

4 ERGEBNISSE

4.1 Interaktion von Envelope Proteinen mit dem spannungsabhängigen Kalium Kanal BEC-1

Retrovirale Envelope Proteine spielen eine entscheidende Rolle beim Eindringen des Virus in die Zelle und legen den Tropismus des Virus fest.

Vor dem Hintergrund der Untersuchungen zur Interaktion zwischen envelope Proteinen endogener Retroviren und zellulären Proteinen wurde zunächst ein Hefe-II-Hybrid-Screen durchgeführt. Mit Hilfe des envelope Proteins von MSRV (Multiple Sclerosis Related Virus, AF331500) als „Fänger“ wurde eine humane fötale Gehirn cDNA-Bank durchmustert und der spannungsabhängige Kalium Kanal BEC-1 (NM_012284) identifiziert.

Um herauszufinden ob diese Interaktion auch auf Env Proteine anderer endogener bzw exogener Retroviren übertragbar ist, wurde die Bindung zu Syncytin-1 (HERV-W Env, AF072506,), und den Envelope Proteinen von HERV-K (AF074086), HTLV-1 (AF033817), und HIV-1 (NM_0011802) untersucht. Diese Interaktion wurde durch GST- Pulldown Experimente, Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen bestätigt. In dieser Arbeit wurde der Hauptaugenmerk auf die physikalische und funktionale Bedeutung der Interaktion zwischen HIV-1 und BEC-1 gelegt.

BEC-1 stellt einen interessanten Interaktionspartner für envelope Proteine dar. Seit 1999 wusste man über BEC-1, dass es vor allem im menschlichen Gehirn exprimiert ist und man mutmaßte (Miyake et al., 1999), dass BEC-1 mit verschiedenen Gehirnerkrankungen assoziiert sein könnte. Jedenfalls war bekannt, dass der Genlokus 12q13 mit einer bestimmten Form der Alzheimer Erkrankung und des Bettnässens in Verbindung steht (Pericak-Vance et al., 1997; Arnell et al., 1997).

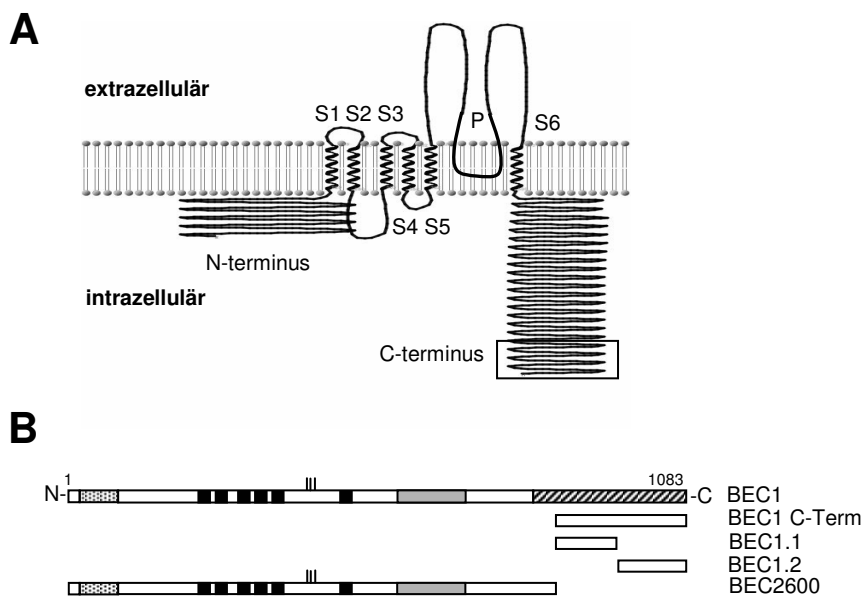


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des BEC-1-Proteins und der eingesetzten Deletionsmutanten des BEC-1 Proteins. **A:** Die transmembrane Regionen von BEC-1 (S1-S6) sind dargestellt. Der Kanal besitzt ferner mehrere zytoplasmatische Komponenten (<http://smart.embl.de/>). **B:** Eingesetzte Klone von BEC-1. Das Vollängenprotein BEC-1, die Deletionsmutante BEC2600, der im Hefe-Screen gefischte Klon BEC-1 C-term und die Deletionsmutanten BEC 1.1 und BEC 1.2.

Der spannungsabhängige Kalium Kanal BEC-1 besteht aus 1083 Aminosäuren, die von dem *KCNH3* Gen (NM_012284), das sich auf dem Genlocus 12q13 befindet, kodiert werden. Die Abbildung 4.1 zeigt die transmembrane Organisation von BEC-1 und die verschiedenen Konstrukte, die für die Arbeit benutzt wurden. Als typisches Mitglied der *eag* Familie besitzt BEC-1 sechs transmembrane Regionen (S1-S6), mit C- und N-Terminus, auf der intrazellulären Seite der Membran (Yellen, 2002). Zusätzlich gibt es drei wahrscheinliche N-Glykosylierungsstellen zwischen S5 und der „Poren-Region“ (Miyake et al., 1999). Die konservierte Per-Arnt-Sim (PAS) und die zyklische-Nukleotid-Monophosphat (cNMP) Bindedomänen befinden sich zwischen der Position 20-88 und 582-697 von BEC-1.

4.1.1 Studien zur Bindung von MSRV Proteinen und BEC-1 in Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Experimenten

Erstmals konnte die Bindung zwischen MSRV Env und BEC-1 im Hefe-II-Hybrid-System gezeigt werden. Zur Bestätigung dieser Bindung wurden zunächst Glutathion-S-Transferase Experimente durchgeführt (Abb. 4.2).

Für die (GST)-Pulldown Experimente wurden ausschließlich die letzten 220 Aminosäuren vom C-Term des BEC-1 Proteins benutzt.

Dabei wurden die Envelope Proteine von MSRV in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem synthetisiert und gleichzeitig unter Verwendung von ^{35}S die Methionine und Cysteine radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit Matrix gebundenen GST-, als Negativkontrolle, und GST- BEC-1 Lysaten inkubiert. Die matrixgekoppelten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, das anschließend mittels Autoradiographie untersucht wurde.

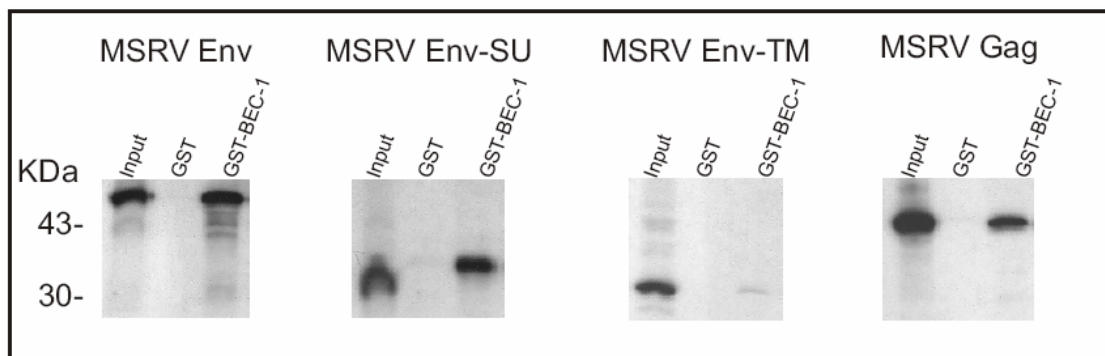


Abb. 4.2 Autoradiographie der Bindung zwischen BEC-1 (die letzten 220 Aminosäuren des Proteins) und MSRV Env, MSRV Env-SU, MSRV Env-TM und MSRV Gag. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell exprimierten GST-BEC-1 Protein und den *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten MSRV Proteinen, von denen je 1/10 als Inputkontrolle (Input) aufgetragen wurde. GST alleine dient als Negativkontrolle.

Aus den Ergebnissen der GST-Pulldown Analysen tritt hervor, dass ausschließlich der SU Bereich des Envelope Proteins und das Gag Protein an BEC-1 binden, wohingegen der TM Bereich nicht von BEC-1 präzipitiert wird.

4.1.2 Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von MSRVR Env

Um die genaue Bindungsdomäne von MSRVR Env an BEC-1 einzugrenzen, wurden verschiedene MSRVR Env Deletionsmutanten kloniert und diese anschließend im GST-Pulldown auf Bindung zu BEC-1 untersucht (Abb. 4.3)

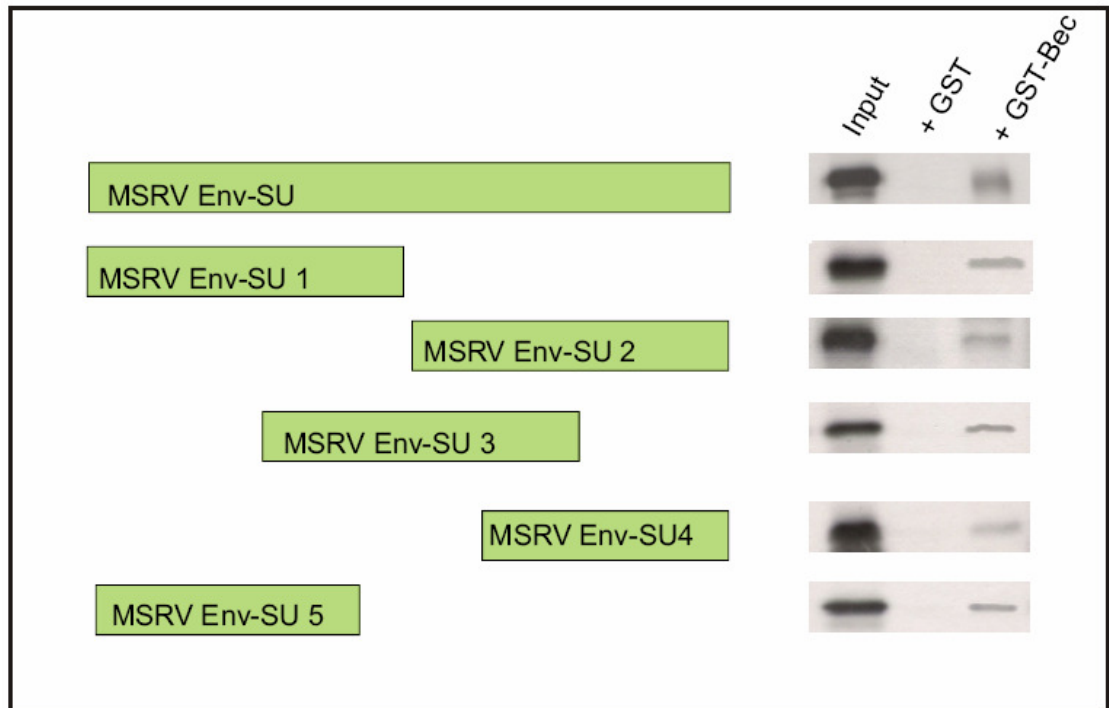


Abb. 4.3 Autoradiographie der Bindung zwischen BEC-1 (die letzten 220 Aminosäuren des Proteins) und MSRVR Env, MSRVR Env-SU1-5. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell exprimierten GST-BEC-1 Protein und den *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten MSRVR Proteinen, von denen je 1/10 als Inputkontrolle aufgetragen wurde. Die MSRVR-Env Deletionsmutanten sind schematisch dargestellt. GST alleine dient als Negativkontrolle.

Die GST-Pulldown Analyse zeigt eine Bindung zwischen allen MSRVR Deletionsmutanten und BEC-1. Aus den Ergebnissen der Experimente lässt sich keine Aussage über die Bindungsdomäne von BEC-1 an MSRVR Env machen.

4.1.3 Studien zur Bindung von Envelope Proteinen verschiedener endogener bzw. exogener Retroviren und BEC-1 in Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Experimenten

Weiterhin wurde die Interaktion zwischen BEC-1 und den Env Proteinen verschiedener endogener als auch exogener Retroviren untersucht. Dazu wurden GST-Pulldown-Experimente mit den Envelope Proteinen von HIV-1, HERV-W, HERV-K und HTLV-1 durchgeführt. Es wurde jeweils der Surface (SU) bzw. Transmembran (TM)-Bereich des Envelope Proteins eingesetzt.

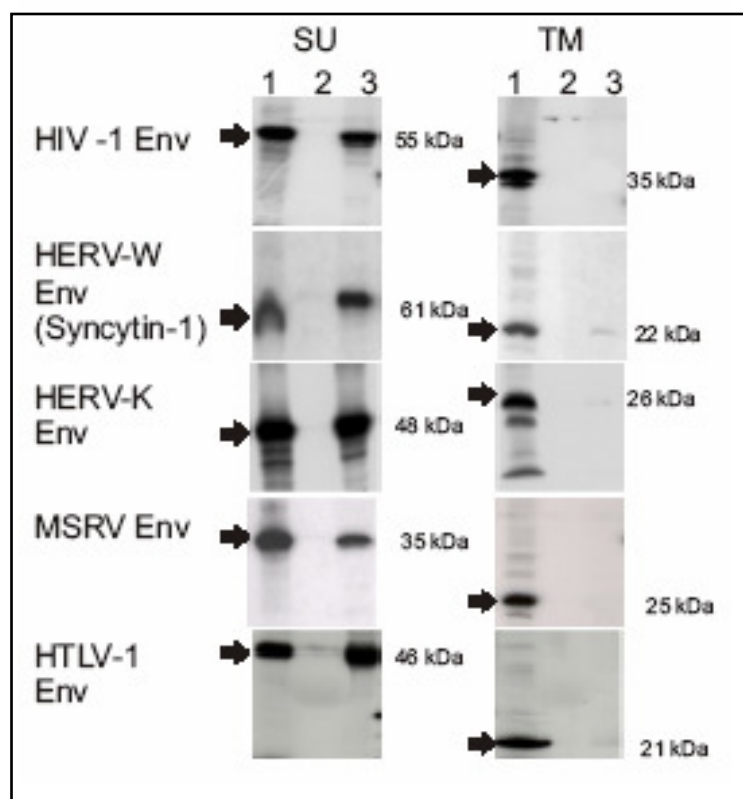


Abb. 4.4: Autoradiographie der Bindung zwischen BEC-1 (die letzten 220 Aminosäuren des Proteins) und verschiedenen Envelope Proteine (Surface-(SU) bzw. Transmembranbereich (TM)) endogener und exogener Retroviren. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit dem bakteriell exprimierten GST-BEC-1 und den *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Envelope Proteinen, von denen je 1/10 als Inputkontrolle aufgetragen wurde. GST alleine dient als Negativkontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass Env-SU Proteine verschiedener Retroviren an den spannungsabhängigen Kalium Kanal BEC-1 binden. Währenddessen keine Bindung für die Membranbereiche gezeigt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Interaktion zwischen HIV Env und BEC-1 gelegt.

4.1.4 Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von HIV Env-SU

Um die Bindungsdomänen der beiden Proteine zueinander weiter einzugrenzen, wurden GST- Pulldown Analysen mit Deletionsmutanten von HIV Env-SU und BEC-1 durchgeführt (Abb.4.5). Bei der Eingrenzung der Bindungsdomäne von BEC-1 zu HIV Env-SU wurden die HIV- Mutanten synthetisiert und gleichzeitig unter Verwendung von ^{35}S die Methionine und Cysteine radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit Matrix gebundenen GST-, als Negativkontrolle, und GST- BEC-1 Lysaten inkubiert (s.Kap.3.3.4.1). Die matrixgekoppelten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, das anschließend mittels Autoradiographie untersucht wurde. Die Abbildung 4.5 zeigt auf der linken Seite die eingesetzten HIV Env-SU-Klone und auf der rechten Seite die Autoradiographie der Pulldownanalyse. In der linken Spur sind die Inputkontrollen. Diese entsprechen 10% der in einem Ansatz eingesetzten Menge an radioaktiv markiertem Protein. In der Mitte sind die Negativkontrollen und rechts das matrixgebundene Protein GST- BEC-1. Wie bereits beschrieben, ist BEC-1 in der Lage an das Vollängen HIV Env-SU zu binden. Weiterhin zeigen die Bindungsstudien, dass alle abgebildeten Deletionsmutanten von BEC-1 präzipitiert wurden, so dass die genaue Bindungsdomäne von BEC-1 an HIV Env-SU nicht definiert werden konnte.

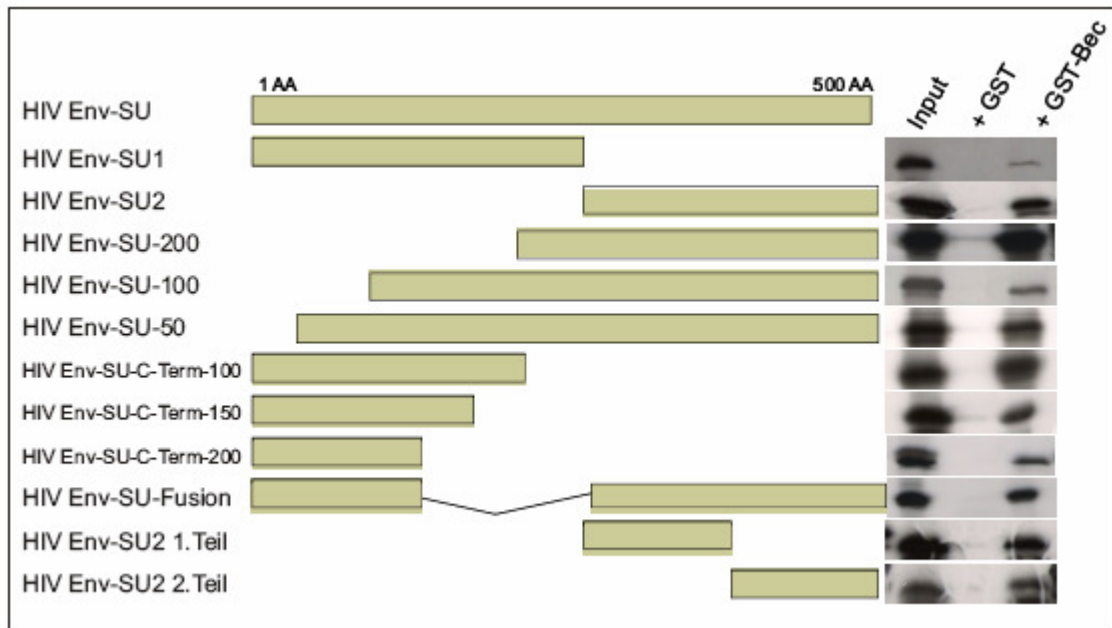


Abb. 4.5: Autoradiographie der Bindung zwischen den Deletionsmutanten HIV Env-SU1, HIV Env-SU2, HIV Env-SU-200, HIV Env-SU-100, HIV Env-SU-50, HIV Env-SU C-Term-100, HIV Env-SU C-Term-150, HIV Env-SU C-Term-200, HIV Env-SU-Fusion, HIV Env-SU2 1. Teil, HIV Env-SU2 2. Teil und BEC-1. Die Abbildung zeigt das Ergebnis mehrerer GST-Pulldown Analysen mit dem bakteriell exprimierten GST-BEC-1 Protein und den *in vitro* translatierten S^{35} radioaktiv markierten Deletionsmutanten von HIV Env SU, von denen 1/10 als Inputkontrolle aufgetragen wurde.

Da sowohl der HIV Env-SU1 als auch der HIV Env-SU2 Teil an BEC-1 binden, wurden die beiden Proteine jeweils so weit verkürzt bis sie nicht mehr binden sollten. Um zu verhindern, dass die Klone zu klein werden um sie noch *in vitro* translatieren zu können, wurden Fusionsproteine hergestellt (HIV Env-SU-Fusion).

4.1.5 Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von BEC-1

Nachdem die durchgeführten GST-Pulldown Analysen die Bindungsdomäne von BEC-1 an HIV Env-SU nicht zeigen konnten, sollten nun weitere Untersuchungen die Bindungsstelle von BEC-1 an HIV Env-SU darstellen. Alle bisher durchgeführten GST-Pulldown Analysen wurden mit diesen letzten 220

C-terminalen Aminosäuren durchgeführt. Um die Bindungsstelle spezifisch zu charakterisieren, wurden verschiedene Deletionsmutanten von *bec-1* hergestellt. Die Sequenz dieser Klone basiert auf unterschiedlichen Anteilen der letzten 220 C-terminalen Aminosäuren. BEC-1 C-Term wurde in zwei gleiche Stücke (BEC1.1 und BEC1.2) geteilt und in den pGEX Vektor kloniert (Abb. 4.6).

Die Durchführung erfolgte analog der bereits beschriebenen GST-Pulldown Analysen. Die Abbildung 4.6 zeigt die Bindungsanalyse von HIV Env-SU und den verkürzten BEC-1 Klonen BEC1.1 und BEC1.2.

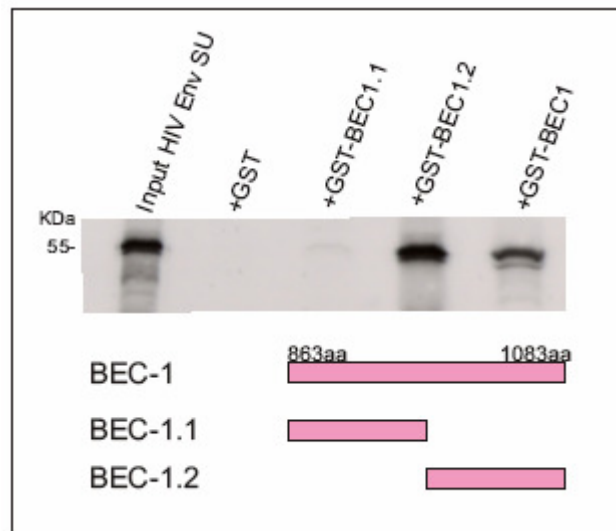


Abb. 4.6: Autoradiographie der Bindung zwischen BEC-1, den Deletionsmutanten BEC1.1, BEC1.2 und HIV Env-SU. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer GST-Pulldown Analyse mit den bakteriell exprimierten GST-BEC-1, GST-BEC1.1, GST-BEC1.2 Proteinen und dem *in vitro* translatierten ^{35}S radioaktiv markierten HIV Env SU, von denen 1/10 als Inputkontrolle aufgetragen wurde.

Die Bindungsstudien konnten darstellen, dass das HIV Env-SU Protein ausschließlich an BEC1.2 bindet (Spur 4), erkennbar durch eine Bande bei 55 kDa. Wohingegen HIV Env-SU durch BEC1.1 nicht präzipitiert wird. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsregion von HIV Env-SU an BEC-1 auf die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren beschränkt ist.

4.2 Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen BEC-1

Zum immunologischen Nachweis von BEC-1 wurde ein Kaninchen Anti-Serum hergestellt. Dafür wurden die Kaninchen mit dem C-Term des BEC-1 Proteins (die letzten 260 Aminosäuren) immunisiert. Zur Kontrolle ob das Serum spezifisch BEC-1 erkennt, wurden Kompetitionsstudien durchgeführt, welche in der Abbildung 4.7 dargestellt sind.

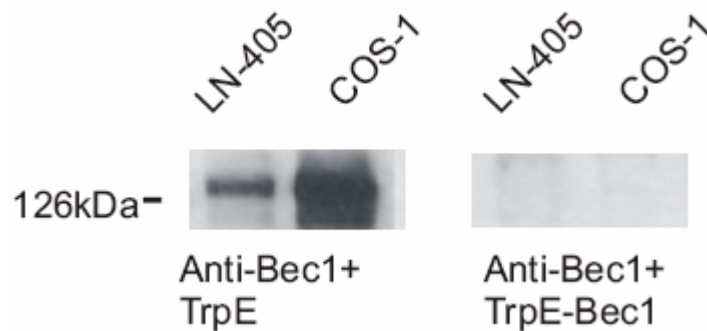


Abb. 4.7 Kompetition des BEC-1 Serums im Western Blot

LN-405 und COS-1 Zellen wurden mit EGFP-BEC-1 transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im linken Teil der Abbildung kann man bei 126 kDa das BEC-1 Protein erkennen. Dieser Blot wurde mit Anti-BEC-1 Serum, das mit dem bakteriell exprimierten TrpE-Protein kompetitiert wurde, gefärbt. Der rechte Blot wurde mit Anti-BEC-1 Serum, das mit TrpE-BEC-1 Protein (der Bereich des Proteins mit dem immunisiert wurde) kompetitiert wurde, gefärbt. BEC-1 wird nicht mehr erkannt.

Im Versuch konnte gezeigt werden, dass BEC-1 mit TrpE-BEC-1 absorbiert werden kann. Dies ist ein Beweis für die Spezifität des BEC-1 Serums. Da TrpE-BEC-1 den Proteinbereich darstellt mit dem immunisiert wurde. Somit

war für die weiteren Versuche sicher gestellt, dass das Serum spezifisch BEC-1 erkennt.

4.3 Lokalisierung des Kalium Kanals BEC-1 in vivo

Da in den Pulldownanalysen nachgewiesen werden konnte, dass das retrovirale HIV Env-SU Protein mit dem Kalium Kanal BEC-1 *in vitro* interagiert, stellte sich die Frage ob beide Proteine auch unter nativen Bedingungen assoziieren und sich deren Kolokalisation in Zellen darstellen lässt. Um festzustellen ob beide Proteine in denselben Kompartimenten exprimiert werden, so dass die Voraussetzung einer Kolokalisation gegeben ist, wurden Lokalisations- und Kolokalisationsversuche mittels konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden BEC-1 und HIV Env-SU entweder als grün oder rot leuchtende Fusionsproteine exprimiert. BEC-1 wurde in den pEGFP-C1 Vektor und HIV Env-SU in den pDsRed Vektor kloniert. Wobei der pEGFP Vektor für ein grün leuchtendes Protein (EGFP: enhanced green fluorescent protein) und der pDsRed Vektor für ein rot leuchtendes Protein kodiert. Es wurden COS-1 Zellen mit den Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden fixiert. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Der Nachweis der Kolokalisation erfolgte durch Übereinanderlagerung der Bilder, so dass Signale kolokalisierender Proteine gelb erscheinen.

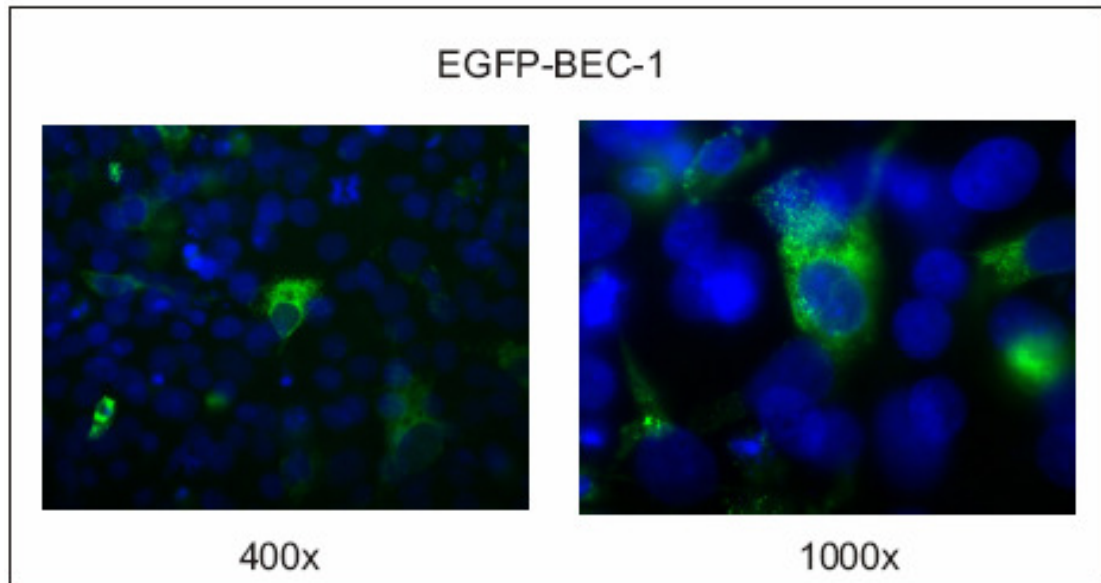


Abb. 4.8 Lokalisation von EGFP-BEC-1. Die Bilder zeigen COS-1 Zellen, die mit pEGFP-BEC-1 transfiziert wurden. Die Fixierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Zum Nachweis der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die DAPI gefärbten Zellkerne erscheinen blau. Die Bilder wurden bei 400facher und 1000facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop und dem angeschlossenen Bildbearbeitungsprogramm erstellt.

Die Abbildung 4.8 zeigt die Lokalisation des Kalium Kanals BEC-1 in der Zelle. Die Aufnahmen verdeutlichen, dass BEC-1 in zytoplasmatischen Kompartimenten exprimiert wird. Möglich ist, dass der Kalium Kanal BEC-1 in den Membranen der Zellkompartimente lokalisiert ist.

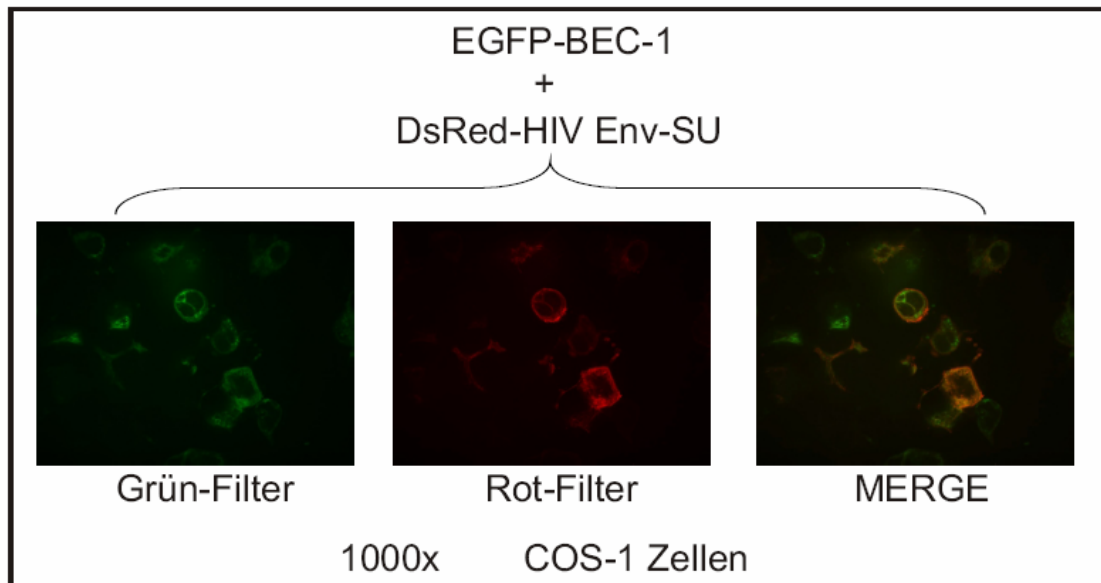


Abb. 4.9 Kolokalisation von EGFP-BEC-1 und Ds-Red-HIV Env-SU

Die Bilder zeigen COS-1 Zellen, die mit pEGFP-BEC-1 und pDs-Red-HIV Env-SU kotransfiziert wurden. Die Fixierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Im rechten Bild ist die Überlagerung der Bilder gezeigt (MERGE). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop und dem angeschlossenen Bildbearbeitungsprogramm erstellt. Das grünfluoreszierende BEC-1 Protein ist im Grün-Filter und das rotfluoreszierende HIV Env-SU Protein im Rot-Filter zu erkennen.

In Abbildung 4.9 ist die Kolokalisation von BEC-1 mit HIV Env-SU gezeigt.

Die Aufnahmen verdeutlichen, dass sich die Proteine BEC-1 und HIV Env-SU in den gleichen zytoplasmatischen Kompartimenten befinden, was durch die Überlagerung beider Fluoreszenzen (MERGE) bestätigt wird. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass auch eine *in vivo* Interaktion angenommen werden kann.

4.4 Expression des spannungsabhängigen Kalium Kanal BEC-1 in HIV Zielzellen

In den Arbeiten von Smith et al. (2002) und 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 Telencephalons als auch in hämatopoetischen Zellen nachweisbar ist. Um die Charakterisierung der Expression des BEC-1 Kanals fortzuführen, wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten weitere Zelllinien auf die Expression des Kanals mittels RT (reverse transkription)-PCR untersucht. Diese Arbeiten zeigten, dass BEC-1 in diversen Zelllinien wie COS-1, Tera-1, 293T, Hela, in Astrozytomzelllinien wie GOS-3 und LN-405 und außerdem in HIV Zielzellen wie Jurkat und A3.01 exprimiert wird (Dissertation Pearl v. Heteren; Praktikum Natasha Shalginskikh).

Um nun auch die Expression auf Proteinebene zu belegen wurden Immunpräzipitationen mit Jurkat, A3.01, PBMCs, Makrophagen und CD4 positiven T-Zellen gemacht.

Dabei wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt und mit dem polyklonalen Anti-BEC-1 Serum Immunpräzipitationen durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Gels elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western Blot sichtbar gemacht (Abb. 4.10). Dabei konnte in allen getesteten Zellen das 126 kDa große BEC-1 detektiert werden.

Die Annahme, dass BEC-1 auch von HIV Zielzellen exprimiert wird, konnte bestätigt werden.

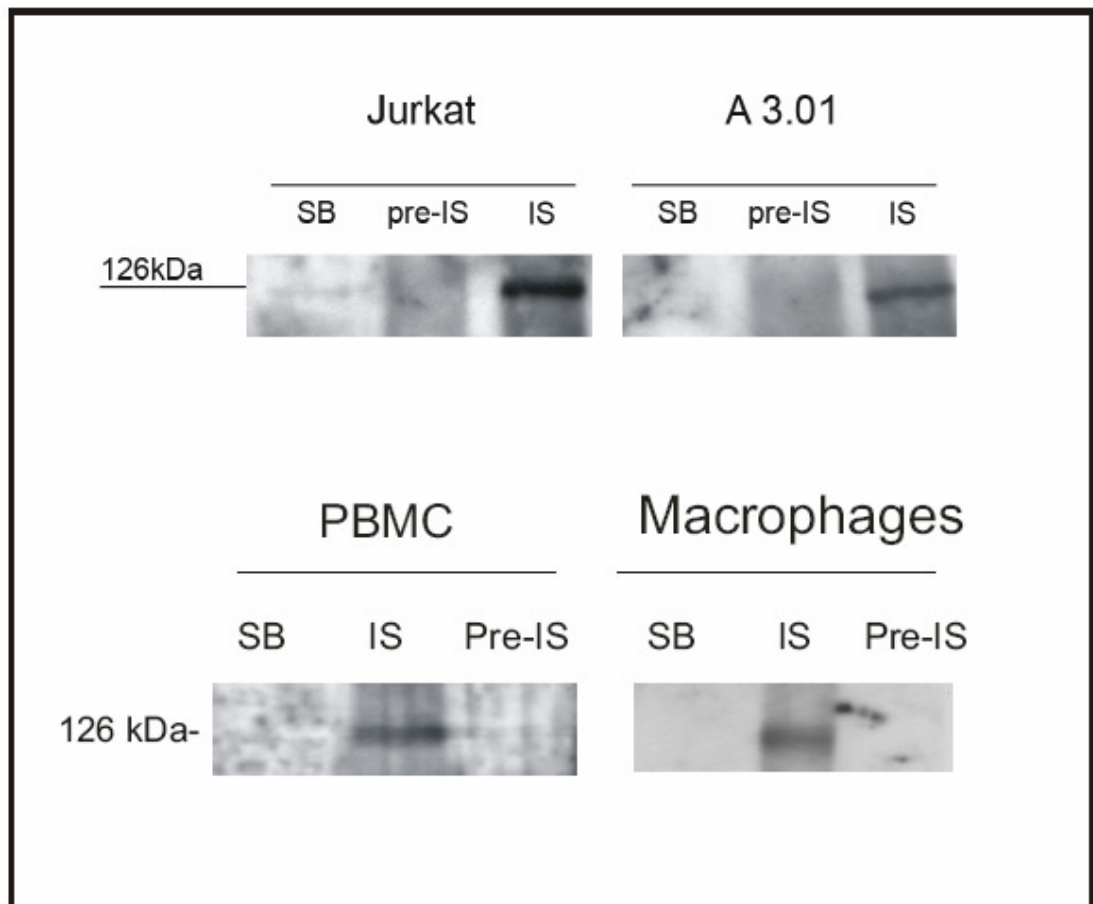


Abb. 4.10 Expression des Kalium Kanals BEC-1 in HIV Zielzellen. Die vier Western Blots zeigen Immunpräzipitationen mit Jurkat, A3.01, PBMCs und Makrophagen mit Hilfe des Anti-BEC-1 Serums und Anti-BEC-Präserum (Pre-IS) als Negativkontrolle. Alle Western Blots wurden mit dem Anti-BEC-1 (1:1000) Serum gefärbt. Gesamtzellextrakte (SB) wurden aufgetragen.

4.5 Nachweis der *in vivo* Interaktion des HIV Env-SU Proteins mit dem zellulären BEC-1 Kalium Kanal durch Koimmunpräzipitation

Um die Interaktion zwischen BEC-1 und HIV Env-SU in einem weiteren Testsystem zu überprüfen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Koimmunpräzipitationen sind geeignet, um eine Interaktion *in vivo* nachzuweisen. Dabei wurden 293T Zellen mit pSG5-HA-HIV Env-SU/TM transfiziert (s.Kap.3.3.4.2). pSG5-HA-HIV Env-SU/TM exprimiert HIV Env-SU bzw. HIV Env-TM mit C-terminalem HA Tag. 48h nach der Transfektion wurden aus den Zellen native Proteinextrakte hergestellt und zur Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Anti-BEC-1 Serum eingesetzt. Zur Kontrolle wurde Immunpräzipitation mit dem Präserum von BEC-1 durchgeführt. Bindet das zelluläre BEC-1 an HIV Env, so entsteht ein Immunkomplex. Dieser bindet an die Protein-G-Sepharose.

Anschließend wurden die Proben durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die Proteine mit Hilfe eines Western Blots sichtbar gemacht.

In der Abbildung 4.11 wurde im Western Blot das BEC-1 Protein mit dem polyklonalen Anti-BEC-1 Serum und die HIV Env Proteine mit monoklonalem Anti-HA-Serum nachgewiesen.

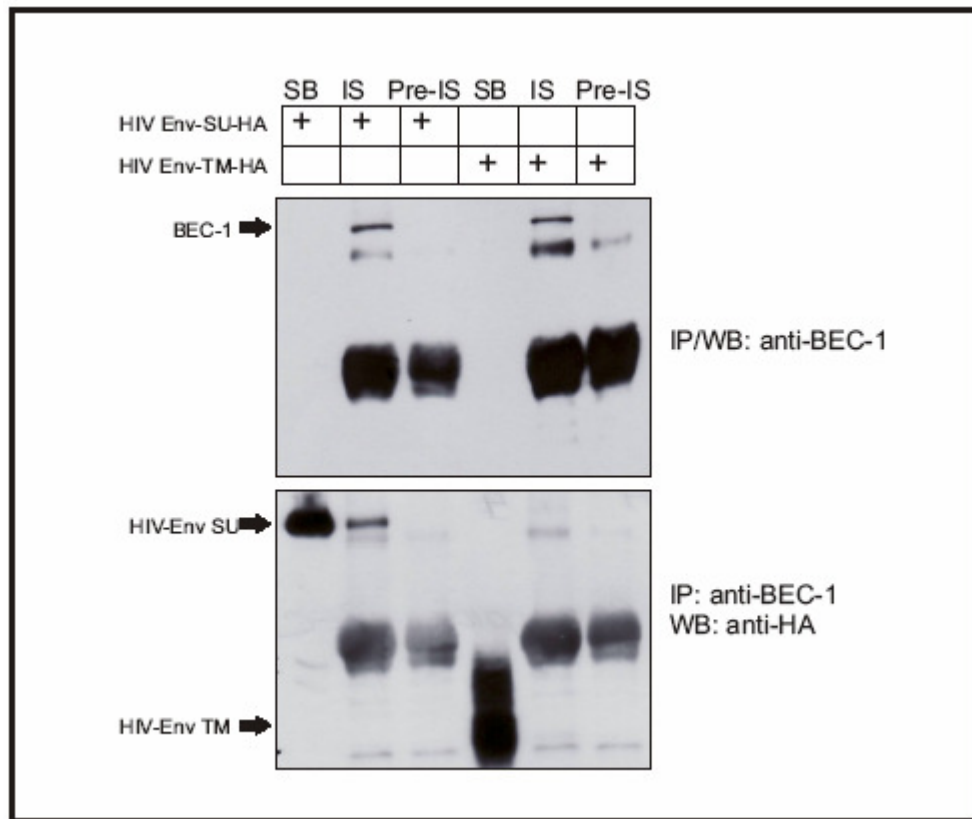


Abb. 4.11 Koimmunpräzipitation von HIV Env-SU durch matrixassoziiertes zelluläres BEC-1 Protein. 293T Zellen wurden mit pSG5-HIV Env-SU-HA bzw. pSG5-HIV Env-TM-HA transfiziert. Der obere Western Blot zeigt das mit Anti-BEC-1 Serum präzipitierte BEC-1 Protein (IS). In der Kontrollspur (Pre-IS) wurde das Präserum von BEC-1 eingesetzt. Im unteren Blot ist das kopräzipitierte HIV Env-SU in der Spur IS zu erkennen. In den Zellen, die mit HIV Env-TM transfiziert wurden, ist kein kopräzipitiertes Protein zu erkennen. Die mit der Protein G- Sepharose assoziierten Proteine wurden in einem 10%igen SDS Gel aufgetrennt und anschließend in einem Western Blot analysiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Anti-BEC-1 Serum und Anti-HA-Serum nachgewiesen. In den Spuren, die mit SB gekennzeichnet sind, wurden die Gesamtzellextrakte aufgetragen.

Die Koimmunpräzipitation bestätigt die Ergebnisse der GST-Pulldown Analysen. HIV Env-SU bindet auch *in vivo* an den Kalium Kanal BEC-1 wohingegen HIV Env-TM nicht vom zellulären BEC-1 kopräzipitiert wird.

4.6 Nachweis der *in vivo* Interaktion des HIV Env-SU Proteins mit der Deletionsmutante BEC2600 durch Koimmunpräzipitation

Um die Spezifität der *in vivo* Interaktion zu zeigen, wurde eine um 110 Aminosäuren verkürzte Deletionsmutante von BEC-1 (BEC2600) hergestellt, die nicht mehr an HIV Env-SU binden kann (s.Kap.4.1.5).

Diese Deletionsmutante wurde zur Expression im eukaryotischen System in den pSG5 Vektor kloniert und dabei zur Erkennung im Western Blot ein C-terminales Flag-Tag angehängt.

Danach wurde diese Mutante in Koimmunpräzipitationen auf die Bindung zu HIV Env-SU getestet. Hierfür wurden erneut 293 T Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und mit Anti-Flag Antikörper (SIGMA) präzipitiert.

In der folgenden Abbildung 4.12 ist eine Koimmunpräzipitation mit BEC-1, BEC2600 und HIV Env-SU zu sehen.

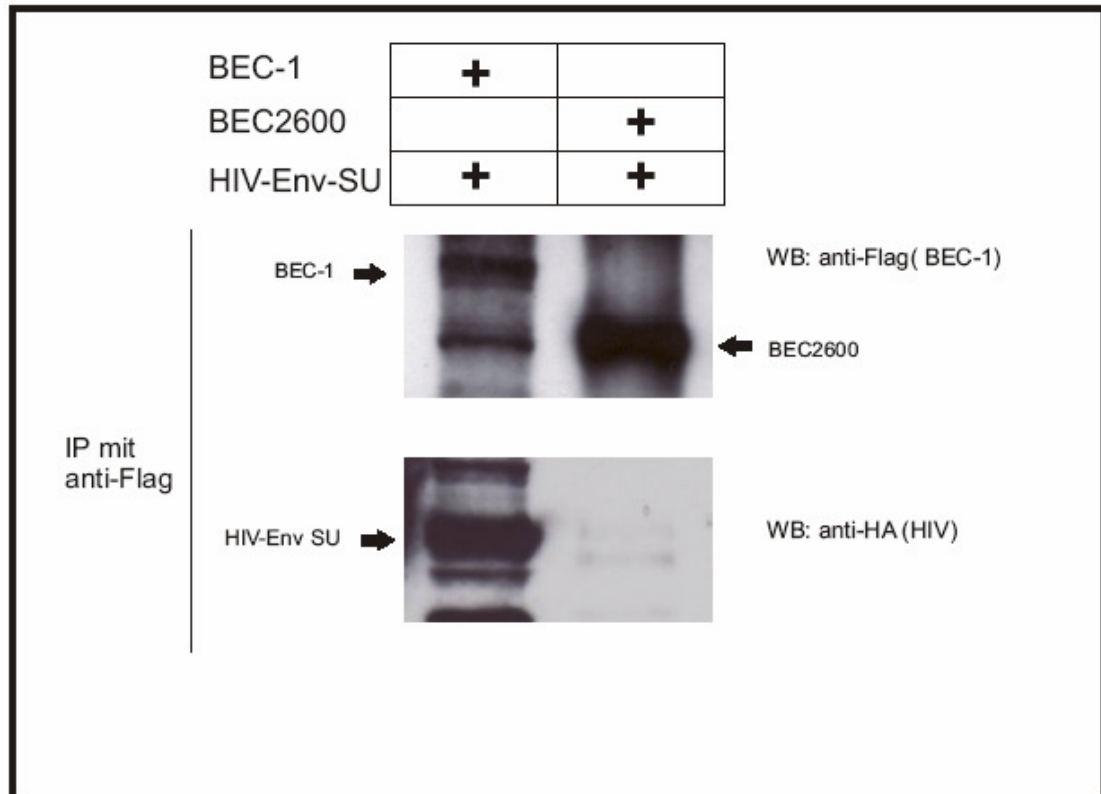


Abb. 4.12 Koimmunpräzipitation von HIV Env-SU-HA durch matrixassoziertes BEC-1 und BEC2600 Protein. 293T Zellen wurden mit BEC-1 bzw. BEC2600 (beide mit C-terminalem Flag-Tag) und HIV Env-SU-HA kotransfiziert (s. obere Reihe). Der obere Western Blot zeigt die mit Anti-Flag Antikörper präzipitierten BEC-1 und BEC2600 Proteine (durch Pfeile gekennzeichnet). Im unteren Blot ist das von BEC-1 kopräzipitierte HIV Env-SU in der ersten Spur zu erkennen. In den Zellen, die mit HIV Env-SU und der Deletionsmutante BEC2600 transfiziert wurden, ist kein kopräzipitiertes Protein zu erkennen. Die mit der Protein G- Sepharose assoziierten Proteine wurden in einem 10%igen SDS Gel aufgetrennt und anschließend in einem Western Blot analysiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Anti-Flag Antikörper und Anti-HA-Serum nachgewiesen.

Mit diesen Koimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die Deletionsmutante BEC2600 nicht mehr an HIV Env-SU bindet und so für weitere Experimente als Kontrolle benutzt werden konnte.

4.7 Zellwachstum in Abhängigkeit der BEC-1 Expression

Hier sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße das Zellwachstum als auch die Apotoserate (siehe Kap. 3.4.2) von 293T Zellen durch rekombinant exprimiertes BEC-1 bzw. der Deletionsmutante BEC2600 beeinflusst sind. Zur Versuchsdurchführung der Untersuchung des Zellwachstums wurden 3×10^5 293T-Zellen in 96 Loch Platten ausgesät und mit BEC-1 bzw. BEC2600 transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des „*Cell Proliferation Kit*“ (MTT-Assay) der Firma Roche behandelt und am Photometer gemessen. Bei diesem Test nehmen lebende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um, der nachdem die Zellen lysiert sind am Photometer messbar ist. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Diese gemessenen Werte wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Anhand der Abbildung 4.13 kann man erkennen, dass untransfizierte sowie transfizierte Zellen gleich gut wachsen.

Somit lässt sich sagen, dass BEC-1 keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von 293T-Zellen hat.

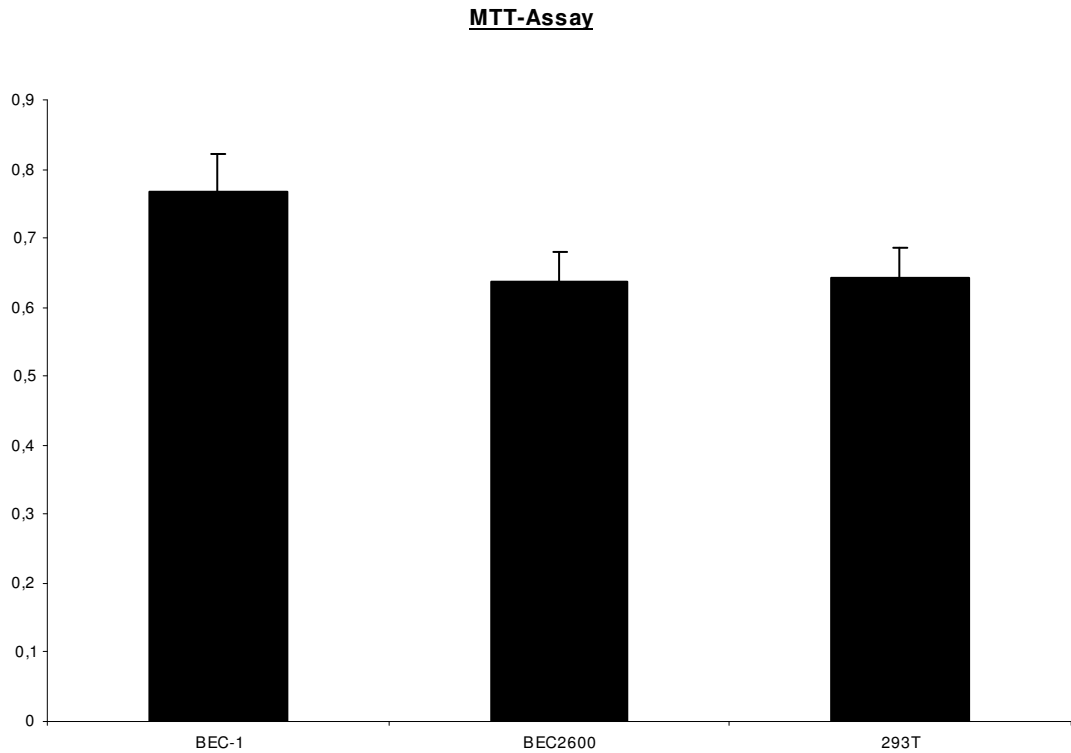


Abb. 4.13: Zellwachstum in Abhängigkeit der BEC-1 bzw BEC2600 Expression

Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen mit dem Farbstoff Formazan behandelt und nach weitem 4 Stunden lysiert („Cell Proliferation Kit I“ (MTT-Assay) Firma Roche). Die Wachstumsrate wurde ermittelt, indem die Absorption im Microelisa® Auto Reader der Firma Dynatech gemessen wurde. Die Werte wurden in einem Balkendiagramm dargestellt.

4.8 Nachweis der Funktionalität des BEC-1 Kanals

Ob der BEC-1 Kalium Kanal *in vivo* aktiv ist, sollte mit Hilfe des FluxOR™ Thallium Assay Kits der Firma Invitrogen gezeigt werden. Dieser Test nutzt die Tatsache, dass alle Kalium Kanäle gleichermaßen permeabel für Thallium sind wie für Kalium, so dass der Thallium Einstrom als Ersatz-Indikator für die Aktivität des Kalium Kanals wirkt. Der Test beruht auf der Aktivierung eines neuen Fluoreszenz-Farbstoffes FluxOR™, welcher eine hohe Affinität zu Thallium besitzt. Die Aktivität des Kalium Kanals wird in einer fluorogenen Antwort ausgedrückt, welche proportional zu den geöffneten Kalium Kanälen in der Zelle ist. Die Abbildung 4.14 zeigt schematisch das Prinzip des Tests. Als Kontrolle zur Funktion des Tests wurde ein Kontroll Kanal (hERG) mitgeliefert, der mit Hilfe eines Baculo Systems in die Zelle gebracht wurde.

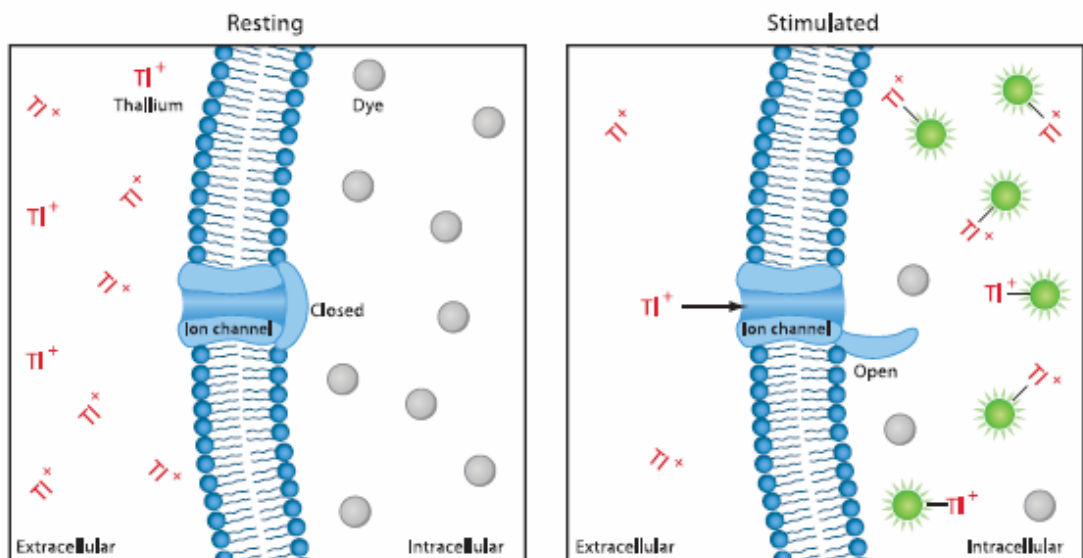


Abb. 4.14 Prinzip des FluxOr Thallium Detection Kits

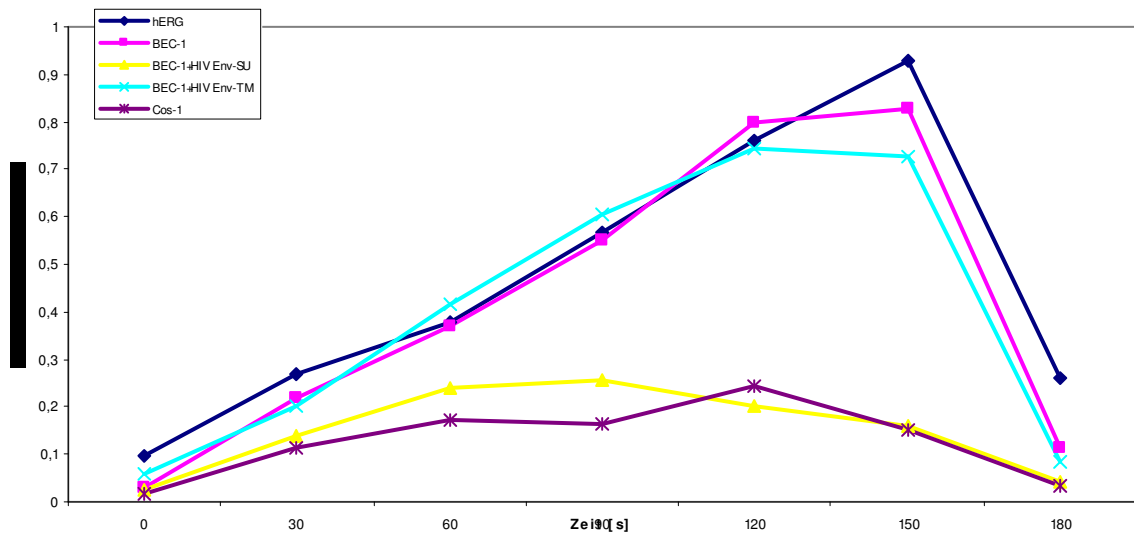
Zuerst werden die Zellen mit dem Thallium-sensitiven FluxOR™-Farbstoff (Dye) geladen. Während des Tests wird eine kleine Menge an Thallium und einem Stimulator (Kalium) in den extrazellulären Bereich gebracht. Thallium strömt dann in die Zelle proportional zu der Zahl an geöffneten Kalium-Kanälen, resultierend in einem Fluoreszenz-Signal. Die Emission kann dann in einem Photometer in Abhängigkeit von der Zeit gemessen werden (490 nm).

Um die Funktionalität des spannungsabhängigen BEC-1 Kanals zu bestimmen, wurden COS-1 Zellen mit BEC-1 und dem Kontrollkanal hERG transfiziert. Nach 48 Stunden (mit hERG transfizierte Zellen nach 24h) wurden die transfizierten Zellen in 96 Lochschalen überführt und nach Anleitung des FluxOR Thallium Detection Kits behandelt (s. 3.6.1). In der Abbildung 4.15 ist ein Diagramm der mit dem Photometer gemessenen Emissionswerte in Abhängigkeit von der Zeit aufgeführt. Dabei wurde beim Zeitpunkt 0 der Kaliumkanal stimuliert und zeigt im Verlauf von 150-180 Sekunden eine Aktivierung. Nach 180 Sekunden ist die Reaktion abgelaufen und die Kurve fällt schlagartig ab. Mit Hilfe des FluxOR Thallium Assays konnte gezeigt werden, dass BEC-1 als Kalium Kanal funktional ist. Die emittierten Werte stimmen annähernd mit denen des Kontrollkanals (hERG) überein.

4.8.1 Einfluss der HIV Env Proteine auf die Funktionalität des BEC-1 Kanals

Um zu zeigen, dass die HIV Env Proteine Einfluss auf die Funktionalität des BEC-1 Kalium Kanals ausüben, wurden Zellen gleichzeitig mit BEC-1 und HIV Env-SU bzw. HIV Env-TM transfiziert. Bei den Zellen, die mit HIV Env-SU kotransfiziert waren, ist eine Reduktion der Transporterfunktion des BEC-1 Kanals zu erkennen. Wohingegen die Funktionalität, gemessen anhand des emittierten Lichts, bei einer Kotransfektion mit HIV Env-TM annähernd gleich bleibend ist.

Somit kann eine Hemmung der Funktionalität des Kanals in Zusammenhang mit der Interaktion mit HIV Env Proteinen festgestellt werden (Abb. 4.15).



BEC-1	+	+	+
HIV Env-SU	-	+	-
HIV Env-SU	-	-	+



WB: Anti-BEC-1



WB: Anti-HA



WB: Anti-HA

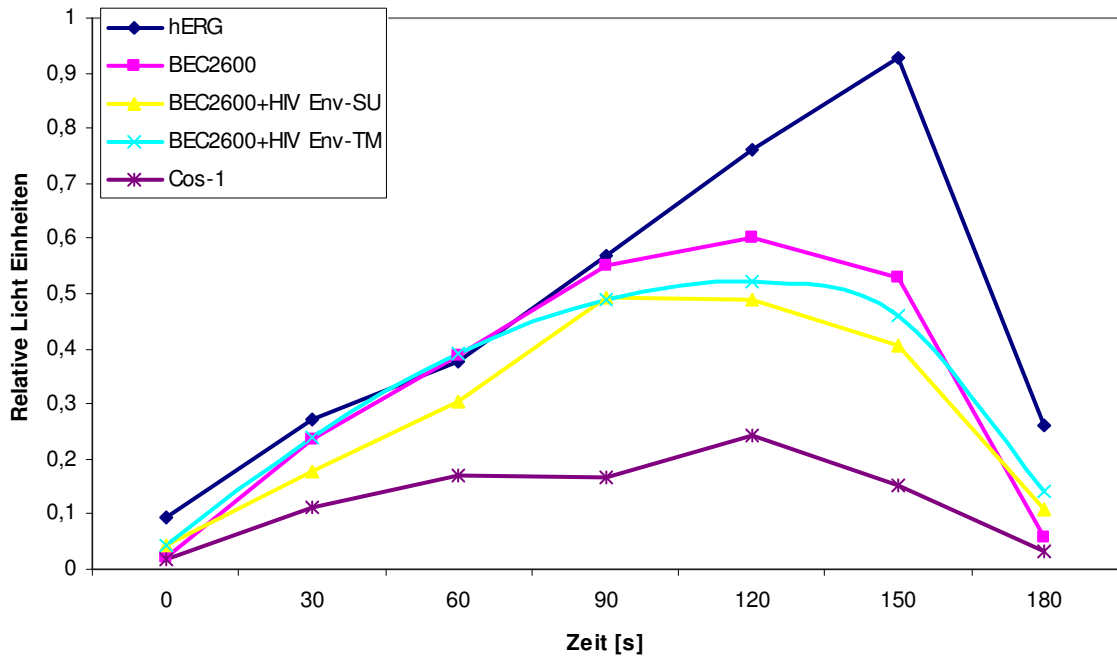
Abb. 4.15 Diagramm zur Funktionalität des BEC-1 Kanals

COS-1 Zellen wurden mit den Konstrukten BEC-1, HIV Env-SU und HIV Env-TM und dem Kontrollkanal hERG transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in eine 96 Loch Schale überführt und nach Anleitung des Protokolls des FluxOR Thallium Detection Assay behandelt. Die Emission wurde im Photometer bei 490nm gemessen. Auf der Abszisse ist die Zeit [s] und auf der Ordinate Werte der Absorption (Relative Lichteinheiten) aufgetragen.

Im unteren Teil der Abbildung ist die Expressionskontrolle von BEC-1 sowie der HIV Env-Su sowie HIV Env-TM Konstrukte im Western Blot zu sehen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit anti-BEC-1- oder Anti-HA Serum angefärbt.

4.8.2 Funktionalität der BEC-1 Deletionsmutante und Einfluss der HIV Env Proteine

Nach den Ergebnissen der Koimmunpräzitationen wurde eine Mutante von BEC-1 identifiziert, die nicht mehr mit HIV Env-SU interagiert. Um Auswirkungen der Interaktion von HIV Env-SU mit BEC-1 auf die Funktion des BEC-1 Kalium Kanals zu zeigen, wurde die Mutante in diesen Assays getestet. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 4.16 dargestellt.



BEC2600	+	+	+
HIV Env-SU	-	+	-
HIV Env-TM	-	-	+



WB: Anti-Flag

WB: Anti-HA

WB: Anti-HA

Abb. 4.16 Diagramm zur Funktionalität der BEC-1 Mutante „BEC2600“

COS-1 Zellen wurden mit den Konstrukten BEC2600, HIV Env-SU und HIV Env-TM und dem Kontrollkanal hERG transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in eine 96 Loch Schale überführt und nach Anleitung des Protokolls FluxOR Thallium Detection Assay behandelt. Die Emission wurde im Photometer bei 490nm gemessen. Auf der Abszisse ist die Zeit [s] und auf der Ordinate Werte der Absorption (Relative Lichteinheiten) aufgetragen.

Im unteren Teil der Abbildung ist die Expressionskontrolle der BEC2600 Deletionsmutante sowie der HIV Env-Su sowie HIV Env-TM Konstrukte im Western Blot zu sehen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit anti-Flag Antikörper oder Anti-HA Serum angefärbt.

Dass sich die Absorptionswerte des Kontroll-Kanals und der BEC2600 Deletionsmutante gleichen, ist ein Beweis, dass BEC2600 auch als Kalium Kanal funktionell ist. Jedoch zeigt sie ein um 25% gemindert Maximum des Fluoreszenz Signals im Vergleich zum Vollängen BEC-1. Daraus kann gefolgert werden, dass durch das Verkürzen des C-Terminus von BEC-1 die Transporterfunktion von BEC-1 beeinflusst wird.

Als Kontrolle wurden COS-1 Zellen ohne Transfektion benutzt, die keine Absorption zeigen. Transfiziert man COS-1 Zellen mit der nicht-bindenden Deletionsmutante BEC2600 und HIV Env-SU bzw. HIV Env-TM, kann aufgrund der nicht vorhandenen Interaktion der Proteine auch kein Einfluss auf die Funktionalität des Kanals beobachtet werden.

4.8.3 Dosisabhängigkeit der Reduktion der Transporterfunktion des BEC-1 Kanals von HIV Env-SU

Zur weiteren Charakterisierung der Einwirkung der HIV Env Proteine auf die Transporterfunktion des BEC-1 Kanals wurden sinkende Mengen an HIV Env-SU in den Assay eingesetzt, um eine tatsächliche Verbindung zwischen der Interaktion und des Einflusses auf die Funktionalität des Kalium Kanals aufzuzeigen. Somit sollte eine Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

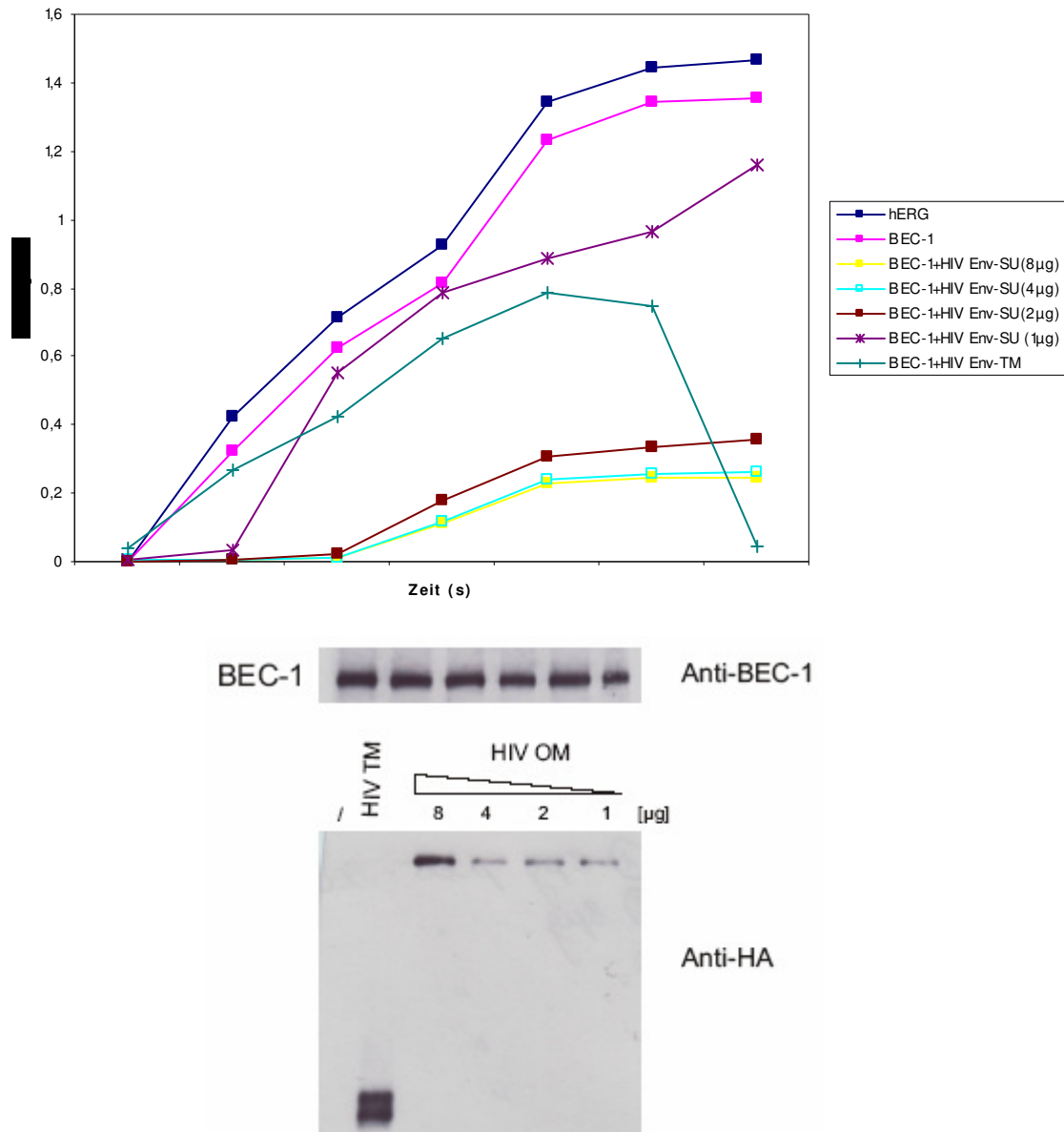


Abb. 4.17 Funktionalität des BEC-1 Kanals in Dosisabhängigkeit von HIV Env-SU. COS-1 Zellen wurden mit den Konstrukten BEC-1, sinkenden Mengen an HIV Env-SU und HIV Env-TM un dem Kontrollkanal hERG transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in eine 96 Loch Schale überführt und nach Anleitung des Protokolls FluxOR Thallium Detection Assay behandelt. Die Emission wurde im Photometer bei 490nm gemessen. Im unteren Teil der Abbildung ist die Expressionskontrolle von BEC-1 sowie der HIV Env-Su und HIV Env-TM Konstrukte im Western Blot zu sehen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit anti-Flag Antikörper oder Anti-HA Serum angefärbt.

Auffälligerweise resultiert die Koexpression von BEC-1 und HIV Env-SU in einer starken Unterdrückung der BEC-1 Leitfähigkeit im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen. Nimmt man sinkende Mengen an HIV Env-SU (8-1µg), so kann man einen dosisabhängigen Effekt erkennen (Abbildung 4.17).

4.9 Inhibierung des Partikel-Release durch BEC-1

In früheren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des HIV-1 Vpu mit dem humanen Kalium Kanal TASK-1 den von Vpu ausgelösten HIV-1 Partikel Release inhibiert (Hsu et al., 2004). Ob der Interaktion von HIV Env-SU und BEC-1 ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt, soll durch folgende Experimente herausgefunden werden. In der Abbildung 4.18 ist das Prinzip des Tests gezeigt. Dabei wurden 293 T Zellen mit dem Vollängen BEC-1 bzw. mit der Deletionsmutante BEC2600 transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen erneut mit dem HIV-1 Provirus Konstrukt transfiziert. Die Überstände der pseudotypisierten HIV-1 Partikel wurden 48 Stunden später geerntet und die Viruslast wurde mit Hilfe eines p24 ELISAs und durch Messung der *Renilla Luziferase* Aktivität in PM1 Zellen, die mit den Überständen infiziert wurden, bestimmt. Der HIV-1 Partikel-Release der 293T Zellen, die mit BEC-1 transfiziert waren, wurde auf 100% gesetzt (s.Kap.3.8). Die Abbildung 4.19 zeigt, dass der Partikel-Release in den 293T Zellen, die das Vollängen BEC-1 exprimieren, im Vergleich zu den Zellen, die BEC2600 exprimieren, um das zweifache reduziert ist. Diese 50%ige Reduktion wurde konsequent in beiden (p24 und *Renilla Luziferase* Aktivität) gemessen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Interaktion von HIV-1 mit dem überexprimierten BEC-1 in 293T Zellen das HIV-1 Partikel Release inhibiert. Da diese Inhibierung nur beim Vollängenprotein zu erkennen ist, kann weiter gefolgert werden, dass dieser Effekt auf die Interaktion von HIV-1 mit dem C-Term von BEC-1 zurückzuführen ist.

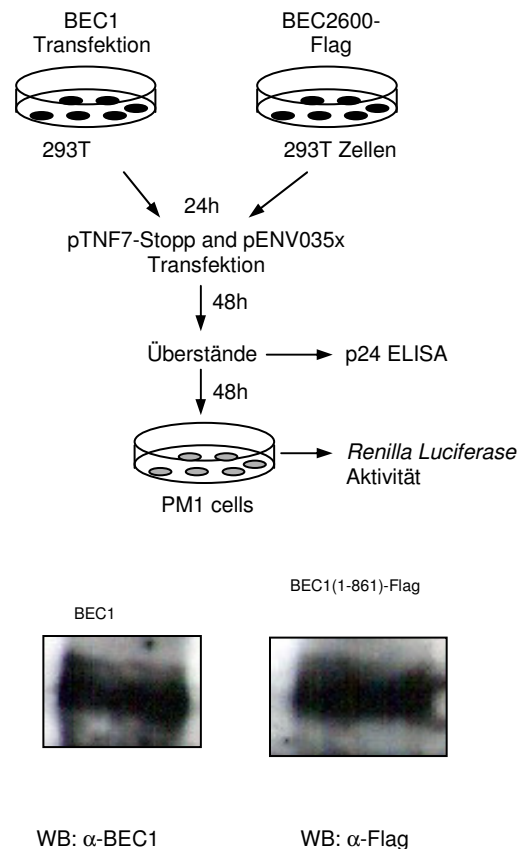


Abb. 4.18 Prinzip des Experiments zur Bestimmung des HIV-1 Partikel Release unter Einfluss von BEC-1. 293 T Zellen wurden entweder mit dem Volllängen BEC-1 oder mit der Deletionsmutante BEC2600 transfiziert. 24h später wurden die Zellen mit dem Env-defekten HIV-1 Klon (pTN7-Stop), der ein *Renilla Luziferase* Gen enthält und einem R5-tropen *env* Plasmid (pENV035x) transfiziert. Der HIV-1 Partikel Release in den Überständen wurde durch p24 ELISA und durch die Messung der *Renilla Luziferase* Aktivität in mit den Überständen infizierten PM1 Zellen gemessen. Im unteren Teil der Abbildung befindet sich ein repräsentativer Western Blot, der die Expression von BEC-1 und BEC2600 zeigt.

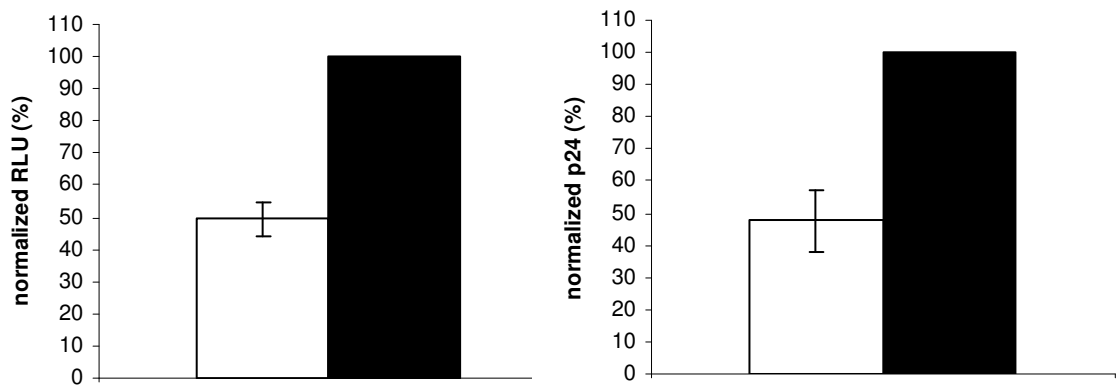


Abb. 4.19 BEC-1 inhibiert den HIV-1 Partikel Release. Der Einfluss von BEC-1 auf den HIV-1 Partikel-Release wurde in 293T Zellen, die entweder mit BEC-1 oder dem BEC2600 Konstrukt, das um die interagierende Dömäne verkürzt ist, transfiziert waren. Das Release der HIV-1 Partikel in den Überständen wurde durch p24 ELISA (rechte Seite) und durch die Messung der *Renilla Luziferase* Aktivität (linke Seite) bestimmt. Der HIV Partikel Release der 293T Zellen transfiziert mit BEC-1 wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind in „relativen light units (RLU)“ normalisiert mit den p24 Werten angegeben. Die gezeigten Daten repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.