

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

**Interaktion des Envelope-Proteins von HTLV-1 mit dem
spannungsgesteuerten Kaliumkanal Bec-1**

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

2007

vorgelegt von: Pearl Sabrina van Heteren
geboren am: 24.09.1982 in Bad Kreuznach

Meiner Familie
gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

II. Verzeichnis der Abbildungen

III. Verzeichnis der Abkürzungen

1. Zusammenfassung	15
2. Abstract	17
3. Einleitung	19
3.1. Das Humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV)	19
3.1.1. Aufbau von HTLV-1	20
3.1.2. HTLV-1 assoziierte Erkrankungen	26
3.2. Der Bec-1 Kanal	28
3.2.1. Aufbau und Struktur	28
3.2.2. Einteilung und Aufbau der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle	28
3.2.3. Funktion der Ether-à-go-go Kanäle und Bec-1	31
3.2.4. Expression von Bec-1 in verschiedenen Geweben und Zellen	32
3.3. Proteininteraktionen	33
3.3.1. Interaktionen des HTLV-1 Env Proteins	33
3.3.2. Ether-à-go-go related Kanäle und minK/MiRP1	34
3.3.3. Hefescreen mit MSRV Env	35
3.4. Ziele dieser Arbeit	35
4. Material	37
4.1. Bakterienstämme	37
4.2. Größenmarker	37
4.2.1. DNA-Größenmarker	37
4.2.2. Proteingrößenmarker	37
4.3. Antikörper	37
4.3.1. Monoklonale Antikörper	37

4.3.2. Polyklonale Antikörper	37
4.3.3. Peroxidasekonjugierte Zweitantikörper	38
4.4. Puffer und Medien	38
4.5. Vektoren	41
4.5.1. pGem-T-Zellvektor	41
4.5.2. pGBKT7 Vektor	41
4.5.3. pGex-4T-1 Vektor	42
4.5.4. pEGFP C1 Vektor	42
4.5.5. pDsred Monomer Vektor	42
4.5.6. pSG5 Vektor	42
4.5.7. pHCMV-pA-Vektor	42
4.6. Oligonukleotide	43
4.7. Enzyme und dNTPs	45
4.8. Chemikalien und andere Materialien	45
4.8.1. Chemikalien	45
4.8.2. Photochemikalien	45
4.8.3. Radiochemikalien	45
4.8.4. Kits	45
4.8.5. Papiere und Membranen	46
4.8.6. Zellkulturmedien	46
4.8.7. Nährmedien für Bakterien	46
4.9. Konstrukte	46
4.10. Zellen und Zelllinien	47
4.10.1. B-Zelllinien	47
4.10.2. Adhärente Zellen	47
4.10.3. T-Zellen und Zelllinien	47
4.11. Computersoftware	48
5. Methoden	49
5.1. Bakterienkultur	49
5.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	49
5.1.2. Transformation und Kultivierung von Bakterien	49
5.2. DNA-Techniken	50
5.2.1. Agarosegelelektrophorese	50

5.2.2. DNA-Aufreinigung aus Agarosegel	50
5.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
5.2.4. DNA Sequenzierung	52
5.2.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	52
5.2.6. Dephosphorylierung von Vektoren	52
5.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	52
5.2.8. Analytische Plasmidaufarbeitung	53
5.2.9. Präparative Plasmidaufarbeitung	53
5.2.10. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und Proteinen	53
5.2.11. RNA Extraktion und DNase Verdau	54
5.2.12. Reverse Transkription	54
5.3. Proteintechniken	55
5.3.1. Herstellung von Proteinextrakten	55
5.4. Techniken zum Nachweis von Proteinen	56
5.4.1. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	56
5.4.2. Westernblot (Immunoblot)	56
5.4.3. Coomassiefärbung	57
5.4.4. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen	57
5.4.5. Immunopräzipitation (IP) und Co-IP	57
5.4.6. Kolokalisation von Proteinen	59
5.5. GST-Pulldown Analysen	59
5.5.1. Expressionsinduktion von GST-Fusionsproteinen	59
5.5.2. Invitrotranslation	60
5.6. Zellkulturtechniken	61
5.6.1. Kultivierung von Suspensionszellen	61
5.6.2. Kultivierung von adhärennten Zellen	62
5.6.3. Zellzahlbestimmung mit dem Analysegerät CASY	62
5.6.4. Transfektion von Zellen	62
5.6.5. Zytotoxizitätsassay (MTT-Assay)	62
5.7. Durchflusszytometrie (FACS)	63
5.8. Statistische Auswertung des MTT-Assays	63

6. Ergebnisse	64
6.1. Bindung von HTLV-1 SU und TM an den Bec-1 Kanal	65
6.1.1. Klonierungen	65
6.1.2. Identifikation der Konstrukte SU und TM durch Agarosegel- elektrophorese	65
6.1.3. Herstellung von Fusionsproteinen	65
6.1.4. GST Pulldown Analyse der Bindung zwischen SU/TM und Bec-1	68
6.1.5. Verkürzung des TM Proteins am N-terminalen Ende	69
6.1.6. GST Pulldown Analyse zur Interaktion von TM Cut mit Bec-1	71
6.2. Kartierung der Bindungsstelle des Bec-1 Kanals	72
6.2.1. Klonierungen	72
6.2.2. GST Pulldown Analyse der Bec-1 Klone I und II	72
6.2.3. Herstellung weiterer Bec-1 Klone zur spezifischen Charakterisierung der Bindungsstelle	73
6.2.4. Nachweis der Proteinexpression der Bec-1 Klone durch Westernblot	75
6.2.5. GST Pulldown Analysen mit den trunkierten Bec-1 Klonen	77
6.3. Lokalisations- und Koloalisationsstudien	79
6.4. Nachweis der <i>in vivo</i> Interaktion des HTLV-1 SU Proteins mit Bec-1	84
6.4.1. Immunopräzipitation (IP) und Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	84
6.4.2. IP und Co-IP von pSG5 Bec-1 und pDsred SU	87
6.4.3. Interaktion von HTLV-1 SU mit endogen exprimiertem Bec-1	89
6.5. FACS-Analyse der transfizierten Zellen	91
6.6. Versuchsreihe zu den Effekten der Interaktion von HTLV-1 Env und Bec-1	92
6.7. Expression des Bec-1 Kanals in verschiedenen Zelllinien	96
6.7.1. Herstellung von mRNA und reverse Transkription	96
6.7.2. Testung der Zelllinien auf den Bec-1 Kanal mittels RT-PCR	97
7. Diskussion	100
7.1. Interaktion von HTLV-1 SU und TM mit dem Bec-1 Kanal	100
7.2. Kartierung der Bindungsstelle des Bec-1 Kanals	101
7.3. Lokalisations- und Koloalisationsstudien	102
7.4. Nachweis der <i>in vivo</i> Interaktion des HTLV-1 SU Proteins mit Bec-1	104
7.5. Funktionelle Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1	105

7.6. Expression des Bec-1 Kanals in verschiedenen Zelllinien	105
7.7. Mögliche Bedeutung der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1	106
7.7.1. Funktion von HTLV-1 Env	106
7.7.2. Funktion von Bec-1 und anderen spannungsgesteuerten Kalium Kanälen	107
7.7.3. Bec-1 als möglicher zellulärer Rezeptor für HTLV-1 SU	108
7.7.4. Die Beteiligung von Bec-1 bei der Freisetzung retroviraler Partikel	109
7.7.5. Kalium Kanäle und deren Interaktion mit anderen retroviralen Proteinen	111
7.7.6. Mögliche Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 auf die Calciumhomöostase	113
7.8. Konklusion	114
8. Literaturverzeichnis	116
9. Publikationen	125
10. Danksagung	126
11. Lebenslauf	127

II. Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1. Phylogenie der Retroviren
- Abb. 2. Aufbau des HTLV-1 Virus
- Abb. 3. Das HTLV-1 Genom
- Abb. 4. Env Leserahmen des HTLV-1 Genoms
- Abb. 5. Replikationszyklus eines Retrovirus
- Abb. 6. Aufbau der EAG Kanäle und 3D-Darstellung der Pore
- Abb. 7. Darstellung eines gesamten EAG Kanals
- Abb. 8. Klassifikation der EAG Kalium Kanäle
- Abb. 9. Verschlussmechanismen der Kanalpore von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen
- Abb. 10. Schematische Darstellung einer IP und Co-IP
- Abb. 11. Schematische Darstellung der Pulldownanalyse
- Abb. 12. Induktionskontrolle des Bec-1 Proteins
- Abb. 13. Vergleich der Bec-1 Klone in verschiedenen Vektoren
- Abb. 14. Pulldown mit SU/TM und Bec-1
- Abb. 15. SU, TM und TM-Cut im Vergleich
- Abb. 16. Aufbau des HTLV-1 Env Gens und die pGBKT7 Klone
- Abb. 17. Pulldown SU/TM/TM-Cut mit Bec-1
- Abb. 18. Pulldownanalyse von HTLV-1 SU mit Bec-1 I/II
- Abb. 19. Vergleich der Bec-1 Klone durch Agarosegelelektrophorese
- Abb. 20. Westernblot der verschiedenen Bec-1 Klone
- Abb. 21. Schematischer Vergleich der Bec-1 Klone und ihre Bindungsaffinität zu HTLV-1 SU
- Abb. 22. Pulldown der Bec-1 Klone A, B, C, und D mit dem HTLV-1 SU Protein
- Abb. 23. Pulldown der Bec-1 Klone 3.6, 4.14 und 5.31 mit HTLV-1 SU
- Abb. 24. Kolokalisationsaufnahmen von pEGFP und pDsred SU
- Abb. 25. Kolokalisationsaufnahmen von pEGFP Bec-1 und pDsred
- Abb. 26. Bildreihe A der Kolokalisationsaufnahmen von pEGFP Bec-1 und pDsred SU
- Abb. 27. Bildreihe B der Kolokalisationsaufnahmen von pEGFP Bec-1 und pDsred SU
- Abb. 28. IP und Co-IP nach Präzipitation mit Anti-gp46
- Abb. 29. IP und Co-IP nach Präzipitation mit Anti-Bec-1 Serum

- Abb. 30. IP und Co-IP von HTLV-1 SU nach Präzipitation mit Anti-Bec-1 Serum
- Abb. 31. IP und Co-IP nach Immunopräzipitation mit Anti-HTLV-1 gp46
- Abb. 32. IP und Co-IP nach Immunopräzipitation mit Anti-HTLV-1 gp46
- Abb. 33. Darstellung der FACS-Analyse pEGFP transfizierter Hela Zellen als Histogramm
- Abb. 34. Darstellung der FACS-Analyse pEGFP Bec-1 transfizierter Hela Zellen als
Histogramm
- Abb. 35. Darstellung monotransfizierter Zellen im Zytotoxizitätsassay
- Abb. 36. Doppeltransfizierte Hela Zellen des Zytotoxizitätsassays
- Abb. 37. Darstellung der Kotransfektion mit pEGFP Bec-1 und pDsred SU
- Abb. 38. RT-PCR der untersuchten adhärennten Zellen
- Abb. 39. RT-PCR der untersuchten T-Zellen und T-Zelllinien
- Abb. 40. RT-PCR der untersuchten B-Zelllinien

III. Verzeichnis der Abkürzungen

α	alpha
μ	micro-
Abb	Abbildung
Acetat	Acetat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATL	adulte T-Zell Leukämie
ATLV	adultes T-Zell Leukämie Virus
Bec-1/2	brain-specific-eag-like channel 1/2
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Kapsidprotein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	chinese hamster ovary
CNB	cyclic-nucleotid-bindingdomain
Co-IP	CoImmunopräzipitation
C-Terminus	Carboxylterminus
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAG	Ether-à-go-go Kanäle
EVB	Epstein Barr Virus
E. coli	Escherischia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescence protein

elk	Ether-à-go-go like Kanäle
Env	Envelope Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
erg	Ether-à-go-go related Kanäle
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GLUT 1	humaner Glucosetransporter 1
GST	Gluthation Sepharose Transferase
h	Stunde
HAM	HTLV-1 assoziierte Myelopathie
hDlg	human Disc-large
HERV-W/K	Humanes endogenes Retrovirus W/K
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV-1/2	Humanes T-Zell Leukämie Virus 1/2
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
kb/kbp	Kilobasen/Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LTR	long terminal repeat
m	milli-
MA	Matrixprotein
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MiRP1	minK-related peptide 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSRV	Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus
n	nano-
NC	Nucleocapsid Protein
NP-40	Non-ionic detergent P-40

N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame/offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCK	regulator of conductance
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SU	Surface
Tab	Tabelle
TE	Tris EDTA
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TM	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	tropisch spastische Paraparese
U	Units
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1. Zusammenfassung

Die Interaktion von retroviralen mit zellulären Proteinen spielt eine entscheidende Rolle im retroviralen Replikationszyklus und ist ein wichtiger Mechanismus für pathogene Auswirkungen retroviraler Infektionen in Wirtszellen.

In Vorarbeiten wurde durch ein Hefe-II-Hybridssystem der spannungsgesteuerte Kalium Kanal Bec-1 als zellulärer Interaktionspartner des Envelope (Env) Proteins des Multiple Sklerose-assoziierten Retrovirus (MSRV, ein Mitglied der humanen endogenen Retrovirus Familie W [HERV-W]) entdeckt. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das Env Protein des humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV-1), einem humanpathogenen exogenem Retrovirus, in ähnlicher Weise mit Bec-1 interagiert. Retrovirale Env Proteine sind Glykoproteine der Virushülle und unter anderem für die Bindung an Rezeptoren auf Zielzellen des Wirts verantwortlich.

Durch GST-Pulldown-Analysen konnte gezeigt werden, dass *in vitro* sowohl die surface (SU) als auch die transmembran (TM) Domäne des HTLV-1 Env Proteins an die letzten, 223 carboxy-terminal gelegenen Aminosäuren von Bec-1 binden. Ein um 63 Aminosäuren amino-terminal verkürztes TM Protein wies keine Bindung an Bec-1 mehr auf, so dass sich die interagierende Region von HTLV-1 TM vermutlich im carboxyterminalen Anteil des TM Proteins befindet. Zur genaueren Charakterisierung der interagierenden Region des Bec-1 Kanals (innerhalb der letzten 223 Aminosäuren) wurden insgesamt 9 trunkierte Klone erstellt, mit Hilfe derer sich die Bindungsregion zu HTLV-1 SU auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren von Bec-1 eingrenzen ließ.

Eine Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 *in vivo* legen Kolokalisationsstudien nahe, in denen sich beide Proteine mittels konventioneller und konfokaler Mikroskopie in denselben zytoplasmatischen Kompartimenten darstellten. Darüber hinaus konnte ebenfalls in Zellen, welche mit HTLV-1 SU und Bec-1 Konstrukten transfiziert wurden, eine Bindung von HTLV-1 SU an Bec-1 *in vivo* durch Co-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden.

Als erster Schritt zur Untersuchung möglicher funktioneller Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 wurden Zytotoxizitätsassays (MTT) durchgeführt. Hierbei zeigte sich allerdings kein Unterschied bezüglich der Vitalität zwischen Kontrollen und mit HTLV-1 SU und Bec-1 kotransfizierten Zellen, sodass die Assoziation beider Proteine vermutlich keine zytotoxischen Auswirkungen hat.

Die Expression von Bec-1 konnte bisher in unterschiedlichen Regionen des humanen Telencephalons und in verschiedenen hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zellkulturen und primäre T-Zellen auf die Expression des Kanals mittels RT-PCR untersucht. Bec-1 wurde in unterschiedlichen adhärennten Zelllinien (Cos 1, Tera 1, 293 T, Gos 3) nachgewiesen. In den getesteten B-Zelllinien (BL41, B95-8, Bjab, Raji, Jiyoye) konnte hingegen keine mRNA für Bec-1 gefunden werden, während in fast allen untersuchten T-Zelllinien (Jurkat, A3.01, Tall, nicht aber in Ach2-Zellen) und in primären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine Bec-1 Expression nachweisbar war.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mittels unterschiedlicher Methoden eine Interaktion von HTLV-1 SU und dem Bec-1 Kanal *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Die möglichen funktionellen Konsequenzen dieser Interaktion sind gegenwärtig unbekannt und sollten in weitergehenden Untersuchungen charakterisiert werden. Nachdem T-Zellen die primären Zielzellen für HTLV-1 *in vivo* darstellen, erscheint die hier nachgewiesene Expression von Bec-1 in T-Zellen jedoch vereinbar mit einer möglichen funktionellen Bedeutung der Interaktion von Bec-1 und HTLV-1 SU bei HTLV-1 Infektionen *in vivo*.

2. Abstract

Interaction of the HTLV-1 envelope protein with the voltage-gated potassium channel Bec-1

Interactions of retroviral proteins with cellular proteins play an important role in the retroviral replication cycle and are an important mechanism for pathogenetic effects of retroviral infections in host cells.

In previous studies, a yeast two hybrid screen with the envelope protein of the multiple sclerosis associated retrovirus (MSRV, a member of the human endogenous retrovirus family W) as bait identified the voltage-gated potassium channel Bec-1 as an interacting protein. In this work we therefore investigated whether the envelope protein of the human T-cell leukaemia virus (HTLV-1), an exogenous retrovirus, interacts with Bec-1 in a similar way. The HTLV-1 Env protein is a glycoprotein, located in the virus membrane and among other functions responsible for the interaction with virus receptors on host target cells.

GST pulldown assays demonstrated that both, the surface (SU) and the transmembrane (TM) domains of HTLV-1 interact with the last 223 carboxy-terminal amino acids of Bec-1 *in vitro*. A truncated TM protein lacking the first 63 amino terminal amino acids did not bind to Bec-1 anymore, suggesting that the interacting domain resides within this aminoterminal region of TM. In order to characterize the binding site of Bec-1 to HTLV-1 SU, we designed nine truncated clones of the last 223 amino acids of Bec-1, with which we could locate the interacting domain to the last 110 C-terminal amino acids of Bec-1.

Using conventional and confocal microscopy, Bec-1 and HTLV-1 SU were shown to colocalise in the same cellular compartments, indicating an *in vivo* interaction of both proteins. The interaction of HTLV-1 SU and Bec-1 *in vivo* was also proven by immuno- and coimmunoprecipitations in cotransfected cells.

As a first step towards the characterization of possible functional consequences of the binding between HTLV-1 SU and Bec-1, possible cytotoxic effects were studied by MTT assays. However, there was no difference in viability between untreated and cotransfected cells, indicating that cotransfection of HTLV-1 SU and Bec-1 has no cytotoxic effect.

Expression of the Bec-1 potassium channel was previously described in human telencephalon and in haematopoietic cells. In a RT-PCR expression analysis, we examined different cell cultures and cell types for the expression of Bec-1 transcripts. In different

adherent cell cultures (Cos 1, Tera 1, 293 T, Gos 3) mRNA for Bec-1 was detected. While several B-cell lines (BL41, B95-8, Bjab, Raji, Jiyoye) tested did not express Bec-1, almost all screened T-cell lines (Jurkat, A3.01, Tall cells, except Ach2 cells) and primary T-cells (CD4⁺ and CD8⁺) expressed mRNA for Bec-1.

In sum, our data suggest an *in vivo* and *in vitro* interaction of HTLV-1 SU and Bec-1. The functional consequences of this interaction are currently unknown and remain to be investigated. Nevertheless, since T-cells are the primary cellular targets of HTLV-1, and given the expression of Bec-1 in T-cells detected in this study, the interaction of HTLV-1 SU and Bec-1 may be relevant during infection with HTLV-1 *in vivo*.

3. Einleitung

3.1. Das Humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV)

Das HTLV-1 Virus konnte 1979 gleichzeitig in den USA und in Japan nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Robert C. Gallo publizierte 1980 die Entdeckung des ersten humanen Retrovirus (Poiesz et al. 1980). Es gelang ihnen, in einer T-Zell-lymphoblastoiden Zelllinie eines Patienten mit cutanem T-Zelllymphom, die Bildung des für Retroviren typischen Enzyms Reverse Transkriptase nachzuweisen und elektronenmikroskopisch retrovirale Partikel darzustellen. In Japan gelang es Hinuma und Mitarbeitern retrovirale Partikel in einer T-Zelllinie eines Patienten mit akuter T-Zelleukämie elektronenmikroskopisch nachzuweisen (Hinuma et al. 1981). Die japanische Arbeitsgruppe bezeichnete das von ihnen gefundene Virus als Adultes T-Zell Leukämie Virus (ATLV). Wenig später stellte sich heraus, dass beide Arbeitsgruppen dasselbe Virus entdeckt hatten und man einigte sich auf die Bezeichnung HTLV-1. Kurz darauf wurde auch das verwandte HTLV-2 Virus beschrieben (Kalyanaraman et al. 1982).

HTLV-1 gehört zur Familie der komplexen Retroviren und wird in fünf Subtypen unterteilt: Melanesischer Typ, Zairischer Typ, Typ A, B, und C (Gessain, 1993). Man vermutete zunächst, dass der Ursprung des Virus in Afrika liegt, aufgrund der dortigen hohen Prävalenz und Mutationsrate. Weitere Sequenzanalysen zeigten jedoch, dass die Herkunft des Virus in der Indo-Malaischen Region zu suchen ist (Saksena, Sherman, 1992). Bis heute werden zwei Theorien, wie sich HTLV-1 in die menschliche Population integrieren konnte, kontrovers diskutiert. Einerseits besteht die Theorie, dass HTLV-1 von einem Ur-Virus abstammt und sich über Millionen von Jahren in der menschlichen Linie verbreitet hat (Komuro et al. 1984). Im Gegensatz dazu stehen Studien, die vermuten lassen dass das Virus erst kürzlich über Transmission aus einer anderen Spezies in die menschliche Population gelangte (Ina et al. 1990).

Als Zielzellen des Virus konnten $CD4^+$ T-Lymphozyten sowohl in symptomatischen als auch in asymptomatischen Patienten nachgewiesen werden (Grant et al. 2002). Bei Patienten mit HTLV-1 assoziierter Myelopathie (HAM), einer durch HTLV-1 ausgelösten Erkrankung, wurde zusätzlich eine Infektion der $CD8^+$ Lymphozyten sowie von Monozyten und B-Lymphozyten beobachtet. Bei weiteren Untersuchungen konnten Gliazellen, Makrophagen,

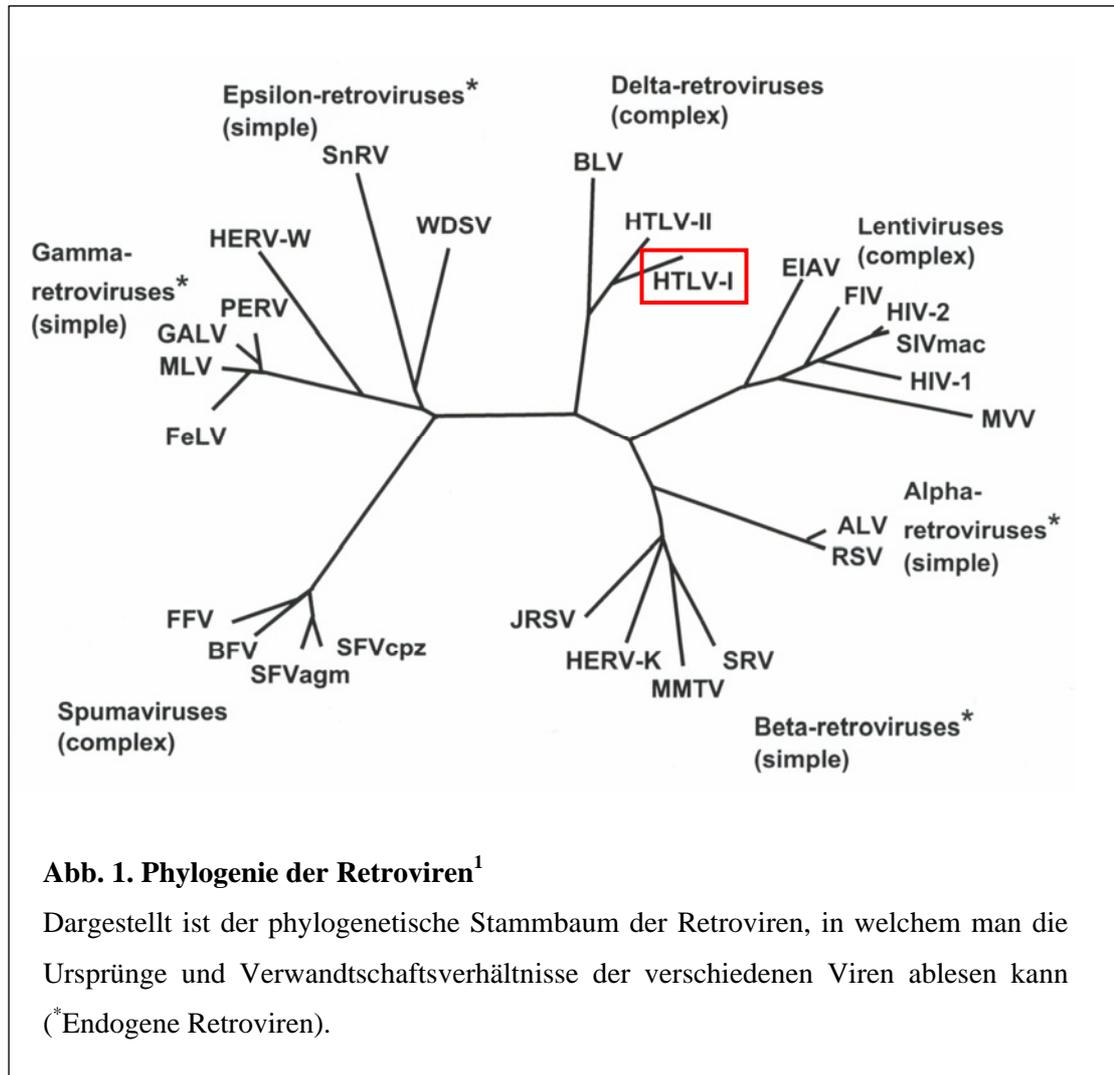
Dendritische Zellen und Megakaryozyten als weitere potentielle Angriffspunkte des HTLV-1 Virus identifiziert werden (Koyanagi et al. 1993).

Als ein Rezeptor für das HTLV-1 Virus auf Wirtszellen konnte der GLUT-1 Transporter nachgewiesen werden (Manel et al. 2005). GLUT-1 ist ein insulinabhängiger Glukosetransporter (Typ 1) mit zwölf transmembranen Domänen. Diese besitzen lipophile und hydrophile Anteile, sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen intrazellulär. Der hydrophile Anteil bildet in der Plasmamembran eine Pore, um somit die Diffusion durch die Membran für das polare Glukosemolekül zu erleichtern. GLUT-1 wird vor allem auf Zellen mit erhöhtem Metabolismus, unter anderem auf Tumorzellen, exprimiert. Der Glukosetransporter kann direkt mit dem HTLV-1 Envelope Protein (Protein der Hüllemembran des Virus, Env) interagieren. Zudem konnte die transiente Transfektion des GLUT-1 Rezeptors, die Infektionsrate von MDBK Zellen, welche normalerweise gegenüber HTLV-1 relativ resistent sind, wesentlich erhöhen (Coscun et al. 2005).

3.1.1. Aufbau von HTLV-1

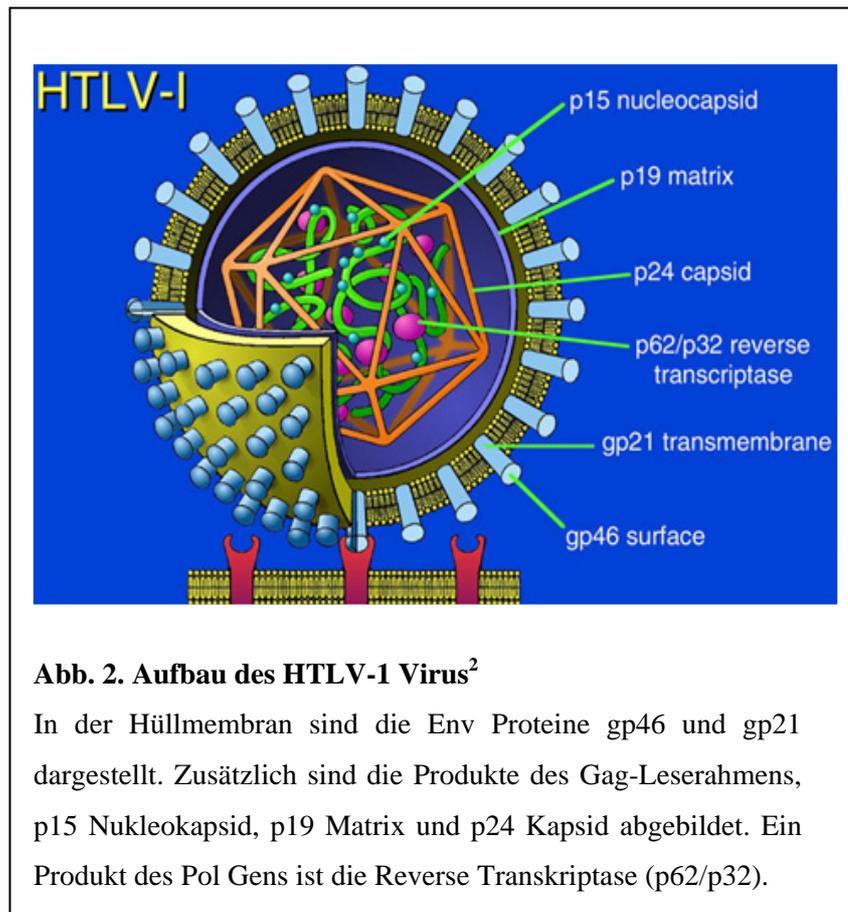
3.1.1.1. Retroviren

Retroviren werden in einfache und komplexe (bezogen auf ihre Morphologie) sowie in exogene und endogene Viren unterteilt. Endogene Viren können über die Keimbahnzellen vertikal übertragen werden, exogene Viren besitzen in ihrem Genom alle Informationen zum Ablauf eines Infektionszyklus und können somit in einer Spezies horizontal verbreitet werden. In Retroviren liegt die Erbinformation als eine Einzel (+)- Strang RNA vor.



HTLV-1 gehört zu den Delta-Retroviren (Abb. 1.) und weist eine Viruspartikelgröße von 80-100 nm auf. Retroviren besitzen Nukleinsäuren, die durch Proteinbausteine (Kapsomere) geschützt werden. Um dieses Nukleokapsid, das eine ikosaedrische oder konische Form annehmen kann, liegt zusätzlich eine Hülle aus Lipidbausteinen, die das Virus schützen soll. In diese Hüllmembran sind Glycoproteine des Env-Leserahmens eingebaut, welche aus einer transmembranen Domäne (TM) und einer Oberflächendomäne (SU) bestehen (Abb. 2.). Bei HTLV-1 besitzt das TM Protein eine Größe von 21 kDa (gp21), das SU Molekül umfasst 46 kDa (gp46). Beide Proteine spielen bei der Erkennung und Penetration in die Zielzelle eine wichtige Rolle.

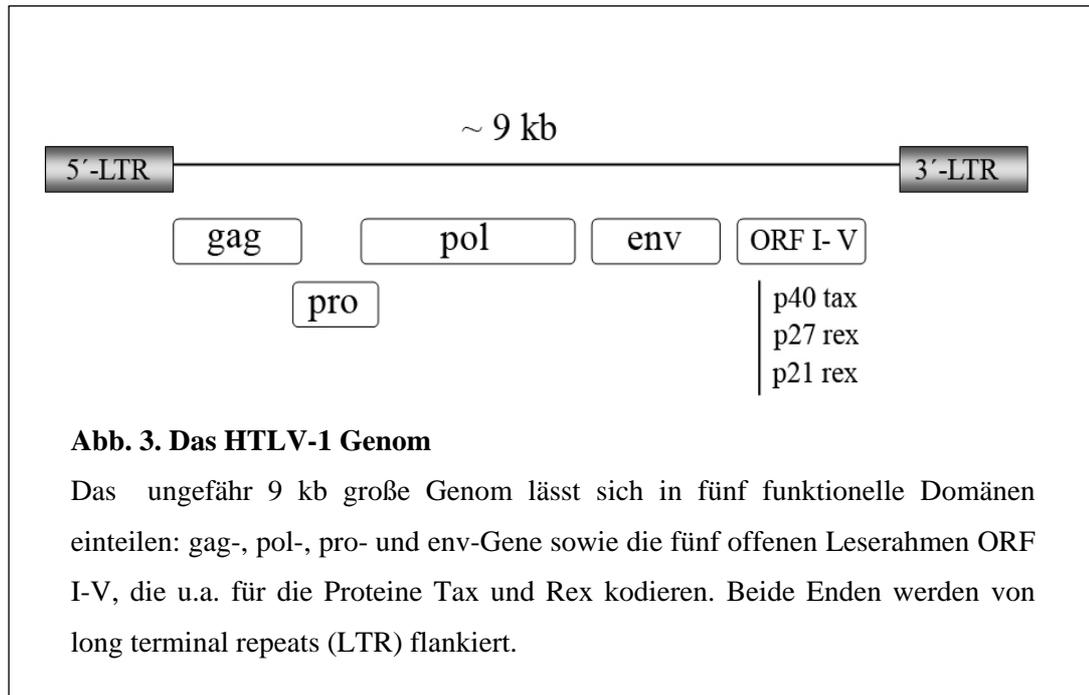
¹ "The discovery of endogenous retroviruses", R. A. Weis (2006)



Retroviren unterscheiden sich von anderen Viren durch die Fähigkeit ihr eigenes genetisches Material in das Wirtsgenom integrieren zu können. Hierfür benötigt das Virus das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses Enzym kann die retrovirale RNA in DNA umschreiben, welche dann in die Wirts-DNA durch die Integrase (Enzym des Pol-Leserahmens) inseriert werden kann.

In Abbildung 3. ist das HTLV-1 Genom schematisch dargestellt. Es besteht aus einer einzelsträngigen plus Strang RNA einer Länge von ungefähr 9000 Nukleotiden. Das Genom kann in fünf verschiedene Regionen unterteilt werden: 5'-LTR (Long Terminal Repeat)-Gag-Pol-Env-LTR-3'. Aus diesen Anteilen werden die Proteine Gag, Pro, Pol und Env synthetisiert, daneben kodieren fünf weitere offene Leserahmen (ORF = open reading frames) für akzessorische Proteine wie Tax und Rex.

² http://www.sciences.uqam.ca/scexp/img/img_contenu/htlv1.jpg



Die retrovirale Transkription startet am 5' Ende und endet mit einer Polyadenylierung am 3'LTR. Die transkribierte RNA existiert sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma und dient dort als Matrize für das Gag und das Gag-Pol Protein. Zudem wird sie im Zellkern gesplitt, um als subgenomische mRNA als Vorlage für das Env Protein zu dienen. Die Transportprozesse vom Kern ins Zytoplasma werden über den NXF1/NXT-gesteuerten oder den Crm1-gesteuerten (RNA Exportfaktoren) Transportweg geleitet (Swanson 2006, Cullen 2003). Das Gag Protein wird als Polyprotein synthetisiert und kann in folgende funktionelle Untereinheiten gegliedert werden: Matrix, Kapsid, Nukleokapsid und andere kleine virusspezifische Domänen. Die Gag-Proteine spielen eine Rolle beim Zusammenbau des Virus, dem sogenannten Assembly. Der Pol-Leserahmen kodiert für wichtige Funktionenzyme wie die Reverse Transkriptase und Integrase. Die akzessorischen Proteine Tax und Rex, die durch die offenen Leserahmen I-V kodiert werden, sind Translations- und Posttranslationsregulatoren. Das vermehrte Auftreten von HTLV-1-assoziierten Erkrankungen wie ATL (akute T-Zell Leukämie) und HAM (HTLV-1 assoziierte Myelopathie) wurde im Zusammenhang mit Mutationen im Tax Gen beobachtet (Furukawa 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Env-Protein von HTLV-1 gearbeitet. Das Env-Gen kodiert für ein 488 Aminosäuren großes Vorläuferprotein, welches Dimere bildet. Dieses Protein wird im Golgi Apparat von Proteasen in die Proteine SU (surface subunit)

³“HTLV-1 tropism and envelope receptor“, N. Manel et al. (2005)

und TM (transmembrane subunit) gespalten (Pique et al. 1992). Wird dieser Vorgang nicht oder falsch ausgeführt, wird das Vorläuferprotein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten. Das SU Protein besitzt fünf Glykosylierungsdomänen, welche alle für ein funktionelles Env Protein glykosyliert sein müssen (Pique 1993). Das SU Protein kann in drei verschiedene Subdomänen unterteilt werden (Abb. 4.): eine Rezeptorbindungsdomäne (Aminosäure 21-180), eine zentrale prolinreiche Region (AS 181-215) und eine carboxyterminale Domäne (AS 216- 313) (Manel et al. 2005).

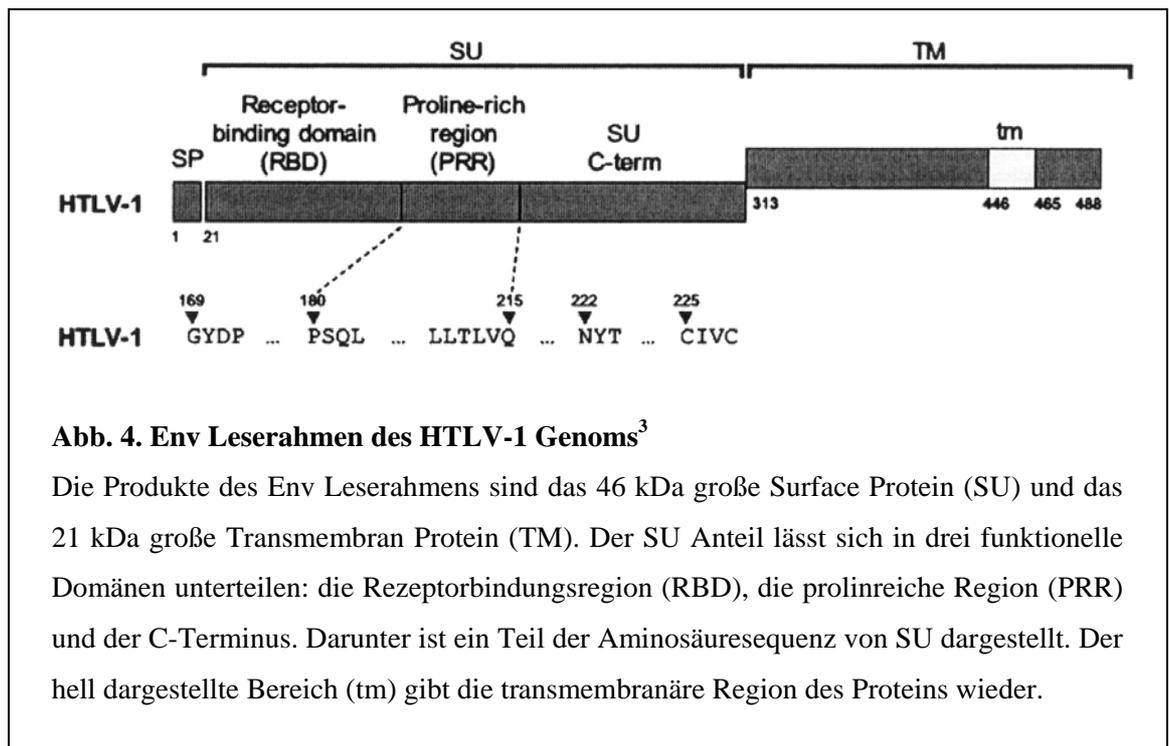


Abb. 4. Env Leserahmen des HTLV-1 Genoms³

Die Produkte des Env Leserahmens sind das 46 kDa große Surface Protein (SU) und das 21 kDa große Transmembran Protein (TM). Der SU Anteil lässt sich in drei funktionelle Domänen unterteilen: die Rezeptorbindungsregion (RBD), die prolinreiche Region (PRR) und der C-Terminus. Darunter ist ein Teil der Aminosäuresequenz von SU dargestellt. Der hell dargestellte Bereich (tm) gibt die transmembranäre Region des Proteins wieder.

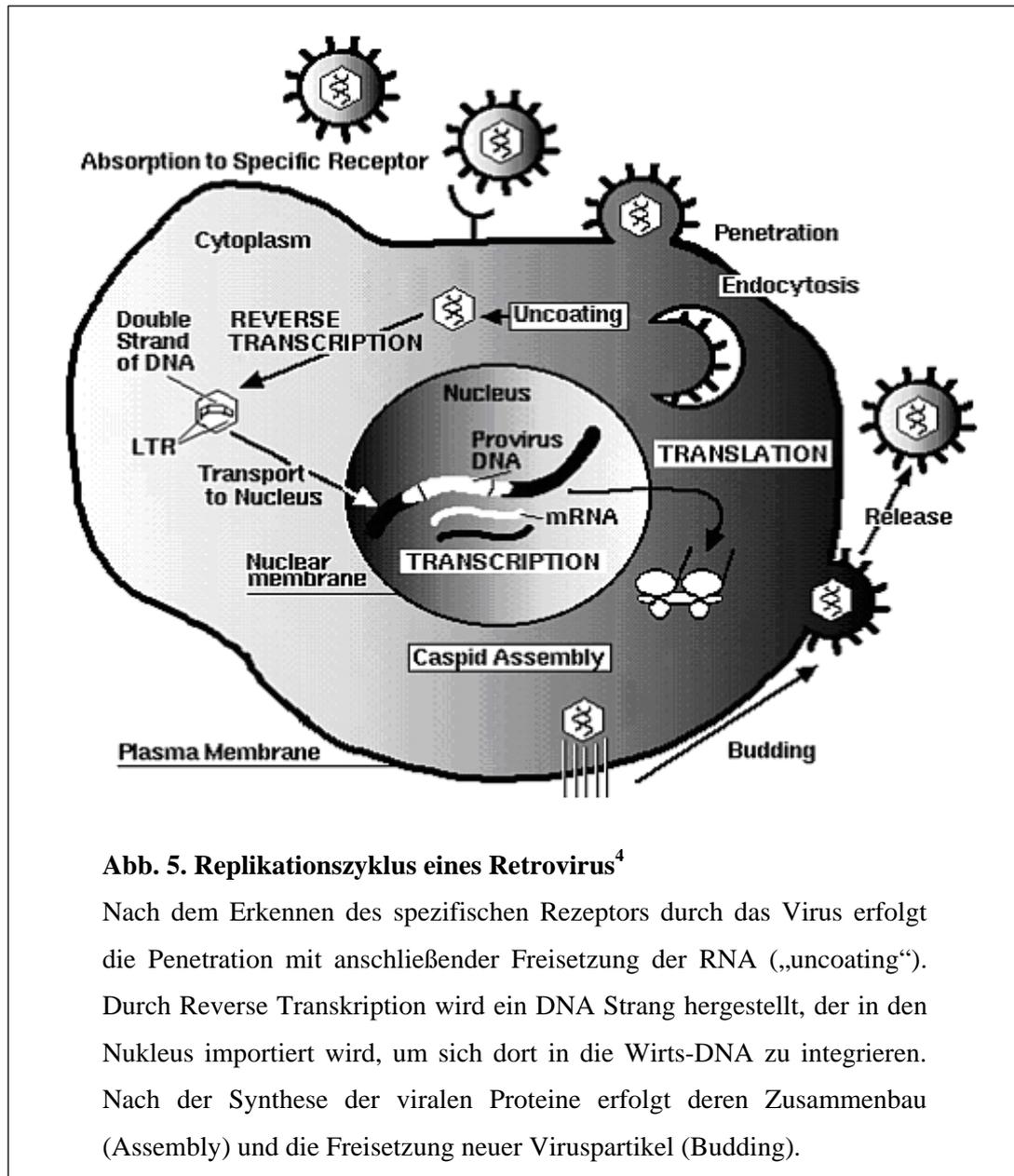
Gerichtete Mutationen zeigten, dass die Aminosäure Thyrosin-170 in die Bindung zwischen TM und SU involviert ist (Delamarre et al. 1994). Das SU Protein spielt bei der Virus-Rezeptorinteraktion eine Rolle, das TM Protein ist an Fusionschritten beteiligt.

In den Seren HTLV-1 positiver Patienten wurden fast ausschließlich Antikörper gegen den C-terminalen Teil des SU Proteins gefunden, jedoch nur ein geringer Prozentsatz gegen den N-Terminus. Beim TM Protein stellt nur der intrazytoplasmatische Teil ein antigenes Epitop dar (Delamarre, 1994).

³“HTLV-1 tropism and envelope receptor“, N. Manel et al. (2005)

3.1.1.2. Replikationszyklus

Die Bindung des Virus an die Zielzelle wird durch ein Rezeptor-Ligandenpaar vermittelt, welches für jedes Virus spezifisch ist. Als Erkennungssequenz auf der Zielzelle dienen häufig membranständige Proteine, wie beispielsweise der GLUT-1 Transporter bei HTLV-1. Die Membranproteine der Zelle bestimmen die Spezifität der Viren, da deren Aufbau in jedem Wirtsorganismus unterschiedlich ist. Die Adsorption erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip, sobald das Virus den passenden Rezeptor für eines der Glykoproteine auf der Hüllmembran gefunden hat. Ist dies der Fall, erfolgt die Penetration, das Verschmelzen der Virusmembran mit der Wirtszelle, woraufhin das Nukleokapsid in das Zytoplasma eingeschleust wird. Bei diesem Vorgang wird das Nukleokapsid stark beschädigt, sodass die Nukleinsäuren freigesetzt werden („uncoating“). Die RNA des HTLV-1 Virus wird durch die Reverse Transkriptase zu einem RNA/DNA Hybrid umgeschrieben. Der DNA Strang wird zu einem DNA Doppelstrang synthetisiert. Nach seinem Transport in den Zellkern kann der Doppelstrang als Episom vorliegen sowie in die DNA des Wirts an polyklonalen Stellen integriert werden (Manel, 2005). Um den Zusammenbau neuer Viruspartikel zu erleichtern, geschieht dies in bestimmten Zellkompartimenten, was eine lokale Konzentrationserhöhung der retroviralen Partikel zur Folge hat, und das Assembly somit effizienter macht. Der Zusammenbau von Gag und Gag-Pol findet beispielsweise in freien Polysomen statt (Swanson et al. 2006). Zur Ausschleusung der gereiften Partikel lagern sich diese an die Zellmembran der Wirtszellen an und verlassen diese eingehüllt in Teile der Lipidhülle, welche somit als eigene Hüllmembran für gereifte Viruspartikel dient. Die folgende Abbildung veranschaulicht die beschriebenen Prozesse (Abb. 5.).



3.1.2. HTLV-1 assoziierte Erkrankungen

Derzeit wird geschätzt, dass ungefähr 10-20 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert sind. HTLV-1 weist unterschiedliche Transmissionswege auf, zum einen von der Mutter auf den Fötus, über Muttermilch auf den Säugling, über Bluttransfusionen sowie durch sexuellen Kontakt. Interessanterweise beträgt die Rate der Übertragung von Mann zu

⁴ <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/retrovirus.gif>

Frau 60%, umgekehrt jedoch nur 0,4%, was auf eine hohe Infektiösität der Samenflüssigkeit hindeutet (Murphy et al. 1989).

Etwa 5-10% der infizierten Patienten entwickeln ein HTLV-1 assoziiertes Krankheitsbild, welches variable Erscheinungsformen wie Uveitis, Polymositis, Thyroiditis und bronchoalveolärer Pneumonie annehmen kann. Die zwei wichtigsten Erkrankungen, die mit dem Virus in Verbindung gebracht werden, sind die akute T-Zell Leukämie (ATL) und die HTLV-1 assoziierte Myelopathie (HAM)/tropisch spastische Paraparese (TSP) (Cann, 1996). Die ATL gliedert sich in vier verschiedene Stadien: asymptomatisch, pre-leukämisch, chronisch, Lymphom und akute T-Zelleukämie (Yamaguchi et al. 1983). Eine akute T-Zelleukämie entwickeln ca. 1-2% der infizierten Patienten mit einer Latenz von etwa 20-30 Jahren nach der Primärinfektion. Die lange Dauer bis zum Ausbruch deutet auf eine Anhäufung von genetischen Mutationen in den T-Zellen hin. Das Virus selbst trägt weder wirtsschädigende Onkogene, noch aktiviert es zelluläre Onkogene, indem es sich als Provirus in ein solches integriert (Yamaguchi et al. 1986). Obwohl das Virus sich polyklonal (an verschiedenen Stellen) in das Genom des Wirts integriert, ist die Leukämie charakterisiert durch einen dominanten oder wenige verschiedene expandierte T-Zellklone mit identischen Integrationsstellen (Kondo et al. 1987).

Die HTLV-1 assoziierte Myelopathie (HAM) ist eine chronisch demyelinisierende Erkrankung. Sie resultiert in einem inflammatorischen Prozess, mit Infiltration des Zentralnervensystems durch Monozyten und Lymphozyten und Degeneration des Rückenmarks. Der Ausbruch einer HAM erfolgt meist im Erwachsenenalter und weist Symptome wie Paresen und Spastik der Extremitäten, Sensibilitätsstörungen und Hyperreflexie auf (Johnson et al. 2001). Die Mehrheit der Patienten mit HAM ist seropositiv für Anti-HTLV-1 Antikörper.

Nur in vereinzelten Fällen erkranken Patienten sowohl an ATL als auch an HAM. Dies ist möglicherweise bedingt durch die unterschiedlichen Infektionsarten der Patienten. Die Wahrscheinlichkeit an ATL zu erkranken ist bei einer maternalen Transmission des Virus am größten (Wilks et al. 1993). Bei sexueller Transmission und infizierten Bluttransfusionen erhöht sich das Risiko eine HAM zu entwickeln. Versuche bei Ratten zeigten, dass orale Inokulation des HTLV-1 Virus zu keinem Anstieg des Antikörpertiters führten, bei intravenöser Injektion wurden jedoch signifikante Level an Antikörpern gebildet (Kannagi et al. 2000). Die fehlende Antikörperbildung gegen das Virus bei oraler Injektion könnte somit zu einem Überleben und Transformieren der infizierten T-Zellen, bis hin zur ATL führen. Die überschießende Immunreaktion bei intravenöser Übertragung könnte zu einer gezielten

Destruktion der infizierten Zellen (vor allem T-Zellen und Zellen des ZNS) führen und somit zu einer inflammatorischen Destruktion des Nervensystems, welche bei HAM beobachtet wird (Barmak et al. 2002).

3.2. Der Bec-1 Kanal

3.2.1. Aufbau und Struktur

Die Familie der Bec Kanäle gehört zu den spannungsgesteuerten Kalium Kanälen. Sie wurde entsprechend ihrem ersten Fundort (Gewebeproben des menschlichen Gehirns) und ihrer Sequenzähnlichkeit als „brain-specific-eag-like channel“, kurz Bec bezeichnet (Miyake et al. 1999). Wenig später konnte ein zweiter strukturell ähnlicher Kanal im Gehirn entdeckt werden, sodass eine Subklassifizierung in Bec-1 und Bec-2 vorgenommen wurde. Die AG Miyake isolierte die cDNA beider Kanäle aus Gewebeproben des menschlichen Gehirns und verglich sie mit Sequenzen anderer spannungsgesteuerter Kaliumkanäle. Aufgrund dessen wurde der Bec-1 Kanal der Familie der Ether-à-go-go (EAG) Kanäle zugeordnet. Es bestehen Sequenzähnlichkeiten zu cAMP und cGMP gesteuerten Kationenkanälen, sowie zu den durch Hyperpolarisation aktivierten Kationen Kanälen.

3.2.2. Einteilung und Aufbau der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

Die Superfamilie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle lässt sich in zwei Subgruppen unterteilen, die Shaker Kanäle (SK, Kv.1- Kv.4) und die Ether-à-go-go Kanäle (EAG). Die Kaliumkanäle der Ether-à-go-go Familie besitzen vier Untereinheiten, jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs α -Helices (S1-S6), die sich transmembranär durch die Zellwand aufspannen (Abb. 6.). Sowohl das C-terminale Ende als auch der N-Terminus liegen intrazellulär. Der Spannungssensor des Kanals liegt auf der Subdomäne S4, dort sind positiv geladene Aminosäuren (wie Arginin oder Lysin) an jeder dritten Stelle integriert. Untersuchungen an Shaker Kanälen, welche Mutationen in dieser Region aufweisen, lassen darauf schließen, dass die positiv geladene S4 Region als Spannungssensor dient (Seoh et al., Aggarwal et al. 1996). Beim Öffnen und Schließen des Kanals werden mehr als vier Ladungen pro Untereinheit über die Membran transloziert (Yellen, 2002). Die zentrale Pore wird von den Domänen S5 und S6 gebildet, welche durch einen P-Loop (pore-loop), der sowohl intra- als auch extrazellulär liegt und den Selektionsfilter des Kanals bildet, verbunden wird.

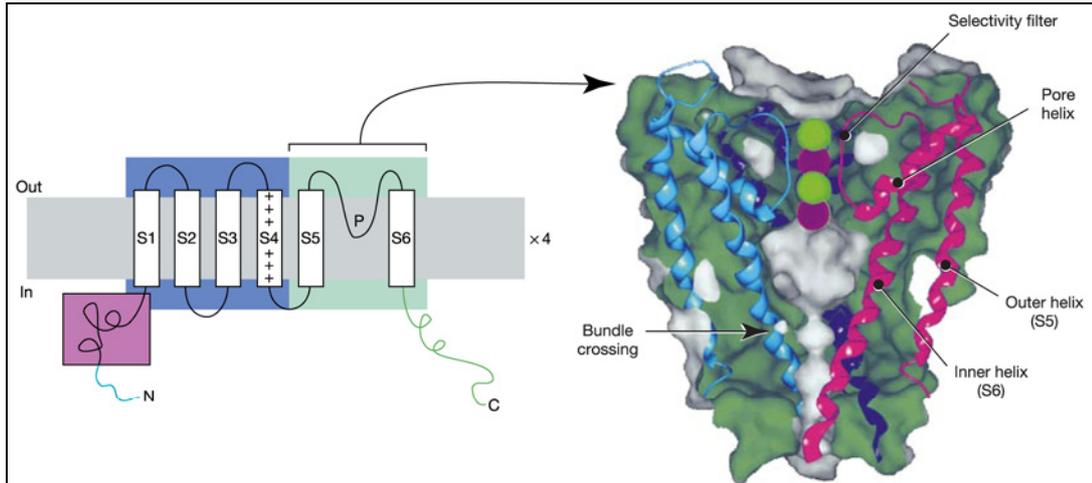


Abb. 6. Aufbau der EAG Kanäle und 3D-Darstellung der Kanalpore⁵

Links sind die sechs S-Domänen, welche sich in der Zellmembran aufspannen dargestellt. Das C- und N-terminale Ende liegt jeweils intrazellulär. Der P-Loop (P) bildet den Selektivitätsfilter. Die Pore wird von vier S5 und S6 Domänen gebildet, die sich im rechten Bild dreidimensional als α -Helices darstellen.

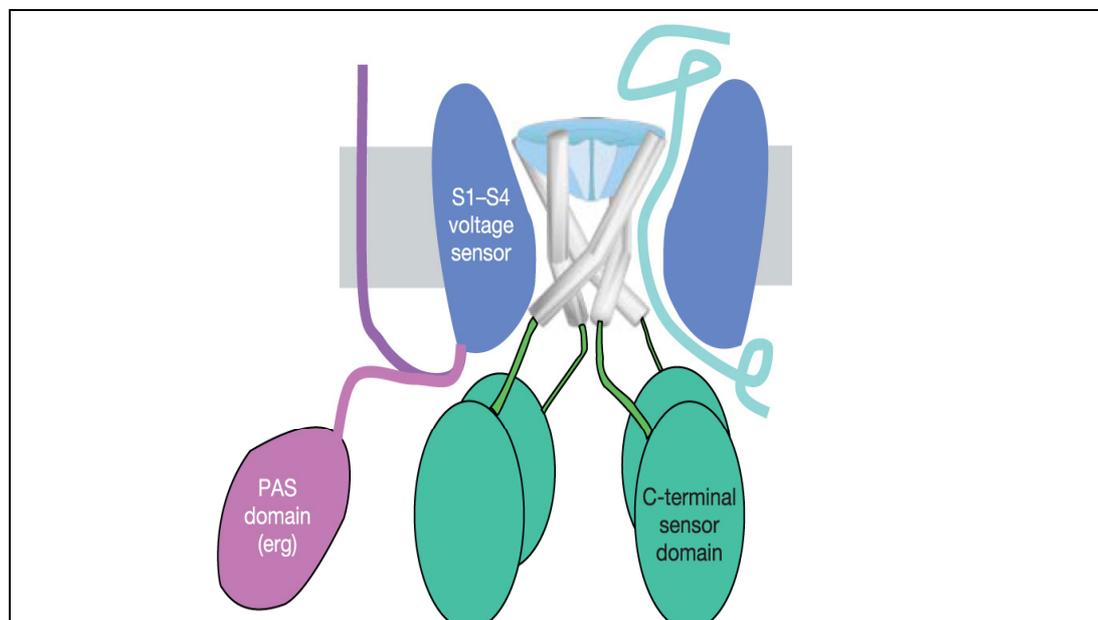


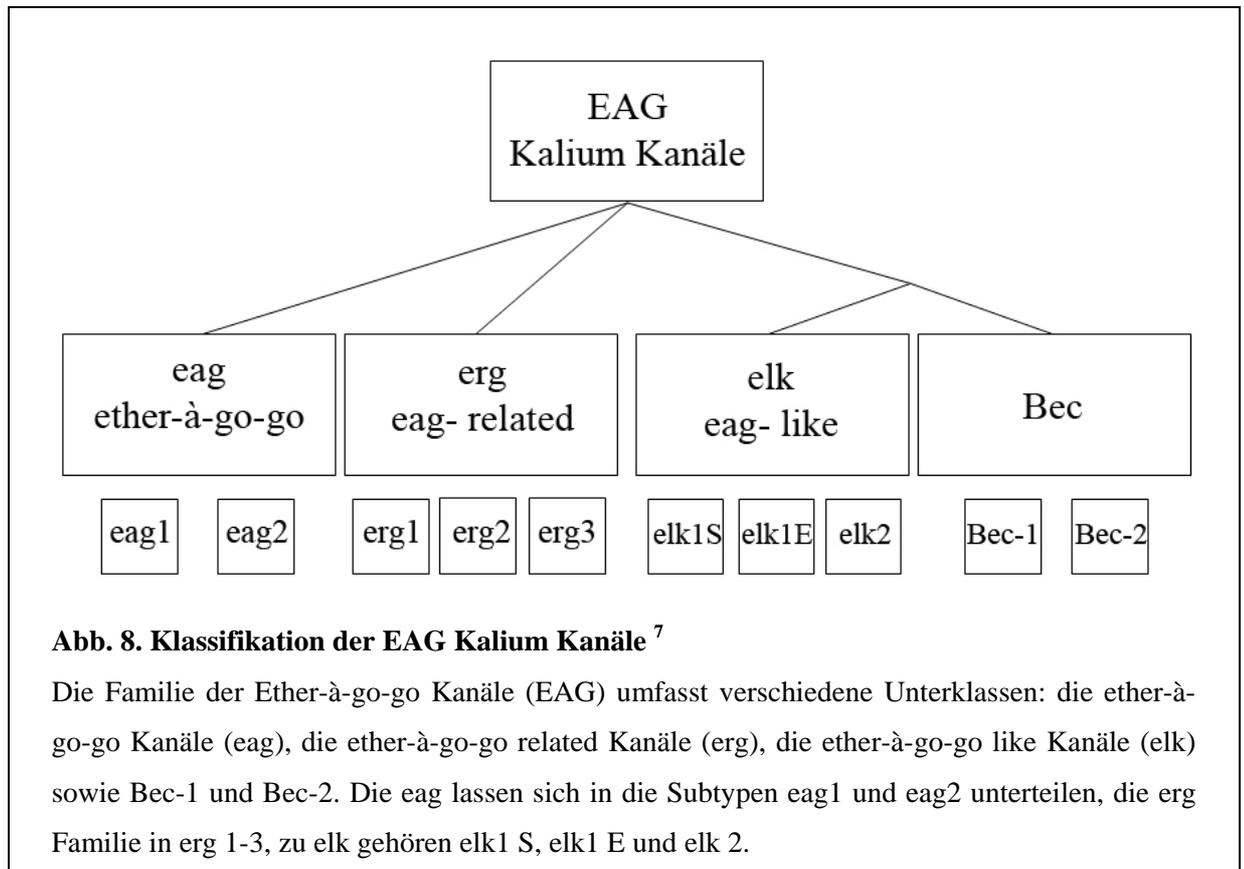
Abb. 7. Schematischer Aufbau eines EAG Kanals⁶

Dargestellt ist die intramembranäre Lage von S1-S4. Zudem ist der Aufbau der Kanalpore mit der Anordnung der C-Termini als Dimer von Dimeren abgebildet. Eine PAS-Domäne ist nur in erg Kanälen vorhanden.

⁵⁺⁶ „The voltage gated potassium channels and their relatives“, Yellen (2002)

Ein charakteristisches Motiv der Porenregion von EAG Kanälen ist das GFG Triplet. Zudem wurden auf dem Bec-1 Protein drei potentielle N-Glycosylierungsstellen am hydrophoben Teil von S5 gefunden (Miyake et al. 1999). Auf dem C-Terminus befindet sich eine CNB Domäne (cyclic-nucleotid-bindingdomain), was auf das „Verwandtschaftsverhältnis“ zu den cAMP und cGMP gesteuerten Kationenkanälen hinweist. Zwei der vier C-terminalen Domänen lagern sich jeweils zu einem Dimer zusammen. Beide Dimere lagern sich wiederum aneinander, sodass ein „Dimer von Dimeren“ entsteht (Abb.7.).

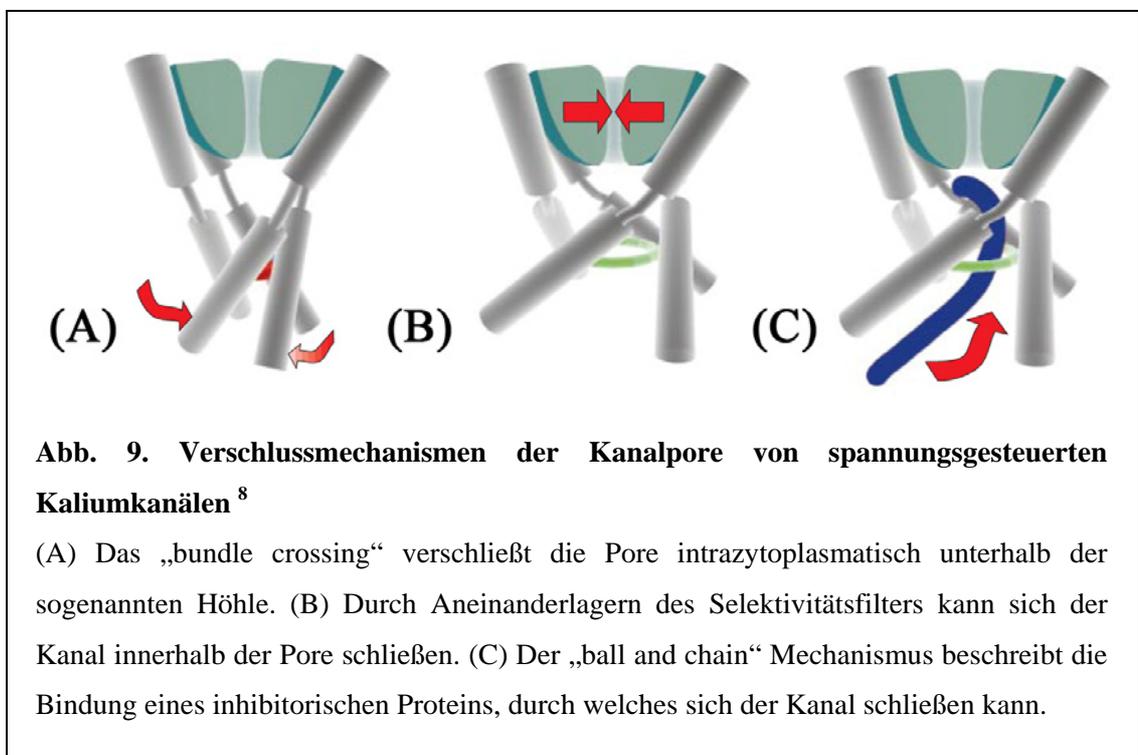
Das Bec-1 Proteins wird von dem Gen KCNH3 kodiert, welches sich auf Chromosom 12q13 befindet. Auf der Grundlage von Sequenzanalysen besitzt KCNH3 zu 95 % Ähnlichkeit zum KCNH3 Gen der Ratte. Zu 48% Prozent zeigt es Analogie mit dem menschlichen Bec-2, 46% zum Ratten elk Kanal sowie 33% zu menschlichen erg und 30% Gleichheit zu Ratten eag Kanälen (Miyake et al. 1999). Die Folgende Abbildung (Abb. 8.) veranschaulicht nochmals schematisch die Subklassifizierung der EAG Kalium Kanäle und verdeutlicht die Position des Bec-1 Kanals im Vergleich zu den anderen EAG Kanälen bezogen auf deren Sequenzhomologie.



⁷ “New Ether-à-go-go K⁺ Channel Family Members Localized in Human Telencephalon”, Miyake et al. (1999), modifiziert

3.2.3. Funktion der Ether-à-go-go Kanäle und Bec-1

Die Aufgabe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle besteht in der Ionenpermeation, welche schnell und ionenspezifisch sein muss. Die Permeation wird durch Konformationsänderungen, die im Öffnen und Schließen der Pore resultieren, reguliert. Die Steuerung erfolgt durch Detektion von transmembranen Strömen (Yellen, 2002). Das Öffnen von Natriumkanälen bewirkt einen Einwärtsstrom von positiv geladenen Natriumionen, welcher die Zellen depolarisiert. Durch das nachfolgende schlagartige Öffnen ($<1\text{ms}$) der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle folgt ein, nach ihrem Konzentrationsgradienten gerichteter, Auswärtsstrom von K^+ Ionen (mit Diffusionsraten von 10^{-8} Ionen pro sec), welcher die Zelle wieder repolarisiert. Um die Ionen beim Durchfluss durch die Kanalpore möglichst stabil zu halten, gibt es mehrere vorteilhafte Konstrukte und Mechanismen der Kaliumkanäle. Zum einen fließen die Ionen mit viel Wasser durch die Pore, sodass die Wassermoleküle, die selbst Dipole sind, die Ionen flankieren können. Der Selektivitätsfilter der Kaliumkanäle ist so gebaut dieses Flankieren zu imitieren um somit die Ionen gleichermaßen zu schützen. Zum anderen nutzt die Pore die Dipoleigenschaft der α - Helices der S-Domänen, da die negativ geladenen Enden zum Inneren der Pore zeigen (Yellen, 2002).



⁸ „The voltage gated potassium channels and their relatives“, Yellen (2002)

Bis heute konnten drei Mechanismen zum Schließen der Pore aufgezeigt werden (Abb. 9.). Der Kanal kann inaktiviert werden, indem der Eingang der Pore durch die S6 Domäne intrazytoplasmatisch verschlossen wird und somit keine Ionen mehr durchfließen können. Zu diesem Verschluss führt ein Übereinanderlegen der intrazytären Anteile von S6 („bundle-crossing“) unterhalb der Porenhöhle, ähnlich einem Verschnüren. Desweiteren kann auch der Selektivitätsfilter durch Annäherung der gegenüberliegenden Enden die Pore verschließen. Die dritte Möglichkeit besteht in der Bindung eines auto-inhibitorischen Proteins, dem sogenannten „ball and chain“ Mechanismus (Armstrong 1971). Dieser Mechanismus wird auch häufig in der pharmakologischen Therapie genutzt. Die Kaliumkanalblocker TEA (Tetraethylammonium) und Quinidin inhibieren auf diese Weise die Ströme der Shakerkanäle, zeigen jedoch keinen Effekt auf den Bec-1 Kanal. Generell sprechen jedoch alle Kanäle der EAG Familie in vermindertem Maße auf beide Kaliumkanalblocker an.

CHO Zellen (chinese hamster ovary), die stabil mit Bec-1 transfiziert wurden, produzieren einen Auswärtsstrom als Antwort auf eine Depolarisation. Die untransfizierten CHO Zellen zeigen jedoch keine Reaktion auf eine Depolarisation, was den Schluss zulässt, dass der Auswärtsstrom von Bec-1 induziert wurde (Miyake et al. 1999).

Die Funktionen des C-terminalen Ende des Bec-1 Kanals wurden bis heute nicht untersucht. Man kann anhand verwandter Kalium Kanäle, beispielsweise dem bakteriellen MthK-Kanal (prokaryotischer Ca^{2+} aktivierter Kalium-Kanal, Chakrapani et al. 2007) vermuten, dass der C-Terminus eine RCK („regulator of conductance“) Domäne als Sensorregion besitzt (Yellen 2002). Die Dissoziation von Ca^{2+} von der RCK Domäne bewirkt den Verschluss des Kanals durch Rotation der Dimere. Die Shaker-Kalium Kanäle weisen eine Calmodulin-Bindungsdomäne auf. Diese bewirkt, bei Bindung von Ca^{2+} Ionen, eine Dimerisierung der C-Termini, und führt infolge dessen zu einer Konformationsänderung, welche im Öffnen der Pore resultiert. In beiden Fällen bewirkt die Bindung oder Dissoziation von Ca^{2+} , eine Veränderung der Flussraten des Kanals (Yellen 2002).

3.2.4. Expression von Bec-1 in verschiedenen Geweben und Zellen

Mit Hilfe von Northernblot Analysen konnte der Bec-1 Kanal in verschiedenen Hirnregionen identifiziert werden (Miyake et al. 1999). Bec-1 Transkripte wurden im zerebralen Kortex, im Hippocampus, im Striatum, inklusive Putamen und Nucleus caudatus, und im Corpus Amygdaloideus nachgewiesen. Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchung verschiedener humaner Hirnregionen durch quantitative PCR bestätigt werden (Zou et al. 2003). Eine

verstärkte Expression des KCNH3 Genes ließ sich im cerebralen und frontalen Kortex, im Hippocampus, Nucleus Accumbens und Corpus Amygdaloideus nachweisen. Generell lässt sich sagen, dass der Kanal in humanem Telencephalorgewebe ausgebildet wird. In weiteren untersuchten Geweben wie Herz, Plazenta, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Skelettmuskel, Thymus, Prostata, Hoden, Ovarien und in Leukozyten aus peripherem Blut ließ sich der Bec-1 Kanal nicht nachweisen. Durch in-situ Hybridisierung konnte die zelluläre Lokalisation des Kanals im Kortex genauer festgestellt werden. Es zeigten sich Signale im Hippocampus und im zerebralen Kortex. Im Hippocampus stellte sich der Kanal im CA1 und CA3 Feld der Pyramidalzellen und in den granulären Zellen des Gyrus dentatus dar. Im Kortex wurde Bec-1 in den Schichten II und VI dargestellt. Spezifische Signale konnten auch in Neuronen festgestellt werden, die den typischen Aufbau von pyramidalen Zellen besitzen (Miyake et al. 1999). Untersuchungen verschiedener Zellen und Zelllinien mittels RT-PCR zeigten, dass der Kanal nicht nur im Telencephalon exprimiert wird, sondern auch in Zelllinien und Blutzellen zu finden ist (Smith et al. 2002). Der Bec-1 Kanal wurde in allen untersuchten Proben von primären Leukämiezellen, aktivierten Tonsillarzellen, Lymphozyten von Patienten mit Sjögren-Syndrom und in EBV transformierten B-Zellen exprimiert. In hämatopoetischen Zelllinien konnte Bec-1 in CEM Zellen und schwach in MOLT-4 Zellen nachgewiesen werden.

3.3. Proteininteraktionen

3.3.1. Interaktionen des HTLV-1 Env Proteins

Nach heutigem Wissensstand gelten zwei Proteine als Interaktionspartner für das SU Protein von HTLV-1, der in Kapitel 1.2.1. erwähnte Glucosetransporter GLUT-1 und die sogenannten Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPGs) (Pinon et al. 2003). HSPGs bestehen aus Glykosaminglykanen mit einem Kern aus Heparansulfaten. Die Assoziation findet jedoch nicht an der Rezeptorbindungsdomäne, sondern am C-Terminus von HTLV-1 SU statt (Jones et al. 2006). HSPGs dienen vielen Viren als mögliche Zellkontakte, im Falle von Herpesviren (HSV-1) als Fusionsrezeptoren (Tiwari et al. 2004) oder als Rezeptoren für HIV an mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (Argyris et al. 2003, Bobardt et al. 2004). Sie agieren zudem als sogenannte „attachment factors“, welche das Eindringen des Virus durch Konzentration dessen an der Zelloberfläche effizient steigern können, wodurch die

Interaktion des Virus mit den Fusionsrezeptoren erhöht wird. Welche genaue Rolle HSPGs bei der Interaktion von HTLV-1 mit der Zielzelle spielen, ist ungeklärt. In adhärenenten (nicht T-) Zellen, welche ein hohes Level an Heparansulfaten exprimieren, wurde sobald HSPGs enzymatisch von der Zelloberfläche entfernt wurden, eine verminderte Bindung von HTLV-1 SU beobachtet, sowie eine um 75- 95% verminderte Virionenzahl. Gleiche Ergebnisse wurden durch Blockade der Interaktion mit Hilfe von Dextransulfaten oder Osteoprotegerin erreicht (Okuma et al., Pinon et al. 2003). In den Zielzellen von HTLV-1, den CD4⁺ Zellen, wurden vergleichsweise niedrige Level an HSPGs an der Zelloberfläche gemessen. Aktivierte man die Zellen jedoch mittels PHA (Phytohämagglutinin) und Interleukin-2, ließen sich höhere Konzentrationen von HSPGs auf der Zellmembran nachweisen (Jones et al. 2005). Trotz einer Blockade aller HSPG Proteine auf den Zellen, konnten HTLV-1 SU Proteine in die Zellen penetrieren. Dies zeigt, dass noch andere interagierende Moleküle, wie beispielsweise der GLUT-1 Transporter, auf der Zelloberfläche vorhanden sein müssen, welche am Eindringen des HTLV-1 Virus beteiligt sind.

Die erforschten Interaktionen von HTLV-1 SU beziehen sich bisher nur auf die Rezeptorinteraktion außerhalb der Zelle. Bis heute liegen keine Erkenntnisse über mögliche Bindungen des SU Proteins innerhalb der Wirtszelle, beispielsweise während der Prozessierung der viralen Bestandteile, vor.

Untersuchungen des HTLV-1 TM Proteins haben ergeben, dass dieses intrazytoplasmatisch an hDlg (human Disc-large) Proteine bindet (Blot et al. 2004). HDlg Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation von Zell-Zell Kontakten, wie neuronale Synapsen und tight junctions. Die an hDlg gebundenen TM Proteine lagern sich an der Zellmembran an, ebenso wie das Gag Protein und virale RNA. Da sich HTLV-1 hauptsächlich über Zell-Zell Kontakte verbreitet scheint dieser Mechanismus ein wichtiger Schritt der Übertragung von HTLV-1 auf andere Zellen zu sein. Diese Vermutung wird durch Virusmutanten, die nicht mehr an hDlg binden können, bestätigt, da diese eine verminderte Fähigkeit zur Zell-Zell Fusion zeigten (Blot et al. 2004).

3.3.2. Ether-à-go-go related Kanäle und minK/MiRP1

Für den Bec-1 Kanal konnten bisher keine Interaktionspartner dargestellt werden. Dass zelluläre Proteine mit Kanälen der EAG Familie interagieren können, zeigt sich an der Interaktion von minK und MiRP1 (minK related protein 1) mit HERG (humane Ether-à-go-go related) Kanälen. MinK ist ein kurzes integrales Membranprotein mit einer Größe von ungefähr 15 kDa. Mittels Immunopräzipitation konnte eine Assoziation des minK Proteins

mit dem HERG Kanal dargestellt werden (McDonald et al. 1997). Diese Bindung findet schon zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese statt, möglicherweise im Endoplasmatischen Retikulum. Durch die Interaktion mit minK wird die Anzahl an funktionsfähigen HERG Kanälen in der Zellmembran gesteigert, es erhöht jedoch nicht die Oberflächenexpression des HERG Proteins. Die Assoziation führt in diesem Falle zu einer Steigerung der „aktiven“ Kanäle der Zellmembran, die sowohl aktive als auch ruhende Kanäle besitzt.

Neben minK besitzt auch MiRP1 die Fähigkeit zur Interaktion mit HERG Kanälen (Abbott et al. 1999). MiRP1 ist ein einzelnes transmembranes Segment, welches sich stabil mit dem HERG Kanal verbinden kann. Der so entstandene Kanalkomplex hat die Funktion eines natürlichen Kaliumkanals. Mutationen des MiRP1 Gens sind assoziiert mit Veränderungen der Kanalfunktion (Long QT-Syndrom, Torsades de pointes Arrhythmien, Curran et al. 1995). Kanäle mit dem mutierten MiRP1 Protein zeigten eine langsamere Aktivierung, eine schnellere Deaktivierung und eine erhöhte Medikamentenempfindlichkeit. Durch Bindung von akzessorischen Proteinen und deren Mutationen sind somit Veränderungen in den Strömungseigenschaften der Kaliumkanäle möglich.

3.3.3. Hefescreen mit MSR V Env

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller-Lantzsch werden seit längerem Interaktionen von endogenen retroviralen und zellulären Proteinen erforscht. Im Zuge dessen wurde das MSR V (Multiple-Sklerose assoziiertes Retrovirus, ein Mitglied der humanen endogenen Retrovirusfamilie W) Envelope Protein näher untersucht. Um dessen mögliche zelluläre Interaktionspartner zu charakterisieren, wurde ein Hefe-II-Hybrid Screen mit dem Gal4 basierten Hefe-II-Hybrid System der Firma Clontech durchgeführt. Als Grundlage diente eine cDNA Bank aus dem Gehirn eines erwachsenen Menschen (Clontech). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte als Interaktionspartner zu MSR V Env das Kaliumkanalprotein Bec-1 identifiziert werden.

3.4. Ziele dieser Arbeit

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit die mögliche Interaktion des HTLV-1 Env Proteins mit dem Bec-1 Kanal näher untersucht werden. Es sollte somit geklärt werden, ob die Ergebnisse, die bisher für das Env-Protein von MSR V, einem endogenen

Retrovirus, zutreffen, sich auch auf das Env-Protein des exogenen Retrovirus HTLV-1 übertragen lassen.

Hierfür sollte eine mögliche Bindung von HTLV-1 Env mit Bec-1 mit folgenden *in vivo* und *in vitro* Untersuchungsmethoden näher charakterisiert werden:

- Pulldownanalysen
- Immunopräzipitationen und Coimmunopräzipitationen
- Kolokalisationsstudien

Die möglichen funktionellen Effekte der Interaktion sollten in einem Zytotoxizitätsassay dargestellt werden. Abschließend wurden unterschiedliche Zelllinien auf die Expression des Bec-1 Kanals mittels RT-PCR getestet.

Die vorliegenden Ergebnisse sollen zu einem besseren molekularbiologischen Verständnis der Interaktionen retroviraler und zellulärer Proteine führen und als mögliche Grundlage für therapeutische Ansätze dienen.

4. Material

4.1. Bakterienstämme

E. coli-pMos-blue (pMos-blue T-vector Kit, Amersham) wurden zur Transformation sowie zur Klonierung in den pGem-T-Vektor benutzt.

E. coli BL21DE3 (Studier et al. 1986) wurden zur Proteinexpression benutzt.

4.2. Größenmarker

4.2.1. DNA – Größenmarker

„1-kb⁺ Marker“ der Firma Invitrogen besteht aus Vektor-DNA-Fragmenten mit den Größen 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.65, 1, 0.85, 0.65, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 und 0.1 kB

4.2.2. Proteingrößenmarker

Low-Molecular-Weight-Marker mit Proteinen der Größe 94, 67, 43, 30, 20, 14 kDa (selbst hergestellt).

¹⁴C Marker: Proteine des Molekulargewichts 200, 92, 69, 46, 30, 14 kDa, die radioaktiv mit Kohlenstoff markiert wurden (Amersham).

4.3. Antikörper

4.3.1. Monoklonale Antikörper

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

Anti-HTLV-1 gp 46 Antikörper aus der Maus (Abcam)

4.3.2. Polyklonale Antikörper

Anti-Bec-1 Antikörper aus Kaninchen, gegen die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren von Bec-1, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller- Lantzsch

Anti-pDsred Monomer Antikörper aus Kaninchen, (Clontech)

4.3.3. Peroxidasekonjugierte Zweitantikörper

Anti-Ratte IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert aus Kaninchen (Sigma & Aldrich).

Anti-Kaninchen IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert aus der Ziege (Sigma & Aldrich).

Anti-Maus IgG Antikörper, peroxidasekonjugiert aus Ziege (Sigma & Aldrich).

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 Aqua dest.
LB-Medium oder LB-Agar mit Ampicillin	0,1g Ampicillin pro ml Medium, 0,1% [w/v]
LB-Medium oder LB-Agar mit Kanamycin	10mg Kanamycin pro ml Medium 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 (1M, pH 8)	60,55g auf 500ml Aqua dest.
TE(Tris-EDTA)-Puffer	1ml Tris-HCl (1M); 0,5ml EDTA (0,2M); auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen, 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 (engl. "Samplebuffer")	6ml SDS (10%); 2,5ml Uppergel-stock-Lösung; 1ml Mercaptostrandiol; 1,05ml Glycerin
Probenpuffer mit Bromphenolblau	Probenpuffer, blau gefärbt mit einer Messerspitze 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 (engl. "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); Natriumdodecyl-sulfat (SDS, 0,4%); pH 6,8
Bottomgelstock	Tris-HCl (1,5M); Natriumdodecyl-sulfat (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); MgCl ₂ (50mmol/l); Dithiothreitol (DTT, 10mmol/l); Tris-HCl (600mmol/l, pH 7,5)

4.5. Vektoren

4.5.1. pGem-T-Zellvektor (Promega)

Dieser bakterielle Expressionsvektor wird zur Klonierung von PCR Produkten mit Hilfe von überhängenden Desoxyadenosinresten durch die Taq-Polymerase benutzt. Die klonierten Fragmente integrieren in das lacZ-Gen des Plasmids, wodurch ein „Blue-White-Screening“ ermöglicht wird.

4.5.2. pGBKT7 Vektor (Clontech Biosciences)

Der Expressionsvektor pGBKT7 wird zur Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen mittels Invitrotranslation benutzt und ermöglicht somit den Nachweis von Protein-Proteinbindungen in Pulldownanalysen. Der Vektor kodiert für einen T7 Promoter, der die Transkription und Translation reguliert. Bei der Expression werden die Proteine mit einer GAL4-DNA Bindungsdomäne fusioniert. Als Selektionsmarker besitzt pGBKT7 ein Kanamycin Resistenzgen.

4.5.3. pGex-4T-1 Vektor (Amersham)

Dieser Expressionsvektor dient zur Herstellung von Fusionsproteinen, durch das Gluthathion-S-Transferase (GST) System. Nach Induktion des tac-Promotors mit IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactosid) entsteht ein 26 kDa großes GST Molekül welches an das Protein des Inserts angehängt ist. Daher können die Proteine durch Bindung an die Glutathionsepharose eluiert werden. Diese Technik wird vor allem in Pulldownanalysen genutzt.

4.5.4. pEGFP C1 Vektor (Addgene)

Der Vektor ermöglicht die Expression von Fremdproteinen als Fusionsproteine mit dem grün-fluoreszierenden Protein eGFP („enhanced green fluorescence proteine“), oder die alleinige Expression von GFP zur Kontrolle der Transfektion. Zur Selektion besitzt pEGFP C1 eine Kanamycin Resistenz.

4.5.5. pDsred Monomer Vektor (Clontech)

Dieser Expressionsvektor kodiert für ein Dsred-Monomer-Fluoreszenz Protein, welches sein Emissionsmaximum bei 585 nm und ein Exzitationsmaximum bei 557 nm aufweist. Er besitzt einen CMV Promotor, der Proteine als Fusionsproteine mit einem Dsred-Tag exprimiert. Zur differenziellen Selektion enthält dieser Vektor ein Ampicillin Resistenzgen.

4.5.6. pSG5 Vektor (Stratagene)

Dieser 4,1 kb große, eukaryotische Vektor dient zur transienten Expression von Proteinen. Er besitzt einen T7 Promotor des Simian Virus 40 (SV40) und weist ein Ampicillin-Resistenz-Gen auf.

4.5.7. pHCMV- pA-Vektor

Der 4,6 kb große Vektor verfügt über einen expressionsstarken CMV-Promotor. Er dient zur *in vivo* Expression im eukaryotischen System. Als Selektionsmarker besitzt pHCMV-pA eine Ampicillin-Resistenz.

4.6. Oligonukleotide (Operon, Invitrogen)

Folgende Primer wurden zur Herstellung von PCR Amplifikaten und zur späteren Klonierung verwendet. Die Restriktionsenzyme wurden hinter dem Primernamen gekennzeichnet und deren Schnittstellen mittels Kleinbuchstaben verdeutlicht.

1. HTLV-OMFor- EcoRI 5'- GGG AAA gaa ttc ATG GGT AAG TTT CTC – 3'
2. HTLV-SU-Rev- PstI 5'- CCC AAA ctg cag CTA CGG CGG GAG CGG
G – 3'
3. HTLV-TM-For– EcoRI 5'- GGG AAA gaa ttc GGA GTA CCG GTG GCG – 3'
4. HTLV-TM-Rev- PstI 5'- GGG CCC ctg cag TTA CAG GGA TGA CTC AGG –
3'
5. HTLV-EnvOMFor2 5'- ATG GGT AAG TTT CTC GCC ACT – 3'
6. HTLV-EnvOM-Rev2 5'- GAC ATG GAG CCC GGT AAT CC – 3'
7. HTLV-EnvTMFor2 5'- CCC CTT TTC CTT GTC ACC T – 3'
8. HTLV-EnvTM-Rev2 5'- GGT TTA CAG GGA TGA CTC AGG – 3'
9. HTLV-Env-OM3For-EcoRI 5'- Gga att cAT GGG TAA GTT TCT CGC CAC T – 3'
10. HTLV-EnvOM3Rev-PstI 5'- Cct gca gTC GGC GGG AGC GGG ATC CTA
G – 3'
11. HTLV-EnvTM3For-EcoRI 5'- Gga att cGC AGT ACC GGT GGC GGT CTG
G – 3'
12. HTLV-EnvTM3Rev-PstI 5'- Cct gca gGG TTT ACA GGG ATC ACT CAG
G – 3'
13. HTLV-1-OMfor4-NdeI 5'- cat atg ATG GGT AAG TTT CTC GCC – 3'
14. HTLV-1-OMfor5-PstI 5'- ctg cag GGA TGG GTA CTT TCT CGC C – 3'
15. HTLV-1-TM-FOR4-NdeI 5'- cat atg GCA GTA CCG GTG GCG GTC – 3'
16. HTLV-1-TM-FOR5-PstI 5'- ctg cag GGG CAG TAC CGG TGG CGG TC – 3'
17. BEC1-FWD2-EcoRI 5'- AAA GGG gaa ttc GGT ACC CTG GCC CTG
GGG – 3'
18. BEC1-Rev1-XhoI 5'- ATA TGG ctc gag ATG AGG GGA GGA GGC CCC –
3'
19. BEC1-Rev2-XhoI 5'- ATA TGG ctc gag TCA GAC CCC TGT GCC
TTC – 3'

20. BEC-1-Rev2-NotI	5'- ATA Tgc ggc cgc TCA GAC CCC TGT GCC TTC - 3'
21. HTLV-1-TM-cut-NdeI	5'- AAA GGG cat atg GCC CAG AAC AGA CGA GGC - 3'
22. HTLV-1-TM-cut-PstI	5'- AAA Gct gca gGG GCC CAG AAC AGA CGA GGC - 3'
23. BEC-1Rev-3200-NotI	5'- ATA Tgc ggc cgc TGG GGG ACC CCA GGG CCA - 3'
24. BEC-1Rev-3227-NotI	5'- ATA Tgc ggc cgc TCG AGG CCA GGG GGA GCT - 3'
25. BEC-1Rev-3332-NotI	5'- ATA Tgc ggc cgc CCC TTC CTC AGA AGG AGG - 3'
26. BEC-1Rev-3482-NotI	5'- ATA Tgc ggc cgc GTC CCA GGG CAA GGC CAG - 3'
27. Klon30FP- EcoRI	5'- AAA GGG gaa ttc AGC GGC CTG CTC ACT GTT- 3'
28. KCNH3-F	5'- AGG GGC TTT GAA GGC TGA- 3'
29. KCNH3-R	5'- AGC ACC TGC TCT GAC AGC TC- 3'
30. BEC-FWD3-E-998-EcoRI	5'- AAA GGG gaa ttc GAC TCA GAG CCC CCT GCC- 3'
31. BEC-FWD4-F-1025-EcoRI	5'- AAA GGG gaa ttc GCT AGG ACT GGG CCC GCA- 3'
32. BEC-FWD5-F-1058-EcoRI	5'- AAA GGG gaa ttc CCC CAC AGC CTG GAG ATG- 3'
33. HTLV-1-SU-Red-F-SacI	5'-AGA Gga gct CAA ATG GGT AAG TTT CTC GCC- 3'
34. HTLV-1-SU-Red-R-KpnI	5'-ATA Tgg tac cTC GGC GGG AGC GGG ATC C- 3'
35. KCNH3 F	5'-AGG GGT TTG AAG GCT A- 3'
36. KCNH3 R	5'-AGC AGG TGC TCT GAC AGC TC- 3'
37. GAPDH N	5'-AGT CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC- 3'
38. GAPDH M	5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC- 3'
39. HTLV-1-SU-F-pHCMV -BamHI	5'-AGA Ggg atc cAT GGG TAA GTT TCT CGC C- 3'
40. HTLV-1-SU-R-pHCMV -BamHI	5'-ATA Tgg atc cTC GGC GGG AGT GGG ATC C- 3'

4.7. Enzyme und dNTPs

Alkalische Phosphatase	Boehringer
dNTP's	Boehringer
Taq Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Promega
DNase I	Boehringer
Superscript II RT	Invitrogen
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 (München), Serva (Heidelberg), Biozym (Rockland, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt).

4.8.2. Photochemikalien

Röntgen-Entwicklerkonzentrat, ADEFO Chemie GmbH

Röntgen-Fixiererkonzentrat, ADEFO Chemie GmbH

ECL Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech

4.8.3. Radiochemikalien

³⁵S- translabelled Methionin/Cystein, MP Biomedicals

4.8.4. Kits

ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences

Nucleospin Extract II, Macherey und Nagel

Nucleobond Plasmidextraktion, Macherey und Nagel

T7- TNT "reticulocyte-coupled *in vitro* Transcription and Translation System", Promega

RNeasy Mini, Qiagen

QIAshredder, Qiagen

4.8.5. Papiere und Membranen

Whatman Limited, Springfield, Maidstone, Kentucky, USA

Immobilon Nylon-Protein-Transfermembran, Millipore Corporation, Billerica Massachusetts

4.8.6. Zellkulturmedien

RPMI 1640 und Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), PAA Laboratories

Fötale Kälberserum (FKS), Biochrom, Berlin

4.8.7. Nährmedien für Bakterien

LB Broth, Miller, Difco, Becton & Dickinson

LB Agar, Miller, Difco, Becton & Dickinson

4.9. Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert. Diese sind durch die entsprechenden Primer mittels PCR amplifiziert worden. Das entstandene Fragment wurde durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und in Vektoren kloniert (Kap. 2.5.).

1. pGBKT7 HTLV 1 SU, Primer 10. und 13.
2. pGBKT7 HTLV 1 TM, Primer 12. und 16.
3. pGBKT7 HTLV 1 TM Cut, Primer 12. und 21.
4. pGex Bec I, Primer 18. und 27.
5. pGex Bec II, Primer 18. und 20.
6. pGex Bec A, Primer 18. und 23.
7. pGex Bec B, Primer 18. und 24.
8. pGex Bec C, Primer 18. und 25.
9. pGex Bec D, Primer 18. und 26.
10. pGex Bec 3.6, Primer 20. und 30.
11. pGex Bec 4.14, Primer 20. und 31.
12. pGex Bec 5.31, Primer 20. und 32.
13. pDsred SU, Primer 33. und 34.
14. pHCMV SU, Primer 39. und 40.

4.10. Zellen und Zelllinien

4.10.1. B-Zelllinien

B95-8: EBV Typ 1 positive Zelllinie aus *in vitro* immortalisierten B-Zellen eines Krallenaffen. Das zur Immortalisation verwandte Epstein-Barr Virus stammte von einer Patientin mit infektiöser Mononukleose (Lipman, 1973).

Raji: EBV positive B-Zelllinie aus einem Burkitt Lymphom mit Chromosomentranslokation (8;14) (Pulvertaft, 1964)

Jiyoye: EBV positive B-Zelllinie aus einem Burkitt Lymphom eines afrikanischen Patienten (Pulvertaft, 1965).

Bjab: EBV negative B-Zelllinie aus Biopsiematerial eines Burkitt Lymphoms eines afrikanischen Patienten (Klein et al., 1967)

BL 41: Ebenfalls EBV negative Zelllinie aus einem Burkitt Lymphom eines afrikanischen Patienten (Lenoir et al., 1985).

BL 41– B95.8: BL 41 Zellen, die mit EBV B95-8 infiziert wurde.

BLCL-M: B-lymphoblastoide Zelllinie, hergestellt aus PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) eines Mitarbeiters, die durch Transformation mit EBV-B95-8 immortalisiert wurden.

4.10.2. Adhärenzte Zellen

293 T: Humane Epithelzelllinie aus Nierenepithel, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurde und das SV 40 T-Antigen enthält.

Hela: Zelllinie kultiviert aus einem Zervixkarzinom einer 31-jährigen Frau (Scherer et al., 1953)

Gos 3: Astro-Oligodendrogliom Zelllinie eines 55-jährigen Mannes (Halfter et al., 1998)

Tera 1: Humane Teratocarcinom Zelllinie

Cos 1: „African green monkey cells“, von Nierenzellen abgeleitete, fibroblastenähnliche Zelllinie (Gluzman, 1981)

4.10.3. T- Zellen und Zelllinien

Tall: Humane T-lymphoblastoide Zelllinie eines Kindes mit T-ALL (Santoli et al., 1990)

Jurkat: T-Zelllinie aus dem Blut eines Patienten mit ALL (Schneider et al., 1977)

A3.01: Klon einer humanen T-Zelllinie, gewonnen von einem Kind mit ALL, die bei HIV Infektion zytopathische Effekte zeigt und zu Grunde geht (Folks, 1985)

Ach2: Klon der A3.01 Zelllinie, der bei HIV Infektion nicht zu Grunde ging und so latent mit HIV infiziert ist (Folks, 1989)

CD4⁺: aufgereinigte primäre CD4 positive T-Zellen (In Kooperation mit AG Prof. Hoth)

CD8⁺: aufgereinigte primäre CD8 positive T-Zellen (In Kooperation mit AG Prof. Hoth)

4.11. Computersoftware

Die Software Microsoft XP Home Edition wurde als Grundlage für die vorliegende Doktorarbeit verwendet. Zur Bildbearbeitung diente Adobe Photoshop CS2 und Microsoft Powerpoint. DNA Sequenzanalysen wurden mit den Programmen Blast Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) und UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/sprot>) durchgeführt. Für den T-Test für unverbundene Stichproben wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 verwendet. Zur Literaturrecherche im Internet wurden die Datenbanken von MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) und die Suchmaschine Google Scholar (scholar.google.de) verwendet.

5. Methoden

5.1. Bakterienkultur

5.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

30 ml SOB Medium, zu dem kurz vor Gebrauch 10 ml 1 M Magnesiumlösung gegeben wurde, wurden mit pMos beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 200 ml SOB Medium mit 8 ml der Übernachtskultur und 2 ml 1 M Magnesiumlösung versetzt. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3 bei 550 nm bei 37°C geschüttelt, danach zu je 50 ml Aliquots für 15 min auf Eis gekühlt und bei 3000 upm, 4°C für zehn min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Die Pellets wurden in 16 ml TFP 1 resuspendiert und leicht gevortext, 15 min auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert (3000 upm, 4°C, 10 min). Nach Lösen des Präzipitats in 4 ml TFP 2 wurde es kurz gevortext und für ein Stunde bei RT stehen gelassen. Je 100 µl kompetente pMos Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70° gelagert.

5.1.2. Transformation und Kultivierung von Bakterien (Lederberg und Cohen, 1974)

Zu 50 µl pMos Bakterien, die 30 min auf Eis auftauten, wurde 1 µg Plasmid DNA gegeben und für zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagerte sich die DNA an die Bakterienwand an. Der folgende Hitzeschock für zwei Minuten bei 42°C diente zur Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch die Bakterien die DNA aufnahmen. Die Kultur wurde direkt auf Eis gestellt, sodass sich die Poren der Bakterien wieder schlossen. Für die Vorkultur wurde zu jedem Ansatz 200 µl LB Medium gegeben, der Ansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt und danach auf LB Agarplatten, die mit Ampicillin (1 µg/ml) versetzt oder Kanamycin (3 µg/ml) behandelt wurden, ausplattiert. Diese wurde dann bei 37°C über Nacht inkubiert oder zu 100 ml LB Medium (mit Ampicillin oder Kanamycin) gegeben und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler kultiviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien, die durch das Plasmid die jeweilige Resistenz besaßen.

Zur Aufbewahrung wurden 800 µl der transformierten Kultur zu 200 µl DMSO gegeben und bei -70° weggefroren.

5.2. DNA-Techniken

5.2.1. Agarosegelelektrophorese

Während der Gelelektrophorese wurden die DNA Fragmente nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Je nach Größe der DNA musste die Agarosegelkonzentration bestimmt werden. Da in der vorliegenden Arbeit Fragmente zwischen 300 und 1000 bp amplifiziert wurden, wurde eine Konzentration von 1,5% gewählt. Der Agarose wurde einfach TAE beigemischt und unter Kochen gelöst. Die Amplifikate wurden mit 20% Blaumarker versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipetiert. Um die Größe bestimmen zu können, wurde DNA Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer TAE gefüllten Kammer, in einem elektrischen Feld von maximal 120 V. Um die Fragmente im Gel darstellen zu können, wurde der Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), welcher im Doppelstrang interkaliert, zugegeben. Der Nachweis erfolgte unter kurzwelligem UV-Licht (254 nm Wellenlänge) und wurde fotografisch festgehalten.

5.2.2. DNA-Aufreinigung aus Agarosegel

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Banden wurden unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, um Doppelstrangbrüche und weitere UV-Licht induzierte DNA Schäden zu vermeiden. Die DNA Fragmente wurden dann mit Hilfe des Nucleo Spin Extract II Kits von Macherey und Nagel aufgereinigt. Dieser Kit basiert auf Grundlagen der Ionenaustauschchromatographie, sodass die DNA an der positiv geladenen Säule bindet. Die Eluierung erfolgt nach einem Waschschrift durch Zugabe von TE Puffer.

5.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1988, Graham, 1973)

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine gebräuchliche Technik zur gezielten *in vitro* Amplifikation bestimmter DNA Fragmente. Sie verläuft in bis zu 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Bei der Denaturierung wurde durch Erhitzen auf über 90°C der Doppelstrang der Ausgangs-DNA (Template) getrennt. Beim Annealing lagerten sich die sequenzkomplementären Primer an das Template an. Dieser Schritt erfolgte bei einer Temperatur von ca 50°C. In der Elongationsphase wurden komplementäre DNA Stränge durch die Taq-Polymerase

synthetisiert. Die Taq-Polymerase ist eine hitzestabile Polymerase, die ihr Arbeitsoptimum zwischen 68°C und 73°C hat. Durch Wiederholung dieses Zyklus war eine exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden 50 µl Ansätze verwendet, diese beinhalten je 1 µl Template DNA, 0,3 µl Taq Polymerase, 5 µl Taq-Puffer, 1 µl Forwardprimer, 1 µl Reverseprimer (Konzentration 25 µM) und dNTPs in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM.

Die durchgeführten Amplifikationen erfolgten mit dem Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Reseach und folgenden Programmen:

- KR 58_40, Programm mit 40 Zyklen
 1. 95°C, 3 Minuten
 2. 95°C, 50 Sekunden (Denaturierung)
 3. 58°C, 50 Sekunden (Annealing)
 4. 72°C, 1 Minute (Elongation)
 5. Wiederholung der Schritte 2.-4. 39 mal
 6. 72°C, 10 Minuten
 7. Abkühlen auf 4°C
- KR 58_35, Programm mit 35 Zyklen
 1. 95°C, 3 Minuten
 2. 95°C, 50 Sekunden (Denaturierung)
 3. 58°C, 50 Sekunden (Annealing)
 4. 72°C, 1 Minute (Elongation)
 5. Wiederholung der Schritte 2.-4. 34 mal
 6. 72°C, 10 Minuten
 7. Abkühlen auf 4°C
- JM3MIN, Programm mit 30 Zyklen
 1. 94°C, 3 Minuten
 2. 94°C, 50 Sekunden (Denaturierung)
 3. 60°C, 50 Sekunden (Annealing)
 4. 72°C, 90 Sekunden (Elongation)
 5. Wiederholung der Schritte 2.-4. 29 mal
 6. 72°C, 10 Minuten
 7. Abkühlen auf 5°C

5.2.4. DNA Sequenzierung

Für Sequenzanalysen wurden 30 µl des Plasmids in der Konzentration 0,1 µg/µl zur Firma GATC-Biotech AG in Konstanz versandt.

5.2.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Um ein DNA Fragment an bestimmten Stellen aufspalten zu können, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme erkennen bestimmte Sequenzen mit hoher Spezifität und spalten den DNA Strang, indem sie die Phosphodiesterbindung splicen. Für den Ansatz eines Restriktionsverdau wurde zu analytischen Zwecken 1 µg DNA benutzt, zur Präparation bis zu 10 µg. Die Ansätze (20 µl-100 µl) wurden mit zwei bis fünf U's pro Enzym und zwei bis zehn µl Restriktionspuffer, nach Angaben des Herstellers, versetzt.

5.2.6. Dephosphorylierung von Vektoren (Bolivar et al., 1977, Chaconas et al., 1980)

Vektoren, die durch Endonukleasen geschnitten wurden, besitzen ein 5' Phosphatende. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass diese wieder religieren und somit den Einbau des Inserts unmöglich machen. Um dies zu verhindern, wurde der verdauten Vektor mit alkalischer Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase, CIP), nach Angaben der Firma Boeringer Ingelheim, versetzt. Diese entfernte („cippt“) die Phosphatreste des Vektors, welcher nur wieder religieren konnte, wenn er ein Insert trägt, welches die beiden Phosphatreste besitzt. Dieser Vorgang wurde durch Ligasen gesteuert.

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

Der Einbau eines DNA Fragments in einen Vektor geschieht durch DNA Ligasen und wird Ligation genannt. Hierfür wurden äquimolare Mengen des verdauten und „gecippten“ Vektors mit dem verdauten Insert bei 4°C über Nacht inkubiert. Um den Einbau vorzunehmen, wurde zusätzlich T4-DNA Ligase und T4-DNA Ligasepuffer (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers zugegeben.

5.2.8. Analytische Plasmidaufarbeitung (Minipräparation, Holmes und Quigley, 1981)

Um festzustellen, welche Klone einer Agarplatte das Insert tragen, wird die Minipräparations Methode angewandt. Hierbei wurden geringe Mengen Plasmid DNA aufgereinigt und später durch Restriktionsverdau analysiert.

Die Ligation des DNA Fragments mit dem Vektor wurde transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten enthielten je nach Resistenzgen des Vektors das entsprechende Antibiotikum. Die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden in 1,5 ml LB Medium (mit Antibiotikum) gegeben und nochmals über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl STET Puffer und Lysozym versetzt. Die Suspension wurde für 30 sek gekocht und direkt auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (12000 upm, 4°C, 15 Minuten) wurden die Pellets mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Auf die Zugabe von 200 µl Isopropanol folgte eine erneute Zentrifugation (12000 upm, 4°C, 15 min). Die Pellets wurden in 70% Ethanol aufgenommen und in gleicher Weise zentrifugiert. Nach Trocknung der Sedimente wurden diese in 30 µl TE- RNase gelöst. Die Analyse erfolgte durch Restriktionsverdau mit Endonukleasen.

5.2.9. Präparative Plasmidaufarbeitung (Midipräparation)

Die inserttragenden Klone der Minipräparation können durch Midipräparation in größeren Mengen vervielfältigt werden. Nach Animpfen von 100 ml LB Medium wurde die Kultur über Nacht bei 37°C angezogen. Zur Aufreinigung wurde ein Plasmid-Isolationskit der Firma Macherey und Nagel nach deren Angaben verwendet. Die DNA wurde über eine Säule aufgereinigt, eluiert und mit Alkohol präzipitiert. Es erfolgte eine Konzentrationseinstellung auf 1 µg/µl nach photometrischer Konzentrationsmessung.

5.2.10. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und Proteinen

5.2.10.1. DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch Absorptionsspektroskopie gemessen. Zur Analyse wurde eine 1:100 Verdünnung des Plasmids mit Wasser verwendet (500 µl Wasser auf 5 µl Probe). DNA weist in wässrigen Lösungen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf, Proteine bei 280 nm. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz kann die Extinktion in die

Nukleinsäurenkonzentration umgerechnet werden, sowie über den Quotienten aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm die Reinheit (Ratio) der Lösung bestimmt werden, ein optimaler Wert sollte zwischen 1.65-1.85 liegen. Niedrigere Werte lassen auf Proteinverunreinigungen, höhere auf RNA Verunreinigungen schließen.

5.2.10.2. RNA

Eine 1:50 Verdünnung der RNA wurde gegen 260 nm Wellenlänge gemessen. Optimalerweise sollte der Wert der Ratio zwischen 1.9 und 2.20 liegen.

5.2.10.3. Proteine

Proteinkonzentrationen wurden in einer Lösung 0,1 molarer Natronlauge analysiert. Dazu wurde 10 µl Proteinextrakt in 500 µl NaOH gelöst und gegen 280 nm Wellenlänge gemessen. Danach konnte über die Formel 6.4/o.D. entsprechen 15 µg Protein die Proteinmenge berechnet werden.

5.2.11. RNA Extraktion und DNase Verdau

Zur RNA Extraktion wurden in der vorliegenden Arbeit Zellkulturen verwendet. Bei Suspensionzellen wurde nach zehnmütiger Zentrifugation auf die pelletierten Zellen RLT Lysispuffer gegeben, bei adhärenen Zellen konnte der Puffer direkt nach Abnahme der Nährlösung auf die Zellen aufgetragen werden. Die Lösung wurde auf eine Schredder Säule (QIAshredder, Qiagen, Hilden) gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die weitere Extraktion erfolgte über mehrere Wasch- und Eluierungsschritte mit Hilfe des Quiagen RNeasy Mini Kits über Säule, nach Angaben des Herstellers.

Um DNA Verunreinigungen zu vermeiden, wurde das gewonnene Eluat 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad mit DNase und RNAsin (einem RNase Inhibitor) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,2 M EDTA Lösung und einer zehnmütigen Inkubation bei 75°C im Wasserbad gestoppt.

5.2.12. Reverse Transkription

Diese Technik wird genutzt um die gewonnene RNA in cDNA umzuwandeln und sie so in der PCR einsetzen zu können. Hierzu wurden 11 µl RNA mit 4 µl First Strand Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP (0.2 mM Endkonzentration), 1 µl Random Hexamer Primer und 1 µl Superscript Reverse Transkriptase (GIBCO, Life Technologies) für 50 Minuten bei 42°C im

Wasserbad inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Lösung für 15 Minuten in ein 70°C Wasserbad gegeben. Die gewonnene cDNA konnte nun in der PCR verwendet werden.

5.3. Proteintechniken

5.3.1. Herstellung von Proteinextrakten

5.3.3.1. Für GST Pulldown

Nach Induktion wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet mit Lysispuffer gelöst. Die Proteine wurden 60 Sekunden mit Ultraschall behandelt, fünf Minuten gekocht und anschließend für eine Stunde, bei 4°C und 6000 upm zentrifugiert. Dadurch sedimentierten alle unlöslichen Faktoren und die Proteine wurden im Überstand abpipettiert.

5.3.3.2. Für Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Um Proteingrößen durch SDS-Page zu analysieren, wurden die Pellets in 2 x Samplepuffer aufgenommen. Nach 30 sekundiger Ultraschallbehandlung wurde das Proteingemisch für fünf Minuten gekocht. Die Proteine konnten nach Zentrifugation (5000 upm, 1 min) aus dem Überstand entnommen werden.

5.3.3.3. Proteinsynthese durch *in vitro* Transkription und Translation

Da für einen GST-Pulldown radioaktiv markierte Moleküle benötigt werden, wurden diese Proteine mit einem Transkriptions-/Translationssystem hergestellt. Hierfür wurde von der Firma Promega ein Kaninchen-Retikulozyten Lysat nach Angaben des Herstellers verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Einbau von ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein in die synthetisierten Proteine. Als Template DNA dienten die Konstrukte im pGBKT7 Vektor (Kapitel 4.9.).

5.4. Techniken zum Nachweis von Proteinen

5.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) (Lämmler, 1970)

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichts auftrennen zu können, wurde die SDS-Proteingelelektrophorese verwendet. Durch das zugesetzte SDS wurde die Eigenladung der Proteine maskiert, da dieses sich an die Aminosäurereste anlagert und die Proteine neutralisiert. Dadurch wandern Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Die Auftrennkapazität und damit die Porengröße eines Gels wurden durch die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt. Je höher deren Konzentration, desto enger wurden die Poren, was eine bessere Darstellung von hochmolekularen Proteinen ermöglicht. Zur Polymerisation wurde APS und TEMED zugesetzt. Um eine bestmögliche Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die Moleküle erst in einem großporigen Sammelgel konzentriert und dann in einem engmaschigen Trenngel aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden 10-12,5%ige Polyacrylamidgele in einer Kammer mit Laufpuffer (RB-Puffer) bei einer Stromstärke von 25 mA verwendet. Zur Bestimmung der relativen Proteinmenge wurden Markerproteine mit bekannter Molekülmasse zum Vergleich herangezogen.

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

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können auf Membranen gebunden und immunologisch durch Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert (2 h bei 30 V, oder 10 V über Nacht) und durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Die Immobilonfolie wurde zuvor in Methanol getränkt und danach in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer, die mit Transferpuffer gefüllt war. Die Folie wurde danach luftgetrocknet und die Markerspuren auf einem Tischlicht abgetrennt, in Amidoschwarz gefärbt und mit Entfärbemittel visualisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die restliche Folie in Magermilch (5 g Magermilchpulver auf 100 ml PBS) für 30 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Erstantikörper (gelöst in 5 ml Magermilch) unter Schwenken. Nach dreimaliger Waschung der Folie in PBS wurde der peroxidasekonjugierte Zweitantikörper für eine

Stunde bei 4°C auf die Membran gegeben. Nach erneuter PBS Waschung konnten die membrangebundenen Zweitantikörper mittels ECL-Reaktion nachgewiesen werden. Der hierfür verwendete Kit der Firma Amersham beruht auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion. Hierbei wurde Luminol, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase, freigesetzt. Diese Strahlung schwärzte einen aufgelegten Röntgenfilm.

5.4.3. Coomassiefärbung

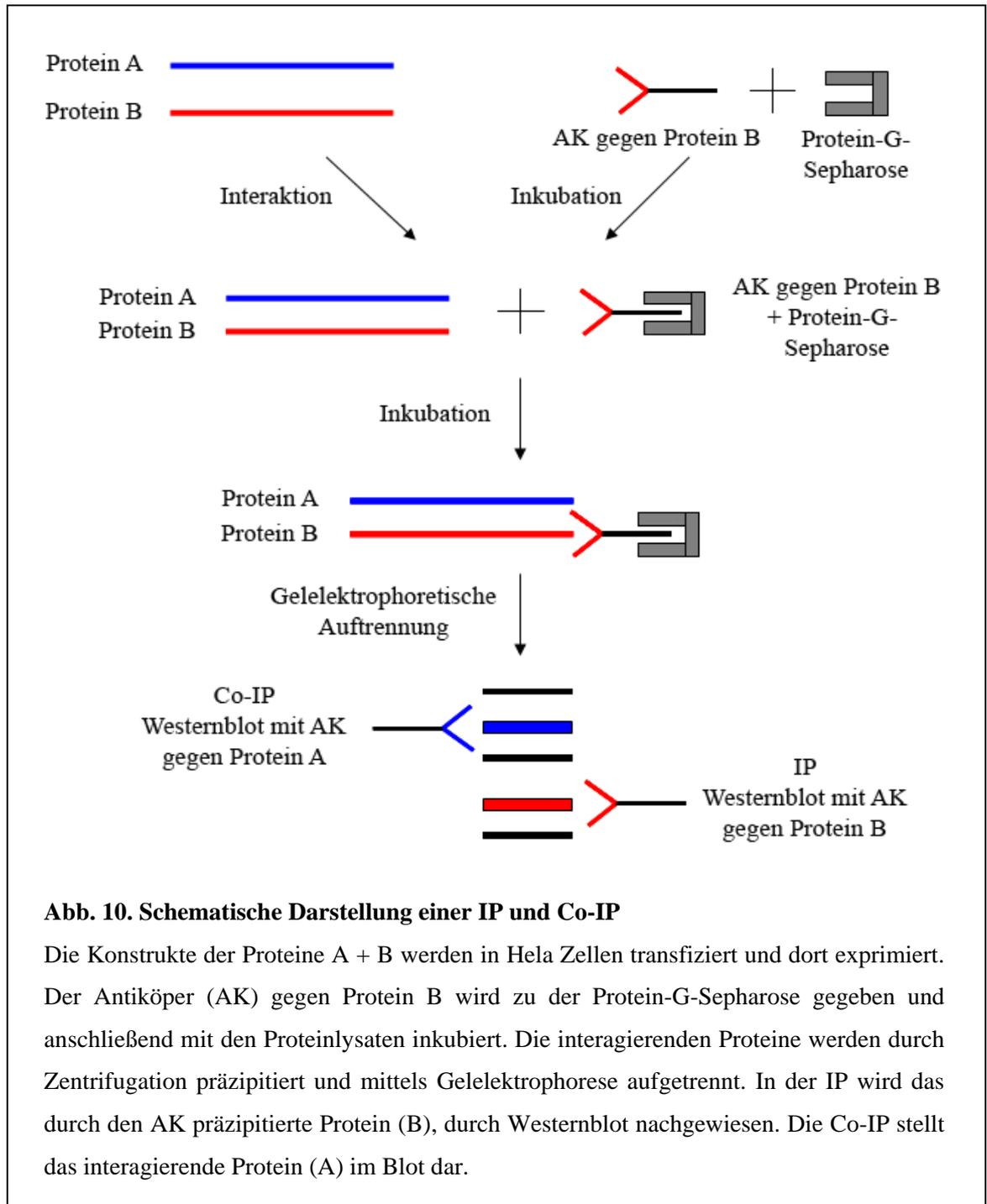
Die Visualisierung von Proteinen kann auch mit dem Farbstoff Coomassie-Blue erfolgen. Hierfür wurde das Gel eine Stunde bei 50°C in Coomassie-Blue inkubiert und anschließend mit Entfärbemittel entfärbt. Zur Dokumentation erfolgte eine Hitzetrocknung unter Vakuum. Diese Färbemethode wurde zur Kontrolle der Bindung von GST an die Glutathionsepharose, beim GST-Pulldown verwendet, um sicher zu stellen, dass der GST-Tag an die Glutathionsepharose gebunden hat (Kapitel 5.5.). Hierfür wurden Samplebufferproben der Inkubation der Lysispuffeextrakte mit der Sepharose zentrifugiert, per SDS-Page aufgetrennt und coomassiegefärbt. Hatte eine Bindung stattgefunden, war das Protein auf dem Gel nachweisbar. Die Färbung wurde auch zur Expressionskontrolle bei der Induktion verwendet (Kapitel 5.5.1.), hierbei wurden die Samplebufferproben der verschiedenen Kontrollzeitpunkte auf ein Gel aufgetragen und anschließend gefärbt. Eine erfolgreiche Induktion des Proteins konnte durch Verstärkung der Bande nachgewiesen werden.

5.4.4. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen

Um die ³⁵S markierten Proteine zu detektieren, wurde das SDS-Gel für 30 min mit Fixierer behandelt, anschließend für 3 x 15 min in Aqua dest gewässert. Zur Verstärkung der Strahlung erfolgte die Inkubation des Gels für eine Stunde in 1M Natrium-Salicylat Lösung. Die Trocknung fand unter Hitzeeinwirkung und Vakuum statt. Anschließend wurde zum Nachweis der Strahlung ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -70°C belichtet.

5.4.5. Immunopräzipitation (IP) und Co- IP

Die Immunopräzipitation dient zum Nachweis von spezifischen Proteinen (IP) sowie Protein-Protein Interaktionen (Co-IP). Die folgende Abbildung (10.) veranschaulicht das Prinzip der IP und Co-IP schematisch.



Native Proteinextrakte wurden mittels Antikörper und deren Bindung an die Protein G-Sepharose präzipitiert. Diese wurde in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und per Westernblot analysiert. Bei der IP wurde der Blot mit dem spezifischen Antikörper gegen das präzipitierte Protein inkubiert, bei der Co-IP wurde der Blot einem Antikörper gegen das

interagierende Protein entwickelt. Die nativen Proteinextrakte wurden in AB Puffer aufgenommen, gevortext und mit Ultraschall behandelt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 upm. Anschließend wurden zu je 500 µl Zentrifugat die entsprechenden Antikörper gegeben. Die Ansätze wurden für eine Stunde auf Eis gestellt und mit je 30 µl Protein G–Sepharose (1:1 in PBS) gemischt. Daraufhin wurden diese für zwei Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und mit AB Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 30 µl Samplepuffer erfolgte eine erneute Zentrifugation (1 min/5000 upm) und ein fünfminütiges Kochen der Ansätze, die danach auf Polyacrylamidgel aufgetragen wurden.

5.4.6. Kolokalisation von Proteinen

Diese Technik wird zum Nachweis von Proteinkolokalisation *in vivo* verwendet. Hela Zellen wurden hierfür mit den fluoreszierenden Vektoren pEGFP C1 und pDsred Monomer (Kapitel 4.5.) und den spezifischen Inserts transfiziert. Die Zellkerne wurden durch den Farbstoff Dapi (4,6-Diamino-2-Phenylindol), der in dem Fixierungsreagenz enthalten ist, angefärbt. Die Fluoreszenzen wurden mit Licht verschiedener Wellenlängen angeregt. Der Nachweis der Kolokalisation erfolgte nach separater Dokumentation beider Proteine und spätere digitale Überlagerung. Der Vektor pDsred Monomer stellte sich als rote Fluoreszenz dar, pEGFP C-1 als grüne. Übereinanderliegende Signale wurden durch die Bildbearbeitungssysteme als gelbe Bereiche dargestellt. Die Aufnahmen entstanden am Fluoreszenzmikroskop in der Medizinischen Mikrobiologie und am konfokalen Mikroskop der Anatomie der Universität des Saarlands. Die konfokale Aufnahmen lassen eine genauere Darstellung der intrazellulären Strukturen zu und weisen eine erhöhte Tiefenschärfe auf.

5.5. GST- Pulldown Analysen

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

5.5.1. Expressionsinduktion von GST-Fusionsproteinen

Eines der zu untersuchenden Proteine wurde bakteriell als GST-Fusionsprotein exprimiert. Hierfür wurden BL21DE3 (E.coli) mit dem jeweiligen Konstrukt im pGex Vektor

transformiert und in 20 ml LB Medium mit Ampicillin über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Übernachtskultur in 100 ml frisches LB-Amp-Medium gegeben und geschüttelt, bis eine OD von 0.6 bei 600 nm erreicht war. Um die Proteinexpression zu induzieren, wurden 95 µl IPTG (0,1 mM) zugegeben. Die Kultur schüttelte für weitere 4 h mit anschließender Messung der OD. Von beiden Zeitpunkten wurden zusätzlich 5 ml Proben genommen, deren Pellets in Samplepuffer aufgenommen und per SDS-Gel mit Coomassiefärbung als Kontrolle der Induktion dienten. Die restliche Bakterienkultur wurde in Lysispuffer aufgenommen und nach Zentrifugation (60 min, 4°C, 12000 upm) als Lysispufferextrakt bei -70°C, aliquotiert á 500 µl, eingefroren.

Für den GST-Pulldown wurden die gewonnenen Lysispufferextrakte zu je 250 µl mit 80 µl Glutathionsepharose für 4 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Hier erfolgte eine Kopplung des GST-Fusionsproteins mit der Glutathionsepharose. Die gebundenen Fusionsproteine wurden durch fünfmaliges Waschen mit low salt Kopplungspuffer und Zentrifugation von Proteinrückständen im Überstand, die nicht an die Sepharose gebunden hatten, gereinigt (Zentrifugation je 1 min, 5000 upm).

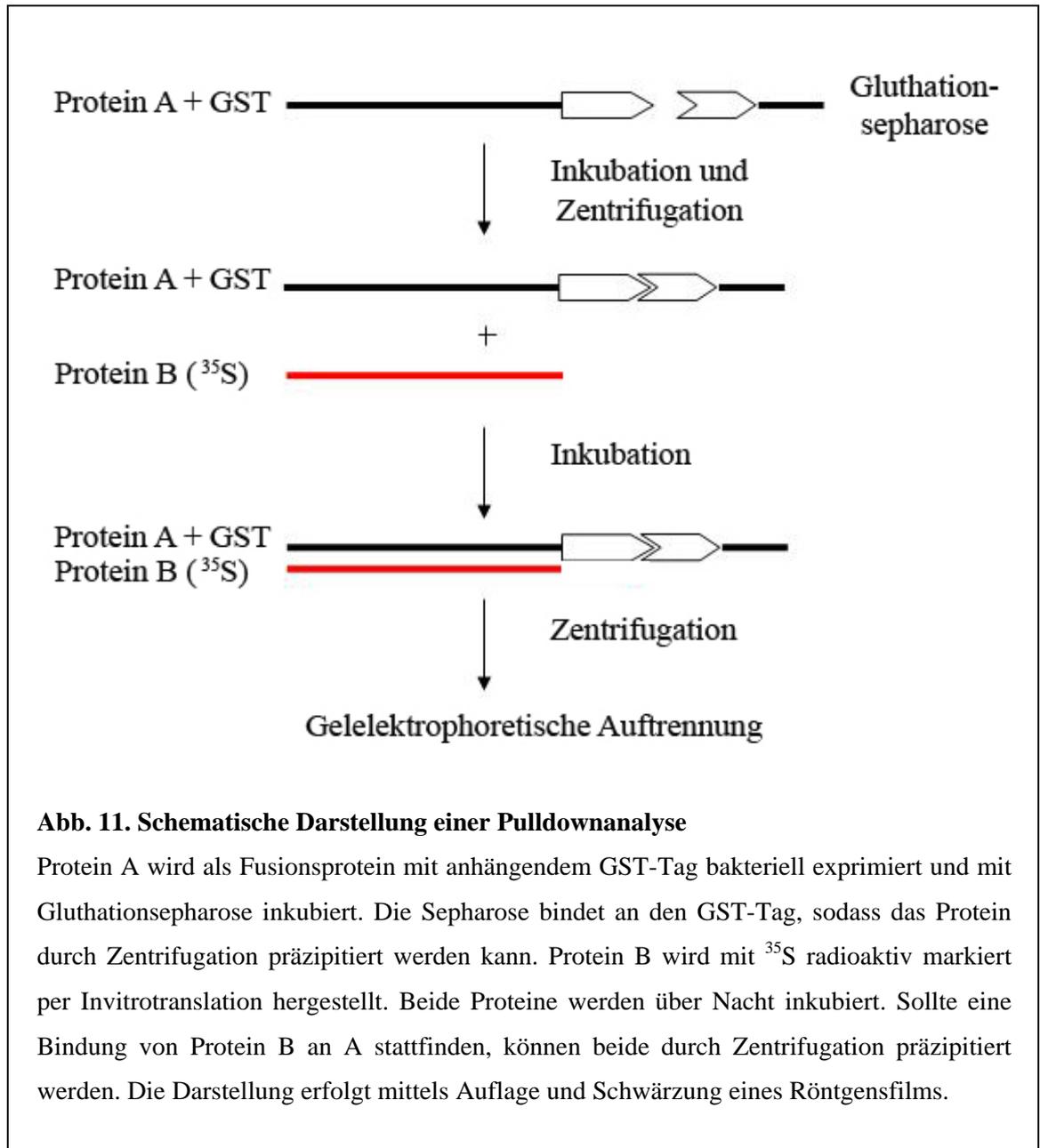
5.5.2. Invitrotranslation

Wie in Kapitel 4.3.3.3. beschrieben, wurden die verschiedenen Komponenten des Invitrotranslationskits nach Angaben des Herstellers zusammengefügt. Als radioaktive Markierung wurden 5 µl ³⁵S-Translabelled und ein methionin- und cysteinfreier Aminosäurenmix hinzugefügt. Als Ausgangs-DNA wurden die jeweiligen pGBKT7 Klone zugesetzt. Der Ansatz inkubierte für 90 min bei 30° im Wasserbad, sodass das Protein exprimiert wurde. Nach direkter Kühlung auf Eis wurden 1,5 µl des Invitrotranslatats mit 20 µl Samplebuffer als Inputkontrolle weggefroren.

Nach Zugabe von 15 µl Invitrotranslatat zu jedem Lysispufferextrakt inkubierten beide Ansätze auf dem Drehrad (4°C) über Nacht.

Am nächsten Morgen erfolgte eine sechsmalige Waschung mit je 500 µl mit high salt Kopplungspuffer. Der Puffer wurde vollständig entfernt, das Pellet mit 20 µl Samplepuffer gelöst und anschließend für 5 min gekocht. Nach erneuter Zentrifugation (5000 upm, 1 min) wurde das Protein aus dem Überstand abpipetiert und auf SDS-Gel gegeben. Das Gel lief für 2 h bei 33 mA und wurde wie in Kapitel 5.4.5. beschrieben nachbehandelt.

Abbildung 11. soll das Prinzip des Pulldownassays schematisch verdeutlichen:



5.6. Zellkulturtechniken

5.6.1. Kultivierung von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 Medium gehalten. Dieses wurde zuvor mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und den Antibiotika Penicillin G 40 (40 U/ml) und

Streptomycinsulfat (50 µg/ml) versetzt. Die Zellen wurden in 20 ml Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und bei einer Dichte von ungefähr 5-6 x 10⁶ Zellen subkultiviert.

5.6.2. Kultivierung von adhärennten Zellen

Nach Ablösen der Zellen durch eine Trypsin/EDTA Behandlung vom Boden der Kulturflaschen, konnten die Zellen in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) subkultiviert werden und bei 37°C und 5% CO₂ gelagert werden. Das Medium wurde zusätzlich mit 10% FKS und einem Antibiotikagemisch aus Penicillin und Streptomycinsulfat versetzt.

5.6.3. Zellzahlbestimmung mit dem Analysegerät CASY

Um bei einer Transfektion eine bestimmte Zellzahl einsetzen zu können, musste die Anzahl mit dem Zellanalysegerät CASY TT (Innovatis) bestimmt werden. Dazu wurde eine 1:1000 Verdünnung der Zellen in Casyton (Elektrolytlösung) aufgenommen. Bei Durchtritt der Zellen durch die Messzelle ändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße. Aufgrund der Tatsache, dass Zellen in einem leitenden Medium als Isolator wirken, kann so auf die Zelldichte und Größenverteilung der Kultur geschlossen werden.

5.6.4. Transfektion von Zellen

In dieser Arbeit wurden Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die optimalen Bedingungen (Verhältnis DNA Konzentration/Lipofectamin Konzentration) mussten für jede verwendete Zelllinie im Vorfeld ausgetestet werden. Bei optimalen Bedingungen wurden bei Hela Zellen Transfektionsraten von bis zu 95 % erzielt.

5.6.5. Zytotoxizitätsassay (MTT-Assay) (Mosmann , 1983)

Das MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid] Assay beruht auf der Fähigkeit der mitochondrialen Dehydrogenase von lebenden Zellen, Tetrazoliumbromid in blau-schwarze Formazankristalle, die die Zellmembran nicht passieren können, umzuwandeln. Durch Zugabe von HCL-Isopropanol (Solubilisationbuffer) wurden die Zellen permeabilisiert und das Formazan konnte wieder in Lösung gehen, wodurch das gesamte Medium eine dunkle Farbe annahm. Die Zahl der lebenden Zellen war direkt

proportional zu der Menge an Kristalleinlagerungen. Somit war es möglich durch Bestimmung der optischen Dichte per ELISA Messung (Wellenlänge 540 nm, Referenzwellenlänge 690 nm) die Zytotoxizität zu quantifizieren, da die Extinktion mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert. Es wurden 96-well Platten verwendet, welche mit 10 µl MTT Reagenz und 100 µl Solubilisationbuffer behandelt wurden. Die Messungen wurden nach 48, 72, 96 und 120 Stunden durchgeführt, währenddessen wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

5.7. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“) wird zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz und Streulichteigenschaften genutzt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen in sterilem PBS gewaschen, bei 1200 upm für 6 min zentrifugiert und durch 300 µl FACS-Fix fixiert. In der Messkammer wurden die Zellen durch einen Argonlaser, der Licht mit der Wellenlänge 488 nm emittiert, angeregt. Das Fluoreszieren der Zellen wurde wiederum von einem optischen System gemessen. So konnte die relative Zellgröße und Zellgranularität gemessen werden, da diese direkt mit der relativen Lichtintensität korreliert. Daher ist die Einheit der FACS Analyse die relative Lichtintensität. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe EGFP („enhanced green fluorescent protein“) und Dsred (rot fluoreszierend) verwendet, die mittels Vektoren durch Transfektion in den Zellen exprimiert wurden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte über Histogramme oder Punktwolkendiagramme mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac AppR 3.0.1.

5.8. Statistische Auswertung des MTT-Assays

Für die statistische Auswertung der Zytotoxizitätsassays wurde ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die mit den Konstrukten transfizierten Zellen wurden jeweils mit den unbehandelten Helazellen verglichen. Die Darstellung und Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0.

6. Ergebnisse

Als Gallo und Hinuma anfang der 80er Jahre das erste humanpathogene Retrovirus in T-Zelllinien nachweisen konnten, bestand nur die Vermutung, dass diese Viren auch kanzerogen wirken können (Poiesz et al. 1980, Hinuma et al. 1981). Heutzutage gilt diese These als erwiesen und HTLV-1 wird eng in Zusammenhang mit T-Zellleukämien und HTLV-1 assoziierter Myelopathie (HAM) gesehen. Während der Virusreplikation werden verschiedene Proteine des Virus von der Wirtszelle synthetisiert, unter anderem die Leserahmen des gag, pro, pol und env Gens sowie die akzessorischen Proteine Tax und Rex. Untersuchungen des Tax Proteins zeigten, dass es durch Interaktion mit zellulären Bestandteilen Transkriptionsfaktoren aktiviert, Signaltransduktionswege modifiziert und die Funktion von Tumor Suppressorproteinen verändert. Zudem wurde nachgewiesen, dass es in DNA Reparaturmechanismen eingreift und apoptoseinhibitorisch wirkt (Shuh et al., 2005). Das Beispiel des Tax Proteins zeigt, dass die Interaktion mit intrazellulären Bestandteilen der Wirtszelle eine wesentliche Rolle in der Pathogenität von HTLV-1 spielt und eine mögliche Ursache für die Entstehung der HTLV-1 assoziierten Erkrankungen sein könnte. Für die Produkte des Env Leserahmens (SU und TM) sind heutzutage verschiedene Funktionen bekannt, jedoch konnten für diese Proteine bisher kaum intrazytoplasmatische Interaktionspartner ausfindig gemacht werden. Durch Bindungsanalysen gelang es der AG Müller-Lantsch, den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Bec-1 als Interaktionspartner retroviraler SU Proteine darzustellen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion des exogenen Retrovirus HTLV-1 und dessen Env Protein mit dem Bec-1 Kanal analysiert.

6.1. Bindung von HTLV-1 SU und TM an den Bec-1 Kanal

6.1.1. Klonierungen

Um die mögliche Bindung des HTLV-1 Env Proteins, mit den Anteilen SU und TM, und dem Bec-1- Kanal zu analysieren, wurden zunächst Pulldownanalysen durchgeführt. Als Ausgangs-DNA diente ein HTLV-1 Klon der Arbeitsgruppe V. Gurtsevitch vom Cancer Research Center der Russian Academy of Medical Science in Moskau. HTLV-1 SU und TM wurden zunächst in den pGEM Vektor (Kapitel 4.5.1.) kloniert, um die nachfolgende Insertion in den Expressionsvektor pGBKT7 (Kapitel 4.5.2.) zu erleichtern. Hierdurch entstanden die Konstrukte pGBKT7 HTLV-1 SU, hergestellt durch die Primer 10. und 13., sowie pGBKT7 HTLV-1 TM, hergestellt durch die Primer 12. und 16. (Kapitel 4.6.). Für den SU Klon wurden bei der PCR Primer mit den Schnittstellen Nde I/Pst I, für TM Pst I/Pst I verwendet. Nach der Klonierung wurden die Konstrukte sequenziert, um eine Sequenzhomologie des Inserts zum MT2 Stamm von HTLV-1 nachzuweisen.

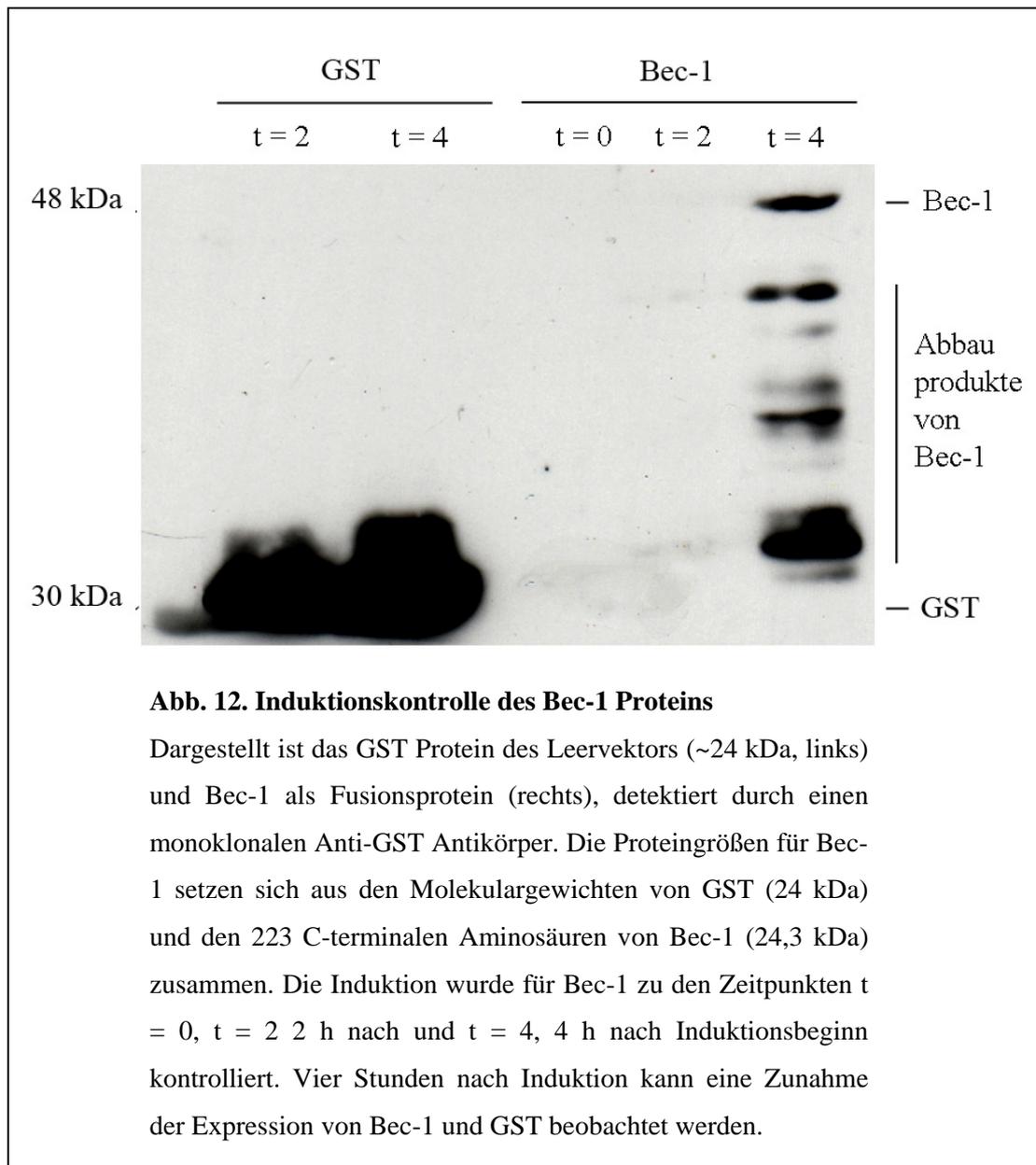
6.1.2. Identifikation von HTLV-1 SU und TM durch Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der Amplifikate nach der PCR wurden diese auf 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und durch UV-Licht dargestellt (Daten nicht gezeigt). Danach folgte der Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und die Ligation in den pGBKT7 Vektor. Über Mini- und Midipräparationen wurde je ein ausgewählter Klon selektioniert und präparativ aufgearbeitet.

6.1.3. Herstellung von Fusionsproteinen

Nach Transformation des Leervektors pGex und des Konstrukts pGex Bec-1, wurden BL21DE3 Bakterien mittels IPTG zur Expression des GST Proteins (durch den Leervektor pGex) und dem Insert Bec-1, welches an einen GST-Tag gekoppelt ist, angeregt (Kapitel 5.5.1.). In den pGex Vektor wurden nur die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des insgesamt 1086 AS (~126 kDa) umfassenden Bec-1 Proteins, kloniert (Abb. 13.), da diese

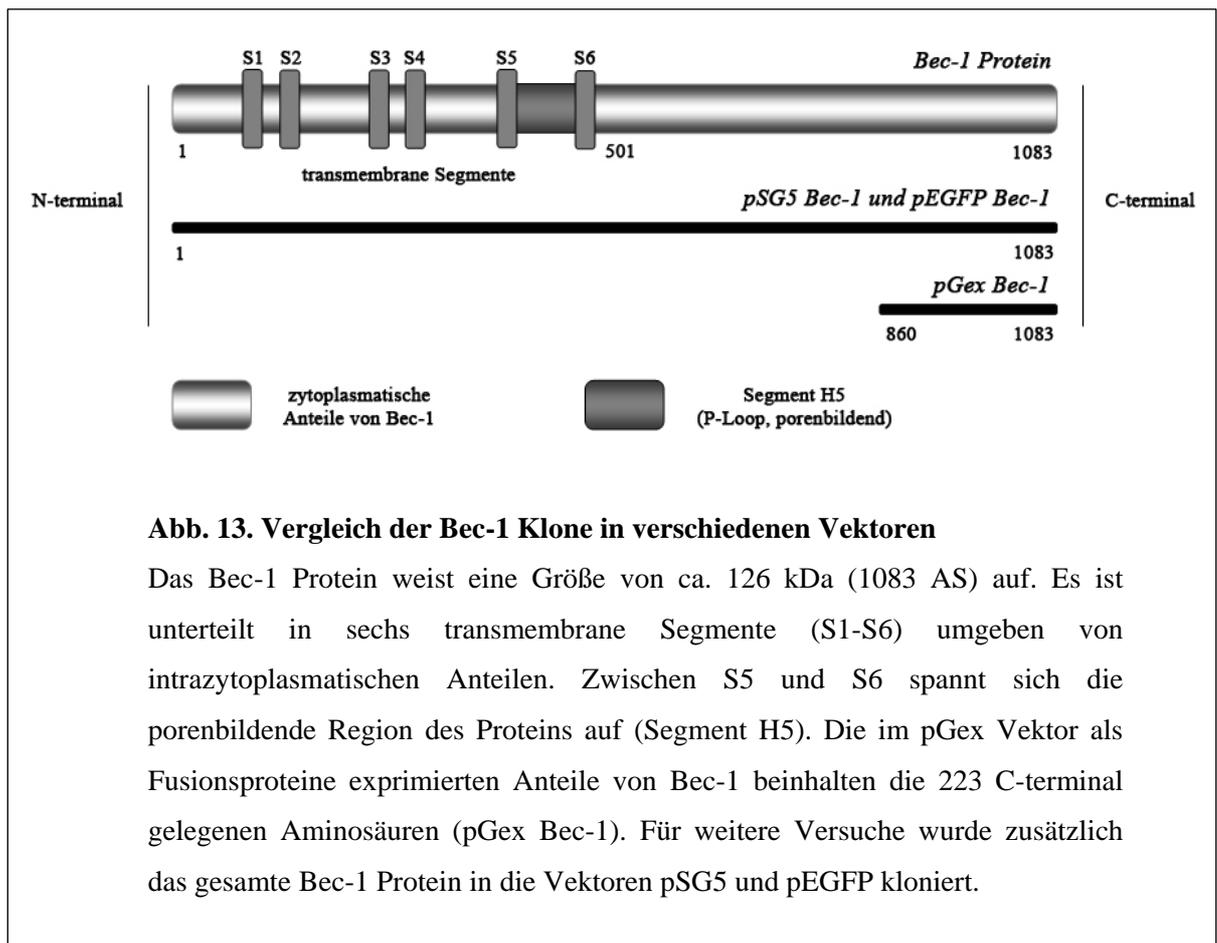
als Interaktionsdomäne mit dem retroviralen Env Protein von MSRV im Hefe-II-Hybrid Screen identifiziert werden konnte. Der GST-Tag dient zur Bindung an die Glutathionsepharose, wodurch die Proteine mittels Zentrifugation präzipitiert werden können. Zur Kontrolle der Induktion wurde ein Westernblot (Abb. 12.) mit den gewonnenen Bakterienextrakten durchgeführt.



Die Proben wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend geblottet. Der monoklonale Erst-Antikörper (aus der Ratte) ist

gegen GST gerichtet, um somit spezifisch das Fusionsprotein GST-Bec-1 zu detektieren. Der Nachweis des Erst-Antikörpers erfolgt durch einen peroxidasekonjugierten Anti-Ratte Zweit-Antikörper, der nach Behandlung mit ECL Lösung die Banden durch Auflage eines Röntgenfilms darstellt. Auf dem Blot (Abb. 12.) sind die Samplebufferproben der verschiedenen Zeitpunkte ($t = 0$, vor der Induktion, $t = 2$, zwei Stunden nach Induktion, $t = 4$, vier Stunden nach Induktion) aufgetragen. Die ersten beiden Spuren zeigen das GST Protein, (durch den Leervektor pGex exprimiert), die nächsten drei Spuren das Fusionsprotein von Bec-1. Die Höhe der Bande, in der Bec-1 dargestellt ist, ergibt sich aus der Addition beider Molekulargewichte (GST und Bec-1) und liegt bei ungefähr 48 kDa. Die verschiedenen Zeitpunkte verdeutlichen die Zunahme der Proteinexpression von GST und Bec-1 während der Induktion. Die weiteren Banden, die sich unterhalb der Darstellung von Bec-1 zeigen, entsprechen Abbauprodukten des Proteins.

In der folgenden Abbildung (Abb. 13.) sind die in dieser Arbeit verwendeten Bec-1 Klone in unterschiedlichen Leervektoren schematisch als Vergleich dargestellt.

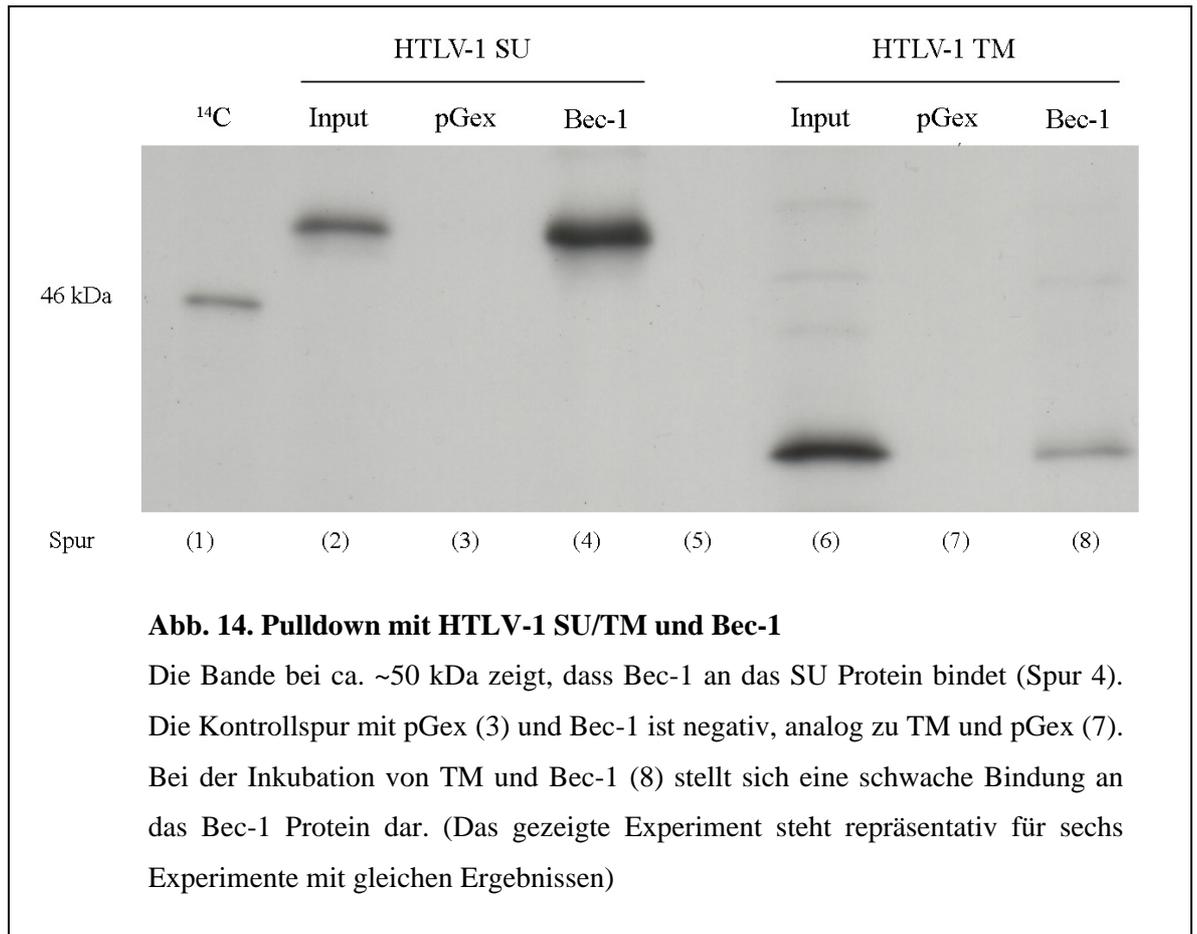


Zur Herstellung der Fusionsproteine wurden die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des Bec-1 Proteins im pGex Vektor verwendet, da diese sich in Hefe-II-Hybrid Analysen als Bindungsstelle für das retrovirale Env Protein von MSRV darstellten (Kapitel 3.3.3). In den weiteren Versuchen kamen zusätzlich die Vektoren pEGFP (Kapitel 6.3, 6.5 und 6.6) und pSG5 (Kapitel 6.4) zur Anwendung, in welche das gesamte Bec-1 Protein mit einer Länge von 1083 Aminosäuren (~ 126 kDa) kloniert wurde.

6.1.4. GST Pulldown Analyse der Bindung zwischen HTLV-1 SU/TM und Bec-1

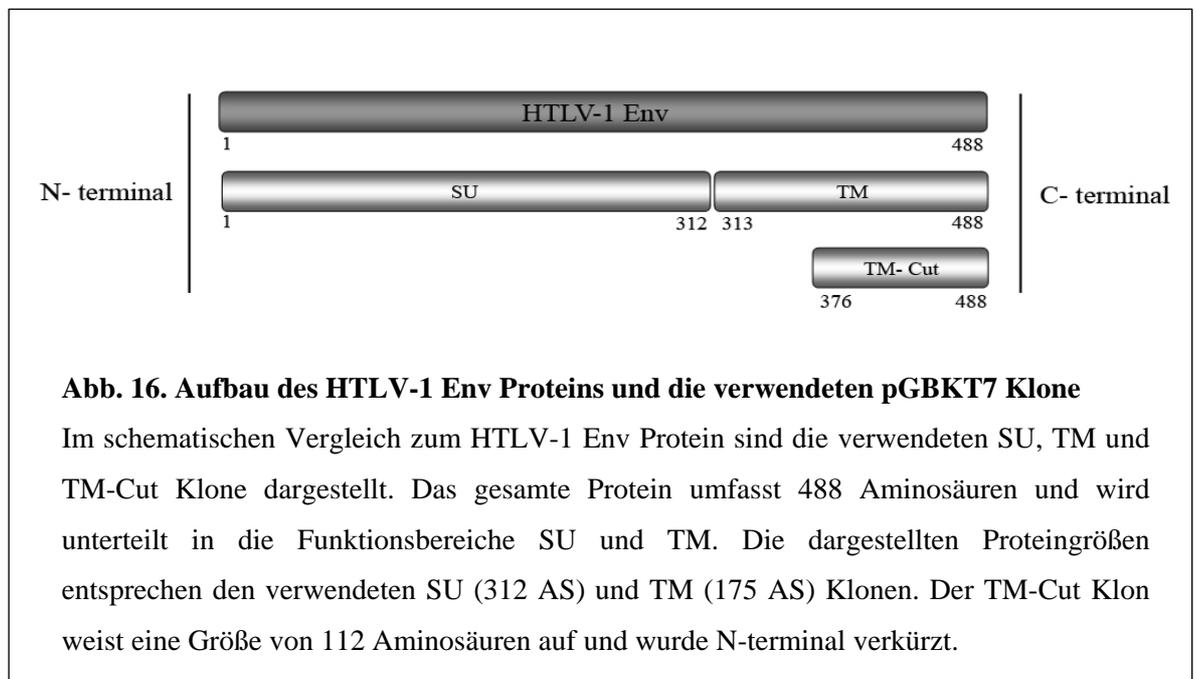
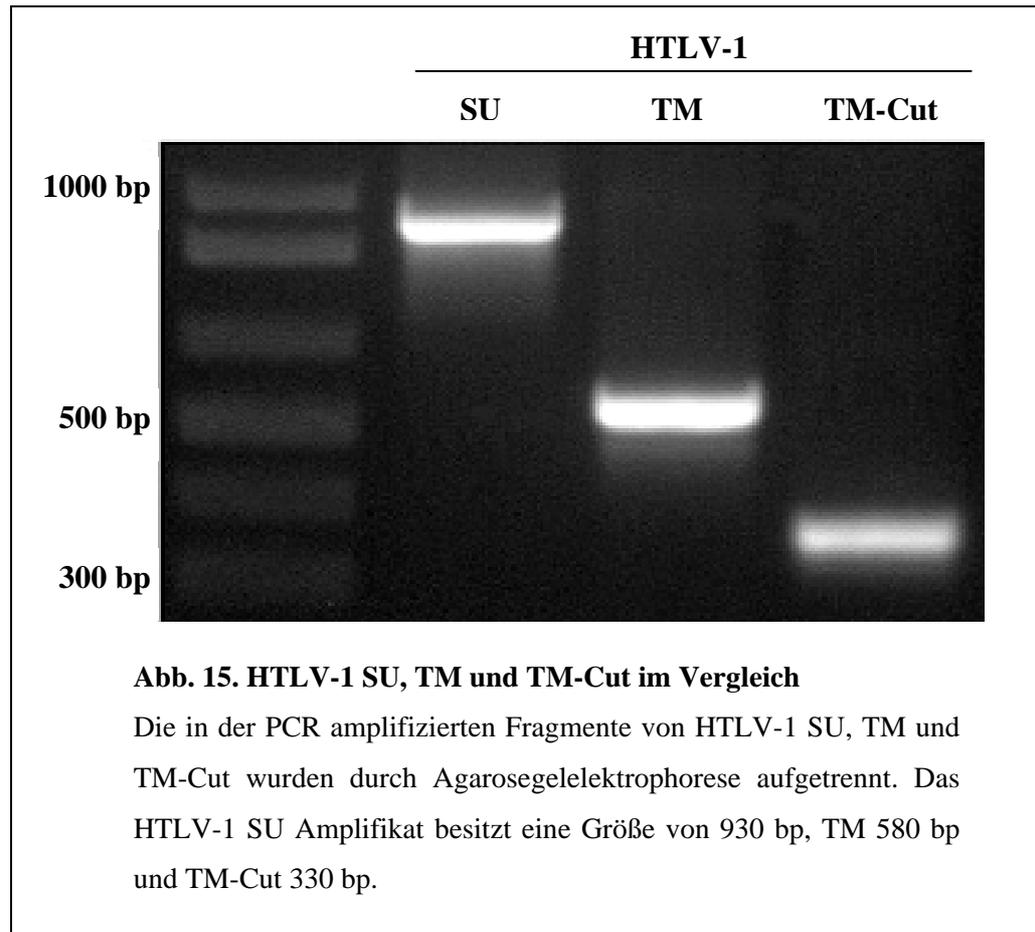
Um eine mögliche Interaktion zwischen den Envelope Proteinen von HTLV-1 und dem Kalium Kanal Bec-1 darzustellen, wurden GST Pulldownanalysen durchgeführt. Hierfür wurde das Vektorkonstrukt pGex-Bec-1 als Fusionsprotein exprimiert (Kapitel 6.1.3.). Als Kontrolle diente der alleinige GST-Tag des Leervektors pGex. Die Klone pGBKT7 SU und TM wurden durch Invitrotranslation mit ³⁵S radioaktiv markiert, sodass sich eine mögliche Bindung, nach Auftrennung durch SDS-PAGE, per Röntgenfilm detektieren lässt.

Abbildung 14. zeigt jeweils in Spur 2 und 6 zur Kontrolle der Invitrotranslation den Input, das zugesetzte Invitrotranslatat, welches noch nicht mit dem Fusionsprotein von Bec-1 inkubiert wurde. Es wurde 1/15 der Proteinmenge, welche später mit Bec-1 inkubiert wird, aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde in der ersten Spur ¹⁴C-Marker aufgetragen. In den Spuren 3 und 7 wurde zu den Proteinen von SU und TM der Leervektor pGex, der als Fusionsprotein nur GST exprimiert, zugegeben. In dieser Kontrollspur sollte keine Bindung an Bec-1 erfolgen. In den Spuren 4 und 8 sind die Inkubationen des Fusionsproteins Bec-1 mit dem Invitrotranslatat von HTLV-1 SU beziehungsweise TM gezeigt. Die Bande auf Höhe von ~ 50 kDa veranschaulicht, dass eine Bindung zwischen HTLV-1 SU und Bec-1 *in vitro* erfolgt. Eine schwache Bande stellt sich auch in der Spur von Bec-1 und TM dar.



6.1.5. Verkürzung des TM Proteins am N-terminalen Ende

Die wenn auch schwache Bindung von HTLV-1 TM an Bec-1 war zunächst überraschend, nachdem sich bei ähnlichen Experimenten mit anderen retroviralen Env-Proteinen (z.B. HERV-W Env, Daten noch nicht veröffentlicht) keine Interaktion von HERV-W TM mit Bec-1 darstellte. Zur genaueren Untersuchung, der Bindung zwischen HTLV-1 TM und Bec-1, wurde das TM Protein um 63 Aminosäuren auf eine Größe von 112 AS gekürzt. Die Klonierung erfolgte mittels PCR analog zur Herstellung des pGBKT7 TM Klon über einen Restriktionsverdau und den Schnittstellen Nde I/Pst I. Dadurch wurde der Klon pGBKT7 HTLV-1 TM Cut, mit den Primern 12. und 21., hergestellt. Die folgende Abbildung (15.) zeigt das PCR Amplifikat der HTLV-1 Klone SU, TM und TM-Cut auf 1,5% Agarosegel im Vergleich. Darunter (Abb. 16.) sind das HTLV-1 Env Protein sowie die pGBKT7 Klone SU, TM und TM-Cut schematisch dargestellt.



6.1.6. GST Pulldown Analyse zur Interaktion von HTLV-1 TM-Cut mit dem Bec-1 Protein

Der um 63 Aminosäuren aminoterminal verkürzte TM Klon (TM-Cut) wurde vergleichend zu den bereits getesteten SU und TM Klonen durch GST Pulldownanalysen untersucht. Das Fusionsprotein GST-Bec-1 sowie das zur Kontrolle dienende GST Protein des pGex Vektors wurden mit den radioaktiv markierten Proteinen der Klone pGBKT7 SU, TM und TM-Cut inkubiert. Der schematische Aufbau des Pulldownassays (Abb. 17.) ist analog zu Abb. 14. In der Kontrollspur des Leervektors pGex (3 und 6) zeigt sich bei der Inkubation mit SU und TM ein schwacher Hintergrund. In Analogie zu den Ergebnissen des Pulldowns aus Abb. 14. bindet auch hier das HTLV-1 SU Protein an Bec-1 (Spur 4) und es zeigt sich eine schwache Bindung von HTLV-1 TM an Bec-1 (Spur 7). Der N-terminal verkürzte TM Klon (TM-Cut) weist jedoch keine Interaktion mehr mit dem Bec-1 Protein auf (Spur 10).



6.2. Kartierung der Bindungsstelle des Bec-1 Kanals

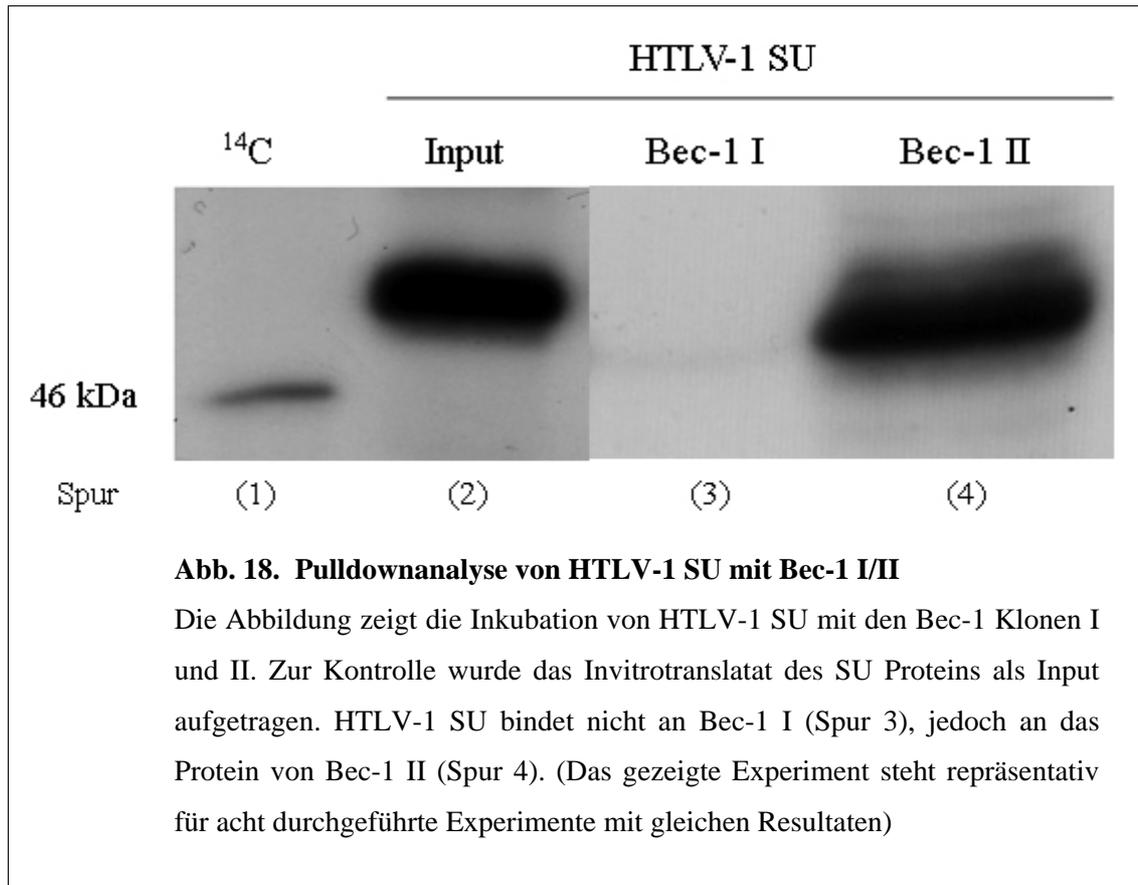
Nachdem die durchgeführten Pulldown Analysen zeigen konnten, dass das HTLV-1 SU Protein an Bec-1 bindet, sollen weitere Untersuchungen die Bindungsstelle von SU an Bec-1 darstellen. Um diese spezifischer zu charakterisieren, wurden verschiedene Klone des Bec-1 Proteins hergestellt, welche unterschiedliche Anteile der letzten 223 C-terminalen Aminosäuren abdecken. Das Kanalprotein weist insgesamt eine Größe von ungefähr 126 kDa auf. Um zunächst die Bindungsregion grob eingrenzen zu können, wurden die letzten 223 AS des C- Terminus in zwei gleich große Proteine (Bec-1 I und II) geteilt und beide in den pGex Vektor kloniert.

6.2.1. Klonierungen

Aus dem Klon Bec-1 im pGex Vektor wurden durch Polymerasekettenreaktion die Konstrukte Bec-1 I (AS 860 – 971) und Bec-1 II (AS 973 – 1083) amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI/XhoI (Bec-1 I) und EcoRI/NotI (Bec-1 II). Anschließend wurden sie in den pGex Vektor ligiert, um sie als Fusionsproteine mit anhängendem GST-Tag exprimieren zu können.

6.2.2. GST Pulldown Analyse der Bec-1 Klone I und II

Um eine mögliche Bindung der Bec-1 Klone an das SU Protein von HTLV-1 darzustellen, wurden weitere GST Pulldownanalysen durchgeführt. Hierfür wurde das Konstrukt pGBKT7 SU durch Invitrotranslation radioaktiv mit ^{35}S markiert und exprimiert. Die Klone Bec-1 I und Bec-1 II wurden per Induktion als GST-Fusionsproteine hergestellt. Die Durchführung erfolgte analog der bereits beschriebenen Pulldownanalysen. Die folgende Abbildung (Abb. 18.) zeigt die Darstellung der Bindungsanalyse von HTLV-1 SU und den verkürzten Bec-1 Klonen I und II.



Die Pulldownanalysen konnten darstellen, dass das HTLV-1 SU Protein an Bec-1 II bindet (Spur 4), erkennbar durch die Bande bei ca. ~50 kDa, jedoch stellt sich keine Bande bei der Inkubation von HTLV-1 SU und dem Bec-1 I Protein dar. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsregion des HTLV-1 SU Proteins an Bec-1 auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren beschränkt ist.

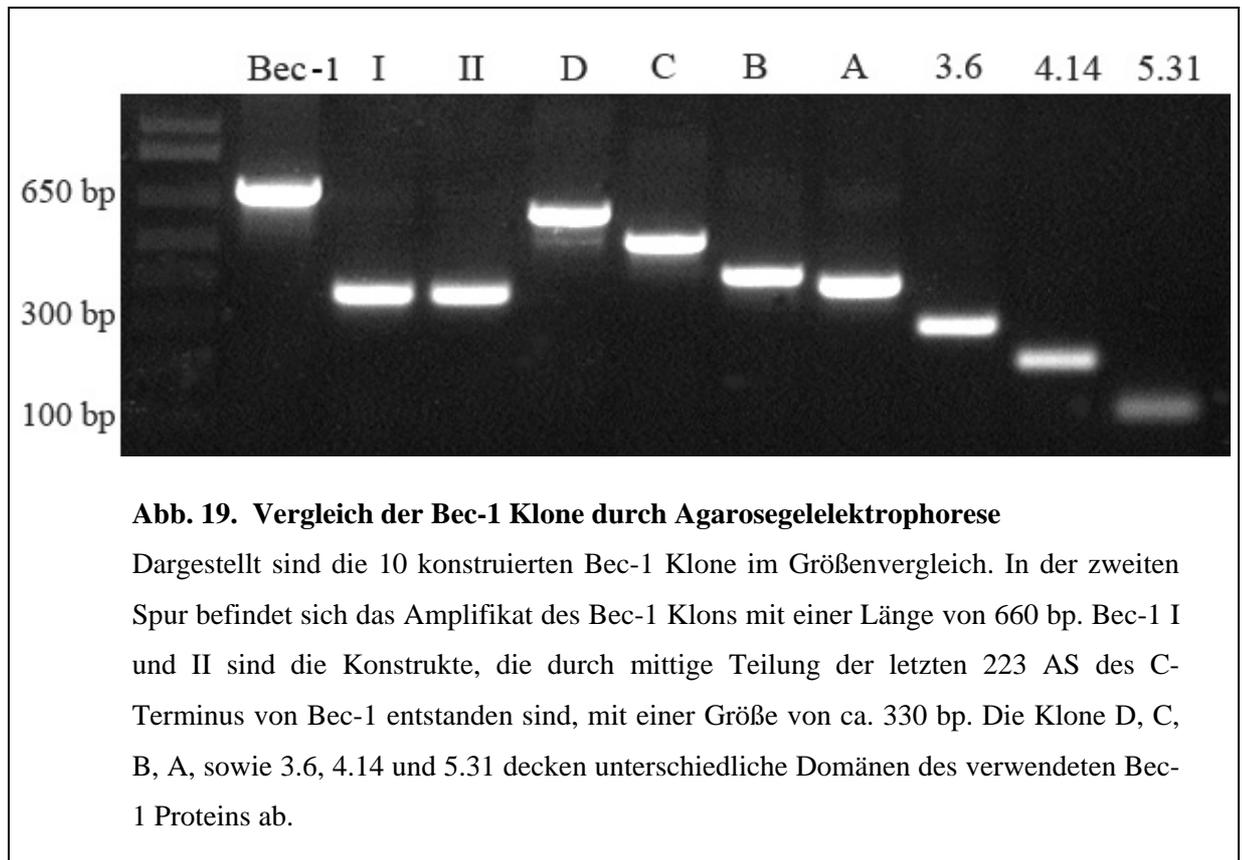
6.2.3. Herstellung weiterer Bec-1 Klone zur spezifischen Charakterisierung der Bindungsstelle

Ausgehend von diesen Befunden, wurden insgesamt sieben weitere C- und N-terminal trunkierte Klone von Bec-1 hergestellt, mit welchen eine weitere Eingrenzung der interagierenden Region erfolgen sollte. Die Klone umfassen folgende Aminosäuresequenz auf dem Bec-1 Protein (Abb. 21.):

1. pGex Bec-1 A (AS 860-980)
2. pGex Bec-1 B (AS 860-998)

3. pGex Bec-1 C (AS 860-1024)
4. pGex Bec-1 D (AS 860-1057)
5. pGex Bec-1 3.6 (AS 998-1083)
6. pGex Bec-1 4.14 (AS 1025-1083)
7. pGex Bec-1 5.31 (AS 1058-1083)

Alle Klone sind mit den Schnittstellen EcoRI und Not I versehen und wurden in den Vektor pGex kloniert, um sie als Fusionsproteine exprimieren zu können. Die folgende Abbildung (19.) zeigt ein 1,5%iges Agarosegel, auf welches die PCR-Amplifikate aller Bec-1 Klone, ausgehend von den letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des gesamten Bec-1 Proteins, zum Vergleich aufgetragen wurden.



6.2.4. Nachweis der Proteinexpression der Bec-1 Klone durch Westernblot

Durch Induktion wurden BL21DE3 Bakterien angeregt, die Proteine der Bec-1 Klone zu exprimieren. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden auf 12,5% Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Blotting der Proteine auf Immobilon Folie über Nacht. An den monoklonalen Anti-GST Antikörper (Ratte) bindet ein peroxidasekonjugierter Zweit-Antikörper, sodass die Proteine mittels ECL Färbung auf einem Röntgenfilm dargestellt werden konnten.

Der folgende Westernblot (Abb. 20.) zeigt die Induktionskontrollen aller klonierten Bec-1 Konstrukte sowie die pGex Leervektor Kontrolle, welche die Expression des GST Proteins anzeigt. Der mit „Gesamt“ bezeichnete Bec-1 Klone bezieht sich auf die 223 C-terminalen Aminosäuren des Bec-1 Proteins.

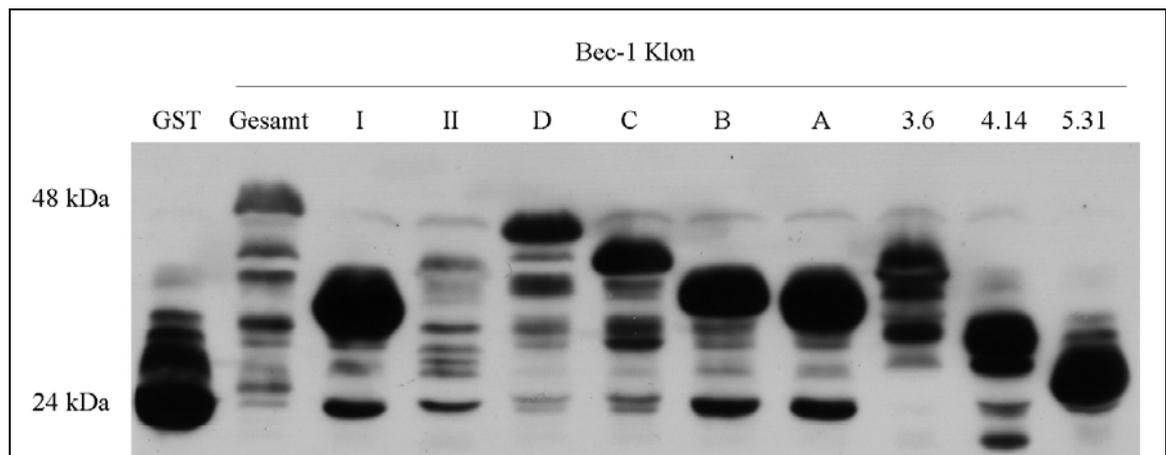
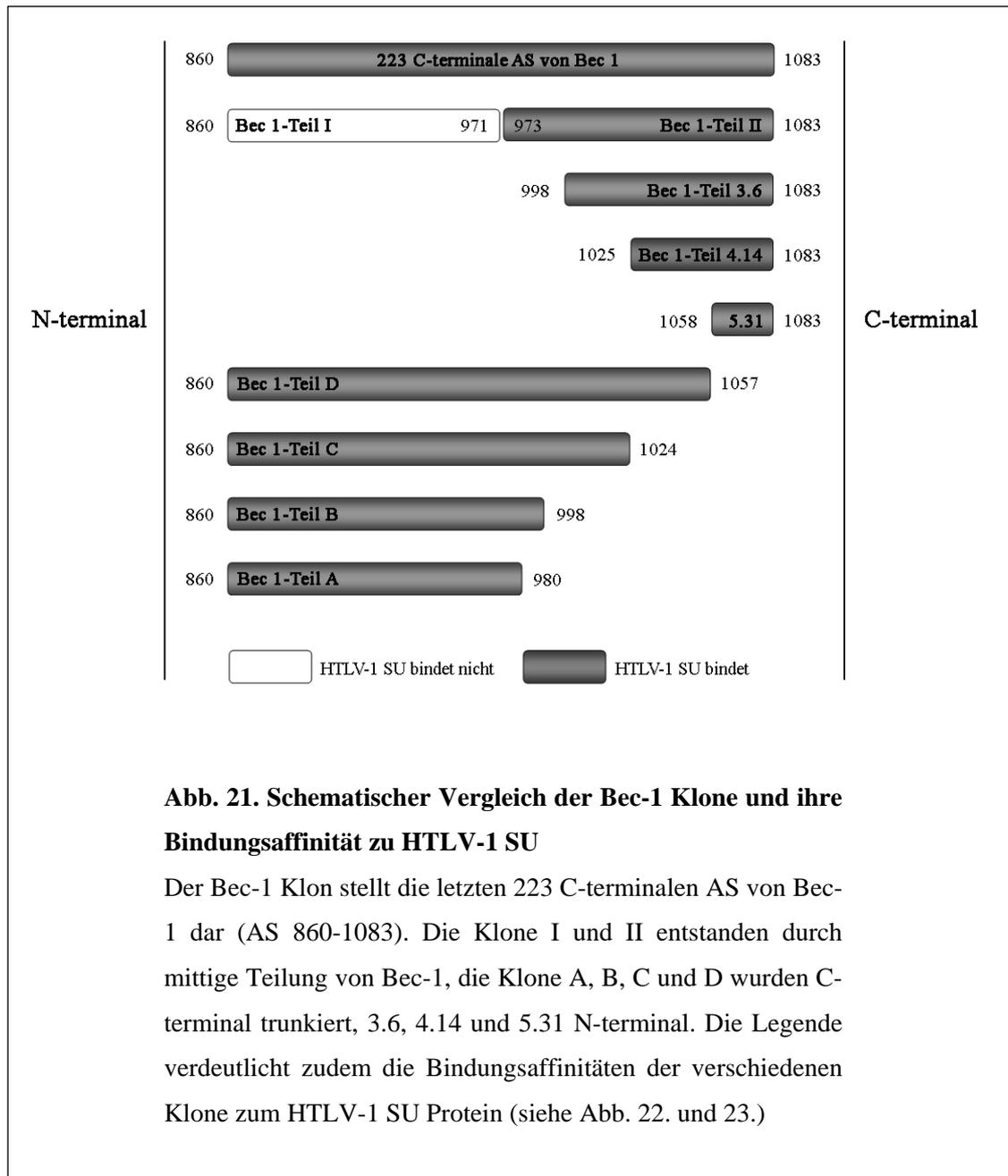


Abb. 20. Westernblot der verschiedenen Bec-1 Klone

Um die Expression der Bec-1 Proteine nach der Induktion zu überprüfen, wurde ein Westernblot durchgeführt. Ausgehend vom Bec-1 Klon decken die weiteren aufgeführten Klone unterschiedliche Domänen des Bec-1 Proteins ab. Die Größen ergeben sich aus der Proteingröße des jeweiligen Bec-1 Klons und dem GST-Tag mit 24 kDa.

Die folgende Abbildung (Abb. 21.) stellt die verschiedenen Bec-1 Klone schematisch dar. Der Bec-1 Klon steht für die letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des Bec-1 Proteins. Ausgehend davon wurden die Klone 3.6, 4.14 und 5.31 am N-Terminus trunkiert, die Klone A, B, C, und D am C-Terminus. Die unterschiedliche Färbung der Balken weist auf die Bindungsaffinität der Klone zum HTLV-1 SU Protein im GST-Pulldown hin (siehe Kapitel 6.2.5.).



6.2.5. GST Pulldown Analysen mit den trunkierten Bec-1 Klonen

Die Pulldownanalyse der weiteren Bec-1 Klone wurde analog zu den bereits getesteten Klonen (Bec-1 I und II) durchgeführt. Die folgende Abbildung (Abb. 22.) zeigt die Bindungsanalyse mit den Konstrukten pGex Bec-1 A, B, C und D. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle das GST-Protein des pGex Leervektors und das Fusionsprotein von Bec-1 als Positivkontrolle aufgetragen. Die erste Spur zeigt als Kontrolle das Invitrotranslatat von HTLV-1 SU vor der Inkubation mit den Fusionsproteinen (Input). In der Spur von pGex und SU ist ein leichter Hintergrund zu erkennen, trotzdem zeigt die Interaktion des SU Proteins mit Bec-1 eine deutlich stärkere Bande (Spur 3). Bei den Klonen D, C, B, A, nach abfallender Länge geordnet, ist eine immer schwächer werdende Bindung zu HTLV-1 SU zu erkennen. Jedoch ist die Schwärzung der Bande des Klons Bec-1 A im Verhältnis zum Hintergrund der pGex Spur wesentlich stärker, sodass eine unspezifische Bindung unwahrscheinlich ist.

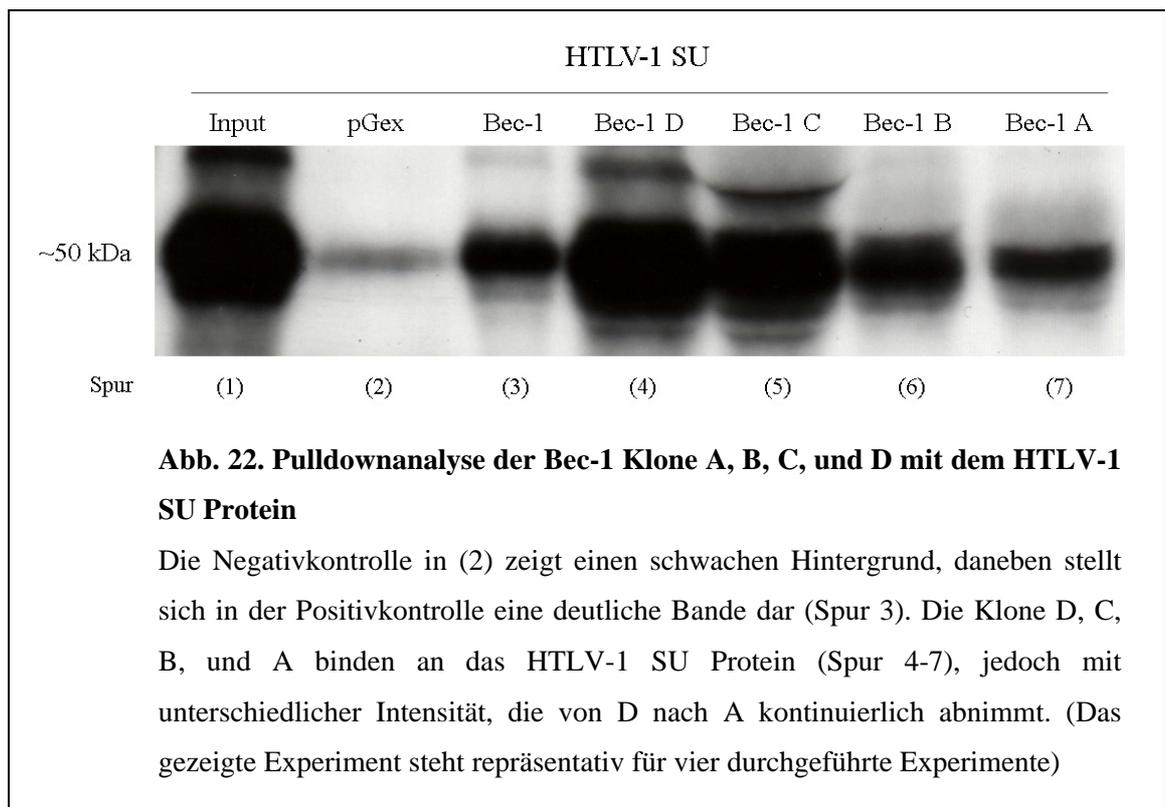
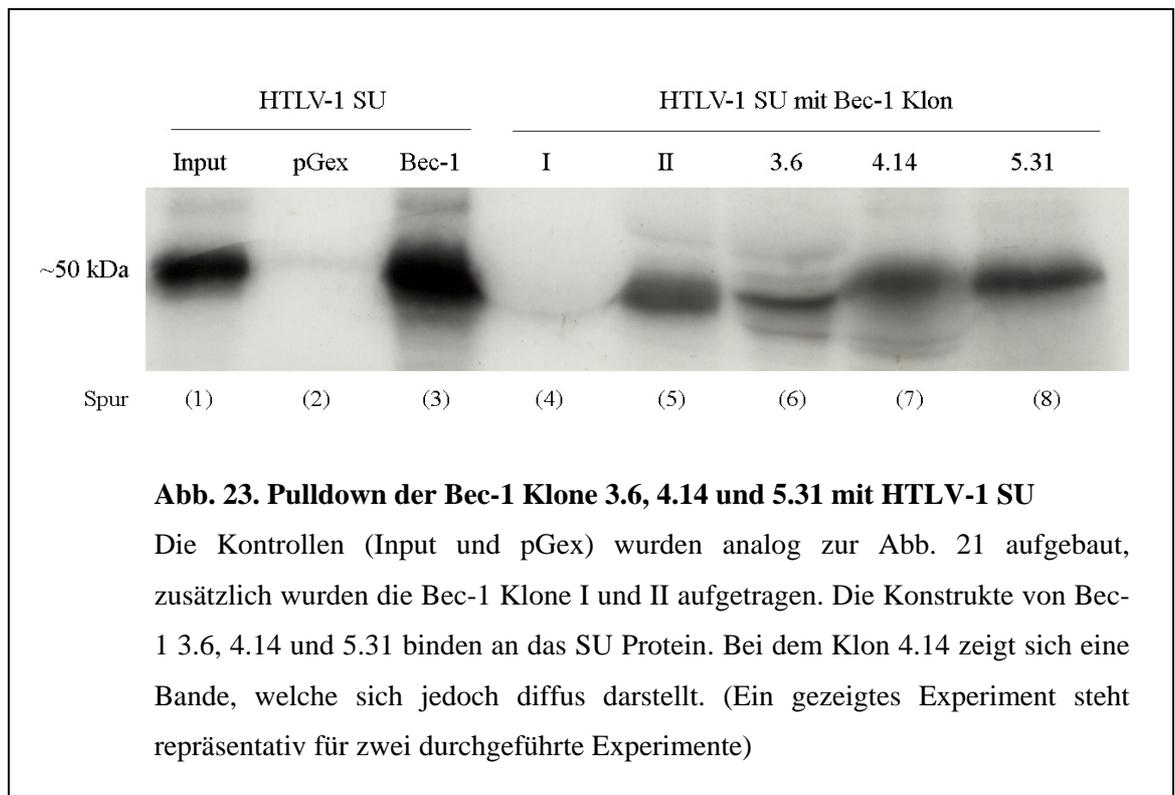


Abbildung 23. zeigt die Pulldownanalyse der Klone Bec-1 3.6, 4.14 und 5.31 mit dem HTLV-1 SU Protein. Zur Positiv- und Negativkontrolle wurden die Klone Bec-1 I und II (Spur 3 und 4) sowie das GST-Fusionsprotein des pGex Leervektors (Spur 2) aufgetragen. Alle N-terminal trunkierten Klone (Bec-1 3.6, 4.14 und 5.31) binden an das HTLV-1 SU Protein, wobei in der Spur des Klons 4.14 eine diffuse Bande zu sehen ist. In Analogie zu den bereits beschriebenen Ergebnissen zeigt der Klon Bec-1 II eine Bindung an HTLV-1 SU, der Klon Bec-1 I jedoch nicht.



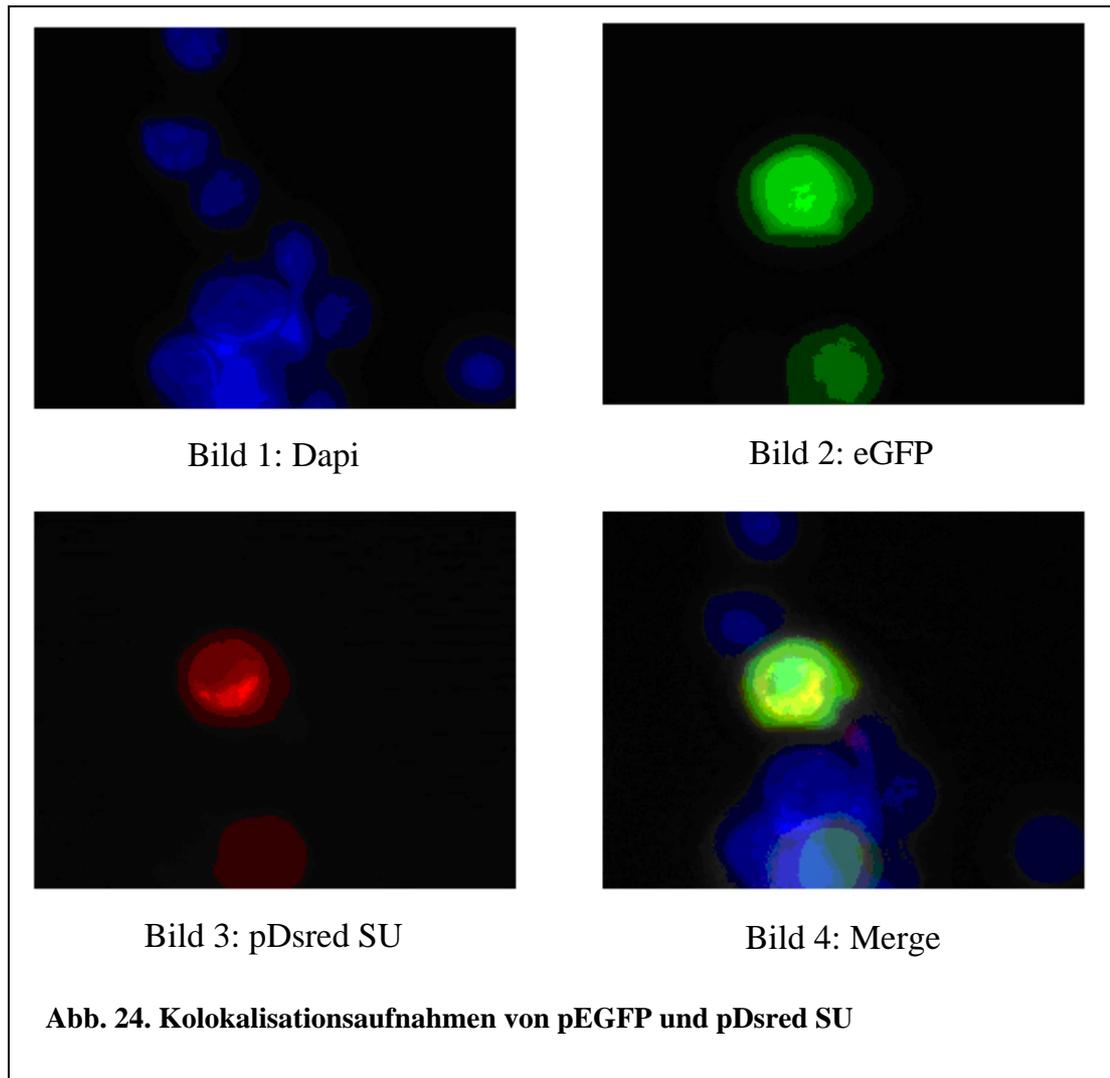
6.3. Lokalisations- und Kolokalisationsstudien

Da in den Pulldownanalysen nachgewiesen werden konnte, dass das retrovirale HTLV-1 SU Protein mit dem Bec-1 Kanal *in vitro* interagiert, stellt sich die Frage, ob beide Proteine auch unter nativen Bedingungen assoziieren und sich deren Lokalisation in Zellen darstellen lässt. Um festzustellen, ob beide Proteine in denselben Kompartimenten exprimiert werden sodass die Voraussetzung für eine *in vivo* Interaktion gegeben ist, wurden Lokalisations- und Kolokalisationsversuche mittels konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden Bec-1 und HTLV-1 SU als Fusionsproteine mit anhängendem Fluoreszenz-Tag exprimiert. Bec-1 wurde in den pEGFP C 1 Vektor kloniert, die Gensequenz von HTLV-1 SU in den pDsred Vektor. So entstand der Klon pDsred SU mit den Schnittstellen NdeI/PstI (Kapitel 4.9.). Der pEGFP C 1 Vektor kodiert für ein eGFP Protein (enhanced green fluorescent protein), welches unter Anregung grün fluoresziert, wohingegen der Dsred Tag rot leuchtet. Es wurden 5×10^4 Hela Zellen pro Bedingung auf einem Objektträger mit dem PermiFlexsystem ausgesät. Beide Klone wurden mit Lipofectamin transfiziert und 24 h später mit Vectashield Lösung fixiert. Die Fixationslösung enthielt den Farbstoff Dapi (4,6-Diamino-2-Phenylindol), der die Zellkerne mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit den Leervektoren (pEGFP und pDsred) transfiziert wurden, sodass sich folgende Bedingungen ergaben:

1. pEGFP Leervektor und pDsred SU
2. pDsred Leervektor und pEGFP Bec-1
3. pDsred SU und pEGFP Bec-1

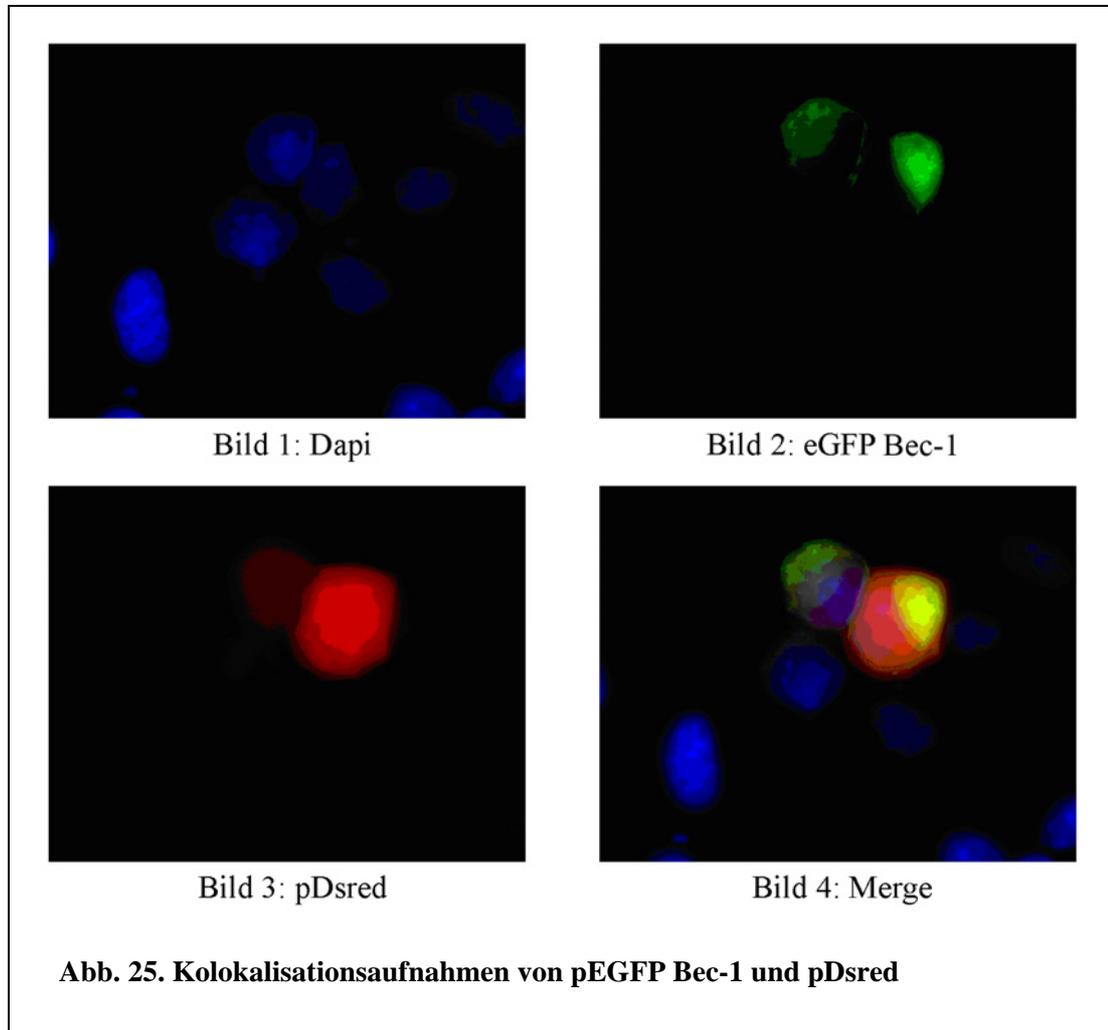
Die Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in 1000facher Vergrößerung betrachtet, dabei wurden die Zellen mit verschiedenen Farbkanälen des Mikroskops untersucht. Der Nachweis der Kolokalisation erfolgte später durch Übereinanderlagerung der Bilder, sodass Signale von kolokalisierenden Proteinen gelb erscheinen.

Die folgende Abbildung (24.) zeigt Aufnahmen von Hela Zellen die mit dem pEGFP Leervektor und pDsred SU transfiziert wurden (Bedingung 1). Bild 1 zeigt die Dapi Färbung der Zellkerne, Bild 2 das grün fluoreszierende eGFP Protein des Leervektors, das dritte Bild die pDsred Rot-Fluoreszenz des HTLV-1 SU Proteins und Bild 4 die Überlagerung aller drei Fluoreszenzkanäle (Merge).

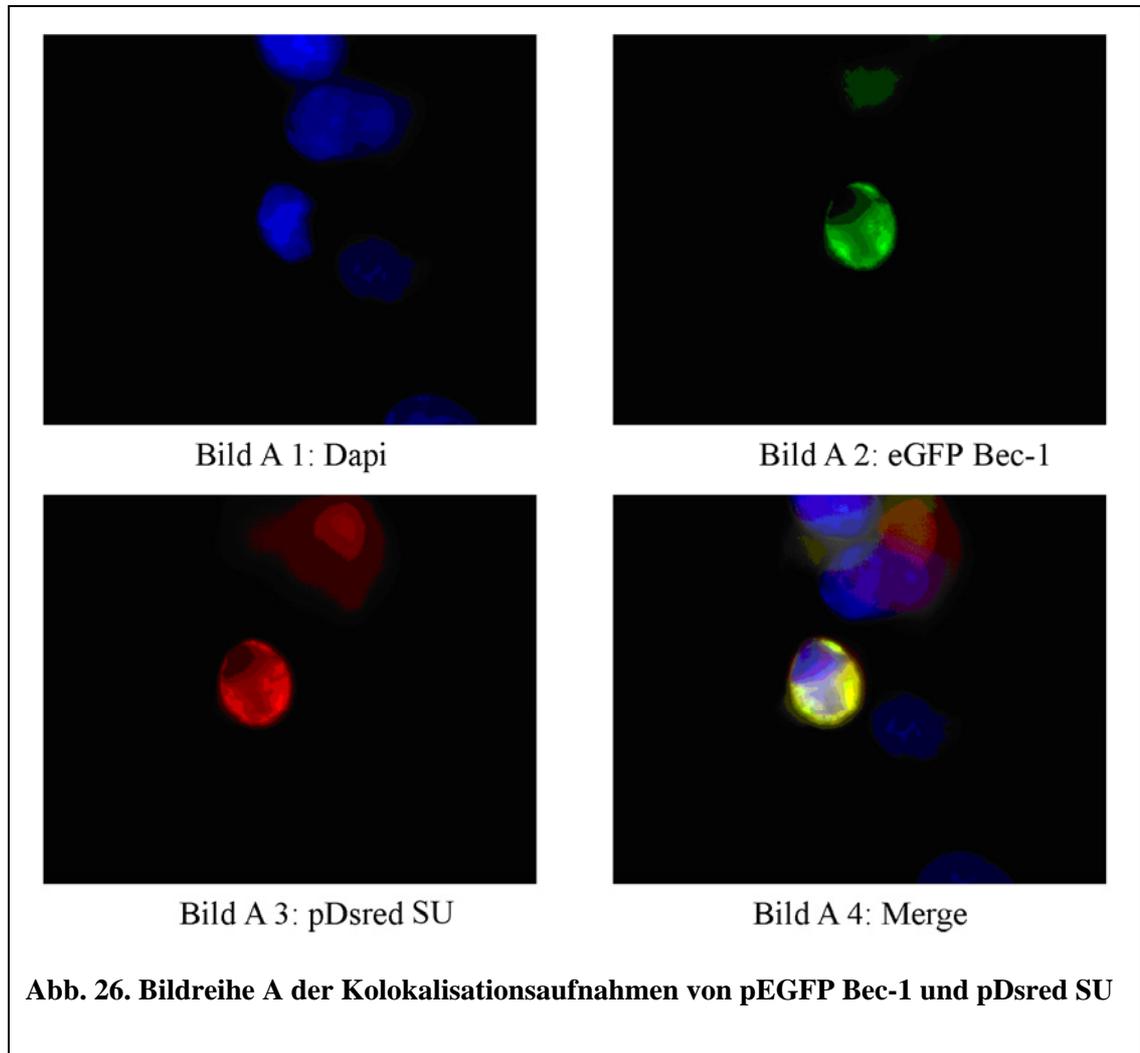


Die Dapi Färbung stellt die Zellkerne der Zellen auf dem Objektträger in blauer Farbe dar (Bild 1). Bild 2 zeigt, dass die Fluoreszenz des eGFP Proteins über die gesamte Zelle erstreckt ist, wohingegen die Rot-Fluoreszenz des pDsred SU Proteins sich zytoplasmatisch darstellt (Bild 3). Im Vergleich zu Bild 2 ist die Proteinlokalisierung hier nicht über die gesamte Zelle verteilt. Es stechen bestimmte zytoplasmatische Areale heraus, die vorwiegend rot fluoreszieren. Die Übereinanderlagerung der Proteine ist in Bild 4 an einem gelben Fluoreszenzsignal zu erkennen.

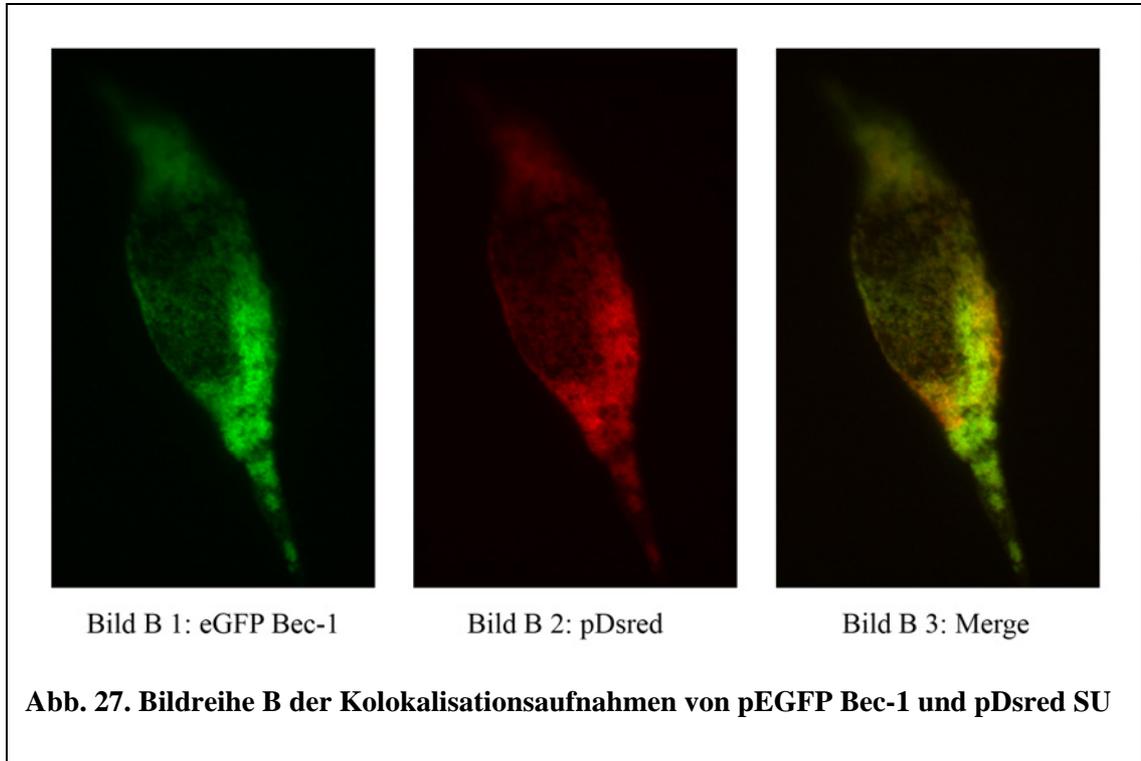
Abbildung (25.) zeigt die Bildreihe der Bedingung 2. HeLa Zellen wurden mit dem pDsred Leervektor und dem Konstrukt pEGFP Bec-1 transfiziert. Die Anordnung der Aufnahmen entspricht der vorherigen Abbildung 24.



In Bild 1 sind die Zellkerne durch die Dapi Färbung in blau dargestellt. Die Fluoreszenz des eGFP Bec-1 Fusionsproteins im Bild 2 liegt zytoplasmatisch und erschließt sich perinukleär um den Zellkern. Im Gegensatz dazu stellt sich das Rot des pDsred Proteins (Leervektor) über die gesamte Zelle dar (Bild 3). Auch Bild 4, die Übereinanderlagerung der Fluoreszenzkanäle, zeigt, dass sich beide Proteine unterschiedlich in der Zelle verteilen.

Bildreihe A der Kolokalisation von pEGFP Bec-1 und pDsred SU

Die zwei Bildreihen (**A** und **B**, siehe nächste Seite) stellen Bilder von Zellen dar, die gemäß Bedingung 3 transfiziert wurden. Hela Zellen wurden mit den Konstrukten pEGFP Bec-1 und pDsred SU transfiziert. Die Bilder der Reihe B zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen, welche eine genauere Darstellung der intrazellulären Strukturen zulassen und eine erhöhte Tiefenschärfe aufweisen. Diese Bilder wurden von Dr. Lars Kästner (AG Lipp) im Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes angefertigt. Die Anordnung der Aufnahmen ist analog zu den vorherigen Abbildungen, wobei in Abbildung 27. keine Aufnahme der Dapi Färbung gezeigt ist.

Bildreihe B der Kollokalisierung von pEGFP Bec-1 und pDsred SU

Die Bildreihen **A** und **B** verdeutlichen, dass sich die Proteine Bec-1 und HTLV-1 SU in den gleichen zytoplasmatischen Kompartimenten befinden, was durch die Überlagerung beider Fluoreszenzen (Bilder A 4 und B 3) bestätigt wird. Im Gegensatz dazu fluoreszieren die von den Leervektoren pDsred und pEGFP exprimierten Proteine über die gesamte Zelle, wie die ersten beiden Bildreihen verdeutlichen. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass das Bec-1 Protein und HTLV-1 SU, bei konventioneller fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung und bei konfokaler Mikroskopie, in denselben zytoplasmatischen Kompartimenten kollokalisieren.

6.4. Nachweis der *in vivo* Interaktion des HTLV-1 SU Proteins mit dem Bec-1 Kanal

6.4.1. Immunopräzipitation (IP) und Co-Immunopräzipitation (Co-IP) des Bec-1 Kanals und HTLV-1 SU

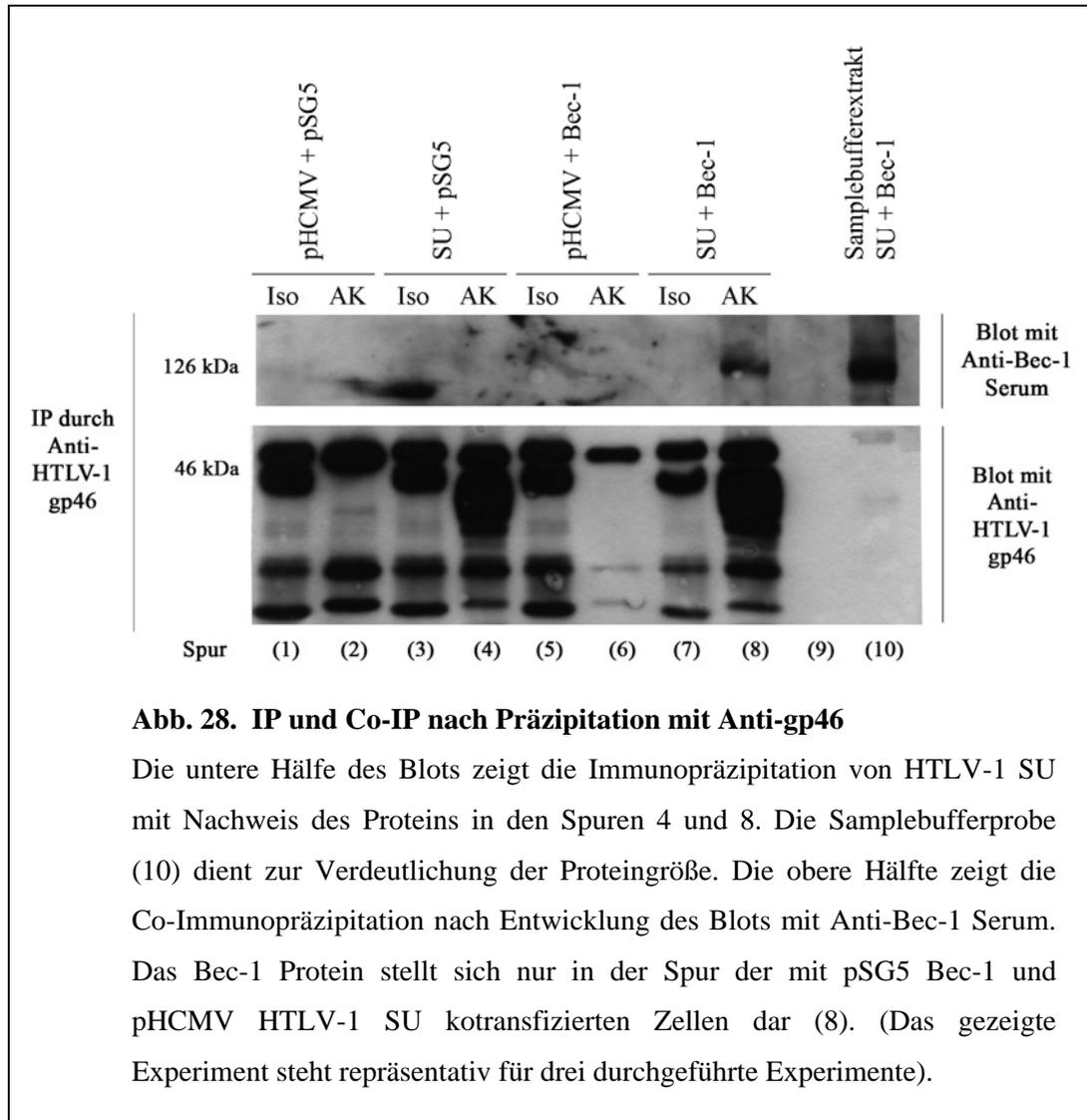
Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Kollokalisierung von HTLV-1 SU und Bec-1 in denselben intrazytoplasmatischen Kompartimenten dargestellt werden. Nun sollten weitere Untersuchungen klären, ob *in vivo* tatsächlich eine Interaktion beider Proteine stattfindet. Hierfür wurden jeweils ca. 6 Mio. Hela Zellen auf 10 cm Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit Lipofectamin behandelt und wie folgt transfiziert:

1. pHCMV Leervektor und pSG 5 Leervektor
2. pHCMV Leervektor und pSG 5 Bec-1
3. pSG 5 Leervektor und pHCMV SU
4. pSG 5 Bec-1 und pHCMV SU

Bei der Transfektion wurde ein Klon (pSG5 Bec-1), der die Sequenz für das gesamte Bec-1 Protein enthält mit einer Größe von 126 kDa verwendet. Zwei Tage danach wurden aus den Zellen Proteinextrakte hergestellt. Diese wurden mit einem monoklonalen Anti-HTLV-1 gp46 Antikörper (Maus) präzipitiert. Zur Kontrolle wurde die Immunopräzipitation auch mit einem Isotyp-Antikörper (Iso) durchgeführt. Dieser weist eine unspezifische Aminosäuresequenz in der antigenbindenden Region (Fab-Anteil) des Antikörpers auf, während die Fc-Region aus dem gleichen Isotyp (IgG-1) wie der zur Immunopräzipitation verwandte Anti-HTLV-1 gp46 Antikörper besteht. Hiermit sollen unspezifisch detektierte von spezifisch präzipitierten Proteinen unterschieden werden. Nach Zugabe von Protein-G-Sepharose präzipitierten die an den Antikörper gekoppelten Proteine durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Proben durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und die Immobilonfolie nach dem Blotting der Proteine unter der 94 kDa Marker Bande durchtrennt. Die untere Hälfte wurde mit einem Anti-gp46 Antikörper inkubiert. In dieser wurden die mit präzipitierten HTLV-1 SU Proteine durch den entsprechenden Antikörper nachgewiesen, sodass die untere Hälfte die Immunopräzipitation darstellt. Die obere Hälfte wurde mit Anti-Bec-1 Serum (Kaninchen) behandelt und zeigt die Co-Immunopräzipitation durch den Nachweis des interagierenden Proteins mit dem entsprechenden Antikörper (hier Bec-1). Nach Inkubation mit den peroxidasekonjugierten Zweitantikörpern (Anti-Kaninchen-Pox.

gegen Anti-Bec-1 Serum und Anti-Maus-Pox. gegen Anti-gp46) wurden die Proteine mittels ECL Färbung auf einem Röntgenfilm visualisiert.

Die folgende Abbildung (Abb. 28.) zeigt die Immunopräzipitation der Proteine mit Anti-gp46 (unten) und die Co-Immunopräzipitation durch Entwicklung des oberen Blotanteils mit Anti-Bec-1 Serum (Kaninchen).



In den mit Iso gekennzeichneten Spuren wurde die Immunopräzipitation mit dem Isotyp-Antikörper durchgeführt. Auf der unteren Hälfte des Blots, welche die IP mit Anti-gp46 zeigt, stellen sich die Proteine von HTLV-1 SU mit einer Größe von 46 kDa dar (Spur 4 und 8). Das Samplebufferextrakt der Transfektion von HTLV-1 SU und Bec-1 wurde auf der rechten Seite des Blots zum Größenvergleich aufgetragen.

Die obere Hälfte der Abbildung 28. stellt die Co-IP dar, da der Blot mit Anti-Bec-1 Serum inkubiert wurde. Die Bande des Bec-1 Proteins mit einer Größe von 126 kDa lässt sich in Spur 8 nachweisen. Hier wurden Zellen mit den Konstrukten HTLV-1 SU und pSG5 Bec-1 transfiziert. Da das Bec-1 Protein nur in (8) darstellbar war, lassen sich Kreuzreaktionen zwischen den Vektorprodukten und/oder den Proteinen und den Vektorprodukten ausschließen.

Die Immunopräzipitation wurde zusätzlich mit Serum gegen Bec-1 durchgeführt, wie die nachstehende Abbildung (29.) zeigt. Die Transfektionskonstellationen wurden aus dem vorherigen Experiment analog übernommen. Die Immunopräzipitation erfolgte mit Anti-Bec-1 Serum. Nach Teilung des Blots unter der 94 kDa Bande stellt die obere Hälfte die Immunopräzipitation dar. Dieser Teil wurde mit dem Anti-Bec-1 Antikörper entwickelt. Die untere Hälfte des Blots wurde mit Anti-gp46 inkubiert (Co-IP). Zur Kontrolle wurde die Immunopräzipitation mit Präimmenserum (Prä-IS, vor Immunisierung des Kaninchens mit dem Bec-1 Protein) durchgeführt, um unspezifisch präzipitierte Banden auszuschließen.

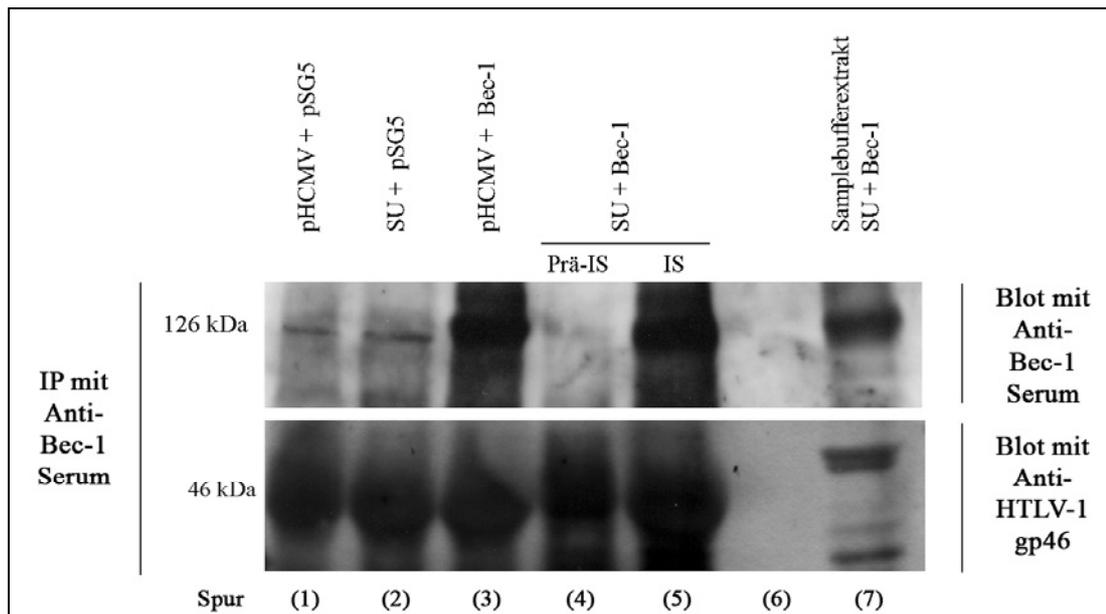


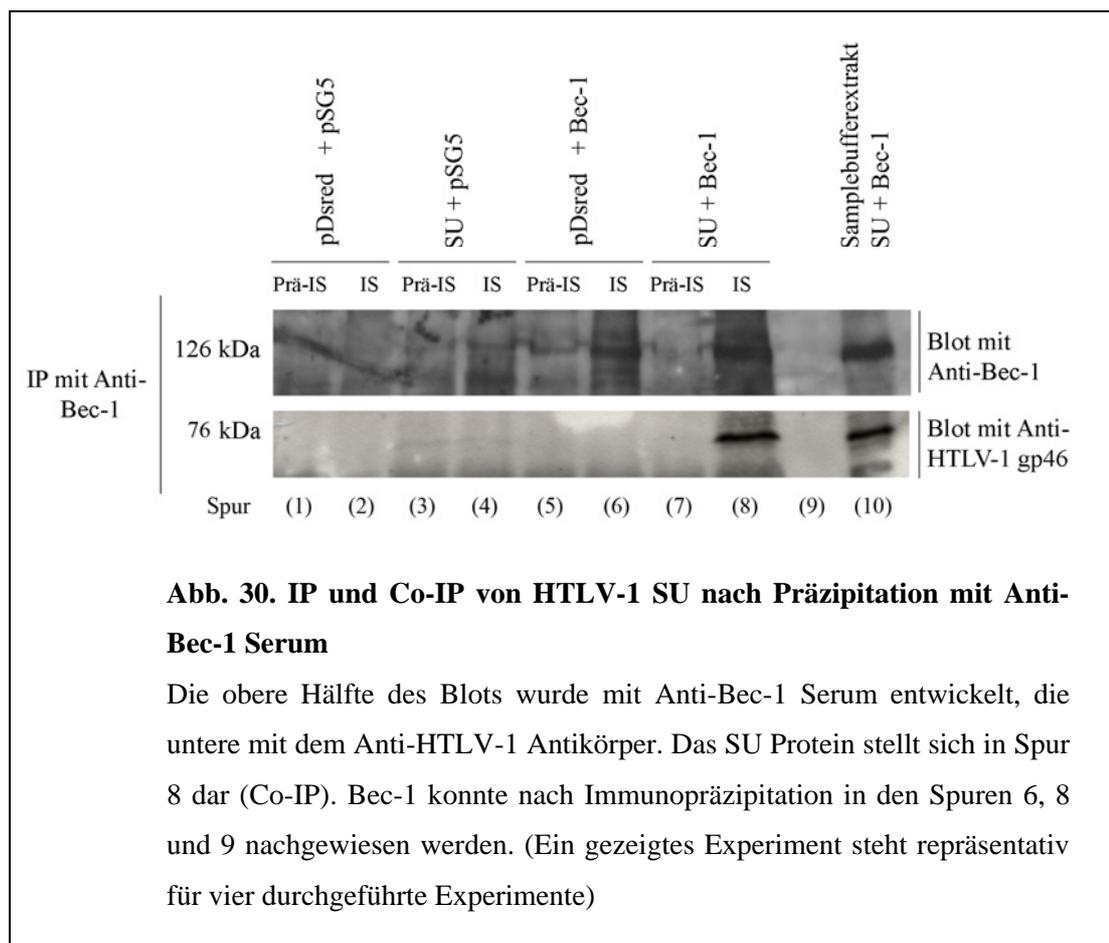
Abb. 29. IP und Co-IP nach Präzipitation mit Anti-Bec-1 Serum

In der oberen Hälfte ist die Immunopräzipitation von Bec-1 auf einer Höhe von 126 kDa in den Spuren 3 und 5 dargestellt. Die Interpretation der Co-IP ist nur schwer möglich, da das SU Protein auf einer Höhe von 46 kDa liegt und hier von schweren Antikörperketten überlagert wird. (Ein gezeigtes Experiment steht repräsentativ für drei durchgeführte Experimente)

Das Bec-1 Protein konnte auf einer Höhe von 126 kDa durch Immunopräzipitation nachgewiesen werden. In der Co-IP ist das Protein von HTLV-1 SU schwer darstellbar, da dieses von den schweren Antikörperketten, die eine Größe von ungefähr 45 kDa aufweisen, überlagert wird. Aufgrund dessen ist eine eindeutige Beurteilung der Co-IP nicht möglich.

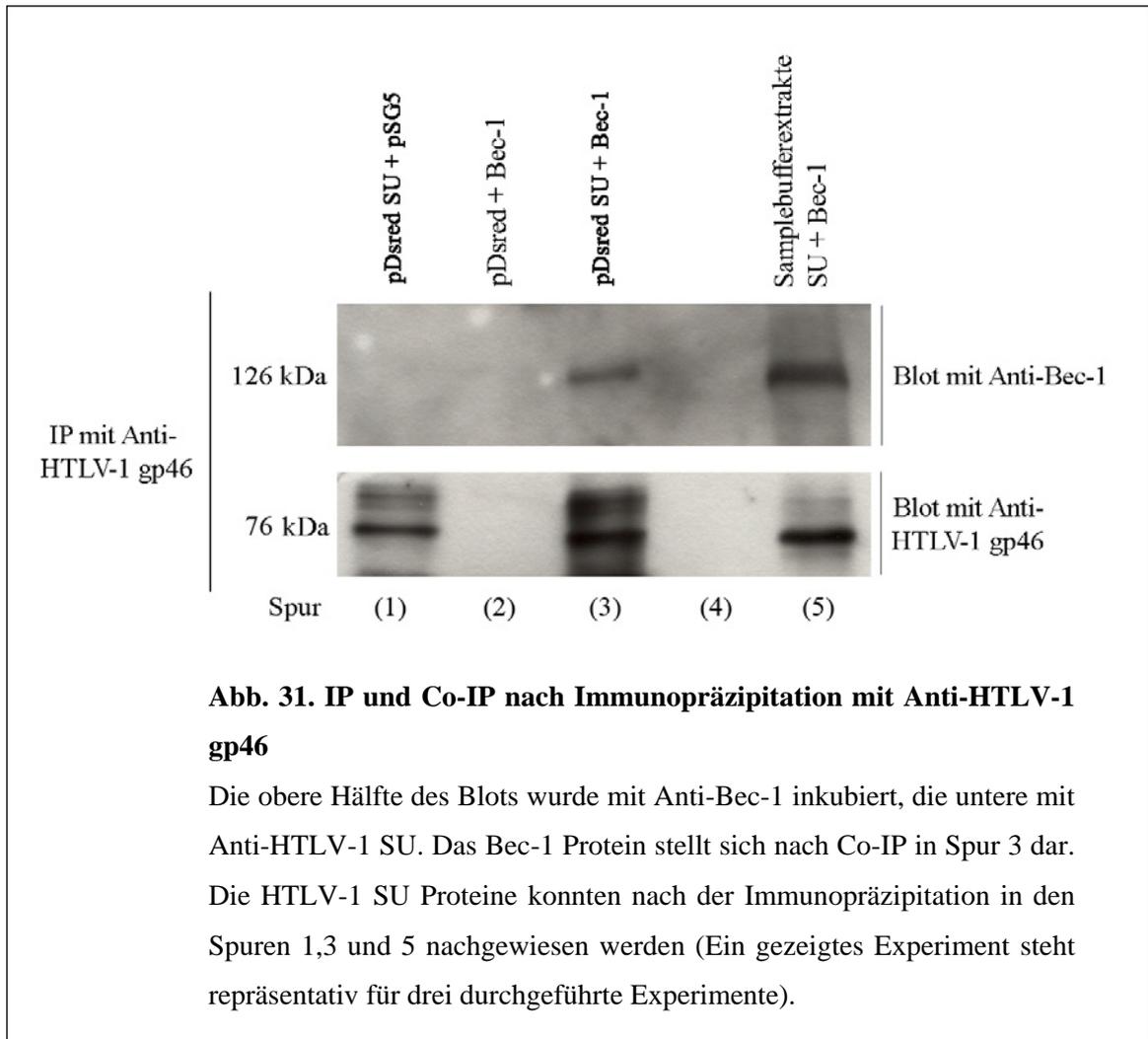
6.4.2. IP und Co-IP von pSG5 Bec-1 und pDsred SU

Da die Co-IP im vorherigen Versuch, mit der Präzipitation von pSG5 Bec-1 und dem anschließenden Nachweis von HTLV-1 SU (siehe Abb. 29), kein eindeutiges Ergebnis brachte, wurde das SU Konstrukt im pDsred Monomer Vektor verwendet. Dieser kodiert für ein rot fluoreszierendes Tag-Protein mit einer Größe von 30-38 kDa (nach Angaben des Herstellers). Nach Expression der Fusionsproteine ermöglicht dies die Darstellung von HTLV-1 SU oberhalb der schweren Antikörperketten, da SU und das Tag-Protein eine Größe von ungefähr 76 kDa aufweisen. Die folgende Abbildung (30.) zeigt die Immunopräzipitation mit dem Bec-1 Antikörper und die Co-IP mit Anti-HTLV-1 gp46.



Als Kontrolle wurde zusätzlich Zellextrakt kotransfizierter Zellen mit Präimmuns serum inkubiert, um unspezifisch gebundene Proteine darzustellen. Die obere Hälfte des Westernblots wurde mit Anti-Bec-1 Serum entwickelt (IP), die untere Hälfte mit dem Antikörper gegen HTLV-1 gp46 (Co-IP). In der Immunopräzipitation (Inkubation des oberen Blotteils mit Anti-Bec-1 Serum) konnte das Bec-1 Protein in den Spuren 6 und 8 nachgewiesen werden. Zum Größenvergleich dient das unbehandelte Samplebufferextrakt von SU und Bec-1 (rechts). In den Spuren, die die Inkubation der Zellextrakte mit Präimmuns serum wiedergeben, stellen sich keine Banden dar, was darauf hinweist, dass eine spezifische Präzipitation von Bec-1 stattfand. Die untere Hälfte des Blots zeigt die Co-IP von HTLV-1 SU. Hier wird das SU Protein nur in Spur 8, in der Zellextrakte von Bec-1 und SU aufgetragen wurden, durch den HTLV-1 gp46 Antikörper dargestellt. Da sich in den Spuren 3 und 4 und in 5 und 6 (Kombination der Leervektoren mit den inserttragenden Konstrukten) keine Banden darstellen, zeigt dies, dass das SU Protein nicht unspezifisch durch die Proteininteraktionen mit den Vektorprodukten präzipitiert wurde.

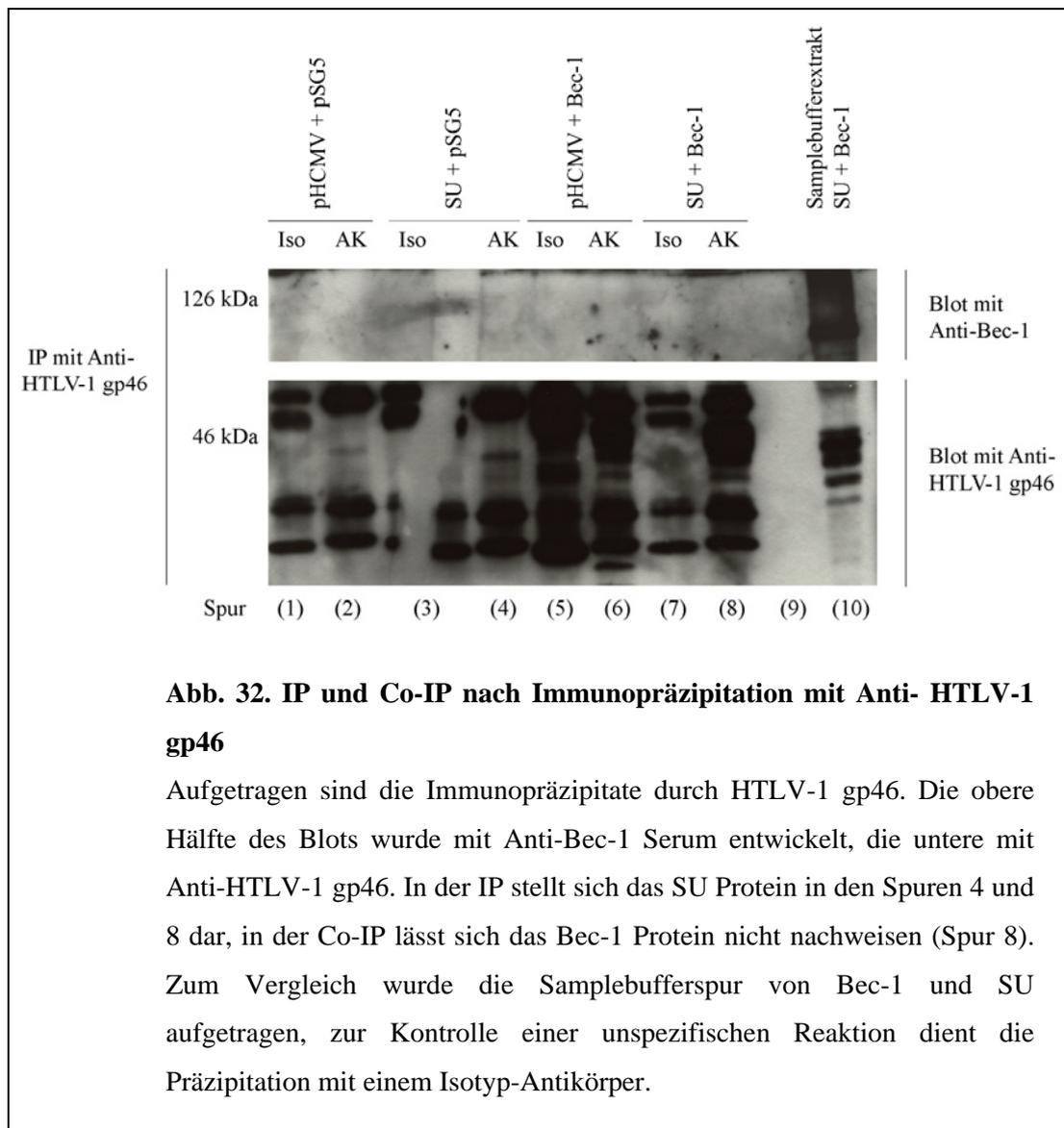
Die nächste Abbildung (31.) zeigt die IP und Co-IP unter den gleichen Transfektionsbedingungen, die nun mit dem Antikörper gegen HTLV-1 (Anti-gp46) durchgeführt wurde. Hierbei wurden die Extrakte mit Anti-HTLV-1 gp46 inkubiert, um das SU Protein und Bec-1 zu präzipitieren. Der Blot wurde wiederum unter der 94 kDa Bande in zwei Anteile geschnitten. Die obere Hälfte wurde mit Anti-Bec-1 Immuns serum (Co-IP), die untere mit Anti- HTLV-1 gp46 (IP) entwickelt. In der Co-IP stellt sich das Bec-1 Protein auf einer Höhe von ungefähr 126 kDa dar (Spur 3). Zur Kontrolle wurde ein Samplebufferextrakt aufgetragen, der Bec-1 und SU enthielt (Spur 5). Auch in der Immunopräzipitation zeigt sich das SU Protein inklusive pDsred Tag auf einer Höhe von 76 kDa (Spur 1,3 und 5).



6.4.3. Interaktion von HTLV-1 SU mit dem endogen exprimierten Bec-1 Kanal

Um zu untersuchen, ob HTLV-1 SU auch mit endogen exprimiertem, also zelleigenem Bec-1 Protein interagiert, wurde das Konstrukt pHCMV SU in 293 T Zellen transfiziert. In diesen Zellen konnte eine erhöhte endogene Expression des Bec-1 Kanalproteins nachgewiesen werden (Kapitel 6.7.2.). Zur Kontrolle wurden zusätzlich Zellen mit dem pHCMV Leervektor transfiziert. Nach zwei Tagen wurden Proteinextrakte hergestellt und es folgte eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen HTLV-1 gp46. Um unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen ausschließen zu können wurde ein Teil der Proteinextrakte mit einem Isotyp-Antikörper präzipitiert. Nach Durchtrennung des Blots, wurde die obere

Hälfte mit dem Anti-Bec-1 Antikörper (Co-IP) entwickelt, die untere mit Anti-HTLV-1 gp46 (IP). In der Immunopräzipitation ist das SU Protein auf einer Höhe von 46 kDa in den Spuren 4 und 8 zu erkennen (Abb. 32.). In der Co-IP lässt sich, abgesehen von der Samplebuffer Probe, kein Bec-1 Protein nachweisen (Spur 8). Der für die Kontrolle verwendete Samplebufferextrakt wurde aus Hela Zellen gewonnen, die mit den Konstrukten Bec-1 und HTLV-1 SU kotransfiziert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich eine Interaktion von endogen exprimiertem Bec-1 und HTLV-1 SU mittels IP und Co-IP nicht belegen.



6.5. FACS-Analyse der transfizierten Zellen

Um für die vorherigen (Kokolisationsstudien, IP/Co-IPs) und nachfolgenden Experimente die Transfektionseffizienz der getesteten Zellen zu überprüfen wurden FACS („fluorescence activated cell sorting“) Analysen durchgeführt. Auf eine 24-Lochplatte wurden pro well 2 x 10⁵ Hela Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin mit dem pEGFP Leervektor und dem Konstrukt pEGFP Bec-1 transfiziert. Dieser Vektor kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP), welches durch einen Laser angeregt werden kann. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend fixiert. Durch die FACS Methode kann anhand der emittierten Fluoreszenz des eGFP Proteins die relative Zellgröße und Granularität analysiert werden. In der Messung stellte sich eine Transfektionseffizienz für den Leervektor pEGFP von 72 % nach 24 Stunden und 95% nach 48 Stunden heraus (Abb. 33.). Für das Konstrukt pEGFP Bec-1 wurde eine Effizienz von 50% nach 24 Stunden und 39% nach 48 Stunden erreicht (Abb. 34.).

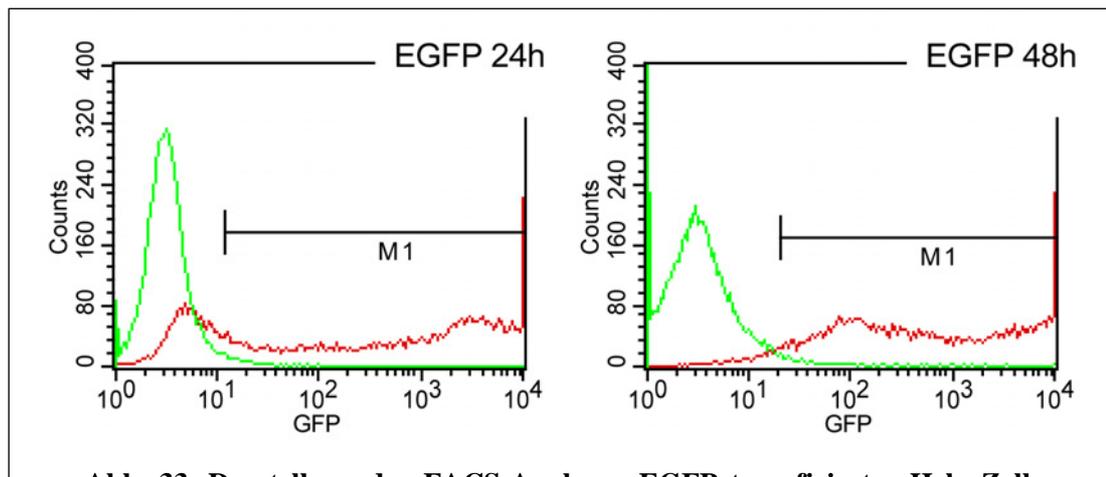
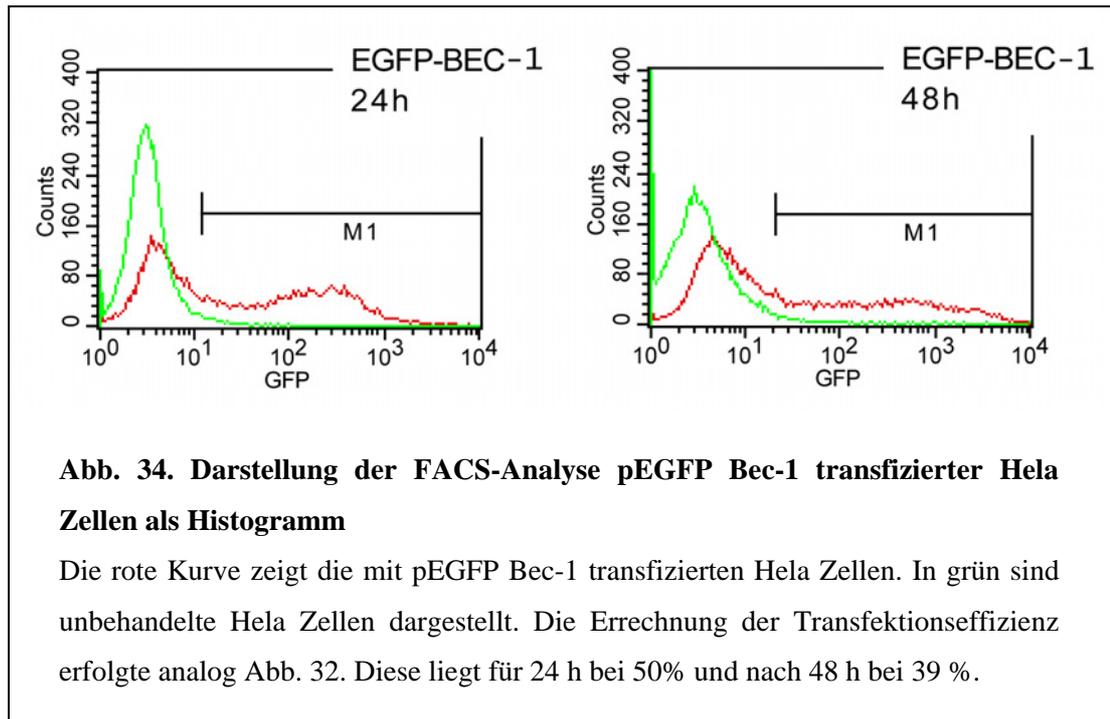


Abb. 33. Darstellung der FACS-Analyse pEGFP transfizierter Hela Zellen als Histogramm

Die Abbildung zeigt die mit pEGFP Leervektor transfizierte Hela Zellpopulation. Untransfizierte Helazellen wurden zum Vergleich als Overlay in grün dargestellt. Die Ordinate beschreibt die Anzahl der gezählten Zellen. Die Rechtsverschiebung der roten Kurve auf der Abszisse, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (grün), zeigt eine erfolgreiche Transfektion an. Durch einen für jede Messung individuell festgelegten Marker (M1) kann die Transfektionseffizienz errechnet werden, diese liegt für 24 Stunden bei 72 % und nach 48 h bei 95%.



Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die durchgeführten Experimente (Kokalisationen, Immunopräzipitationen und Co-IPs) und für das folgende Zytotoxizitätsassay eine ausreichende Transfektionseffizienz für den pEGFP Leervektor (bis zu 95%) und das Bec-1 Protein (bis zu 50%) erreicht wurde.

6.6. Versuchsreihe zu funktionellen Effekten der Interaktion von HTLV-1 Env und Bec-1

Um Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des Bec-1 Kanals und dessen mögliche Auswirkungen im Zusammenspiel mit HTLV-1 SU zu erhalten, wurde ein Zytotoxizitätsversuch unter der Hypothese durchgeführt, dass die Interaktion von Bec-1 und dem HTLV-1 SU Protein einen zytotoxischen Effekt auf die Zellpopulation bewirken könnte. Hierfür wurden HeLa Zellen in 96-Lochplatten ausgesät, die Zellzahl betrug 3×10^4 pro well. Danach wurden die Zellen mit folgenden Konstrukten transfiziert (als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin verwendet):

1. lebende Zellen ohne Transfektion
2. pEGFP Leervektor

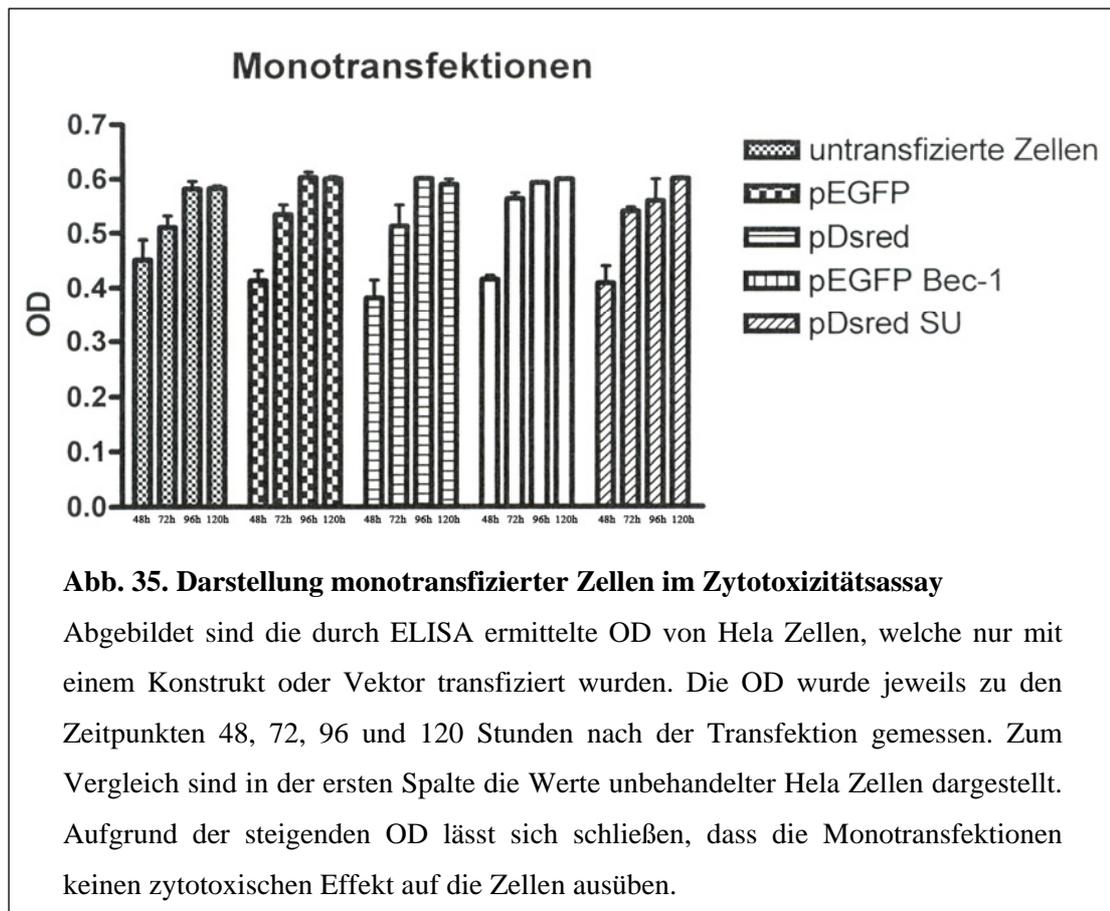
3. pDsred Leervektor
4. pEGFP Bec-1
5. pDsred SU
6. pEGFP Leervektor und pDsred Leervektor
7. pEGFP Leervektor und pDsred SU
8. pEGFP Bec-1 und pDsred Leervektor
9. pEGFP Bec-1 und pDsred SU

Für jede Konstellation wurden vier Schalen transfiziert, um Schwankungen der Werte abschätzen zu können. Um die Zytotoxizität zu prüfen, wurden die Zellen mit MTT-Reagenz behandelt, wodurch lebende Zellen schwarze Kristalle einlagern (Kapitel 5.6.3.). Diese wurden durch einen Puffer verflüssigt, sodass anhand der Messung der optischen Dichte per ELISA die Zahl der kristalleinlagernden Zellen quantifiziert werden konnte. Es wurden jeweils Messungen zu den Zeitpunkten 48, 72, 96 und 120 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPadPrism 4.0 ausgewertet. In einem T-Test für unverbundene Stichproben wurden die Werte der verschiedenen Transfektionen (bei t=120 h) jeweils mit denen unbehandelter Hela Zellen verglichen. Die Nullhypothese des T-Tests lautete: „Die Transfektion beider Konstrukte bewirkt einen zytotoxischen Effekt.“

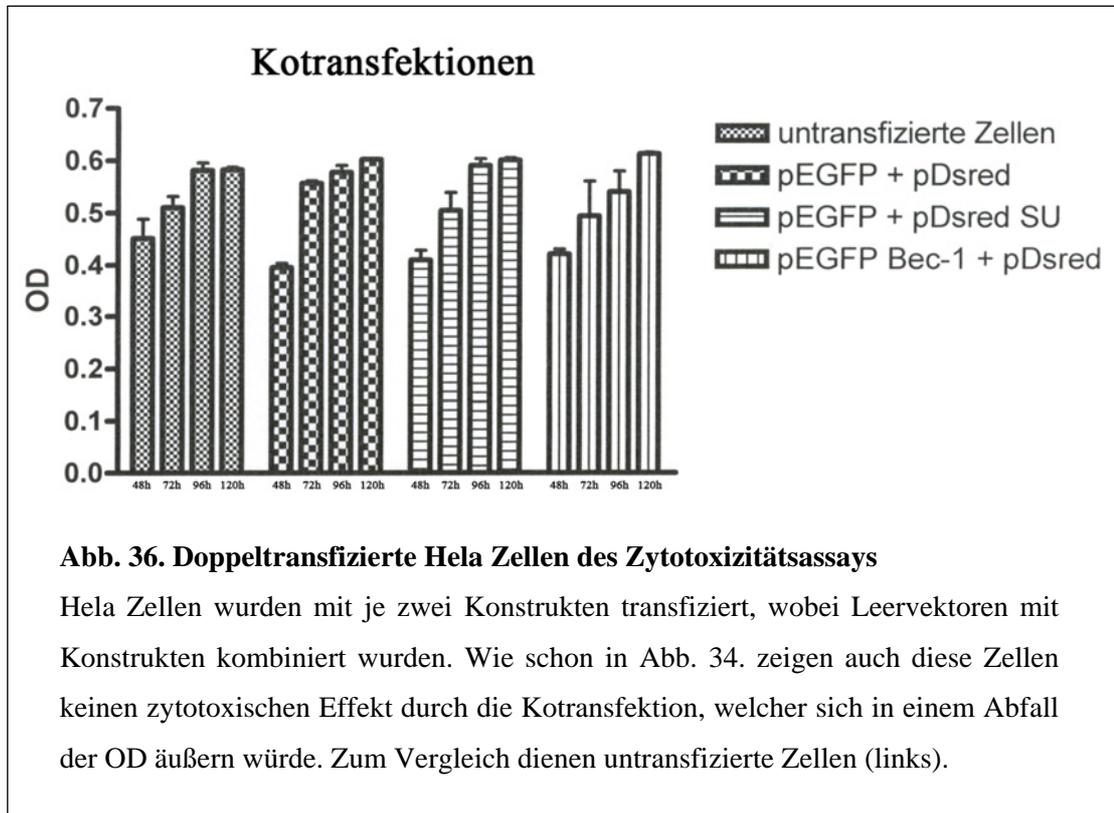
Vektor/ Vektorkonstrukt	p-Wert (T-Test)
pEGFP	0.8915
pDsred	0.8730
pEGFP Bec-1	0.8444
pDsred SU	0.9344
pEGFP und pDsred	0.9797
pEGFP und pDsred SU	0.9336
pEGFP Bec-1 und pDsred	0.7980
pEGFP Bec-1 und pDsred SU	0.7225

Da die p-Werte der verschiedenen Transfektionen oberhalb des Signifikanzniveaus von 0.05 liegen, ist die Nullhypothese abzulehnen, was bedeutet, dass die Kotransfektion keinen

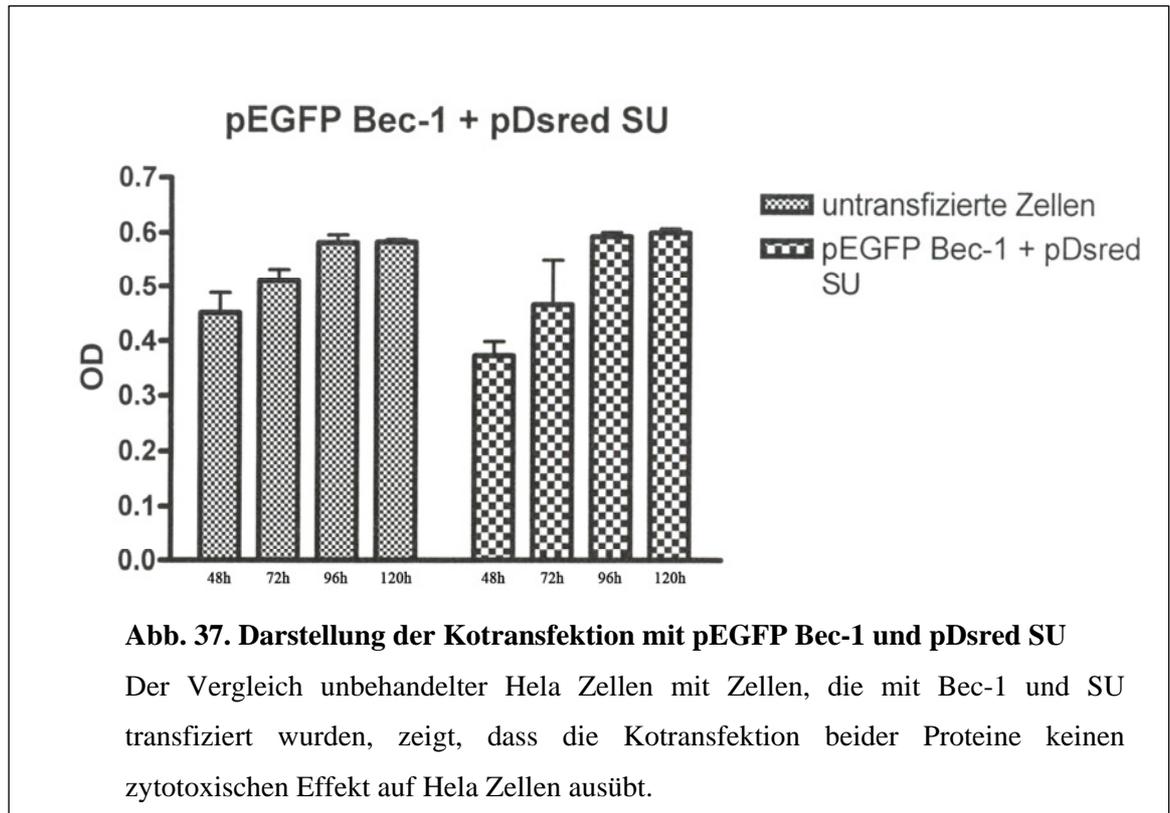
zytotoxischen Effekt auf HeLa Zellen ausübt. Dieser zeigt sich weder bei den Einzeltransfektionen, noch in der Transfektion der beiden Konstrukte Bec-1 und SU. Um diese Ergebnisse bildlich zu veranschaulichen, zeigen die folgenden Abbildungen die gemessenen Extinktionen (OD) bei unterschiedlichen Bedingungen. In Abb. 35. sind die monotransfizierten HeLa Zellen dargestellt, welche jeweils nur mit einem Konstrukt oder dem Leervektor transfiziert wurden (Bedingungen 2.- 5.). Je höher die Zellzahl, desto mehr Kristalle werden in die Zellen eingelagert und die spätere Lösung färbt sich dunkler. Dies resultiert in einer höheren optischen Dichte, die mittels ELISA gemessen werden kann. Sollten die Zellen aufgrund der Transfektion oder Interaktionen der transfizierten Proteine zu Grunde gehen, hätte dies eine Verminderung der OD bewirkt. So zeigten, mit Methanol als Positivkontrolle zerstörte Zellen eine OD nahe Null. Da die Werte in Abb. 35. zu jedem Messzeitpunkt steigen, verdeutlicht dies, dass die Monotransfektionen der Bedingungen 2.- 5. keinen Einfluss auf die Zellen ausüben.



Ähnlich wie die einfachtransfizierte Zellen zeigen auch die doppeltransfizierte Zellen (Bedingungen 6.-8.) ein stetiges Wachstum, welches anhand der steigenden OD verdeutlicht wird. Auch hier übt die Transfektion mit den Konstrukten und/oder den Vektoren keinen zytotoxischen Einfluss auf die HeLa Zellen aus (siehe Abb. 36.).



Die entscheidende Bedingung (9.) war die Kotransfektion von HeLa Zellen mit pSG5 Bec-1 und pDsred HTLV-1 SU (Abb. 37.). Sollte sich hier, im Gegensatz zu den vorherigen Kontrollen, ein zytotoxischer Effekt zeigen, liegt der Schluss nahe, dass dieser nicht durch die Transfektion bedingt, sondern durch die Interaktion der Proteine von Bec-1 und SU zustande kommt. Die folgende Abbildung zeigt die OD von Zellen, welche mit pSG5 Bec-1 und pDsred HTLV-1 SU kotransfiziert wurden. Durch die steigende optische Dichte im Verlauf der Messungen lässt sich jedoch kein zytotoxischer Effekt nachweisen, der durch die Assoziation beider Proteine hätte bedingt sein können.



Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1, die in den vorherigen Experimenten beobachtet wurde, keine zytotoxische Wirkung auf transfizierte HeLa Zellen hatte, welche sich durch ein MTT-Assay quantifizieren ließe.

6.7. Expression des Bec-1 Kanals in verschiedenen Zelllinien

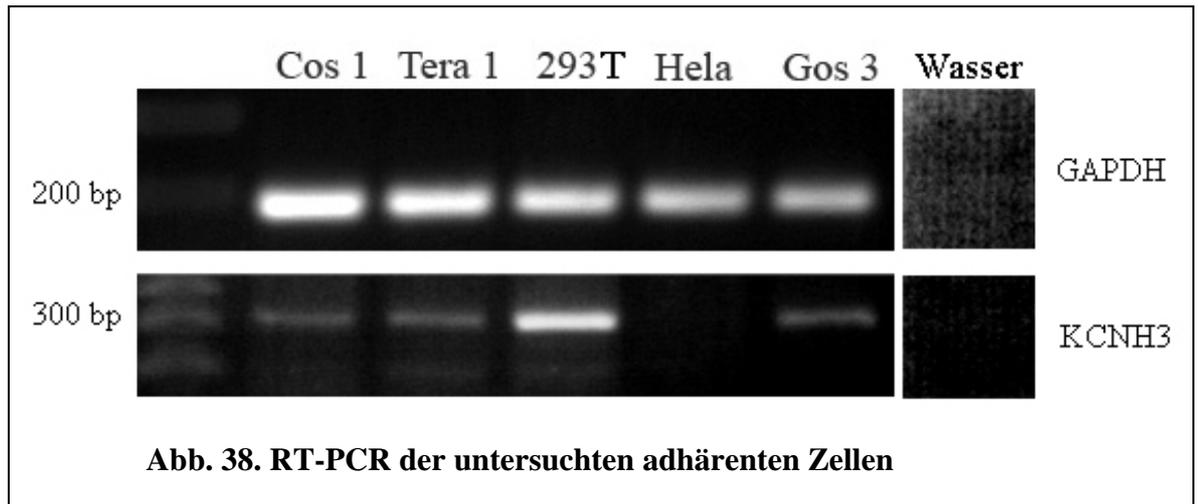
6.7.1. Herstellung von mRNA und reverse Transkription

In den Arbeiten von Smith (Smith et al. 2002) und Miyake (Miyake et al. 1999) wurden verschiedene Gewebe auf das Vorhandensein des Bec-1 Kanals untersucht. Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der Kanal sowohl in Regionen des Telencephalon als auch in hämatopoetischen Zellen nachweisbar ist. Um die Charakterisierung der Expression des Bec-1 Kanals fortzuführen, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Zelllinien auf die Expression des Kanals mittels RT (reverse transcription)-PCR untersucht.

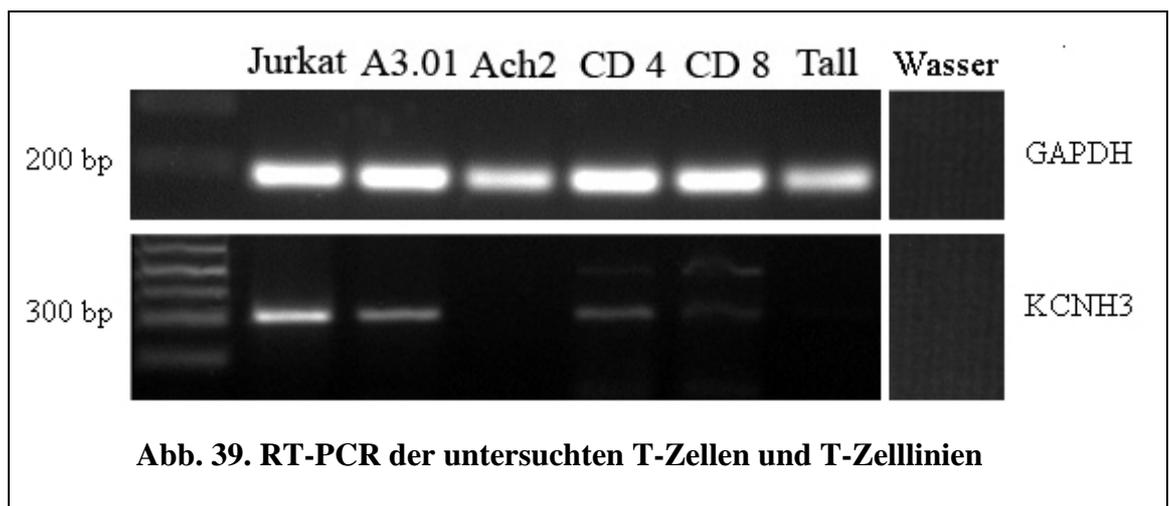
Pro getesteter Zelllinie wurden ca. 6 Mio. Zellen eingesetzt, aus denen mit Hilfe eines Kits (RNeasy, Qiagen) die mRNA (messenger RNA) extrahiert wurde. Um eventuelle Kontaminationen von genomischer DNA zu entfernen, wurde das gewonnene Extrakt mit DNase verdaut. Anschließend wurde die RNA durch eine reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Es wurde jeweils 1 µg/µl RNA (bei BL41 2 µg/µl) eingesetzt. Die cDNA konnte als Template für die PCR mit den Primern KCNH3 F und KCNH3 R (Kapitel 4.6.) verwendet werden. Zur Kontrolle wurde ein zweiter Ansatz jeder Probe nicht mit Reverser Transkriptase (-RT) behandelt (Daten nicht gezeigt). Die Primer für den Bec-1 Kanal wurden so gewählt, dass diese „Intron-spanning“ (intronübergreifend) amplifizieren. Initiale Experimente zeigten, dass die verwendeten Primer cDNA spezifisch sind und keine genomische DNA vervielfältigen. Die PCR wurde auch mit Primern für GAPDH durchgeführt (GAPDH N und GAPDH M, Kapitel 4.6.). GAPDH ist ein „house-keeping-gene“, welches konstitutiv in allen Zelltypen exprimiert wird und somit als interne Kontrolle für die Intaktheit der cDNA verwendet wurde.

6.7.2. Testung der Zelllinien auf den Bec-1 Kanal mittels RT (reverse transcription)-PCR

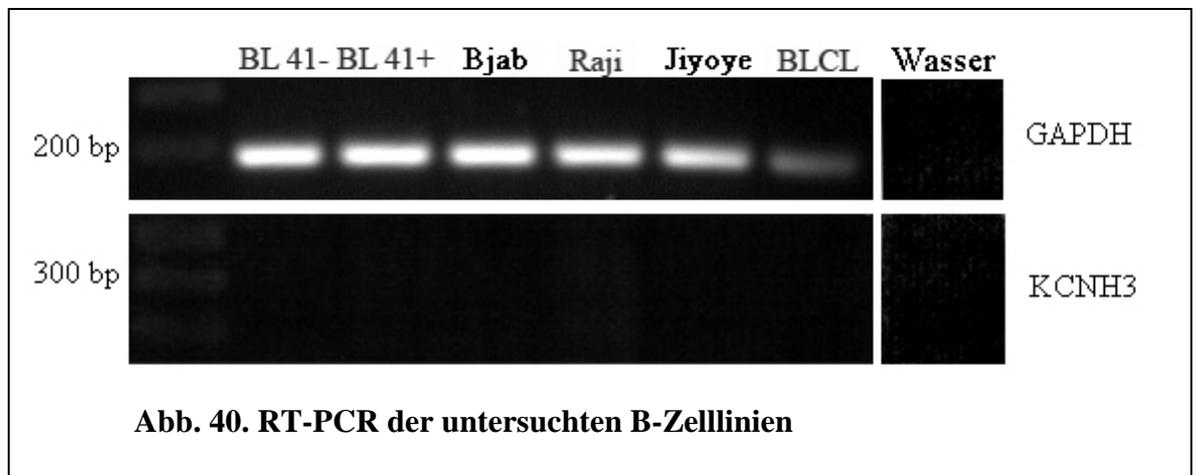
Die getesteten Zelllinien wurden in drei Gruppen unterteilt: Adhärente Zellen, T-Zellen und B-Zelllinien (Kapitel 4.10.). Wird der Bec-1 Kanal von einer Zelllinie exprimiert, stellt sich nach der RT-PCR eine Bande auf Höhe von 314 bp in der Agarosegelelektrophorese dar. Das GAPDH Fragment besitzt eine Größe von 189 bp. Um eine gewisse Vergleichbarkeit zu erhalten, wurden für die PCR mit den Primern KCNH3 F/R von jeder Zelllinie 2 µl cDNA in die Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation wurde das PCR Programm KR 58_40 verwendet. Beim GAPDH-Screening wurde 1 µl cDNA eingesetzt und mit dem Programm KR 58_35 vervielfältigt. Im Folgenden ist das Resultat der RT-PCR der verschiedenen Zelllinien auf 3%igem Agarosegel abgebildet. Die obere Hälfte der Abbildungen (Abb. 38.-40.) zeigt zunächst die Kontroll-PCR mit den GAPDH Amplifikaten und darunter das PCR Resultat der Primer KCNH3 F/R. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurde eine Wasserkontrolle durchgeführt.



Bei den adhärennten Zellen zeigt die GAPDH PCR, dass die verwendete cDNA intakt war, da sich eine Bande auf Höhe von ~200 bp in jeder Probe darstellt (Abb. 38.). Die Wasserkontrolle (rechts) war negativ. Die mRNA des Bec-1 Kanals ließ sich in vier der getesteten Zelllinien (Cos 1, Tera 1, 293 T und Gos 3) nachweisen. Die Expression ist jedoch unterschiedlich stark. In Cos 1 Zellen, einer von Nierenzellen abgeleitete, fibroblastenähnliche Zelllinie, Tera 1 Zellen, einer Teratokarzinom Zelllinie und Gos 3 Zellen, einer Astro-Oligodendrogliom Zelllinie, ist der Kanal eher schwach vorhanden, wohingegen eine deutliche Expression bei 293 T Zellen (humane Nierenepithelzelllinie) erkennbar ist. In Hela Zellen konnte das KCNH3 Transkript nicht nachgewiesen werden.



Bei der Untersuchung der T-Zellen und Zelllinien ließ sich der Bec-1 Kanal in Jurkatzellen (T-Zelllinie, aus Blut eines Patienten mit ALL) nachweisen, sowie in aufgereinigten primären CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Eine sehr schwache Bande ist auch bei den Tall Zellen, einer T-lymphoblastoiden Zelllinie eines Kindes mit ALL, zu erkennen. Diese stellte sich bei einer PCR mit 5 µl cDNA Input (anstelle von 2 µl) deutlicher dar (Daten nicht gezeigt). A3.01 Zellen zeigen nach HIV Infektion zytopatische Effekte und gehen infolge dessen zugrunde. Aus dieser Zelllinie entstanden Ach2 Zellen, welche die Infektion mit HIV überlebten und nun latent mit HIV infiziert sind. Die Mutterzellen A3.01 weisen den Bec-1 Kanal auf, wohingegen der Kanal in den Tochterzellen (Ach2) mittels RT-PCR nicht nachweisbar war (Abb. 39.).



Auch bei den B-Zelllinien (Abb. 40.) ist eine gut darstellbare Bande im GAPDH Screening zu sehen, die Wasserkontrolle negativ. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine der getesteten B-Zelllinien (BL 41 [EBV positiv und negativ], Bjab, Raji, Jiyoye und BLCL) den Bec-1 Kanal exprimiert. Auch die B-Zelllinie B95.8 (Daten nicht gezeigt) weist kein KCNH3 Transkript auf. Zudem ergaben Versuche mit größerem cDNA Input (bis 5 µl) ebenfalls keine sichtbaren Banden. Dies lässt darauf schließen, dass in den getesteten B-Zelllinien der Bec-1 Kanal nicht transkribiert wird.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass mRNA des Bec-1 Kanals in fast allen getesteten T-Zelllinien und primären T-Zellen (Jurkat, CD4⁺, CD8⁺, Tall, außer Ach2) exprimiert wird, nicht jedoch in B-Zelllinien. Bec-1 wird außerdem von einigen adhärenen Zelllinien wie Cos 1, Tera 1, 293 T und Gos 3 Zellen transkribiert.

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Interaktion von HTLV-1 Env und dem Kaliumkanalprotein Bec-1. Zum Nachweis der Bindung wurden *in vitro* (Pulldownanalysen) und *in vivo* Untersuchungstechniken (Kokalisation, IP und Co-IP) angewandt, welche eine Interaktion beider Protein bestätigen konnten.

7.1. Interaktion von HTLV-1 SU und TM mit dem Bec-1 Kanal

In den Pulldownanalysen stellte sich einerseits eine Bindung von HTLV-1 SU und Bec-1, andererseits aber auch eine schwache Interaktion von HTLV-1 TM und dem Bec-1 Kanal dar (Abb. 14). Nachdem Kontrollen mit anderen retroviralen TM Proteinen (HIV, HERV-W) in ähnlichen Experimenten negativ ausfielen, war diese Bindung zunächst ungewöhnlich. Um die Interaktionsdomäne genauer zu charakterisieren, wurde das TM Protein um 63 Aminosäuren N-terminal verkürzt. In den folgenden Pulldownanalysen zeigte sich, dass das verkürzte TM-Cut Protein nicht mehr mit dem Bec-1 Kanal interagiert (Abb. 17.). Daher lässt sich die Bindungsdomäne von Bec-1 zu HTLV-1 TM auf dessen 63 amino-terminale Aminosäuren eingrenzen.

Die weiteren Pulldownanalysen stellten zudem eine *in vitro* Interaktion des HTLV-1 SU Proteins mit dem Bec-1 Kanal dar (Abb. 14. und 17.). In Hefescreenuntersuchungen des humanen endogenen Retrovirus MSRV konnte die Bindung des MSRV Env Proteins an den Bec-1 Kanal nachgewiesen werden. Pulldownanalysen mit Env-Proteinen weiterer Retroviren (HERV-W, HERV-K und HIV) ergaben, dass auch deren SU Proteine an das Kanalprotein binden (Daten noch nicht veröffentlicht). Durch die Interaktion von HTLV-1 SU mit Bec-1 stellt HTLV-1 ein weiteres Retrovirus dar, welches in Assoziation mit dem Bec-1 Kanal treten kann. Analog zu den mit MSRV TM erzielten Resultaten, bindet auch das verkürzte HTLV-1 TM Protein nicht an den Bec-1 Kanal.

Bei Pulldownanalysen sollte berücksichtigt werden, dass die Proteine *in vitro* exprimiert werden und interagieren. Die Untersuchungsbedingungen entsprechen nicht dem nativen Milieu und der Kompartimentierung einer Zelle, sodass hierdurch eine Interaktion der Proteine als Artefakt der Untersuchungsmethoden auftreten könnte. Aufgrund dessen wurden

virale und retrovirale Proteine als Negativkontrolle im Pulldown getestet. Im Rahmen anderer Arbeiten der AG Müller-Lantzsch zeigte das LMP (latent membrane protein) Protein des Epstein-Barr-Virus keine Bindung an den Bec-1 Kanal (Daten nicht gezeigt). Auch die Gag Proteine von HERV-K und HIV, deren SU Proteine mit Bec-1 interagieren, assoziieren nicht mit dem Kanal. Da die transmembranen Proteine (TM als Teil des Env Proteins) von HTLV-1, MSRV sowie HERV-W nicht an den Bec-1 Kanal binden, stellen diese Negativkontrollen dar. Daher ist eher unwahrscheinlich, dass eine Assoziation von HTLV-1 SU und Bec-1 auf unspezifische Proteininteraktionen zurückzuführen ist. Zudem konnte im Folgenden auch die Kolokalisation (Kapitel 6.3.) und eine *in vivo* Interaktion (Co-IP) (Kapitel 6.4.) beider Proteine nachgewiesen werden.

7.2. Kartierung der Bindungsstelle des Bec-1 Kanals

Nach Sequenzierung der verschiedenen Bec-1 Klone wurden diese als GST-Fusionsproteine exprimiert und in Pulldownanalysen mit dem HTLV-1 SU Protein getestet. Die verwendete Sequenz von Bec-1 entspricht den letzten 223 C-terminalen Aminosäuren des Kanals, welche intrazytoplasmatisch in die Zelle hineinragen. Nach Trennung des Proteins in gleich große Anteile (Bec-1 I und II) zeigten Pulldownanalysen, dass HTLV-1 SU an das Bec-1 II Protein bindet, nicht aber an Bec-1 I. Daraus resultiert, dass die Bindungsstelle am C-terminalen Ende, innerhalb der letzten 110 Aminosäuren des Bec-1 Kanals liegt (AS 973-1083). Im Folgenden wurden weitere trunkierte Bec-1 Klone hergestellt, welche unterschiedliche Domänen des Bec-1 Proteins beinhalteten, um somit genauer auf die Bindungsstelle an HTLV-1 SU schließen zu können (Abb. 21.). Die Klone Bec-1 A, B, C und D welche am C-terminalen Ende trunkiert wurden, zeigten alle eine Bindung an das SU Protein (Abb. 22). Auch die N-terminal trunkierten Klone Bec-1 3.6 und 4.14 binden an HTLV-1 SU (Abb. 23.). Die Bindung von Bec-1 4.14 erscheint diffus, muss jedoch insgesamt als positive Interaktion gewertet werden. Das Bec-1 Protein besitzt eine prolinreiche Region zwischen AS 951 und 1057, welche eine mögliche Bindungsdomäne darstellen könnte. Prolinreiche Sequenzen sind potentielle Bindungsregionen und interagieren mit verschiedenen Domänen wie SH3 (Src Homologe), WW (zwei konservierte Tryptophan Moleküle) und EVH1 (enabled vasp homology) (Kay et al. 2000). Daher wurde der Klon 5.31 konstruiert, welcher die prolinreiche Domäne nicht mehr beinhaltet. Jedoch legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass auch dieser trunkierte Klon (Bec-1 5.31) an das

SU Protein bindet (Abb. 23.). Aufgrund der durchgeführten Bindungsanalysen, lässt sich schließen, dass die Bindung von HTLV-1 SU an Bec-1 auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren beschränkt ist. Dass keine kürzere Aminosäuresequenz als Bindungsregion nachzuweisen ist, liegt möglicherweise an der dreidimensionalen Faltung des C-Terminus oder an der Zusammenlagerung der vier C-Termini als Dimer von Dimeren (Kap 3.2.1.). Es ist daher nicht auszuschließen, dass innerhalb der letzten 110 C-terminalen Aminosäuren mehrere Bindungsstellen von Bec-1 an HTLV-1 SU vorhanden sind.

Es zeigte sich zudem, dass, im Vergleich zu Klon Bec-1 I (AS 860-971), welcher nicht an HTLV-1 SU bindet, der um nur 9 Aminosäuren längere Klon Bec-1 A (AS 860-980) eine Interaktion mit HTLV-1 SU aufweist. Aufgrund dessen ist zu vermuten, dass die Domäne zwischen AS 971-980 eine mögliche Relevanz für die Bindung von HTLV-1 SU und Bec-1 besitzt. Es lässt sich spekulieren, dass die Interaktion der letzten 110 C-terminalen AS von Bec-1 an HTLV-1 SU zwar nicht auf das Vorhandensein dieser Domäne angewiesen ist (die Klone Bec-1 3.6, 4.14 und 5.31 sind soweit trunziert, dass AS 971-980 fehlt, trotzdem binden diese), jedoch könnte eine Beeinflussung der Bindungsaffinität oder der Sekundärstruktur des Bec-1 C-Terminus durch diese Region möglich sein.

Untersuchungen der AG Müller-Lantzsch ergaben, dass die Bindungsstelle von HIV SU an Bec-1 nicht eingrenzbar ist, da unterschiedlich trunzierte HIV SU Klone gleichermaßen an den Bec-1 Kanal gebunden haben. Auch beide Proteine der mittig geteilten HERV-W SU Sequenz binden an Bec-1 (Daten noch nicht veröffentlicht). Aufgrund dessen lässt sich die Bindungsstelle der retroviralen SU Proteine an den Bec-1 Kanal nicht generell auf spezifische Aminosäuresequenzen beschränken, sondern unterliegt womöglich der dreidimensionalen Faltung beider Proteine, mit multiplen wechselseitigen Bindungsstellen.

7.3. Lokalisations- und Koloalisationsstudien

Das HTLV-1 SU Protein wurde als Dsred Fusionsprotein in Hela Zellen exprimiert, Bec-1 als eGFP Fusionsprotein (Kapitel 6.3.). Mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass beide Leervektoren (pEGFP und pDsred) in der gesamten Zelle exprimiert werden (Abb. 24., Bild 2, Abb. 25., Bild 3), wohingegen die Proteine von Bec-1 und HTLV-1 SU nur intrazytoplasmatisch darstellbar sind (Abb. 24., Bild 3, Abb. 25., Bild 2). Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Integration des Inserts in beide Vektoren die Lokalisation der Proteine beeinflusst wurde. Die übereinandergelagerten Aufnahmen (Merge) der

Kotransfektion von HTLV-1 SU und Bec-1 sprechen dafür, dass beide exprimierten Proteine im Zytoplasma kolokalisieren. Das HTLV-1 Env Protein wird als Vorläuferprotein translatiert und am Golgi Apparat in die Proteine SU und TM gespalten (Delamarre et al. 1994). Beide Anteile sind über eine Disulfidbrücke zwischen der Aminosäure 225 und 401 verbunden. Nach der Prozessierung assoziieren die Proteine des infektiösen HTLV-1 Virus für den Zusammenbau der Viruspartikel, dem sogenannten Assembly, um zur Zellmembran zu gelangen und zu Knospen (Budding). Die Maturation des Bec-1 Kanals ist bisher nicht untersucht, man kann jedoch anhand anderer spannungsgesteuerter Kalium Kanäle (Kv-Kanäle) vermuten, dass nach Transport der mRNA aus dem Nukleus, die Proteine durch Ribosomen direkt in das Endoplasmatische Retikulum translatiert werden. Dort lagern sich jeweils vier Untereinheiten zu einem funktionellen tetrameren Kanal zusammen. Nach dieser Faltung werden die Kanäle im Golgi Apparat weiter modifiziert (beispielsweise glykosyliert, [Papazian 1999]) um dann zur Plasmamembran zu gelangen (Delisle et al. 2004). Die in den Kolokalisationsaufnahmen beobachtete zytoplasmatische Lokalisation entspricht somit der erwarteten Verteilung eines am Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteins. Die eingesetzten Vektoren (pEGFP und pDsred) besitzen einen starken CMV Promotor, welcher zu einer Überexpression der Proteine in Zellen führt. Daher entspricht die Konzentration des Proteins in den behandelten Zellen nicht der nativen Konzentration *in vivo*. Möglicherweise wurde ein Vielfaches an Protein exprimiert, sodass beide Proteine nur aufgrund des geringen Verteilungsvolumens kolokalisierten. Dies sollte bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Zum anderen können die anhängenden eGFP und Dsred Proteine aufgrund ihrer relativ großen Masse von 24 bzw. 30-38 kDa die Lokalisation in der Zelle beeinflussen (Giepmans et al. 2006). Dagegen spricht jedoch, dass sich auch nach immunzytochemischer Färbung eines transfizierten Bec-1 Proteins ohne Tag mit Anti-Bec-1 Serum, durch floureszenzmikroskopische Darstellung ein ähnliches Muster wie in den vorliegenden Abbildungen (Abb. 25, 26 und 27) ergibt und das Protein in gleicher Weise lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die Lokalisation des Proteins nicht durch den Tag beeinflusst wurde.

7.4. Nachweis der *in vivo* Interaktion des HTLV-1 SU Proteins mit dem Bec-1 Kanal

Um eine Interaktion beider Proteine in Zellen darzustellen, wurden Immunopräzipitationen und Coimmunopräzipitationen durchgeführt. Die hierfür verwendeten Vektoren (pSG5 und pHCMV) exprimieren das Protein ohne zusätzlichen Tag, um falsch positive Ergebnisse durch Tag-Protein-Interaktionen auszuschließen. Abb. 28. zeigt die IP und Co-IP nach der Präzipitation mit dem Anti-HTLV-1 gp46 Antikörper, in der deutlich das coimmunopräzipitierte Bec-1 Protein zu erkennen ist. Dieses Ergebnis belegt, dass das HTLV-1 SU Protein und Bec-1 auch *in vivo* interagieren. In der Immunopräzipitation durch Bec-1 Serum aus Kaninchen (Abb. 30.) kann eine Interaktion von HTLV-1 SU mit Bec-1 bestätigt werden. In dieser IP wurde jedoch pDsred als Vektor eingesetzt, der SU als Fusionsprotein exprimiert, da das Surface Protein eine Größe von 46 kDa aufweist und somit, ohne anhängenden Tag von den schweren Ketten des Antikörpers überlagert würde. Die Qualität der Immunopräzipitationen hängt stark von den verwendeten Antikörpern ab (Heyderman 1979). Aufgrund dessen wurden alle verwendeten Antikörper im Vorfeld durch Westernblotanalysen mit eukaryotisch exprimierten Proteinen und Kontrollen auf deren Spezifität getestet, sodass falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen auszuschließen sind.

Eine Interaktion von endogenem Bec-1 und transfiziertem HTLV-1 SU in 293 T Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden (Abb. 32.). Dies ist möglicherweise bedingt durch die geringe Bec-1 Konzentration in der verwendeten Zelllinie im Vergleich zu den Konzentrationen, die bei transienter Transfektion mit Bec-1 DNA erreicht werden. Zum anderen ist der Großteil des endogenen Bec-1 Proteins eher membranständig lokalisiert und möglicherweise auch dort verankert, wohingegen das transfizierte Insert erst im Zytoplasma exprimiert wird, um dann zur Membran zu gelangen. Aufgrund der ähnlichen Lokalisation ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Proteine der transient transfizierten Zellen interagieren höher, und somit auch die Wahrscheinlichkeit das Protein durch die Immunopräzipitation darzustellen. Diese Tatsache stellt jedoch auch ein Risiko für falsch positive Ergebnisse dar, denn die hierfür verwendeten Vektoren pSG5 und pHCMV besitzen expressionsstarke Promotoren, die die Proteine in einem Vielfachen der eigentlichen Zellkonzentration exprimieren. Daher gilt es zu bedenken, dass eine solche Interaktion auch artifiziell, aufgrund der hohen Dichte beider Proteine, stattfinden könnte.

Bisher konnte jedoch durch Pulldownanalysen die Bindung von HTLV-1 SU an Bec-1 dargestellt werden, sodass aufgrund der Bestätigung der Vorexperimente eine Interaktion wahrscheinlich ist.

7.5. Funktionelle Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1

Als erster Schritt zur Charakterisierung funktioneller Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 wurde ein Zytotoxizitäts-Assay (MTT) durchgeführt. Mit dieser Methode sollte nachgewiesen werden, ob durch eine Bindung beider Proteine das Überleben der transfizierten Kulturen beeinflusst. Der Vergleich von unbehandelten Zellen mit Helazellen, welche mit Bec-1 und HTLV-1 SU transfiziert wurden (siehe Abb. 35., 36. und 37.) ergab jedoch, dass die Interaktion der Proteine keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine solche Bindung anderweitige Effekte (z.B. Auswirkungen auf die Flussraten des Kalium Kanals) haben könnte, sondern zeigt lediglich, dass die Assoziation beider Proteine keinen zytotoxischen Effekt auf Helazellen bewirkt.

Um die Transfektionsraten von Hela Zellen, die für den Zytotoxizitätsnachweis (MTT-Assay) verwendet wurden, festzustellen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Diese ergaben eine Effizienz von 50% für das transient transfizierte Bec-1 Konstrukt in Hela Zellen (Abb. 34.). Dies erscheint ausreichend, um effektiv Aussagen über die Zytotoxizität der transfizierten Konstrukte machen zu können.

7.6. Expression des Bec-1 Kanals in verschiedenen Zelllinien

Bisher konnte der Bec-1 Kanal in bestimmten Regionen des menschlichen Gehirns (Miyake et al. 1999, Zou et al. 2003) und in hämatopoetischen Zellen (Smith et al. 2002) durch RT-PCR und Northernblot nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden kultivierte Zelllinien und Zellen auf die Expression von Bec-1 mRNA, nach RNA Extraktion, mittels RT-PCR getestet. Transkripte des KCNH3 Gens ließen sich in humanen Karzinomzelllinien nachweisen, beispielsweise in Gos 3, einer Astro-Oligodendrogliom Zelllinie, und Tera 1, einer humanen Teratocarcinom Zelllinie. Zudem wird der Kanal von 293 T Zellen

(Nierenepithelzelllinie) und Cos 1 Zellen (fibroblastenähnliche Zelllinie) exprimiert. In allen getesteten B-Zelllinien war der Bec-1 Kanal nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer BCLL-Zelllinie (von einer Patientin mit chronisch lymphatischer B-Zell Leukämie), in denen der Bec-1 Kanal mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Smith et al. 2002). In dieser Studie wurde eine BCLL Tumorzelllinie getestet, in der vorliegenden Arbeit jedoch Burkitt-Lymphom Zelllinien und immortalisierte lymphoblastoide B-Zellen verwendet. Daher ist zu vermuten, dass spezifische B-Zelltumore den Bec-1 Kanal exprimieren, im Gegensatz zu den hier getesteten B-lymphoblastoiden Zellen. Fast alle getesteten T-Zelllinien (Jurkat, A3.01, Tall, außer Ach2-Zellen) und primäre CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen weisen Transkripte des KCNH3 Gens auf. Der positive Nachweis von Bec-1 RNA in T-Zellen ist als interessantes Ergebnis hervorzuheben, da vor allem CD4⁺ T-Zellen für HTLV-1 und auch HIV primäre Zielzellen im menschlichen Organismus darstellen. Die Expression des Kanals auf Wirtszellen könnte sich als Selektionsvorteil des Virus in bestimmten Zellen herausstellen und könnte somit für die Expansion des Virus in der Zelle einen begünstigenden Faktor darstellen.

Während der Versuchreihe zeigte sich, dass bei erhöhter Ausgangskonzentration der cDNA in der PCR der Bec-1 Kanal in manchen Zelllinien noch nachweisbar wurde (beispielsweise in Tall-Zellen). Daher ist nicht auszuschließen, dass bei wesentlich höherer cDNA Konzentration oder durch quantitative PCR eine niedrige Expression in anderen Zellen und Zelllinien noch nachgewiesen werden könnte.

7.7. Mögliche Bedeutung der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1

Als Voraussetzung zur Hypothesenformulierung werden nochmals in Kürze wesentliche Funktionen des HTLV-1 Env Proteins erläutert um davon ausgehend mögliche funktionelle Konsequenzen der Interaktion von HTLV-1 Env und Bec-1 zu diskutieren.

7.7.1. Funktion von HTLV-1 Env

Das HTLV-1 Vorläufer Protein wird am Golgi Apparat in SU und TM prozessiert. Nach dem Zusammenbau viraler Partikel dient das TM Protein zur Verankerung von HTLV-1 SU in der Virusmembran. Zudem ist es an Schritten der Fusion des Virus mit der Zielzelle beteiligt, worin das Fusionspeptid (AS 313-333) involviert ist. Während der Penetration

insetiert dessen N-terminaler Anteil in die Zellmembran der Zielzelle, während der C-Terminus das Virus mit der Zelle verbindet. Aber auch die glycinreiche Domäne (AS 327-339) gilt Untersuchungen zufolge als obligat für die Fusion von Virus und Zellmembran (Wilson et al. 2004). Glycinreiche Segmente besitzen charakteristischerweise eine hohe Rotationsfreiheit und sind daher besonders geeignet Membranfusionsprozesse zu steuern. Bei Mutationen des TM Anteils wurden Abnahmen der Zellfusionsaktivität von bis zu 90% beobachtet (Wilson et al. 2004). Bis heute liegen keine Daten über die intrazytoplasmatische Funktion des HTLV-1 TM Proteins vor. Beispiele von Rous Sarkoma Viren (RSV) zeigen, dass der alpha-helicale TM Anteil des Env Proteins dem Transport der Viruspartikel zur Zellmembran dient, der carboxyterminale Anteil von TM zur Oligomerisierung der Viruspartikel (Einfeld et al. 1997). Der Transport erfolgt erst nach korrekter Faltung der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER).

Nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip erkennt das SU Protein HTLV-1 spezifische Rezeptoren wie GLUT1 und Heparan Sulfat-Proteo-Glykane (HSPGs) auf der Zelloberfläche der Zielzellen. Die Infektiosität ist eng an bestimmte Aminosäuren des SU Proteins gekoppelt, welche sich über das gesamte Protein erstrecken (AS 100-194 und 208-299). Ohne Expression des SU Proteins oder bei Mutationen des Vorläuferproteins, welche nicht zur Prozessierung in SU und TM führen, findet keine Zell-Zell Übertragung statt (Delamarre et al. 1999). Bislang sind keine intrazytoplasmatischen Funktionen von HTLV-1 SU nach dessen Penetration bekannt. Bei anderen Retroviren, wie HIV-1, ist eine Interaktion von Env mit Gag Proteinen bekannt. Möglicherweise vereinfacht dieses Zusammenspiel das Virus-Assembly durch Konzentration der Gag-Proteine in bestimmten Kompartimenten der Wirtszelle (Baldwin 1998).

7.7.2. Funktion von Bec-1 und anderen spannungsgesteuerten Kalium Kanälen

Die Prozessierung von Bec-1 ist bisher nicht untersucht worden, daher lassen sich anhand Studien anderer spannungsgesteuerter Kalium Kanäle nur Hypothesen aufstellen, inwieweit sich das Bec-1 Kanalprotein in Zellen verhält und welche Funktionen die einzelnen Domänen des Kanals ausüben. Beispielsweise lagern sich translatierte Proteine von Kv Kanälen im ER mit je vier Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammen (Delisle 2004, Papazian 1999). Dort nehmen sie eine Struktur als „Dimer von Dimeren“ ein. Diese

Faltung wird durch eine sogenannte T1 Domäne („tetramerization domain 1“) am aminoterminalen Ende initiiert (Schultheis et al. 1998). Der COOH-Terminus bei HERG Kanälen spielt eine wichtige Rolle beim Transport der Kanäle zur Plasmamembran. Bei Trunkierung der AS 860-899 des C-Terminus werden weniger Kanäle auf der Zelloberfläche exprimiert und es liegt eine verminderte Anzahl glykosylierter Proteine von HERG vor, die Konformation als Tetramer ist jedoch nicht beeinträchtigt. Die verminderte Expression der HERG Kanäle ist lediglich bedingt durch eine vermehrte Retention des Proteins im ER (Akhavan et al. 2003). In ähnlicher Weise bewirkt die variable Region des C-Terms die Oberflächenexpression von Kv4.1 Kanälen. Mutationen dieses Bereiches resultieren in einer stark verminderten Integration der Kanäle in die Zellmembran (Zhu et al. 2003).

Der Transport der Kanäle zur Zellmembran erfolgt entlang eines Strukturnetzwerks in der Zelle. Beispielsweise interagieren Kv4.2 Kanäle über eine prolinreiche Region am carboxyterminalen Ende mit dem Struktur- und Transportprotein Filamin (Birnbbaum et al. 2003). Möglicherweise führt die Bindung an Filamin zu einem verbesserten und schnelleren Transport der Kanäle durch die Zelle. Auch Bec-1 besitzt eine solche prolinreiche Region (AS 951-1057), welche in der Lage sein könnte, mit anderen funktionellen Domänen zu assoziieren, um somit möglicherweise einen effizienten Transport zur Zellmembran zu gewährleisten (Kay et al. 2000).

In Kv4.1 Kanälen sind sowohl der C- als auch der N-Terminus an der Regulation der Ionenströme, dem „Gating“, beteiligt. Mutationen von akzessorischen Proteinen können somit über eine Interaktion mit Kalium Kanälen (MiRP1, siehe Kapitel 3.3.2.) zu pathologischen Krankheitsbildern wie Long-QT Syndrom (L-QT) oder Epilepsie führen (Birnbbaum et al. 2003). Im C-Terminus mutierte HERG Kanäle sind alleine nicht in der Lage funktionelle tetramere Kalium Kanäle zu bilden, in Kombination mit Wildtyp Proteinen ist die Ausbildung von funktionsfähigen Kanälen jedoch möglich. Die so entstandenen Kanäle besitzen eine veränderte Funktion. Beispielsweise wurde die Mutation S818L bei Patienten mit L-QT Syndrom gefunden (Nakajima et al. 2000). Diese Veränderung zeigt, dass im Zusammenspiel mit akzessorischen Untereinheiten und/oder deren Mutation, die Funktion eines Kalium Kanals verändert werden kann. Möglicherweise könnte auch die Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 zu einem solchen Effekt führen (Kapitel 7.7.5.).

7.7.3. Bec-1 als möglicher zellulärer Rezeptor für HTLV-1 Env

Der Oberflächenanteil (SU) des HTLV-1 Env Proteins dient dem Virus zur Erkennung von Zielzellen, durch entsprechende Rezeptoren auf deren Oberfläche. Hierfür verwendet HTLV-

1 den Glucosetransporter GLUT1 (Manel et al. 2005). Als weitere mögliche Rezeptoren für HTLV-1 SU sind HSPGs nachgewiesen worden (Pinon et al. 2003, Jones et al. 2006, Kapitel 3.3.1.). Die Interaktion von Bec-1 mit HTLV-1 SU lässt auf den ersten Blick vermuten, dass Bec-1 ein weiterer möglicher Rezeptor für HTLV-1 auf Zielzellen ist. Zudem zeigte sich in Pulldownanalysen mit HTLV-1 TM, dass das transmembrane Protein von HTLV-1 auch eine Bindungsregion (AS 313-376) zu Bec-1 aufweist (Abb. 12). Die 63 amino-terminalen Aminosäuren des TM Proteins beinhalten eine glycinreiche Domäne (AS 327-339) und die Region des Fusionspeptids (AS 313-333). Das Fusionspeptid initiiert die Fusion des Virus mit der Zellmembran und stellt deshalb einen wichtigen Faktor für die Penetration von Retroviren in die Zielzelle dar. Daher lässt sich spekulieren, ob die Interaktion von HTLV-1 TM mit dem Bec-1 Kanal in die Virus-Zell-Fusion involviert sein könnte.

Durch die Untersuchung verschiedener T- und B-Zelllinien (Kapitel 6.7) zeigte sich, dass der Bec-1 Kanal in primären T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) sowie in den kultivierten T-Zelllinien (Jurkat, Tall und A3.01), jedoch nicht in B-Zellen exprimiert wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Bec-1 als Rezeptor für HTLV-1 fungieren könnte. Jedoch sollte bedacht werden, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete Anteil von Bec-1 am C-Terminus intrazytoplasmatisch liegt. Aufgrund dessen ist es praktisch ausgeschlossen, dass Bec-1 tatsächlich als extrazellulärer Rezeptor für HTLV-1 SU dient.

7.7.4. Die mögliche Beteiligung von Bec-1 bei der Freisetzung retroviraler Partikel

Da zu weiteren Prozessierungswegen von HTLV-1 SU nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum bislang keine Daten vorliegen, werden im Folgenden mögliche Hypothesen über eine Interaktion von HTLV-1 SU mit endogenen zellulären Proteinen anhand retroviraler Proteine anderer Retroviren exemplarisch besprochen. Möglicherweise lassen sich durch Studien anderer Retroviren Erkenntnisse gewinnen, die sich auf die Funktion von HTLV-1 SU übertragen lassen.

Das Assembly, der Zusammenbau infektiöser Partikel, wird bei fast allen Retroviren über die Proteine des Gag (gruppenspezifisches Antigen) Leserahmens gesteuert. Bei HIV ist das Matrix (MA) Protein in den Transport zur Plasmamembran der Wirtszelle involviert, das Kapsid Protein (CA) bewirkt wichtige Protein-Protein Interaktionen und das Nukleokapsid (NC) Protein bindet die virale RNA für den Zusammenbau von viralen Partikeln. Die Freisetzung der Viren erfolgt hauptsächlich in der Nähe von Zell-Zell Kontakten, wodurch

eine effektive *in vivo* Verbreitung des Virus ermöglicht wird (Igakura et al. 2003, Jolly et al. 2004, McDonald et al. 2003). Der zytoplasmatische Anteil des HIV-1 Env Proteins interagiert mit dem N-Terminus des Gag Proteins. Diese Interaktion erhöht lokal die Konzentration der Gag Proteine und führt somit möglicherweise zu einem effizienteren Zusammenbau der Viruspartikel (Baldwin et al. 1998). Die Interaktion von HIV-1 Gag mit Env bestimmt in bipolaren Zellen die Seite der Virusfreisetzung (Budding). Bei fehlender Env Expression wurden Viren auf allen Zellseiten freigesetzt, bei Coexpression von Gag und Env verließen die Viren die Zelle nur zur basolateralen Seite (Cimarelli et al. 2001). Da bei HTLV-1 die Zell zu Zellübertragung 100fach effektiver ist als die Infektion mit freien Viruspartikeln (Delamarre et al. 1996), könnte dieser Mechanismus ein wichtiger Bestandteil des Buddings von HTLV-1 sein, jedoch liegen bis heute keine genauen Erkenntnisse über den Mechanismus der Virusfreisetzung von HTLV-1 vor.

Eine andere Gattung der komplexen RNA-Retroviren sind Spumaviren (SV) (Lecellier et al. 2000). Die Formierung der Kapside von SV Viren erfolgt im Zytoplasma, wobei anschließend eine Fusion am rauen ER mit dem Env Protein stattfindet. Die Bindung der Gag-Proteine an SV Env erfolgt am Golgi Apparat über ein SV Leaderpeptid am aminoterminalen Ende von Env (Yu et al. 2006, Shaw et al. 2003). Die Envelope Proteine werden für die Freisetzung von Viruspartikeln benötigt, nicht jedoch für deren Zusammenstellung. Dies konnte durch eine Mutation des Env Proteins dargestellt werden, mit derer die intrazelluläre Partikelzahl unverändert blieb, die extrazelluläre Partikelfreisetzung jedoch stark abnahm (Baldwin et al. 1998). Man vermutet, dass die Env Proteine mit der zelleigenen Sekretionsmaschinerie interagieren um somit zur Zellmembran zu gelangen. HI-Viren interagieren mit dem zelleigenen Transportprotein Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101). Tsg101 bindet an zusammengefügte Viruskomplexe durch PTAP und Ubiquitin Bindungsdomänen und ist am retroviralen Budding beteiligt (Bukrinskaya 2004). Die Über- und Unterexpression von Tsg101 vermindert die Virusfreisetzung von HIV-1. Auch HTLV-1 Gag bindet an Tsg101 und ist involviert in den Transportprozess von Gag zur Zellmembran.

Eine intrazelluläre Interaktion stellt die Bindung von HTLV-1 TM über eine PDZ-Domäne an das zelleigene Protein hDlg (human Disc-large) dar, einem Protein, das vermehrt an neuronalen Synapsen und Zell-Zellkontakten vorkommt (Blot et al. 2004). HDlg besitzt zusätzlich eine prolinreiche Domäne, über die eine Bindung an die prolinreiche Region des Bec-1 Kanals ausgebildet werden könnte. Theoretisch bestünde somit die Möglichkeit, dass die Bindung von hDlg an HTLV-1 TM (SU ist über eine Disulfidbindung an TM gebunden)

als Mediator zwischen HTLV-1 SU und dem Bec-1 Kanal fungiert. Der Bec-1 Kanal könnte als möglicher Zielort für das Env Protein dienen, sodass die Bindung von SU an Bec-1 den Ort der Virusfreisetzung vorgibt. Bei spannungsgesteuerten Shaker Kanälen dient beispielsweise die PDZ Domäne am C-Terminus als Bindungsregion für andere Proteine mit PDZ Domäne (Doyle et al. 1996). In ähnlicher Weise könnte die C-terminale Region des Bec-1 Kanals als Bindungsdomäne für das retrovirale HTLV-1 SU Protein fungieren.

Studien an HERG (human ether-à-go-go-related gene) Kanälen lassen vermuten, dass der COOH-Terminus bedeutend für den Transport der Kanäle zur Zellmembran ist (Akhavan et al. 2003). Verkürzte Klone resultierten in einer verminderten Oberflächenexpression und einem vermehrten Rückhalt der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum. Auch bei den Kv1.4 Kanälen (spannungsgesteuerte Kalium Kanäle) ist der C-Terminus für die Oberflächenexpression obligat, hier bewirkte ein trunkierter Klon eine fehlende Expression des Kanals an der Zelloberfläche (Zhu et al. 2003). Durch Bindung des HTLV-1 SU Proteins an den C-Terminus des Bec-1 Kanals, könnte dieser möglicherweise als Transportprotein für das Env Protein zur Zellmembran dienen. Aufgrund der heutigen Datenlage lässt sich die Hypothese formulieren, dass die retroviralen Proteine von HTLV-1 SU die zelleigene Transportmaschinerie der Zielzellen verwenden um an die Zellmembran zum Budding zu gelangen.

Da die Interaktion von Bec-1 mit verschiedenen Retroviren (HIV, HERV-K, MSRV [Daten noch nicht veröffentlicht] und HTLV-1) nachgewiesen werden konnte, lässt sich spekulieren, inwieweit diese Theorie auf andere Retroviren zutrifft, vor allem aufgrund der Tatsache, dass, mit der Interaktion von HIV und Tsg101, schon zuvor eine Interaktion von retroviralen mit zelleigenen Proteinen beschrieben wurde, welche in die Virusfreisetzung involviert ist. Sollte sich diese Hypothese in weiteren Studien bestätigen, könnte sich die Interaktion von retroviralen SU Proteinen mit dem C-Terminus des Bec-1 Kanals als biologisch wichtige Funktion für das Budding Retroviren und damit auch die Viruspartikelexpansion herausstellen.

7.7.5. Kalium Kanäle und deren Interaktion mit anderen retroviralen Proteinen

Bisher sind nur wenige Interaktionen von Kalium Kanälen und anderen zellulären Proteinen beschrieben worden, sowie nur ein Beispiel für die Interaktion von Kalium Kanälen mit

retroviralen Proteinen. Im Folgenden sollen diese Modelle als Grundlage für weitere Hypothesen über die Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 verwendet werden.

Spannungsgesteuerte HERG Kanäle sind in der Lage durch Interaktion mit anderen zellulären Proteinen funktionelle Kanäle zu bilden. Das minK Protein steigert die Anzahl der aktiven Kalium Kanäle auf der Zelloberfläche, nicht jedoch deren Gesamtzahl. Die Interaktion von MiRP1 mit HERG Kanälen trägt zur Entstehung von funktionellen Kanälen bei (minK und MiRP1, siehe Kapitel 3.3.2.) Eine Assoziation von Kalium Kanälen ist auch im Zusammenhang mit retroviralen HIV Proteinen beobachtet worden. Das akzessorische Virusprotein Vpu bindet an den zellulären Kalium Kanal TASK-1 (Hsu et al. 2004). Vpu ist ein Klasse I integrales Membranprotein (wie auch HTLV-1 TM) und besitzt sowohl eine N-terminale hydrophobe Domäne, welche als Anker in der Zellmembran dient, einen hydrophilen C-Terminus mit katalytischer Aktivität und eine extrazelluläre Region (Tiganos et al. 1998). Der N-Terminus wird in Verbindung gebracht mit der Virusfreisetzung aus der Wirtszelle, der C-Terminus bewirkt eine Degradierung von CD4⁺ Proteinen durch Phosphorylierung im Endoplasmatischen Retikulum. Studien von Schubert et al. (1996) zeigten jedoch, dass beide Domänen an beiden Funktionen von Vpu beteiligt sind. Man vermutet, dass Vpu in der Lage ist, in die Membran zu integrieren und Ionenkanäle zu formen (Schubert et al. 1996), allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass Vpu durch Modulation endogener Ionenkanäle deren Leitfähigkeit verändern kann (Lamb und Pinto, 1997). Studien von Hsu et al. (2004) bestätigten, dass HIV-1 Vpu an den zelleigenen Kalium Kanal TASK-1 bindet. TASK-1 ist ein pH-sensitiver Kanal, der zum Ruhemembranpotential beiträgt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen Vpu und TASK-1 (24%) ist zu vermuten, dass das virale Protein durch „Molekulare Piraterie“ während der retroviralen Evolution von Wirtsgenen ins virale Genom übertragen wurde. Die Interaktion zwischen Vpu und TASK-1 erfolgt am N-Terminus von TASK-1. Vpu agiert vermutlich in Form einer Alpha Untereinheit der Kalium Kanäle, ähnlich der Interaktion zwischen MiRP1 und HERG (Kapitel 3.3.2.). Die Bindung solcher Untereinheiten kann zur Modifikation der eigentlichen Kanalfunktionen führen (Abbott et al. 1998, Sesti et al. 2000). HEK-293 (human embryonal kidney) Zellen exprimieren den TASK-1 Kanal und zeigen auf Stimulation einen Ba²⁺ sensitiven, TEA⁺ insensitiven Auswärtstrom. Die Koexpression von TASK-1 und Vpu führt jedoch zum Erlöschen des Auswärtstroms. Umgekehrt führt die Überexpression von TASK-1 in Hela Zellen zu einer um das zwei bis dreifach verminderten Freisetzung von HIV-Partikeln (Hsu et al. 2004). Vpu und TASK-1 sind in der Lage, durch Interaktion Heterooligomere zu bilden. Aufgrund dieser Bindung wird vermutlich die Funktion von

TASK-1 und Vpu in gleicher Weise beeinträchtigt. HIV-1 ist das einzige Retrovirus, das Vpu exprimieren kann, jedoch ist die Funktion von Vpu nicht HIV-1 spezifisch. Das Protein ist in der Lage bei verschiedenen anderen Retroviren, die selbst kein Vpu oder ähnliche akzessorische Proteine exprimieren, die Menge an freigesetzten Viruspartikeln effizient zu erhöhen (Göttlinger et al. 1993).

Möglicherweise ist die Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 vergleichbar mit der Bindung von Vpu an TASK-1. Das SU Protein könnte als Untereinheit von Bec-1 fungieren und durch die Bindung die Leitfähigkeit des Kanals verändern. Vpu bindet an das aminoterminal Ende von TASK-1, HTLV-1 SU jedoch an den C-Terminus von Bec-1. Dieser wird bei spannungsgesteuerten Kalium Kanälen mit dem „Gating“, dem Öffnen und Schließen der Kanalpore in Verbindung gebracht (Yellen 2002). Die spannungsgesteuerten Shaker Kanäle weisen eine Calmodulin Bindungsdomäne am C-Terminus auf. Die Bindung von Ca^{2+} Ionen führt durch Dimerisierung zu einer Konformationsänderung, die das Öffnen der Kanalpore bewirkt (Yellen 2002). Bei bakteriellen MthK Kalium Kanälen bewirkt die Dissoziation von Ca^{2+} von der Sensordomäne den Verschluss des Kanals durch Rotation der C-Termini. Aufgrund dieser Beispiele liegt die Vermutung nahe, dass auch die Bindung von HTLV-1 SU an den C-Terminus des Bec-1 Kalium Kanal eine Veränderung der Ionenflussraten des Kanals bewirken könnte.

Um mögliche funktionelle Effekte der Interaktion retroviraler Envelope Proteine mit dem Bec-1 Kanal nachzuweisen, sind Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Hoth geplant, um unter anderem mittels Patch clamp Technik Bec-1 transfizierte Zellen auf Veränderungen der Ionenflussraten zu untersuchen.

7.7.6. Mögliche Effekte der Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 auf die Calciumhomöostase

Die Interaktion von Ca^{2+} mit der Calmodulin Bindungsdomäne am C-Terminus von Shaker Kanälen oder der Bindung von Ca^{2+} an MthK Kanälen (Kapitel 7.7.5.) sind Beispiele für die Regulierung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle über deren C-Terminus. Bei beiden Kanälen erfolgt die Öffnung der Pore durch Bindung von Calciumionen. Möglicherweise führt auch die Interaktion von HTLV-1 SU mit dem C-terminalen Ende von Bec-1 zu einer Öffnung des Kalium Kanals. Hierbei fließen K^+ Ionen über die Zellmembran nach außen und das Ruhemembranpotential, das bei ungefähr -91 mV liegt, wird negativer. Dies lässt vermuten, dass zum Ausgleich dieser Hyperpolarisation reflektorisch Calcium aus dem

Interstitium, entlang seines Konzentrationsgradienten, in die Zelle einströmen könnte. Ca^{2+} Ionen sind in viele Signaltransduktionswege involviert und die regulatorischen Eigenschaften der Calciumhomöostase sind auch deshalb Angriffspunkte vieler Retroviren (Quintana et al. 2005).

In T-Zellen wird über die Bindung von antigenpräsentierenden Zellen an den T-Zellrezeptor das Protein Inositoltriphosphat (IP_3) freigesetzt. Dieses bewirkt wiederum den Ausstrom von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Eine solche Calciumfreisetzung führt zu einem Ca^{2+} Einstrom aus dem Extrazellulärraum über „ Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} -channels“ (CRAC) Kanäle. Der CRAC-vermittelte Ca^{2+} Einstrom bewirkt eine vermehrte Expression des „nuclear factor of activated cells“ (NFAT) einem wichtigen Transkriptionsfaktor in T-Zellen und somit eine T-Zellaktivierung. Umgekehrt führt ein verminderter Einstrom zu einer reduzierten T-Zellaktivität (Quintana et al. 2005).

Das HIV Protein Nef sowie das akzessorische HTLV-1 Protein p12 sind in der Lage, über den CRAC-vermittelten Ca^{2+} Einstrom und die folgende NFAT Induktion, T-Zellen zu aktivieren. Die Hochregulation von NFAT korreliert stark mit der Fähigkeit von HIV in Zellen zu replizieren und diese zu infizieren. Dadurch wird eine persistierende virale Infektion begünstigt (Quintana et al. 2005). Falls die Interaktion von HTLV-1 SU und Bec-1 Auswirkungen auf zelluläre Ionenströme haben sollte, lässt sich spekulieren, dass ein vermehrter Calciumeinstrom nach Hyperpolarisation der Zelle, durch Öffnung von Bec-1, synergistisch mit dem Calcium Einstrom durch CRAC wirken könnte und somit zu einer verstärkten T-Zell Aktivierung führt.

Die Mechanismen, über die Retroviren die Ca^{2+} Konzentration in Zellen regulieren, sind vielfältig und auch die Effekte, die dadurch bewirkt werden reichen von T-Zell Aktivierung, Apoptose bis hin zu verstärkter viraler Replikation (Chami et al. 2006). Möglicherweise führt die Bindung von HTLV-1 SU an Bec-1 über die Hyperpolarisation der infizierten Zellen zu einem vermehrten Calciumeinstrom, welcher Signaltransduktionswege der Zelle und den Effekt des CRAC-vermittelten Ca^{2+} Einstroms beeinflussen oder verstärken könnte und damit zur T-Zellaktivierung führt.

7.8. Konklusion

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe unterschiedlicher Untersuchungsmethoden eine *in vitro* und *in vivo* Interaktion des Env Proteins des exogenen Retrovirus HTLV-1 mit dem

spannungsgesteuerten Kaliumkanal Bec-1 nachgewiesen werden. Welche funktionellen Auswirkungen die Bindung von HTLV-1 SU an Bec-1 auf die infizierte Wirtszelle hat, ist aktuell ungeklärt. Nachdem eine Bindung von Bec-1 an Env Proteine unterschiedlicher endogener und exogener Retroviren (HERV-W, HERV-K, HIV [AG Müller-Lantzsch] und HTLV-1) nachgewiesen werden konnte, scheint es sich um eine evolutionär konservierte Interaktion zu handeln, was auf einen Selektionsvorteil und eine möglicherweise wichtige biologische Rolle dieser Interaktion während des retroviralen Replikationszyklus schließen lässt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden somit die Grundlage für weitere Untersuchungen retroviraler Interaktionen mit der Wirtszelle und können möglicherweise in Zukunft Anhaltspunkte für neue antiretrovirale Therapiekonzepte schaffen.

8. Literaturverzeichnis

Abbott, G., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M., Lehmann, M., Timothy, K., Keating, M., Goldstein, S. (1999): MiRP1 Forms I_{KR} Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. *Cell*, 97: 175-187

Aggarwal SK, MacKinnon R (1996): Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K^+ channel. *Neuron*.;16(6): 1169-77

Akhavan, A., Atanasiu, R., Shriers, A. (2003): Identification of a COOH-terminal Segment Involved in Maturation and Stability of Human Ether-à-go-go- related Gene Potassium Channels. *J. Biol. Chem.* 278: 40105-40112

Argyris EG, Acheampong E, Nunnari G, Mukhtar M, Williams KJ, Pomerantz RJ. (2003): Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J Virol*.;77(22): 12140-51.

Armstrong CM. (1971): Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol*.;58(4): 413-37

Baldwin, D., Linial, M. (1998): The Roles of Pol and Env in the Assembly Pathway of Human Foamy Virus. *J. Virol.* 1998: 3658-3665

Barmak, K., Harhaj, E., Grant, C., Alefantis, T., Wigdahl, B. (2002): Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology* 308 (2003) 1-12

Birnbaum, S., Varga, A., Yuan, A., Anderson, A., Sweatt, J., Schrader, L. (2004): Structure and Function of Kv4-Family Transient Potassium Channels. *Physiol. Rev.* 84: 803-833

Blot, V., Delamarre, L., Perugi, F., Pham, D., Benichou, S., Benarous, R., Hanada, T., Chrishti, A., Dokhelar, M., Pique, C. (2004): Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope cell-cell fusion in T Lymphocytes. *J. of Cell Science* 117: 3983-3993

Blot, V., Perugi, F., Gay, B., Prevost, M., Briant, L., Tangy, F., Abriel, H., Staub, o., Kokhelar, M., Pique, C. (2004): Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J. Cell Sci.* 117: 2357-2367

- Bobardt MD**, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G, Galloway PA. (2004): Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J Virol.*;78(12): 6567-84
- 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(2): 75-93.
- Bukrinskaya, A.** (2004): HIV-1 assembly and maturation. *Arch. Virol.* 149: 1067-1082
- 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.
- Cann, A. J. a. C.**, I.S.Y. (1996) *Fields Virology* Fields, B.N. e.a., (Ed.), Lippincott-Raven, pp. 1849-1879
- Chaconas G**, van de Sande JH. (1980): 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.*;65(1): 75-85.
- Chakrapani, S.** Perozo, E. (2007): How to gate an ion channel: lessons from MthK. *Nature structural & molecular biology* Vol. 14 No. 3.
- Chami, M.**, Oules, B., Paterlini-Brechot (2006): Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. *Biochemica et Biophysica Acta* 1763: 1344-1362
- Cimarelli, A.**, Darlix, J. (2002): Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1166-1184
- Coscun, A.**, Sutton, R., (2005): Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-Cell Leukemia Virus envelope-mediated fusion. *J. Virol.* 79: 4150-4158
- Cullen, BR.** (2003): Nuclear RNA Export. *J. of Cell Science* 116, 587-597
- Curran M. E.**, Splawski, I., Timothy, K., Vincent, G., Green, E., Keating, M. (1995): Molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT-Syndrome. *Cell* 80, 795-803
- Delamarre, L.**, Pique, C., Pham, D., Tursz, T., Dokhelar, M. (1994): Identification of Functional Region in the Human T-Cell Leukemia Virus Type I SU Glycoprotein. *J. Virol.* 1994: 3544-3549
- Delamarre, L.**, Rosenberg, A. R., Pique, C., Pham, D., Dokhelar, M. (1997): A Novel Human T-Leukemia Virus Type 1 Cell-to-Cell Transmission Assay Permits Definition fo SU Glycoprotein Amino Acids Important for Infectivity. *J. Virol.* 1997: 259-266

- Delamarre, L.**, Pique, C., Rosenberg, A. R., Blot, V., Grange, M., Le Blanc, I., Dokhelar, M. (1999): The Y-S-L-I Tyrosine-Based Motif in the Cytoplasmic Domain of the Human T-Cell Leukemia Virus Type-1 Envelope Is Essential for Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* 1999: 9659-9663
- Delisle, B.**, Anson, B., Rajamani, S., January, C. (2004): Biology of Cardiac Arrhythmias, Ion Channel Protein Trafficking. *Circ. Res.* 94: 1418-1428
- Doyle, D.**, Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., MacKinnon, R. (1996): Crystal Structures of a complexed and Peptide-Free Membrane Protein-Binding Domain: Molecular Basis of Peptide Recognition. *Cell* 85: 1067-1076
- Dugaiczyk A.**, Boyer HW, Goodman HM. (1975): Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol.* 25;96(1): 171-84.
- Einfeld, D.**, Hunter, E. (1997): Mutational Analysis of the Oligomer Assembly Domain in the Transmembrane Subunit of the Rous Sarcoma Virus Glycoprotein. *J. Virol.* 1997: 2383-2389
- 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
- Folks TM.**, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS(1989): Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;86(7):2365-8
- Furukawa Y.**, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M.(2001): Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia *Blood.* Feb 15;97(4): 987-93
- Gallo, R. C.** (2005): History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 2005, 24: 5926-5930
- Garcia, J.**, Ma, S. (2005): Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. *Crit. Care Med.* 2005 Vol. 33, No. 12
- Gessain, A.**, Boeri, E., Yanagihara, R., Gall, R., Franchini, G. (1993): Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) variant from melanesian: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strain from other geographical regions. *J. Virol.* 67, 1015-1023
- Giepmans, B.**, Adams, S., Ellisman, M., Tsien, R. (2006): The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* Vol. 312

- Gluzman Y.** (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*;23(1):175-82
- 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 USA*. 1;90(15): 7381-5
- Graham FL,** van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*;52(2): 456-67.
- Grant C,** Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. (2002): Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol*;190(2): 133-59.
- Halfter H,** Kremerskothen J, Weber J, Hacker-Klom U, Barnekow A, Ringelstein EB, Stögbauer F.J *Neurooncol.* (1998): Growth inhibition of newly established human glioma cell lines by leukemia inhibitory factor;39(1):1-18
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 5;166(4): 557-80.
- Heyderman, E.** (1997): Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods and controls. *J. of Clin. Path.* 32: 971-978
- Hinuma Y.,** Nagat, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S., Miyoshi, I. (1981): Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.78: 6476-6480
- Holmes DS,** Quigley M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* Jun;114(1):193-7
- Hsu, K.,** Seharasyon, J., Dong, P., Bour, S., Marban, E. (2004): Mutual Functional Destruction of HIV-1 Vpu and Host TASK-1 Channel. *Molecular Cell* 14: 259-267
- Igakura, T.,** Stinchcombe, J., Goon, P., Taylor, G., Weber, J. (2003): Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713-1716
- Ina Y, Gojobori T.** (1990): Molecular evolution of human T-cell leukemia virus. *J Mol Evol*;31(6) :493-9
- Johnson, J.,** Harrod, R., Franchini, G. (2001): Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. Exp. Path* 2001, 82: 135-147

- Jolly, C.**, Kashefi, K., Hollinshead, M., Sattentau, Q. (2004): HIV-1 cell to cell transfer across an env-induced, actin- dependent synapse. *J. Exp. Med.* 199: 283-293
- Jones K.**, Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D., Huang, Y., Ruscetti, F (2005): Heparan Sulfate Proroteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virion into CD4⁺ Cells. *J. Virol.* 2005: 12692-12702
- Jones K.**, Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D., Lisinsk, I., Cushman, W., Jacobsen, S., Ruscetti, F. (2006): Human T-Cell Leukemia Virus Typ 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Use Different Receptor Complexes To Enter T Cells. *J. Virol.* 2006: 8291-8302
- Kalyanaraman VS**, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC (1982): A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 5;218(4572): 571-3.
- Kannagi M**, Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Hasegawa A, Masuda T, Yoshiki T. (2000): Immunological aspects of rat models of HTLV type 1-infected T lymphoproliferative disease. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1;16(16):1737-40.
- Kay, B.**, Williamson, M., Sudol, M. (2000): The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14: 231-241
- Klein G**, Clifford P, Klein E, Smith RT, Minowada J, Kourilsky FM, Burchenal JH. (1967): Membrane immunofluorescence reactions of Burkitt lymphoma cells from biopsy specimens and tissue cultures. *J Natl Cancer Inst.*; 39(5):1027-44
- Komuro A.**, Watanabe T., Miyoschi I., Hayami M., Tsujimoto H., Seiki M., Yoshida M. (1984): Detection and characterisation of simian retroviruses homologous to human T-cell leukaemia virus type I. *Virology* 138, 373-378
- Kondo T**, Kono H, Nonaka H, Miyamoto N, Yoshida R, Bando F, Inoue H, Miyoshi I, Hinuma Y, Hanaoka M. (1987): Risk of adult T-cell leukaemia/lymphoma in HTLV-I carriers. *Lancet.* 18;2 (8551):159.
- Koyanagi Y**, Kobayashi S, Harada S, Kikukawa R, Yamamoto N, Watanabe K, Okino F, Kajii T. (1983-1984): Detection of antibodies to human T-lymphotropic viruses type I and III in Japanese hemophiliacs. *AIDS Res.*;1(5): 353-8.
- Laemmli UK.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15;227(5259): 680-5.
- 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.* 3;229(1):1-11.

- Lecellier, C.**, Saib, A. (2000): Foamy Viruses: Between Retroviruses and Pararetroviruses. *Virology* 271: 1-8
- Lederberg EM**, Cohen SN (1974): Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.*;119(3): 1072-4
- Lenoir GM**, Vuillaume M, Bonnardel C. (1985): The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ.*;(60):309-18
- Miller G,
- Lipman M.** (1973): Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *J Exp Med.* Dec 1;138(6):1398-412
- Manel, N.**, Battini, J., Taylor, N., Sitbon, M. (2005): HTLV-1 tropism an envelope receptor. *Oncogene* 24: 6016-6025
- McDonald, T.**, Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M., Wang, K., Goldstein, S., Fishman, G. (1997): A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{KR} . *Nature* Vol. 388
- McDonald, D.**, Wu, L., Bohks, S., Kewal-Ramani, V., Unutmaz, D., Hope, T. (2003): Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T junctions. *Science* 300: 1295-1297
- 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. of Biol. Chem.* 274: 25018-25025
- Mosmann T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16;65(1-2):55-63
- Murphy, E. L.**, Figueroa, J.P., Gibbs, W., Brathwaite, A., Holding-Cobham, M., Waters, D., Cranston, B., Hanchard, B., Blattner, W. (1989): Sexuell transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 111, 555-560
- Nakajima, T.**, Kurabayashi, M., Ohyama, Y., Kaneko, Y., Furukawa, T., Itoh, T., Taniguchi, Y., Tanaka, T., Nakamura, T., Hiraoka, M., Nagai R. (2000): Characterization of S818L mutation in HERG C-termiuns in LQT2. *FEBS Letters* 481: 197-203
- Okuma K**, Dalton KP, Buonocore L, Ramsburg E, Rose JK. (2003): Development of a novel surrogate virus for human T-cell leukemia virus type 1: inhibition of infection by osteoprotegerin. *J Virol.*;77(15): 8562-9
- Papazian, D.** (1999): Potassium Channels: Some Assembly Required. *Neuron*, Vol. 23: 7-10

- Pinon, J.**, Klasse, P., Jassal, S., Welson, S., Weber, J., Brighty, D., Sattenau, Q. (2003): Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp46 Interacts with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Virol.* 2003: 9922-9930
- Pique, C.**, Pham, D., Tursz, T., Doklehar, M. (1992): Human T-Cell Leukemia Virus Type I Envelope Protein Maturation Process: Requirements for Syncytium Formation. *J. Virol. Fe.* 1992: 906-913
- Pique, C.**, Tursz, T., Dokhelar, M. (1993): The Cytoplasmic Domain of the Human T-Cell Leukemia Virus Type I Envelope Can Modulate Envelope Functions in a Cell Type-Dependent Manner. *J. Virol.* 1993: 557-561
- Poiesz BJ**, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77(12): 7415-9.
- Pulvertaft** (1964): Cytology of burkitts tumor (African Lymphoma). *Lancet* 1;1:238-40
- Pulvertaft JV.** (1965): A study of malignant tumors in Nigeria by short-term tissue culture. *J Clin Pathol.*; 18:261-73
- Quintana, A.**, Griesemer, D., Schwarz, E., Hoth, M. (2004): Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Eur J Physio* 450: 1-12
- 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.* 29;239(4839): 487-91
- Saksena NK**, Sherman MP, Yanagihara R, Dube DK, Poiesz BJ. (1992): LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. *Virology.*;189(1):1-9.
- Santoli D**, O'Connor R, Cesano A, Phillips P, Colt TL, Lange B, Clark SC, Rovera G. (1990): Synergistic and antagonistic effects of IL-1 alpha and IL-4, respectively, on the IL-2-dependent growth of a T cell receptor-gamma delta+ human T leukemia cell line. *J Immunol.* 15;144(12):4703-11
- 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
- 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.* 15;19(5):621-6

- Schubert, U.**, Bour, S., Ferrer-Montiel, A., Montal, M., Malarelli, F., Strebel, K. (1996): The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J. Virol.* 70: 809-819
- Schubert, U.**, Ferrer-Montiel, A., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K., Montal, M. (1996): Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-infected cell. *FEBS Letters* 398: 12-18
- Schultheis, C.**, Nagaya, N., Papazian, D. (1996): Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric shaker K⁺ channels. *Biochemistry* 35: 12133-12140
- Seoh SA**, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. (1996): Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*;16(6): 1159-67
- Sesti F**, Tai KK, Goldstein SA (2000): MinK endows the I(Ks) potassium channel pore with sensitivity to internal tetraethylammonium. *Biophys J*;79(3): 1369-78
- 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
- Shaw, K.**, Lindemann, D., Mulligan, M., Goepfert, P. (2003): Foamy Virus Envelope Glycoprotein Is Sufficient for Particle Budding and Release. *J. Virol.* 2003: 2338-2348
- Shuh, M.**, Beilke, M. (2005): The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1): New Insights into the Clinical Aspects and Molecular Pathogenesis of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (TSP/HAM). *Microscopy Res. and Technique* 2005, 68: 176-196
- Smith, G.**, Tsui, H., Newell, E., Jian, X., Zhu, X., Tsui, F., Schlichter, L. (2002): Functional Up-regulation of HERG K⁺ Channels in Neoplastic Hematopoietic Cells. *J. of Biol. Chem.* 277: 18528-18534
- Studier FW**, Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 5; 189(1):113-30
- Swanson, C.**, Malim, M. (2006): Retrovirus RNA Trafficking: From Chromatin to Invasive Genomes. *Traffic* 2006,7: 1440-1450
- Tiganos, E.**, Friberg, J., Allain, B., Daniel, N., Yao, X., Cohen, E. (1998): Structural and Functional Analysis of the Membran-Spanning Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein. *Virology* 251: 96-107

- Tiwari V**, Clement C, Duncan MB, Chen J, Liu J, Shukla D (2004): A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.*;85(Pt 4): 805-9
- 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
- Weiss, R. A.** (2006): The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 2006, 3: 67
- Wilks RJ**, LaGrenade L, Hanchard B, Campbell M, Murphy J, Cranston B, Blattner WA, Manns A. (1993): Sibling adult T-cell leukemia/lymphoma and clustering of human T-cell lymphotropic virus type I infection in a Jamaican family *Cancer.* 1;72(9): 2700-4
- Wilson, K.**, Bär, S., Maerz, A., Alizon, M., Pombourios, P. (2005): The Conserved Glycine-Rich Segment Linking the N-Terminal Fusion Peptide to the Coiled Coil of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transmembrane Glycoprotein gp21 Is a Determinant of Membrane Fusion Function. *J. Virol.* 2005: 4533-4539
- Yamaguchi K**, Nishimura H, Kawano F, Kohrogi H, Jono M, Miyamoto Y, Takatsuki K. (1983): A proposal for smoldering adult T-cell leukemia--diversity in clinical pictures of adult T-cell leukemia. *Jpn J Clin Oncol.*;13 Suppl 2:189-99
- Yamaguchi K**, Yoshioka R, Kiyokawa T, Seiki M, Yoshida M, Takatsuki K. (1986): Lymphoma type adult T-cell leukemia--a clinicopathologic study of HTLV related T-cell type malignant lymphoma. *Hematol Oncol.*;4(1):59-65.
- Yellen, G.** (2002): The voltage gated potassium channels and their relatives. *Nature* Vol. 419 2002
- Yu, S.**, Eastman, S., Linial, M. (2006): Foamy Virus Capsid Assembly Occurs at a Pericentriolar Region Through a Cytoplasmic Targetion/Retention Signal in Gag. *Traffic*, 7: 966-977
- Zhu, J.**, Watanabe, I., Gomez, B., Thornhill, W. (2003): Trafficking of Kv1.4 potassium channels: interdependence of a pore region determinant and a cytoplasmic C-terminal VXXSL determinant in regulation cell-surface trafficking. *Biochem.* 375: 761-768
- Zou, A.**, Lin, Z., Humble, M., Creech, C., Wagoner, P., Krafte, T., Jegla, J., Wickenden, A. (2003): Distribution and functional properties of human KCNH8 (Elk1) potassium channels. *AJP-Cell Physiology* 285: C1356-1366

9. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Klemens Ruprecht, Pearl van Heteren, Michael Glas, Madeleine Herrmann, Marlies Sauter, Barbara Best, Lars Kästner, Klaus Roemer, Nikolaus Mueller-Lantzsch (2007): „Interaction of exogenous and endogenous retroviral envelope proteins with the potassium channel Bect-1”. Third European Congress of Virology, Nürnberg 2007 (Poster)

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Virologischen Institut der Universität des Saarlandes in der molekularbiologischen Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Müller-Lantzsch durchgeführt. Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Müller-Lantzsch möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken. Zudem gab er mir die Möglichkeit, nähere Einblicke in die Welt der wissenschaftlichen Forschung und des molekularbiologischen Arbeitens zu erlangen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Klemens Ruprecht, der mit seiner Begeisterungsfähigkeit und neuen Ideen den Laboralltag immer wieder abwechslungsreich gestaltete. Dank seiner warmherzigen Art verstand er es, selbst bei fehlgeschlagenen Experimenten positive Schlüsse zu ziehen. Er hatte immer ein offenes Ohr für Probleme und konnte mich selbst in schwierigen Situationen motivieren. Durch seine fachliche Kompetenz und seine kritischen Rückfragen trug er wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Marlies Sauter für die interessanten und anregenden Hilfestellungen bedanken. Sie war für dieses Projekt ein wichtiger Ansprechpartner.

Den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe HERV-K gilt mein Dank, da sie mich in molekularbiologische Arbeitsweisen eingeführt haben und oft mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Freund Michael Glas, der mir immer zur Seite stand, selbst wenn Computer und Technik mich manchmal verzweifeln ließen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Eltern bedanken. Mit großem Interesse haben sie diese Doktorarbeit und mein Studium begleitet und verstanden es, mich in schwierigen Zeiten stets aufzumuntern. Durch ihre finanzielle Unterstützung haben Sie mir das Medizinstudium und damit auch die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

11. Lebenslauf

Name	Pearl Sabrina van Heteren
Adresse	Volhardstraße 1 66424 Homburg
Geburtsdatum	24.09.1982
Geburtsort	Bad Kreuznach
Familie	Jürgen van Heteren, Realschullehrer Gudrun van Heteren, geb. Kehrein, Realschullehrerin Maditta van Heteren, Schwester, Studentin
Familienstand	ledig
Schullaufbahn	Staatliche Grundschule 1989 –1993 Emanuel-Felke-Gymnasium 1993 –2002 Abitur März 2002
Studium	Studium der Humanmedizin Beginn Wintersemester 2002/2003 in Homburg/Saar 1. Ärztliche Prüfung im August/September 2004
Famulaturen	Chirurgie 03/2005 Innere Medizin-Kardiologie 03/2006 Anästhesie 03/2007 Innere Medizin-Intensiv Medizin 09/2007
Promotionsarbeit	ganztägige Labortätigkeit von 07/2006 bis 02/2007
Studentische Aktivitäten	Mitglied des Fachbereichsrats 4 und des Fakultätsrats seit September 2006 Tutorium der Anatomie WS 2004/2005, WS 2007/2008