

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die retrovirale Replikation hängt vom dynamischen Zusammenspiel zwischen retroviralen und zellulären Proteinen ab. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die envelope Proteine von endogenen und exogenen Retroviren an den Kaliumkanal Bec-1 binden. Mit Hilfe von GST-Pulldownanalysen konnte die Bindung der Env-SU Bereiche von MSRV, HERV-K, HERV-W, HTLV-1 und HIV-1 an BEC-1 nachgewiesen werden. Auffällig an diesen Analysen war, dass nur die Env-SU Proteine, im Gegensatz zu den Env-TM Proteinen, mit den letzten 110 C-terminalen Aminosäuren des BEC-1 Proteins interagierten. Bei der engeren Kartierung der Binderegion auf Seiten des MSRV- bzw. HIV Env-Proteins interagierten alle Deletionsmutanten mit BEC-1. So muss man von mehreren Bindungsdomänen innerhalb des Proteins ausgehen. Im Folgenden wurde der weitere Fokus der Arbeit auf die Interaktion zwischen HIV-1 und dem spannungsabhängigen Kalium Kanal BEC-1 gerichtet und auf funktioneller Ebene näher untersucht.

Konfokal-mikroskopischen Analysen zufolge ist BEC-1 in den zytoplasmatischen Kompartimenten exprimiert. Eine Kotransfektion von EGFP-BEC-1 und DsRed-HIV Env-SU zeigt eine Kolokalisierung beider Proteine.

Um die Interaktion aus den *in vitro* Studien in einem zellulären System zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Dabei konnte eine *in vivo* Interaktion zwischen dem zellulären BEC-1 und dem rekombinant exprimierten HIV Env-SU gezeigt werden. Auch hier zeigte der Env-TM Bereich keine Bindung an den Kanal.

Zur Bestätigung, dass die letzten 110 C-terminalen Aminosäuren von BEC-1 mit dem HIV Env-SU Protein interagieren, wurde eine Deletionsmutante von BEC-1 hergestellt, der genau diese letzten Aminosäuren fehlten. Mit dieser Deletionsmutante konnte wie erwartet *in vivo* keine Interaktion gezeigt werden. In einem Zytotoxizitätstest (MTT-Assay) von BEC-1 in COS-1 Zellen wurde festgestellt, dass die Expression von BEC-1 keine Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen hat.

Nach Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen BEC-1 konnte die Expression des Kalium Kanals in HIV Zielzellen wie Jurkat, A 3.01, PBMCs und Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Immunpräzipitationen durchgeführt.

Um mehr über die BEC-1-HIV Env-SU Interaktion zu lernen, wurde ein System genutzt, mit dem die Funktion des Kalium Kanal BEC-1 - auch unter Einfluss der Envelope-Proteine - getestet werden kann. Mit Hilfe des FluxOr Thallium Detection Assays konnte die Funktionalität des Kanals bewiesen werden. Desweiteren zeigte sich, dass die Interaktion mit HIV Env-SU zu einer eindeutigen Repression der Ionenleitfähigkeit des Kanals führt.

Die Kotransfektion von BEC-1 und HIV Env-TM als auch die Kotransfektion der Deletionsmutante BEC2600 mit HIV Env-SU übten keinen Effekt auf die Transporterfähigkeit von BEC-1 aus. Dies dient somit als Beweis dafür, dass nur die HIV Env-SU-BEC-1 Interaktion zur Inhibierung des Kanals führt.

In einem weiteren Testverfahren wurde untersucht, ob Bec-1 einen Effekt auf die Replikation von HIV ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass der HIV-1 Partikel Release in Zellen, die mit dem Vollängen BEC-1 transfiziert waren, im Vergleich zu Kontrollzellen, die die Deletionsmutante BEC2600 exprimierten, um das zweifache reduziert wurde.

Zusammenfassend konnte hier der Beweis erbracht werden, dass es eine physikalische und funktionelle Interaktion zwischen HIV Env-SU und dem Kalium Kanal BEC-1 gibt. Diese Interaktion resultiert zum einen in einer Unterdrückung der BEC-1 Ionenleitfähigkeit und zum anderen in einer Inhibierung des HIV-1 Partikel Release in HIV infizierten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt kann keine Aussage darüber gemacht werden ob diese Effekte einen Vorteil für das Virus HIV-1 oder den Wirt darstellen.

Die Daten könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktion zwischen HIV Env-SU und BEC-1 die HIV Replikation beeinflusst und gegebenenfalls pathogene Konsequenzen für infizierte Zellen haben könnte.