

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen dem Oberflächenprotein des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) und dem Kaliumkanalprotein BEC-1 zu analysieren. Zum Nachweis der Bindung wurden sowohl *in vitro*- (Pull-downanalysen) als auch *in vivo*-Techniken (Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, Immunpräzipitationen und Ko-Immunpräzipitationen) angewandt, welche die Interaktion beider Proteine bestätigen konnten und halfen, diese genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte die aus dieser Interaktion potentiell resultierende Funktion näher untersucht werden. Dafür wurden Funktionsanalysen (FluxOR Thallium Detektion Kit und Partikel Release Experimente) durchgeführt, welche bestätigen konnten, dass die Interaktion zwischen BEC-1 und dem HIV Env SU Protein zum einen zu einer Funktionsminderung des Kaliumkanals und zum anderen zu einer Reduktion der Partikel Ausschleusung von HIV-1 führt.

5.1 Interaktion zwischen HIV Env SU/TM und BEC-1

Grundlage für diese Interaktionsstudien waren die bereits zuvor von der AG Müller-Lantzsch durchgeführten Hefe-Screen-Analysen, die BEC-1 als Zielprotein von MSR V Env identifizierten (Kap.4.1)

Zunächst wurden für die vorliegende Arbeit die letzten 220 C-terminalen Aminosäuren von BEC-1 für die GST-Pull-downanalysen verwendet, da diese im Hefe-Screen mit MSR V Env als „Fängerprotein“ gefischt wurden. Als Interaktionspartner wurden anfänglich die Env Proteine (unterteilt in SU und TM Domäne) von MSR V genauer untersucht.

Die in Abbildung 4.2 dargestellte Autoradiographie zeigt die Bindung zwischen MSR V Env, MSR V Env-SU und MSR V Gag und BEC-1. Dabei bindet das Transmembranprotein (TM) von MSR V nicht an den Kaliumkanal BEC-1.

Daraufhin wurden die Untersuchungen auf Env Proteine weiterer endogener und exogener Retroviren ausgeweitet. In der Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der GST-Pull-downanalysen zwischen BEC-1 und HIV-1, HTLV-1, HERV-W, MSR V und HERV-K aufgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei allen Env Proteinen stets die „Surface“ Domäne (SU) an BEC-1 gebunden

hat, während eine Bindung zwischen BEC-1 und dem Transmembranprotein ausblieb. Im Folgenden wurde der Focus dieser Arbeit auf die Interaktion von HIV-1 und BEC-1 gerichtet. Die konservierte Bindung des Env-SU Proteins des Gammaretrovirus HERV-W und des lentiviralen HIV Env-SU an das gleiche zelluläre Protein deuten darauf hin, dass BEC-1 eine signifikante Rolle für verschiedene Retroviren spielen könnte. Da HERV-W Env und HIV Env jedoch keine signifikanten Sequenzhomologien besitzen, muss die strukturelle Basis der Bindung der beiden retroviralen Env-SU Proteine an BEC-1 näher betrachtet werden. Eine Möglichkeit der Bindung von BEC-1 könnte eher in der konformationellen als in der linearen Struktur der retroviralen Env-SU Proteine liegen.

Bei Pulldownanalysen sollte berücksichtigt werden, dass die Proteine *in vitro* exprimiert werden. Die Untersuchungsbedingungen entsprechen also nicht dem nativen Milieu und der Kompartimentierung in der Zelle, sodass eine Interaktion der Proteine ein Artefakt der Untersuchungsmethode sein könnte. Aufgrund dessen wurden virale und retrovirale Proteine als Negativkontrollen im Pulldown getestet. Dabei zeigte zum Beispiel das „latent membrane protein“ (LMP) des Epstein-Barr-Virus (EBV) keine Bindung an den BEC-1 Kanal.

Die Transmembranproteine aller getesteten Viren, wie auch LMP von EBV, binden nicht an den BEC-1 Kanal. Daher ist eher unwahrscheinlich, dass eine Assoziation von HIV-1 Env-SU und BEC-1 auf unspezifische Proteininteraktionen zurückzuführen ist.



Abb. 5.1 GST-Pulldownanalyse von EBV LMP und dem Kaliumkanal BEC1. In der ersten Spur ist 1/10 des Inputs vom *in vitro* synthetisierten EBV LMP aufgetragen. GST alleine dient als interne Negativkontrolle. EBV LMP wird vom GST-BEC-1 nicht präzipitiert.

5.2 Kartierung der Bindungsstelle des BEC-1 Kanals an MSR/HIV

Nach den Studien zur Interaktion zwischen BEC-1 und MSR/HIV sollten die funktionellen Bindungsdomänen der Proteine eingegrenzt werden. Dazu wurden verschiedene MSR und HIV Deletionsmutanten kloniert und diese im GST-Pulldown getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle deletierten Proteine sowohl von MSR als auch von HIV an BEC-1 binden (Abbildung 4.3 und 4.5). Daraus lässt sich schließen, dass es entweder mehrere Bindungsstellen sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich für BEC-1 gibt oder, dass es durch die Verkürzung des Proteins zu einer Konformationsänderung kommt, welche in jedem Fall eine Bindung zu BEC-1 hervorruft.

Um im umgekehrten Fall die Bindung von HIV Env-SU an BEC-1 zu kartieren, wurden die letzten 220 C-terminalen Aminosäuren von BEC-1 in zwei Bereiche unterteilt (BEC-1.1 und BEC1.2, Abbildung 4.1) und im Pulldown getestet. In der Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass HIV Env SU nur an die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren von BEC-1 bindet. Daraus ist zu folgern, dass eine Bindungsdomäne im C-terminalen Bereich von BEC-1, der intrazellulär liegt, zu finden ist.

Es wurden noch weitere Bindungsstudien zwischen BEC-1 und HIV-1 durchgeführt. Dabei wurden die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren von BEC-1 in mehrere Bereiche unterteilt. Jedoch konnte hierbei keine klare Aussage über die genaue Bindungsdomäne von HIV Env-SU auf BEC-1 gemacht werden (Daten nicht gezeigt). 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. 1.5.1). Es ist daher nicht auszuschließen, dass innerhalb der letzten 110 C-terminalen Aminosäuren mehrere Bindungsstellen von BEC-1 an HIV Env-SU vorhanden sind.

5.3 Lokalisations- und Koloalisationsstudien

Nachdem die Bindung von HIV Env-SU und BEC-1 *in vitro* durch GST-Pulldownanalysen dargestellt wurde, erfolgte als erste *in vivo* Untersuchung die Darstellung beider Proteine in der Fluoreszenz. BEC-1 wurde als grünfluoreszierendes Fusionsprotein und HIV Env-SU als rotfluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert. Die konfokal-mikroskopisch untersuchten Zellen zeigten eine intrazytoplasmatische Koloalisation von EGFP-BEC-1 und DsRed-HIV Env-SU, während die Zellkerne vom Fluoreszenzsignal ausgespart blieben (Abbildung 4.7 und 4.8). Das HIV-Env Protein wird als Vorläuferprotein translatiert im ER und durch eine Furin-Protease in die Proteine SU und TM gespalten (Moulard et al., 2000). Nach der Prozessierung assoziieren die Proteine des infektiösen HIV-1 Virus für den Zusammenbau der Viruspartikel, dem sogenannten Assembly, um zur Zellmembran zu gelangen und zu Knospen (Budding) (Ganser-Pornillos et al., 2008). 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 (beispielweise glykosyliert, [Papazian, 1999]) um dann zur Plasmamembran zu gelangen (Delisle et al., 2004). Die in den Koloalisationsaufnahmen beobachtete zytoplasmatische Lokalisation entspricht somit der erwarteten Verteilung eines am Endoplasmatischen Retikulums synthetisierten Proteins. Bei den durchgeführten Fluoreszenz-Untersuchungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass beide Proteine in den Zellen überexprimiert wurden und somit eine quantitativ höhere Konzentration der analysierten Proteine im Zellmilieu vorliegt und die Ergebnisse sich daher als Artefakt der Transfektion darstellen könnten. Desweiteren sollte bedacht werden, dass BEC-1 als EGFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, somit 26 kDa größer ist und daher aufgrund der Größe die Lokalisation beeinflusst sein könnte (Giepmans et al., 2006). Dies konnte allerdings durch immunzytochemische Färbung des BEC-1 Proteins ohne Fusionprotein mit Anti-BEC-1 Serum widerlegt werden. Beide

Proteine lokalisieren in gleicher Weise und es ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 4.8 (Daten nicht gezeigt). Daher kann nicht von einer Beeinflussung der Lokalisation des Proteins durch den Tag ausgegangen werden. Jedoch bleibt die Hypothese der Membranlokalisierung nicht bestätigt, da keine immunzytochemische Färbung an Lebendzellen durchgeführt werden konnte, da sich der Teil gegen den der Antikörper gerichtet ist, auf der intrazellulären Seite befindet.

5.4 Expression des spannungsabhängigen Kalium Kanals in HIV-Zielzellen

Die mRNA des BEC-1 Kanals konnte via Northern Blot Analysen im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden konnte (Miyake et al., 1999). Darüber hinaus zeigten weitere RT-PCR Analysen, dass BEC-1 auch in primären Leukämie Zellen, in normalen peripheren Blut-Lymphozyten, in proliferierenden aktivierten Tonsillar-Zellen, in Lymphozyten von Patienten mit Sjögren-Syndrom und in EBV-transformierten B-Zellen zu finden ist (Smith et al., 2002). Die Detektion von BEC-1 in hämatopoietischen Zellen könnte also darauf hindeuten, dass BEC-1 auch in HIV-1 Zielzellen gefunden werden kann. Tatsächlich wurde der BEC-1 Kanal nur durch Immunpräzipitation in frisch kultivierten humanen PBMC's und aus Makrophagen, genauso wie in der menschlichen T-Zelllinie Jurkat als auch in A3.01 (Abbildung 4.9) nachgewiesen. Ferner wurde schon früher in der AG Müller-Lantzsch BEC-1 in mehreren adhärennten Zellen (COS-1, HeLa, GOS-3 (Astrodendrogliom-Zelllinie), LN405 (Glioblastomzelllinie), HCAT, 293T), in menschlichen Fibroblasten und in EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen gefunden. BEC-1 konnte nur durch Immunpräzipitation und PCR nachgewiesen werden.

Da BEC-1 in HIV-1 Zielzellen exprimiert wird, kann man die Hypothese erstellen, dass sich die Expression des Kanals in Wirtszellen im menschlichen Organismus als Selektionsvorteil des Virus in bestimmten Zellen herausstellen und somit für die Expansion des Virus einen begünstigenden Faktor darstellen könnte.

In umgekehrter Weise kann man sich die Expression des Kanals aber auch als „Schutzmechanismus“ der Zelle gegen das Virus vorstellen.

Auf jeden Fall können die Konsequenzen der HIV Env-SU Interaktion mit dem ubiquitinär exprimierten BEC-1 sehr vielseitig und wahrscheinlich auch klinisch relevant sein.

5.5 Nachweis der *in vivo* Interaktion des HIV-1 Env-SU Proteins mit dem Kalium Kanal BEC-1

Nach dem Nachweis der Interaktion von HIV Env-SU mit dem Kalium Kanal BEC-1 *in vitro* durch GST-Pulldownanalysen, sollte gezeigt werden, dass diese Interaktion auch *in vivo* vorhanden ist. Dafür wurden Immunpräzipitationen und Koimmunpräzipitationen durchgeführt.

In der Abbildung 4.10 ist zunächst die Koimmunpräzipitation von HIV Env-SU und dem zellulären BEC-1 dargestellt. BEC-1 konnte mit dem spezifisch hergestellten anti-BEC-1 Serum aus 293T Zellen präzipitiert werden. Als Negativkontrolle wurde das Präserum von BEC-1 eingesetzt. Der Blot, der mit dem anti-BEC-1 Serum gefärbt wurde, zeigte das zelluläre BEC-1 wohingegen in den Proben, die mit Präserum von BEC-1 präzipitiert wurden, kein BEC-1 zu erkennen ist. Der Blot, der mit dem anti-HA Antikörper gefärbt wurde, zeigt das kopräzipitierte HIV Env-SU. Als Negativkontrolle wurde HIV Env-TM benutzt, welches nicht durch BEC-1 kopräzipitiert werden kann.

In den Zellextrakten kann das zelluläre BEC-1 nicht nachgewiesen werden, was daraufhin weist, dass die konstitutive Expression von BEC-1 in 293T Zellen eher gering ist.

Als Argument gegen die These, dass durch die hohen Proteinkonzentrationen von HIV Env eine unspezifische Proteininteraktion zustande kommt, spricht die Tatsache, dass durch das Präserum von BEC-1 kein Protein präzipitiert werden konnte. Außerdem wird auch HIV Env-TM –trotz ebenfalls hoher Proteinkonzentrationen- nicht von BEC-1 präzipitiert.

Des Weiteren wurden die bisherigen Vorexperimente (GST-Pulldownanalysen) bestätigt, sodass eine tatsächliche Interaktion wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend kann man folgern, dass HIV Env-SU auch *in vivo* mit BEC-1 interagiert, während HIV Env-TM auch *in vivo* keine Interaktion mit dem Kalium Kanal zeigt.

Die Qualität der Immunpräzipitationen hängt enorm von den verwendeten Antikörpern ab (Heydermann, 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.

Darüber hinaus wurde die *in vivo* Interaktion auch mit einer Flag-exprimierenden Deletionsmutante von BEC-1 (BEC2600) getestet. Eine Mutante, die um die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren verkürzt war sollte zum Beweis dafür dienen, dass HIV Env-SU mit dem C-Terminus von BEC-1 in lebenden Zellen interagiert. Dafür wurden 293T Zellen mit beiden BEC-Konstrukten (BEC-1 und BEC2600) sowie HIV Env-SU transfiziert und durch Koimmunpräzipitation auf Interaktion getestet. In der Abbildung 4.11 ist zu erkennen, dass trotz gleich starker Expression der BEC Konstrukte nur das Vollängen BEC-1 in der Lage ist HIV Env-SU zu präzipitieren. Dieses Ergebnis stützt also die These, dass nur die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren für die Bindung verantwortlich sind.

5.6 Funktion der Interaktion zwischen HIV Env-SU und BEC-1

Zur Hypothesenformulierung werden im Folgenden wesentliche Funktionen des spannungsabhängigen Kaliumkanals und des HIV Env-SU Proteins und davon ausgehend mögliche funktionelle Konsequenzen der Interaktion von HIV Env-SU und BEC-1 aufgezeigt.

5.6.1 Funktionelle Bedeutung HIV Env

Das zwischen 850-870 Aminosäuren große Vorläuferprotein von HIV wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Das mit Mannose-modifizierte gp160 Vorläuferprotein wird in den Golgi Apparat transportiert, wo die Spaltung

durch die Furin-Protease in die Untereinheiten SU (surface), das externe Glykoprotein und TM (transmembrane), transmembrane Glykoprotein stattfindet (Wyatt und Sodroski, 1998). Nach dem Zusammenbau viraler Partikel dient das TM Protein zur Verankerung von HIV Env-SU in der Virusmembran. Das HIV Env-SU Protein interagiert später mit dem CD4-Rezeptor (Klatzmann et al., 1986), wofür das Protein als Trimer vorliegen muss (Earl et al., 1991). Der CD4-Rezeptor befindet sich auf T-Lymphozyten, Monozyten, Dendritischen Zellen und Mikroglia des Gehirns. Diese CD4-Bindung führt zu einer Konformationsänderung im HIV Env-SU Protein. Durch diese Konformationsänderung kann es zu weiteren Wechselwirkungen mit zusätzlichen Faktoren (Chemokinrezeptoren) auf der Zelloberfläche kommen (Trkola et al., 1996). Bei den Chemokinrezeptoren handelt es sich um Mitglieder der Rhodopsinrezeptorfamilie. Dazu gehören CCR5 und CXCR4. Die Bindung an CXCR4 dient vor allem lymphotropen HIV-Varianten als Kofaktor für den Eintritt in T-Lymphozyten wohingegen CCR5 für die Bindung der makrophagotropen Virusvarianten an Monocyten und Makrophagen dient. Nach der Bindung an die Chemokinrezeptoren erfolgt die Membranfusion. Diese wird ausgelöst durch die Konformationsänderung der Ektodomäne des HIV Env-TM Proteins (Carr et al., 1993).

Die nächste Funktion der Envelope Glykoproteine ist das Wirken als Antigene bzw. Immunogene. Bei der Verbreitung der Viren sind die Glykoproteine erste Ziele von Antikörpern. Jedoch liegt der Erfolg des Virus eine persistierende Infektion zu erreichen darin, dass die viralen envelope Glykoproteine keine „idealen“ Immunogene und Antigene sind gegen die das Immunsystem effektiv vorgehen könnte (Wyatt und Sodroski, 1998). Wodurch auch die Herstellung eines entsprechenden Impfstoffs erschwert wird.

5.6.2 Funktionelle Bedeutung von BEC-1 und anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen

Über die Prozessierung von BEC-1 ist bisher nichts bekannt, sodass sich nur anhand anderer spannungsabhängiger Kaliumkanäle Hypothesen aufstellen lassen können, in welcher Weise sich BEC-1 in den Zellen verhält und welche Funktion die einzelnen Domänen des Proteins ausüben könnten. Delisle et al.

(2004) und Papazian et al. (1999) fanden heraus, dass sich translatierte Proteine von Kv Kanälen im ER mit je vier Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammenlagern. Dort entsteht dann eine Struktur, die als „Dimer von Dimeren“ benannt wird. Diese Dimerbildung von Dimeren wird bei manchen Kaliumkanälen durch die aminoternale T1-Domäne (tetramerization domain 1) der Aminosäuresequenz vermittelt (Delisle et al., 2004; Kosolapov und Deutsch, 2003). Da nicht alle Kaliumkanäle über eine T1-Domäne verfügen, beschreibt eine weitere Hypothese die Rolle des C-terminalen Endes bei der Multimerausbildung des Kanals (Kanki et al., 2004). Aber auch der C-Terminus von hERG-Kanälen spielt eine wichtige Rolle beim Transport zur Plasmamembran. Die Deletion der Aminosäuren 860-899 im C-Terminus führt zu einer verminderten Expression der Kanäle auf der Zelloberfläche und wird so als möglicher Pathomechanismus für die Entstehung des Long-QT-Syndroms diskutiert (Akhavan 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. So 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 Kanals verändert werden kann. Der Export des Kaliumkanals aus dem endoplasmatischen Retikulum unterliegt komplexen Kontrollmechanismen. Bei einer inkorrekten Faltung oder Zusammenlagerung von hERG-Kanalproteinen, wobei hydrophobe Anteile der Aminosäuresequenz in Richtung Zytosol zeigen, führt dies zur Degradierung des Proteins durch Proteasomen (Asher et al., 2006). Der Export aus dem Golgi-Apparat unterliegt der Kontrolle durch andere Proteine. So wird der vesikuläre Transport von hERG durch das *cis*-Golgi-assoziierte GM130-Protein gesteuert, welches an den C-Terminus des Kaliumkanalproteins bindet (Roti et al., 2002). Der zielgerichtete Transport zur endgültigen Lokalisation des Kaliumkanals in der Zellmembran wird über zytoskelettale Strukturen vermittelt. Der Kaliumkanal Kv1.5 gelangt über Dynamin und Dynein zur Plasmamembran, während Kv4.2 über eine prolinreiche Region mit Filamin interagiert (Choi et al., 2005). Zudem konnte

Filamin die Expression von Kv4.2 an der Zelloberfläche erhöhen (Petrecca et al., 2000). Auch BEC-1 besitzt eine solche prolinreiche Region (AS 951-1057); so könnte durch Interaktion über diese Region mit Filamin das Strukturnetzwerk der Zelle genutzt werden um zur Plasmamembran zu gelangen (Kay et al., 2000).

5.7 HIV Env-SU inhibiert die Leitfähigkeit des BEC-1 Kalium Kanals

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HIV Env-SU physikalisch mit BEC-1 interagiert, sollten die funktionellen Konsequenzen dieser Interaktion untersucht werden. Dabei bestand die Frage darin, ob die elektrophysiologischen Gegebenheiten von BEC-1 durch HIV Env-SU veränderbar seien. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Thallium Detektion Kit verwendet, das den Vorteil nutzt, dass Kalium Kanäle genauso permeabel für Thallium wie für Kalium sind (Weaver et al., 2004). Als Kontrollkanal wurde der humane Kalium Kanal hERG (Spannungsabhängiger Kalium Kanal der Subfamilie H2) benutzt (Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006).

Dabei wurde klar, dass eine wichtige Konsequenz der Interaktion von HIV Env-SU und BEC-1 in der Unterdrückung der Leitfähigkeit des Kalium Kanals liegt. Das Ergebnis, dass die Leitfähigkeit der Deletionsmutante BEC2600 (der die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren fehlen) nicht durch die Bindung von HIV Env-SU beeinflusst wurde, bestärkte die These, dass die HIV Env-SU induzierte Unterdrückung von BEC-1 aus der direkten Interaktion der beiden Proteine miteinander resultiert.

Da auch bei der Koexpression von HIV Env-TM und BEC-1 keine Auswirkungen auf die Leitfähigkeit von BEC-1 festzustellen sind, kann man davon ausgehen, dass keine falsch positiven Ergebnisse vorliegen.

Interessanterweise ist in der Literatur beschrieben, dass auch andere Kalium Kanäle durch HIV kodierte Proteine, entweder durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder durch einen indirekten Mechanismus, inhibiert werden können. So interagiert zum Beispiel das akzessorische HIV-1 Protein Vpu mit dem pH-sensitiven Kalium Kanal TASK-1 und führt dadurch zu dessen Unterdrückung (Hsu et al., 2004). Vpu ist ein Klasse I integrales Membranprotein 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. Schubert et al (1996) zeigten, dass beide Domänen an der Funktion von Vpu beteiligt sind.

TASK-1 ist ein pH-sensitiver Kanal, der zum Ruhemembranpotential beiträgt. Vpu und TASK-1 zeigen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit (24%), sodass vermutet wird, dass das virale Protein durch „Molekulare Piraterie“ während der retroviralen Evolution von Wirtsgenen ins virale Genom übertragen wurde. Im Gegensatz zur Interaktion zwischen HIV Env-SU und BEC-1 erfolgt hier die Interaktion am N-Terminus von TASK-1. Vpu agiert vermutlich in Form einer Alpha Untereinheit der Kalium-Kanäle, welche zur Modifikation der eigentlichen Kanalfunktion führen kann (Abbott et al., 1998). HEK-293 (human embryonal kidney) Zellen exprimieren den TASK-1 Kanal und zeigen auf Stimulation einen Ba²⁺ sensitiven, TEA (Tetraethylammonium; Kalium Kanal-Blocker) insensitiven Auswärtsstrom. Die Koexpression von TASK-1 und Vpu führt jedoch zum Erlöschen des Auswärtsstroms. 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).

Möglicherweise ist die Interaktion von HIV Env-SU und BEC-1 vergleichbar mit der Bindung von Vpu an TASK-1. Das SU Protein könnte ebenfalls als alpha-Untereinheit mit BEC-1 interagieren und somit die elektrischen Eigenschaften des Kanalproteins beeinflussen. Im Falle der Interaktion zwischen BEC-1 und HIV Env-SU findet die Bindung allerdings am C-Terminus statt. Für Shaker-Kaliumkanäle konnte die Bedeutung des C-Terminus für das „Gating“ des Kanals und damit für die Veränderung des Ionenmilieus beschrieben werden (Yellen, 2002). Die Bindung von Ca²⁺ an der C-terminalen Calmodulin-Bindungsdomäne führt zur Dimerisierung dieses Komplexes mit Ca²⁺, was zur Konformationsänderung und damit zur Öffnung des Kaliumkanals führt. So ist anzunehmen, dass die Bindung von HIV Env-SU am C-Terminus auf genau diese Weise die Ionenleitfähigkeit von BEC-1 verändert.

Weitere Beispiele für die Inhibierung von Kalium Kanälen durch HIV kodierte Proteine ist das akzessorische Protein Nef. Dieses inhibiert in CEM Lymphozyten die Aktivität des Ca^{2+} abhängigen Kalium Kanal (Zegarra-Moran et al., 1999). HIV Env (gp160) verringert den Strom des spannungsabhängigen Kalium Kanals Kv 1.3 in Jurkat Zellen, wahrscheinlich durch den Anstieg der Kanal-Phosphorylierungsrate (Dellis et al., 1999). Zu guter letzt zeigen die Herz-Myozyten von HIV transgenen Mäusen einen Rückgang der Repolarisierung, was mit einer Reduktion des Kalium-Auswärtsstroms verbunden ist (Brouillette et al., 2007). All diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Kontrolle der Kalium Kanal Aktivität wichtig für die Replikation von HIV sein könnte und folgendermaßen auch pathogen sein könnte.

Eine weitere Theorie könnte darin liegen, dass in T-Lymphozyten, den Hauptzielzellen von HIV-1, funktionelle Kalium Kanäle unabdinglich sind um das bleibende Negativ-Membranpotential aufrecht zu erhalten. Diese Negativ-Membranpotential ist der Motor für den wichtigen Ca^{2+} Einfluss über die Ca^{2+} Kanäle, welcher umgekehrt sehr wichtig für die Antigen-Aktivierung der T-Lymphozyten darstellt (Lewis and Cahalan, 1995). Tatsächlich weiss man auch, dass hoch-affine Antagonisten von Kalium Kanälen zu einer Depolarisierung von humanen T-Zellen führt und dabei die Ca^{2+} abhängige Aktivierung der T-Zellen verhindert (Leonard et al., 1992; Lin et al., 1993). Auch die Inhibierung der Ca^{2+} -abhängigen Kalium Kanäle durch HIV Nef führt zu einer Depolarisierung der CEM Lymphozyten (Zegarra-Moran et al., 1999). Da BEC-1 ebenfalls in humanen T-Zellen vorhanden ist, liegt es nahe zu vermuten, dass die Unterdrückung von BEC-1 durch HIV Env-SU zu einer Depolarisierung der T-Zellen führen und daraus eine Unterdrückung der Ca^{2+} abhängigen Aktivierung der T-Zellen folgen könnte.

Elektrophysiologische Untersuchungen, wie „Patch-Clamp“ müssten zur weiteren Beleuchtung dieser Hypothese durchgeführt werden.

5.8 Inhibierung des HIV-1 Partikel Release durch BEC-1

Früher konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des säure-sensitiven Kalium Kanals TASK-1 und HIV-1 Vpu zur Inhibierung des Vpu abhängigen HIV-1

Partikel Release führt (Hsu et al., 2004). Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die Frage ob die Interaktion von HIV Env-SU und BEC-1 einen ähnlichen Effekt auf den HIV-1 Partikel Release haben könnte. Dafür wurden 293T Zellen mit den BEC-Konstrukten (BEC1 und BEC2600) transfiziert, mit HIV infiziert und der Partikel Release gemessen. Dabei wurde klar, dass der HIV Partikel Release in Zellen, die mit BEC-1 transfiziert waren um das zweifache reduziert war im Vergleich zu Zellen, die mit der nicht-bindenden Deletionsmutante BEC2600 transfiziert waren. Diese 50%ige Reduktion des Release konnte sowohl im p24 Test als auch bei der Messung der *Renilla Luziferase* Aktivität festgestellt werden.

Auch hier kann man zusammenfassend sagen, dass die Reduktion des HIV-1 Partikel Release anhängig von der direkten Interaktion von HIV Env mit dem C-Terminus von BEC-1 ist.

Die Gag-Proteine (gruppenspezifische Antigene) steuern das Assembly, den Zusammenbau infektiöser Partikel, fast aller Retroviren. Bei HIV ist das Matrix (MA) 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-Gag mit Env bestimmt in bipolaren Zellen die Seite der Virusfreisetzung (Budding). Bei fehlender Env Expression wurden Viren auf allen Zellseiten freigesetzt, bei Koexpression von Gag und Env verließen die Viren die Zelle nur zur basolateralen Seite (Cimarelli et al., 2001).

So liegt die Vermutung nahe, dass HIV Env die Viruspartikel zur basolateralen Seite der Zelle dirigiert. Da nun HIV Env auf der intrazelluläre Seite an BEC-1 bindet, könnte diese Interaktion ein Teil des Mechanismus sein wie HIV Env die Partikel dirigiert.

HIV Proteine interagieren in infizierten Zellen stets mit zellulären Proteinen (Greene and Peterlin, 2002) Infolgedessen gibt es auch andere HIV kodierte Proteine, die mit Kalium Kanälen interagieren und auf diese Weise den HIV-1 Partikel Release inhibieren. Wie Klimkait et al. (1989) zeigten, ist das akzessorische HIV-1 Protein Vpu in der Lage den HIV-1 Partikel Release zu verstärken, sodass es durch Abwesenheit dieses Proteins zu einer signifikanten Reduktion der Partikel Produktion kommt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Vpu das Partikel Release an der Plasmamembran verstärkt (Bour et al., 1999). Hier wird angenommen, dass Vpu aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu TASK-1 (24%) als α -Untereinheit des Kalium Kanals fungiert und somit seine eigentliche Funktion –nämlich die der Verstärkung des Partikel Release- verliert (Hsu et al., 2004). Übertragen auf die HIV Env-SU-BEC-1 Interaktion hieße das, dass auch HIV Env-SU an der Verstärkung oder generell „Leitung“ (zur basolateralen Seite) des HIV-1 Partikel Release beteiligt ist, dann auf der intrazellulären Seite an den Kalium Kanal BEC-1 bindet und somit seine eigentliche Funktion verliert. Sattentau et al. (1993) beschreiben ebenfalls die Konformationsänderung von HIV Env-SU nach der Bindung an Rezeptoren. Auf diese Weise ist vorstellbar, dass HIV Env SU folglich seine Rolle im Partikel Release verliert.

5.9 Konklusion

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe unterschiedlicher Methoden eine *in vitro* als auch eine *in vivo* Interaktion zwischen dem HIV Env-SU Glykoprotein des exogenen Retrovirus HIV-1 und dem spannungsabhängigen Kaliumkanal BEC-1 nachgewiesen werden. Als funktionelle Auswirkung dieser Interaktion konnte gezeigt werden, dass es zu einer Suppression der Leitfähigkeit des Kaliumkanals BEC-1 kommt und weiter, dass auch der HIV-1 Partikel Release in HIV-1 infizierten Zellen signifikant herunterreguliert wird. Obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob diese Umstände besser für HIV-1 oder den Wirt sind, räumen diese Daten die Möglichkeit ein, dass die HIV Env-SU-BEC-1 Interaktion die HIV-1 Replikation beeinflusst oder sogar pathogene Effekte in infizierten Zellen hervorrufen kann.

Diese Bindung ist während der Evolution über Jahrtausende erhalten geblieben, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich um einen wichtigen biologischen Regulationsmechanismus handelt. Diese erstmals gefundenen funktionellen Auswirkungen auf das Kaliumkanalprotein BEC-1 durch die Bindung von retroviralen Env-Proteinen könnten einen möglichen Ansatz für therapeutische Interventionen bieten.