-Expression, während der T7-Promotor die *in vitro*-Transkription des klonierten Inserts vereinfacht. Die Ligation von Produkten erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS), die Erkennungssequenzen von *EcoRI*, *BamHI* und *BglII* enthält. Für die Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen besitzt der 4,1kb große Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

4.5.6 pHCMV-pA-Vektor

Dieser 4,6kb große Vektor verfügt über einen expressionsstarken CMV-Promotor sowie über Schnittstellen für *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *ScaI*, *Sall*, *XbaI*, *SacI*, *SacII*, *BglII*, *NdeI*, *SmaI* sowie *PstI*. Er dient zur *in vivo*-Expression im eukaryotischen System. Als Selektionsmarker besitzt pHCMV-pA eine Ampicillin-Resistenz.

4.6 Oligonukleotide

Für die Herstellung von PCR-Produkten und anschließende Klonierungen wurden die in Tab. 4.1 aufgeführten Primer der Firmen Operon und Invitrogen verwendet. Für die Oligonukleotide sind jeweils Bezeichnung, Orientierung und Sequenz angegeben. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind in Kleinbuchstaben geschrieben.

Nr.	Primer-Name	Primer-Sequenz
1.	MSRVpEGSPBamFor	5' – GCG CCC gga tcc CCA TGG CCC TCC CTT ATC – 3'
2.	MSRV477Rev	5' – GGG AAA gga tcc TAG GTA CGG AGG TAC GGA GGG TTT C – 3'
3.	MSRV477For	5' – GGG AAA gga ttc cGT ACC CAT ACT CGC C – 3'
4.	HERV-W-TM-RP	5' – GCG CGC gga tcc TAT TTG TTG CGG GGC TTA G – 3'
5.	W-gag-Klon-fwd	5' – ATG GGA AAC ATT CCC C – 3'
6.	W-gag-Klon-rev	5' – CTA AGG CAG ACT TTT GAA G – 3'
7.	W-gag-Klon-f-BamHI-1	5' – AAA GGG gg atc cGG ATG GGA AAC ATT CCC C – 3'
8.	W-gag-Klon-rev-BamHI-1	5' – ATG Ggg atc cCT AAG GCA GAC TTT TGA AG – 3'
9.	HERV-W3-gen-up	5' – ATT GTT CCC ACA CGG CTA AG – 3'
10.	HIV-gag-for	5' – AGA GGA Ggg atc cGT ATG GGT GCG AGA GCG – 3'
11.	HIV-gag-rev	5' – GGA GGA gga tcc TTA TTG TGA CGA GGG GTC – 3'

Tab 4.1 Für die Herstellung von PCR-Produkten und anschließende Klonierungen benutzte Oligonukleotide.

4.7 Enzyme und dNTPs

Alkalische Phosphatase	Boehringer
dNTPs	Boehringer
Taq-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs

4.8 Chemikalien und andere Materialien

4.8.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen in reinster Form bezogen:

Sigma & Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Biozym (Rockland, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt)

4.8.2 Photochemikalien

Röntgen-Entwicklerkonzentrat	ADEFO Chemie GmbH (Dietzenbach)
Röntgen-Fixiererkonzentrat	ADEFO Chemie GmbH (Dietzenbach)
ECL Hyperfilm	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)

4.8.3 Radiochemikalien

³⁵ S-translabelled Methionin / Cystein	MP Biomedicals (Heidelberg)
---	-----------------------------

4.8.4 Kits

ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)

Nucleospin Extract II, Macherey & Nagel (Düren)

Nucleobond Plasmidextraktion, Macherey & Nagel (Düren)

T7-TNT Reticulocyte-coupled *in vitro* Transcription and Translation System, Promega (Mannheim)

4.8.5 Papiere und Membranen

Whatman Limited Filterpapiere (Springfield, Maidstone, Kentucky, USA)

Immobilon Nylon-Protein-Transfermembran, Millipore Corporation (Billerica, Massachusetts, USA)

4.8.6 Zellkulturmedien

DMEM high Glucose (4,5g/l), PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

RPMI 1640, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Fetales Kälberserum (FKS), GIBCO / Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)

4.8.7 Nährmedium für Bakterien

LB Broth, Miller, Difco, Becton & Dickinson (Detroit, Michigan, USA)

LB Agar, Miller, Difco, Becton & Dickinson (Detroit, Michigan, USA)

4.9 Konstrukte

Folgende Vektorkonstrukte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert. Durch Polymerasekettenreaktion (PCR), die Verwendung entsprechender Primer (Kap. 4.6) und Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren kloniert.

Vektorkonstrukt	Verwendete Primer (in Bezug auf Tab. 4.1)
a) pGEM-HERV-W-SU1	1, 2
b) pGBKT7-HERV-W-SU1	1, 2
c) pGEM-HERV-W-SU2	3, 4
d) pGBKT7-HERV-W-SU2	3, 4
e) pGEM-HERV-W- <i>gag</i>	5, 7, 6, 8, 9
f) pGBKT7-HERV-W- <i>gag</i>	5, 7, 6, 8, 9
g) pGEM-HIV- <i>gag</i>	10, 11
h) pGBKT7-HIV- <i>gag</i>	10, 11
i) pSG5-HERV-W-SU	
j) pSG5-HERV-W- <i>env</i>	
k) pSG5-HERV-W- <i>env</i> (invers)	
l) pHCMV-HERV-W-SU	
m) pHCMV-HERV-W- <i>env</i>	

Tab 4.2 Für diese Arbeit verwendete klonierte Vektorkonstrukte. Die aufgeführten Primer-Nummern beziehen sich auf Tab. 4.1 in Kapitel 4.6. Die unter i) bis m) aufgeführten Konstrukte entstanden durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen von unter a) bis h) genannten Konstrukten und anschließender Insertion dieser Sequenzen in die entsprechenden Vektoren.

4.10 Zelllinien

4.10.1 Adhärenente Zellen

Hela: Zelllinie, die aus einem Cervixcarcinom einer 31jährigen Frau kultiviert wurde (Scherer, 1953).

- Cos1:** "African Green Monkey Cells", von Nierenzellen abgeleitete, fibroblastenähnliche Zelllinie (Gluzman, 1981).
- Gos3:** Astro-Oligodendrogliom-Zelllinie eines 55jährigen Mannes (Halfter et al., 1998).
- 293-T:** Humane Epithelzelllinie aus Nierenepithel, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (DuBridge et al., 1987).
- LN405:** Glioblastom-Zellen aus einem Astrozytom-Tumor (Grad IV) einer 62jährigen Patientin (Bodmer et al. 1989).
- HCAT:** Zelllinie aus spontan immortalisierten Keratinozyten der Haut eines erwachsenen Menschen (Boukamp et al., 1988).

Humane primäre Fibroblasten aus der Diagnostik des Virologischen Instituts der Universität des Saarlandes.

4.10.2 Suspensionszellen

- Jurkat:** T-Zelllinie aus dem Blut eines 14jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie, entnommen nach dem Auftreten des ersten Rezidivs im Jahre 1976 (Schneider et al., 1977).
- A 3.01:** Humane CD4-positive T-Zelllinie (Folks et al., 1985).
- BLCL:** B-lymphoblastoide Zelllinie, hergestellt aus PBMCs ("peripheral blood mononuclear cells") eines Spenders, die durch Transformation mit EBV-B95-8 immortalisiert wurden.

4.10.3 Weitere Zellen

- PBMC:** Mononukleäre Zellen, gewonnen aus peripher-venösem Blut verschiedener Spender des Virologischen Instituts.

4.11 Computersoftware

Die PC-Software Microsoft Office 2003 mit den Programmen Microsoft Word und Microsoft Powerpoint wurde als Grundlage für die vorliegende Arbeit verwendet. Zur Bildbearbeitung dienten die Programme Adobe Photoshop CS2 sowie ImageJ.

Die Analyse von DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe folgender Websites durchgeführt:
<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>

<http://insilico.ehu.es>

<http://www.bioservers.org/bioinformatics/modules>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Proteinsequenzanalysen wurden mit Hilfe von UniProtKB / Swiss-Prot durchgeführt (<http://www.expasy.org/sprot>).

Zur Literaturrecherche im Internet wurden die Datenbanken von MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) und SCOPUS (<http://www.scopus.com>) sowie die Suchmaschine Google Scholar (<http://scholar.google.de>) verwendet.

5. Methoden

5.1 Bakterienkultur

5.1.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien (Lederberg und Cohen, 1974; Hanahan, 1983)

Transformationskompetent gemachte und bei -70°C gelagerte Bakterien des *E. coli*-Stammes pMOS (Suspension in SOB-Medium) werden ca. eine halbe Stunde auf Eis aufgetaut. $1\mu\text{g}$ Plasmid-DNA wird zu $50\mu\text{l}$ der aufgetauten Bakteriensuspension gegeben. Es folgt eine 20minütige Inkubation auf Eis. Zur Permeabilisierung der Zellmembran und um das Aufnehmen der Plasmid-DNA durch die Bakterien zu ermöglichen wird nun ein zweiminütiger Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C durchgeführt. Anschließend wird die Bakteriensuspension mit DNA-Plasmid nochmals kurz auf Eis gestellt, um ein Schließen der Poren der pMOS-Bakterien zu ermöglichen. Es folgt eine einstündige Vorkultur. Dazu werden zur Bakteriensuspension $200\mu\text{l}$ LB-Medium gegeben und anschließend wird die Suspension bei 37°C auf eine Schüttelplatte gestellt. Die Vorkultur soll ein erstes Wachstum der transformierten Bakterien im antibiotikafreien Medium ermöglichen. Nach der Vorkultur kann die pMOS-Suspension nun auf LB-Agar-Platten ausplattiert werden, die mit Antibiotikum – Ampicillin ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ LB-Agar) oder Kanamycin ($3\mu\text{g}/\text{ml}$ LB-Agar) – vorbehandelt wurden oder in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin: Endkonzentration $0,1\%$ [w/v]; Kanamycin: Endkonzentration $0,01\%$ [w/v]) gegeben werden. Die ausplattierten Agarplatten oder das die transformierten Bakterien enthaltende LB-Medium werden nun für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert (Schüttler), um ein rasches Wachstum zu ermöglichen.

Zur Stammhaltung der transformierten Bakterien werden $800\mu\text{l}$ der gewachsenen Kultur zu $200\mu\text{l}$ DMSO gegeben und bei -70°C eingefroren.

5.2 DNA-Techniken

5.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die im Jahre 1983 von Mullis entwickelte und durch Saiki erstmals beschriebene Polymerasekettenreaktion ist heute eine etablierte Technik, um gezielt DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al., 1988). In jedem der bis zu 45 Zyklen laufen drei charakteristische Schritte ab: die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs,

das Annealing (Aneinanderlagern) der Primer und die Elongation des DNA-Komplementärstrangs durch Desoxyribonukleotide.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs der Ausgangs-DNA (Template-DNA) in Einzelstränge. Dies geschieht bei einer Temperatur von über 90°C. Der Schritt des Annealings beschreibt das Anlagern der sequenzspezifischen Primer an das DNA-Template. Dieser Schritt geschieht bei Temperaturen von ca. 50°C. Im dritten Schritt, der Elongation, findet die Synthese des komplementären DNA-Strangs durch hitzestabile Taq-Polymerase statt, deren maximale Enzymaktivität im Bereich von 68°C bis 73°C liegt. Im Idealfall wird so die DNA-Menge nach jedem Zyklus verdoppelt, so dass eine exponentielle DNA-Amplifikation stattfindet. Für diese Arbeit wurden PCR-Ansätze zu 50µl verwendet: Pro Ansatz werden 1µg DNA-Template, 0,3U Taq-Polymerase, 5µl Taq-Puffer, 1µl Forward-Primer (zu einer Konzentration von 25µM), 1µl Reverse-Primer (zu einer Konzentration von 25µM), und dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate, Konzentration 0,2mM) zu Aqua dest. ad 50µl pipettiert.

Für die Klonierung von pGBKT7-HERV-W *gag* (siehe Kap. 4.2.1) wurde das Prinzip der Nested-PCR angewandt (Chelly et al., 1989). Nach Durchführung einer ersten PCR, wie oben beschrieben, wird das Produkt aus dieser PCR als DNA-Template für eine darauffolgende PCR mit anderen Primern verwendet. Die Sequenzen des zweiten Primerpaars liegen dabei zwischen denen des ersten Primerpaars. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch Hybridisierungsfehler falsch amplifizierte Produkte ausselektiert werden. Durch Nested-PCRs können bereits sehr geringe Template-Mengen amplifiziert werden.

Alle PCRs für diese Arbeit wurden mit dem Gerät "Peltier Thermal Cycler PTC 200" der Fa. MJ Research durchgeführt. Als Programme wurden "KR_58-35" und "JM3min" verwendet.

"KR_58-35": Programm mit 35 Zyklen

1. 95°C für 3 Minuten
2. 95°C für 50 Sekunden (Denaturierung)
3. 58°C für 50 Sekunden (Annealing)
4. 72°C für 1 Minute (Elongation)
5. 34malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 72°C für 10 Minuten
7. Abkühlen auf 4°C

"JM3min" Programm mit 30 Zyklen

1. 94°C für 3 Minuten
2. 94°C für 50 Sekunden (Denaturierung)
3. 60°C für 50 Sekunden (Annealing)
4. 72°C für 90 Sekunden (Elongation)
5. 29malige Wiederholung der Schritte 2. bis 4.
6. 72°C für 10 Minuten
7. Abkühlen auf 4°C

5.2.2 Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der Eigenschaft ihrer Nukleotide als Polyanionen lassen sich DNA-Fragmente im elektrischen Gleichspannungsfeld über Agarosegele nach ihrer Molekülgröße und Ladung auftrennen. Dabei ist die Konzentration des zu verwendenden Agarosegels nach der DNA-Molekülgröße zu wählen. In dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente zwischen 0,2 und 1,5kb verwendet, so dass sich eine Gelkonzentration von 1,5% bzw. 3,0% (1,5g bzw. 3,0g Agarose-Pulver auf 100ml 1x-TAE-Puffer) ergab.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde zur entsprechenden Menge Agarose-Pulver 1x-TAE-Puffer gegeben und diese Flüssigkeit in der Mikrowelle so lange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war und die Lösung klar erschien. Nach leichtem Abkühlen konnte der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5µg pro ml Agarose-Lösung) hinzugegeben werden. Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelstränge und ist notwendig, um die DNA-Banden bei späterer Betrachtung des Gels unter UV-Licht (Wellenlänge $\lambda = 254\text{nm}$) sichtbar zu machen. Das Gel wurde nun in einen vorbereiteten Rahmen mit Kämmen, welche für die Taschen benötigt wurden, gegossen. Nach ca. zwanzig Minuten bei Raumtemperatur war das Gel vollständig polymerisiert und konnte nun verwendet werden.

Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 20% Blaumarker versetzt, um die Laufstrecke zu verfolgen und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Tasche DNA-Molekulargewichtsmarker ("1kb plus DNA Ladder" bzw. "1kb DNA Ladder") gegeben, um die Größe der jeweiligen DNA-Banden beurteilen zu können. Nach dem Pipettieren wurde das Gel in eine Gelkammer mit 1x-TAE-Puffer gegeben. Bei Gleichspannungswerten bis maximal 120V wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Ladung und Molekülgröße im elektrischen Feld

getrennt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese konnte durch Fotografieren des Gels unter UV-Licht ($\lambda = 254\text{nm}$) festgehalten werden.

5.2.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das oben beschriebene Prinzip der Trennung von DNA-Fragmenten aufgrund von Ladung und Molekülgröße kann genutzt werden, um bestimmte Fragmente für Klonierungen aus dem Agarosegel zu isolieren. Um Schäden der DNA zu vermeiden, wurde das Agarosegel nach dem Gellauf im Gleichspannungsfeld unter lang-welligem UV-Licht ($\lambda = 366\text{nm}$) betrachtet und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die isolierte DNA wurde mit Hilfe des Nucleospin-Extract-II-Kits der Fa. Macherey & Nagel nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie aufgearbeitet. Das DNA-Fragment wurde in dem dem Kit beiliegenden NT-Puffer im Wasserbad für 10-15min bei 50°C aus dem Agarosegel gelöst und die DNA anschließend auf die Ionenaustauschsäule pipettiert. Durch Zentrifugation konnten die negativ geladenen DNA-Nukleotide an die positiv geladene Säule gebunden werden. In einem abschließenden Waschschrift erfolgte die Eluation der DNA mit TE-Puffer.

5.2.4 Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für den "Verdau" von DNA-Fragmenten für Klonierungen werden Restriktionsendonukleasen benutzt. Diese Enzyme erkennen mit hoher Spezifität bestimmte DNA-Sequenzen und schneiden diese durch die Spaltung der Phosphodiesterbindung.

Für einen Restriktionsverdau wurden in dieser Arbeit zu analytischen Zwecken Ansätze mit $1\mu\text{g}$ DNA, für präparative Zwecke Ansätze mit bis zu $10\mu\text{g}$ DNA gewählt. Für die Verdauansätze ($20\text{-}100\mu\text{l}$) wurden Enzymmengen eingesetzt, die einer Enzymaktivität zwischen zwei und fünf International Units (Enzymmenge, die in einer Minute $1\mu\text{mol}$ Substrat bei 37°C umsetzt) entsprechen. Des Weiteren wurde den Restriktionsverdauansätzen – je nach Angabe des Herstellers – zwei bis zehn μl Restriktionspuffer sowie evtl. bovines Serumalbumin (BSA) hinzugegeben. Je nach Enzym und Zweck erfolgte die Inkubation der Ansätze zwischen einer und 16 Stunden bei 37°C (bzw. 25°C).

5.2.5 Dephosphorylierung von Vektoren (Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980)

Vektoren, welche durch Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, besitzen noch Phosphatreste an ihrem 5'-Ende. Um ein Re-Ligieren des Vektors zu verhindern, das den Einbau eines DNA-Inserts unmöglich machen würde, folgt dem Verdau des Vektors mit dem Restriktionsenzym das Entfernen des Phosphatrests am 5'-Ende durch alkalische Phosphatase ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" = CIP, Fa. Boehringer, Ingelheim). Nach dem "CIP-Verdau" kann der DNA-Vektor nur wieder re-ligieren, wenn er ein DNA-Insert enthält, das an seinen Enden noch Phosphatreste besitzt. Die Ligation von Vektor und DNA-Insert wird durch Ligasen katalysiert.

Zur Kontrolle des erfolgreichen "CIP-Verdaus" wurden pMOS-Bakterien sowohl mit nicht-dephosphoryliertem als auch dephosphoryliertem Vektor transformiert (nach Anleitung in Kap. 5.1.1) und nach einstündiger Vorkultur auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Nach 12- bis 16stündiger Inkubation bei 37°C konnte auf den Platten mit den pMOS-Bakterien, die den nicht-"gecippten" Vektor enthielten, viele Bakterienkolonien beobachtet werden. Auf den Platten mit den pMOS-Bakterien, die dephosphorylierten Vektor enthielten, wuchsen hingegen nur vereinzelt Kolonien.

5.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten (Sgaramella et al., 1970; Dugaiczky et al., 1975)

Der Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren wird durch Ligasen katalysiert. Für Ligationen wurden äquimolare Mengen des entsprechenden DNA-Fragments und des gewünschten Vektors, der zuvor durch Restriktionsenzyme und alkalische Phosphatase verdaut wurde, verwendet.

Zu den Ligationsansätzen wurden T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Ligasepuffer (beides New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers gegeben. Nach ca. 16-24 Stunden Inkubation (idealerweise bei 14°C) konnten die Ligationsansätze in pMOS-Bakterien transformiert werden.

5.2.7 Analytische Plasmidaufarbeitung (Holmes und Quigley, 1981)

Nach Transformation, Ausplattieren auf LB-Agar-Platten und Inkubation bei 37°C für 12-16 Stunden dient der Schritt der Minipräparation zur Selektion von Klonen,

welche das gewünschte Insert enthalten. Geringe Mengen an Plasmid-DNA werden hierzu aufgereinigt und durch Restriktionsverdau analysiert.

Von den auf den Agar-Platten gewachsenen Bakterienkolonien wurden einige der Kolonien – z.B. mit einer Pipettenspitze – aufgenommen und in je 1,5ml LB-Medium (mit Antibiotikum, welches dem Resistenzgen des Vektors entspricht) gegeben. Es folgte die Inkubation dieser Suspension auf einer Schüttelplatte bei 37°C für wiederum 12-16 Stunden.

Die Minipräparation begann mit der Zentrifugation der 1,5ml Bakteriensuspension für fünf Minuten bei 5000rpm (Sigma 202MK). Anschließend wurde das entstandene Pellet mit 200µl STET-Puffer (mit Lysozym 1µl/ml) resuspendiert. Es folgten das Kochen der Suspension für 30 Sekunden und die sofortige Abkühlung auf Eis. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12000rpm für 15 Minuten bei 4°C (Sigma 202MK) wurde das entstandene Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 200µl reinem Isopropanol erfolgte eine Zentrifugation bei 12000rpm für 15 Minuten bei 4°C (Sigma 202MK). Anschließend wurden 200µl Ethanol (70%) auf das Pellet gegeben und die Zentrifugation wurde erneut wiederholt. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde das entstandene Sediment getrocknet und abschließend in 40µl TE-RNase-Puffer gelöst.

Die isolierte Minipräparations-DNA konnte nun mit den entsprechenden Restriktionsenzymen analysiert werden.

5.2.8 Präparative Plasmidaufarbeitung

Der Schritt der "Maxipräparation" erlaubt die Aufbereitung von amplifizierten Klonen, die durch Minipräparation und anschließenden Restriktionsverdau selektiert wurden. Die Reste der Bakteriensuspension, die den richtigen Klon enthielten, wurden dazu in 100ml LB-Medium (mit Antibiotikum, das dem Resistenzgen des Vektors entspricht) gegeben. Die Bakteriensuspension wurde danach bei 12-16 Stunden bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Zur anschließenden Aufbereitung der Bakteriensuspension diente der Plasmid-Isolations-Kit "Nucleobond" (Fa. Macherey & Nagel). Nach Angaben des Herstellers wurde die DNA an eine Ionenaustauschersäule gebunden, mit Puffer gewaschen, eluiert und schließlich mit Isopropanol (100%) gefällt. Nach einem abschließenden Waschschrift mit Ethanol (-20°C, 70%) erfolgte die Lösung des Sediments mit Aqua dest., so dass sich nach photometrischer Kontrolle eine DNA-Konzentration von 1µg/µl einstellte.

5.2.9 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Proben

Die Konzentration von Nucleinsäuren und Proteinen wurde durch Absorptionsspektroskopie gemessen. Zur Analyse von DNA-Proben wurde eine Verdünnung von 1:100 (in Aqua dest.) gewählt. DNA weist in wässrigen Lösungen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm auf, Protein bei 280nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes erfolgte die Umrechnung der Extinktion in die Konzentration von Nucleinsäuren. Des Weiteren konnte über die photometrische Messung eine Reinheitsbestimmung der Proben durchgeführt werden. Der Quotient (Ratio) der optischen Dichten (OD) bei 260nm und 280nm der Proben sollte zwischen den Werten 1,65 und 1,85 liegen. Höhere Werte weisen auf RNA-Verunreinigungen, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigungen hin.

5.2.10 DNA-Sequenz-Analysen

Die Analyse von DNA-Sequenzen wurde durch die Fa. GATC Biotech in Konstanz durchgeführt. Die entsprechenden Proben lagen dazu in einer DNA-Konzentration von 0,1µg/µl vor.

5.3 Proteintechniken

5.3.1 Extraktion von Proteinen aus Zellen für SDS-PAGE

Für die Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen wurden diese bei 1200rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert (adhärente Zellen wurden zuvor mit einem Zellschaber (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) vom Boden der Zellkulturflasche abgenommen). Es folgten ein Waschschrift mit PBS und ein weiterer Zentrifugationsschrift. Nach Abkippen des Überstandes wurde auf das Pellet Samplebuffer gegeben. Nach einer anschließenden Behandlung mit Ultraschall, fünfminütigem Kochen der Probe und einem weiteren Zentrifugationsschrift bei 6000rpm für 5min bei 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R), wurde der Proteinüberstand entnommen und die Konzentration durch Absorptionsspektroskopie bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen.

5.3.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Proben

Für die Konzentrationsbestimmung von Protein-Proben wurde eine Verdünnung von 1:50 (in Natronlauge der Konzentration 0,1M) gewählt und die photometrische Extinktion bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt. Die Protein-Konzentration

der gemessenen Proben kann nach der empirischen Formel $15\mu\text{g} = 6,4 / \text{OD}$ näherungsweise berechnet werden.

5.3.3 Techniken zum Nachweis von Proteinen

5.3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970)

Proteine können aufgrund der Molekülgröße im elektrischen Gleichspannungsfeld voneinander getrennt werden. Das dem Polyacrylamidgel zugesetzte anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) maskiert die Eigenladung der Proteine. Dieses Detergens denaturiert die Proteine, indem es alle nicht-kovalenten Bindungen im Protein zerstört. SDS lagert sich an die Aminosäurereste an – das Protein bekommt durch die vielen negativ geladenen SDS-Moleküle eine stark negative Oberfläche. Die eigentliche Ladung des Proteins wird somit vernachlässigbar klein. Die negative Oberflächenladung der denaturierten Proteine ist nun direkt proportional, die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld indirekt proportional zu seinem Molekulargewicht. Die Trenngenaugigkeit ist von der Porengröße des Polyacrylamidgels abhängig, welche durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid (beide Fa. Roth, Karlsruhe) bestimmt wird.

Für diese Arbeit wurden Polyacrylamidgele der Konzentration 7,5% bis 15% verwendet. Die Polymerisation der Gele wurde durch das Hinzufügen von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert.

Um eine bestmögliche Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrem Molekulargewicht, zu erreichen, wurde nach dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE gearbeitet: die Proteine wurden zunächst in einem großporigen Sammelgel konzentriert und anschließend in einem engmaschigen Trenngel aufgrund ihrer Masse getrennt. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von Laufpuffer (RB) bei einer Gleichstromstärke von 25mA. Zur Bestimmung der relativen Proteinmasse dienten Markerproteine bekannter Molekülmasse zum Vergleich.

5.3.3.2 Westernblot (Immunoblot) (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Um die durch SDS-PAGE getrennten Proteine mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren, wurden die Proteine durch die Technik des Westernblots elektrophoretisch auf Polyvinylidenfluorid-Transfer-Membran (Immobilion-P, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) übertragen. Der Transfer wurde bei

Spannungswerten von 10V für 12 bis 16 Stunden (alternativ 30V für zwei Stunden) durchgeführt. Zuvor wurde die Immobilon-Membran für ca. 15 Minuten in Methanol (100%) getränkt und anschließend in Aqua dest. und Transferpuffer äquilibriert. Der Protein-Transfer erfolgte im Gleichspannungsfeld in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Kammer. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde das Polyacrylamidgel verworfen, die Membran luftgetrocknet und unter Licht betrachtet. Gelspuren, welche die Markerproteine enthielten, wurden von der Membran abgetrennt und mit Amidoschwarz-Lösung angefärbt. Nach dem Entfärben mit Entfärbelösung wurden die Markerproteine sichtbar. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die restliche Immobilon-Membran für 30 Minuten in Magermilch-Lösung (5% Magermilchpulver, Fa. Roth, Karlsruhe) gegeben. Anschließend wurde der spezifische Erstantikörper (in Magermilch-Lösung), der gegen die zu detektierenden Proteine gerichtet war, auf die Immobilon-Membran gegeben und für mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach dem Entfernen des Erstantikörpers erfolgte das Waschen der Membran mit PBS-Lösung für 30 bis 60 Minuten. Nun konnte die Folie mit einem peroxidasemarkierten Zweitantikörper (in Magermilch-Lösung) für eine weitere Stunde inkubiert werden. Nach einem erneuten 30- bis 60minütigen Waschschrift erfolgte der Nachweis der Proteine mit Hilfe des ECL-Detektions-Kits und eines Röntgenfilms (beides Fa. Amersham, Buckinghamshire, UK). Bei der zugrunde liegenden enzymkatalysierten Lichtreaktion wird Luminol, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, durch das an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase-Enzym freigesetzt. Die dabei entstehende Strahlung schwärzt einen aufgelegten Röntgenfilm, der nach dem Entwickeln und Fixieren ausgewertet werden kann.

5.3.3.3 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Die Visualisierung von Proteinen, welche durch SDS-PAGE getrennt wurden, kann mit dieser Methode erfolgen.

Dazu wurde das Polyacrylamidgel zum Färben für eine Stunde im Wasserbad (50°C) in Coomassie-Blue-Lösung gelegt und danach mit Entfärbelösung behandelt. Es erfolgte anschließend die Übertragung des Gels auf Filterpapier und die Trocknung auf einem Vakuum-Geltrockner für zwei Stunden bei 80°C.

5.3.3.4 Immunpräzipitation (IP) und Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation dienen zum sensiblen Nachweis spezifischer Proteine (IP) sowie Protein-Protein-Interaktionen (Co-IP). Hierzu wird Protein über Antikörperbindung an Protein-G-Sepharose Fast Flow (Sigma, Deisenhofen) präzipitiert. Die präzipitierten Proteine können über SDS-PAGE getrennt und mittels Westernblot detektiert werden. Bei der Immunpräzipitation erfolgt der Nachweis des Proteins durch Verwendung eines Erstantikörpers, der gegen das präzipitierte Antigen gerichtet ist, bei der Co-Immunpräzipitation wird die Immobilon-Membran mit demjenigen Erstantikörper inkubiert, der gegen den interagierenden Partner des präzipitierten Proteins gerichtet ist.

Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS in Antibody-Puffer (AB-Puffer) aufgenommen, gevortext und ca. 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 3000rpm für 10 Minuten bei 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R). Anschließend wurden 500µl des Überstands zu 25µl des Immuserums bzw. 25µl des zugehörigen Prä-Immuserums gegeben und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Zu jeder Probe wurden anschließend 30µl Protein-G-Sepharose Fast Flow mit PBS (im Verhältnis 1:1) gegeben und die Probe für weitere zwei Stunden auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Probe mit AB-Puffer (Zentrifugation bei 5000rpm, Heraeus Megafuge 1.0R) und dem Abnehmen des Überstandes wurde die Probe in 30µl Samplebuffer aufgenommen, für fünf Minuten gekocht und nach abschließendem einminütigem Zentrifugieren bei 5000rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im elektrischen Feld (bei 25mA Gleichstrom) erfolgte das Blotting der Proteine für 12-16 Stunden (siehe Kap. 5.3.3.2) mit anschließender Detektion der Proteine durch die entsprechenden Erst- und Zweitantikörper. Nach dem Schwärzen eines Röntgenfilms mit Hilfe des ECL-Detektions-Kits konnte das Resultat der IP bzw. Co-IP analysiert werden.

5.3.3.5 *In vivo*-Nachweis von Proteinen durch Fluoreszenztechniken

Die Technik der (Immun)-Fluoreszenz wurde zum Nachweis der Kolokalisation von zellulären Proteinen *in vivo* verwendet.

Zum Fluoreszenznachweis von Proteinen wurde die entsprechende Plasmid-DNA in Vektoren kloniert, die für fluoreszierende Proteine kodieren, und in Hela-Zellen

transfiziert. Für diese Arbeit wurde der Vektor pEGFP-C1 der Fa. Clontech verwendet, der für ein grün-fluoreszierendes Protein kodiert.

Für den *in vivo*-Nachweis von Proteinen wurde die Technik der Immunfluoreszenz eingesetzt. Dafür wurde das Konstrukt (als Vektor diente pHCMV-pA) in Hela-Zellen transfiziert. Nach Expression der entsprechenden Proteine erfolgte nach 24 Stunden die Fixierung der Zellen mit 4% PFA-Lösung (Paraformaldehyd-Lösung) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellmembranen durch 0,2% Triton-X-100-PBS-Lösung permeabilisiert. Das HERV-W SU Protein konnte nun mit einem spezifischen Erstantikörper (in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in PBS) sowie einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper (hier Alexa Fluor 568 Tritc Anti-Maus-IgG Antikörper, Ziege, Invitrogen, Karlsruhe) detektiert werden. Die Zellkerne der transfizierten Zellen wurden außerdem mit dem Farbstoff DAPI, der im Fixierungsreagenz Vectashield (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vectorlabs, Burlingame, Kalifornien, USA) enthalten ist, angefärbt.

Die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteine wurden danach mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop des Virologischen Institutes (Axioskop 40, Carl Zeiss AG, Jena) betrachtet. Durch Anregung mit Licht verschiedener Wellenlänge konnten die mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Proteine zunächst separat und anschließend gemeinsam visualisiert werden. Die digitale Übertragung der Bilder auf den PC erfolgte mit Hilfe der Software Axiovision (Carl Zeiss AG, Jena), die weitere Bildbearbeitung mit den Programmen ImageJ sowie Adobe Photoshop CS2.

5.3.3.6 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Nachdem die Expression des EGFP-Bec1-Fusionsproteins und HERV-W SU mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie betrachtet wurde, erfolgte zusätzlich die Auswertung der Objektträger mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Institut für Zellbiologie, AG Lipp, Homburg). Durch die große Tiefenauflösung dieser Technik ist die genaue Analyse einzelner Ebenen des betrachteten Objekts entlang der optischen Achse möglich. Diese Technik erlaubt daher – im Vergleich zur konventionellen Technik – eine detailliertere Betrachtung der Zellkompartimente.

5.3.4 GST-Pulldown-Assay

Diese Methode dient zum *in vitro*-Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die interagierenden Proteine werden dabei in unterschiedlichen Systemen exprimiert, die im Folgenden beschrieben werden.

5.3.4.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Eines der interagierenden Proteine wurde bakteriell mit Hilfe des *E. coli* Stammes BL21-DE3 als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-Fusionsprotein) exprimiert und anschließend an Glutathionsepharose nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gebunden.

Hierfür wurde die für das entsprechende Protein kodierende DNA in pGEX-Vektor kloniert und BL21-DE3-Bakterien damit transformiert. Es erfolgte die Vermehrung der Bakterien für 12-16 Stunden in LB-Medium mit Antibiotikum auf einer Schüttelplatte bei 37°C. Am nächsten Tag wurden 2ml der Bakterienkultur zu 100ml LB-Amp-Medium gegeben und eine photometrische Kontrolle der optischen Dichte durchgeführt. Nach Erreichen einer OD (600nm) von 0,5-0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Schütteln der Bakteriensuspension bei 37°C für weitere vier Stunden und erneuter Kontrolle der optischen Dichte wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und das Pellet in Lysispuffer aufgenommen. Nach Ultraschallbehandlung, fünfminütigem Kochen und erneuter Zentrifugation (12000rpm bei 4°C für 60 Minuten, Sigma 202MK) konnte der Überstand als Lysispufferextrakt abgenommen, à 500µl aliquotiert und bei -70°C eingefroren werden. Vor der Zugabe von IPTG und vier Stunden danach wurde zur Kontrolle der Induktion jeweils Bakteriensuspension abgenommen und als Samplebuffer-Extrakt aufbereitet.

Für die Durchführung des Pulldown-Assays wurden die gewonnenen Lysispufferextrakte zu 250µl mit je 80µl gewaschener Glutathionsepharose (1:1 in PBS) für vier Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach dieser Zeit, in der die Kopplung des Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins an die Glutathionsepharose stattfand, wurde der Ansatz fünfmal mit Kopplungspuffer (low salt) durch Zentrifugation bei 5000rpm (Sigma 202MK) für jeweils eine Minute gewaschen.

5.3.4.2 Proteinsynthese durch *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation

Für die Durchführung von GST-Pulldowns wurden mit Hilfe des "*in vitro*-Transkriptions-Translations-Kits" der Fa. Promega ^{35}S radioaktiv-markierte Proteine als Interaktionspartner synthetisiert. Dazu wurde nach Angaben des Herstellers Lysat von Kaninchen-Retikulozyten verwendet und zusätzlich ein Methionin- und Cystein-freier Aminosäure-Mix des Herstellers eingesetzt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein. Als Template-DNA wurden Plasmid-DNA-Konstrukte verwendet, die im Vektor pGBKT7 kloniert waren. Der Ansatz wurde zur Proteinexpression für 90 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zur Kontrolle der *in vitro*-Transkription und -Translation wurden je 1,5µl der Proben in Samplebuffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

5.3.4.3 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion durch Autoradiographie

Nach bakterieller Expression des GST-Fusionsproteins und *in vitro*-Translation wurden je 15µl des *in vitro*-Translationsansatzes zu einem GST-Fusionsproteinansatz gegeben und bei 4°C für 12-16 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend folgte das sechsmalige Waschen des Ansatzes mit je 500µl Kopplungspuffer (high salt) durch Zentrifugation bei 5000rpm für je eine Minute. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 20µl Samplebuffer aufgenommen und anschließend für zehn Minuten gekocht. Nach erneuter Zentrifugation (5000rpm für eine Minute) konnte das Protein aus dem Überstand abpipettiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

Nach einem Gellauf von zwei Stunden bei 33mA Gleichstrom wurde das SDS-Gel für dreißig Minuten mit SDS-Gel-Fixierlösung behandelt. Es folgten drei 15minütige Waschschrte mit Aqua dest. und die einstündige Inkubation des Gels mit Natrium-Salicylat-Lösung. Diese Reaktion erhöht die Strahlungsintensität von ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein. Die anschließende Trocknung des Gels wurde auf einem Vakuum-Geltrockner für zwei Stunden bei 80°C durchgeführt. Zum Nachweis der radioaktiv-markierten Proteine wurde ein Röntgenfilm (Amersham, Buckinghamshire, UK) auf das SDS-Gel gelegt und abhängig von der "Intensität" der radioaktiven Strahlung für mehrere Stunden bis einige Tage bei -70°C belichtet. Abschließend erfolgte das Entwickeln und Fixieren des geschwärzten Röntgenfilms in der Dunkelkammer.

5.4 Zellkulturtechniken

5.4.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 Medium gehalten, das zuvor mit fetalem Kälberserum (10%) und den Antibiotika Penicillin G (40U/ml) und Streptomycinsulfat (50µg/µl) versetzt wurde. Die Zellen wurden in 75cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank gelagert und bei einer Dichte von 5·10⁶ bis 6·10⁶ Zellen subkultiviert.

5.4.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die in dieser Arbeit kultivierten Adhäsionszellen wurden in Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium (DMEM) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach dem Waschen mit steriler PBS-Lösung (alternativ Trypsin-EDTA) durch Hinzugabe von Trypsin-EDTA, Inkubation im Brutschrank bei 37°C für ca. fünf bis zehn Minuten und anschließendem Klopfen gegen die Wand der Mediumflasche vom Boden abgelöst. Anschließend erfolgte die Aufnahme in DMEM, welches zusätzlich mit den Antibiotika Penicillin G (40U/ml) und Streptomycinsulfat (50µg/µl) sowie fetalem Kälberserum (10%) versetzt wurde, sowie die Subkultivierung.

5.4.3 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zählers

Für die Durchführung von Transfektionen wurde eine definierte Zellzahl eingesetzt, die mit Hilfe des Zellzählgeräts CASY TT der Fa. Innovatis, Reutlingen erfolgte. Dazu wurden 10µl der Zellsuspension in einer 1:1000 Verdünnung in Casyton (Elektrolytlösung des Herstellers) aufgenommen. Bei Durchtritt der Zellen durch die Messzelle ändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße. Die gemessenen Zellen wirken im leitenden Medium als Isolator, was den Rückschluss auf Zelldichte und Größenverteilung erlaubt.

5.4.4 Transfektion von Zellen

Transfektionen von Zellen mit Plasmid-DNA wurden für diese Arbeit mit den Transfektionsreagenzien Fugene (Roche, Grenzach-Wyhlen) und Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

Die optimalen Bedingungen für die Transfektion (Verhältnis des Transfektionsreagens zu Plasmid-DNA) mussten für jede Zelllinie im Vorfeld getestet werden.

6. Ergebnisse

Der AG Müller-Lantzsch gelang es mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Screening den Ether-à-go-go-Kaliumkanal Bec1 als Interaktionspartner retroviraler Proteine zu identifizieren. In dieser Arbeit soll diese Bindung weiter charakterisiert und durch unterschiedliche *in vitro*- und *in vivo*-Methoden die Interaktion von HERV-W Env und Bec1 untersucht werden.

6.1 Interaktion von HERV-W Env mit Bec1

6.1.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Die C-terminalen 223 Aminosäuren des Bec1-Kanals wurden als GST-Fusionsprotein hergestellt. Zur Expression wurden BL21DE3-Bakterien mit pGEX-Bec1 transformiert und die Proteinsynthese mit Hilfe von IPTG induziert (Kap. 5.3.4.1). Zur Kontrolle der Synthese des Fusionsproteins erfolgten die Durchführung eines Westernblots und der anschließende Nachweis des Proteins mit einem monoklonalen Antikörper gegen GST (Abb. 6.1).

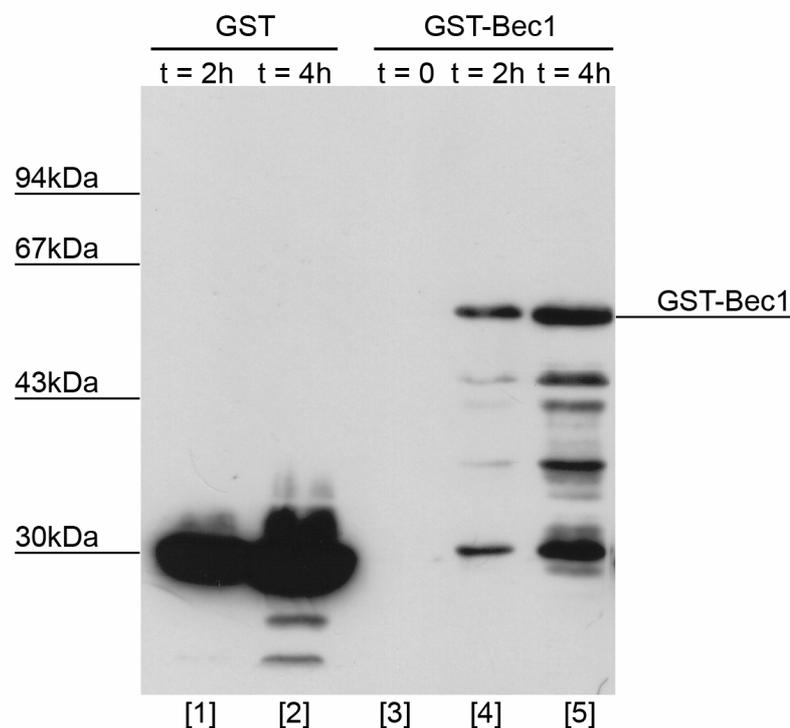


Abb. 6.1 Kontrolle der Expression des GST-Bec1-Fusionsproteins nach Induktion im Westernblot. Die Expression wurde zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 2h$ und $t = 4h$ kontrolliert. Die Größe des Fusionsproteins von ca. 50kDa setzt sich aus GST mit 26kDa und Bec1 mit 24,3kDa zusammen. Als Negativkontrolle ist auf der linken Seite des Blots das GST-Protein dargestellt (GST: $t = 2h$, $t = 4h$). Die Detektion der Proteine erfolgte durch einen monoklonalen Anti-GST-Antikörper (Ratte). Der Röntgenfilm wurde für 2,5min belichtet.

Um die optimale Proteinexpression zu erhalten, wurde die Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert. Die Spuren zeigen die Proteinsynthese nach Induktion mit IPTG zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 2\text{h}$ sowie $t = 4\text{h}$. Die Induktion der Proteinsynthese mit IPTG wurde bei $t = 0$ durchgeführt. Aufgrund der Bande bei ca. 50kDa und der Zunahme der Intensität über die Zeit ist davon auszugehen, dass Bec1 als GST-Fusionsprotein exprimiert wurde.

6.1.2 Pulldown-Analyse der Interaktion von HERV-W Env und Bec1

Für die Analyse der Bindung von HERV-W Env mit Bec1 wurden zunächst die funktionellen Bestandteile des Envelope-Proteins von HERV-W, SU und TM, auf ihre Interaktion mit Bec1 im Pulldown-Assay untersucht. Die von der AG Müller-Lantzsch hergestellten Klone HERV-W SU und TM wurden dafür eingesetzt. Mittels *in vitro*-Translations-Kit wurden SU und TM als ^{35}S -radioaktiv-markierte Proteine exprimiert (Kap. 5.3.4.2). Zur Analyse der Interaktion wurden die mit pGEX-Bec1 transformierten BL21DE3-Bakterien zum entsprechenden Zeitpunkt geerntet, zu Lysispufferextrakten verarbeitet und über Nacht zusammen mit den *in vitro*-exprimierten SU- und TM-Proteinen inkubiert. Nach Waschung mit High-Salt-Puffer erfolgten die Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE und die Detektion der radioaktiv-markierten Proteine mittels Röntgenfilm, der für zwei Tage belichtet wurde (Abb. 6.2).

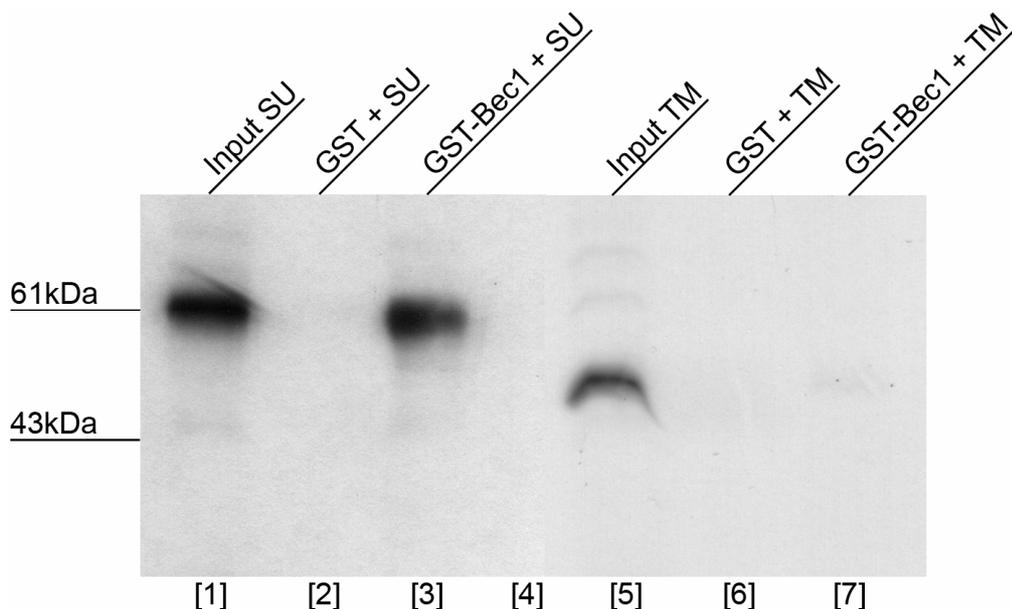


Abb. 6.2 Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W SU und TM mit Bec1 im Pulldown. Der Glutathion-S-Transferase-Pulldown-Assay zeigt die Bindung von SU an Bec1 (Spur 3), während die TM-Spur (Spur 7) keine Bande zeigt. Als Input dienen ^{35}S -markierte HERV-W SU- (Spur 1) bzw. TM-Proteine (Spur 5), von denen 1/10 Volumen als Kontrolle aufgetragen ist. Als Negativkontrolle wurde die Inkubation von GST + SU (Spur 2) bzw. GST + TM (Spur 6) aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass HERV-W SU und Bec1 *in vitro* miteinander interagieren (Spur 3, Abb. 6.2). Für HERV-W TM konnte hingegen keine Bindung der beiden Proteine gezeigt werden (Spur 7, Abb. 6.2).

6.1.3 Analyse der Bindungsstelle von HERV-W SU an Bec1

Da in den Vorversuchen (Abb. 6.2) die Bindung von HERV-W SU mit Bec1 durch Pulldown-Analyse gezeigt werden konnte, sollte in den folgenden Experimenten die Bindungsstelle von HERV-W SU näher eingegrenzt werden.

6.1.3.1 Klonierung von SU1 und SU2

Das Gesamt-SU-Protein wurde zur Analyse der Bindungsstelle in zwei gleich große Fragmente SU1 und SU2 unterteilt (Abb. 6.4). Als Template für die Klonierung diente der HERV-W *env* Klon 12 der AG Müller-Lantzsch, der aus genomischer DNA eines Spenders amplifiziert, kloniert und sequenziert wurde. Der Klon besitzt 99,8% Homologie zu der veröffentlichten Sequenz (accession number NM_014590). Die entsprechenden Sequenzen für SU1 und SU2 wurden mit Hilfe der Primer 1. und 2. (SU1), 3. und 4. (SU2) amplifiziert (Tab. 4.1, 4.2) und zunächst durch Agarose-Gelelektrophorese dargestellt (Abb. 6.3).

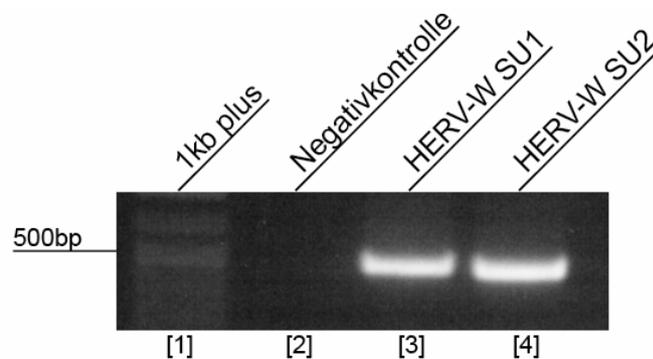


Abb. 6.3 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifizierung von SU1 und SU2 (Spur 3 und 4). Als Template wurde für die PCR das Produkt pGBKT7-HERV-W *env* der AG Müller-Lantzsch verwendet. SU1 besteht aus 480bp und SU2 aus 477bp. Ein PCR-Ansatz wurde mit Wasser an Stelle von DNA durchgeführt (Negativkontrolle). Als Marker wurden auf das Agarose-Gel 10µl 1kb plus ladder aufgetragen.

Die folgende Abb. 6.4 zeigt eine Übersicht der mit Bec1 im Pulldown-Assay getesteten HERV-W *env* Klone.

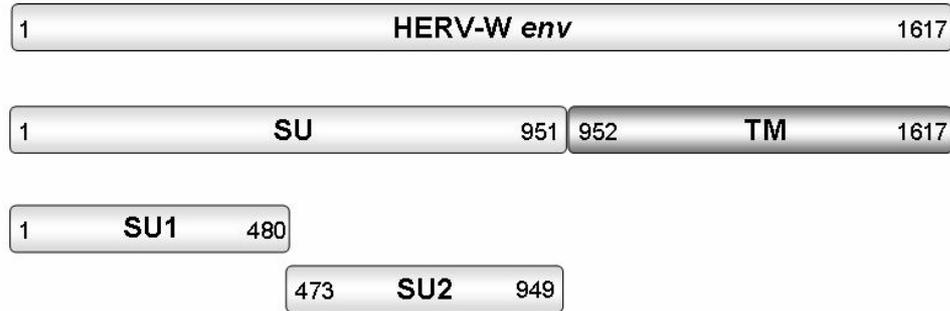


Abb. 6.4 Schema der im Pulldown mit Bec1 getesteten HERV-W *env* Fragmente. Als Template für die PCR-Amplifikation von SU1 und SU2 diente ein 1617bp großes HERV-W *env* Konstrukt, das von der AG Müller-Lantzsch zur Verfügung gestellt wurde. Die Fragmente sind in den Vektor pGBKT7 kloniert.

6.1.3.2 Pulldown-Analyse der Interaktion von HERV-W SU1 und SU2 mit Bec1

Die pGBKT7-Klone von SU1 und SU2 wurden mit Hilfe eines *in vitro*-Translations-Kits exprimiert und radioaktiv markiert. Bec1 wurde wiederum als GST-Fusionsprotein zusammen mit den radioaktiv-markierten Proteinen von SU1 und SU2 zur anschließenden Bindungsanalyse inkubiert.

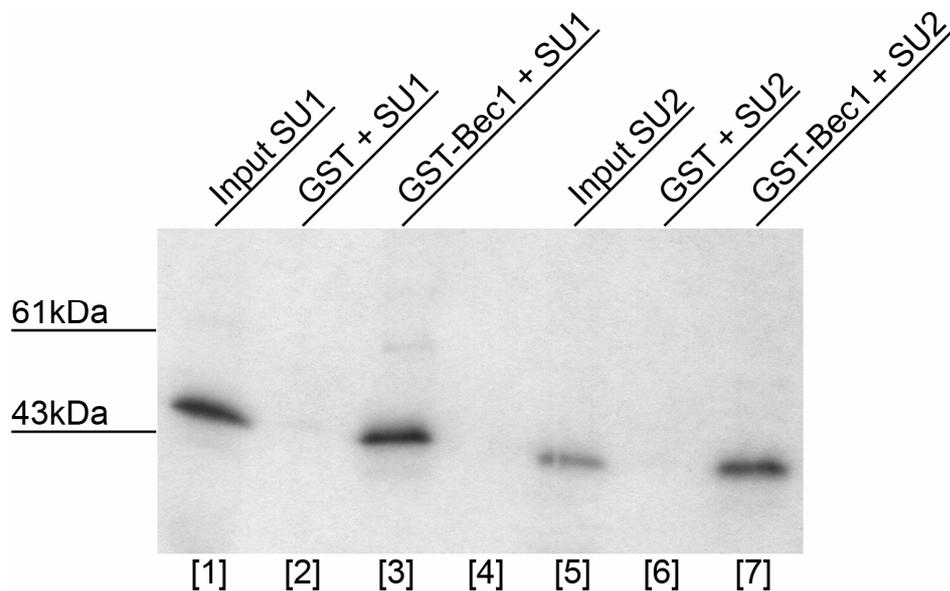


Abb 6.5 Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W SU1 und SU2 mit Bec1 im Pulldown. Der Glutathion-S-Transferase-Pulldown-Assay zeigt die Bindung von SU1 (Bande bei ca. 42kDa, Spur 3) sowie SU2 (Bande bei ca. 41kDa, Spur 7) an Bec1. Als Input dienten ^{35}S -markierte HERV-W SU1- (Spur 1) bzw. SU2-Proteine (Spur 5), von denen 1/10 Volumen als Kontrolle aufgetragen ist. Als Negativkontrolle wurde die Inkubation von GST + SU1 (Spur 2) bzw. GST + SU2 (Spur 6) aufgetragen.

Im Pulldown-Assay wurde sowohl für SU1 als auch für SU2 eine Bindung mit Bec1 nachgewiesen (Spur 3, Spur 7, Abb. 6.5), nicht dagegen in der Negativkontrolle (Spur 2, Spur 6, Abb. 6.5). Daher konnte mit diesem Versuch die Bindungsstelle beider SU-Konstrukte nicht weiter eingegrenzt werden.

6.1.4 Charakterisierung der Bindungsstelle von Bec1 an HERV-W SU

Da sich für die beiden Proteine HERV-W SU1 und SU2 im Pulldown-Assay kein Unterschied bezüglich ihrer Bindung an Bec1 feststellen ließ, wurde im Folgenden versucht, die Bindungsdomäne von Bec1 an HERV-W SU genauer darzustellen. Dafür erfolgten die Expression der trunkierten Bec1-Klone (AG Ruprecht) als GST-Fusionsproteine und die Analyse im Pulldown mit HERV-W SU.

Abb. 6.6 zeigt schematisch die verwendeten Bec1-Klone und das Ergebnis der Bindungsanalysen.

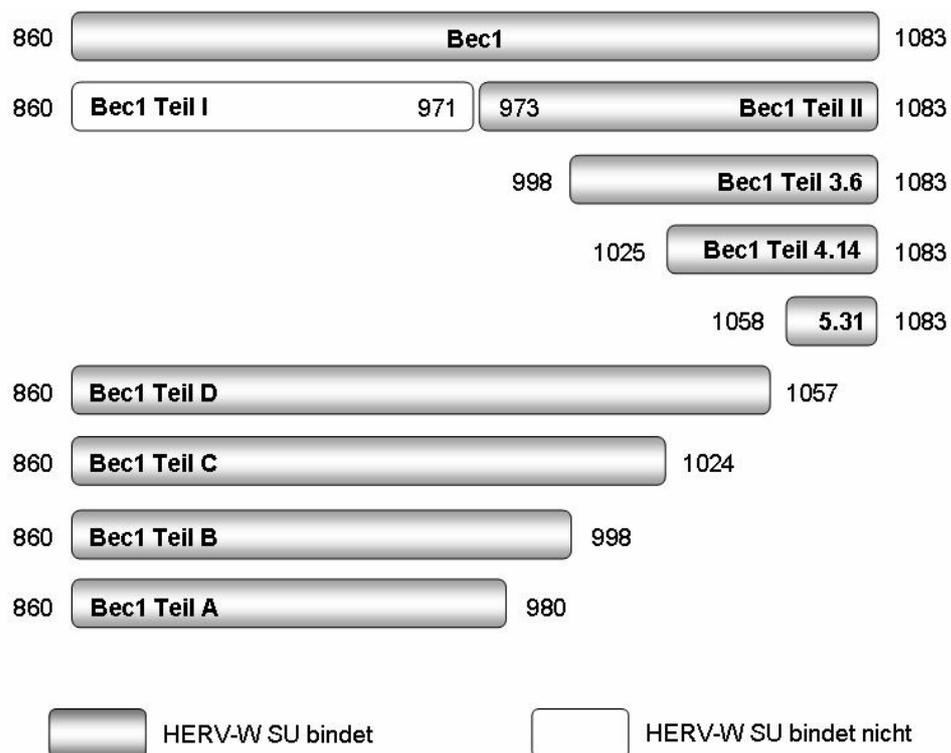


Abb. 6.6 Schema der truncierten Bec1-Proteine (AG Ruprecht). Der in der Abbildung als Bec1 bezeichnete Klon enthält die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des Kaliumkanals. Für die nähere Charakterisierung der Bindungsdomäne von Bec1 an HERV-W SU wurden die weiteren neun dargestellten Fragmente als GST-Fusionsproteine im Pulldown-Assay auf ihre Interaktion analysiert (Abb. 6.7). Die Fragmente sind in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert.

Für die Durchführung des Pulldown-Assays wurden bakterielle Lysispufferextrakte der in Abb. 6.6 dargestellten Konstrukte von Bec1 hergestellt (Kap. 5.3.4.1) und diese zusammen mit Glutathionsepharose bei vier Grad inkubiert und weiter analysiert. Abb. 6.7 zeigt das Ergebnis der Pulldown-Analyse der Interaktion von HERV-W SU mit den verschiedenen Bec1-Fragmenten.

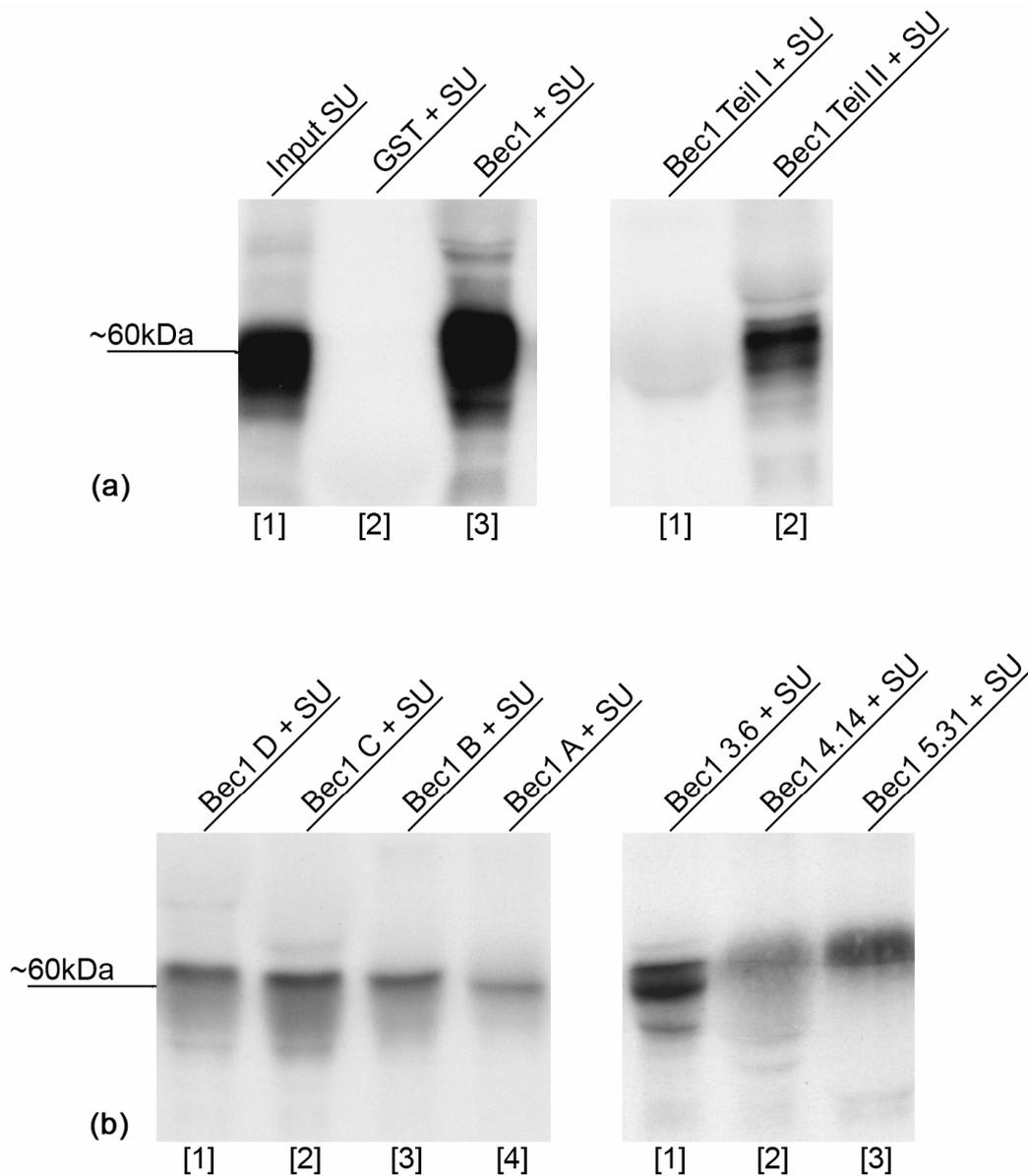


Abb. 6.7 Autoradiographie der Bindungsanalyse der trunktierten Bec1-Proteine mit HERV-W SU. (a) zeigt die Bindung von SU mit Bec1 (links, Spur 3) sowie mit Bec1 Teil II (rechts, Spur 2), während Bec1 Teil I (rechts, Spur 1) nicht interagiert. In (b) sind die Ergebnisse des Pulldowns für die Teilproteine Bec1 A-D sowie für Bec1 3.6, Bec1 4.14 und Bec1 5.31 zu sehen. Als Input diente ^{35}S -markiertes HERV-W SU Protein, von dem 1/10 Volumen als Kontrolle aufgetragen wurde ((a) Spur 1 links). Als Negativkontrolle wurde die Inkubation von GST + SU aufgetragen ((a) Spur 2 links).

Die durchgeführten Pulldown-Analysen konnten eine Assoziation zwischen dem Surface-Protein von HERV-W und dem Kaliumkanalprotein Bec1 zeigen. Während die Bindungsdomäne des Surface-Proteins durch die Fragmente SU1 und SU2 an Bec1 nicht genauer festgelegt werden konnte, zeigte die Untersuchung der trunkierten Bec1-Klone ein spezifisches Bindungsmuster. Bec1 Teil I interagiert nicht mit HERV-W SU, dagegen weisen Bec1 Teil II sowie die weiteren Klone Bec1 A-D und Bec1 3.6, 5.31 eine Bindung mit SU auf. Für den Klon Bec1 4.14 kann aufgrund der diffusen Bande keine eindeutige Aussage bezüglich seiner Bindung an HERV-W SU gemacht werden. Bei der Reproduktion der Versuche konnte ein identisches Bindungsmuster nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Bec1 an HERV-W SU auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren beschränkt ist.

6.2 Bindungsanalyse der Gag-Proteine verschiedener Retroviren mit Bec1

Nachdem eine Bindung des Kaliumkanalproteins Bec1 mit HERV-W Env und seiner Untereinheit HERV-W SU im Pulldown-Assay gezeigt werden konnte, wurde im Weiteren untersucht, ob auch andere retrovirale Proteine wie die Kapsidproteine verschiedener humaner Retroviren als Bindungspartner mit Bec1 agieren.

Hierfür wurden pGBKT7-Konstrukte von HERV-W *gag*, MSRV *gag*, HERV-K *gag* sowie HIV *gag* nach deren *in vitro*-Expression auf ihre Interaktion mit Bec1 mittels Pulldown getestet.

6.2.1 Klonierung von HERV-W *gag* in pGBKT7

Für die Amplifikation der gewünschten HERV-W *gag* Sequenz diente genomische DNA als Template. Nach dem Prinzip der Nested-PCR (Kap. 5.2.1) wurde zunächst mit den Primern 6. und 9. eine Sequenz vervielfältigt, wobei das 5'-Ende von Primer 9. "upstream" der gewünschten HERV-W *gag* Sequenz lag (Tab. 4.1, 4.2). Anschließend wurde diese Sequenz als Template für einen weiteren PCR-Amplifizierungsschritt mit den Primern 7. und 8. verwendet. Das isolierte und vervielfältigte HERV-W *gag* Fragment mit *Bam*HI-Schnittstellen wurde danach in den pGEM-Vektor und anschließend in pGBKT7 kloniert. Abb. 6.8 zeigt die nach der Nested-PCR zur Kontrolle durchgeführte Agarose-Gelelektrophorese. Das Amplifikat von HERV-W *gag* besitzt eine Größe von 1094bp.

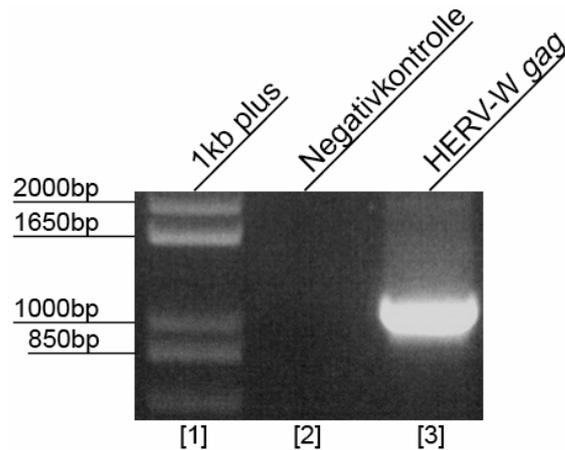


Abb. 6.8 Agarose-Gelelektrophorese der Nested-PCR zur Amplifikation von HERV-W *gag*. Nach Durchführung einer ersten PCR mit den Primern 6. und 9. folgte ein weiterer Vervielfältigungsschritt zur Gewinnung der HERV-W *gag* Sequenz aus genomischer DNA. Dafür wurden die Primer 7. und 8. verwendet. Ein PCR-Ansatz wurde mit Wasser an Stelle von DNA durchgeführt (Negativkontrolle). Zur Größenkontrolle wurde 1kb plus Marker eingesetzt. Die Größe der HERV-W *gag* Sequenz beträgt 1094bp.

6.2.2 Klonierung von HIV *gag* in pGBKT7

Zur Herstellung des pGBKT7-HIV *gag* Klons wurde die gewünschte Sequenz zunächst aus einem der AG Müller-Lantzsch vorliegenden psPAX2-Vektorkonstrukt durch PCR mit den Primern 10. und 11. amplifiziert (Plasmid 12260: psPAX2, Fa. Addgene, Cambridge, USA; Didier Trono Lab., <http://tronolab.epfl.ch>). Das vervielfältigte Fragment mit *Bam*HI-Schnittstellen konnte anschließend in pGBKT7 inseriert und für *in vitro*-Translation und Pulldown-Assay verwendet werden.

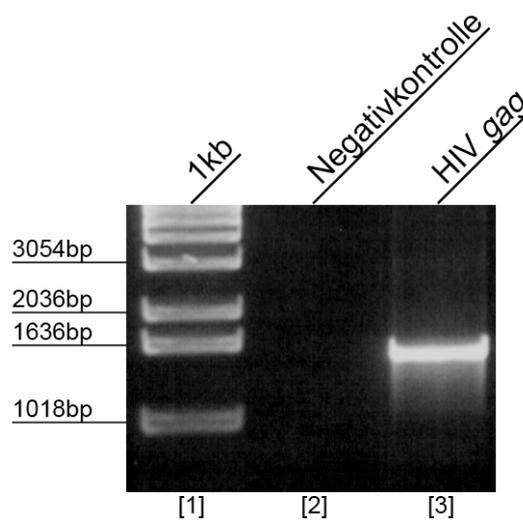


Abb. 6.9 Agarose-Gelelektrophorese des amplifizierten HIV *gag* Fragments (Spur 3). Als DNA-Template diente ein psPAX2-HIV *gag* Vektorkonstrukt. Die PCR wurde mit Hilfe der Primer 10. und 11. durchgeführt und eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt. Ein PCR-Ansatz wurde mit Wasser an Stelle von DNA durchgeführt (Negativkontrolle). Als Marker wurden auf das Agarose-Gel 10µl 1kb Marker aufgetragen.

Abb. 6.9 zeigt das Ergebnis der Amplifikation von HIV *gag*. Das Fragment besitzt eine Größe von ca. 1500bp.

6.2.3 Bindungsanalyse der Interaktion retroviraler Gag-Proteine mit Bec1

Die von der AG Müller-Lantsch bereits hergestellten Expressionskonstrukte MSRVR *gag* und HERV-K *gag* sowie die in 6.2.1 und 6.2.2 aufgeführten Klone HERV-W *gag* und HIV *gag* wurden im Pulldown-Assay mit Bec1 eingesetzt. Die vier Gag-Proteine wurden hierfür *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und zusammen mit dem GST-Bec1-Fusionsprotein inkubiert. Die Proben wurden durch ein 12,5%-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, ein Röntgenfilm für zwei Tage belichtet.

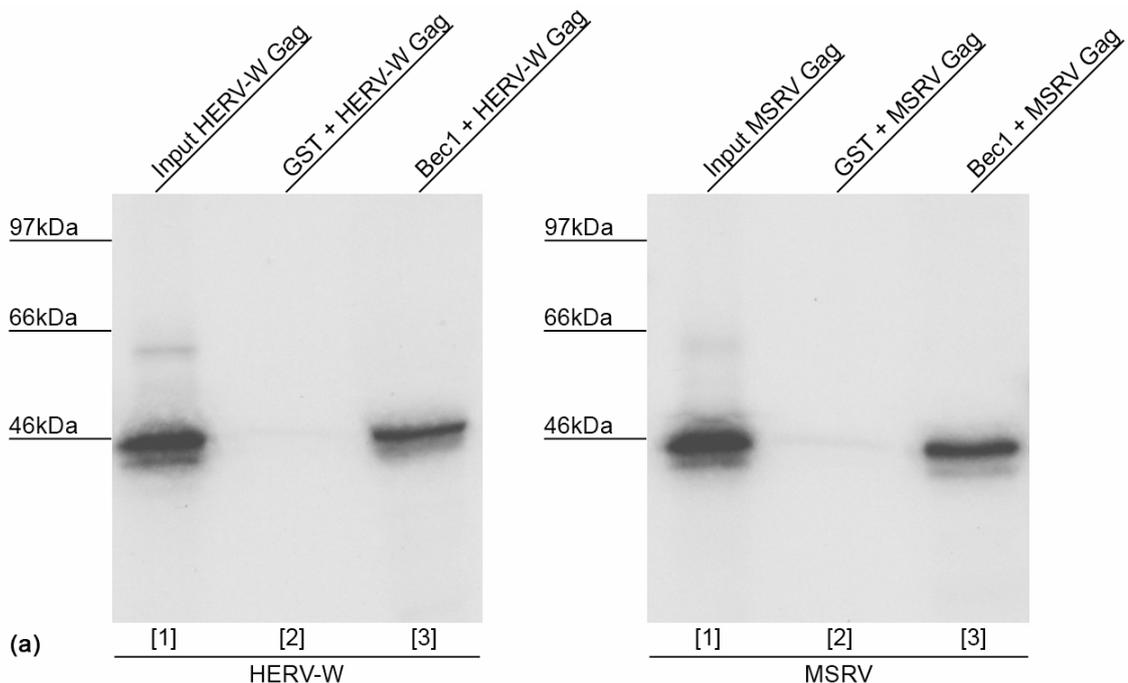


Abb. 6.10 (a) Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-W Gag und MSRVR Gag mit Bec1 im Pulldown. Der Glutathion-S-Transferase-Pulldown-Assay zeigt jeweils in Spur 3 eine Bindung für HERV-W Gag sowie für MSRVR Gag (Bande bei jeweils ca 46kDa). Als Input dienen ^{35}S -markierte HERV-W Gag bzw. MSRVR Gag Proteine (Spur 1), von denen 1/10 Volumen als Kontrolle aufgetragen ist. Als Negativkontrolle wurde die Inkubation von GST + HERV-W Gag bzw. GST + MSRVR Gag aufgetragen (Spur 2).

HERV-W sowie das in seiner Basensequenz zu über 90% übereinstimmende MSRVR wiesen für ihre Gag-Proteine jeweils eine Bindung mit Bec1 auf, die durch Pulldown-Analysen (Abb. 6.10 (a)) dargestellt werden konnte.

Um zu überprüfen, ob der Kaliumkanal Bec1 auch ein Zielprotein für Gag-Proteine weiterer endogener, aber auch exogener Retroviren sein könnte, wurde ebenfalls die Assoziation von HERV-K Gag sowie HIV Gag mit Bec1 untersucht (Abb. 6.10 (b)).

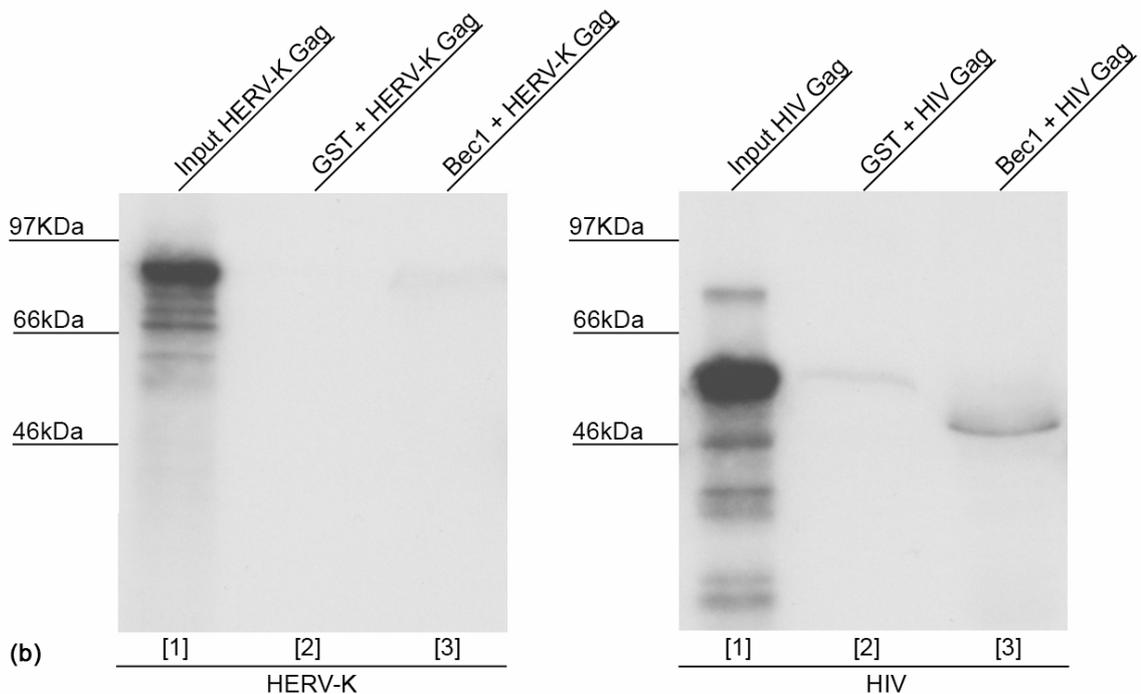


Abb. 6.10 (b) Röntgenfilm der Untersuchung der Interaktion von HERV-K Gag und HIV Gag mit Bec1 im Pull-down. Der Glutathion-S-Transferase-Pulldown-Assay zeigt keine Bindung von HERV-K Gag (Spur 3 links). Für HIV Gag ist ebenfalls keine Interaktion mit Bec1 nachweisbar (Spur 3 rechts). Als Input dienen ^{35}S -markierte HERV-K Gag- bzw. HIV Gag-Proteine, von denen 1/10 Volumen als Kontrolle aufgetragen ist (jeweils Spur 1). Als Negativkontrolle wurde die Inkubation von GST + HERV-K Gag bzw. GST + HIV Gag aufgetragen (jeweils Spur 2).

Während für HERV-K Gag und HIV Gag auch nach zweifacher Wiederholung des Versuchsansatzes keine Bindung mit Bec1 nachzuweisen war (Abb. 6.10 (b)), zeigte die Durchführung des Experiments für HERV-W und MSRV, welche zu ca. 90% in ihrer Nukleotidsequenz übereinstimmen, jeweils für beide Proteine eine Bindung mit Bec1 (Abb. 6.10 (a)). Somit konnte für diese beiden endogenen Retroviren *in vitro* eine Assoziation ihrer Gag-Proteine mit Bec1 gezeigt werden.

6.3 Analyse der Interaktion von HERV-W SU mit Bec1 durch Immunfluoreszenz

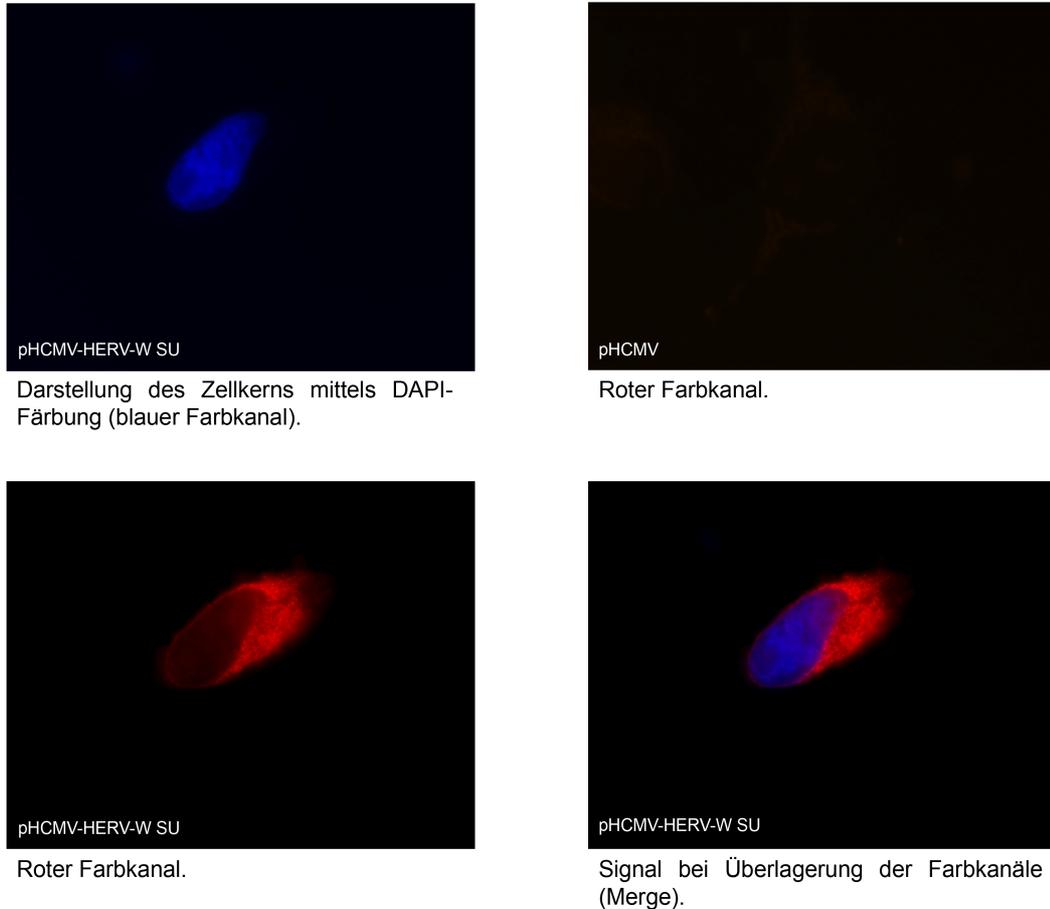
Um die Interaktion von HERV-W SU an Bec1 auch *in vivo* weiter zu untersuchen, wurden beide Proteine in Hela-Zellen exprimiert. Für die *in vivo*-Expression von HERV-W SU und Bec1 wurden die Vektorkonstrukte pHCMV-HERV-W SU und pEGFP-Bec1 (Gesamt-Bec1 mit 1083 Aminosäuren) eingesetzt. Die Zellen wurden mit den Konstrukten mit Hilfe des Transfektionsreagens Lipofectamine transfiziert (Kap. 5.4.4) und nach 24 Stunden auf den Objektträgern fixiert. Das EGFP-Fusionsprotein besitzt einen grün-fluoreszierenden Protein-Tag, während zum Nachweis von HERV-W SU in der Zelle dieses zunächst mit einem Anti-HERV-W Env Serum (in unterschiedlichen Verdünnungen mit PBS) markiert wurde. Als Zweitantikörper diente zum Nachweis von SU ein rot-fluoreszierender Alexa 568 Antikörper. Danach wurden die Zellen mit Vectashield behandelt, das die Zellen fixiert und ihre Kerne blau-fluoreszierend anfärbt. Anschließend konnten die Objektträger mit konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden.

6.3.1 Analyse der Kolo-kalisation von HERV-W SU und Bec1 durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst erfolgte die Analyse der Hela-Zellen mit Hilfe eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes. Neben co-transfizierten Zellen wurden zur Kontrolle Bilder von Zellen aufgenommen, die lediglich mit den Konstrukten pEGFP-Bec1 oder pHCMV-HERV-W SU transfiziert wurden.

6.3.1.1 Lokalisation von HERV-W SU

Um die subzelluläre Lokalisation von HERV-W SU zu untersuchen, wurden zunächst Hela-Zellen mit dem Vektorkonstrukt pHCMV-HERV-W SU oder pHCMV-Leervektor transfiziert (Abb. 6.11). SU wurde mit Anti-Env-Serum und einem Tritc-markierten rot-fluoreszierenden Zweitantikörper (Alexa 568) nachgewiesen. Nach DAPI-Färbung stellt sich der Zellkern blau-fluoreszierend dar (Abb. 6.11, links oben). Im Gegensatz dazu ist das HERV-W SU Protein intrazytoplasmatisch lokalisiert und kann dort mit Hilfe des rot-fluoreszierenden Zweitantikörpers markiert werden (Abb. 6.11, links unten).



Darstellung des Zellkerns mittels DAPI-Färbung (blauer Farbkanal).

Roter Farbkanal.

Roter Farbkanal.

Signal bei Überlagerung der Farbkanäle (Merge).

Abb. 6.11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von HeLa-Zellen, die mit pHCMV oder pHCMV-HERV-W SU transfiziert wurden (1000x Vergrößerung). 24 Stunden nach Transfektion wurde das exprimierte Oberflächenprotein mit Anti-HERV-W Env Serum (1:200) und Alexa 568 Tritc Antikörper (1:1000) detektiert (links unten). Zur Darstellung des Nukleus wurde DAPI-Farbstoff zusammen mit Vectashield auf die Zellen aufgetragen (links oben). Bei der Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzsignale (Merge) ist das Signal für HERV-W SU im Zytoplasma sowie der blau-fluoreszierende Kern erkennbar. Um eine unspezifische Antikörperreaktion auszuschließen, wurden zur Kontrolle Zellen, die mit pHCMV-Leervektor transfiziert wurden, mit den Antikörpern behandelt (rechts oben).

6.3.1.2 Lokalisation von Bec1

Um die subzelluläre Verteilung von Bec1 zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit dem Vektorkonstrukt pEGFP-Bec1 oder pEGFP transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nach Fixierung erfolgte das Eindecken des Objektträgers mit Vectashield und die Anfärbung mit DAPI. Die HeLa-Zellen wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene betrachtet. Die Fluoreszenzmikroskopie-Ergebnisse der mit pEGFP oder pEGFP-Bec1 transfizierten HeLa-Zellen sind in Abb. 6.12 dargestellt. Das als EGFP-

Fusionsprotein exprimierte Bec1 ist intrazytoplasmatisch lokalisiert (unterer Teil der Abb.), während sich das Fluoreszenzsignal für die mit pEGFP transfizierten Zellen unspezifisch über die gesamte Zelle erstreckt (rechts oben).

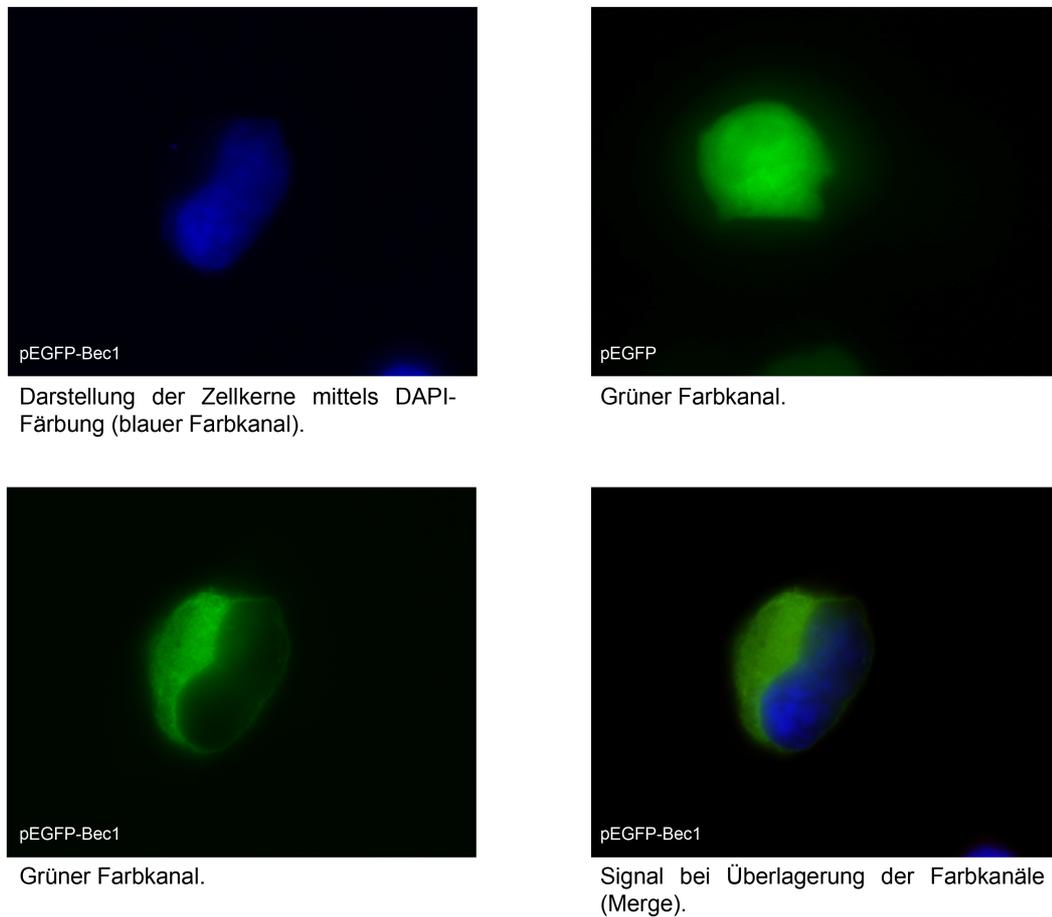


Abb. 6.12 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von HeLa-Zellen, die mit pEGFP oder pEGFP-Bec1 transfiziert wurden (1000x Vergrößerung). Zur Darstellung des Nukleus wurde DAPI-Farbstoff zusammen mit Vectashield auf die Zellen aufgetragen (links oben). Rechts oben ist die Expression von enhanced green fluorescent protein zu erkennen, das sich unspezifisch über die gesamte Zelle erstreckt. Zellen, die mit pEGFP-Bec1 transfiziert wurden, zeigen eine intrazytoplasmatische Lokalisation des Fusionsprotein-Signals (links unten). Bei der Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzkanäle ist das Signal für EGFP-Bec1 sowie der blau-fluoreszierende Kern erkennbar (rechts unten).

6.3.1.3 Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1

Nachdem jeweils für HERV-W SU und Bec1 die intrazytoplasmatische Lokalisation in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte, erfolgte nun die Co-Transfektion von HeLa-Zellen mit pHCMV-HERV SU und EGFP-Bec1. Zur Detektion von HERV-W SU diente HERV-W Env Serum (1:200) und Alexa 568 Tritc Antikörper (1:1000). Nach

Fixierung erfolgte die Behandlung des Objektträgers mit Vectashield. Bec1 wurde als grün-fluoreszierendes EGFP-Fusionsprotein exprimiert.

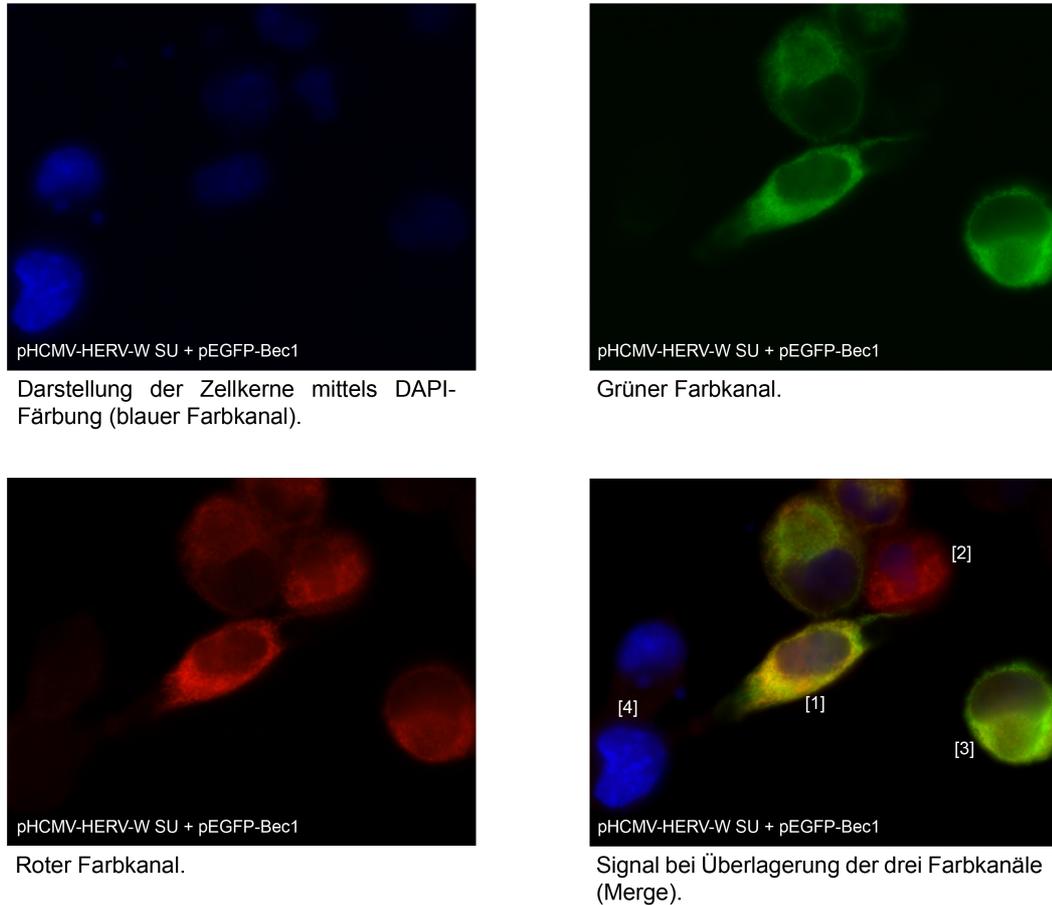


Abb. 6.13 Immunfluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen, die mit pEGFP-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert wurden (400x Vergrößerung). Bec1 wurde als grün-fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert, während HERV-W SU mit Anti-HERV-W Env Serum (Kaninchen, 1:200) und rot-fluoreszierendem Alexa 568 Tritc Antikörper (1:1000) nachgewiesen wurde. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde DAPI-Farbstoff zusammen mit Vectashield auf die Zellen aufgetragen (links oben). Bei Betrachtung der Zellen mit dem grünen Fluoreszenzkanal ist die Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-Bec1 im Zytoplasma erkennbar (rechts oben). Im linken unteren Teilbild ist das Expressionsmuster von HERV-W SU dargestellt, welches ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist. Bei der Überlagerung der drei einzelnen Farbkanäle (Merge, rechts unten) ist erkennbar, dass die Zelle in der Bildmitte beide Proteine exprimiert und deshalb gelb fluoresziert [1], während die angrenzenden HeLa-Zellen entweder nur HERV-W SU (rot fluoreszierend, [2]) bzw. EGFP-Bec1 (grün fluoreszierend, [3]) oder auch keines der beiden Proteine exprimieren. Im letzteren Fall ist lediglich das blaue Fluoreszenzsignal des DAPI-Farbstoffs im Bereich des Nukleus erkennbar [4].

Die Ergebnisse der konventionellen Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen sind in Abb. 6.13 dargestellt. Sie zeigt die Betrachtung co-transfizierter HeLa-Zellen in den

unterschiedlichen Farbkanälen. Das rote Fluoreszieren der Zelle zeigt dabei die Expression des HERV-W SU Proteins an, das mit Anti-HERV-W Env Serum als Erstantikörper und dem in der Fluoreszenz rot leuchtenden Alexa 568 Zweitantikörper detektiert wurde (links unten). Die Emission grünen Lichts durch die Zelle nach Anregung stellt die Expression des Fusionsproteins EGFP-Bec1 dar, welches durch das transfizierte Vektorkonstrukt pEGFP-Bec1 kodiert wird (rechts oben). Der zusammen mit Vectashield aufgetragene DAPI-Farbstoff zur Darstellung des Zellkerns fluoresziert bei Betrachtung mit dem Mikroskop blau (links oben). Bei Überlagerung der einzelnen Farbkanäle (Merge) wird die Kolokalisation von SU und Bec1 durch ein gelbes Erscheinungsbild der Zelle in dem Kompartiment angezeigt, in dem die Co-Expression der Proteine stattfindet (rechts unten).

Mit den konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 6.13 konnte gezeigt werden, dass 24 Stunden nach Co-Transfektion von Hela-Zellen mit den Konstrukten pHCMV-HERV-W SU und pEGFP-Bec1 eine Lokalisation der beiden Proteine im Zytoplasma stattfindet (gelbes Fluoreszenzsignal in Abb. 6.13, Merge).

6.3.2 Analyse der Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1 durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Um das Lokalisationsmuster für SU und Bec1 genauer zu charakterisieren, wurden neben der Darstellung der Zellen mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie auch Aufnahmen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes (AG Lipp) angefertigt. Aufgrund seiner um ein Vielfaches erhöhten Tiefenauflösung bietet das konfokale Mikroskop – im Gegensatz zur konventionellen Technik – die Möglichkeit der genauen Analyse einzelner Ebenen des betrachteten Objekts.

Die Ergebnisse der konfokalen Analyse co-transfizierter Hela-Zellen (Transfektion mit pHCMV-HERV-W SU und pEGFP-Bec1) sind in Abb. 6.14 dargestellt. Durch die Betrachtung der Hela-Zellen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wird eine detailliertere Darstellung der Lokalisation von SU und Bec1 in den einzelnen Zellkompartimenten ermöglicht.

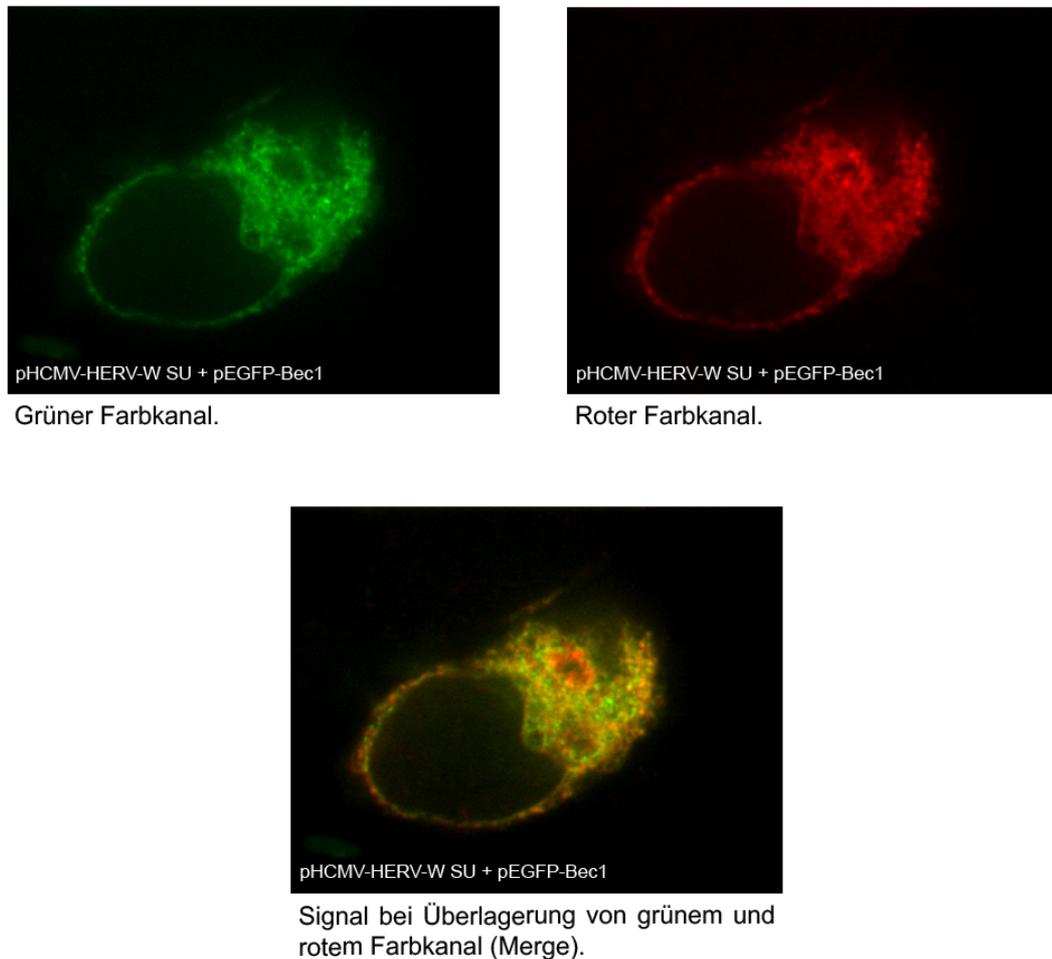


Abb. 6.14 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie einer HeLa-Zelle, die mit pEGFP-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert wurde (1000x Vergrößerung). Links oben ist die Expression des Fusionsproteins EGFP-Bec1 zu sehen. Das Zytoplasma zeigt ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal, der Nucleus ist ausgespart. Die Expression von HERV-W SU ist rechts oben dargestellt. HERV-W SU wurde mit Anti-HERV-W Env Serum (1:200) und rot-fluoreszierendem Tritc-Zweitantikörper (1:1000) markiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Fluoreszenzsignal bei Überlagerung der beiden Farbkanäle (Merge).

Das rote Fluoreszenzmuster von HERV-S SU (Abb. 6.14, rechts oben) unterscheidet sich an einigen Stellen von dem von EGFP-Bec1 (Abb. 6.14, links oben). Dies wird auch bei der Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle deutlich, die neben einem gelben Signal (Kokalisation, Merge) in Zytoplasma und Zellmembran auch Bereiche der Zelle wiedergibt, in denen nur SU (rot) oder EGFP-Bec1 (grün) exprimiert wurde. Trotz dieser beschriebenen Unterschiede verdeutlicht Abb. 6.14 die zytoplasmatische Expression und Kokalisation von HERV-W SU und Bec1.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl das Oberflächenprotein des humanen endogenen Retrovirus als auch das Kaliumkanalprotein im Zytoplasma kolokalisieren (Abb. 6.13 und 6.14, jeweils Merge). Eine Expression im Bereich der Zellmembran konnte nicht eindeutig dargestellt werden. Im Bereich des Zellkerns wurde für beide Proteine kein Fluoreszenzsignal beobachtet.

6.4 Darstellung der Interaktion von HERV-W SU mit Bec1 durch Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung co-transfizierter Hela-Zellen konnte die Kolokalisation von Bec1 und HERV-W SU im Zytoplasma zeigen, der Nachweis der direkten Protein-Protein-Bindung ist mit dieser Technik jedoch nicht möglich. Für die weitere Analyse der *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine wurde deshalb die Technik der Immunpräzipitation bzw. Co-Immunpräzipitation angewandt. Hierfür wurden Hela-Zellen mit den Vektorkonstrukten pHCMV-HERV-W SU und pSG5-Bec1 (Gesamt-Bec1 mit 1083AS) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für weitere zwei Tage bei 37°C inkubiert, bis eine Dichte des Zellrasens von ca. 90% erreicht war. Es erfolgte nun die Herstellung von Lysispufferextrakten (Kap. 5.3.4.1). Für die Präzipitation der Proteine Bec1 bzw. HERV-W SU durch Anti-Bec1 Serum bzw. Anti-HERV-W Env Serum erfolgte eine einstündige Inkubation der Ansätze auf Eis. Nach der Bindung an Protein-G-Sepharose und der anschließenden Aufnahme in Samplebuffer wurden die Proben durch SDS-PAGE und anschließenden Westernblot analysiert. Die Immobilon-Membran wurde hierfür bei ca. 90kDa horizontal durchtrennt. Der obere Teil, der das Bec1-Protein mit einer Größe von 126kDa enthielt, wurde dabei mit Anti-Bec1 Serum (1:1000), der untere Teil mit dem ca. 40kDa großen HERV-W SU Protein mit Anti-HERV-W Env Serum (1:300) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Behandlung beider Blot-Teile mit peroxidasegekoppeltem Zweitantikörper, der gegen Kaninchen-Protein gerichtet ist (1:2000). Nach Behandlung der Blot-Teile mit ECL-Reagens konnten ein Röntgenfilm geschwärzt und die Proteinbanden des Westernblots sichtbar gemacht werden (Kap. 5.3.3.2). Wurden die Lysate mit den Proteinen SU und Bec1, wie oben beschrieben, zunächst mit Anti-HERV-W Env Serum inkubiert, konnte HERV-W SU präzipitiert werden. Diese Immunpräzipitation wurde mittels Westernblot aufgetrennt und mit Anti-Bec1 Serum inkubiert. Konnte mit diesem Serum das 126kDa große Bec1- Protein nachgewiesen werden, wurde Bec1 erfolgreich co-präzipitiert.

6.4.1 Co-Immunitprazipitation mit Anti-Bec1

Zunächst wurde eine IP mit Anti-HERV W Env Serum durchgeführt, im Gel aufgetrennt, geblottet und der Blot mit Anti-HERV-W Env inkubiert. Das immunpräzipitierte Env-Protein konnte in der unteren Hälfte des Blots im Bereich von 40kDa nachgewiesen werden (Abb. 6.15). Weiter wurde die obere Hälfte des Blots mit Anti-Bec1 Serum inkubiert, so dass das co-immunpräzipitierte Bec1-Protein bei 126 kDa dargestellt werden konnte. Die im Originalfilm sichtbare SU-Bande wird von den schweren Ketten des Antikörpers (Lage bei ca. 46kDa) überlagert und ging beim Scan-Vorgang des Films verloren. Die Anfärbung der Spuren 3 und 5 sowie die Kontrolle durch das verwendete Prä-Immuserum für die in Spur 4 aufgetragene Probe gibt jedoch die Expression von SU wieder.

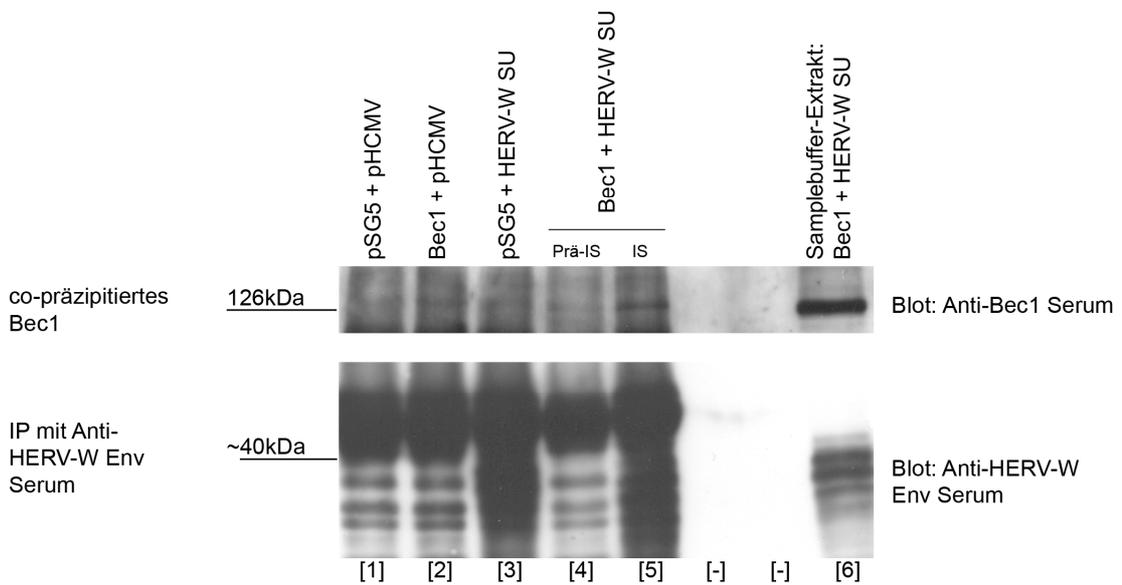


Abb. 6.15 Co-Immunitprazipitation von HERV-W SU und Bec1. Hela-Zellen wurden mit pSG5-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert (Spuren 4 und 5), bzw. die dargestellten Kontrollen mit den Leervektoren pHCMV und pSG5 sowie den Vektor-Insert-Konstrukten (Spuren 1-3) durchgeführt. Spur 4 stellt die Kontroll-IP mit dem zu Anti-HERV-W Env korrespondierenden Prä-Serum dar. Der Film zeigt in Spur 6 die exprimierten Proteine (Bec1 im oberen, HERV-W SU im unteren Teil) co-transfizierter Hela-Zellen (15µg Protein). Der untere Teil des Blots gibt die Immunpräzipitation von HERV-W SU wieder, der obere Teil des Blots stellt die Co-IP von Bec1 dar (Spur 5, Nachweis durch Anti-Bec1 Serum).

Der obere Teil des Westernblots zeigt die Detektion von Bec1 durch Anti-Bec1 Serum. Eine deutliche Bande auf der Höhe von 126kDa ist in Spur 5 erkennbar (co-transfizierte Hela-Zellen) und gibt somit die Co-Immunitprazipitation der beiden

Proteine wieder. Die schwach ausgeprägten Banden von 126kDa in den Spuren 1-4 stellen die Expression von endogenem Bec1-Protein dar, die für Hela-Zellen ebenfalls gezeigt werden konnte (Abb. 6.17).

6.4.2 Co-Immunpräzipitation mit Anti-HERV-W Env

Die Methoden der Immunpräzipitation / Co-Immunpräzipitation wurden angewandt, um eine Protein-Protein-Bindung zwischen HERV-W SU und Bec1 zu untersuchen. Hierfür wurden Hela-Zellen mit den Konstrukten pHCMV-HERV-W SU und pSG5-Bec1 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die zellulären Proteine extrahiert. Nach der Durchführung der Immunpräzipitation mit Anti-Bec1 Serum erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE. Nach dem Blotting wurde der obere Teil der Transfer-Membran mit Anti-Bec1 Serum behandelt, so dass das präzipitierte 126kDa große Bec1 nachgewiesen werden konnte (Abb. 6.16, oben). Die Detektion des 40kDa großen HERV-W SU mittels Anti-HERV-W Env Serum im unteren Teil des Blots gibt die Co-Immunpräzipitation des HERV-W Oberflächenproteins wieder.

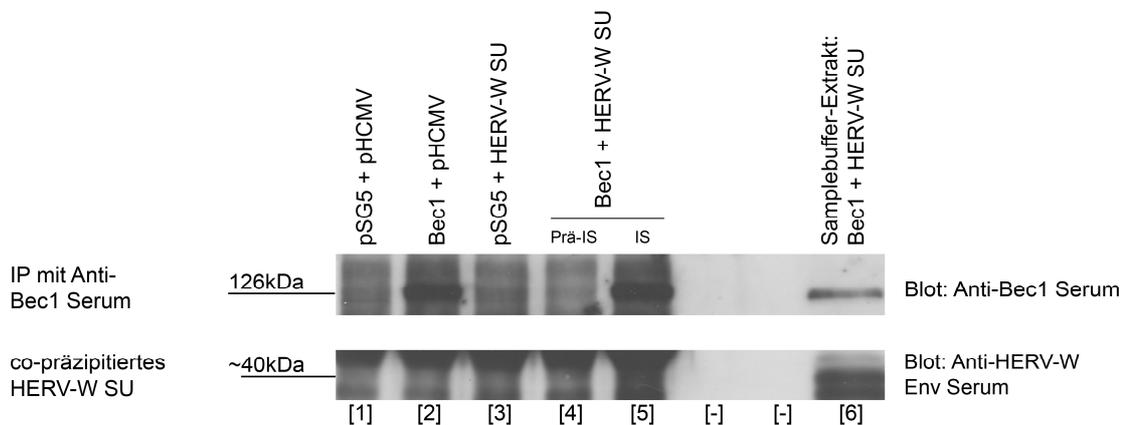


Abb. 6.16 Co-Immunpräzipitation von HERV-W SU und Bec1. Hela-Zellen wurden mit pSG5-Bec1 und pHCMV-HERV-W SU co-transfiziert (Spuren 4 und 5), bzw. die dargestellten Kontrollen mit den Leervektoren pHCMV und pSG5 sowie den Vektor-Insert-Konstrukten (Spuren 1-3) durchgeführt. Spur 4 stellt die Kontroll-IP mit dem zu Anti-Bec1 korrespondierenden Prä-Serum dar. Der Film zeigt in Spur 6 die exprimierten Proteine (Bec1 im oberen, HERV-W SU im unteren Teil) co-transfizierter Hela-Zellen (15µg Protein). Der obere Teil des Blots gibt die Immunpräzipitation von Bec1 wieder, der untere Teil des Blots stellt die Co-IP von HERV-W SU dar (Spur 5, Nachweis durch Anti-HERV-W Env Serum).

Auf dem oberen Anteil des in Abb. 6.16 dargestellten Blots ist die Immunpräzipitation durch Anti-Bec1 Serum mit einer Bande auf einer Höhe von

126kDa in den Spuren 2 und 5 zu sehen. Der untere Anteil zeigt die Co-Immunitäzpräzitation mit Anti-HERV-W Env Serum. Eine eindeutige Bande auf einer Höhe von 40kDa ist dabei nicht erkennbar. Der Film zeigt im Bereich von 40kDa eine Schwärzung (Spur 5), welche bei der dreimaligen Wiederholung des Versuchs reproduziert werden konnte, jedoch ist die Co-Immunitäzpräzitation von HERV-W SU und Bec1 nicht eindeutig nachweisbar.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Wurde Bec1 mit Anti-Bec1 Serum präzitiert, so konnte nach Durchführung einer SDS-PAGE und anschließendem Westernblot eine Bande bei 126kDa sicher gezeigt werden (Immunitäzpräzitation von Bec1). Eine Bande für HERV-W SU im Bereich von 40kDa (Co-Immunitäzpräzitation) konnte dabei jedoch nicht sicher nachgewiesen werden (Abb. 6.16). Wurde hingegen HERV-W SU mit Anti-HERV-W Env Serum präzitiert, so konnte im Westernblot eine Bande im Bereich von 40kDa nachgewiesen werden (Immunitäzpräzitation von HERV-W SU). Dabei gibt die Darstellung einer Bande bei 126kDa nach Anfärbung durch Anti-Bec1 Serum die Co-Immunitäzpräzitation des Kaliumkanalproteins wieder (Abb. 6.15).

Dieses Ergebnis und seine Reproduktion nach wiederholter Durchführung des Experiments sprechen somit für die Bindung des Oberflächenproteins HERV-W SU mit dem Kaliumkanalprotein Bec1.

6.5 Nachweis von Bec1 in verschiedenen Zelllinien

Die Arbeitsgruppe um Akira Miyake beschrieb 1999 erstmals das Vorkommen des Kaliumkanals Bec1, welcher durch *KCNH3* auf Chromosom 12q13 kodiert wird (Miyake et al, 1999). Die Expression dieses Ether-à-go-go-Kanals (zur Klassifikation siehe Kap. 3.4.1) konnte damals mittels Northernblot-Analysen nur in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns nachgewiesen werden, weshalb Bec1 zunächst als gehirnspezifisch angenommen wurde (Bec1 = brain specific eag like channel type 1). 2002 beschrieben schließlich Smith et al. das Vorkommen von Bec1 in verschiedenen Zellen des Immunsystems (Smith et al., 2002). Durch RT-PCR konnte die Expression des Kaliumkanals in primären Leukämie-Zellen, PBL-Zellen, aktivierten Tonsillar-Zellen, Lymphozyten von Sjögren-Patienten sowie EBV-transfizierten B-Zellen gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere verschiedene neoplastische und nicht-neoplastische Zellen auf das Vorkommen von Bec1-Protein untersucht. Die Proteine unterschiedlicher Suspensions- und Adhäsionszellen sowie peripherer mono-

nukleärer Zellen aus EDTA-Blut wurden hierfür durch Ultraschallbehandlung der Zellen extrahiert und in AB-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation der Proben mit Anti-Bec1 Serum (Kaninchen) und die Bindung der präzipitierten Proteine an Protein-G-Sepharose gemäß der Methode der Immunpräzipitation (Kap. 5.3.3.4). Nach Waschen mit AB-Puffer wurde die Analyse der Ansätze durch SDS-PAGE durchgeführt, wobei die Konzentrationen für das Polyacrylamid-Gel 7,5% bzw. 10% betragen. Anschließend folgte das Blotting der Proteine auf Immobilon-Membran über Nacht. Als Erstantikörper für die Detektion von Bec1 (Proteingröße 126kDa) wurde Anti-Bec1 Serum (1:200) eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde ein peroxidasegekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000) verwendet.

6.5.1 Nachweis von Bec1 in adhärenenten Zelllinien

Abb. 6.17 zeigt die Analyse verschiedener adhärenenten Zelllinien auf ihre Expression von endogenem Bec1-Protein durch Immunpräzipitation.

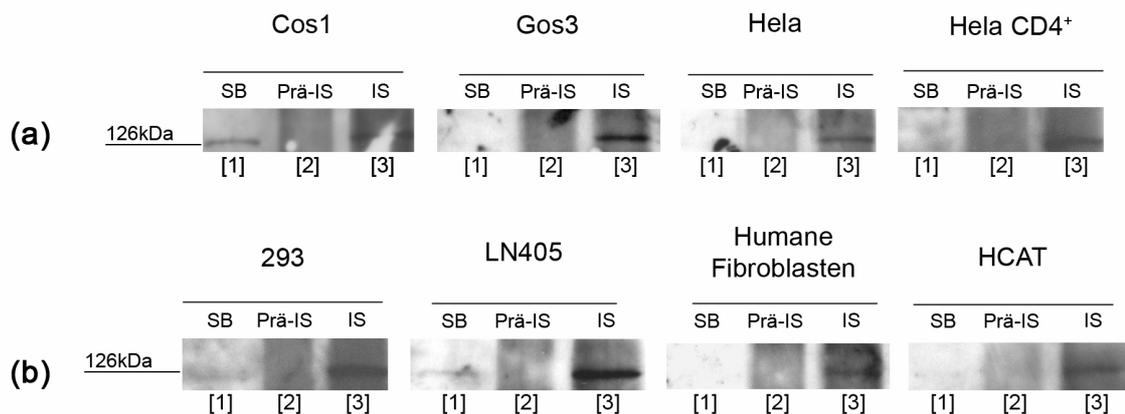


Abb. 6.17 Nachweis von Bec1 in unterschiedlichen adhärenenten Zelllinien ((a): Cos1, Gos3, HeLa, HeLa CD4⁺; (b): 293, LN405, Humane Fibroblasten, HCAT) durch Immunpräzipitation des Kaliumkanalproteins. In Spur 3 (IS) der Westernblots sind jeweils die Ansätze dargestellt, bei denen nach Extraktion der zellulären Proteine eine Präzipitation von Bec1 mit Anti-Bec1 Serum durchgeführt wurde. Spur 2 zeigt jeweils die Kontrolle nach Inkubation mit dem zu Anti-Bec1 korrespondierenden Prä-Immunsrum (Prä-IS). Als Kontrolle dienten Proteinextrakte der einzelnen Zelllinien (Spur 1, SB, je 15µg).

Alle in Abb. 6.17 abgebildeten Zelllinien zeigen eine Bande bei 126kDa in der Immunpräzipitation mit Anti-Bec1 Serum, nicht dagegen in der Kontrolle mit dem Prä-Immunsrum. Eine starke Expression von Bec1 weisen die Astro-Oligodendrogliom-Zelllinie Gos3 sowie die Glioblastom-Zellen LN405 auf. In den

eingesetzten Samplebuffer-Proteinextrakten (jeweils 15µg Protein) ohne Präzipitation von Bec1 stellen sich lediglich schwache bzw. keine Banden der Größe 126kDa dar.

6.5.2 Nachweis von Bec1 in Suspensionszelllinien

Neben dem in Abb. 6.17 dargestellten Nachweis von Bec1 in diversen Adhäsionszellen wurden auch die Suspensionszelllinien Jurkat und A 3.01 sowie PBMC- und BLCL-Zellen aus EDTA-Blut von Probanden auf ihre Expression von Bec1 getestet (Abb. 6.18). Zur Gewinnung von PBMC-Zellen wurde peripher-venös abgenommenes Blut mittels Ficoll-Dichte-Gradient analysiert und die Zellen des "buffy coats" wurden isoliert. Nach Aufnahme der Zellen der einzelnen Suspensionszelllinien in Antibody-Puffer wurden diese durch Ultraschallbehandlung lysiert und im Westernblot mit Anti-Bec1 Serum analysiert.

Abb. 6.18 zeigt die Analyse der genannten Suspensionszellen durch Immunpräzipitation bezüglich ihrer Expression von Bec1.

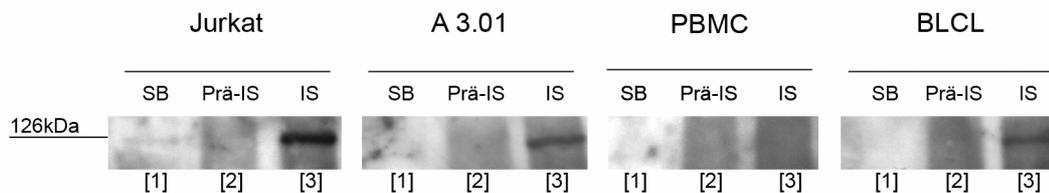


Abb. 6.18 Untersuchung von Jurkat-, A 3.01-, PBMC- und BLCL-Zellen durch Immunpräzipitation auf ihre endogene Expression von Bec1. In Spur 3 jeder Zelllinie (IS) ist jeweils die Analyse des Ansatzes gezeigt, der das präzipitierte Bec1-Protein enthielt. Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation der Ansätze jeder Zelllinie mit dem zu Anti-Bec1 korrespondierenden Prä-Serum (Spur 2, Prä-IS). In Spur 1 wurden die Samplebuffer-Proteinextrakte aufgetragen.

Die in Abb. 6.18 dargestellten Westernblots zeigen die endogene Expression des Kaliumkanals Bec1 in Jurkat-, A 3.01- und BLCL-Zellen nach Untersuchung durch Immunpräzipitation. In A 3.01- und BLCL-Zellen konnte eine Bande der Größe 126kDa durch Präzipitation von Bec1 gezeigt werden. Eine starke Expression des Kaliumkanals wurde wiederholt in Jurkat-Zellen nachgewiesen, wobei auch das Samplebuffer-Extrakt eine Bande bei 126kDa aufweist. Bei den PBMC-Zellen verschiedener Probanden ließ sich Bec1 auf Proteinebene nicht darstellen.

Bisher wurde das Vorkommen des Ether-à-go-go-Kaliumkanals Bec1 lediglich für verschiedene Regionen des Gehirns sowie für einige Immunzellen auf mRNA-

Ebene gezeigt (Miyake et al., 1999; Smith et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde endogenes Bec1 auf Proteinebene durch die Methode der Immunpräzipitation in weiteren Zellen nachgewiesen. Eine Bec1-spezifische 126kDa große Bande wurde für die Astro-Oligodendrogliom-Zelllinie Gos3 sowie für LN405 Glioblastom-Zellen gezeigt. Des Weiteren wurde eine Bec1-Expression in Cos1-, Hela-, A 3.01-, Jurkat-Zellen, einer humanen Fibroblasten-Linie, aber auch in der Keratinozyten-Zelllinie HCAT beobachtet. Eine Bec1-Expression war außerdem für BLCL-Zellen aus peripher-venösem Blut, nicht aber für PBMC-Zellen von Probanden (n = 3) beobachtbar (Abb. 6.18).

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen dem Oberflächenprotein des humanen endogenen Retrovirus W (HERV-W Env) und dem Kaliumkanalprotein Bec1 zu analysieren. Zum Nachweis der Bindung wurden sowohl *in vitro*- (Pulldownanalysen) als auch *in vivo*-Untersuchungstechniken (fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation) angewandt, welche die Interaktion beider Proteine bestätigen konnten und halfen, diese genauer zu charakterisieren.

7.1 Interaktion zwischen HERV-W SU und TM mit Bec1

Als Grundlage für die Interaktionsstudien zwischen HERV-W Env und Bec1 in dieser Arbeit dienten die von der AG Müller-Lantzsch durchgeführten Hefe-Screen-Analysen, die Bec1 als mögliches Zielprotein von HERV-W Env hervorbrachten (Kap. 3.3).

Für die vorliegende Arbeit wurden die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren von Bec1 verwendet, da diese im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen die Interaktionsdomäne zu HERV-W Env darstellten. Um mit Hilfe von GST-Pulldownanalysen eine mögliche Bindung von HERV-W Env an Bec1 zu untersuchen, wurde Bec1 zunächst als GST-Fusionsprotein in BL21DE3-Bakterien exprimiert. Durch Westernblot-Analysen konnte die Expression des Bec1-Fusionsproteins mit einem polyklonalen Anti-Bec1 Serum nachgewiesen werden (Abb 6.1).

Zunächst wurde *in vitro* die Bindung zwischen HERV-W Env und Bec1 analysiert. Der in Abb. 6.2 dargestellte Blot zeigt die Bindung von SU an Bec1 bei ca. 61kDa, während das Transmembranprotein (TM) von HERV-W nicht mit dem Kaliumkanalprotein zu interagieren scheint. Zur Kontrolle dieses Ergebnisses für HERV-W TM konnten die Bindungsanalysen weiterer retroviraler Transmembranproteine (HIV, MSRV, HERV-K) hinsichtlich ihrer Interaktion mit Bec1 herangezogen werden, die identische Ergebnisse hervorbrachten (unveröffentlichte Daten der AG Müller-Lantzsch). Lediglich für HTLV-1 TM konnte eine schwache Bindung zu Bec1 gezeigt werden, wobei die TM-Bindungsdomäne von HTLV-1 auf dessen 63 N-terminale Aminosäuren eingegrenzt werden konnte (unveröffentlichte Daten der AG Ruprecht). Analog zum Ergebnis des in Abb. 6.2 dargestellten Blots für HERV-W (mit Bindung von SU an Bec1) ergaben Pulldownanalysen mit Envelope-Proteinen weiterer endogener (MSRV, HERV-K) und auch exogener

Retroviren (HTLV-1 und HIV-1), dass auch deren SU Proteine an das Kaliumkanalprotein binden. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich HERV-W als weiteres humanes endogenes Retrovirus dar, welches mit dem Kaliumkanalprotein Bec1 interagiert.

Um die Bindungsstelle von HERV-W SU an Bec1 zu charakterisieren, wurden zwei Klone HERV-W SU1 (160AS) und SU2 (158AS) hergestellt, welche jeweils ca. die Hälfte des Surface-Proteins exprimieren. In Pulldownanalysen zeigten sowohl SU1 und SU2 eine Bindung an den Bec1-Kanal, die in der Darstellung auf dem Röntgenfilm in gleicher Intensität erscheint. Daraus lässt sich schließen, dass HERV-W SU sowohl C- als auch N-terminal Bindungsstellen für Bec1 aufweist.

Um die Bindungsstelle auch an Bec1 einzugrenzen, wurden neun verschiedene Bec1-Klone verwendet, die unterschiedliche Domänen des Bec1-Proteins exprimieren (Abb. 6.6). Es konnte gezeigt werden, dass alle C- und N-terminal tranktierten Proteine von Bec1 an HERV-W SU binden (Abb. 6.7). Eine Ausnahme bildet der Klon Bec1 Teil I, welcher den aminoterminalen Anteil der letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des Bec1 Proteins exprimiert (Abb. 6.7. (a)). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Bindungsregion von Bec1 an HERV-W SU auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren des Bec1 Proteins eingrenzen lässt.

Bei den durchgeführten Pulldown-Analysen sollte berücksichtigt werden, dass die untersuchten Proteine *in vitro* exprimiert wurden und es sich deshalb um artifizielle Untersuchungsbedingungen handelt. Aufgrund dessen wurden in der AG Müller-Lantzsch mehrere retrovirale Oberflächenproteine auf deren Interaktion mit Bec1 getestet. Neben einer fehlenden Bindung für HERV-W TM (s.o.) konnte zudem gezeigt werden, dass auch das latent membrane protein (LMP) von EBV keine Bindung mit Bec1 eingeht (persönliche Mitteilung M. Sauter). Daher ist davon auszugehen, dass die Interaktion von HERV-W Env mit Bec1 spezifisch ist.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Bindung von HERV-W SU und Bec1 vermutlich auf mehreren beiderseitigen Interaktionsdomänen basiert, welche möglicherweise zusätzlich durch Faltung der Proteine (Tertiärstruktur) beeinflusst wird.

7.2. Bindung der Gag-Proteine verschiedener Retroviren an das Bec1-Protein

Erst kürzlich wurde dargelegt, dass neben HERV-W Env auch das Gag-Protein dieses humanen endogenen Retrovirus regulär im menschlichen Körper

(Enzephalon) exprimiert wird (Perron et al., 2005). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Gag-Proteine der endogenen Retroviren HERV-W und MSRV mit Bec1 interagieren.

Der Prozess der Maturation sowie die unterschiedlichen Funktionen von retroviralen Gag-Proteinen sind in ihrer Komplexität bisher noch nicht vollständig verstanden, sind jedoch Gegenstand intensiver Forschungen. So konnte vor kurzem die Interaktion von HIV Gag mit unterschiedlichen zellulären Wirtsproteinen gezeigt werden. Annexin 2 (Anx2) stellt ein Mitglied der Familie Kalzium-abhängiger zytosolischer Proteine dar, das an zelluläre Membranen bindet. Die Funktionen des Strukturproteins Anx2 umfassen Membrantransportvorgänge, die Formation von Endosomen, die Gruppierung von Vesikeln sowie Exozytosevorgänge (Mayran et al., 2003; Donnelly et al., 1997; Faure et al., 2002). Die Expression von Anx2 konnte in Microglia, Monozyten sowie in primären Makrophagen nachgewiesen werden (Siao et al., 2002; Brownstein et al., 2004; Diakonova et al., 1997).

Vor kurzem konnte die Rolle von Anx2 als Bindungspartner des Gag-Vorläuferproteins von HIV-1 in primären Makrophagen beschrieben werden (Ryzhova et al., 2006). Diese Interaktion wird über den N-Terminus des zellulären Proteins vermittelt. Bei der Kolokalisation der beiden Proteine an den späten Endosomen der Makrophagen wird Anx2 eine direkte Rolle bei der Bildung sowie Exozytose HIV-Partikel enthaltender endosomaler Vesikel zugeschrieben (Ryzhova et al., 2006). Die Bindung von Annexin 2 mit dem Gag-Vorläuferprotein von HIV-1 stellt damit beispielhaft die Interaktion eines zellulären Strukturproteins mit einem retroviralen Gag-Protein während dessen komplexer Maturation dar.

Bei der Interpretation der Resultate der durchgeführten Pulldownanalysen muss berücksichtigt werden, dass die Proteine in diesen Versuchsansätzen *in vitro* und in sehr großen Mengen exprimiert werden. Die Untersuchungsbedingungen entsprechen dabei nicht dem nativen zellulären Milieu, auch die Zellkompartimentierung wird nicht berücksichtigt. Um auszuschließen, dass es sich bei den gezeigten Protein-Interaktionen um versuchsbedingte Artefakte handelt, wurden unterschiedliche Gag-Proteine auf ihr Interaktionsmuster mit Bec1 getestet. Durch Pulldown-Analysen wurde die Interaktion von Gag-Proteinen verschiedener Retroviren mit Bec1 untersucht (Abb. 6.10). Während für die Gag-Proteine von HERV-W und MSRV eine Bindung an Bec1 gezeigt werden konnte (Abb. 6.10 (a)), war das Ergebnis der Pulldownanalyse für HERV-K und HIV (Abb. 6.10 (b))

diesbezüglich negativ. Aufgrund dieser Resultate ist es unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse der *in vitro*-Bindungsanalyse für HERV-W Gag artefaktbedingt waren.

7.3 Darstellung der Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1 durch Immunfluoreszenz

Nachdem die Bindung von HERV-W SU und Bec1 *in vitro* durch Pulldownanalysen dargestellt wurde, erfolgte eine *in vivo*-Untersuchung beider Proteine mittels Immunfluoreszenz. Die dafür verwendeten Hela-Zellen wurden mit pHCMV-HERV-W SU und pEGFP-Bec1 transfiziert. Während Bec1 als grün fluoreszierendes EGFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, konnte HERV-W SU mittels rot fluoreszierendem Zweitantikörper nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Reagenz, das in der Fixationslösung von Vectashield enthalten war, angefärbt. Die konventionell- mikroskopisch untersuchten Zellen zeigten eine intra-zytoplasmatische Kolokalisation von EGFP-Bec1 und HERV-W SU, während die Zellkerne vom Fluoreszenzsignal ausgespart blieben (Abb. 6.13). Dieses Ergebnis konnte durch die konfokal-mikroskopische Untersuchung bestätigt werden (Abb. 6.14).

Die Maturation des Kaliumkanals Bec1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Aufgrund der Untersuchung anderer spannungsgesteuerter Kaliumkanäle lässt sich vermuten, dass die mRNA des Kanals aus dem Nukleus exportiert wird und an Ribosomen translatiert wird. Nach Integration in das endoplasmatische Retikulum findet die Zusammenlagerung der Kanalproteine zu einem "Dimer von Dimeren" statt (vgl. Kap. 3.4.3), wobei dies bei einigen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen über eine aminoternale T1-Domäne (= first tetramerization domain) oder zusätzliche Proteinerkennungsdomänen vermittelt wird (Delisle et al., 2004). Das Protein gelangt anschließend über den Golgi-Apparat durch zytoskelettale Transportmechanismen zu seinem Bestimmungsort in der Zellmembran. Die beobachteten Signale von Bec1 in der Immunfluoreszenz (Abb. 6.12, 6.13 und 6.14) entsprechen somit denen von im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteinen.

Das durch den ERVWE1-Locus auf Chromosom 7q kodierte 538AS große HERV-W Env Vorläuferprotein verhält sich bezüglich seiner Prozessierung ähnlich einem exogenen retroviralen Oberflächenprotein. Homotrimere des Vorläuferproteins werden im *trans*-Golgi-Apparat proteolytisch zwischen AS 317 und 318 in HERV-W SU und TM gespalten. Es erfolgt eine anschließende Zusammenlagerung der

beiden Untereinheiten und ihr Transport als SU-TM-Trimer zur Zellmembran (Cheynet et al., 2005). Die Lokalisation des durch Antikörper-Detektion in Hela-Zellen dargestellten HERV-W SU Proteins entspricht damit einem zytoplasmatisch synthetisierten viralen Hüllprotein (Colman und Lawrence, 2003).

Bei den durchgeführten Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchten Hela-Zellen transfiziert wurden, somit eine quantitativ höhere Konzentration der analysierten Proteine im Zellmilieu vorhanden war und die Ergebnisse sich daher als Artefakt der Transfektion darstellen könnten. Des Weiteren sollte bedacht werden, dass Bec1 als Fusionsprotein mit einem 24kDa großen EGFP-Tag exprimiert wurde, welcher aufgrund seiner Größe die Lokalisation des Fusionsproteins beeinflussen könnte (Giepmans et al., 2006). Dies konnte jedoch durch immunzytochemische Färbung des Bec1-Proteins ohne Tag mit Anti-Bec1 Serum widerlegt werden. Beide Proteine kolokalisieren in gleicher Weise und es ergibt sich ein ähnliches Bild wie in den Abb. 6.11, 6.12 und 6.13 (Daten nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die Lokalisation des Proteins nicht durch den Tag beeinflusst wurde. Für die Detektion von HERV-W SU durch Immunfluoreszenz wurde ein Anti-Bec1 Antikörper (Kaninchen) verwendet. Dieser wurde im Vorfeld bezüglich seiner Spezifität gegen Bec1 in eukaryotischen Systemen getestet, so dass falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden können.

7.4 Darstellung der *in vivo*-Interaktion von HERV-W SU und Bec1 durch Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Da in den Vorversuchen eine *in vitro*-Interaktion und Kolokalisation von HERV-W SU und Bec1 gezeigt werden konnte, sollte nun dargestellt werden, ob beide Proteine auch *in vivo* interagieren. Hierfür wurden Immunpräzipitationen und Co-Immunpräzipitationen durchgeführt.

In Abb. 6.16 sind die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation von HERV-W SU und Bec1 dargestellt. Bec1 konnte in der Immunpräzipitation in den Spuren 2 und 5 auf einer Höhe von ca. 126kDa mit Hilfe von Anti-Bec1 Serum dargestellt werden. Für die Co-Immunpräzipitation wurde der Blot mit Anti-HERV-W Env Serum inkubiert. Trotz der Schwärzung des Röntgenfilms im Bereich von 40kDa (Spur 5) ist eine

eindeutige Bande auf dieser Höhe nicht erkennbar. In diesem Fall war die Co-Immunpräzipitation von HERV-W SU und Bec1 nicht eindeutig nachweisbar.

Weiterhin wurde die Immunpräzipitation mit Anti-HERV-W Env Serum durchgeführt (Abb. 6.15). Das SU-Protein konnte in den Spuren 3 und 5 nachgewiesen werden. Für die Co-Immunpräzipitation wurde Bec1 auf einer Höhe von ca. 126kDa mit Hilfe von Anti-Bec1 Serum detektiert. In den dabei durchgeführten Kontrollen zeigten sich keine Banden entsprechender Größe. Diese Ergebnisse legen die *in vivo*-Interaktion von HERV-W SU und Bec1 nahe.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass auch hier aufgrund der hohen Proteinkonzentration nach der Transfektion der Zellen falsch positive Ergebnisse möglich sind. Dagegen sprechen jedoch die Vorexperimente und deren Resultate, die eine Interaktion beider Proteine zeigten. Die eingesetzten Antikörper (Anti-Bec1 und Anti-HERV-W Env Serum, Kap. 4.3.2) wurden bereits in Vorexperimenten verwendet und waren spezifisch bezüglich ihres Epitops.

7.5 Nachweis des Kaliumkanals Bec1 in verschiedenen Zellen und Zelllinien

Nachdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Interaktion von HERV-W SU und Bec1 gezeigt werden konnte, wurden unterschiedliche Zellen und Zelllinien auf ihre Expression des Kaliumkanalproteins Bec1 untersucht. Der Kanal wurde in den untersuchten Zellen durch Immunpräzipitation mit Hilfe von Anti-Bec1 Serum nachgewiesen.

In den untersuchten adhärennten Zelllinien zeigte sich die Expression von Bec1 in zwei Nierenepithel-Zelllinien. Sowohl für Cos1- als auch für 293-Zellen konnte eine Bande auf Höhe von 126kDa dargestellt werden (Abb. 6.17). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren Studien, in denen das Bec1-Transkript nicht in Nierengewebe nachgewiesen wurde (Miyake et al., 1999). Möglicherweise liegt der Unterschied darin begründet, dass in dieser Studie natives Nierengewebe untersucht wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit immortalisierte Nierenepithel-Zelllinien getestet wurden.

Auch in Hela- und CD4⁺-Hela-Zellen konnte das Bec1-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 6.17(a)). Die Expression von Bec1 wurde zudem in Tumorzelllinien des Gehirns gezeigt (Gos3, eine Astrozytom-Zelllinie und LN405, eine Glioblastom-Zelllinie) (Abb. 6.17). Diese Beobachtung ergänzt die Resultate der Arbeitsgruppe von Miyake, die Bec1 im humanen Enzephalon nachweisen konnte,

insbesondere in den Regionen des zerebralen Kortex, des Kleinhirns, des Putamens, des Corpus amygdaloideum, des Nucleus caudatus, des Hippocampus und der Substantia nigra (Miyake et al., 1999; Zou et al., 2003). Des Weiteren konnte *Bec1* in der vorliegenden Arbeit in einer Fibroblasten- sowie einer Keratinozyten-Zelllinie (HCAT) nachgewiesen werden.

Neben adhärennten Zelllinien wurden auch unterschiedliche Suspensionszelllinien durch Immunpräzipitation auf die Expression des Kaliumkanals getestet. Die dafür in dieser Arbeit untersuchten T-Zelllinien (Jurkat, A 3.01; Abb. 6.18) zeigten dabei eine *Bec1*-spezifische Bande bei ca. 126kDa. Der Nachweis von *KCNH3*-Transkripten gelang auch schon bei MOLT-4, einer Zelllinie, welche aus einer humanen T-Zell-Leukämie isoliert wurde (Smith et al., 2002). Die Untersuchung einer immortalisierten BLCL-Zelllinie aus PBMCs eines Spenders erbrachte ebenfalls den Nachweis der Expression von *Bec1* (Abb. 6.18), was die Ergebnisse früherer Studien zur Darstellung des Kaliumkanals in B-Zelllinien (BL2, Raji, Ramos und BCLL) bestätigte (Smith et al., 2002). Interessanterweise konnte das Transkript von *Bec1* in den ursprünglichen nativen PBMC-Zellen vor der Immortalisation mit EBV-B95-8 nicht nachgewiesen werden (Abb. 6.18). Unter PBMC werden die in peripherem Blut vorkommenden monozytären und lymphozytären Zellen zusammengefasst – darunter auch die in Kap. 6.5.2 untersuchten BLCL-Zellen, die eine Expression von *Bec1* zeigten. Da PBMC-Zellen demnach einen Zell-Mix darstellen, in dem BLCL-Zellen lediglich einen kleinen Anteil ausmachen, war die fehlende *Bec1*-Bande in Abb. 6.18 wahrscheinlich auf einen Verdünnungseffekt durch *Bec1*-negative monozytäre Zellen im isolierten "buffy coat" zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die neu aufgetretene Expression von *Bec1* durch Transfektion der PBMCs mit EBV-B95-8 hervorgerufen wurde. Daher lässt sich spekulieren, ob *Bec1* eine mögliche biologische Relevanz in der Virusreplikation haben könnte. Eine weitere Ursache könnte evtl. die durch die Immortalisation bedingte erhöhte Mitoserate oder der daraus resultierende erhöhte Zellmetabolismus sein. Die Expression von *Bec1* in den bis heute untersuchten Tumorzelllinien könnte die zuletzt aufgestellten Theorien gegebenenfalls bestätigen.

7.6 Funktionelle Bedeutung von HERV-W Env

Die Expression des Syncytin-Gens konnte bisher in Form von zwei Transkripten mit einer Größe von vier beziehungsweise acht Kilobasen nachgewiesen werden, wobei in der Plazenta beide Transkripte vorkommen und im Hoden das acht Kilobasen

große Transkript dominiert (Mi et al., 2000). HERV-W ist ein Beispiel dafür, dass die Integration von retroviralen Genen während der Evolution eine wichtige physiologische Rolle übernimmt, jedoch gleichzeitig auch pathologische Bedeutung haben kann. Durch positive evolutionäre Selektion des HERV-W *env* Gens bekommt Syncytin als retrovirales Protein entscheidenden Einfluss in der Kaskade der Entstehung der Syncytiotrophoblasten während der plazentaren Entwicklung (Frendo et al., 2003; Mi et al. 2000; Blond et al., 2000). Dabei korreliert die Expression von Syncytin auf RNA-Ebene mit dem Anstieg von hCG (humanes Choriongonadotropin), das von den Syncytiotrophoblasten synthetisiert wird (Frendo et al., 2003). Eine verminderte Syncytin-Synthese konnte bei Schwangerschaftserkrankungen wie Gestosen gezeigt werden (Präeklampsie, HELLP), die mit einer verminderten Bildung von Syncytiotrophoblasten einhergehen (Knerr et al., 2002). Zusätzlich zu seiner fusogenen Funktion werden weitere Bedeutungen von HERV-W Env in der Plazenta diskutiert. In der TM Region (AS 380-396) konnte eine immunosuppressive Domäne nachgewiesen werden, die möglicherweise eine maternale Immunantwort gegen den Fetus verhindert (Blond et al., 1999; Pötgens et al., 2004). Des Weiteren könnte Syncytin evtl. die vertikale Transmission retroviraler Infektionen durch die Plazenta verhindern (Ponferrada et al., 2003; Pötgens et al., 2004).

Neben seinem Vorkommen in Plazenta und Hoden konnten HERV-W Transkripte auch im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden, nachdem zuvor extrazelluläre MSRV-Partikel, die der HERV-W Familie zugeordnet wurden, bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) entdeckt wurden (Perron et al., 1997; Blond et al., 1999). Diese pathophysiologische Rolle wird möglicherweise durch die Hochregulierung von HERV-W Transkripten in Gliazellen vermittelt. Die Syncytin-Expression in Astrozyten führt zur Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen, die für Oligodendrozyten toxisch sind und eine Demyelinisierung der Nervenzellfortsätze bewirken (Antony et al., 2004). Das daraus resultierende inflammatorische Zellmilieu führt zu einer Verminderung der Expression des Syncytin-Rezeptors hASCT1 (humaner Natrium-abhängiger neutraler Aminosäure-Transporter Typ 1) in Astrozyten. Dieser Aminosäure-Transporter ist unter anderem für die Aufrechterhaltung des Glutamat-Milieus verantwortlich. Der Verlust von hASCT1 in Astrozyten bei neurodegenerativen Erkrankungen führt zu Glutamat-vermitteltem zytotoxischem Schaden und Untergang von Neuronen. Bei MS-Patienten konnte neben dem Nachweis von Syncytin-Transkripten in Gliazellen auch ein signifikant erhöhtes

Level von HERV-W *env* Sequenzen in PBMC nachgewiesen werden. Die Präsenz von HERV-W assoziierten Partikeln korreliert mit dem Krankheitsverlauf und kann als prognostischer Marker für MS angesehen werden. So macht der Nachweis dieser Partikel bei einer vorhandenen Optikusneuritis, welche bei einem Teil der Patienten als Primärsymptom der MS angesehen wird, den Übergang in eine manifeste Multiple Sklerose sehr wahrscheinlich (Mameli et al. 2007). Der Nachweis von MSR / HERV-W RNA-Sequenzen gelang auch im gesunden Gehirn, jedoch konnten keine zugehörigen exprimierten Proteine dargestellt werden. Diese Diskrepanz zwischen RNA- und Proteinnachweis konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es lässt sich spekulieren, dass bei diesem Entstehungsmodell der Multiplen Sklerose bei der Translation von RNA zu Protein posttranslationale Prozesse beteiligt sind.

Auf Grund der oben genannten Beispiele, welche die Interaktion von HERV-W Env mit zellulären Rezeptoren und Proteinen darstellen und zu pathologischen Effekten führen, könnte die Assoziation von HERV-W Env und Bec1 eine Rolle in der Entstehung von Krankheitsprozessen spielen.

7.7 Funktionelle Bedeutung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

Zum besseren Verständnis und zur späteren Hypothesenformulierung soll kurz auf die Prozessierung von Bec1 eingegangen werden. Da bis jetzt nur wenig über dieses Kaliumkanalprotein bekannt ist, werden die Funktionen und Interaktionen anhand von Informationen über andere spannungsgesteuerte Kaliumkanäle erläutert.

7.7.1 Maturation von Kaliumkanalproteinen

Nach der Transkription und dem Splicevorgang findet der Export der mRNA aus dem Nukleus in das zytosolische Kompartiment und zum Ort der Translation, dem ribosomalen endoplasmatischen Retikulum (ER), statt (Delisle et al., 2004). An der ER-Membran erfolgt die Zusammenlagerung der funktionellen Untereinheiten des Kanalproteins zu einem Tetramer (Kv-Kanäle) oder bei einigen Kanälen zunächst als Dimer, worauf wiederum eine Zusammenlagerung zweier Dimere stattfindet (Kosolapov und Deutsch, 2003). Diese Dimerbildung von Dimeren wird bei manchen Kaliumkanälen durch die aminoterminalen T1-Domäne der Aminosäuresequenz

vermittelt (Delisle et al., 2004; Kosolapov und Deutsch, 2003). Da nicht alle Kaliumkanäle über eine T1-Domäne verfügen, beschreibt eine weitere Hypothese die Rolle des C-terminalen Endes bei der Multimerausbildung des Kanals (Kanki et al., 2004; Schwake et al., 2003). So bilden die C-terminalen Untereinheiten von KCNQ- (eine weitere Familie spannungsgesteuerter Kaliumkanäle) oder HERG-Kanälen sogenannte "coiled-coil"-Strukturen aus, die für die Tetramerisierung wesentlich sind (Jenke et al., 2003). Untersuchungen an verschiedenen Ionenkanälen zeigten die Bedeutung des C-Terminus für den ER-Export, die Maturation, die Proteinstabilität sowie die Oberflächenexpression des Kanals (Ma et al., 2001; Gentzsch und Riordan, 2001; Haardt et al., 1999). Die Deletion der Aminosäuren 860-899 im C-Terminus von HERG-Kanälen führt zu einer verminderten Expression des Kanals an der Zelloberfläche und wird so als möglicher Pathomechanismus für die Entstehung des Long-QT-Syndroms diskutiert (Akhavan et al., 2003; Ficker et al., 2000). Der Export des Kaliumkanals aus dem endoplasmatischen Retikulum unterliegt komplexen Kontrollmechanismen. Liegt beispielsweise eine inkorrekte Faltung oder Zusammenlagerung von HERG-Kanalproteinen vor, wobei hydrophobe Anteile der Aminosäuresequenz in Richtung Zytosol zeigen, so führt dies zur Degradierung des Proteins durch Proteasomen (Asher et al., 2006). Des Weiteren kontrollieren ER-Retentionssignale die richtige Proteinzusammensetzung. Bei korrekter Faltung werden diese Signale maskiert und somit wird eine Bindung an ER-Proteine mit Chaperon-Funktion verhindert (Ma und Jan, 2002). Ein solches Retentionsmotiv stellt RXR (R = Arginin, X = variable Aminosäure) bei *erg1*-Kanälen (HERG) dar (Kupersmidt et al., 2002). Auch die Aminosäuresequenz von *KCNH3* enthält solche RXR-Motive, die möglicherweise bei inkorrekt gefalteter Tertiärstruktur von *Bec1* den ER-Export verhindern. Im Gegensatz dazu bewirkt die Ausbildung bestimmter Motive den Weitertransport von Proteinen zum Golgi-Apparat. Bei HCN2- (Hyperpolarisations-aktivierter Kationenkanal Typ2), HERG- und *erg3*-Kanälen stellt das Motiv der cNBD (cyclic nucleotide binding domain) ein solches Signal dar (Akhavan et al., 2005). Strukturanalysen zeigen, dass eine solche Domäne auch in der C-terminalen Region von *KCNH3* vorhanden ist. Daraus lässt sich ableiten, dass der C-Terminus von *Bec1* möglicherweise eine wesentliche Funktion während des Transports des Kanalproteins zum Golgi-Apparat übernimmt. Dort finden eine weitere Prozessierung sowie die Markierung des Kaliumkanals für das Zielkompartiment statt. Durch Glykosylierung von HERG-Kanälen kann so eine erhöhte Stabilität der

Faltung des Proteins erreicht werden (Gong et al., 2002). Der Export aus dem Golgi-Apparat unterliegt ebenfalls der Kontrolle durch andere Proteine. So wird der vesikuläre Transport von HERG durch das *cis*-Golgi-assoziierte GM130-Protein gesteuert, welches an den C-Terminus des Kaliumkanalproteins bindet (Roti et al., 2002). Der zielgerichtete Transport zur endgültigen Lokalisation des Kaliumkanals in der Zellmembran wird über zytoskelettale Strukturen vermittelt. Der Kaliumkanal Kv1.5 gelangt über Dynamamin und Dynein zur Plasmamembran, während Kv4.2 über eine prolinreiche Region mit Filamin interagiert (Choi et al., 2005). Zudem konnte Filamin die Expression von Kv4.2 an der Zelloberfläche erhöhen (Petrecca et al., 2000). Da die Aminosäuresequenz von *KCNH3* ebenfalls eine prolinreiche Domäne im Bereich zwischen AS 951-1057 besitzt, lässt sich spekulieren, ob auch Bec1 durch Interaktion über diese Region mit Filamin das Strukturnetzwerk der Zelle nutzt, um zur Plasmamembran zu gelangen. Interessanterweise liegt die prolinreiche Sequenz von Bec1 auf dem C-Terminus, welcher, wie vorweg schon beschrieben, bei HERG-Kanälen für das Targeting zur Plasmamembran verantwortlich ist.

7.7.2 Interaktion spannungsgesteuerter Kaliumkanäle mit zellulären Proteinen

Die Interaktion spannungsgesteuerter Kaliumkanäle mit zellulären Proteinen soll anhand von MinK und MiRP1 erläutert werden, welche hierbei eine regulatorische Funktion ausüben. Das 129AS große MinK, welches durch *KCNE1* kodiert wird und in Gleichgewichtsorgan, Niere und Herz von Säugern exprimiert wird, ist an der Formation von HERG- und KvLQT1 beteiligt und bildet dabei mit den Kanalproteinen einen stabilen Komplex (McDonald et al., 1997). Es wird angenommen, dass die Zusammenlagerung von regulatorischem Protein und Kaliumkanalprotein bereits in der frühen Phase der Proteinsynthese (endoplasmatisches Retikulum) stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel der beiden Proteine den Anteil der an der Zelloberfläche von Kardiomyozyten exprimierten aktiven HERG-Kanäle erhöht, ohne dabei die Gesamtexpression der Kanalproteine zu verändern. Die Komplexbildung aus MinK und spannungsgesteuertem Kanal bewirkt schließlich eine Veränderung der Spannungssensibilität für Aktivierung und Inaktivierung des Kanals (McDonald et al., 1997). Ein weiteres regulatorisches Protein, das mit HERG-Kanälen assoziiert werden kann, ist MiRP1 (MinK-related peptide 1), ein 123AS großes integrales

Membranprotein (Genlocus *KCNE2*) mit einer Transmembrandomäne. Ähnlich wie MinK beeinflusst MiRP1 die Kinetik von spannungsabhängigen Kaliumkanälen wie HERG und konnte durch Mutationsuntersuchungen mit der Entstehung kardialer Arrhythmien (Long-QT-Syndrom) in Zusammenhang gebracht werden (Abbott et al., 1999). Die Interaktion zwischen MinK bzw. MiRP1 und spannungsgesteuerten Kaliumkanälen bewirkt dabei eine Erhöhung der Leitfähigkeit von repolarisierenden Kanälen und eine Verlangsamung ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik. MinK und MiRP können somit als Beispiel für die regulatorische Rolle zellulärer Proteine bezüglich der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung von Kaliumkanälen herangezogen werden.

7.7.3 Wechselwirkung zwischen Kaliumkanälen und retroviralen Proteinen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion (endogener) retroviraler Proteine mit Kaliumkanälen charakterisiert. Ein weiteres Beispiel für eine solche Wechselwirkung stellen HIV-1 Vpu und TASK-1 dar. Neben Nef, Vpr und Vif zählt Vpu (virales Protein U) zu den akzessorischen HIV-Proteinen und ist dabei HIV-1 spezifisch. Das 81AS große Vpu besitzt die Eigenschaften eines Klasse I integralen Membranproteins und ist zur Homooligomerbildung fähig, weshalb eine Eigenschaft von Vpu als unselektiver Kationenkanal diskutiert wurde (Strebel, 1989; Maldarelli, 1993; Bour und Strebel, 2003). Alternativ zu dieser Theorie wurde vermutet, dass Vpu durch Interaktion mit bestehenden zellulären Kationenkanälen deren Leitfähigkeit verändern könnte (Lamb und Pinto, 1997). Für den N- und C-Terminus des akzessorischen HIV-1-Proteins konnten unterschiedliche Funktionen im viralen Zyklus beschrieben werden. Das 27AS umfassende hydrophobe N-terminale Ende besitzt eine Transmembrandomäne, die als Membrananker dient und vermutlich an der Freisetzung der Viruspartikel beteiligt ist (Maldarelli et al., 1993; Tiganos et al., 1998). Trotz seiner HIV-1-Spezifität ist Vpu jedoch in der Lage, die Freisetzung der Partikel anderer Retroviren, die keine Vpu-ähnlichen akzessorischen Proteine exprimieren, signifikant zu erhöhen (Göttlinger et al. 1993). Der hydrophile C-Terminus von Vpu besitzt katalytische Aktivität und vermittelt durch seine Phosphorylierung die Degradierung von CD4 im endoplasmatischen Retikulum (Friborg et al., 1995; Tiganos et al., 1998). Durch Ausbildung eines Multiproteinkomplexes aus Vpu, CD4 und β -TrCP wird dabei die Halbwertszeit von CD4 von ungefähr sechs Stunden auf ca. fünfzehn Minuten reduziert (Strebel,

2004). Des Weiteren vermindert die Interaktion von Vpu und CD4 die Oligomerisierung von Vpu und damit die Viruspartikelfreisetzung (Bour et al., 1999). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Vpu mit dem N-Terminus des zellulären Kaliumkanals TASK-1 interagiert (Hsu et al., 2004). TASK-1 (Genlocus *KCNK3*) ist ein pH-sensitiver Kaliumkanal, der zwei Membranporen besitzt und an der Regulation des Ruhemembranpotentials in Zellen von Herz, ZNS, Lunge, Niere, Plazenta sowie in peripheren Blutzellen (u.a. CD4⁺-Lymphozyten) beteiligt ist. Aufgrund einer Sequenzhomologie von 24% zwischen Vpu und TASK-1 (insbesondere dem N-Terminus) wurde diskutiert, ob Vpu vom zellulären TASK-1 abstammt und während der Evolution von HIV-1 von der Wirtszelle übernommen wurde, so dass es sich in diesem Fall um so genannte "molekulare Piraterie" handeln würde (Hsu et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Hsu konnte zeigen, dass Vpu mit TASK-1 interagiert, indem es in der Art eines "funktionellen Mimikris" als α -Untereinheit des Kaliumkanals fungiert und so die Heterooligomerbildung zwischen Vpu und den Untereinheiten von TASK-1 bewirkt. Solche Komplexbildungen zwischen Kaliumkanälen und kleinen integralen Membranproteinen, wie sie auch für HERG und MiRP1 / MinK beschrieben wurden, können die ursprünglichen Kanaleigenschaften und darüber hinaus Maturation und Trafficking der α -Untereinheiten verändern (Abbott et al., 1999; McDonald et al., 1997; Hsu et al., 2004; siehe Kap. 7.7.2). Im Falle von Vpu und TASK-1 bringt die Heterooligomerbildung einen negativen Effekt auf die Funktionen beider Proteine mit sich. HEK-293- und A549-Zellen exprimieren in Abwesenheit von Vpu TASK-1-Kanalproteine, die einen Ba²⁺-sensitiven und TEA⁺-insensitiven Auswärtsstrom erzeugen. Durch Co-Expression von Vpu kommt es zur Unterdrückung und nach Erhöhung der Vpu-DNA schließlich zum kompletten Auslöschen des TASK-1 spezifischen Stroms. Im Gegenzug bewirkt die Expression von TASK-1 in Hela-Zellen eine dosisabhängige zwei- bis dreifache Reduktion der Freisetzung von HIV-1-Partikeln. Diese resultiert aus der Einschränkung der Vpu-Funktion durch die Heterooligomerbildung mit TASK-1.

Am Beispiel des akzessorischen HIV-1-Proteins Vpu und des zellulären Kaliumkanals TASK-1 konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von retroviralen Proteinen die funktionellen Eigenschaften hinsichtlich der Ströme von Kaliumkanälen der Wirtszelle verändern kann. Ein ähnlicher Zusammenhang könnte möglicherweise auch zwischen dem endogenen retroviralen Protein HERV-W SU und dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Bec1 bestehen. Das

Oberflächenprotein von HERV-W könnte dabei ebenfalls als α -Untereinheit mit Bec1 interagieren und somit die elektrischen Eigenschaften des Kanalproteins beeinflussen. Vpu beeinflusst durch Bindung an das N-terminale Ende von TASK-1 dessen Leitfähigkeit, während die Interaktion von HERV-W SU mit Bec1 durch dessen C-Terminus vermittelt wird (Abb. 6.6). Für Shaker-Kaliumkanäle konnte die Bedeutung des C-Terminus für das "Gating" des Kanals und damit für die Veränderung des Ionenmilieus beschrieben werden (Yellen, 2000). Die Bindung von Ca^{2+} an der C-terminalen Calmodulin-Bindungsdomäne (an die Calmodulin fest gebunden ist) führt zur Dimerisierung dieses Komplexes mit Ca^{2+} , was zur Konformationsänderung und damit zur Öffnung des Kaliumkanals führt. Daher könnte möglicherweise auch die Bindung von HERV-W SU am C-Terminus von Bec1 die Ionenleitfähigkeit des Kanals verändern.

Elektrophysiologische Untersuchungen, beispielsweise mittels "Patch-Clamp"-Technik, könnten eine solche Theorie in weiteren Versuchen möglicherweise bestätigen und einen funktionellen Effekt der Bindung von HERV-W-Proteinen an Bec1 aufzeigen.

7.8 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen (Env, Gag) des humanen endogenen Retrovirus W (HERV-W) und des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Bec1 mittels unterschiedlicher *in vitro*- und *in vivo*-Methoden nachgewiesen werden. Nachdem bereits die Bindung verschiedener endo- und exogener Retroviren (HERV-K, MSR, HTLV-1 und HIV-1; AG Müller-Lantzsch) mit Bec1 gezeigt werden konnte, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Interaktionen nach Expression der retroviralen Proteine in der Wirtszelle. Die vorliegenden Daten könnten dabei als Grundlage für weitere Forschungen, evtl. auch im Bereich der Pathogenese der Multiplen Sklerose, die in den letzten Jahren verstärkt mit der Expression von HERV-W-Proteinen in Zusammenhang gebracht wurde, herangezogen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. **Abbott GW**, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999): MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 97(2):175-87.
2. **Akhavan A**, Atanasiu R, Shrier A (2003): Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J Biol Chem*. 278(41):40105-12.
3. **Akhavan A**, Atanasiu R, Noguchi T, Han W, Holder N, Shrier A (2005): Identification of the cyclic-nucleotide-binding domain as a conserved determinant of ion-channel cell-surface localization. *J Cell Sci*. 118(Pt 13):2803-12.
4. **Antony JM**, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004): Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*. 7(10):1021-3.
5. **Antony JM**, Zhu Y, Izad M, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F, Power C (2007): Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(10):1251-6.
6. **Asher G**, Reuven N, Shaul Y (2006): 20S proteasomes and protein degradation "by default". *Bioessays*. 28(8):844-9.
7. **Barbulescu M**, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, Lenz J (1999): Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol*. 9(16):861-8.
8. **Barré-Sinoussi F** (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599):868-71.
9. **Bittner JJ** (1936): Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 84:162-169.
10. **Blond JL**, Besème F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet (1999): F. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*. 73(2):1175-85.
11. **Blond JL**, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL (2000): An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta

- and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol.* 74(7):3321-9.
12. **Bodmer S**, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A (1989): Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol.* 143(10):3222-9.
 13. **Bolivar F**, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene.* (2):75-93.
 14. **Boukamp P**, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106(3):761-71.
 15. **Bour S**, Perrin C, Strebel K (1999): Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem.* 274(47):33800-6.
 16. **Bour S**, Strebel K (2003): The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5(11):1029-39.
 17. **Brownstein C**, Deora AB, Jacovina AT, Weintraub R, Gertler M, Khan KM, Falcone DJ, Hajjar KA (2004): Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. *Blood.* 103(1):317-24.
 18. **Bukrinsky MI**, Haffar OK (1999): HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci.* 4:D772-81.
 19. **Burnette WN** (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112(2):195-203.
 20. **Chaconas G**, van de Sande JH (1980): 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* 65(1):75-85.
 21. **Chelly J**, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989): Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(8):2617-21.
 22. **Cheyne V**, Ruggieri A, Oriol G, Blond JL, Boson B, Vachot L, Verrier B, Cosset FL, Mallet F (2005): Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol.* 79(9):5585-93.

23. **Cheyne V**, Oriol G, Mallet F (2006): Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology*. 3:41.
24. **Choi KL**, Aldrich RW, Yellen G (1991): Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(12):5092-5.
25. **Choi WS**, Khurana A, Mathur R, Viswanathan V, Steele DF, Fedida D (2005): Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ Res*. 97(4):363-71.
26. **Coffin JM**, Hughes SH, Varmus HE (1997): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 1-19.
27. **Colman PM**, Lawrence MC (2003): The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(4):309-19.
28. **Costas J** (2002): Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol Biol Evol*. 19(4):526-33.
29. **del Camino D**, Yellen G (2001): Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁽⁺⁾ channel. *Neuron*. 32(4):649-56.
30. **Delisle BP**, Anson BD, Rajamani S, January CT (2004): Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ Res*. 94(11):1418-28.
31. **Diakonova M**, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, van der Vusse G, Griffiths G. (1997): Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci*. 110 (Pt 10):1199-213.
32. **Donnelly SR**, Moss SE (1997): Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci*. 53(6):533-8.
33. **Doyle DA**, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280(5360):69-77.
34. **DuBridges RB**, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 7(1):379-87.
35. **Dugaiczyk A**, Boyer HW, Goodman HM (1975): Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol*. 96(1):171-84.
36. **Ellermann V**, Bang O (1908): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Centralbl. Bakteriol*. 46:595-609.

37. **Faure AV**, Migné C, Devilliers G, Ayala-Sanmartin J (2002): Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp Cell Res.* 276(1):79-89.
38. **Ficker E**, Dennis AT, Obejero-Paz CA, Castaldo P, Taglialatela M, Brown AM (2000): Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome *J Mol Cell Cardiol.* 32(12):2327-37.
39. **Fields S**, Song O (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340(6230):245-6.
40. **Flynn GE**, Zagotta WN (2001): Conformational changes in S6 coupled to the opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron.* 30(3):689-98.
41. **Folks T**, Benn S, Rabson A, Theodore T, Hoggan MD, Martin M, Lightfoote M, Sell K (1985): Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(13):4539-43.
42. **Forsman A**, Yun Z, Hu L, Uzhameckis D, Jern P, Blomberg J (2005): Development of broadly targeted human endogenous gammaretroviral pol-based real time PCRs Quantitation of RNA expression in human tissues. *J Virol Methods.* 129(1):16-30.
43. **Frendo JL**, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F (2003): Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol.* 23(10):3566-74.
44. **Friberg J**, Ladha A, Göttlinger H, Haseltine WA, Cohen EA (1995): Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 8(1):10-22.
45. **Garson JA**, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H (1998): Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet.* 351(9095):33.
46. **Gentzsch M**, Riordan JR (2001): Localization of sequences within the C-terminal domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator which impact maturation and stability. *J Biol Chem.* 276(2):1291-8.

47. **Giepmans BN**, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY (2006): The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*. 312(5771):217-24.
48. **Gilbert JM**, Mason D, White JM (1990): Fusion of Rous sarcoma virus with host cells does not require exposure to low pH. *J Virol*. 64(10):5106-5113.
49. **Gluzman Y** (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 23(1):175-82.
50. **Goff SP** (2001): Retroviridae: The retroviruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edition, pp. 1871-1939. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
51. **Gong Q**, Anderson CL, January CT, Zhou Z (2002): Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283(1):H77-84.
52. **Göttlinger HG**, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA (1993): Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(15):7381-5.
53. **Graves BJ**, Eisenman RN, McKnight SL (1985): Delineation of transcriptional control signals within the Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat. *Mol Cell Biol*. 5(8):1948-58.
54. **Griffiths DJ** (2001): Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol*. 2(6):REVIEWS1017.
55. **Gulbis JM**, Zhou M, Mann S, MacKinnon R (2000): Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*. 289(5476):123-7.
56. **Gutman GA**, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X (2005): International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 57(4):473-508.
57. **Haardt M**, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL (1999): C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*. 274(31):21873-7.

58. **Halfter H**, Kremerskothen J, Weber J, Hacker-Klom U, Barnekow A, Ringelstein EB, Stögbauer F (1998): Growth inhibition of newly established human glioma cell lines by leukemia inhibitory factor; *J Neurooncol.* 39(1):1-18.
59. **Hanahan D** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-80.
60. **Hayashida H**, Miyata T (1983). Unusual evolutionary conservation and frequent DNA segment exchange in class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(9):2671-5.
61. **Holmes DS**, Quigley M (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114(1):193-7.
62. **Hoshi T**, Zagotta WN, Aldrich RW (1991): Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron.* 7(4):547-56.
63. **Hsu K**, Seharaseyon J, Dong P, Bour S, Marbán E (2004): Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell.* 14(2):259-67.
64. **Huebner RJ**, Todaro GJ (1969): Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 64(3):1087-1094.
65. **Hughes JF**, Coffin JM (2005): Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. *Genetics.* 171(3):1183-94.
66. **International human genome sequencing consortium** (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822):860-921.
67. **Jenke M**, Sánchez A, Monje F, Stühmer W, Weseloh RM, Pardo LA (2003): C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J.* 22(3):395-403.
68. **Jern P**, Sperber GO, Blomberg J (2005): Use of Endogenous Retroviral Sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology.* 2:50.
69. **Johnston M** (1987): A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 51(4):458-76.
70. **Kanki H**, Kupersmidt S, Yang T, Wells S, Roden DM (2004): A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J Biol Chem.* 279(32):33976-83.

71. **Karlsson H**, Bachmann S, Schröder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH (2001). Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(8):4634-9.
72. **Kim HS**, Kim DS, Huh JW, Ahn K, Yi JM, Lee JR, Hirai H (2008): Molecular characterization of the HERV-W env gene in humans and primates: expression, FISH, phylogeny, and evolution. *Mol Cells.* 26(1):53-60.
73. **Knerr I**, Beinder E, Rascher W (2002): Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 186(2):210-3.
74. **Kosolapov A**, Deutsch C (2003): Folding of the voltage-gated K⁺ channel T1 recognition domain. *J Biol Chem.* 278(6):4305-13.
75. **Kreusch A**, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S (1998): Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature.* 392(6679):945-8.
76. **Kupersmidt S**, Yang T, Chanthaphaychith S, Wang Z, Towbin JA, Roden DM (2002): Defective human Ether-à-go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus. *J Biol Chem.* 277(30):27442-8.
77. **Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
78. **Laimins LA**, Gruss P, Pozzatti R, Khoury G (1984): Characterization of enhancer elements in the long terminal repeat of Moloney murine sarcoma virus. *J Virol.* 49(1):183-9.
79. **Lamb RA**, Pinto LH (1997): Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology.* 229(1):1-11.
80. **Lavillette D**, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL, Kabat D (2002): The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol.* 76(13):6442-52.
81. **Lederberg EM**, Cohen SN (1974): Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 119(3):1072-4.
82. **Lee WJ**, Kwun HJ, Kim HS, Jang KL (2003). Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Mol Cells.* 15(1):75-80.

83. **Lewis PF**, Emerman M (1994): Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol.* 68(1):510-6.
84. **Liu Y**, Holmgren M, Jurman ME, Yellen G (1997): Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron.* 19(1):175-84.
85. **Ma D**, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY (2001): Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science.* 291(5502):316-9.
86. **Ma D**, Jan LY (2002): ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 12(3):287-92.
87. **Maldarelli F**, Chen MY, Willey RL, Strebel K (1993): Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol.* 67(8):5056-61.
88. **Mallet F**, Bouton O, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, Lucotte G, Duret L, Mandrand B. The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology (2004): *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(6):1731-6.
89. **Mameli G**, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, Sotgiu S, Bonetti B, Dolei A (2007): Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 88(Pt 1):264-74.
90. **Mayran N**, Parton RG, Gruenberg J (2003): Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO* 22(13):3242-53.
91. **McClure MO**, Marsh M, Weiss RA. (1988): Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.* 7:513-518.
92. **McDonald TV**, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI (1997): A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature.* 388(6639):289-92.
93. **Mi S**, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 403(6771):785-9.

94. **Miyake A**, Mochizuki S, Yokoi H, Kohda M, Furuichi K (1999): New ether-à-go-go K(+) channel family members localized in human telencephalon. *J Biol Chem.* 274(35):25018-25.
95. **Morais Cabral JH**, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R (1998): Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell.* 95(5):649-55.
96. **Nellåker C**, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H (2006): Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology.* 3:44.
97. **Nelson PN**, Carnegie PR, Martin J, Davari Ejtehadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG (2003): Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol.* 56(1):11-8.
98. **Nermut MV** (1972): Further investigation on the fine structure of influenza virus. *J. Gen. Virol.* 17:317-331.
99. **Paces J**, Pavlíček A, Zika R, Kapitonov VV, Jurka J, Paces V (2004): HERVd: the Human Endogenous RetroViruses Database: update. *Nucleic Acids Res.* 1:32.
100. **Perron H**, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B (1997): Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(14):7583-8.
101. **Perron H**, Lazarini F, Ruprecht K, Péchoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Créange A, Battail-Poirot N, Sibaï G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H (2005): Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol.* 11(1):23-33.
102. **Perron H**, Mekaoui L, Bernard C, Veas F, Stefas I, Leboyer M (2008): Endogenous Retrovirus Type W GAG and Envelope Protein Antigenemia in Serum of Schizophrenic Patients. *Biol Psychiatry* [Epub ahead of print].
103. **Petrecca K**, Miller DM, Shrier A (2000): Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *J Neurosci.* 20(23):8736-44.

104. **Ponferrada VG**, Mauck BS, Wooley DP (2003): The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol.* 148(4):659-75.
105. **Pötgens AJ**, Drewlo S, Kokozidou M, Kaufmann P (2004): Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update.* 10(6):487-96.
106. **Roe T**, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12(5):2099-108.
107. **Roti EC**, Myers CD, Ayers RA, Boatman DE, Delfosse SA, Chan EK, Ackerman MJ, January CT, Robertson GA (2002): Interaction with GM130 during HERG ion channel trafficking. Disruption by type 2 congenital long QT syndrome mutations. *Human Ether-à-go-go-Related Gene. J Biol Chem.* 277(49):47779-85.
108. **Rous P** (1911): A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 13(4):397-411.
109. **Ruprecht K**, Gronen F, Sauter M, Best B, Rieckmann P, Mueller-Lantsch N (2008): Lack of immune responses against multiple sclerosis-associated retrovirus/human endogenous retrovirus W in patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 14(2):143-51.
110. **Ryzhova EV**, Vos RM, Albright AV, Harrist AV, Harvey T, González-Scarano F (2006): Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages. *J Virol.* 80(6):2694-704.
111. **Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91.
112. **Sambrook J**, Fritsch F, Maniatis T (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
113. **Sauter M**, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dölken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haefelin D, Mueller-Lantsch N (1995): Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol.* 69(1):414-21.

114. **Scherer SF** (1953): The utilization of a pure strain of mammalian cells (Earle) for the cultivation of viruses in vitro. I. Multiplication of pseudorabies and herpes simplex viruses. *Am J Pathol.* 29(1):113-37.
115. **Scherer WF**, Syverton JT, Gey GO (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97(5):695-710.
116. **Schneider U**, Schwenk HU, Bornkamm G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 19(5):621-6.
117. **Schwake M**, Jentsch TJ, Friedrich T (2003): A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep.* 4(1):76-81.
118. **Sgaramella V**, van de Sande JH, Khorana HG (1970): Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 67(3):1468-75.
119. **Siao CJ**, Tsirka SE (2002): Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci.* 22(9):3352-8.
120. **Smith GA**, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FW, Schlichter LC (2002): Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 277(21):18528-34.
121. **Strebel K**, Klimkait T, Maldarelli F, Martin MA (1989): Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J Virol.* 63(9):3784-91.
122. **Strebel K** (2004): HIV-1 Vpu: putting a channel to the TASK. *Mol Cell.* 14(2):150-2.
123. **Studier FW**, Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189(1):113-30.
124. **Temin HM** (1964): Malignant transformation in cell cultures. *Health Lab Sci.* 1:79-83.
125. **Temin HM**, Mizutani S (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 226(5252):1211-3.

126. **Tiganos E**, Friborg J, Allain B, Daniel NG, Yao XJ, Cohen EA (1998): Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology*. 251(1):96-107.
127. **Toby GG**, Golemis EA (2001): Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods*. 24(3):201-17.
128. **Tönjes RR**, Löwer R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, König H, Korbmacher C, Limbach C, Lugert R, Phelps RC, Scherer J, Thelen K, Löwer J, Kurth R (1996): HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 13 Suppl 1:S261-7.
129. **Towbin H**, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.
130. **Venter JC** et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507):1304-51.
131. **Villesen P**, Aagaard L, Wiuf C, Pedersen FS (2004): Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology*. 1:32.
132. **Voisset C**, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G (2000): Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16(8):731-40.
133. **Wallner M**, Meera P, Toro L (1996): Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(25):14922-7.
134. **Weiss RA** (1969): The host range of Bryan strain Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. *J Gen Virol*. 32:511-528.
135. **Weiss RA** (2006): The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 3:67.
136. **Yellen G** (2002): The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 419(6902):35-42.

-
137. **Yoshida M**, Miyoshi I, Hinuma Y (1982): Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(6):2031-5.
138. **Zou A**, Lin Z, Humble M, Creech CD, Wagoner PK, Kraffe D, Jegla TJ, Wickenden AD (2003): Distribution and functional properties of human KCNH8 (Elk1) potassium channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(6):C1356-66.

9. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Klemens Ruprecht, Pearl van Heteren, Michael Glas, Madeleine Herrmann, Marlies Sauter, Barbara Best, Lars Kästner, Klaus Römer, Nikolaus Müller-Lantzsch (2007): "Interaction of exogenous and endogenous retroviral envelope proteins with the potassium channel Bec1". Third European Congress of Virology, Nürnberg 2007 (Poster).

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt haben und damit zu dieser Dissertationsarbeit einen wesentlichen Beitrag leisteten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Müller-Lantzsch, dem Direktor des Virologischen Instituts der Universität des Saarlandes, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe molekularbiologische Arbeitstechniken zu erlernen und mit der vorliegenden Arbeit nähere Einblicke in die moderne molekularbiologische und medizinische Forschung zu erlangen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. Marlies Sauter bedanken, der es mit ihrer Begeisterungsfähigkeit, ihrer warmherzigen Art und neuen Ideen immer gelang, zu motivieren und den Laboralltag abwechslungsreich zu gestalten. Ich fand bei ihr stets ein offenes Ohr für Probleme und wissenschaftliche Fragestellungen. Durch ihre herausragende fachliche Kompetenz und ihre kritischen Rückfragen trug sie entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Klemens Ruprecht, der mit seinen interessanten und hilfreichen Anregungen für diese Arbeit ebenfalls ein wichtiger und ständiger Ansprechpartner war.

Bei den Mitarbeiterinnen der "Arbeitsgruppe HERV-K" Barbara Best, Madeleine Herrmann, Sabine Kaufmann und Miriam Denne möchte ich mich herzlich für die Einweisung in unterschiedliche molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken. Sie standen mir für offene Fragen und Probleme stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ein großes Dankeschön gilt Pearl van Heteren, Georg Laufer, Janto Thierbach und Helge Latz, denen es gelang, auch nach fehlgeschlagenen Experimenten meinen Ehrgeiz für diese Arbeit immer wieder zu entfachen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken. Durch ihren ständigen Rückhalt und nicht zuletzt durch die finanzielle Unterstützung meiner Eltern wurden mir die Durchführung meines Medizinstudiums sowie die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht.

11. Lebenslauf

	Michael Glas Emilienstr. 23, 66424 Homburg/Saar
Telefon	(06841) 993028
E-Mail	michaelglas@gmx.de
Geburtstag, Geburtsort	16.06.1982 in Freyung
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder
Familie	Vater: Siegfried Glas, Gymnasiallehrer Mutter: Erika Glas, Grundschullehrerin Geschwister: Martin Glas, Student der Architektur; Benedikt Glas, Auszubildender zum Piloten

Studium

seit 10/2002	Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
09/2004	Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote 1,66)
07/2006 – 03/2007	Ganztägige Laborarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Müller-Lantsch
seit 02/2008	Praktisches Jahr (Wahlfach Anästhesie)

Famulaturen

02/2005 – 03/2005	Chirurgie (Krankenhaus Waldkirchen)
03/2006 – 04/2006	Anästhesie und Intensivmedizin (Klinikum Idar-Oberstein)
03/2007 – 4/2007	Chirurgie und Sportmedizin (Praxis Dr. B. Ünel, Waldkirchen)
09/2007 – 10/2007	Innere Medizin (Krankenhaus Sulzbach)

Studentische Aktivitäten

10/2006 – 09/2008	Studentisches Mitglied des "Fachbereichsrats Klinische Medizin" und des "Erweiterten Fakultätsrats"
10/2007 – 02/2008 04/2008 – 07/2008	Kursassistent der Veranstaltung "Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie"

Schule

08/1988 – 07/1992	Grundschule Waldkirchen
08/1992 – 07/1999	Johannes-Gutenberg-Gymnasium Waldkirchen
08/1999 – 06/2001	Gymnasium Freyung
29.06.2001	Abitur (Gesamtnote 1,7)

Zivildienst

08/2001 – 05/2002	Krankenhaus Waldkirchen
-------------------	-------------------------

Zusatzqualifikationen

EDV-Kenntnisse	Sehr gute Kenntnisse in Word, PowerPoint, Excel Gute Kenntnisse in Bildbearbeitung
Fremdsprachen	Gute Englisch- und Französischkenntnisse in Wort und Schrift Grundkenntnisse in Italienisch

Interessen

Radreisen
Kochen