

1 EINLEITUNG

1.1 Viren

1892 konnte zum ersten Mal von Dimitri I. Iwanowski gezeigt werden, dass die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze durch ein Virus- also etwas, das kleiner war als Bakterien- verursacht wird. Zuvor glaubte man, dass die Ursache aller Krankheiten im Gift lag. Der erste Nachweis eines solchen Virus gelang Friedrich Loeffler und Paul Frosch 1898 mit der Entdeckung des Maul- und Klauenseuche- Virus. Jedoch war der Gedanke der Impfung schon viele Jahre früher in den Köpfen der Menschen, als man vor etwa 3000 Jahren den getrockneten Schorf von Pocken auf noch nicht erkrankte Menschen übertrug und diese damit „immun“ wurden (Modrow et al., 2003).

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, die weder proteinproduzierende Strukturen (Ribosomen) besitzen noch einen energieregenerierenden Mechanismus. Außerhalb einer Zelle sind sie nicht in der Lage, sich durch Teilung wie z.B. Bakterien zu vermehren. Sobald sich aber das Virus oder die virale Nukleinsäure Zutritt in eine lebende Zelle verschafft hat, erfolgt dessen Replikation. Im Laufe der Evolution haben Viren unterschiedliche Strategien entwickelt, die Wirtszelle zu infizieren und deren Proteinsynthese und Replikationszyklus zu nutzen. Sie sind in der Lage, zelluläre Prozesse umzusteuern und so für den optimalen Ablauf ihrer Vermehrung zu modifizieren.

Die Virionen, wie die Viruspartikel auch genannt werden, bestehen aus Proteinen, die bei einigen Virustypen von einer Lipidmembran, dem Envelope, umgeben sind. Viren besitzen als genetisches Material entweder RNA oder DNA, welches von einem Protein-Kapsid umgeben ist. Die Nukleinsäure kann linear, ringförmig oder segmentiert sein. Die Kapside und auch die Nukleokapside sind sphärische oder stäbchenförmige Gebilde. Neben der Erbinformation für die Strukturkomponenten, besitzen Viren Gene für regulatorisch aktive Proteine und Enzyme.

Viren können in verschiedene Familien eingeteilt werden. Diese Einteilung erfolgt nach ihrem Genom (RNA oder DNA), außerdem nach der Form wie es vorliegt (einzel- oder doppelsträngig). Die weitere Einteilung erfolgt aufgrund der Symmetrie der Kapside und des Vorhandenseins einer Membranhülle.

Je nach Virustyp hat die Infektion für die Wirtszelle unterschiedliche Folgen: Die Wirtszelle stirbt nach der Infektion, sie wird chronisch infiziert und produziert damit kontinuierlich geringe Mengen an Viren oder bei einer latenten Infektion ist die Expression von viralen Proteinen über längere Zeit unterdrückt, z.B. Retroviren.

1.2 Retroviren

Schon vor Entdeckung des ersten humanen Retrovirus (Poiesz et al., 1980) wurde den Retroviren eine Menge Beachtung geschenkt, jedoch haben sie eine lange Geschichte. Als 1908 Ellermann und Bang die Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate übertragen hatten und 1911 Peyton Rous mit ultrafiltrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen konnte, wurden die Retroviren zum ersten Mal beschrieben (Ellermann und Bang, 1908; Rous, 1911). Heute, 72 Jahre nachdem das *MMTV (Maus-Mammatumor-Virus)* von John Bittner entdeckt wurde (Bittner, 1936), spielen die Retroviren besonders für die biologisch/medizinische Forschung eine wichtige Rolle. MMTV kann nicht nur als infektiöses, von der Zelle freigesetztes, exogenes Partikel übertragen werden (horizontale Übertragung), sondern auch als endogener Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration (vertikale Übertragung) (Modrow et al., 2003).

Mit der Isolation weiterer solcher Viren bei Säugetieren in den darauf folgenden Jahren und der Beschreibung von Onkogenen, die eine bedeutende Rolle in der zellulären Signaltransduktion und der Tumorentstehung spielen, wurden die Grundlagen für die heutige Tumorforschung geschaffen (Huebner und Todaro, 1969).

Nachdem 1980 Robert C. Gallo das HTLV (Humanes T-Zell-Leukämie-Virus) und die damit assoziierte T-Zell-Leukämie beschrieben hatte, begann ein großer Forschungsdrang (Poiesz et al., 1980). In den folgenden Jahren konnten die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert Gallo die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS identifizieren (Popovic et al., 1984; Barré-Sinoussi et al., 1983). Diese humanpathogenen Viren wie HIV und HTLV-1 gehören heute zu den am besten untersuchten, wobei auch viele Einzelheiten der Molekularbiologie und der Pathogenese retroviraler Infektionen bekannt ist. Da HIV mit schweren Krankheitsbildern und Tod einhergeht, besteht ein natürliches Bestreben, Näheres über den viralen Lebensweg und den Lebenszyklus zu erfahren, um auf dem Feld der Therapie weiter voranzukommen. Darüber hinaus sind die nicht zytopathogenen Retroviren, die eine stabile Virusform ins Wirtsgenom einbauen, für die Erforschung der Evolution des menschlichen Genoms sehr interessant.

1.2.1 Klassifikation der Retroviren

Zunächst wird ein Überblick über die wichtigsten Vertreter der Retroviridae gegeben. Des Weiteren werden der morphologische und genomische Aufbau eines Retrovirus am Beispiel des humanen Immundefizienzvirus (HIV) sowie die charakteristischen Eigenschaften dieser Virusfamilie erläutert.

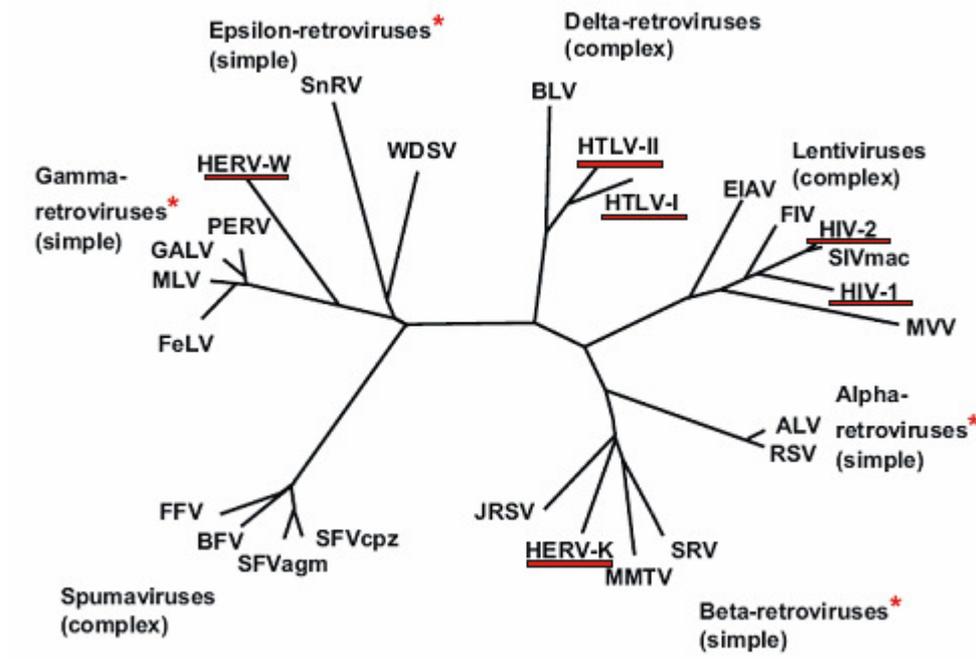


Abb. 1.1 Phylogenetische Einteilung der Retroviren (Weiss, 2006). Endogene Retroviren sind mit einem Stern gekennzeichnet (ALV=Avian Leukemia Virus, RSV= Rous sarcoma virus, SRV= simian retrovirus, MMTV= mouse mammary tumor virus, HERV-K= human endogenous retrovirus K, JRSV= Jaagsiekte sheep retrovirus, FeLV= feline leukemia virus, MLV= murine leukemia virus, GALV= gibbon ape leukemia virus, PERV= Porcine endogenous retrovirus, HERV-W= Human endogenous retrovirus W, BLV= Bovine leukemia virus, HTLV= Human T-cell leukemia virus, SnRV= Simian endogenous retrovirus, WDSV= Walleye dermal sarcoma virus, EIAV= Equine infectious anemia virus, FIV= Feline immunodeficiency virus, HIV= Human immunodeficiency virus, SIVmac= Simian immunodeficiency virus, MVV= Maedi-Visna virus, SFV= Simian foamy virus, BFV= Bovine foamy virus, FFV= Feline foamy virus).

In der Abbildung 1.1 sind die wichtigsten Vertreter der Familie der Retroviren, die mit humanpathogenen Erkrankungen assoziiert sind rot unterstrichen. Dabei kann HERV-K mit Keimzelltumoren (Sauter et al., 1995); HERV-W mit Multipler Sklerose (Garson et al., 1998; Blond et al., 1999), HTLV-1 und HTLV-2 mit T-Zell-Leukämie (Yoshida et al., 1982) und HIV-1 und HIV-2 mit Erworbenen Immundefizienz (Barré-Sinoussi et al., 1983) in Verbindung gebracht werden.

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

1.2.2 Virion-Struktur

Anhand der Abbildung 1.2 wird der Aufbau eines Virions (HIV-1) dargestellt. Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm und ist von einer Lipoproteinhülle umgeben. Eingebettet in diese Hülle sind 72 etwa 10 nm große Env-Glykoproteinkomplexe, die aus einem externen Anteil (OM/SU) und einem Transmembranprotein (TM) bestehen. Die externe Domäne besteht bei HIV aus einem 120 kDa großen und die transmembrane Domäne aus einem 41 kDa großen Glykoprotein (gp 120 und gp 41). Während der Infektion kann das Virus über diese Glykoproteinkomplexe Kontakt mit den zellulären Oberflächenrezeptoren CD4 auf humanen T-Lymphozyten, aufnehmen.

Die vom *gag*-Leserahmen kodierten Produkte sind die Kapsidproteine (p24), die Matrixproteine (p17) und das Nukleokapsidprotein (p7). Sie werden als gruppen-spezifische Antigene (Gag-Proteine) zusammengefasst.

Im Inneren des Partikels befindet sich nun das Kapsid – oder Core genannt – das je nach Virustyp eine sphärisch-ikosaedrische oder konische Form (HIV)

besitzt. Das Kapsid enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Genom, die mit den Proteinen des Nukleokapsids komplexiert vorliegen. Außerdem enthält der Viruspartikel zwei Moleküle Reverse Transkriptasen (RT) mit Ribonuklease H-Aktivität (RNase H), eine Protease (PR) und eine Integrase (IN).

Struktur eines HI-Virus

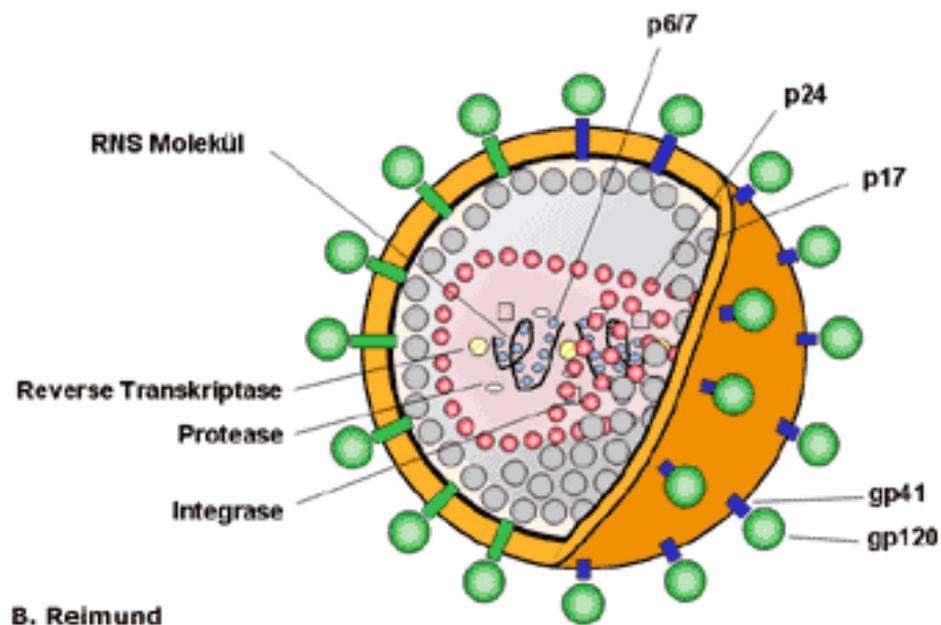


Abb.1.2: Schematischer Aufbau des HIV-1 Partikels. In der Hüllmembran sind die Glykoproteine gp41 und gp120 eingelagert. Das Partikel besitzt eine Lipid-Schicht und im Inneren ein Nukleokapsid. In diesem Nukleokapsid befinden sich die RNA mit Proteinhülle, die Reverse Transkriptase und das p24 Antigen (<http://www.infektionsbiologie.chseitenmodellparasitenseitenhivfotoshiv-partikel.gif>).

1.2.3 Genomstruktur, Integration, Proteinsynthese und Reifung

Retroviren werden aufgrund ihrer Genomstruktur in einfache und komplexe Retroviren unterteilt (Coffin et al., 1997). Während die einfachen Retroviren oft nur die Gene *gag*, *pol* und *env* besitzen, zeichnen sich die komplexen

Retroviren darüber hinaus noch durch das Vorhandensein weiterer Gene aus (Mertz et al., 2004; Löwer et al., 1995; Armbruster et al., 2002). Durch eine spezifische Bindung des Env-Proteins mit einem zellulären Rezeptor infiziert das Virus die Zelle. Danach wird es internalisiert und die Membranhülle entfernt. Die RNA wird zu einer proviralen doppelsträngigen DNA mit Hilfe der im Virus enthaltenen Reversen Transkriptase umgeschrieben worauf die DNA ins Wirtsgenom integriert wird. Somit ist die Wirts-DNA modifiziert. Diese Integration ins Wirtsgenom erfolgt mittels der viruseigenen Integrase. Nach der Integration erfolgt die Transkription der proviralen DNA. Dabei werden zum einen komplette provirale Sequenzen gebildet, die als neues virales RNA Genom dienen, zum anderen werden Sequenzen gespleißt und mit Hilfe der Wirtsproteine translatiert (*gag*, *pro*, *pol* und *env*). Diese gespleißten RNA-Sequenzen werden nicht in die virale Hülle verpackt. Nach der Verpackung wird das komplette Virus dann durch die mit Env-Proteinen bestückte Membran ausgeschleust und erhält dadurch die Membranhülle (Modrow et al., 2003).

1.2.3.1 Genomstruktur

Grundsätzlich kann die RNA je nach Virustyp zwischen 7000 Mäuseleukämievirus (MLV) bis 12000 Basen beim humanen Spumaretrovirus (HSRV) lang sein.

Das Virus enthält einzelsträngige RNA in „+“ Orientierung, die am 5´Ende ein Cap, als Schutz vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen, trägt und am 3´Ende polyadenyliert ist, um die Translationsmaschinerie der Zelle nutzen zu können.

Alle Genome der infektiösen Retroviren kodieren für die Produkte Gag (Gruppen-spezifische Antigene), Pol (Enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine). Die Lenti- und Spumaviren besitzen außerdem noch weitere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren.

Die kodierenden Regionen werden am 5´ und am 3´Ende des Genoms von regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen flankiert. Dazu gehört die R-Region (R=redundant) , welche sich am 5´Cap und am 3´Ende anschließt. Darüber hinaus die U5-Region (U= unique), die sich am 5´Ende hinter der R-Region

befindet. Die U5-Region enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus ins Zellgenom wichtig sind. An die U5-Region schließt sich die Primerbindungsstelle (PB) an, welche später mit einem Molekül zellulärer tRNA hybridisiert. Zwischen *gag*-Genen und der Primerbindungsstelle sitzt die Leader Region, welche die Spleißdonorstelle für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle, enthält.

Darüber hinaus beinhaltet die Leader-Sequenz eine ψ -Stelle, die für die Anlagerung der RNA-Genome an die Nukleokapsidabschnitte der sich bildenden Viruspartikel notwendig ist.

Am 3' Ende schließt sich an die Unique-Sequenz (U3) ein Polypurintrakt (PP), der für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstrangs bei reverser Transkription verantwortlich ist.

Die diese Sequenzen flankierenden Bereiche werden als Kontrollelemente bezeichnet, welche bei der Reversen Transkription- der Umschreibung der ss-„+“-RNA in dsDNA- zu den sogenannten *long terminal repeats* (LTR`s) vervollständigt werden. In der proviralen Form liegen dann die kodierenden Bereiche von einem 3`LTR- und einem identischen 5`-LTR-Element flankiert vor, die sich ihrerseits in U3, R und U5 Domänen unterteilen lassen (Modrow et al., 2003).

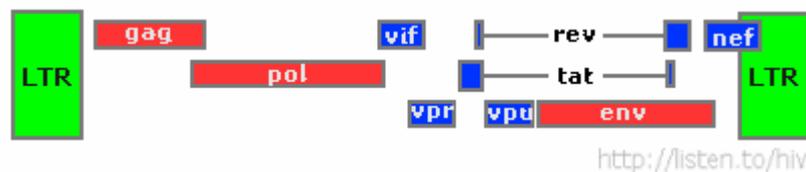


Abb. 1.3 Genomschema komplexer Retroviren, am Beispiel von HIV-1. Die Leserahmen der Genprodukte sind mit Abkürzungen bezeichnet, die später im Text erklärt werden. Die Exons der regulatorisch aktiven Proteine, die von gespleißten mRNAs translatiert werden, sind durch Striche untereinander verbunden.

1.2.3.2 Penetration und Integration

Grundsätzlich wird der Prozess der Penetration initiiert durch die Anlagerung des externen Transmembranproteins an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Bei HIV lagert sich die C3-Domäne des gp 120 an CD4-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Helferzellen an. Die Folge davon ist eine Umlagerung in der Proteinstruktur des Glykoproteinkomplexes, wodurch die Membranfusionsaktivität des gp 41 Glykoproteins aktiviert wird. Bei HIV wurde gezeigt, dass für die effiziente Bindung der SU-Domäne an den CD4-Rezeptor ferner eine Konformationsänderung der TM-Domäne erforderlich ist (Hildinger et al., 2001). Somit verschmilzt dann das Viruspartikel mit der Cytoplasmamembran und das Viruskapsid gelangt ins Innere der Zelle (Coffin et al. 1997).

Das einzelsträngige „+“-RNA Genom wird nun mittels der RT, RNase H und einer tRNA aus der vorherigen Wirtszelle als Primer in die provirale dsDNA Form umgeschrieben. Anschließend wird die dsDNA als „Präintegrationskomplex“, der in der Lage ist Kernporen zu durchdringen – und somit unabhängig von der Teilung der Zelle ist- in den Zellkern transportiert. Andere Viren können nur sich in der Mitose befindliche Zellen infizieren, weil sich währenddessen die Kernmembran auflöst. Im Anschluss wird die Integration der dsDNA mittels der viralen Integrase ins Wirtszellgenom initiiert, die zunächst 2 Basen an den 3`-Enden der viralen dsDNA abspaltet und damit ein überhängendes „C-A“- Motiv erzeugt, das für alle transponierbaren Elemente charakteristisch ist (Coffin et al., 1997). Anschließend spaltet die Integrase die genomische DNA versetzt auf und verbindet sequenzunabhängig die überhängenden Enden der genomischen und der proviralen DNA. Die beiden fehlgepaarten Nukleotide werden anschließend von der zellulären Reparaturmaschinerie entfernt und die meist 4-6 Basen große Lücke mit homologen Nukleotiden aufgefüllt. Aufgrund dieses Mechanismus befinden sich immer 4-6 bp große duplizierte DNA-Bereiche flankierend zu der inserierten Provirus DNA (Coffin et al., 1997).

1.2.3.3 Proteinsynthese und Reifung neuer Virionen

Die Expression der viralen Proteine erfolgt ausschließlich von der proviralen inserierten DNA-Sequenz. Die Transkription durch die RNA Polymerase II der Wirtszelle wird durch die Rekrutierung zellulärer Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Anfangs werden mehrfach gespleißte mRNA's gebildet, die nach der Translokation ins Cytoplasma durch die zelluläre Translationsmaschinerie in Proteinsequenzen umgeschrieben werden. Regulatorische Proteine wie Tat und Rev bei HIV werden anschließend mittels spezifischer Kernimportsignale (*nuclear-localisation-signals, NLS's*) wieder in den Zellkern transloziert, wo sie die Expressionsrate der viralen Proteine transaktivieren bzw. den Export ungespleißter oder einfach gespleißter mRNA ins Cytoplasma anregen (Coffin et al., 1997). Dies führt zur Bildung der viralen Strukturproteine, die zusammen mit dem ungespleißten Genom an der Cytoplasmamembran akkumulieren. Bei vielen Retrovirustypen erfolgt der Zusammenbau des Kapsids simultan zur Abknospung an der Wirtsmembran. Bei B- und D-Typ Retroviren findet hingegen die Bildung des Kapsids im Cytoplasma statt und führt dort zunächst zur Ausbildung sogenannter A-Partikel, die später ebenfalls mit der Cytoplasmamembran assoziieren und ausknospen (Coffin et al. 1997). Die eigentliche Reifung des Partikels zu einem infektiösen Virion erfolgt erst außerhalb der Zelle im unreifen Viruspartikel. Hierfür sind strukturelle Veränderungen, wie die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine, durch die virale Protease notwendig.

Zusammenfassend im Folgenden eine Abbildung zur Übersicht über den HIV-Infektionszyklus.

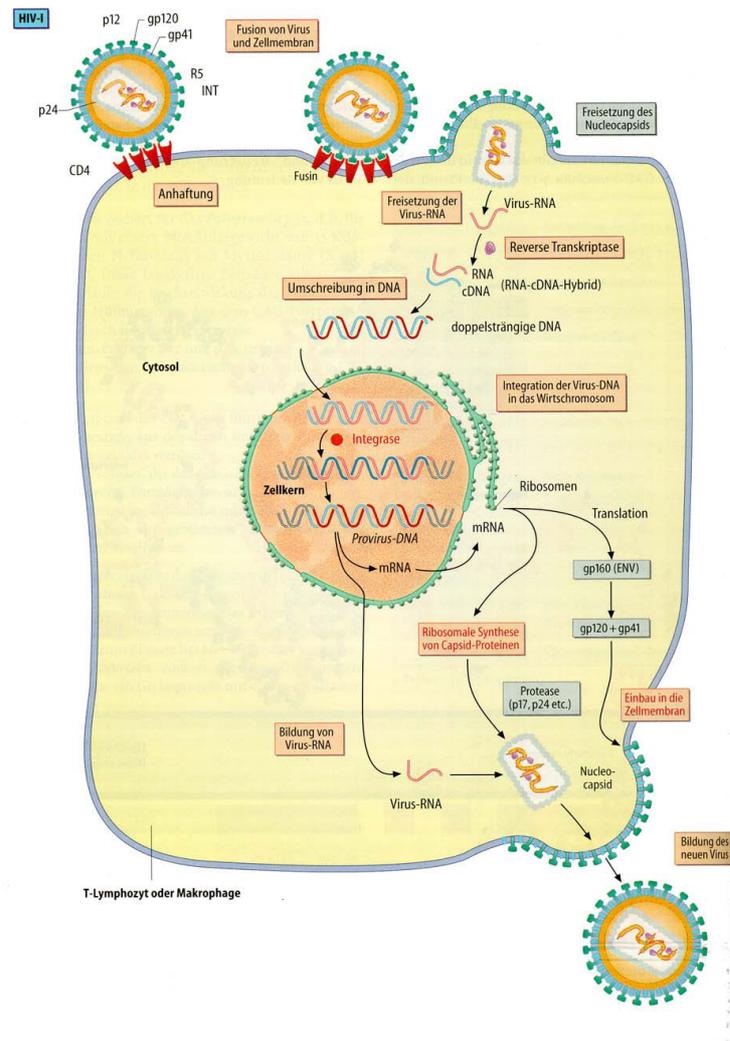


Abb.1.4 Infektionszyklus der Wirtszelle von HIV (nach Löffler&Petrides, 1997)

In dieser Abbildung ist der Infektionszyklus von HIV beschrieben. Die Infektion wird initiiert mit der Bindung an einen Rezeptor, danach verschmilzt das Virus mit der Membran der Zelle. Die Virushülle zerfällt und es beginnt die Reverse Transkription der RNA und der Transport in den Zellkern. Im Zellkern wird die Virus DNA in das Wirtsgenom integriert. Es kommt zur Transkription. Die mRNA wird aus dem Zellkern transportiert und in die verschiedenen Proteine translatiert. Die Proteine assemblieren und es entsteht ein neues Virus, welches durch die sogenannte VirusknoSpung aus der Zelle entlassen wird. Als letzter Prozess findet dann die Virusreifung statt.

1.3 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

1.3.1 Epidemiologie und Übertragung

1981 wurde erstmals die Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben (Gottlieb et al., 1981). Die Vermutung, dass diese Krankheit über ein im Blut oder Blutprodukten vorhandenes Virus übertragen wurde, ließ sich 1983 von den Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert Gallo bestätigen (Barré-Sinoussi et al., 1983; Poiesz et al., 1980). Seit 1986 spricht man offiziell von HIV (*human immunodeficiency virus*). Die Viren haben ihren Ursprung in Afrika. Dort sind verschiedene Affenarten mit ähnlichen Immundefizienzviren (SIV) infiziert, entwickeln jedoch keine Erkrankungen. Man vermutet, dass dieses Virus vor Jahrzehnten auf den Menschen übertragen wurde und sich zum humanpathogenen HIV-1 entwickelt hat (Gao et al., 1999).

1.3.2 Klassifizierung

Heute sind verschiedene Subtypen des HI-Virus bekannt. Beim Menschen findet sich vorrangig HIV-1 Gruppe M (mit den Subtypen A-K) sowie HIV-2, seltener dagegen HIV-1 Gruppe N und O. Daneben sind verschiedene bei Affen vorkommende Subspezies als simian immunodeficiency virus (SIV) bekannt (Gürtler, 2000a). Diese zeigen teilweise große Ähnlichkeiten zu bestimmten menschlichen Subtypen, beispielsweise das bei Schimpansen vorkommende SIV-1, das einen gemeinsamen Vorläufer mit HIV-1 hat (Gao et al., 1999). Das HI-Virus zeigt gegenwärtig eine spezifische Verteilung über die Welt. So findet sich in West- und Südeuropa vor allem HIV-1B, während in Russland HIV-1G und -1H vorherrscht. In Zentralafrika finden sich alle Subtypen, im Westen eher HIV-1A und -1G sowie HIV-2, im Osten HIV-1A und -1D, im Süden HIV-1C. Im Norden Amerikas ist wie in Westeuropa und Australien HIV-1B verbreitet, während im Süden auch HIV-1F häufig zu finden ist. In Indien dominiert HIV-1C, in Südostasien hingegen HIV-1E (Gürtler, 2000a).

1.3.3 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion

1-3 Wochen nach Erstinfektion kann bei 10-20% der Infizierten ein sogenanntes „akutes retrovirales Syndrom“ beobachtet werden, welches sich im plötzlichen Auftreten unspezifischer grippeähnlicher Symptome wie Lymphknotenschwellungen, Fieber, Exanthem und Pharyngitis äußert. Darauf folgt eine klinisch asymptomatische Phase, die mehrere Jahre andauern kann. Typischerweise wird sie durch das Auftreten von Symptomen bzw. Erkrankungen beendet, die der Kategorie B der Einteilung der Centers for Disease Control (CDC B) zuzuordnen sind (CDC, 1993). Diese fallen zwar nicht in die AIDS-definierende Kategorie C, sind jedoch der HIV Infektion ursächlich zuzuordnen oder weisen auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hin. Ohne antiretrovirale Therapie treten, im Median, 10 Jahre nach Erstinfektion, sogenannte AIDS definierende Erkrankungen (Kategorie C) auf, die in relativ kurzer Zeit zum Tod führen (Rockstroh, 2000).

Nach Ablauf der primären Auseinandersetzung zwischen Virus und Wirt im Rahmen der Serokonversion ergibt sich ein individuelles Niveau der Virusaktivität, welches das Gleichgewicht zwischen Virusreplikation und Zerstörung infizierter Zellen repräsentiert. Es wird als „viraler Setpoint“ bezeichnet und ist für den zeitlichen Verlauf der HIV-Infektion von entscheidender Bedeutung. Je höher der virale Setpoint ist (meist zwischen 10.000 und 50.000 Kopien/ml), desto rascher erfolgt der Abfall der CD4+-Zellzahl (O'Brien et al., 1996). Letztere ist neben der Zahl der RNA-Kopien/ml Blut ein wichtiger Parameter für den Infektionsverlauf. Sie wird neben der Klinik im Schema der Centers for Disease Control zur Klassifikation der HIV-Infektion berücksichtigt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: CDC-Klassifikation der HIV-Infektion von 1993 (CDC, 1993)

Klinische Kategorie : Laborategorie:	A	B	C
CD4+-Lymphozyten/ μ l	asymptomatisch	symptomatisch, jedoch kein AIDS	AIDS
1: ≥ 500	A1	B1	C1
2: 200-499	A2	B2	C2
3: < 200	A3	B3	C3

Die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression hängt u. a. ab von der Zahl der inokulierten Viren, dem Infektionsweg, der Virulenz des Virusstammes, der Zahl der bei Inokulation vorhandenen infizierbaren Wirtszellen und der Stärke der antiviralen Immunantwort. Auch genetische Faktoren können eine Rolle spielen: Wie bereits erwähnt ist für das Andocken an die Wirtszelle neben dem CD4+-Rezeptor je nach Virusstamm einer der Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 notwendig. Es hat sich gezeigt, dass Menschen mit einer homozygoten 32 bp-Deletion im CCR5-Rezeptor weitgehend resistent gegenüber einer HIV-Infektion sind. Sie können nur von solchen Virusstämmen infiziert werden, die den CXCR4-Rezeptor als Korezeptor nutzen (Biti et al., 1997; Kupfer et al., 1999). Jedoch auch heterozygote Träger dieser Deletion weisen niedrigere virale Setpoints und eine verlangsamte Krankheitsprogression auf. Neben derartigen Mutationen korreliert die unterschiedliche genetische Suszeptibilität und Progressionsgeschwindigkeit mit bestimmten HLA-Klasse I Typen: Menschen mit den HLA-Markern B27 und B57 weisen seltener ein akutes retrovirales Syndrom auf, haben niedrigere virale Setpoints und scheinen die Replikation des Virus auch im weiteren Verlauf besser zu kontrollieren (Altfeld et al., 2003 und 2006; Kaslow et al., 1996).

1.3.4 Die Virusproteine von HIV-1

1.3.4.1 *Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)*

Der *gag*- Leserahmen kodiert für die gruppenspezifischen Antigene und befindet sich unmittelbar stromab des 5`-LTR`s (siehe Abb. 1.3). Von den Arbeiten zu HIV ist bekannt, dass von dem ungespleißten viralen RNA-Transkript ein sogenanntes Gag-Vorläuferprotein an den freien Ribosomen der Wirtszelle translatiert wird. Dieses Vorläuferprodukt wird während der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten von der viralen Protease gespalten (Kräusslich und Welker, 1996). Im aminoterminalen Bereich befindet sich die Sequenz des Matrixproteins, darauf folgen die Capsidproteine (CA) sowie die Nucleocapsid (NC)- und Link-Proteine im carboxyterminalen Bereich. Das Matrixprotein lagert sich dann mittels einer aminoterminal lokalisierten Myristylsäure an die Innenseite der Zellmembran an, wodurch die Partikelbildung eingeleitet wird (Yu et al., 1992). An den ausknospenden Membranbereich bindet danach ein Komplex aus NC und CA, der das virale RNA-Genom unmittelbar umgibt (Sakalian und Hunter, 1998). Das stark hydrophile NC-Protein komplexiert hierbei über ein Zinkfingermotiv direkt mit der RNA und vermittelt dadurch die charakteristische Struktur des dimeren RNA-Genoms im reifen Viruspartikel. Der so gebildete RNA-NC Komplex wird anschließend von den Kapsidproteinen umschlossen, die wiederum mit den MA-Proteinen assoziieren.

1.3.4.2 *Die Produkte des pol-Leserahmens*

Die Gene, die für die Synthese der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase verantwortlich sind, werden im zentralen Bereich des Genoms codiert (Modrow et al., 2003). Die Produkte des *pol* Gens werden ebenfalls als Vorläuferprotein synthetisiert. Bei HIV hat dieses Vorläuferprotein, wobei es sich um ein Fusionsprotein zwischen Gag-Proteinen und den sich anschließenden Pol-Domänen handelt, ein Molekulargewicht von 160 kDa.

Die Mg^{2+} -abhängige Reverse Transkriptase von HIV ist ein Heterodimer aus zwei Proteineinheiten mit Molekulargewichten von 66 kDa und 51 kDa.

Die RT schreibt nach der Infektion das ssRNA-Genom in eine dsDNA um. Hierzu besitzt sie neben einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase- und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität auch eine Domäne mit RNaseH-Aktivität am C-terminalen Ende des Proteins. Das Enzym besitzt keinen Mechanismus zur Kontrolle der Lesegenauigkeit. Daher werden mit hoher Wahrscheinlichkeit (z.B. 10^{-3} bis 10^{-4} fehlgepaarter Basen/reverser Transkription bei HIV, Modrow et al., 2003) falsche Basen in die DNA eingebaut, wodurch solche Genome eine enorme Variabilität und Flexibilität aufweisen und, wie im Falle von HIV, bei Selektionsdruck (z.B. aufgrund medikamentöser Behandlungen) sehr schnell adaptierte resistente Varianten ausbilden können.

Die Integrase wird am 3'-Ende des *pol*-Leserahmens kodiert. Sie besitzt eine Endonuklease- und eine Ligaseaktivität wodurch sie den Einbau der proviralen DNA in das Wirtsgenom initiieren kann.

1.3.4.3 Die Protease

Der ORF der Protease befindet sich stromabwärts des *gag*-Leserahmens (Prt, siehe Abb.1.3). Die Protease ist ein Dimer aus zwei identischen Proteinuntereinheiten.

1.3.4.4 Die Envelope-Proteine

Am 3'-Ende des viralen Genoms befindet sich der Leserahmen für das *env*-Gen, das für ein Env-Vorläuferprotein kodiert. Bei HIV wird dieses von einer einfach gespleißten RNA am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle synthetisiert und unter Abspaltung einer Signalpeptidsequenz in das Lumen des ER's eingeschleust. Dort wird es über die hydrophobe Domäne innerhalb des TM-Proteins in der Membran verankert, glykosyliert und in die TM- und SU-Proteine gespalten. Diese Spaltung erfolgt im Gegensatz zu der Spaltung des Gag-Vorläuferproteins durch zelluläre Proteasen. Beide Spaltprodukte bleiben bis zur Einlagerung in die Cytoplasmamembran und anschließender Abknospung des Virions miteinander verbunden. Beide Proteine scheinen,

zumindest bei HIV, essenziell zur Infektion von Zellen durch die Adsorption der TM- und SU-Proteine an spezifische Oberflächenrezeptoren zu sein.

1.3.4.5 *Transaktivatoren*

Die Tat-Proteine werden durch zwei Exons codiert, als erste Virusproteine während des Infektionszyklus synthetisiert und entfalten ihre Funktion im Zellkern.

Die Bezeichnung der Tax-Proteine leitet sich von der X-Region des Genoms

1.3.4.6 *Posttranskriptionell wirkende Transaktivatoren*

Das Rev-Genprodukt liegt in einem neuen Leseraster, es besteht wie Tat aus zwei Exonen, jedoch ist jedem Exon eine klare Funktion zugeordnet. Exon 1 wird die Funktion der RNA-Bindung (RRE-Region [rev response element] im Env-Gen) (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1989) und der nukleären Lokalisation zugeordnet, Exon 2 der geförderte Export aus dem Zellkern (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1989;). Bei fehlendem Rev akkumulieren Gag-Pol, Vif, Vpr, Vpu/Env mRNAs nicht im Zytoplasma, so dass die Virusreplikation unzulänglich ist (Felber et al., 1989). Für Retroviren ist die Anhäufung ungespleißter viraler RNA im Zellkern notwendig, da z.B. die Vorläufer für Gag-Pol und das komplette Genom mit 9,2 kb ungeschnitten den Zellkern verlassen muss, um dann in intakte Virione eingebaut werden zu können. In Retroviren ist dieses Problem durch suboptimale Spleißingstellen im Genom gelöst, die von den zellulären Spleißingfaktoren nur sehr ineffizient prozessiert werden.

1.3.4.7 *Akzessorische Proteine*

Das myristylierte (Niederman et al., 1993) und phosphorylierte Nef-Genprodukt (negative regulatory factor) reguliert die Expression des CD4-Rezeptors (Aiken et al., 1994) und des MHC I (Greenberg et al., 1998; Le Gall et al., 1998) herunter. Es erhöht die virale Infektiosität (Kestler et al., 1991),

verändert zelluläre Stoffwechselwege, beeinflusst die T-Zell-Aktivität (Hanna et al., 1998) und die Viruslast *in vivo* (Miller, M.D. et al., 1994; Spina et al., 1994). Außerdem ist es mit zellulärer Kinase (Serin, Thyrosin) assoziiert (Cullen, 1994; Sawai et al., 1995), die mit 60 bis 200 Molekülen in die Partikel eingebaut wird (Jacque et al., 1998). Das Vif-Gen (viral infectivity factor) ist für die Infektiosität des Virions verantwortlich (Strebel et al., 1987), beeinflusst die intermediäre Filamentstruktur (Henzler et al., 2001) und wird in geringen Mengen in die Virione eingebaut (Camaur et al., 1996). Das Gen Vpu bei HIV-1 entspricht dem Gen Vpx bei HIV-2 (viral protein U bzw. X), wobei Vpu die Freisetzung des Virions und den Umsatz des CD4 Antigens (Crise et al., 1992;) erhöht und dessen Degradation bewirkt (Bour et al., 2001), während das Vpx-Gen für den Import des Reverse Transkriptase-Komplexes in den Zellkern verantwortlich ist (Fletcher, 1996) und in großen Mengen in die Viren eingebaut wird (Henderson et al., 1988). Das Produkt des Vpr-Gens (viral protein R) hat einen Einfluss auf den nukleären Import. Es scheint mit den "Transport-Rezeptoren" Importin a, Importin b im Zytoplasma (Popov et al., 1998 a) zu interagieren, aber auch alternative nukleäre Transportwege wurden beschrieben (Jenkins et al., 1998). Andere Autoren berichten, dass die Funktion des Vpr unabhängig von den Importinen ist. Eine Interaktion mit Nukleoporinen scheint gesichert (Fouchier et al., 1998), ebenso wie die Arretierung des Zellzyklus in der G₂-Phase (Poon et al., 1998). Vpr induziert evt. Apoptose (Gaynor et al., 2001; Zhu, Y. et al., 2001). Es wird in hohen Mengen in die Partikel eingebaut. Tev, auch TNV genannt, besteht aus dem ersten Tat-Exon und aus Env- und Rev- Exonen (Rice et al., 1993).

1.4 Das Multiple Sclerosis Related Virus (MSRV)

1.4.1 Die Multiple Sklerose Erkrankung

Die Multiple Sklerose (MS), häufig auch *Encephalomyelitis disseminata*, ist eine chronisch-entzündliche Entmarkungserkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist die am häufigsten vorkommende neurologische Erkrankung junger Erwachsener, mit einer Prävalenz in Europa und Nordamerika zwischen 20 und 200 pro 100.000 (Perron *et al.*, 1997). Bei der Multiplen Sklerose treten in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark verstreut vielfache (multiple) entzündliche Entmarkungsherde auf, die vermutlich durch den Angriff körpereigener Abwehrzellen auf die Myelinscheiden der Nervenzellfortsätze verursacht werden. Da die Entmarkungsherde im gesamten ZNS auftreten können, kann die Multiple Sklerose fast jedes neurologische Symptom verursachen. Sehstörungen mit Minderung der Sehschärfe und Störungen der Augenbewegung (internukleäre Ophthalmoplegie) sind relativ typisch, aber nicht spezifisch für die Multiple Sklerose. Der derzeitige Stand ist, dass MS mit Autoimmunität (Martin *et al.*, 1992), mit einem genetischen Hintergrund (Bell *et al.*, 1996) oder auch mit infektiösen Agenzien verbunden sein könnte (Kurtzke *et al.*, 1993).

1.4.2 Die MSRV-Partikel

MSRV wurde bereits 1997 von Hervé-Perron beschrieben, dessen Gruppe Partikel mit Reverser-Transkriptase-Aktivität aus Zellen des Leptomeninx, des Plexus choroideus und EBV-infizierten immortalisierten B-Zellen von Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt waren, nachweisen konnte (Perron *et al.*, 1997). Blond *et al.* untersuchten die Expression von MSRV-Partikeln in verschiedenen gesunden Geweben an Hand von Northernblot-Analysen und beschrieben eine neue Familie humaner endogener Retroviren, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer PBS zu primer binding sites von Vogel-Retroviren mit ihrer zugehörigen tRNA^{Trp}, als HERV-W bezeichnet wurden (Blond *et al.*, 1999).

1.5 Der BEC-1 Kanal

1.5.1 Aufbau und Struktur

Die Familie der BEC-1 Kanäle gehört zu den spannungsgesteuerten Kalium Kanälen. Der Name BEC (brain specific eag like channel) leitet sich zum einen von dem Fundort (Gewebeproben des menschlichen Gehirns) und der Sequenzähnlichkeiten ab (Miyake et al., 1999). Durch den Fund eines weiteren, strukturell ähnlichen Kanals wurde eine Subklassifizierung in BEC-1 und BEC-2 vorgenommen. Die Gruppe um Miyake isolierte die cDNA beider Kanäle aus Gewebeproben des menschlichen Gehirns und verglich sie mit Sequenzen anderer spannungsgesteuerter Kalium Kanäle. 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.

1.5.2 Einteilung und Aufbau der spannungsgesteuerten Kalium Kanäle

Die Superfamilie der spannungsgesteuerten Kalium Kanäle lässt sich in zwei Subgruppen unterteilen:

- Die Shaker Kanäle (SK, Kv1-4)
- 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 transmembran angeordnet sind (Abb. 1.4). Beide, der C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Auf der Subdomäne S4 ist der Spannungssensor zu finden wo positiv geladene Aminosäuren (wie Arginin und Lysin) an jeder dritten Stelle integriert sind. 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.,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.

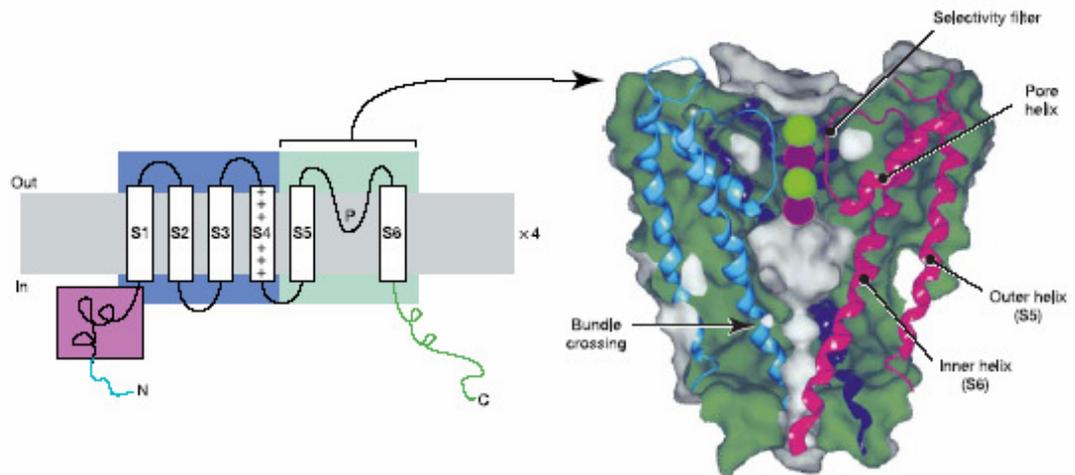


Abb. 1.5 Aufbau der EAG Kanäle und 3D-Darstellung der Kanalpore (Yellen, 2002)

Auf der linken Seite der Abbildung ist die Anordnung der sechs S-Domänen, welche die Zellmembran durchspannen, zu sehen. Der C- und N-Terminus des Kanals liegt jeweils intrazellulär. Der P-Loop (P) bildet den Selektionsfilter. Die Pore wird von vier S5 und S6 Domänen gebildet, die im rechten Teil dreidimensional als α -Helices abgebildet sind.

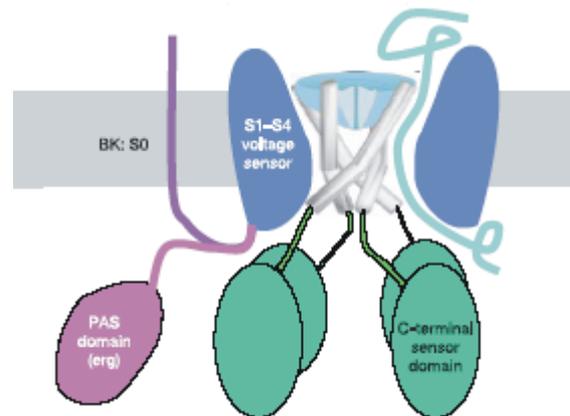


Abb. 1.6 Schematischer Aufbau eines EAG Kanals (Yellen, 2002)

Die transmembrane Lage von S1-S4 ist zu erkennen. Zudem ist der Aufbau der Kanalpore mit der Anordnung der C-Termini als Dimer von Dimeren abgebildet. Eine PAS (Per-Arnt-Sim)-Domäne ist nur in erg Kanälen vorhanden.

Ein charakteristisches Motiv der Porenregion von EAG Kanälen ist das GFG (Glycin, Phenylalanin, Glycin) -Triplet. Miyake et al fanden drei potentielle N-Glycosylierungsstellen am hydrophoben Teil von S5. Auf dem C-Terminus befindet sich eine CNB Domäne (cyclic-nucleotid-binding domain), welche auf die Verwandtschaft zu den cAMP und cGMP gesteuerten Kationkanälen 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. 1.6).

Das Gen *kcnh3*, welches sich auf dem Chromsom 12q13 befindet, kodiert für das BEC-1 Protein. *Kcnh3* besitzt 95% Sequenzähnlichkeit zum *kcnh3* der Ratte. Zu 48% zeigt es eine Analogie mit dem menschlichen BEC-2, eag Kanälen (Miyake et al., 1999). Die folgende Abbildung (Abb. 1.8) veranschaulicht die Position des BEC-1 Kanals im Vergleich zu den anderen EAG Kanälen bezogen auf deren Sequenzhomologie.

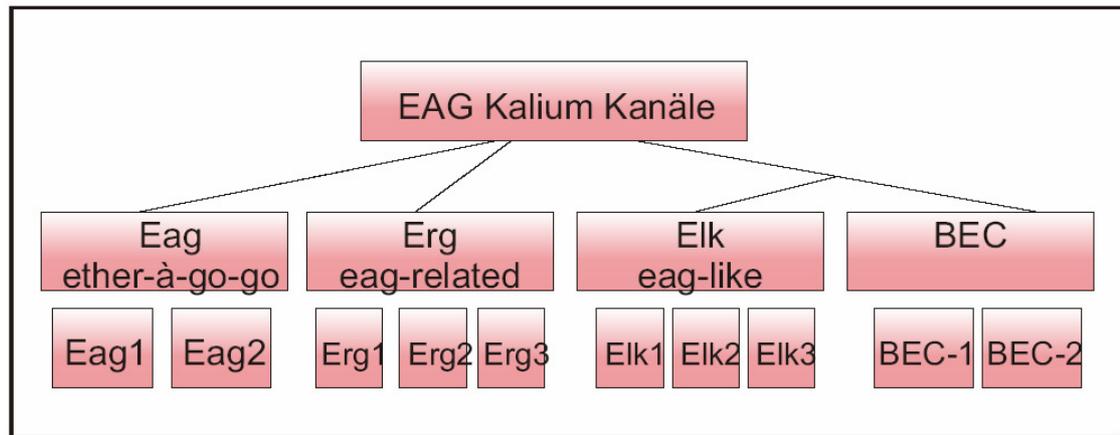


Abb. 1.7 Klassifikation der EAG Kalium Kanäle (Miyake et al., 1999; modifiziert)

Die Familie der Ether-à-go-go Kanäle (EAG) umfasst verschiedene Unterklassen:

- Die Ether-à-go-go Kanäle (eag)
- Die Ether-à-go-go related Kanäle (erg)
- Die Ether-à-go-go like Kanäle (elk)
- Die BEC Kanäle

Die eag lassen sich in die Subtypen eag 1 und 2 unterteilen, die erg Familie in erg1-3, zu elk gehören elk1-3 und BEC wird in BEC-1 und 2 unterteilt.

1.5.3 Funktion der Ether-à-go-go Kanäle und BEC-1

Grundsätzlich besteht die Aufgabe eines Kalium Kanals Kalium Ionen schnell und spezifisch durch die Membran zu führen. Dieser Vorgang, die Permeation wird durch die Konformationsänderung des Kanals reguliert. Dabei schließt und öffnet sich die Pore durch die Detektion von transmembraner Strömung (Yellen, 2002). Zuerst werden Natriumkanäle geöffnet wodurch positiv geladene Natrium Ionen einströmen können und die Zelle depolarisiert wird. Durch das schlagartige Öffnen der spannungsgesteuerten Kalium Kanäle folgt ein dem Konzentrationsgradient folgender Auswärtsstrom von Kalium Ionen (10^8 Ionen/Sec), welcher die Zelle repolarisiert.

Die Kalium Ionen werden dabei stabilisiert durch den gleichzeitigen Strom von Wasser durch die Pore, sodass die dipolaren Wassermoleküle die Ionen flankieren. Unterstützt wird dieser Vorgang durch den Kanal selbst, der dieses

Flankieren imitiert. Des Weiteren besitzen die α -Helices der S-Domänen selbst Dipoleigenschaften, da die negativ geladenen Enden zum Inneren der Pore zeigen (Yellen, 2002).

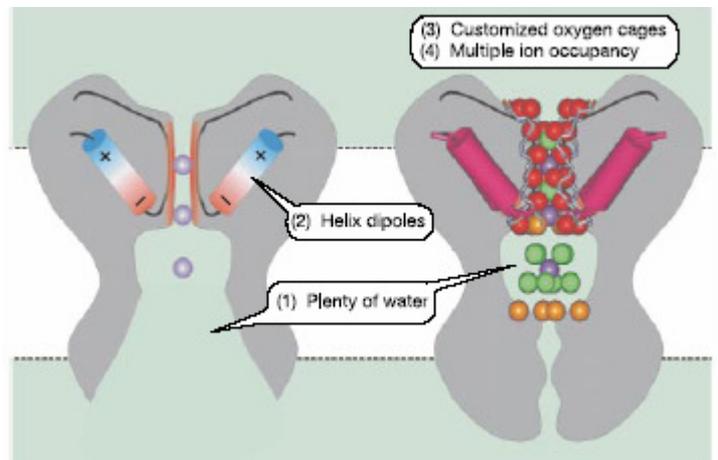


Abb. 1.8 Architektonische Vorteile beim Ionenfluss

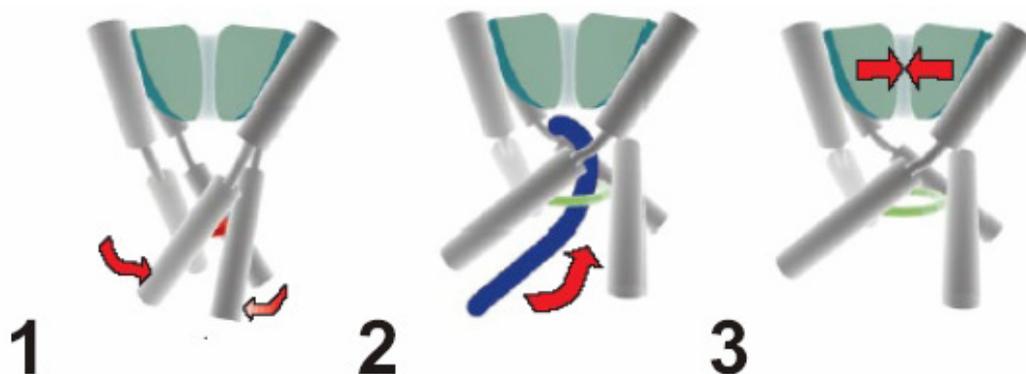


Abb. 1.9 Verschlussmechanismen der Kanalpore von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen (Yellen, 2002)

1) Das Bundle Crossing verschliesst die Pore intrazytoplasmatisch unterhalb der sogenannten Höhle. 2) Der „ball and chain“ Mechanismus beschreibt die Bindung eines inhibitorischen Proteins durch welches sich der Kanal schließen kann. 3) Durch Aneinanderlagern des Selektivitätsfilters kann sich der Kanal innerhalb der Pore schließen.

Bisher sind drei Verschlussmechanismen der Kanalpore bekannt (Abb.1.9). Die S6-Domäne kann den Kanal intrazytoplasmatisch verschließen, sodass keine Ionen mehr fließen können. Beim sogenannten „bundle crossing“ lagern sich die intrazellulären Anteile der S6-Domäne unterhalb der Porenhöhle übereinander.

Auch die Aneinanderlagerung der im Selektivitätsfilter gegenüberliegenden Enden kann die Pore verschließen. Als dritte Möglichkeit dient der sogenannte „ball and chain“ Mechanismus. Dabei wird ein auto-inhibitorisches Protein gebunden (Armstrong, 1971). Die Kaliumblocker TEA (Tetraethylammonium) und Quinidin inhibieren durch Angriff dieses Mechanismus die Ströme der Shakerkanäle. Der BEC-1 Kanal kann dadurch allerdings nicht blockiert werden.

Miyake et al konnte zeigen, dass CHO (chinese hamster ovary) Zellen, die stabil mit BEC-1 transfiziert waren, einen Auswärtsstrom als Antwort auf eine Depolarisation produzieren. Wohingegen Zellen ohne BEC-1 dies nicht taten. Woraus man schließen kann, dass die Depolarisation von BEC-1 ausgelöst wurde.

Über BEC-1 ist bisher nicht viel bekannt, sodass keinerlei Aussagen über die Funktion der einzelnen Domänen gemacht werden können. Jedoch wäre es vorstellbar, dass der C-Terminus eine RCK („regulator of conductance“) Domäne als Sensordomäne 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-Bindedomäne 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).

1.5.4 Expression von BEC-1 in verschiedenen Geweben und Zellen

Die Gruppe um Miyake (Miyake et al., 1999) konnte mit Hilfe von Northern Blot Analysen den BEC-1 Kanal in verschiedenen Hirnregionen identifizieren. BEC-1 Transkripte wurden im zerebralen Kortex, im Hippocampus, im Striatum, Putamen, Nucleus caudatus und im Corpus Amygdaloideus nachgewiesen.

Mit Hilfe von quantitativer PCR konnten Zou et al. (2003) diese Ergebnisse bestätigen. Dabei konnte eine verstärkte Expression des *kcnh3* Gens im zerebralen und frontalen Kortex, im Hippocampus, Nucleus Accumbens und Corpus Amygdaloideus gezeigt werden.

Durch *in-situ* Hybridisierung konnte die zelluläre Lokalisation des Kanals im Kortex genauer festgestellt werden. Es zeigen 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).

Darüber hinaus konnten Smith (Smith et al., 2002) mit Hilfe von RT-PCR Untersuchungen zeigen, dass der Kanal nicht nur im Telencephalon exprimiert wird, sondern auch in Zelllinien und Blutzellen zu finden ist. BEC-1 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.

1.6 Ziele der Arbeit

Grundlage dieser Arbeit sind Untersuchungen auf dem Gebiet der Interaktionen von endogenen retroviralen und zellulären Proteinen. Im Zuge dessen wurde mithilfe des MSRV-(Multiple-Sklerose assoziiertes Retrovirus, ein Mitglied der humanen endogenen Retrovirusfamilie W) Env Proteins ein Hefe-II-Hybrid Screen durchgeführt. Das Ziel des Screens war die Entdeckung möglicher zellulärer Interaktionspartner. Als Grundlage diente eine fötale cDNA Bank aus dem Gehirn eines fötalen Menschen (Clontech). Als Interaktionspartner des MSRV Env Proteins wurde so kürzlich der spannungsabhängige BEC-1 Kanal identifiziert. Erste Untersuchungen ergaben, dass das Kalium Kanal Protein an die Env Proteine von mehreren endogenen als auch exogenen Retroviren bindet. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen HIV-1 und BEC-1 charakterisiert und auf funktioneller Ebene näher untersucht werden.

Zunächst sollte hierfür die Bindung zwischen BEC-1 und den envelope Proteinen von endogenen und exogenen Retroviren durch Pulldownassays analysiert werden. Insbesondere soll die Interaktion zwischen BEC-1 und HIV Env *in vivo* mit Hilfe von Ko-immunopräzipitationen näher charakterisiert werden.

Ferner sollte die genaue Bindungsdomäne sowohl auf HIV Env als auch auf BEC-1 mit Hilfe von Deletionsmutanten und Bindungsanalysen kartiert werden.

Mit Hilfe von Immunpräzipitationen soll die Expression von zellulärem BEC-1 in HIV Zielzellen untersucht werden.

Um die Funktion des BEC-1 Kalium Kanals näher zu charakterisieren, sollen zunächst Funktionsanalysen zur Leitfähigkeit des Kanals durchgeführt werden.

Durch den Einsatz des FluxOR Thallium Detection Kits der Firma Invitrogen soll getestet werden, ob es sich bei BEC-1 um einen funktionellen Kalium Kanal handelt. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Envelope Proteine von HIV die Funktionalität des Kanals beeinflussen.

Abschließend soll untersucht werden, ob BEC-1 einen Einfluss auf die Freisetzung von HIV-1 Partikeln aus HIV infizierten Zellen ausübt.

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