

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VII
III	VERZEICHNIS DER TABELLEN	IX
IV	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	X
<hr/>		
1	EINLEITUNG	1
1.1	Viren	1
1.2	Retroviren	2
1.2.1	Klassifikation der Retroviren	4
1.2.2	Virion- Struktur	5
1.2.3	Genomstruktur, Integration, Proteinsynthese und Reifung	6
1.2.3.1	<i>Genomstruktur</i>	7
1.2.3.2	<i>Penetration und Integration</i>	9
1.2.3.3	<i>Proteinsynthese und Reifung neuer Virionen</i>	10
1.3	Das humane Immundefizienzvirus (HIV)	12
1.3.1	Epidemiologie und Übertragung	12
1.3.2	Klassifizierung	12
1.3.3	Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion	13
1.3.4	Die Virusproteine von HIV-1	15
1.3.4.1	Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)	15
1.3.4.2	Die Produkte des pol-Leserahmens	15
1.3.4.3	Die Protease	16
1.3.4.4	Die Envelope Proteine	16
1.3.4.5	Transaktivatoren	17
1.3.4.6	Posttranskriptionell wirkende Transaktivatoren	17
1.3.4.7	Akzessorische Proteine	17
1.4	Das Multiple Sclerosis Related Virus (MSRV)	19
1.4.1	Die Multiple Sklerose Erkrankung	19
1.4.2	Die MSRV-Partikel	19
1.5	Der BEC-1 Kanal	20
1.5.1	Aufbau und Struktur	20
1.5.2	Einteilung und Aufbau der spannungsgesteuerten Kalium Kanäle	20

1.5.3	Funktion der Ether-à-go-go Kanäle und BEC-1	23
1.5.4	Expression von BEC-1 in verschiedenen Geweben und Zellen	25
1.6	Ziele der Arbeit	26
2	MATERIAL	28
<hr/>		
2.1	Puffer	28
2.2	Enzyme und dNTP`s	29
2.3	Molekulargewichtsmarker	29
2.4	Bakterienstämme und Nährmedien	29
2.5	Zelllinien	30
2.6	Zellkulturmedien für Säugerzellen	31
2.7	Antikörper	31
2.7.1	Monoklonale Antikörper	31
2.7.2	Polyklonale Antikörper	31
2.8.3	Peroxidase(POX)- gekoppelte Zweitantikörper	31
2.8	Chemikalien und andere Reagenzien	31
2.8.1	Chemikalien	31
2.8.2	„Kits“ und Transfektionsreagenzien	32
2.8.3	Photochemikalien	32
2.8.4	Radiochemikalien	32
2.9	Membranen	32
2.10	Oligonukleotide	33
2.11	Vektoren, Reporterplasmide und Konstrukte	35
2.11.1	Parentale Vektoren	35
	pGEX-4T-1 Vektor	35
	pEGFP-C1 Vektor	35
	pGEM-T Vektor	35
	pDsRed-C1 Vektor	36
	pSG5-Vektor	37
	pCMV-pA-Vektor	37
	pGBKT7-Vektor	37
2.11.2	Konstrukte	37
2.12	Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten	40

3	METHODEN	41
3.1	Bakterien-Techniken	41
3.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	41
3.1.2	Blue/White Screening	41
3.2	DNA-Techniken	42
3.2.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	42
3.2.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	43
3.2.3	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43
3.2.4	Spaltung von DNA durch Restriktionendonukleasen	44
3.2.5	Phosphatasebehandlung von Vektoren	44
3.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.2.7	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	45
3.2.8	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	46
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
3.3	Protein-Techniken	47
3.3.1	Herstellung von Proteinextrakten	47
3.3.1.1	<i>Zellaufschluss unter nativen Bedingungen</i>	47
3.3.1.2	<i>Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen</i>	47
3.3.1.3	<i>Proteinsynthese durch in vitro Transkription und Translation</i>	48
3.3.2	Techniken zum Nachweis von Proteinen	48
3.3.2.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	48
3.3.2.2	<i>Immunoblot (Westernblot)</i>	49
3.3.2.3	<i>Nachweis von Proteinen im SDS-Gel</i>	50
3.3.2.4	<i>Nachweis radioaktiv- markierter Proteine durch Autoradiographie</i>	50
3.3.3	Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisation	51
3.3.3.1	<i>Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenz- mikroskopie</i>	51
3.3.3.2	<i>Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz</i>	51
3.3.4	Methoden zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen	52
3.3.4.1	<i>GST- pulldown Analysen</i>	52
3.3.4.2	<i>Ko-immunpräzipitation</i>	53

3.3.4.3	Kolokalisationsassay	53
3.4	Zellkultur-Techniken	54
3.4.1	Kultivierung und Lagerung von Säugerzellen	54
3.4.2	Zellwachstumsassay	54
3.4.3	Herstellung von PBMCs und Makrophagen	55
3.5	Transformation von Zellen	55
3.5.1	Transformation von Bakterienzellen	55
3.5.2	Transfektion von Säugerzellen	56
3.5.2.1	<i>Transfektion mit Nanofectin</i>	56
3.6	Kalium-Kanal Funktionsanalyse	57
3.6.1	FluxOr Thallium Detektion Kit der Firma Invitrogen	57
3.7	HIV-1 Partikel Release Assay	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Interaktion von Envelope Proteinen mit dem spannungsabhängigen Kalium Kanal BEC-1	60
4.1.1	Studien zur Bindung von MSRV Proteinen und BEC-1 in Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Experimenten	62
4.1.2	Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von MSRV Env	63
4.1.3	Studien zur Bindung von Envelope Proteinen verschiedener endogener bzw. exogener Retroviren und BEC-1 in Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Experimenten	64
4.1.4	Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von HIV Env-SU	65
4.1.5	Studien zur Kartierung der Bindungsdomäne von BEC-1	66
4.2	Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen BEC-1	68
4.3	Lokalisierung des Kalium Kanals BEC-1 in vivo	69
4.4	Expression des spannungsabhängigen Kalium Kanals BEC-1 in HIV-Zielzellen	72

4.5	Nachweis der in vivo Interaktion des HIV Env-SU Proteins mit dem zellulären BEC-1 Kalium Kanal durch Koimmunpräzipitation	74
4.6	Nachweis der in vivo Interaktion des HIV Env-SU Proteins mit der Deletionsmutante BEC2600 durch Koimmunpräzipitation	76
4.7	Zellwachstum in Abhängigkeit der BEC-1 Expression	78
4.8	Nachweis der Funktionalität des BEC-1 Kanals	80
4.8.1	Einfluss der HIV Env Proteine auf die Funktionalität des BEC-1 Kanals	81
4.8.2	Funktionalität der BEC-1 Deletionsmutante und Einfluss der HIV Env Proteine	83
4.8.3	Dosisabhängigkeit der Reduktion der Transporterfunktion des BEC-1 Kanals von HIV Env-SU	85
4.9	Inhibierung des Partikel-Release durch BEC-1	87
5	DISKUSSION	90
5.1	Interaktion zwischen HIV Env SU/TM und BEC-1	90
5.2	Kartierung der Bindungsstelle des BEC-1 Kanals an MSR/HIV	92
5.3	Lokalisations- und Koloalisationsstudien	93
5.4	Expression des spannungsabhängigen Kalium Kanals in HIV-Zielzellen	94
5.5	Nachweis der in vivo Interaktion des HIV-1 Env-SU Proteins mit dem Kalium Kanal BEC-1	95
5.6	Funktion der Interaktion zwischen HIV Env-SU und BEC-1	96
5.6.1	Funktionelle Bedeutung HIV Env	96
5.6.2	Funktionelle Bedeutung von BEC-1 und anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen	97
5.7	HIV Env-SU inhibiert die Leitfähigkeit des BEC-1 Kalium Kanals	99
5.8	Inhibierung des HIV-1 Partikel Release durch BEC-1	101

5.9	Konklusion	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	107
8	ANHANG	116
