

# **Der Einfluss des PI3-Kinase Signalwegs auf die Regulation des alternativen HIV-1 prä-mRNA Spleißens**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Frank Hillebrand

aus

Paderborn

Würzburg 2013



Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Juli 2008 bis Februar 2012 in der Abteilung für Elektronenmikroskopie (Prof. Dr. G. Krohne) und dem Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. M. Engstler) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, sowie zu Teilen am Institut für Virologie (Prof. Dr. med. H. Hengel) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

Eingereicht am: 09.01.2013

Mitglieder der Promotionskommission:

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Wolfgang Rössler  
**Erstgutachterin:** Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle  
**Zweitgutachterin:** Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

**Tag des Promotionskolloquiums:** 15.03.2013

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** .....

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und von mir selbstständig durchgeführt und verfasst wurde.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....2013

.....

Frank Hillebrand



*Für  
Bastian  
und  
meine Eltern*

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle und Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung und das Vertrauen, dass sie mir geschenkt haben.

Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies danke ich ebenfalls für Ihre Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber vom Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie in Hamburg für seine nette Unterstützung.

Bei der Universität Bayern e.V. und der Bayerische Elite Förderung für die finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Heiner Schaal und seiner Arbeitsgruppe (Steffen, Marek, Tomek, Jop, Nora und Linda) in Düsseldorf, die mich immer wieder bereitwillig bei sich aufgenommen und mich immer unterstützt haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!!!

Bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie, der Abteilung für Elektronenmikroskopie sowie Elita Avota für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Bei Dattsche, Ludi, Matze, Micha, Lino; bei Steffen, Tomek, Marek, Jop, Claus, Sibbe, Jens und Daniel; bei Michael R., Rike, Mark, Michael S., Christna, Christoph, Karla, Johanna, Chrise, Hannah, Hannes, Holger und allen anderen, die mich aufgemuntert und bei ein paar Bier den Stress und Frust vergessen lassen haben. Ihr seid echt super Freunde und ich hoffe wir trinken noch viele Pils zusammen.

Bei Bastian, der mich damals darauf hingewiesen hat, dass eine Doktorarbeit zu machen nicht das Schlechteste ist. Du warst immer ein guter Freund!! Du fehlst!!!!

Bei meinen Eltern, meinen Brüdern Andreas, Peter und Georg, sowie meinen Schwestern Susanne und Anne, die mich immer unterstützt und mir gut zu geredet haben, wenn ich mal wieder am Verzagen war. Auch ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!!!

...und natürlich bei Nora, das beste Resultat meiner Promotion☺

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg .....	1
1.1.1 Die Phosphatidylinositol-3-Kinase .....	2
1.1.2 Die Akt-Kinase.....	4
1.1.3 Ziele des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs.....	5
1.1.3.1 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf das Überleben der Zelle .....	6
1.1.3.2 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf die Translation.....	7
1.1.4 Die Modulation des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs durch Viren .....	8
1.2 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNA.....	9
1.2.1 Exon/Intron Definition .....	11
1.2.2 Die Spleißreaktion .....	12
1.2.2.1 Die Spleißosom-Assemblierung .....	12
1.2.3 Mechanismen der Spleißregulation .....	14
1.2.3.1 Intrinsische Stärke der Spleißstellen .....	14
1.2.3.2 <i>Cis</i> -regulatorische Elemente und trans-agierende Faktoren .....	15
1.2.4 SR-Proteine.....	16
1.2.5 hnRNP-Proteine .....	21
1.2.6 Mechanismen der SR- und hnRNP-Protein vermittelten Spleißregulation	25
1.2.7 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf die Regulation des prä-mRNA Spleißens.....	27
1.3 Das Humane Immundefizienz-Virus Typ 1 .....	27
1.3.1 Morphologie von HIV-1 .....	28

## Inhaltsverzeichnis

---

1.3.2 Die HIV-1 Replikation .....	29
1.3.3 Das HIV-1 Genom und das virale alternative Spleißen .....	30
1.3.3.1 Der Rev-abhängige virale mRNA Export .....	33
1.3.3.2 Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs.....	35
1.3.3.3 Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs.....	36
1.3.3.4 Die 9-kb Klasse der HIV-1 mRNAs.....	37
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	39
<b>2. Material .....</b>	<b>40</b>
2.1 Biologisches Material .....	40
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme .....	40
2.1.2 Verwendete Viren .....	40
2.1.3 Verwendete Zelllinien .....	40
2.1.4 Antikörper .....	41
2.1.4.1 Primärantikörper .....	41
2.1.4.2 Sekundärantikörper .....	42
2.2 Molekularbiologische Arbeitsmittel.....	42
2.2.1 RNA-Expressionsplasmide.....	42
2.2.2 Virus-Expressionsplasmide .....	43
2.2.3 Plasmide zur Co-Transfektion .....	44
2.2.4 Plasmide zur Protein Expression.....	46
2.2.5 Enzyme .....	49
2.2.6 Oligonukleotide.....	50
2.2.7 Größenstandards.....	51
2.2.8 Kits und Kitsbestandteile .....	52
2.2.9 Zellkultur-Material .....	52
2.3 Chemikalien .....	53
2.4 Geräte .....	53
2.5 Sonstiges Material.....	55

<b>3. Methoden</b> .....	<b>56</b>
3.1 Mikrobiologische Methoden .....	56
3.1.1 Flüssigkulturen von Bakterien .....	56
3.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung.....	56
3.1.3 Glycerinkultur .....	56
3.1.4 Herstellung von LB- Agar-Selektionsplatten .....	57
3.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien.....	57
3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	58
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	58
3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen (Chomczynski und Sacchi, 1987) .....	58
3.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	60
3.2.3 Reverse Transkription .....	61
3.2.3.1 DNase Verdau.....	61
3.2.3.2 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription (Umschreibung der mRNA in cDNA) .....	61
3.2.4 Realtime- PCR.....	61
3.2.5 Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten mittels PCR (Polymerase Chain Reaktion).....	62
3.2.6 Primer und Primerdesign.....	65
3.2.6.1 Primerdesign für Phosphomutanten .....	66
3.2.7.1 Mini-Plasmidpräparation.....	66
3.2.7.2 DNA-Midipräparation .....	67
3.2.8 Restriktionsverdau.....	67
3.2.9 Beladungspuffer für die DNA Gelelektrophorese.....	68
3.2.10 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese .....	68
3.2.10.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose Gelelektrophorese.	69
3.2.10.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch ein 10 % Polyacrylamidgel	70

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.11 Isolierung von aufgetrennten Nukleinsäure .....	70
3.2.11.1 Aus Agarosegelen .....	71
3.2.11.2 Aus Polyacrylamidgelen .....	71
3.2.12 Chloroform/Phenol Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	72
3.2.13 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	72
3.2.13.1 Ligation.....	73
3.2.14 RNA-Gelelektrophorese .....	73
3.2.15 Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin .....	74
3.2.16 Northern Blot (Transfer von RNA) .....	75
3.2.17 Entfernung gebundener Sonden .....	77
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	77
3.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975) .....	77
3.3.1.1 Gießen der Gele .....	78
3.3.1.2 Extraktion von Proteinen aus Kulturzellen, Proben-vorbereitung .....	80
3.3.1.3 Isolierung des p24 Proteins aus dem Zellüberstand HIV-1 (pNL4-3) transfizierten Zellen .....	81
3.3.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen Bradford-Test .....	81
3.3.1.5 Auftragung der Proben, Elektrophoresebedingungen.....	82
3.3.2 Western Blot (Semidry-Elektroblot) .....	82
3.3.2.1 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern (Immunblot).....	84
3.3.2.2 Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemi-Luminescence) .....	85
3.3.3 Entfernen von gebundenen Antikörpern (Re-Blot).....	86
3.3.4 Labeling von Proteinen mit radioaktiv markiertem [ <sup>35</sup> S] Methionin und Cystein .....	86
3.3.5 Färbung von SDS-Gelen (Coomassie-Färbung) .....	87
3.3.6 HIV-1 p24-Antigen-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	88
3.4 Zellkultur .....	89

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.1 Kultivierung von Zellen .....	89
3.4.2 Passagieren adhärenter Zellen .....	89
3.4.3 Passagieren von Suspensions-Zellen .....	90
3.4.4 Aussäen von Kulturzellen für die Transfektion/Infektion .....	90
3.4.5 Einfrieren von Zellen.....	91
3.4.6 Auftauen von Zellen.....	91
3.4.7 Inkubation von Kulturzellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002.....	92
3.4.8 Viabilitäts-Assay (Alamar blue®-Assay) .....	92
3.4.9 Transfektion von Kulturzellen .....	92
3.4.9.1 Transfektion mit FuGENE HD® (Promega).....	93
3.4.9.2 Transfektion mit TransIT®- LT1 (Mirus) .....	93
3.4.10 Infektion von Jurkat- Zellen mit HIV-1- Isolaten.....	93
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>94</b>
4.1 Der PI3K Signalweg nimmt Einfluss auf die SR-Protein Phosphorylierung und das alternative Spleißen HIV-1 basierter Minigenkonstrukte in HeLa-Zellen. ....	94
4.1.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs interferiert mit der SR- Protein Phosphorylierung in HeLa-Zellen .....	94
4.1.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen eines HIV-1 basierten drei-Exon-zwei-Intron Reporterkonstrukts .....	96
4.1.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen eines subgenomischen HIV-1 Reporterkonstrukts .....	99
4.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen in HIV-1 transfizierten und infizierten Zellen.....	101
4.2.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs beeinflusst den Einschluss der HIV-1 Leader Exone .....	101
4.2.2 Untersuchungen an HIV-1 Mutanten bestätigen den Effekt des PI3K Signalwegs auf die Erkennung der Leader Exone.....	105
4.2.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen auch in infizierten Jurkat-Zellen .....	109

4.2.4 Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase hebt den Effekt auf den Einschluss der Leader Exone durch die Inhibition des PI3K Signalwegs auf ..	112
4.2.5 Die Co-Expression von hnRNP H wirkt dem Effekt der PI3K Inhibition auf den Exon2b Einschluss entgegen .....	114
4.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen von hnRNP H und die SR-Protein Phosphorylierung in HIV-1 transfizierten Zellen.....	116
4.3.1 Die PI3K Inhibition beeinflusst das alternative Spleißen von hnRNP H..	117
4.3.2 Die PI3K Signalweg Inhibition interferiert mit der SR-Protein Phosphorylierung und deren Protein Expression in HIV-1 transfizierten HeLa- jedoch nicht HEK 293T-Zellen.....	120
4.3.3 Die Co-Expression von Acinus S und Acinus S Phosphomutanten resultiert in einem höheren Anteil intronhaltiger HIV-1 mRNAs.....	123
4.4 Die PI3K Signalweg Modulation interferiert mit der HIV-1 Replikation .....	127
4.4.1 Sowohl die PI3K Inhibition als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase haben einen negativen Einfluss auf die virale Replikation.....	127
4.4.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst die HIV-1 LTR abhängige Luciferase Expression in TZM-bl Zellen.....	130
4.4.3 Der PI3K Signalweg beeinträchtigt die Produktion der viralen mRNA-Klassen.....	132
4.4.4 Die PI3K Signalweg Modulation interferiert mit dem Rev-abhängigen nuklearen Export viraler mRNAs .....	135
4.4.5 Die PI3K Signalweg Modulation beeinflusst die Expression des akzessorischen HIV-1 Proteins Vif .....	137
4.4.6 Die PI3K Inhibition beeinträchtigt die zelluläre Translation in HEK 293T-Zellen.....	139
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>142</b>
5.1 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen .....	142
5.1.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs hemmt die Nutzung viraler Spleißstellen in HIV-1 basierten Reporterkonstrukten.....	142

## Inhaltsverzeichnis

---

5.1.2 Die Inhibition des PI3K Signalwegs hat den Einschluss der Leader Exone replikationskompetenter HI-Viren zur Folge .....	147
5.2 Die PI3K Signalweg Modulation beeinflusst die virale Replikation.....	153
5.3 Ausblick.....	161
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>163</b>
6.1 Zusammenfassung.....	163
6.2 Summary.....	164
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>165</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>186</b>
8.1 Alamar blue®-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität nach PI3K-Inhibitor Zugabe.....	186
8.2 Abkürzungen.....	187
8.3 Einheiten .....	190
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>191</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>194</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg

Um ihr Verhalten innerhalb eines Organismus koordinieren zu können müssen Zellen miteinander kommunizieren. Hierfür haben sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen entwickelt, die es den Zellen ermöglicht auf äußere Signale zu reagieren. Die Auswertung und Umsetzung dieser Informationen bewirkt dann eine Änderung der zellulären Genexpression, der zellulären Proteinzusammensetzung sowie eine Modifikation der Aktivitätszustände verschiedener Proteine, was letztlich den zellulären Metabolismus, das Zellwachstum und das Überleben der Zelle beeinflusst.

Alle zellulären Signalwege unterliegen demselben Prinzip. Ein Signalmolekül wird von einem Rezeptorprotein gebunden und in eine spezifische Antwort umgewandelt. Diese Umwandlung wird hierbei durch Proteine vermittelt, die durch die Signalmolekül/Rezeptor-Bindung angeregt werden und daraufhin nachgeschaltete Proteine in ihrer Aktivität beeinflussen. Die Konformation eines Signalproteins aber auch Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen sind dabei von entscheidender Bedeutung. Die so entstehenden Signalkaskaden führen nun zu einer Signalverstärkung und können, ausgehend von einem Signal, verschiedenste Adressaten erreichen und somit mehrere Antworten in der Zelle hervorrufen.

Da die Signaltransduktion eine enorme Wichtigkeit für die Genregulation, das Zellwachstum und den zellulären Metabolismus darstellt, führen Störungen innerhalb dieser Informationsweitergabe zu schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs.

Viele Forschungsgruppen arbeiten an der Entwirrung und Relevanz von Signaltransduktionswegen und ihren Einflüssen auf zelluläre Prozesse. Dabei können einige Signalwege immer wieder mit neuen Adressaten innerhalb der Zelle und somit mit neuen zellulären Aufgaben in Verbindung gebracht werden.

Bei dem Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg handelt es sich um einen sehr komplexen Signalweg, der eine Reihe von essentiellen Aufgaben übernimmt. In vielzelligen Organismen spielt er eine entscheidende Rolle im zellulären Metabolismus und der Steuerung des Zellwachstums, sowie dem Überleben der Zelle (Engelman *et al*, 2006). In den letzten Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch eine Relevanz für andere Prozesse innerhalb der Zelle,

wie z.B. dem mRNA Spleißen, hat. Im Folgenden soll daher näher auf diesen Signalübertragungsweg eingegangen werden.

### 1.1.1 Die Phosphatidylinositol-3-Kinase

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) sind Mitglieder einer konservierten Familie von Lipid-Kinasen die in drei Klassen (I-III) zusammengefasst werden. Die Klassen unterscheiden sich hierbei durch ihr bevorzugtes Substrat. Des Weiteren übernehmen die verschiedenen Klassen der PI3Ks spezifische Aufgaben in der zellulären Signaltransduktion. Charakteristisch für die Mitglieder der PI3Ks ist jedoch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen an der dritten OH-Gruppe des Inositolringes, wobei die Phosphatidylinositollipide dabei als sekundäre Botenstoffe fungieren, die wiederum von anderen Proteinen gebunden werden können (Engelman *et al*, 2006). Im Folgenden wird detaillierter auf die Funktionen der PI3-Kinasen der Klasse IA eingegangen.

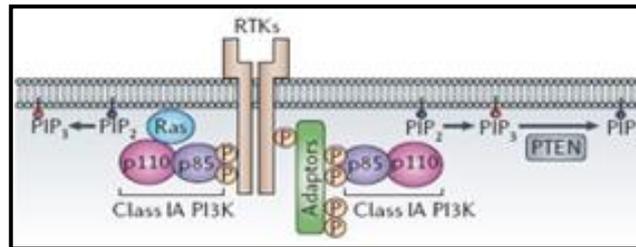
Die PI3Ks der Klasse IA spielen vor allem bei der Glukose Homöostase, dem Zell-Wachstum, Zell-Proliferation und der Zell-Migration eine Rolle (Cantley, 2002). Sie werden durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) aktiviert und generieren bevorzugt Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P<sub>2</sub>). Außerdem kann die kleine GTPase Ras die Aktivierung der PI3-Kinase vermitteln (Rodriguez *et al*, 1994).

Die Kinasen der Klasse IA sind Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit. Die regulatorische Untereinheit besteht im Wesentlichen aus einer p110 Bindungsdomäne, welche durch zwei SH2 (Src-Homologie)-Domänen flankiert wird. Die katalytische Untereinheit besitzt eine N-terminale p85 Bindungsdomäne, eine Ras Bindungsdomäne, welche die Aktivierung durch die kleine GTPase Ras vermittelt, eine C2-Domäne, sowie eine Phosphatidylinositol-homologie-Domäne und eine katalytische Domäne am C-Terminus (Engelman *et al*, 2006).

Findet keine Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren oder Hormone statt, hält die regulatorische Untereinheit p85 die katalytische Untereinheit p110 in einem Zustand von geringer Aktivität. Kommt es jedoch zur Aktivierung der RTKs oder der Adapterproteine (wie z.B. IRS1 = Insulin Receptor Substrat1), bindet die SH2-Domäne von p85 an die Phospho-Tyrosin-Reste, was die Aktivierung von p110 und die Rekrutierung des p85-p110 Heterodimers zur Membran zur Folge hat. Hier

## 1. Einleitung

kommt es dann durch die aktivierte PI3-Kinase zur Phosphorylierung von PI-4,5-P<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> (siehe Abb. 1.1) (Engelman *et al*, 2006; Yu *et al*, 1998a, 1998b; Songyang *et al*, 1993).



**Abb. 1.1: Mechanismen der Aktivierung der Klasse IA Phosphatidylinositol-3-Kinasen.**

Die PI3 Kinasen der Klasse IA werden durch RTK's bzw. Adapterproteinen aktiviert und phosphorylieren PIP<sub>2</sub> an der dritten OH-Gruppe des Inositol-Rings. PIP<sub>3</sub> fungiert dann als sekundärer Botenstoff und kann von nachgeschalteten Proteinen gebunden werden.

PTEN dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> und beendet somit die PI3-Kinase Signalgebung (entnommen aus Engelman *et al*, 2006).

Nachgeschaltete Signalmoleküle des Signalweges binden über eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH- Dömäne) an die durch die PI3-Kinase generierten PIP<sub>3</sub>'s, was wiederum deren Aktivierung zur Folge hat (DiNitto *et al*, 2003).

Zu den wesentlichen Effektoren der PI3-Kinase gehört die Serin-Threonin-Kinase Akt (auch als Protein Kinase B bezeichnet), sowie die Phosphatidylinositol abhängige Kinase 1 (PDK1), auf die in 1.1.2 näher eingegangen wird.

Die Termination des PI3-Kinase Signals durch die Degradation von PIP<sub>3</sub> kann letztlich durch zwei Typen von Phosphatasen erfolgen. Zum einen dephosphoryliert PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) PIP<sub>3</sub> an der dritten Position des Inositolringes und agiert daher als ein Regulator des PIP<sub>3</sub> Levels innerhalb der Zelle (Denu und Dixon, 1998; Fauman und Saper, 1996). Der Verlust des PTEN-Proteins oder der Phosphatase Funktion führt zu einer unkontrollierten Signalisierung durch die PI3-Kinase, was letztlich eine Ursache für Krebs darstellt (Maehama und Dixon, 1999).

Bei dem zweiten Typ von Phosphatasen handelt es sich um die Src-Homologie-2 (SH2)-beinhaltenden Phosphatasen SHIP1 und SHIP2. Diese dephosphorylieren die fünfte Position des Inositolringes von PIP<sub>3</sub> und produzieren daraus Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat. Der Verlust von SHIP2 hat eine erhöhte Insulin Sensitivität zur Folge. Dies weist darauf hin, dass SHIP2 eine wichtige Rolle bei der Regulation der PI3-Kinase Signalisierung stromabwärts von Insulin spielt (Clement *et al*, 2001).

Der PI3K Signalweg kann auch pharmakologisch durch Wortmannin und LY294002 blockiert werden (Wipf und Halter, 2005; Vlahos *et al*, 1994). Hierbei inhibieren beide Moleküle die katalytische Untereinheit p110 der PI3-Kinase.

### 1.1.2 Die Akt-Kinase

Die Serin/Threonin-Kinase Akt gehört zu den wichtigsten Vermittlern in Signaltransduktionsprozessen in Antwort auf Wachstumsfaktoren, Cytokinen und anderen zellulären Stimuli. Sie übernimmt Aufgaben sowohl im Kern als auch im Cytoplasma und beeinflusst dabei Prozesse, die das Überleben der Zelle sicherstellen, den Glukose Metabolismus regulieren sowie in die Transkription und Zell-Proliferation involviert sind. Des Weiteren gilt die Akt-Kinase als eine der wesentlichen Effektoren der PI3-Kinase (Cantley, 2002).

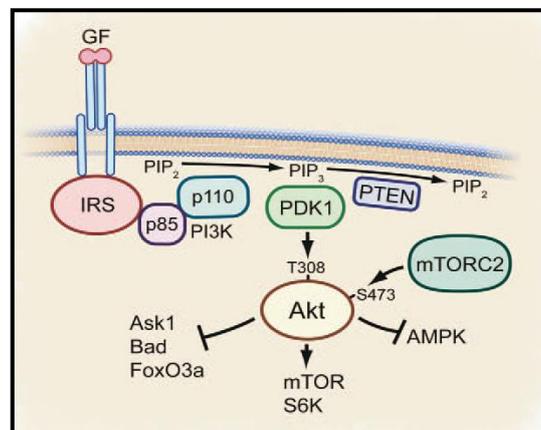
Es existieren drei Isoformen (Akt1, Akt2 und Akt3) der Akt-Kinase, wobei jedes Mitglied der Familie eine zentrale katalytische Domäne mit einer Spezifität für Serin- oder Threonin-Reste besitzt (Manning und Cantley, 2007; Bellacosa *et al*, 1991; Coffey und Woodgett, 1991). Am N-Terminus befindet sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne). Diese vermittelt Lipid-Protein und/oder Protein-Protein Interaktionen (Mayer *et al*, 1993; Musacchio *et al*, 1993; Datta *et al*, 1995). Der C-Terminus beinhaltet eine hydrophobe und Prolin-reiche Domäne. Die Primärstruktur der Mitglieder der Akt-Familie ist während der Evolution hoch konserviert (Datta, 1999).

Über die PH-Domäne bindet Akt an die durch die PI3-Kinase generierten Phospholipide (PIP<sub>3</sub>), was die Rekrutierung aus dem Cytoplasma zur Plasmamembran zur Folge hat. Durch die Relokalisation an die Membran wird Akt so in unmittelbare Nähe regulatorischer Kinasen gebracht, die Akt phosphorylieren und letztlich aktivieren (Datta, 1999).

Die drei Akt Isoformen besitzen vier Positionen, an denen sie phosphoryliert werden können. Während zwei Positionen basal phosphoryliert sind, müssen für die vollständige Aktivierung zusätzlich ein Threonin-Rest in einer Schleife der Aktivierungs-Domäne (Thr-308, Thr-309, Thr-305 in Akt1, 2 und 3) sowie ein Serin-Rest in der C-terminalen hydrophoben Domäne (Ser-473, Ser-474, Ser-472 in Akt1, 2 und 3) phosphoryliert werden (Alessil *et al*, 1996). Im unphosphorylierten Zustand reguliert der Threonin-Rest der Aktivierungsschleife die Aktivität der Akt-Kinase negativ. Erst durch die Interaktion der Lipidprodukte mit der PH-Domäne kommt zu

## 1. Einleitung

einer Konformationsänderung von Akt, was dessen Phosphorylierung durch Kinasen zugänglich macht. Die Phosphatidylinositol abhängige Kinase 1 (PDK1), welche ebenfalls eine PH-Domäne besitzt, phosphoryliert Akt nach der Konformationsänderung am Threonin-Rest (Alessi *et al*, 1997a). Der Serin-Rest der hydrophoben Domäne wird dagegen von dem rictor-mTOR Komplex 2 (mammalian target of rapamycin) phosphoryliert (Sarbasov *et al*, 2005; Manning und Cantley, 2007). Die Aktivierung resultiert in einer Translokation der Kinase in das Cytoplasma und den Nukleus. Hier phosphoryliert sie ein breites Spektrum nachgeschalteter Proteine, die unter anderem das Überleben der Zelle, das Zellwachstum und die Zell-Proliferation beeinflussen (siehe auch Abb. 1.2).



**Abb. 1.2. Schematische Darstellung der Aktivierung der Akt-Kinase.**

Akt bindet die von der PI3-Kinase generierten  $PIP_3$  und wird von der PDK1 sowie vom mTOR Komplex 2 phosphoryliert und somit aktiviert. Akt phosphoryliert dann eine Vielzahl von nachgeschalteten Proteinen, die das Überleben der Zellen (z.B. Bad), die Translation (mTor, S6K) und den Energie Haushalt (AMPK) der Zelle regulieren (entnommen aus Matheny und Adamo, 2009).

Die Termination der Akt Signalisierung kann letztlich auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen durch die Dephosphorylierung von  $PIP_3$  durch die Lipid-Phosphatase PTEN (Maehama und Dixon, 1999). Zum anderen durch die direkte Dephosphorylierung der aktivierten Akt-Kinase. Die Dephosphorylierung kann hierbei durch PP2A-Typ (Protein Phosphatase 2A) Phosphatasen (Andjelkovic *et al.*, 1996) oder durch die Phosphatase Familie PHLPP (PH- domain leucin- rich repeat protein phosphatase) erfolgen, wobei PHLPP den Serin-Rest innerhalb der hydrophoben Domäne dephosphoryliert (Gao *et al*, 2005).

### 1.1.3 Ziele des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs

Die Aktivierung des PI3K Signalwegs hat die Phosphorylierung einer Reihe nachgeschalteter Proteine zur Folge, die das Überleben der Zelle, sowie die

Zellproliferation, das Zellwachstum, aber auch die Translation und das mRNA Spleißen beeinflussen. Des Weiteren machen sich auch diverse Viren diesen Signalweg zu Nutze. Da die Ziele des PI3K Signalwegs zahlreich und die Einflüsse sehr komplex sind, soll im Folgenden nur auf ein paar ausgewählte, für diese Arbeit relevante Beispiele eingegangen werden. Die Beteiligung der Signaltransduktion am alternativen Spleißen wird in dem Abschnitt 1.2.7 näher behandelt.

### **1.1.3.1 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf das Überleben der Zelle**

Viele Ziele der Akt-Kinase sind pro-apoptotische Moleküle die durch die Akt Phosphorylierung in einem inaktiven Zustand gehalten werden.

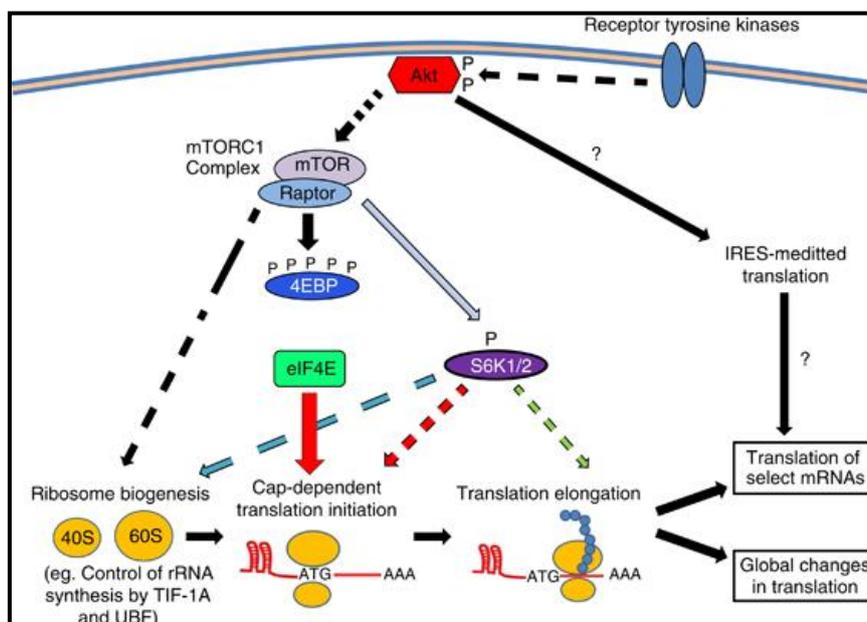
Eines dieser pro-apoptotischen Proteine ist das BH3-only Protein BAD. Die Phosphorylierung durch Akt resultiert in der Bindung von BAD durch 14-3-3 Proteine. Dies interferiert mit der Interaktion von BAD mit seinen nachgeschalteten Zielproteinen (Datta *et al*, 1997; 2000; delPeso *et al*, 1997).

Akt kann die Expression von BH3-only Proteinen auch negativ beeinflussen, indem Akt mit Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie (FOXO oder auch FKHR-L abgekürzt) oder p53 interagiert. Durch die Akt Phosphorylierung können diese Transkriptionsfaktoren nicht mehr an ihre Zielgene binden und werden in das Cytoplasma exportiert. Auf diese Weise blockiert Akt die Transkription von Genen, die die Apoptose, den Arrest des Zellzykluses und metabolische Prozesse fördern (Tran *et al*, 2003; Brunet *et al*, 2001).

Des Weiteren phosphoryliert Akt Acinus (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the Nucleus), ein Protein, das bei der Chromatin Kondensation während der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Sahara *et al*, 1999; Hu *et al*, 2005). Es existiert in den 3 Isoformen Acinus L, S und S'. Die Akt Phosphorylierung verhindert die proteolytische Spaltung von Acinus was letztlich dazu führt, dass die Acinus vermittelte Chromatin Kondensation verhindert wird (Hu *et al*, 2005). Acinus ist auch Bestandteil des ASAP-Komplexes (Apoptosis- and Splicing-Associated-Protein Complex), welcher aus den Proteinen SAP18, RNPS1 und einer der verschiedenen Acinus Isoformen zusammengesetzt ist. Es konnte gezeigt werden, dass der ASAP-Komplex in die RNA Prozessierung und Apoptose involviert ist (Schwerk *et al*, 2003).

### 1.1.3.2 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf die Translation

Eine weitere Rolle der Akt-Kinase besteht in der Aktivierung des mTOR- Komplexes 1, der ein wichtiger Regulator der Initiation der Translation, sowie der Ribosomen Biogenese ist und weiter eine essentielle Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums spielt (Wullschleger *et al*, 2006). Akt aktiviert den mTOR-Komplex 1 indem es die negativ Regulatoren TSC1 und TSC2 durch Phosphorylierung inaktiviert, was die Entlassung von mTOR aus seinem inhibitorischen Komplex zur Folge hat (zusammengefasst in Guertin und Sabatini, 2009; Wullschleger *et al*, 2006). Die Akt Aktivierung des mTOR-Komplexes 1 resultiert dann in der komplexvermittelten Phosphorylierung der eIF4E-Bindungs Proteine (4EBP's), die den eukaryotischen Initiations-Faktor 4E (eIF4E) in hypophosphorylierter Form in einem inhibitorischen Komplex halten (Brown *et al*, 1995; von Manteuffel *et al*, 1997; Gingras *et al*, 1998; Topisirovic *et al*, 2004). Im phosphorylierten Zustand können die 4EBP's eIF4E nicht mehr binden, so dass eIF4E in der Lage ist, den für die Initiation der Translation essentiellen Faktor eIF4G zum 5'UTR zu rekrutieren. Dies hat letztlich den Eintritt der 40 S ribosomalen Untereinheit am 5'Ende der mRNA zur Folge hat (Gingras *et al*, 1999; 2001).



**Abb. 1.3. Der Einfluss der Akt-Kinase auf die Translation.**

Über den mTOR Komplex 1 (mTORC1) nimmt die Akt-Kinase einen fördernden Einfluss auf die Ribosomen Biogenese, sowie auf die Initiation als auch auf die Elongation der Translation (entnommen aus Hsieh *et al*, 2011).

Des Weiteren hat Akt einen positiven Einfluss sowohl auf die Ribosomen Biogenese als auch auf die Elongation der Translation. Der Effekt auf die Ribosomen Biogenese wird hierbei ebenfalls vom mTOR-Komplex 1 vermittelt und führt zu einer stimulierten rRNA Synthese sowie einer erhöhten ribosomalen Protein Produktion (Mayer *et al*, 2004; Martin *et al*, 2004). Die Akt-vermittelte Förderung der translationalen Elongation besteht in der S6K 1/2 abhängigen Inhibition der eEF2-Kinase (Eukaryotischer Translations Elongations Faktor 2). Die eEF2-Kinase inhibiert eEF2 und verhindert, dass dieser seine Aufgaben während der translationalen Elongation erfüllen kann (Wang *et al*, 2001). Die Einflüsse der Akt Kinase sind in Abb. 1.3 zusammenfassend dargestellt

### **1.1.4 Die Modulation des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs durch Viren**

Für die erfolgreiche Replikation müssen Viren die Kontrolle über viele zelluläre Prozesse erlangen. Hierbei kommt es oft zu Modulationen von Signalwegen wie z.B. dem PI3K Signalweg, die den Viren dabei helfen, Prozesse wie die Translation und Transkription für ihre Zwecke um zu regulieren sowie Apoptose zu verhindern, um eine möglichst lange Replikationsphase aufrecht zu erhalten.

Der T-Zell Rezeptor (TZR) spielt eine zentrale Rolle in der T-Zell vermittelten Immunantwort. Bei der Stimulation des TZR durch Antigen-präsentierende Zellen werden in der T-Zelle eine Reihe von Signalwegen beeinflusst, die letztlich das weitere Schicksal der T-Zelle und die Immunantwort bestimmen.

Das HI-Virus z.B. besitzt virale Proteine, die es dem Virus ermöglichen die TZR Funktionen zu modifizieren. Die Interaktion des viralen Glykoproteins gp120 mit dem CD4-Rezeptor z.B. resultiert in der Aktivierung der PI3-Kinase (Briand *et al*, 1997; Francois und Klotman, 2003). Weiter kann der HIV-1 negative Faktor Nef eine Vielzahl von Proteinen der TZR Signalgebung direkt binden und somit betroffene Signalproteine wie die PI3-Kinase modulieren (Foster und Garcia, 2007; Linnemann *et al*, 2002; Wolf *et al*, 2001). Der C-Terminus von Nef interagiert hierbei mit der PI3-Kinase, was deren Stimulation und die Aktivierung der Akt-Kinase zur Folge hat. Die aktive Akt-Kinase schützt dann vor Apoptose und kontrolliert die Zellzyklus Progression (Ahmed *et al*, 1997; Brennan *et al*, 1997).

Ein weiteres Beispiel ist die Interferenz des Masern Virus (MV) mit dem PI3K Signalweg. Auf molekularer Ebene interferiert das MV hierbei mit der TZR oder IL-2R

(Interleukin-2 Rezeptor) induzierten Aktivierung des PI3K Signalwegs, was letztlich in der Expression eines alternativen Spleißprodukts der Lipid-Phosphatase SHIP sowie in einer durch das MV induzierten Immunsuppression resultiert (Avota *et al*, 2001; 2004; 2006).

Um an das obere Beispiel anzuknüpfen, aktiviert auch extrazelluläres HIV-1 Tat (transkriptionales Aktivator Protein) den PI3K Signalweg in lymphoiden Jurkat Zellen (Borgatti *et al*, 1997). Hierbei ist die Vermutung, dass die Bindung von Tat an extrazelluläre Rezeptoren den Signalweg stimuliert und somit die Apoptose der Zellen verhindert. Chugh *et al*. haben 2008 beschreiben, dass Tat in Makrophagen den Transkriptionsfaktor p53 bindet, was die Expression der PTEN Phosphatase (siehe 1.1.1), einem negativ Regulator des PI3K Signalwegs, herunterreguliert. Dies hat eine erhöhte Akt Aktivität und somit die Verhinderung der Apoptose zur Folge.

Des Weiteren spielt die PI3K Signalgebung auch bei der Aktivierung der HIV- 1 Transkription eine Rolle, wobei dieser Mechanismus bei der Re-Aktivierung der Virus Produktion nach der Latenzzeit von großer Bedeutung zu sein scheint (Contreras *et al*, 2007). Der positive Transkription Elongation Faktor b (p-TEFb) ist ein transkriptioneller Co-Faktor, der aus der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (Cdk9) und Cyclin T1 (CycT1) zusammengesetzt ist. HIV-1 Tat bindet Cyclin T1, rekrutiert den Komplex zum TAR-Element (Transaktivator Responsive Element) und stimuliert so die virale Transkription (zusammengefasst in Karn, 1999). Um jedoch von Tat gebunden und rekrutiert zu werden, muss p-TEFb aus seinem inaktiven Komplex, bestehend aus p-TEFb, HEXIM1, HEXIM2 und der kleinen 7SK nuklearen RNA, entlassen werden (Yik *et al*, 2003; 2005). Akt phosphoryliert HEXIM1 und bewirkt so die Freisetzung des aktiven p-TEFb Komplexes und ermöglicht so die virale Transkription (Contreras *et al*, 2007).

Weitere Beispiele für Viren, die den PI3K Signalweg modulieren sind u.a. das Epstein-Barr Virus, das humane Papillomavirus, das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus, sowie das Hepatitis B, C und das Influenza A Virus (zusammengefasst in Cooray, 2004; Dunn und Connor, 2012).

## 1.2 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNA

Bevor sie als funktionelle mRNA-Moleküle in das Cytoplasma exportiert werden können, durchlaufen die von der RNA-Polymerase II synthetisierten Primärtranskripte zunächst eine Reihe von Prozessierungsschritten. Die Prozessierung umfasst hierbei

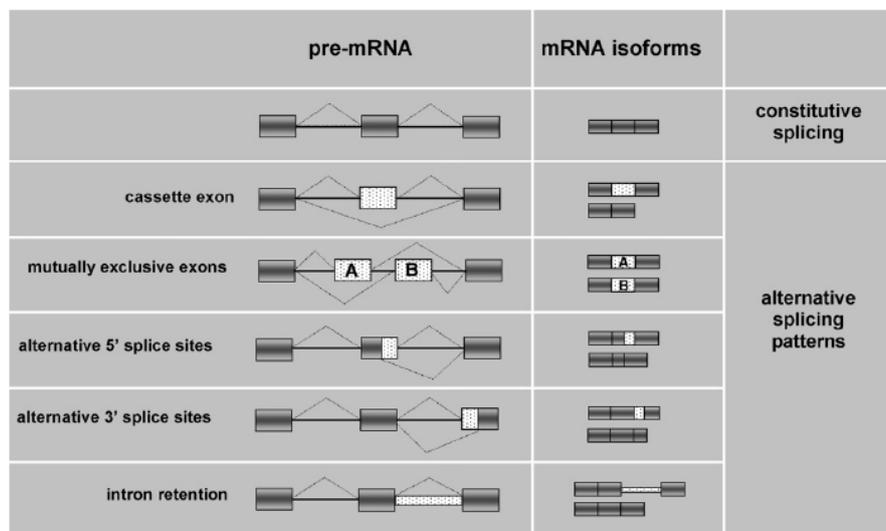
## 1. Einleitung

die drei Hauptmechanismen: 5'Capping, 3'Polyadenylierung und das prä-mRNA-Spleißen.

Da eukaryotische Gene mosaikartig aus für proteinkodierende (Exons) und nicht-kodierende (Introns) Regionen aufgebaut sind, ist das prä-mRNA Spleißen ein essentieller Schritt in der Genexpression höherer Eukaryonten. Hierbei werden die nicht-kodierenden Sequenzen aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die kodierende Sequenzen zu einer translatierbaren mRNA zusammengefügt, ein Prozess, der durch den makromolekularen Ribonukleoprotein-Komplex, dem Spleißosom, katalysiert wird.

Neben dem konstitutiven Spleißen, bei dem die vorhandenen Introns entfernt und die enthaltenen Exons zu einer mRNA zusammengesetzt werden, erlaubt das alternative Spleißen dagegen alternierende Exons oder sogar intronische Sequenzen in die mRNA zu integrieren (siehe Abb. 1.4). Dies ermöglicht die Generierung mehrere Proteine aus einem Gen, was letztlich eine entscheidende Rolle für die proteomische Vielfalt spielt und ebenfalls eine weitere Kontrolle der Genexpression bietet (Black, 2000).

Der Prozess des alternativen Spleißens ist hierbei allerdings nicht nur bei höheren Eukaryonten von entscheidender Bedeutung, sondern ist auch für viele Viren ein essentieller Mechanismus, die kodierende Kapazität ihres Genoms zu erhöhen und somit eine Vielzahl verschiedener Proteine von einem Primärtranskript zu generieren.



**Abb. 1.4. Formen des alternativen Spleißens.**

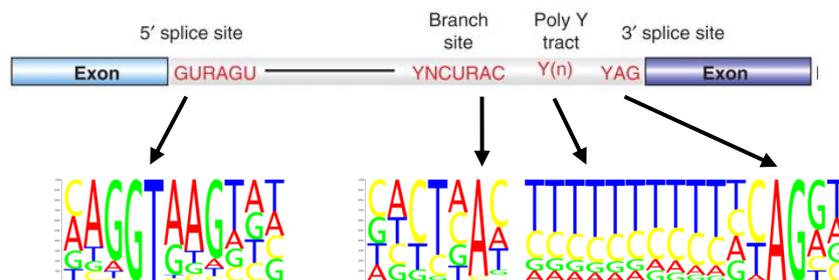
Neben dem konstitutiven Spleißen, erlaubt das alternative Spleißen den Ein- oder Ausschluss alternativer Exons sowie die Integration intronischer Sequenzen. Dies ermöglicht die Generierung mehrerer Proteine von einem Gen und stellt so eine weitere Kontrolle der Genexpression dar (entnommen aus Blaustein *et al*, 2007).

### 1.2.1 Exon/Intron Definition

Um Introns präzise aus der prä-mRNA zu entfernen, sind im Laufe der Evolution konservierte Sequenzelemente entstanden, die für die Exon/Intron Definition essentiell sind. Drei Elemente gelten als die Kern-Spleißsignale und sind daher von entscheidender Bedeutung für den Spleißprozess: die 5'-Spleißstelle (auch Spleißdonor genannt), die 3'-Spleißstelle (auch Spleißakzeptor genannt) und der Verzweigungspunkt (Burge *et al*, 1999). Diese Spleißsignale werden von Komponenten des Spleißosoms erkannt und gebunden, worauf in 1.2.2.1 näher eingegangen wird.

Die 5'-Spleißstelle (5'ss oder SD) markiert die Exon/Intron Grenze am 5' Ende des Introns, wobei das Intron hier mit dem konserviertem GU Dinukleotid (auf DNA Ebene GT) an der Position +1 und +2 beginnt. Des Weiteren ist das GU Dinukleotid von einer weniger konservierten Konsensussequenz, die bis Position -3 innerhalb des Exons und bis Position +8 innerhalb des Introns reicht, umgeben (siehe Abb. 1.5) (Burge *et al*, 1999; Black, 2003; Wahl *et al*, 2009).

Die 3'-Spleißstelle (3'ss oder SA) dagegen kennzeichnet das 3' Ende des Introns, wobei sich diese Region in zwei konservierte Sequenzelemente unterteilen lässt: die Pyrimidin-reiche Region (Pyrimidintract, PPT), ein ab der Position -5 beginnender und bis zu 10 und mehr Nukleotide stromaufwärts ins Intron reichender Pyrimidin Abschnitt, sowie eine Sequenz mit einem hoch konserviertem AG Dinukleotid, was das Ende des Introns definiert (siehe Abb. 1.5) (Burge *et al*, 1999; Black, 2003; Wahl *et al*, 2009).



**Abb. 1.5. Kern-Spleißsignale im humanen GU-AG Introns.**

Die Abbildung illustriert die Haupt-Spleißsignale: 5'-Spleißstelle (splice site), 3'-Spleißstelle, Pyrimidin-reiche Region (Poly (Y) tract) und den Verzweigungspunkt (Branch site). Y= Pyrimidin, R= Purin, N= beliebiges Nukleotid, G= Guanosin, U= Uracil, A= Adenosin, C= Cytosin (entnommen aus Will und Lührmann, 2011).

Die Sequenz-Logos unterhalb der Spleißelemente geben die Häufigkeit der Nukleotide innerhalb der Konsensussequenzen an. Je größer ein Nukleotid dargestellt ist umso konservierter ist es (entnommen aus Hartmann *et al*, 2008).

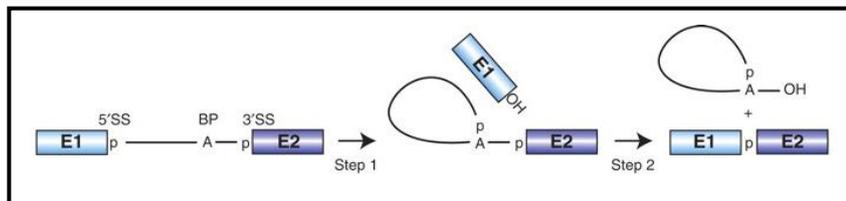
Der Verzweigungspunkt ist dem PPT vorgelagert und ist in der Regel 11-40 Nukleotide vom konserviertem AG Dinukleotid der 3'ss lokalisiert (siehe Abb. 1.5). Er besitzt die Konsensussequenz YNCURAY (Y= Pyrimidin, R= Purin, N= beliebiges

Nukleotid), wobei das Adenin eine wichtige Rolle bei der Initiation der Spleißreaktion spielt (Black, 2003).

Neben den hier beschriebenen GU-AG Introns wurde auch die seltenere Form der AU-AC Introns beschrieben, die abweichende Spleißsequenzen enthalten und von einem anderen Spleißsystem prozessiert werden (Tarn und Steitz, 1996). Auf diese Gruppe soll in dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden.

## 1.2.2 Die Spleißreaktion

Die Entfernung der Introns aus der prä-mRNA erfordert zwei aufeinanderfolgende Transester-Reaktionen. Die erste Reaktion charakterisiert den nukleophilen Angriff der 2'Hydroxylgruppe (-OH) des Verzweigungspunkt-Adenosins auf die Phosphodiesterbindung der 5'ss. Dies hat zum einen die Trennung zwischen Exon und Intron an dieser Stelle zur Folge sowie die Ausbildung einer Lariat-Struktur zwischen dem 5'Ende des Introns und Verzweigungspunkt-Adenosins (siehe Abb. 1.6). Dieser Reaktion folgt nun der zweite nukleophile Angriff der freien 3'OH-Gruppe am 5'-Exon auf die 3'ss, was letztlich in der Ligation der 5'und 3'Exone und in der Entlassung der Intron Lariat-Struktur resultiert (siehe auch Abb. 1.6.) (zusammengefasst in Moore, 1993).



**Abb. 1.6. Schematische Darstellung der zwei aufeinanderfolgenden Transester-Reaktionen.**

Das 5' Exon ist mit E1, das 3' Exon mit E2 gekennzeichnet. Das A gibt das Adenosin des Verzweigungspunktes, das p die Phosphatgruppe an. 5'ss und 3'ss beschreiben die jeweiligen Spleißstellen (entnommen aus Will und Lührmann, 2011)

Im Gegensatz zu der seltenen Gruppe II der selbst spleißenden mRNAs (Jacquier, 1990), interagieren die nuklearen prä-mRNAs mit trans-agierenden Faktoren des Spleißosoms. Die reaktiven Gruppen der Spleißreaktion werden so in räumliche Nähe gebracht und der Spleißprozess katalysiert (Will und Lührmann, 2011).

### 1.2.2.1 Die Spleißosom-Assemblierung

Das U2-abhängige Spleißosom wird aus den kleinen Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs) U1, U2, U5 und U4/U6, sowie einer großen Zahl von nicht-snRNP Proteinen zusammengesetzt. Eine Vielzahl von RNA-RNA, RNA-Protein und Protein-

## 1. Einleitung

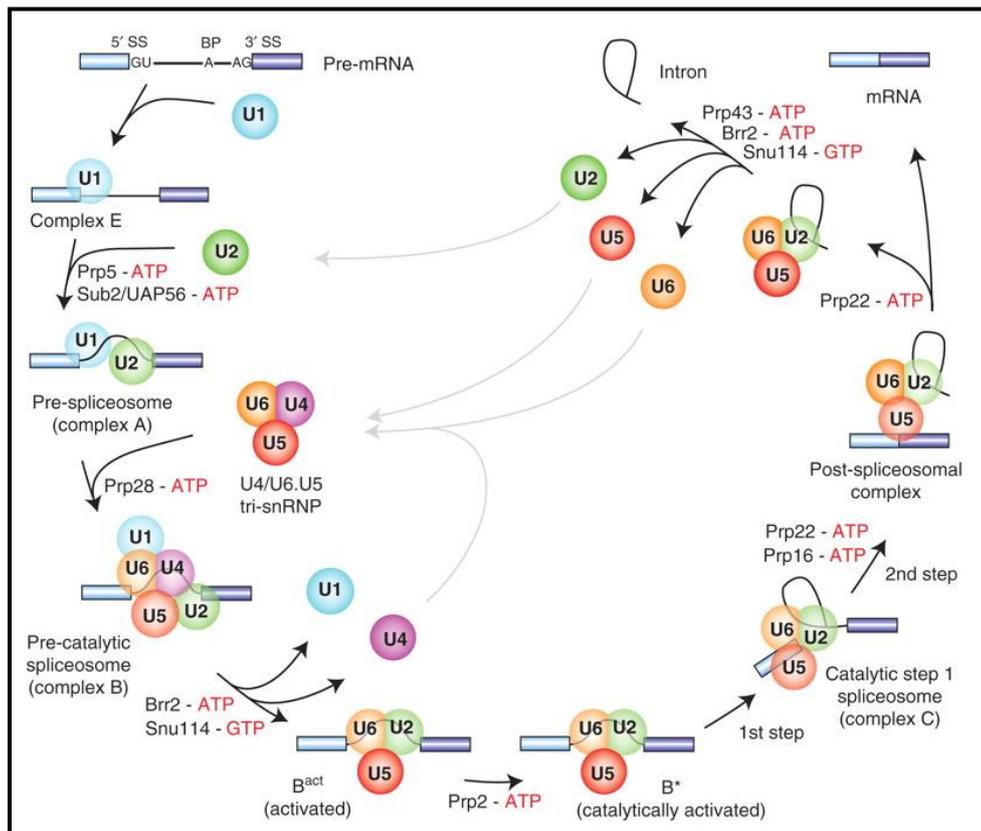
---

Protein Interaktionen, als auch strukturelle Umlagerungen während der Spleißreaktion gewährleisten dann das exakte Herausschneiden der Introns und die präzise Verknüpfung der Exone (Collins und Guthrie, 2000).

Bei den UsnRNPs U1, U2, U5 und U4/U6 handelt es sich um die Haupt-Bausteine des Spleißosoms. Sie sind jeweils aus einer Uracil-reichen snRNA, einer variablen Anzahl von snRNP-spezifischen Proteinen sowie aus den sieben Sm Proteinen B/B', D1, D2, D3, E, F und G aufgebaut (Branlant *et al*, 1981; Wahl *et al*, 2009).

Die Initiation der Spleißosom-Assemblierung wird durch die Formierung des E- (early) Komplexes definiert. Hier wird das U1 snRNP über Basenpaarungen und Protein Interaktionen zu der 5' ss in einem ATP unabhängigen Prozess rekrutiert (siehe Abb. 1.6), während die nicht-snRNP Faktoren SF1/mBBP (splicing factor 1/ mammalian branchpoint binding protein) und U2AF (U2 auxiliary factor) am Verzweigungspunkt und der Pyrimidin-reichen Region binden (Berglund *et al*, 1997). Diese Bindung findet hierbei kooperativ statt, indem SF1/mBBP mittels seines C-terminalen RNA-Erkennungs-Motivs mit der 65 kDa großen Untereinheit von U2AF (U2AF65) interagiert. Die 35 kDa kleine Untereinheit von U2AF (U2AF35) dagegen bindet dann das AG Dinukleotid der 3' ss (Berglund *et al*, 1998). Die Ausbildung des A-Komplexes wird anschließend durch die ATP-abhängige Rekrutierung des U2 snRNPs charakterisiert, wobei die U2 snRNA Basenpaarungen mit dem Verzweigungspunkt eingeht (siehe Abb. 1.6). Diese Interaktion wird durch die Proteine SF3a und SF3b, sowie von U2AF65 stabilisiert (Gozani *et al*, 1996; Valcarcel *et al*, 1996) und führt letztlich zu einer Verschiebung von SF1/mBBP. Nach der Formierung des A-Komplexes tritt das vorassemblierte U4/U6 U5 tri-snRNP dem Spleißosom bei (siehe Abb. 1.6), was in der Ausbildung des B-Komplexes resultiert (Gottschalk *et al*, 1999). In diesem Zustand ist das Spleißosom allerdings noch nicht katalytisch aktiv, da dies zunächst die Umlagerung spleißosomaler Komponenten sowie Konformationsänderungen erfordert. Dies hat zur Folge, dass das U1 und U4 snRNP destabilisieren und letztlich aus dem Spleißosom entlassen werden (siehe Abb. 1.6). Das nun katalytisch aktive Spleißosom (B<sup>\*</sup>-Komplex) vollzieht die erste Transester-Reaktion und geht dabei in den C-Komplex über. Es kommt zur erneuten Umlagerungen der RNPs und der Katalyse der zweiten Transester-Reaktion (siehe Abb. 1.6) (Konarska *et al*, 2006). Abschließend wird die gespleißte mRNA entlassen und die U snRNPs für eine neue Spleißreaktion recycelt (zusammengefasst in Wahl *et al*, 2009; Will und Lührmann, 2011).

## 1. Einleitung



**Abb. 1.6. Schematische Darstellung der Spleißosom-Assemblierung.**

Die Darstellung zeigt die Assemblierung der U1, U2, U5 und U6/U4 snRNP Spleißosom-Bestandteile. In hellblau ist das Exon1 in dunkelblau das Exon2 illustriert. Des Weiteren sind bei den jeweiligen Assemblierungs-Stadien die evolutionär konservierten DEH/D-box RNA ATPasen/Helikasen Prp5, Sub2/ UAO 56, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 und Prp 43 sowie die GTPase Snu114 gekennzeichnet, die die Konformationsänderungen des Spleißosoms während der Spleißreaktion erleichtern (entnommen aus Will und Lüthmann, 2011)

### 1.2.3 Mechanismen der Spleißregulation

Damit beim alternativen Spleißen alternierende Exone ein- oder aus- der mRNA geschlossen bzw. intronische Sequenzen in die RNA integriert werden können, ist eine strenge Regulation erforderlich, die es der Zelle ermöglicht, die richtigen mRNAs zu prozessieren und damit die für die Situation erforderlichen Proteine zu exprimieren. Hierbei spielen drei Hauptregulationsmechanismen eine entscheidende Rolle: 1. die Stärke der Spleißstelle, 2. cis-regulatorische Elemente und 3. trans-agierende Faktoren. Im Folgenden soll auf diese Mechanismen näher eingegangen werden.

#### 1.2.3.1 Intrinsische Stärke der Spleißstellen

Für den Einschluss eines Exons ist es absolut essentiell, dass die jeweiligen 5'- und 3'-Spleißstellen korrekt erkannt werden. Hierbei spielt die Stärke der Spleißstellen eine wichtige Rolle und bildet somit den ersten Schritt in der Spleißkontrolle. Da die Konsensussequenzen der meisten Spleißstellen in höheren Eukaryoten relativ

degeneriert sind, beschreibt die Spleißstellenstärke die Affinität des U1 snRNP und U2AF zur 5´Spleißstelle bzw. Pyrimidin-reichen Region. Dies gibt die Effizienz der Spleißstellenerkennung wieder (Wahl *et al*, 2009).

Die Stärke der 5´-Spleißstelle wird durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem freien 5´Ende der U1 snRNA und der 11 Nukleotid-langen Sequenz des Spleißdonors definiert. Je höher die Komplementarität der U1 snRNA zu seiner Zielsequenz auf der prä-mRNA hierbei ist, umso effizienter wird das Exon letztlich erkannt (Freund *et al*, 2003; Hertel, 2008).

Bei der Erkennung der 3´-Spleißstelle spielt hingegen die Affinität der U2AF65 kDa Untereinheit eine entscheidende Rolle, da dieses Spleißprotein an der Rekrutierung des U2 snRNPs zum Verzweigungspunkt beteiligt ist. Die Affinität von U2AF wird dabei durch die Länge und den Gehalt der Pyrimidin-reichen Region bestimmt. Auch hier gilt, dass mit steigender Affinität von U2AF an die Pyrimidin-reiche Region die Effizienz der Spleißakzeptor-Erkennung erhöht wird (Wu *et al*, 1999, Hertel, 2008).

### **1.2.3.2 Cis-regulatorische Elemente und trans-agierende Faktoren**

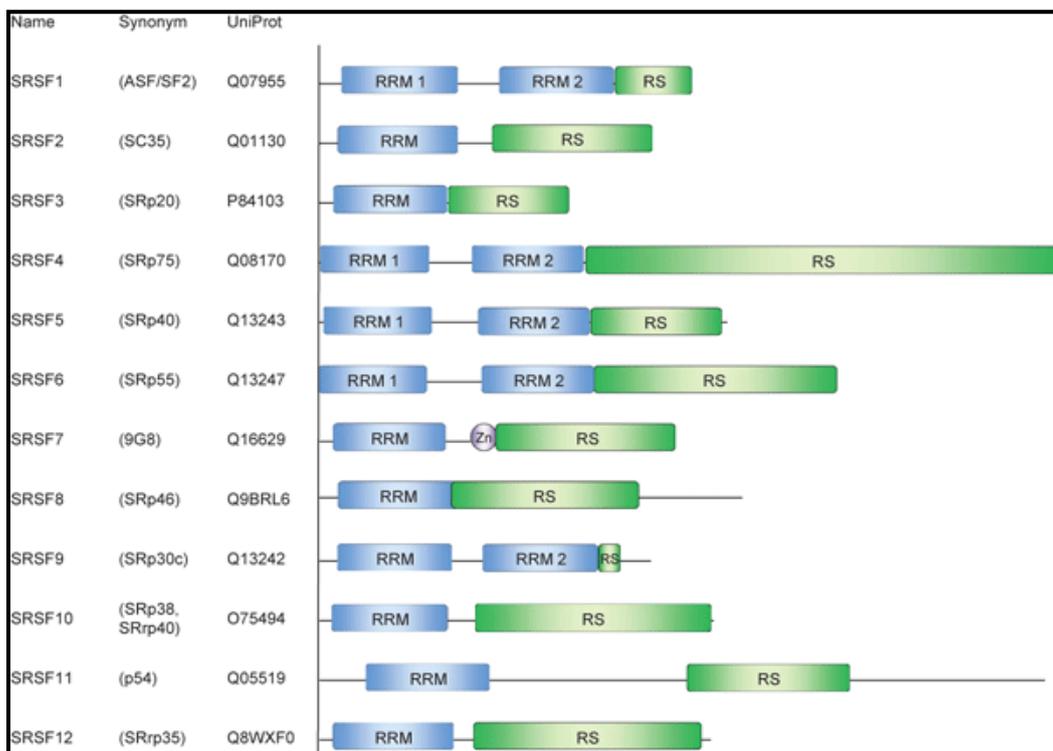
Da in höheren Eukaryoten die Spleißstellen aufgrund ihrer intrinsischen Stärke oft nicht selbst in der Lage sind die Spleißosom-Assemblierung zu initiieren, haben *cis*-regulatorische Elemente einen wesentlichen Einfluss auf die Spleißstellenerkennung. Hierbei können die spleißregulatorischen Elemente (SREs) den Exon Einschluss sowohl positiv als auch negativ modifizieren (Kammler *et al*, 2006).

Die *cis*-regulatorischen Elemente lassen sich hierbei in vier Kategorien einteilen: Exonic Splicing Enhancer (ESE), Intronic Splicing Enhancer (IES), Exonic Splicing Silencer (IES) und Intronic Splicing Silencer (ISS), wobei es sich bei Ersteren um spleißfördernde und bei den Letzteren beiden um spleißinhibitorische Elemente handelt. Diese RNA Sequenzen dienen wiederum als Protein-Bindungs-Stellen, die spleißregulatorische, *trans*-agierende Faktoren rekrutieren. Generell handelt es sich bei diesen Faktoren um SR- (Serin/Arginin- reich) Proteine, die den Spleißprozess positiv regulieren oder um hnRNP- (heterogenous nuclear Ribonucleoproteins) Proteine, die einen eher inhibitorischen Einfluss auf die Spleißstellenerkennung ausüben (Graveley *et al*, 2000; Matlin *et al*, 2005; Pozzoli und Sironi, 2005; Chasin, 2007). Auf diese beiden Hauptgruppen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 1.2.4 SR-Proteine

Die zu den nicht-snRNP gehörenden SR-Proteine (Serin/Arginin-reich) bilden eine große Gruppe von essentiellen Spleißfaktoren, die sowohl beim Entfernen konstitutiv gespleißter Introns als auch beim alternativen Spleißen eine entscheidende Rolle spielen (Manley und Tacke, 1996; Graveley, 2000).

Die SR-Proteine besitzen eine charakteristische strukturelle Organisation, wobei zwei funktionelle Domänen von erheblicher Bedeutung sind: die N-terminale RNA-Bindungsdomäne, sowie die C-terminale Serin-Arginin-reiche (RS) Domäne. Erst genannte enthält ein bis zwei RNA-Erkennungs-Motive (RRMs), die es den Proteinen ermöglicht mit der prä-mRNA zu interagieren. Die RS-Domäne dagegen besteht aus einer Wiederholung von Serin/Arginin Dipeptiden und dient den Proteinen als Protein-Interaktionsdomäne (Wu und Maniatis, 1993; Kohtz *et al*, 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die RS-Domäne auch mit der prä-mRNA in Kontakt treten kann, was mit einer alternativen Spleißosom-Assemblierung im Zusammenhang stehen könnte (Shen *et al*, 2004; Shen und Green, 2004). Die Domänenstruktur der jeweiligen SR-Proteine ist in Abb. 1.7 dargestellt.



**Abb. 1.7. Schematische Darstellung der 12 humanen SR Proteine** (definiert nach Manley und Krainer, 2010; entnommen aus Twyffels *et al*, 2011).

Weiter führte eine umfassende Suche nach RS-Domänen enthaltender Proteine zu der Entdeckung SR-ähnlicher Proteine, die sich in der Struktur der RS-Domäne

sowie in dem Vorhandensein eines typischen RRM von den SR-Proteinen unterscheiden. Zu dieser Gruppe zählen die beiden Untereinheiten von U2AF, die U1 snRNP Untereinheit U1-70K, sowie die Spleiß-Koaktivatoren SRm160/300 (Boucher *et al*, 2001; Long und Cáceres, 2009).

Die Serin-Reste der RS-Domäne können von diversen SR-Protein-Kinasen reversibel phosphoryliert werden. Der Phosphorylierungsstatus der RS-Domäne reguliert dabei die Protein Funktion, die Protein-Protein Interaktionen sowie die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine innerhalb der Zelle (Xiao und Manley, 1997; 1998; Cáceres, *et al.*, 1997).

Man geht davon aus, dass die unterschiedlichen Funktionen der SR-Proteine beim Spleißen einen ganz bestimmten Phosphorylierungsstatus der RS-Domäne erfordern (Graveley, 2000). Die Phosphorylierung des SR-Proteins SRSF1 (SF2/ASF) z.B. fördert die Bindung an das U1-70K (eine Untereinheit des U1snRNPs) Protein *in vitro*. Dagegen wurde die Bindung an andere SR-Proteine, wie SRSF5 (SRp40), oder an U2AF durch die Phosphorylierung reduziert (Misteli, 1999). Weiter konnte in Studien gezeigt werden, dass die Modulation des Phosphorylierungsstatus von SR-Proteinen bei der Aktivierung des prä-mRNA Spleißens während der frühen Entwicklung des Nematoden *Ascaris lumbricoides* (Sanford und Bruzik, 1999) und bei der Kontrolle der SR-Protein Aktivität bei Adenovirus Infektionen eine entscheidende Rolle spielt (Kanopka, *et al*, 1996). Darüber hinaus sind hypo- und hyperphosphorylierte SR-Proteine nicht in der Lage, den Spleißprozess zu unterstützen (Prasad *et al*, 1999).

Neben der Funktion, reguliert der Phosphorylierungsstatus auch die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine. Zum einen müssen SR-Proteine für ihre Aufgaben im Nukleus in den Kern importiert werden. Die RS-Domäne agiert hierbei als Kernlokalisierungssignal (NLS), das von den SR-Protein spezifischen nuklearen Kernimportrezeptoren Transportin SR1 und SR2 (TRN- SR1; TRN- SR2) gebunden wird. Zumindest für den TRN-SR2 vermittelten nuklearen Import ist dabei die Phosphorylierung der RS-Domäne erforderlich (Lai *et al*, 2000; 2001).

Zum anderen lokalisieren die SR-Proteine im Zellkern in so genannten "speckles", bei denen es sich um nukleare Subdomänen handelt, die der Lagerung und/oder der Re-Assemblierung von Spleißfaktoren dienen (Cáceres *et al*, 1997). Während die Phosphorylierung von Serin-Resten in der RS-Domäne in einer Translokation der SR-Proteine zu Orten der Transkription und des Spleißens resultiert, führt die

Dephosphorylierung zu einer erneuten Assoziation der SR-Proteine mit den "speckles" (Misteli und Spector, 1997). Weiter besitzen einige SR-Proteine in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsgrades die Fähigkeit zwischen Nukleus und Cytoplasma zu pendeln (Cazalla *et al*, 2003).

Als bekannte SR-Protein Kinasen gelten die Mitglieder der SR-Protein-Kinase (SRPK)- und Clk/Sty-Familie, sowie die DNA-Topoisomerase 1 (Gui *et al*, 1994; Colwill *et al*, 1996; Rossi *et al*, 1996). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die Akt-Kinase (siehe 1.2.7) (Patel *et al*, 2001; 2005; Blaustein *et al*, 2004; 2005), sowie Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) wie CDK13 als SR-Protein Kinasen fungieren können (Berro *et al*, 2008).

Bis jetzt wurden SRPK1 und 2 als Mitglieder der SRPK-Familie in Säugetieren beschrieben. SRPKs sind überwiegend im Cytoplasma von Zellen in der Interphase lokalisiert, können SR-Proteine jedoch auch im Nukleus phosphorylieren. Die höchste Aktivität zeigt SRPK1 während der Mitose, was für eine Zellzyklus-abhängige Aktivität spricht. Man geht davon aus, dass SRPKs die intrazelluläre Lokalisation der SR-Proteine beeinflusst und so die SR-Protein Funktion indirekt kontrolliert (Koizumi, *et al*, 1999; Shin und Manley, 2004).

Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Mitglieder der Clk/Sty-Kinase Familie. Die Spleißaktivität der SR-Proteine kann durch eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades innerhalb der RS-Domäne durch Clk/Sty beeinflusst werden. Eine Veränderung in der Autophosphorylierung von Clk/Sty modifiziert hierbei dessen eigene Funktion und Substratspezifität (Prasad und Manley, 2003). Weiter zeigen die Clk/Sty-Kinasen eine Co-Lokalisation mit SR-Proteinen im Nukleus, sie besitzen eine RS-Domäne am N-Terminus und phosphorylieren Serin/Threonin- sowie Tyrosin-Reste (Colwill, *et al*, 1996)

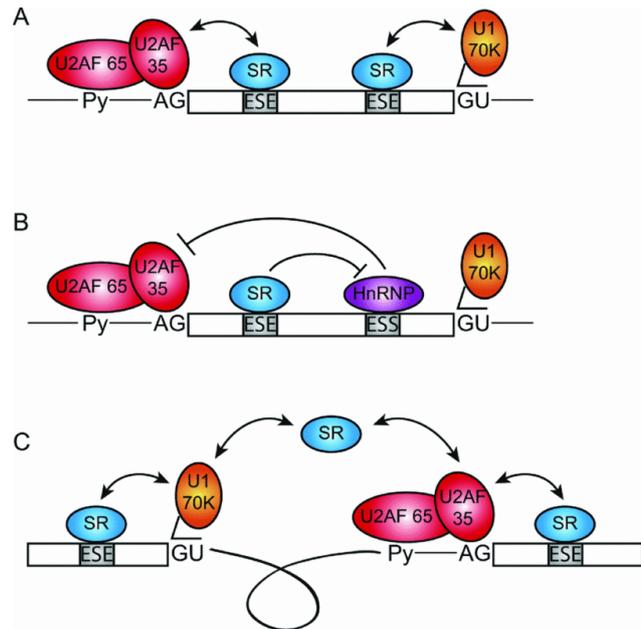
Mit nuklearen Extrakten und permeabilisierten Nuklei konnte gezeigt werden, dass die Serin/Threonin Protein Phosphatasen, Protein Phosphatase 1 (PP1) und Protein Phosphatase 2A (PP2A), die Fähigkeit haben eine Vielzahl von SR-Proteinen zu dephosphorylieren (Mermoud, *et al*, 1994).

SR-Proteine sind multifunktionelle Regulatoren des mRNA Metabolismus mit Aufgaben sowohl im nuklearen als auch cytoplasmatischen Kompartiment der Zelle (Sanford *et al*, 2005).

Eine primäre Funktion beim Spleißen besteht vor allem in der Spleißstellenerkennung und der Spleißosom-Assemblierung (Tacke und Manley 1999; Sanford *et al*, 2003). Zurzeit werden zwei Modelle in diesem Zusammenhang diskutiert. Das "Rekrutierungs-Modell" beschreibt die Bindung von SR-Proteinen an Exonic Splicing Enhancern (ESEs). Hier fördern sie die Rekrutierung und Stabilisierung des U1snRNPs an die 5' ss durch Interaktionen mit der U1-70K Untereinheit (siehe Abb. 1.8) (Eperon *et al*, 1993; Jamison *et al*, 1995; Kohtz *et al*, 1994). An der 3' ss dagegen kommt es durch Interaktionen mit der U2AF35 Untereinheit zur Rekrutierung von U2AF (U2 auxiliary factor), der wiederum die Bindung zwischen U2 snRNP und dem Verzweigungspunkt stimuliert (siehe Abb. 1.8) (Tarn und Steitz, 1995; Wu und Maniatis, 1993). Auf der anderen Seite beschreibt das "Inhibitor-Modell" die antagonistische Wirkung der SR-Proteine gegenüber den ESS gebundenen hnRNPs (siehe Abb. 1.8). SR-Proteine stören hierbei die Bindung von hnRNPs, die ihre Spleiß-negativen Aktivitäten dann nicht mehr ausüben können (Zhu *et al*, 2001) (siehe auch 1.2.5). Des Weiteren sind die SR-Proteine an der Intron Überbrückung mittels RS vermittelten Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Hier kommt es durch Bindung der SR-Proteine an U1-70K und U2AF35 zu einer Annäherung der 5' und 3' ss (siehe Abb. 1.8) (Wu und Maniatis, 1993). Man geht ebenfalls davon aus, dass SR-Proteine auch bei der Rekrutierung des U4/U6/U5-tri-snRNPs in das Spleißosom eine Rolle spielen (Rosciigno und Garcia-Blanco, 1995).

Auch wenn die Funktion der SR-Proteine für gewöhnlich bei der Aktivierung des Spleißens liegt, gibt es auch Fälle, in denen sie als Spleiß-Repressoren fungieren können (Shin und Manley, 2002). Das SR-Protein SRSF1 (SF2/ASF) zum Beispiel, kann je nach Kontext als positiver oder negativer Regulator beim Spleißen auftreten (Kanopka, *et al*, 1996). Weiter verhindert das SR-Protein SRSF10 (SRp38) in dephosphorylierter Form das Spleißen während der M-Phase oder nach einem Hitzeschock, indem es eine feste Interaktion mit dem U1-70K Protein vom U1snRNP eingeht. Dies resultiert darin, dass die Interaktion von SRSF1 mit dem U1snRNP und der 5' Spleißstelle verhindert wird (Shin *et al*, 2004).

## 1. Einleitung



**Abb. 1.8. Rolle der SR-Proteine beim Spleißen.**

(A): Rekrutierungs-Modell, ESE gebundene SR-Proteine fördern die Rekrutierung von U1-70K und U2AF zu den Spleißstellen.

(B): Inhibitor-Modell, ESE gebundene SR-Proteine wirken dem negativen Einfluss von ESS gebundenen hnRNPs entgegen.

(C): Intron Überbrückung, RS-vermittelte Interaktionen der SR-Proteine mit U1-70K und U2AF35 fördern die Annäherung der 5' und 3' ss.

Py: Pyrimidin-reiche Region; AG: 3' ss; GU: 5' ss; ESE: Exonic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer (entnommen aus Long und Cáceres, 2009)

Wie bereits erwähnt, konnte beobachtet werden, dass einige SR-Proteine zwischen Kern und Cytoplasma pendeln können. Es war daher zu vermuten, dass diese SR-Proteine neben dem Spleißen noch andere Aufgaben im mRNA Metabolismus übernehmen.

Pendelnde SR-Proteine wie SRSF3 (SRp20) und SRSF7 (9G8) können an RNA Export-Elemente binden und im Kern sowie im Cytoplasma mit poly(A)<sup>+</sup> RNA assoziieren (Huang und Steitz, 2001). Weiter fungieren einige pendelnde SR-Proteine als mRNA Export-Adapter (u.a. SRSF1), indem sie den Export Rezeptor NXF1/TAP zur mRNA rekrutieren (Huang *et al*, 2003). Die Assoziation findet dabei an der N-terminalen Region von NXF1/TAP statt, die auch von der Export Adapter Proteinfamilie REF/Aly gebunden wird (Dimaano und Ullman, 2004). Die Interaktion mit NXF1/TAP setzt allerdings die Hypophosphorylierung der SR-Proteine voraus (Huang *et al*, 2004; Lai und Tarn, 2004).

Eine weitere Rolle spielen die SR-Proteine (u.a. SRSF1) bei der cytoplasmatischen mRNA Stabilität, sowie dem nonsense-mediated mRNA decay (NMD). So führt die Überexpression von SR-Proteinen im Falle unkorrekt gespleißter mRNAs zu einer Veränderung der Spleißstellenwahl und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Degradation der mRNA durch NMD. Dies erfordert die RS-Domäne, jedoch nicht die Fähigkeit der SR-Proteine zu pendeln (Zhang und Krainer, 2004). Weiter können SR-Proteine auch über andere Mechanismen als dem NMD einen Einfluss auf die mRNA Stabilität nehmen. So bindet SRSF1 an spezifische Sequenzen der PKCI-mRNA, was letztlich zu einer Destabilisierung der mRNA führt (Lemaire *et al*, 2002).

SR-Proteine sind auch an der Regulation der Translation beteiligt. So hat SRSF1 die Fähigkeit mit dem 80S Ribosomen und Polysomen zu assoziieren. In HeLa-Zellen führt die Überexpression von SRSF1 zu einer Stimulation der Translation. Weiter zeigten Reporter-mRNAs durch SRSF1 Stimulation eine verstärkte Translation in *Xenopus* Oocyten (Sanford *et al*, 2004).

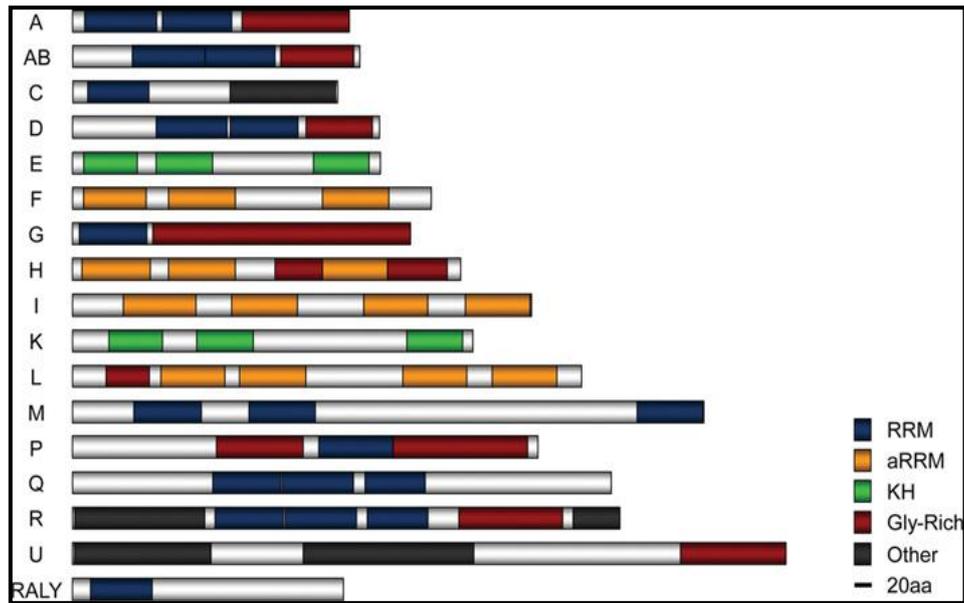
### 1.2.5 hnRNP-Proteine

Wie die SR-Proteine, stellen auch die hnRNP-Proteine (heterogeneous Ribonukleoproteins) eine große heterogene Gruppe RNA bindender Proteine dar, die eine Vielzahl von Aufgaben im mRNA Metabolismus übernehmen. Hier spielen sie eine entscheidende Rolle beim Verpacken naszierender Transkripte, der Regulation der Translation sowie dem alternativen Spleißen.

hnRNP-Proteine sind ebenfalls modular aufgebaute Proteine, die multiple, durch Linker-Regionen verbundene Domänen besitzen. Bei der unter den hnRNPs am weitverbreitetsten Domäne handelt es sich um das RNA-Erkennungs-Motiv (RRM), welche die Bindung an die mRNA ermöglicht (Hoffman *et al*, 1991). Neben dieser RNA-Bindungs-Domäne finden sich bei den unterschiedlichen Familien jedoch auch noch andere Motive für die RNA Bindung, wie die KH- (K-Homologie) Domäne, die quasi RRM (qRRM, auch als atypische RRM (aRRM) bezeichnet) sowie eine Glycin-reiche Domäne (Kiledjian und Dreyfuss, 1992; Dominguez und Allain, 2006; Valverde *et al*, 2008). Hierbei können einzelne hnRNPs mehrere dieser Domänen enthalten. Das Vorkommen der verschiedenen RNA-Binde-Motive ist in Abb. 1.9 zusammenfassend dargestellt.

Eine andere Gemeinsamkeit vieler hnRNPs ist die Anwesenheit von sogenannten RGG-Boxen, bei denen es sich um Wiederholungen von Arginin-Glycin-Glycin-Tripeptiden handelt, die von aromatischen Aminosäuren durchsetzt sind. Des Weiteren besitzen eine Vielzahl der hnRNP-Proteine Hilfsdomänen (sogenannte auxiliary Domänen), die eine charakteristische Aminosäure-Zusammensetzung besitzen (wie z.B. Glycin-reiche- oder Prolin-reiche- sowie saure-Domänen) und als Protein Interaktionsdomänen dienen können (Görlach *et al*, 1993; Dreyfuss *et al*, 1993).

## 1. Einleitung



**Abb. 1.9. RNA-Bindungsdomänen der verschiedenen hnRNPs.**

Dargestellt ist die Zusammensetzung der hnRNP-RNA-Bindungs-Domänen. Die hnRNPs lassen sich in verschiedene Familien unterteilen, wobei die wichtigsten Familien die hnRNP A/B Familie (hnRNP A0, A1, A2/B1, B2 und A3), die hnRNP F/H Familie (hnRNP F, H1, H2 und H3), die hnRNP C Familie (hnRNP C1 und C2), hnRNP E/K Familie (hnRNP E1, E2 und K), die hnRNPI (PTB: Polypyrimidin-Tract-Binding-Protein) und die hnRNPs D und G.

“A“ gibt in dieser Abbildung die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den hnRNPs A0, A1, A2/B1 und A2 wieder. RRM: RNA-Erkennungs-Motiv; aRRM: atypisches RRM; KH: KH-Domäne; Gly-rich: Glycin-reich (entnommen aus Han *et al*, 2010)

Ähnlich wie SR-Proteine können auch die hnRNP-Proteine post-translational modifiziert werden. Hierbei können Serine oder Threonine phosphoryliert sowie Arginine methyliert werden, was deren Aktivität, Protein oder RNA-Interaktionen sowie die zelluläre Lokalisation beeinflusst. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die hnRNPs A/B, E, G, H, J, K, P, Q, R und U an Argininen methyliert werden können (Liu und Dreyfuss, 1995), was deren Kernimport fördert und den Export der hnRNPs verlangsamt (Nichols *et al*, 2000; Maggipinto *et al*, 2004; Passos *et al*, 2006). Eine weitere beschriebene Konsequenz ist die verringerte Affinität der hnRNPs zu Nukleinsäuren. hnRNP A1 z.B. verliert nach Arginin-Methylierung die Fähigkeit unspezifisch an Nukleinsäuren zu binden (Rajpurohit *et al*, 1994). Die hnRNPs werden hierbei in den meisten Fällen von der Protein Arginine N-Methyltransferase 1 methyliert (Nichols *et al*, 2000; Wada *et al*, 2002; Passos *et al*, 2006).

Weiter hat die Phosphorylierung der hnRNPs einen Einfluss auf deren Funktionen. Die Phosphorylierung von hnRNP A1 durch die Akt-Kinase am Serin Rest 199 z.B. führt dazu, dass hnRNP A1 in diesem Zustand seine Funktion als IRES- (Internal Ribosome Entry Site) trans-agierender Faktor (ITAFs) nicht mehr ausüben kann, was in der Inhibition der Cyclin D1 und *c-myc* IRES Aktivität resultiert (Jo *et al*, 2008). Des Weiteren hat die Phosphorylierung von hnRNP E1 am Serin Rest 43 die von TGF- $\beta$

(Transforming growth factor-beta) vermittelte Induktion von EMT (Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation) zur Folge. Die Phosphorylierung findet hierbei durch die Akt-Kinase Isoform 2 statt und stört hnRNP E1 in seiner Funktion als translationaler Inhibitor (Chaudhury *et al*, 2010). Weitere Beispiele sind die Phosphorylierung des hnRNP K Proteins durch die c-Src-Kinase, was zur translationalen Aktivierung von gehemmten mRNAs führt (Ostareck-Lederer *et al*, 2002) sowie die Phosphorylierung von hnRNP C Proteinen durch die Casein-Kinase II, was die Bindung dieser Proteine an die mRNA reguliert (Mayrand *et al*, 1993).

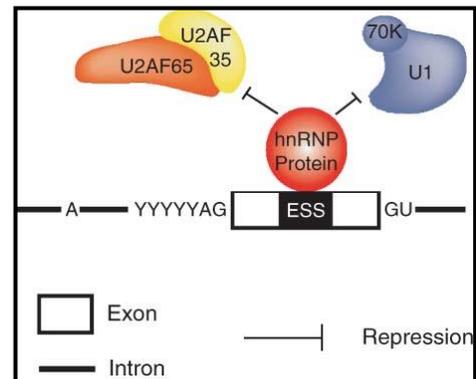
Für die Vielzahl von Aufgaben, die hnRNP-Proteine im mRNA Metabolismus übernehmen, ist es erforderlich, dass diese zwischen dem Kern und Cytoplasma Kompartiment pendeln können. Bei hnRNP A1 findet sich hierfür eine 38 Aminosäure lange Glycin-reiche Domäne, die als NS-Signal (Nucleo-Cytoplasmatic-Shuttling Domain) fungiert und als M9-Domäne bezeichnet wird (Siomi und Dreyfuss, 1995). Sie übernimmt hierbei die Aufgabe des Kernimport-Signals und kann auch den Kernexport der Proteine in einer Temperatur-abhängigen Weise unterstützen (Michael *et al*, 1995; Weighardt *et al*, 1996). Die hnRNP C und U Proteine enthalten dagegen ein klassisches Kern-Lokalisations-Signal (NLS). HnRNP K besitzt sowohl ein klassisches NLS sowie eine NS-Domäne, wobei die Serine 284 und 385 innerhalb der NS-Domäne MAPK/ERK abhängig phosphoryliert werden können, was den Export des Proteins ins Cytoplasma zur Folge hat (Michael *et al*, 1997; Habelhah *et al*, 2001). Des Weiteren besitzt hnRNP E2 zwei funktionell unabhängige NLS-Domänen, die bei den hnRNP Proteinen E3 und E4 jedoch fehlen (Chkheidze und Liebhaber, 2003).

Wie oben bereits erwähnt, sind die hnRNP-Proteine an allen wichtigen Prozessen des mRNA Metabolismus beteiligt. Neben der Verpackung der naszierenden mRNA, sind sie in den mRNA Export, der Translationskontrolle, der mRNA Stabilität sowie der Lokalisation der mRNA involviert (Gallouzi und Steitz, 2001; Habelhah *et al*, 2001; Xu *et al*, 2001; Carson *et al*, 2001).

Neben diesen Aufgaben ist eine weitere wichtige Funktion der hnRNP-Proteine die Beteiligung an der Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens. Hier fungieren sie primär als Repressoren des Spleißprozesses (Caceres *et al*, 1994; Chou *et al*, 1999; Mourelatos *et al*, 2001). Ähnlich wie bei den SR-Proteinen üben sie ihren Einfluss auf das Spleißen durch Spleißstellen-spezifische Bindungen an der Ziel-RNA aus. HnRNP-Proteine binden hierbei vornehmlich exonische- oder

## 1. Einleitung

intronische-Spleiß-Silencer wobei sie mit der Spleißosom-Assemblierung bzw. der Rekrutierung von snRNPs zur Spleißstelle interferieren oder Exons in schleifenartige Strukturen bringen, so dass sie von der Spleißmaschinerie nicht mehr erkannt werden können (siehe Abb. 1.10) (Zhu *et al*, 2001; Tange *et al*, 2001; House und Lynch, 2006; Martinez-Contreras *et al*, 2007). Hierbei sind ihre Protein-Interaktions-Domänen (RGG-Boxen, die Prolin- und Glycin-reichen sowie die saure- Domänen) von großer Bedeutung.



**Abb. 1.10. Repression des Spleißens durch hnRNP-Proteine.**

Silencer gebundene hnRNP-Proteine interferieren mit der Assemblierung von Spleißfaktoren. AG und GU geben die Spleißstellen wieder (entnommen aus Busch und Hertel, 2011).

Der inhibitorische Effekt der hnRNP-Proteine kann, wie oben erwähnt, durch sterische Blockierung der SR-Proteinbindung an ESE oder spleißosomaler Faktoren an die Spleißstellen ausgeübt werden. Das hnRNP I Protein (PTB) z.B. bindet die Pyrimidin-reiche Region und verhindert so die Bindung von U2AF (Singh *et al*, 1995; Spellman und Smith, 2006; Sauliere *et al*, 2006).

Weiter interferiert die Bindung von hnRNP A1 an ein am Verzweigungspunkt lokalisiertes ISS-Element vor dem HIV-1 Tat Exon3 mit der Rekrutierung des U2 snRNPs (siehe Abb. 1.11 B) (Tange *et al*, 2001). Ein weiteres Modell stellt hierbei die Bindung von hnRNP A1 an den ESS3 im Tat Exon3 dar, wobei hnRNP A1 hier an das regulatorische Element bindet und weitere hnRNP A1 Proteine in diese Region rekrutiert. Dies hat wiederum zur Folge, dass das SR-Protein SRSF1 aufgrund der sterischen Behinderung sein Enhancer Element nicht mehr binden kann (siehe Abb. 1.11 A) (Zhu *et al*, 2001).

Neben der sterischen Blockierung von Spleißfaktoren können hnRNP-Proteine, wie oben erwähnt, auch durch Ausbildung einer Schleifen-Struktur ("looped out") die Erkennung des Exons durch die Spleißmaschinerie verhindern. Hierbei kommt es zu Protein-Protein Interaktionen zwischen hnRNPs (z.B. hnRNP A1), die an auseinanderliegenden Sequenzen gebunden sind (meist im Intron lokalisiert), was

## 1. Einleitung

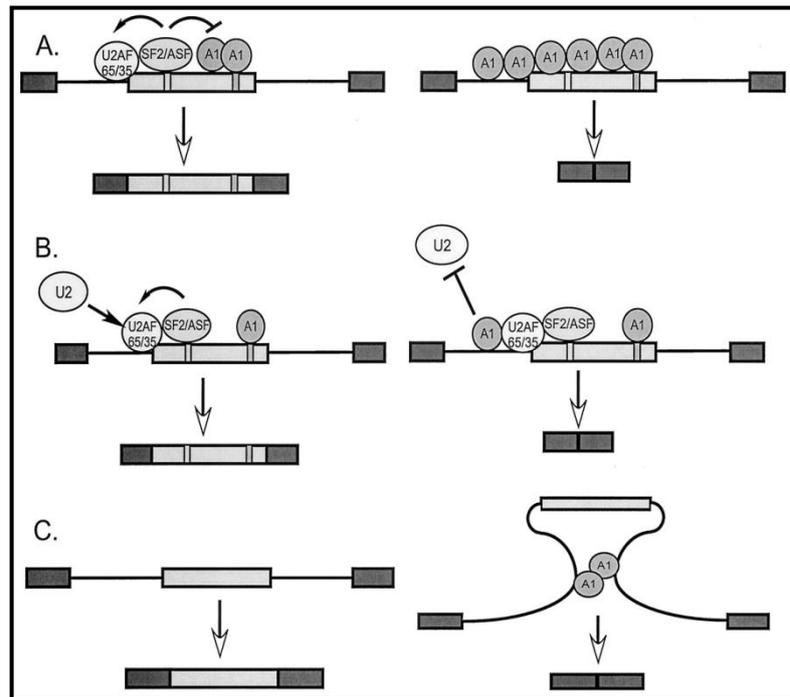
letztlich das "Ausschleifen" des Exons zur Folge hat (siehe Abb. 1.11 B) (Nasim *et al*, 2002).

**Abb. 1.11 Modelle zur hnRNP A1 vermittelten Spleiß-Repression.**

A: Die Bindung von hnRNP A1 an das ESS3 Element im HIV-1 Tat Exon3 führt zur Rekrutierung weiterer hnRNP A1 Proteine und zur sterischen Hinderung von SF2/ASF (SRSF1).

B: Die Bindung von hnRNP A1 an das ISS-Element inhibiert die Rekrutierung des U2snRNPs.

C: hnRNP A1-vermittelte "Ausschleifung" des Exons (Abb. entnommen aus Black, 2003)



HnRNP-Proteine können des Weiteren nicht nur als Spleiß-Repressoren fungieren, sondern können auch aktivatorisch wirksam sein. So wurde für die hnRNP-Proteine F und H beschrieben, dass sie durch die Bindung von fördernden intronischen Elementen (ISE) das Spleißen stimulieren können (Min *et al*, 1995; Chou *et al*, 1999; Garneau *et al*, 2005).

Neben den beiden großen Gruppen der SR- und hnRNP-Proteine, gibt es noch andere beschriebene Spleißfaktoren, die den Spleißprozess beeinflussen können. Zu diesen Proteinen gehören TIA1 (T Cell-Restricted Intracellular Antigen 1), die Mitglieder der STAR-Proteine (z.B. Sam68), NOVA1 und 2 (Neurological Ventral Antigen), FOX1 und 2, sowie Tra2 (Transformer 2) und SRm160 (SR-Related Nuclear Matrix Protein), die beide mittels ihrer RS Domäne mit SR-Proteinen interagieren können (zusammengefasst in Chen und Manley, 2009).

### 1.2.6 Mechanismen der SR- und hnRNP-Protein vermittelten Spleiß-regulation

In den meisten Fällen ist das alternative Spleißen eine Kombination aus multiplen positiv und negativ wirkenden *cis*-regulatorischen Elementen und deren *trans*-

agierenden Spleißfaktoren. Ob ein alternatives Exon letztlich in die mRNA integriert wird hängt hierbei auch von der Konzentration und Aktivität der jeweiligen Spleißfaktoren ab. Das SR-Protein SRSF7 (9G8) und die hnRNP-Proteine H und F z.B. konkurrieren beim  $\alpha$ -Tropomyosin Exon2 Spleißen um die Bindung an dasselbe Element, während die SR-Proteine SRSF1 und SRSF2 (SF2/ASF und SC35) antagonistische Funktionen gegenüber den hnRNP A1-Protein beim  $\beta$ -Tropomyosin Exon6B Spleißen übernehmen (Crawford und Patton, 2006; Expert-Bezancon *et al*, 2004). Hierbei wird nicht nur um gemeinsame RNA-Binde-Sequenzen konkurriert sondern auch um Protein-Interaktionen. Das Verhältnis der antagonistisch wirkenden Spleißfaktoren ist daher von entscheidender Bedeutung für das alternative Spleißen. So inhibiert die Bindung von SRSF1 an das ESE-Element im Tat Exon3 z.B. die Rekrutierung weiterer hnRNP A1 Proteine, so dass der repressive Effekt von hnRNP A1 verhindert wird (siehe Abb. 1.11 A) (Zhu *et al*, 2001). Dieser Zustand wird natürlich durch die höhere Konzentration an SFRS1 in der Umgebung gefördert, während eine höhere Konzentration an hnRNP A1 den anderen Fall begünstigen würde. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Konzentration der SR- und hnRNP-Proteine in den unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien stark variieren kann (Kamma *et al*, 1995; Hanamura *et al*, 1998; Pollard *et al*, 2000).

Des Weiteren haben auch die post-translationalen Modifikationen einen Einfluss auf die Aktivität der Spleißfaktoren sowie auf deren zelluläre Lokalisation (zusammengefasst in Smith and Valcarcel, 2000). So hat eine stressinduzierte Signalgebung einen Einfluss auf das Verhältnis von SR- und hnRNP-Proteinen im Kern, da das hnRNP A1 Protein in diesem Zusammenhang phosphoryliert und in das Cytoplasma exportiert wird, was wiederum das alternative Spleißen hat beeinflusst (van der Houven van Oordt *et al*, 2000).

Zusätzlich hierzu hat auch die Position der gebundenen Spleißfaktoren einen erheblichen Einfluss darauf, ob der Faktor aktivierende oder repressive Auswirkungen hat. Ist die SR-Protein Bindungssequenz z.B. im Intron lokalisiert, interferiert die SR-Protein Bindung mit der Spleißosom Assemblierung. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass im Intron gebundene hnRNPs die 5' ss aktivieren und so fördernd auf die Spleißosom-Assemblierung wirken können (Buratti *et al*, 2007; Hicks *et al*, 2010; Ibrahim, *et al*, 2005; Shen und Mattox, 2012; Hastings *et al*, 2001; Llorian *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011; Erkelenz *et al*, 2012).

### **1.2.7 Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalwegs auf die Regulation des prä-mRNA Spleißens.**

Wie in den letzten Abschnitten bereits besprochen wurde, steht auch das alternative Spleißen, wie fast alle zellulären Vorgänge, unter einer strengen Regulation. Die Stärke der Spleißstellen sowie *cis*-agierende Elemente, die wiederum von *trans*-agierenden Spleißfaktoren gebunden werden, spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Zurzeit ist allerdings wenig darüber bekannt in wie weit sich extrazelluläre Stimuli und Signalwege auf die Regulation des alternativen Spleißens auswirken.

In den letzten 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Akt-Kinase neben den genannten zellulären Prozessen auch bei der Regulation des alternativen Spleißens eine wichtige Rolle spielt (Zhou *et al*, 2012). Viele SR-Proteine (siehe 1.2.5) scheinen potentielle Substrate der Akt-Kinase zu sein, da diese Erkennungsmotive für die Akt-Phosphorylierung besitzen (Obata, *et al*, 2000). Durch die Phosphorylierung des SR-Proteins SRSF5 (SRp40) nach Insulinstimulation kommt es zum alternativen Spleißen der PKC $\beta$  II mRNA in Skelettmuskelzellen. Hierbei phosphoryliert Akt2 SRSF5 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Patel *et al*, 2001; 2005). Ein weiteres Beispiel hierfür ist das alternative Spleißen der Fibronectin mRNA. Durch Stimulation mittels Wachstumsfaktoren kommt es auch hier zur Aktivierung der Akt-Kinase. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung und erhöhten Aktivität der SR-Proteine SRSF7 (9G8) und SRSF1 (SF2/ASF). Diese beiden SR-Proteine spielen beim alternativen Spleißen des Fibronectin-Transkripts eine wichtige Rolle, wobei es auch hier Hinweise darauf gibt, dass die Akt-Kinase die Funktion der SR-Proteine beeinflusst (Blaustein *et al*, 2004; 2005). Das SR-Protein SRSF1 ist weiter für die Expression und das Spleißen der späten mRNAs des BPV-1 (Bovine Papillomavirus Typ1) erforderlich. Auch hier wird die Funktion von SRSF1 durch die Akt-Kinase reguliert (Liu *et al*, 2003).

## **1.3 Das Humane Immundefizienz-Virus Typ 1**

Das humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) gehört zu der Familie der Retroviren (Retroviridae) und besteht aus zwei einzelsträngigen, von einer Hülle umgebenen Ribonukleinsäuremolekülen.

Das Virus infiziert vornehmlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen, jedoch auch andere CD4-Rezeptor tragende Zellen des Immunsystems, was letztlich zum Verlust dieser Zellen und

somit zum erworbenen Immundefizienz Syndrom AIDS (Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome) führt.

Die Transmission des Virus findet über Geschlechtsverkehr, kontaminiertes Blut und durch Mutter-Kind Übertragungen während der Schwangerschaft statt. Zurzeit sind weltweit mehr als 33 Millionen Menschen mit HIV-1 infiziert, wobei ein Großteil dieser Menschen im südlichen und östlichen Afrika lebt.

Ein Cocktail aus verschiedenen Medikamenten (hoch aktive antiretrovirale Therapie, HAART), hat es in den letzten Jahren ermöglicht, die Lebenszeit der mit HIV-1 infizierten Menschen deutlich zu verlängern. Es sei an dieser Stelle jedoch erwähnt, dass den meisten infizierten Menschen der Zugang dieser Medikamente verweigert wird.

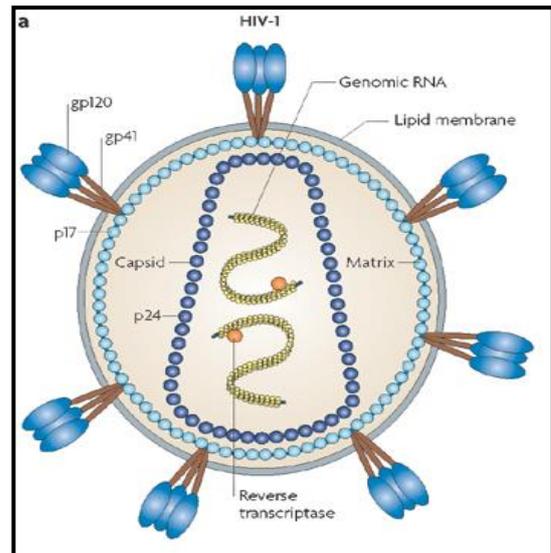
Eines der Hauptprobleme ist dennoch die hohe Frequenz mit der es dem HI-Virus gelingt, sich der Wirksamkeit dieser Medikamente, aufgrund seiner hohen Mutationsrate, zu entziehen. Des Weiteren ist es bis heute noch nicht gelungen, einen Impfstoff gegen HIV-1 zu entwickeln.

### **1.3.1 Morphologie von HIV-1**

Die infektiösen HIV Virionen sind von kugelförmiger Struktur und enthalten das diploide Genom bestehend aus zwei einzelsträngigen RNAs in Plus-Orientierung. Das Virion wird hierbei von einer, von der Wirtszelle stammenden, Lipid-Doppelmembran umgeben und umfasst einen Durchmesser von ca. 125-145 nm (Briggs *et al*, 2003; Grunewald und Cyrklaff, 2006). Aus der Oberfläche ragen Trimere der Oberflächen-Glykoproteine gp41 und gp120 (Gelderblom *et al*, 1989; Wilk *et al*, 2001). Die Innenseite der Membran wird durch das Matrixprotein p17 ausgekleidet, welche über das Linker-Protein p6 mit dem Virus Capsid in Verbindung steht (Frankel und Young, 1998). Das Protein p24 bildet das konisch-förmige Capsid und umschließt das virale Genom, welches mit dem Nukleoprotein p7 komplexiert ist. Des Weiteren enthält das Capsid noch die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (p66/51), Integrase (p31) und Protease (14) sowie die viralen Proteine Vpr (Viral Protein R), Vif (Viral Infectivity Factor) und Nef (Negative Effector) (Frankel und Young, 1998).

### Abb. 1.12. Struktur von HIV-1.

Das Virion ist von einer Lipid-Doppelmembran umgeben. Die trimeren gp120-gp41 Komplexe sind in die Hülle eingebettet, wobei der cytoplasmatische Teil von gp41 mit dem Matrix-Protein p17 interagiert. Das Capsid-Protein umschließt das virale Genom. Im Capsid sind neben der Reversen Transkriptase noch die viralen Enzyme Integrase und Protease sowie die viralen Proteine Vpr, Vif und Nef lokalisiert (nicht gezeigt) (entnommen aus Karlsson Hedestam *et al*, 2008).



### 1.3.2 Die HIV-1 Replikation

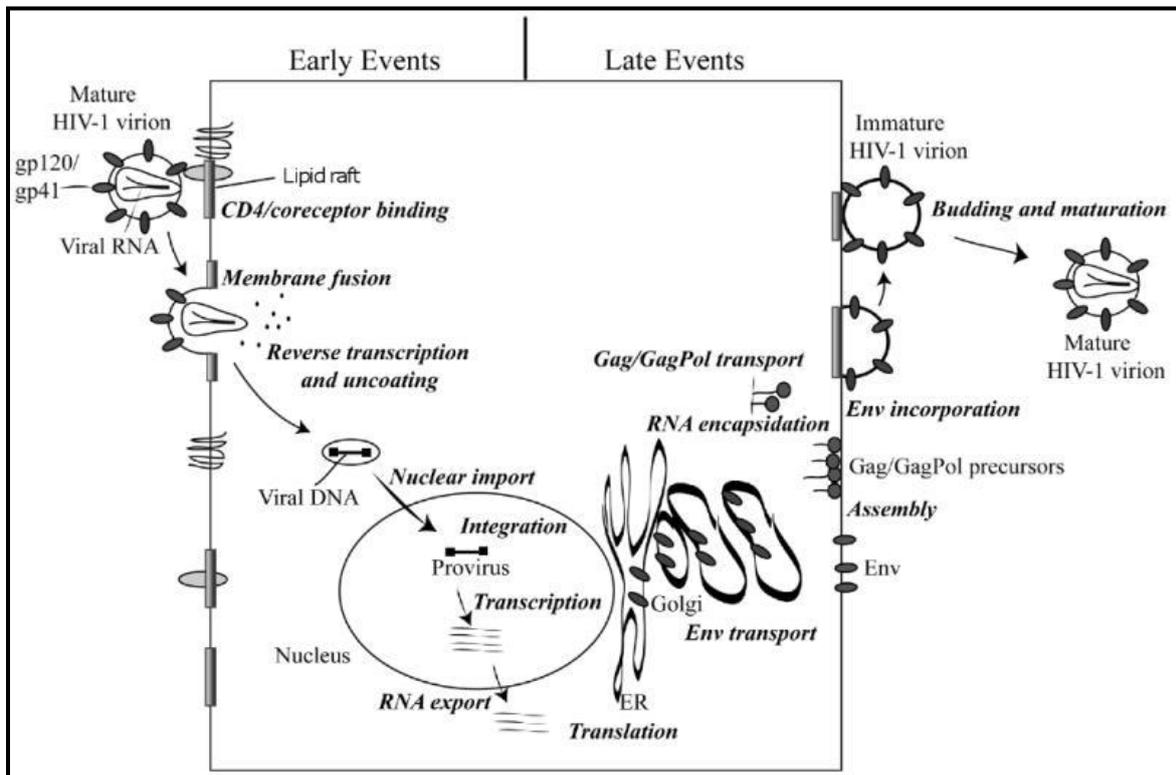
Wie bereits erwähnt, infiziert HIV-1 Zellen des Immunsystems, welche den CD4 Rezeptor tragen. Die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 vermitteln hierbei den Eintritt in die Wirtszelle (Chan und Kim, 1998; Clapham und McKnight, 2001). Die Bindung der Glykoproteine an den CD4-Liganden resultiert in einer Konformationsänderung im gp120 Protein, was nun Bindungsstellen für die Interaktion mit Co-Rezeptoren freilegt (Alkhatib *et al*, 1996; Chan und Kim, 1998; Choe *et al*, 1996; Clapham und McKnight, 2001). Bei diesen Co-Rezeptoren handelt es sich um die Chemokin-Rezeptoren CXCR4 oder CCR5, wobei die Nutzung des jeweiligen Co-Rezeptors vom HIV-Stamm abhängig ist (Berger *et al*, 1999; Doms, 2000). Die Bindung von gp120 an den Co-Rezeptor führt dann sowohl bei gp120 als auch bei gp41 zu weiteren Konformationsänderungen, was letztlich die Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran und das Entlassen des viralen Kern-Partikels in die Zelle zur Folge hat (Doms, 2000; Melikyan, 2008).

Nach dem Eintritt in die Wirtszelle und dem Entpacken des Capsids, kommt es im Cytoplasma zum Umschreiben des viralen RNA Genoms in doppelsträngige DNA. Dieser Prozess wird von der viralen reversen Transkriptase katalysiert (Harrich und Hooker, 2002; Freed, 2001), die hierbei allerdings aufgrund der fehlenden Proof-Reading Funktion, eine hohe Fehlerrate aufweist. Dies hat eine hohe Mutationsrate zur Folge, was letztlich zu der Entstehung von Quasispezies und Medikamenten-Resistenz führt (Mansky und Temin, 1995). Die neu-synthetisierte DNA wird dann über die Kernporen in Form eines prä-Integration-Komplexes in den Nukleus importiert und durch das virale Enzym Integrase in ein Wirtszellchromosom integriert

## 1. Einleitung

(Popov *et al*, 1998; Brown *et al*, 1989; Craigie, 2001; van Maele und Debyser, 2005). Es folgt die Transkription sowie das Spleißen der viralen mRNAs (Purcell und Martin, 1993), dessen Export ins Cytoplasma und die Translation der viralen Proteine (Hanly *et al*, 1989; Klotman *et al*, 1991; Michael *et al*, 1991; Cullen, 2003; Pollard und Malim, 1998).

Die neusynthetisierten viralen Proteine werden nun mit zwei Kopien von ungespleißten, einzelsträngigen RNA zu neuen Virionen verpackt. Zeitgleich zur Entlassung des Viruspartikel aus der infizierten Zelle, spaltet die virale Protease die Gag und Gag-Pol-Polyprotein-Vorläufer, was letztlich zu reifen, infektiösen Virus Partikeln führt (Berkowitz *et al*, 1996; Swanstrom und Wills, 1997; Adamson und Freed, 2007; Ganser-Pornillos *et al*, 2008).



**Abb. 1.13. Überblick über den HIV-1 Replikations-Zyklus.**

Die Replikation ist in eine frühe (early) und späte (late) Phase unterteilt. Während der frühen Phase kommt es zur Rezeptor/Co-Rezeptor-Bindung, dem Eintritt in die Wirtszelle, die Entpackung des Capsids und die Freilassung des viralen Genoms sowie die reverse Transkription des viralen Genoms, den Import der DNA in den Nukleus und dessen Integration in ein Chromosom.

Die späte Phase beginnt mit der Transkription und dem Spleißen der viralen mRNAs, gefolgt von dem Export der RNAs ins Cytoplasma, der Translation der viralen Proteine, dem Env und Gag/GagPol Transport, der Capsid-Bildung mit dem Einschluss des viralen Genoms sowie die Entlassung des Virus-Partikel aus der infizierten Zelle und dessen Reifung zum infektiösem Virion (nähere Erklärungen siehe Text) (entnommen aus Adamson und Freed, 2010).

### 1.3.3 Das HIV-1 Genom und das virale alternative Spleißen

HIV-1 ist ein komplexes Retrovirus, dessen 9 Kilo-Basen (kb) großes Genom aus 9 offenen, sich z.T. überschneidenden, Leserahmen besteht. Diese offenen

Leserahmen können hierbei sowohl intronisch als auch exonisch lokalisiert sein. Insgesamt kodiert das HIV-1 Genom für 18 virale Proteine. Der Leserahmen für die 4 Gag-Proteine, Matrix (MA, p17), Capsid (CA, p24), Nucleocapsid (NC, p7) und p6, ist im 5'-Bereich des Genoms lokalisiert. Dies gilt ebenfalls für den Leserahmen der 3 Pol-Proteine, Protease (PR, p10), reverse Transkriptase (RT, p66/51) und Integrase (IN, p32), die für die viralen Enzyme kodieren. Der Leserahmen für die Env Proteine dagegen ist im 3'-Bereich des Genoms lokalisiert und kodiert für die Glykoproteine gp120 (SU) und gp41 (TM), die die strukturellen Komponenten der Lipid-Doppelschicht darstellen.

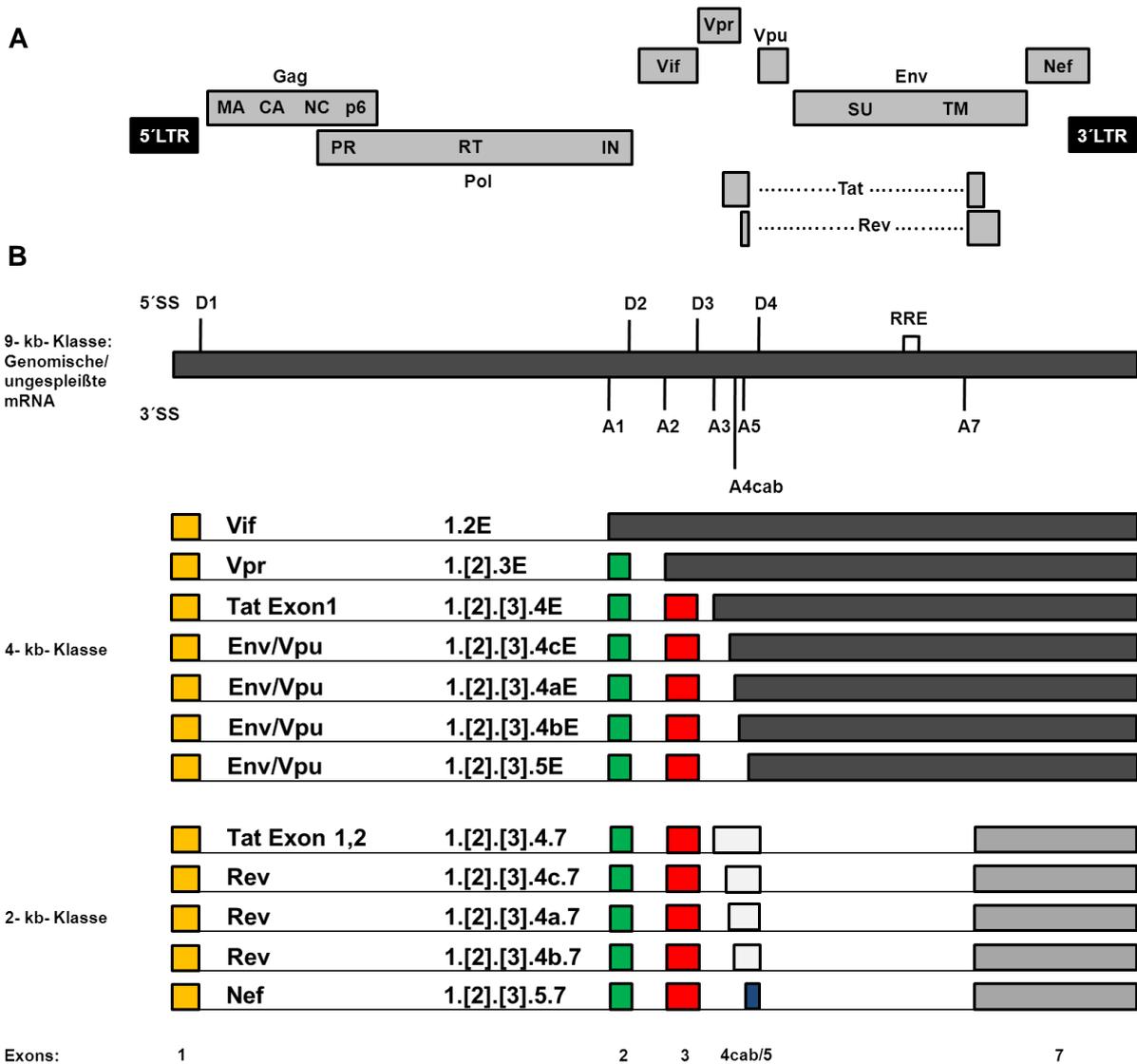
Während die Gag, Pol und Env Proteine bei allen Retroviren zu finden sind, besitzt HIV-1 neben diesen Proteinen die akzessorischen Proteine Vif (Viral Infectivity Factor), Vpr (Viral Protein R) und Nef (Negative Effector), sowie die regulatorischen Proteine Tat (Transcriptional Activator) und Rev (Regulator of viral Gene Expression) und das Vpu Protein (Viral Protein U) (siehe Abb.1.14) (zusammengefasst in Frankel und Young, 1998). An den 5'- und 3'-Bereichen des viral Genoms schließen sich die Long Terminal Repeats (LTR) an, wobei der 5'LTR Promotor Funktion besitzt und der 3' LTR das Polyadenylierungssignal enthält (siehe auch Abb. 1.14) (Stoltzfus, 2009).

Wie bei vielen Viren spielt auch bei HIV-1 das alternative Spleißen eine für die virale Replikation essentielle Rolle. Dies ermöglicht es dem Virus, trotz der Kompaktheit, sein Genom optimal und effizient zu nutzen, um alle für die virale Replikation relevanten Proteine zu synthetisieren. Durch die unterschiedliche Nutzung von vier Spleißdonoren (5'ss; D1, D2, D3, D4) und 8 Spleißakzeptoren (3'ss; A1, A2, SA3, A4cab, A5, A7) werden mehr als 40 unterschiedliche virale, alternativ gespleißte, mRNAs generiert (Purcell und Martin, 1993). Die Identitäten der jeweiligen HIV-1 mRNAs werden hierbei durch die Nähe des offenen Leserahmens zum 5'-Ende der mRNA bestimmt (Stoltzfus, 2009).

### **Abb. 1.14. Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms.**

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die grauen Rechtecke geben die offenen Leserahmen der HIV-1 Proteine wieder. Die LTRs sind in schwarz gezeigt und sind in die Regionen: U3, R und U5 unterteilt. Vollängen Transkripte beginnen am 5'-Ende der R Region im 5'LTR wohingegen die Polyadenylierung am 3'-Ende der R Region im 3'LTR beginnt (MA= Matrix; CA= Capsid; NC= Nucleocapsid; PR= Protease; RT= reverse Transkriptase; IR= Integrase; SU= Surface (gp120); TM= Transmembran (gp41)). Die Exons 1, 2 und 3 sind nicht kodierend, wobei Exon 1 in allen Transkripten, die Exon 2 und 3 jedoch alternativ gespleißt werden (Klammer).  
B: Lokalisierung der 5' und 3'ss sowie des RRE im HIV-1 Genom. Gezeigt sind die mRNAs der 9-, 2- und 4-kb Klasse. In gelb ist das Exon 1, in grün das Exon 2, in rot das Exon 3, in weiß das Exon 4 bzw. Exon 4cab, in blau das Exon 5 und in grau das Exon 7 dargestellt. Schwarze Rechtecke geben ungespleißte mRNA Bereiche wieder (verändert nach Stoltzfus, 2009).

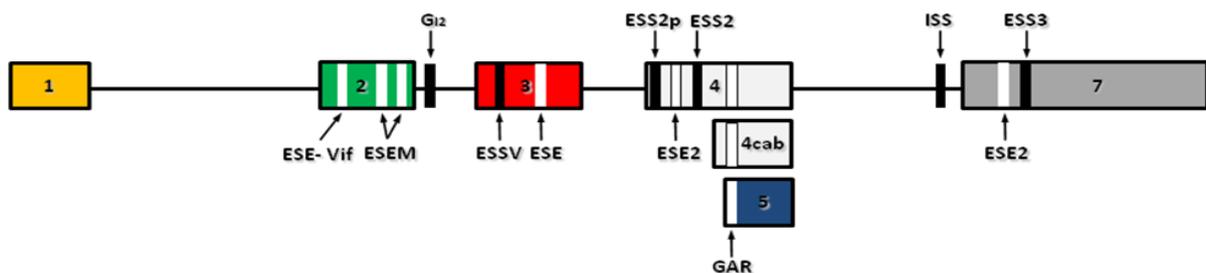
# 1. Einleitung



Es finden sich drei Klassen von HIV-1 mRNAs (siehe auch Abb. 1.14) (Purcell und Martin, 1993). Die mRNAs der 9-kb Klasse (ungespleißt) dienen zum einen als genomische virale RNA und zum anderen als mRNAs für die Gag und Gag-Pol-Polypeptide. Die Klasse der 4-kb mRNAs kodieren für die Env Glykoproteine sowie für Vpu, Vif und Vpr. Sie ist charakterisiert durch das enthalten von Intronsequenzen und wird daher oft als Klasse der "unvollständig" gespleißten mRNAs bezeichnet. Bei der 2-kb Klasse (als gespleißte RNA-Klasse bezeichnet) handelt es sich um mRNAs die für die regulatorischen Proteine Rev und Tat sowie das akzessorische Protein Nef kodieren (siehe auch Abb. 1.14) (Furtado *et al*, 1991; Purcell und Martin, 1993). Des Weiteren ist beschrieben, dass die Entstehung der verschiedenen RNA-Klassen während der viralen Replikation zeitlich reguliert ist. Die 2-kb Klasse wird hierbei in der frühen Phasen der Infektion generiert, während die RNAs der 4-kb Klasse in der intermediären und die der 9-kb Klasse vornehmlich in der späten Phase entstehen (Kim *et al*, 1989).

Wie unter 1.2 beschrieben wird auch das alternative HIV-1 Spleißen durch die intrinsische Stärke der Spleißstellen sowie durch die Anwesenheit von *cis*- und *trans*-agierenden Elementen reguliert. Die meisten der HIV-1 Spleißstellen besitzen eine geringe intrinsische Stärke und werden daher nur ineffizient genutzt. Während die Spleißdonoren D1 und D4 die intrinsisch höchste Stärke aufweisen, handelt es sich bei den 5'-Spleißstellen D2 und D3 um relativ schwache Donoren (O'Reilly *et al*, 1995). Aufgrund der suboptimalen Pyrimidin-reichen Regionen, die eingestreute Purine enthalten, sind auch die HIV-1 3'-Spleißstellen intrinsisch schwach (Dyhr-Mikkelsen und Kjems, 1995; Damier *et al*, 1997). Die 3'ss A2 und A3 weisen hierbei die höchste intrinsische Stärke unter den Akzeptoren auf (Kammler *et al*, 2006). Aufgrund dieser Tatsachen wird daher die Nutzung der HIV-1 Spleißstellen durch die Anwesenheit von spleiß-regulatorischen Elementen und Faktoren bestimmt. So sind die Spleißakzeptoren sehr von ihren 3'-stromabwärtsliegenden Sequenzen abhängig. Eine Schlussfolgerung war daher, dass die Nutzung alternativer 3'-Spleißstellen die Kombination aus intrinsisch schwachen 3'ss mit Enhancer Elementen oder die Kombination intrinsisch starker 3'ss mit Silencer Elementen erfordert (Kammler *et al*, 2006). Im Falle von HIV-1 sind eine Vielzahl der spleißregulatorischen Elemente und deren bindenden Faktoren bereits beschrieben und in Abb. 1.15 schematisch dargestellt.

Auf die jeweiligen regulatorischen Elemente und ihre Bindungsproteine wird im Verlauf der Arbeit in bestimmten Fällen näher eingegangen.



**Abb. 1.15 Positionen der bis jetzt beschriebenen spleißregulatorischen Elemente im HIV-1 Genom.**  
Die Exons sind nach der Nomenklatur in Abb.1.14 nummeriert. Spleiß-Enhancer sind als weiße, Spleiß-Silencer als schwarze Rechtecke dargestellt (verändert nach Stoltzfus, 2009).

### 1.3.3.1 Der Rev-abhängige virale mRNA Export

Eukaryonten besitzen im Gegensatz zu Prokaryonten einen Zellkern, der durch eine Doppelmembran, die aus jeweils einer Phospholipiddoppelschicht und zahlreichen unterschiedlichen Proteinen besteht, vom umliegenden Cytoplasma abgegrenzt ist.

Dies erfordert den Import von Proteinen in den Nukleus sowie den Export von Proteinen und mRNAs aus dem Kernkompartiment in das Cytoplasma.

Da intronhaltige mRNAs im Zellkern zurück gehalten werden (Izaurralde und Mattaj, 1995), haben Viren im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, ihre ungespleißten bzw. intronhaltigen mRNAs aus dem Kern zu exportieren. Zu diesem Zweck nutzt HIV-1 den zellulären Protein-Exportweg. Das HIV-1 Transkriptivator Protein Rev spielt dabei eine entscheidende Rolle. Nach dem Kernimport binden bis zu zwölf Rev Proteine an eine in der HIV-1 Env kodierenden Region lokalisierte Sekundärstruktur, das Rev Response Element (RRE) (Zapp *et al*, 1991; Malim *et al*, 1989; Dayton *et al*, 1992). Der zelluläre Protein Export Rezeptor CRM1 bindet daraufhin das Leucin-reiche Nukleare Export Signal (NES) in der C-terminalen Region von Rev und vermittelt so den nuklearen Export der intronhaltigen HIV-1 mRNAs (Daly, *et al*, 1989; Fischer, *et al*, 1995; Fornerod, *et al*, 1997). Des Weiteren spielt hierbei die kleine GTPase Ran, eine Guanosine Triphosphat (GTP)ase, eine zentrale Rolle, indem sie einen gerichteten nukleocytoplasmatischen Transport gewährleistet und die Energie für den Export bereitstellt (Izaurralde *et al*, 1997). Im Kern fördert Ran-GTP die Interaktion zwischen Ran-GTP, Rev und CRM1. Nach dem Durchqueren der Kernporen ist für die Dissoziation des Export-Komplexes im Cytoplasma die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP nötig, was durch ein GTPase aktivierendes Protein (RanGAP1) und das Ran-BP1 katalysiert wird (Bischoff *et al*, 1994). Nach dem CRM1 Rev und die intronhaltige mRNA ins Cytoplasma entlassen hat, wird Rev von dem Import Rezeptor Importin- $\beta$  an dem N-Terminal lokalisierten Kern Lokalisations Signal (NLS) gebunden und erneut zusammen mit Ran-GDP in den Zellkern importiert (Handerson und Percipalle 1997; Bischoff und Ponstingl 1991).

Neben den hier beschriebenen Faktoren sind in den Rev abhängigen mRNA Export noch andere zelluläre Proteine involviert. Ein essentieller Co-Faktor für den Rev Export ist unter anderem der eukaryotische Initiations Faktor 5A (eIF-5A). Hierbei handelt es sich um das zurzeit einzige bekannte Protein mit dem ungewöhnlichen Aminosäure-Rest Hypusine, der post-translational durch die Modifikation eines Lysin-Rests entsteht (Ruhl *et al*, 1993; Elfgang *et al*, 1999; Hofmann *et al*, 2001). Ein weiterer Co-Faktor ist das humane Rev interagierende Protein (hRIP oder auch RAP genannt), das für die Translokation des Export-Komplexes durch die Kernporen eine Rolle zu spielen scheint (Fritz *et al*, 1995; Bogerd *et al*, 1995; Sanchez-Velar *et al*,

2004). Sam68 wiederum bindet ebenfalls Rev und scheint in den intra-nuklearen Transport von Rev gebundenen mRNAs involviert zu sein (Soros *et al*, 2001; Modem *et al*, 2005).

Da Rev zu der 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs zählt und somit keine Introns enthält, wird seine mRNA im Gegensatz zu denen der 4- und 9-kb Klasse über den zellulären mRNA Exportweg aus dem Zellkern exportiert. Der hierfür zuständige zelluläre Export Rezeptor ist NXF1/TAP (Izaurrealde, 2002). In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass simplere Retroviren wie zum Beispiel das Mason-Pfizer Monkey Virus sich diesen Exportweg zu Nutze machen. Hier spielt das Constitutive Transport Element (CTE), eine Sekundärstruktur innerhalb der viralen ungespleißten mRNAs eine wesentliche Rolle. Die RNA Struktur wird dabei durch den Export Rezeptor NXF1/TAP gebunden und so der Export intronhaltiger mRNAs in das Cytoplasma vermittelt (Wodrich *et al*, 2000; Izaurrealde, 2004).

### **1.3.3.2 Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs**

Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs ist durch das Fehlen der Gag-Pol sowie der Env codierenden Region charakterisiert (Purcell und Martin, 1993). Wie erwähnt, wird diese Klasse ebenfalls als die Klasse der "komplett gespleißten" mRNAs bezeichnet und kodiert für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und das akzessorische Protein Nef.

Von Rev sind mehrere alternative Spleißvarianten beschreiben, wobei sich diese in der Anwesenheit der beiden Leader Exone2 und 3 sowie in der Nutzung der Spleißakzeptoren 4cab unterscheiden (siehe Abb. 1.14) (Purcell und Martin, 1993). Wie unter 1.3.3.1 beschrieben spielt Rev eine entscheidende Rolle beim Export der ungespleißten bzw. intronhaltigen (4- und 9-kb Klasse) mRNAs aus dem Kern ins Cytoplasma. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Rev einen inhibitorischen Effekt auf das virale Spleißen besitzt, indem auch das SR-Protein SRSF1 (SF2/ASF) involviert ist (Tange *et al*, 1996).

Wie von Rev existieren auch von Tat alternative Transkripte, die entweder die Leader Exone2 und 3 enthalten oder aber z.T. nach dem Spleißakzeptor A3 ungespleißt sind (Abb. 1.14.). Letztere werden hierbei zu der 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs gezählt (Purcell und Martin, 1993). Das Tat Protein bindet die im 5'-LTR lokalisierte Transactivator Responsive Region (TAR) und rekrutiert den Elongation Faktor p-TEFb und von Tat aktivierte Kinase zum HIV-1 Promotor, was eine Erhöhung der

transkriptionellen Elongations-Effizienz zur Folge hat (Cujec *et al*, 1997; Zhu *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2000).

Ähnlich wie bei Rev konnte auch für das Tat Protein eine Beteiligung am HIV-1 Spleißen nachgewiesen werden. Nach der Azetylierung an den Lysin-Resten 50 und 51 komplexiert Tat mit dem p32 Protein und der Cyclin-abhängigen Kinase 13 (CDK13), was CDK13 daran hindert das SR-Protein SRSF1 (SF2/ASF) zu phosphorylieren. Dies hat wiederum einen inhibitorischen Effekt auf das Spleißen zur Folge (Berro *et al*, 2008).

Auch Nef besitzt verschiedene Spleißvarianten. Unterschieden werden diese ebenfalls durch das Vorhandensein der Leader Exone2 und 3 sowie durch die Existenz des Exons5 (Abb. 1.14) (Purcell und Martin, 1993). Das Nef Protein interagiert mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, darunter auch viele Proteine der zellulären Signalgebung (Greenway *et al*, 2003; Renkema und Saksela, 2000) Dies hat zum einen zur Folge, dass die Apoptose in infizierten Zellen blockiert und der Aktivitätsstatus der Zelle geändert wird (Linnemann *et al*, 2002; Schibeci *et al*, 2000; Wolf *et al*, 2001). Des Weiteren reguliert Nef die Expression von CD4 und MHC I-Rezeptoren herunter, was die Erkennung von infizierten Zellen durch das Immunsystem erschwert (Aiken *et al*, 1994; Arhel und Kirchhoff, 2009).

### **1.3.3.3 Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs**

Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs ist durch das Fehlen der Gag-Pol kodierenden Region gekennzeichnet (Purcell und Martin, 1993). Da die mRNAs dieser Klasse Introns enthalten sind sie nur "unvollständig" gespleißt und werden daher den Rev-abhängigen mRNAs zugeordnet (Bohne *et al*, 2005). Die Gruppe umfasst die Env mRNAs sowie die mRNAs der akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu (Purcell und Martin, 1993).

Es sind zurzeit 16 alternative Env mRNAs beschrieben, die sich dahingehend unterscheiden, ob sie das Leader Exon2 oder 3 sowie die Exone4cab oder das Exon5 enthalten (siehe auch Abb. 1.14) (Purcell und Martin, 1993). Sie kodieren für das Vorläufer Glykoprotein gp160, was im Golgi durch zelluläre Proteasen in die reifen Oberflächen Glykoproteine gp120 und gp41gespalten wird (siehe auch 1.3.2) (Freed und Martin, 1995; Hunter und Swanstrom, 1990; Hallenberger *et al*, 1992).

Das einzige Spleißereignis bei Vif findet vom Donor 1 (D1) auf den Akzeptor 1 (A1, siehe auch Abb. 1.14) statt, wobei der Rest der mRNA ungespleißt bleibt (Purcell und Martin, 1993).

Das Vif Protein spielt eine essentielle Rolle in der effektiven Vermehrung von HIV-1. Vif verhindert die Einschließung der zellulären antiviralen Faktoren APOBEC3G und APOBEC3F, bei denen es sich um Cytidin Desaminasen handelt. Diese Faktoren werden in Abwesenheit von Vif in das Virus eingeschlossen und desaminieren im viralen Genom Cytosine zu Uracile. In Anwesenheit von Vif vermittelt das akzessorische Protein die Rekrutierung eines Ubiquitin E3 Ligase Komplexes, was letztlich die Polyubiquitierung und die Protease vermittelten Degradation von APOBEC3G/F zur Folge hat (zusammengefasst in *Wissing et al*, 2010).

Das einzige Spleißereignis bei Vpr findet vom D1 auf den A2 statt, wobei ein alternatives Spleißprodukt noch das HIV-1 Exon 2 enthalten kann (siehe Abb. 1.14) (Purcell und Martin, 1993).

Vpr übernimmt eine Vielzahl von Funktionen, wobei es hierbei mit einer großen Anzahl zellulärer Faktoren interagiert. So ist Vpr an dem Import des viralen Prä-Integration-Komplexes in den Zellkern beteiligt (Popov *et al*, 1998), fördert den G2/M-Phase Arrest in infizierten Zellen (Emerman, 1996), erhöht die Aktivität des HIV-1 LTRs (Kino *et al*, 2002), inhibiert selektiv das Spleißen zellulärer mRNAs (Kuramitsu *et al*, 2005) und ist in die Regulation der Apoptose involviert (Roshal *et al*, 2001).

Vpu wird von einer bi-cistronischen mRNA der 4-kb Klasse codiert, die auch parallel das Env Glykoprotein exprimiert (siehe Abb. 1.14) (Schwartz *et al*, 1990b; Purcell & Martin, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Vpu einen Einfluss auf die Entlassung der Virione aus der Zelle hat indem es antagonistische Funktionen zum zellulären Restriktionsfaktor Tetherin (BST-2/CD317) aufweist. Tetherin verhindert in Abwesenheit von Vpu die Freilassung neugebildeter Viren und wird durch Vpu an der Zelloberfläche herunter reguliert (Van Damme *et al*, 2008). Des Weiteren ist Vpu auch an der Degradation des CD4-Rezeptors beteiligt (zusammengefasst in Guatelli, 2009).

### **1.3.3.4 Die 9-kb Klasse der HIV-1 mRNAs**

Die mRNAs der 9-kb Klasse stellen zum einen das virale Genom und kodieren zum anderen die inneren Strukturproteine (Gag) sowie die Replikations Enzyme (Pol) des

## 1. Einleitung

---

Virus. Gag-Pol sind hierbei als Intron definiert und werden von dem ungespleißten Transkript als Polyproteine (Pr55 und Pr160) exprimiert (Bohne *et al*, 2005).

Gag kodiert für das Polyprotein Pr55, welches bei der Reifung zum infektiösem Virus-Partikel durch die virale Protease in die inneren Strukturproteine p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC) und p6 gespalten wird (Freed, 2001).

Pol kodiert für das Polyprotein Pr160, das der Vorläufer für die viralen Replikationenzyme ist. Durch einen Frameshift während der Translation kommt es zur Expression von Pr160, welches später ebenfalls durch die virale Protease in die Enzyme Integrase (IN), reverse Transkriptase (RT) und die Protease (PR) proteolytische gespalten wird (Jacks *et al*, 1988).

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Der PI3K Signalweg ist ein zentraler, für das Überleben der Zelle essentieller Signalweg, der von einer Vielzahl von Viren wie HIV-1 manipuliert wird. Hierdurch werden neben der Inhibierung apoptotischer Vorgänge eine Reihe anderer zellulärer Prozesse beeinflusst, was eine Voraussetzung für eine lange und effiziente Virus Replikation darstellt. Patel und Blaustein haben 2001 und 2005 den PI3K Signalweg mit der SR-Protein Phosphorylierung und einer damit verbundenen Veränderung des alternativen zellulären Spleißens in Verbindung bringen können. Bis heute ist der Einfluss dieses Signalwegs auf das alternative Spleißen zellulärer und viraler mRNAs allerdings, trotz weiterer Hinweise in der Literatur, nur unzureichend geklärt.

Da Viren wie HIV-1 vom alternativen Spleißen abhängig sind, war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob es eine Verbindung zwischen dem PI3K Signalweg und dem alternativen Spleißen bei HIV-1 gibt. Auch der Einfluss der Signalwegmodulation auf die Virus Replikation und die Expression viraler Proteine sollte, sowohl mittels Inhibierung als auch durch Aktivierung des Signalwegs, näher untersucht werden. Die Analyse einer möglichen Aktivitäts- oder Funktionalitäts-Änderung spleißregulatorischer Proteine durch den PI3K Signalweg war ebenfalls Ziel dieser Arbeit.

## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Transformation und Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm DH5 $\alpha$ F'1Q (Invitrogen Life Technologies) verwendet.

#### 2.1.2 Verwendete Viren

NL4-3 wt: Bei NL4-3 handelt es sich um das T-trope HIV-1-Laborisolat, welches durch Transfektion von HEK 293T-Zellen mit dem Plasmid pNL4-3 produziert wird.

NL4-3<sub>pNEU</sub>: Rekombinantes HIV-1 (NL4-3) mit einer Mutation im ESSV innerhalb des HIV-1 Leader Exon2. Produziert durch Transfektion von HEK 293T-Zellen mit dem Plasmid pNL4-3<sub>pNEU</sub> (Madsen und Stoltzfus, 2005)

NL4-3<sub>pNEU ESEdm</sub>: Rekombinantes HIV-1 (NL4-3) mit einer Mutation im ESSV sowie im ESE innerhalb des HIV-1 Leader Exon2. Produziert durch Transfektion von HEK 293T-Zellen mit dem Plasmid pNL4-3<sub>pNEU ESEdm</sub>

NL4-3<sub>G<sub>12</sub>-1</sub>: Rekombinantes HIV-1 (NL4-3) mit einer Mutation im G-run 1 innerhalb des HIV-1 Intron2. Produziert durch Transfektion von HEK 293T-Zellen mit dem Plasmid pNL4-3<sub>F1 mut</sub>

NL4-3 PI 952: Rekombinantes HIV-1 (NL4-3) mit dem V3-Loop-Bereich des PI-952 zwischen *Bgl*II und *Nhe*I. Das Primärisolat PI-952 als R5X4-dualtropes Isolat nutzt beide Korezeptoren mit gleicher Effizienz.

#### 2.1.3 Verwendete Zelllinien

- HeLa-Zellen: Humane epitheloide Cervixkarzinomzellen (von Patientin Henrietta Lack), kultiviert bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 2. Material

- HEK 293T-Zellen: Humane embryonale Nierenepithelzellen, kultiviert bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- Jurkat-Zellen: Eine aus dem Blut einer 14-jährigen Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie stammende Humane T-Lymphocytenzelllinie, kultiviert bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- TZM-bl Zellen: HeLa-Zelllinie, die die Oberflächenrezeptoren CD4 sowie CXCR4 und CXCR5 exprimiert. Weiter stehen Genkopien der  $\beta$ -Galaktosidase und Luciferase unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors, kultiviert bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.4 Antikörper

#### 2.1.4.1 Primärantikörper

**Tabelle 2.1:** Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Typ	Verdünnung	Quelle
anti-SR-Proteine (16H3)	monoklonal Maus	<u>Immunblot:</u> 1:167 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Zymed Laboratories, South San Francisco, USA
anti-phospho-SR-Proteine (1H4)	monoklonal Maus	<u>Immunblot:</u> 16,5 $\mu$ l in 10 ml 3% BSA in TBST, pH 7,4	Zymed Laboratories, South San Francisco, USA
anti-Akt-Kinase (sc-1618)	polyklonal Ziege	<u>Immunblot:</u> 1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti- Phospho- Akt (Ser473) (193H12)	monoklonal Kaninchen	<u>Immunblot:</u> 1:1000 in 5% BSA in TBST, pH 7,4	Cell Signaling Technology, Inc.
anti-ERK2 (c14)	polyklonal Ziege	<u>Immunblot:</u> 1:500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-hnRNPH1	polyklonal Kaninchen	<u>Immunblot:</u> 1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Prof. Dr. D. L. Black
anti-HIV-1-p24 gag	polyklonal Maus	<u>Immunblot:</u> 1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4. <u>ELISA:</u> 1:133 in 100mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,5	Aalto Bio Reagents LTd.Dublin, Ireland
anti-HIV-1-Vif Antiserum	polyklonal Kanninchen	<u>Immunblot:</u> 1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	NIH AIDS Research & Reference Reagent Programm
anti-FLAG	monoklonal Maus	<u>Immunblot:</u> 1:2500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -Digoxigenin AP, Fab Fragments Antikörper	polyklonal Schaf	<u>Nothern Blot:</u> 1:20000 in 1 x Blockierungslösung	Roche

### 2.1.4.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper waren an eine Peroxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase gekoppelt und wurden von der Firma Dianova (Hamburg) oder Aalto Bio Reagents (Ireland) bezogen.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-Peroxidase	<u>Immunblot:</u> 1:5000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	Dianova (Hamburg)
anti-Ziege-Peroxidase	<u>Immunblot:</u> 1:5000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	
anti-Kaninchen-Peroxidase	<u>Immunblot:</u> 1:5000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	
anti-Schaf-Peroxidase	<u>Immunblot:</u> 1:2500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	
anti-Schaf-alkalische Phosphatase	<u>ELISA:</u> 1:2000 in 2% Milch in TBS, 20% FCS, 0,5 % Tween 20	Aalto Bio Reagents LTd.Dubli, Ireland

## 2.2 Molekularbiologische Arbeitsmittel

Wenn nichts anderes vermerkt wurde, wurden alle Plasmide mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heiner Schaal der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1 RNA-Expressionsplasmide

Alle verwendeten LTR-Reporter Plasmide enthielten zur Vermehrung im *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$ F $\lambda$ Q einen Replikationsursprung (*ori*, *origin of replication*), ein Ampicillin-Resistenzgen (codiert für das Enzym  $\beta$ -Lactamase), SP6- und T7-RNA Polymerase Promoter und eine Multiple Cloning Site (MCS).

Weiter haben die hier verwendeten HIV-1 Sequenzen ihren Ursprung aus dem infektiösen, molekularen Klon pNL4-3, der die Virussequenzen des New York 5- und des LAV-Isolats enthält (Adachi *et al*, 1986). Das verwendete Nummerierungssystem bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 (Myers *et al*, 1995).

- LTR SD4 SA1 Ex2 SD2 SA7 (LTR ds Exon2); LTR SD4 SA1 Ex2 SD2 SA7 ΔM1 (LTR ds Exon2 ΔM1)  
Die Plasmide wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Marianne Otte zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide enthalten das Exon2, sowohl mit dem Spleißakzeptor SA1 als auch den Spleißdonor SD2. Das LTR ds Exon2 ΔM1 Plasmid enthielt eine Mutation im Enhancer Element im Exon 2 (Informationen entnommen aus der Dissertation: Identifizierung von *cis*-wirkenden Sequenzen in den alternativen HIV-1 Leader Exonen und ihre funktionelle Bedeutung für die Spleißregulation, Marianne Otte, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2006; Kammler *et al*, 2006).
  
- LTR SD1 SA1 Ex2 SD2 SA2 Ex3 SD3 SA3 SA4cab SA5 GARpA (LTR 4cab wt):  
Das Plasmid wurde mit freundlicher Unterstützung von Diplom Biologe Steffen Erkelenz zur Verfügung gestellt (unveröffentlicht). Der Reporter enthält die HIV-1 Spleißstellen: SA1, SD1, SA2, SD2, SA3, SA4cab, SA5 sowie die HIV-1 Exone: Exon1, Exon2, Exon3 und Exon4cab.
  
- GPV-RRE/GPV-4xCTE/pcRev  
Zur Analyse des HIV-1 *gag/pol* nuklearen Exports wurden Konstrukte verwendet, die den *gag/pol* Leserahmen enthalten und dessen Export entweder vom Rev Responsive Element (GPV-RRE) oder vom Constitutive Transport Element (GPV-4xCTE) abhängig sind. Die Plasmide wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Joachim Hauber (Institut für Zellbiologie und Virologie, Heinrich Pette Institut, Hamburg; Schäfer *et al*, 2006) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Virus-Expressionsplasmide

Die Expression dieser Plasmide fand ausschließlich unter den geltenden Sicherheitsbestimmungen im Labor der biologischen Sicherheitsstufe 3 (BSL-3) statt.

pNL4-3: Hierbei handelt es sich um einen infektiösen HIV-1 Klon (Adachi *et al*, 1986), der für das vollständige Genom eines T-tropen HIV-1-Isolats codiert.

## 2. Material

- pNL4-3<sub>pNEU</sub>: Dieses Plasmid basiert auf dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 und wurde mit freundlicher Unterstützung von Diplom Biologe Steffen Erkelenz zur Verfügung gestellt. Im HIV-1 Leader Exon3 wurde hier eine Mutation im ESSV eingefügt (Madsen und Stoltzfus, 2005; Erkelenz et al, 2012).
- pNL4-3<sub>pNEU ESEdm</sub>: Dieses Plasmid basiert auf dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 und wurde mit freundlicher Unterstützung von Diplom Biologe Steffen Erkelenz zur Verfügung gestellt. Im HIV-1 Leader Exon3 wurde hier eine Mutation im ESSV und im ESE eingefügt. (Erkelenz et al, 2012).
- pNL4-3<sub>F1 mut</sub>: Dieses Plasmid basiert auf dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 und wurde mit freundlicher Unterstützung vom Diplom Biologe Marek Widera zur Verfügung gestellt (Widera et al, 2010; 2012) Im HIV-1 Intron2 wurde hier der G-run 1 (G<sub>12</sub>-1) mutiert, was die Bindung von hnRNPH/F verhindert.

### 2.2.3 Plasmide zur Co-Transfektion

Die NL4-3 *rev*-cDNA und *tat*-cDNA Sequenzen wurden in den pSVT7-Vektor kloniert. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung (*ori*, *origin of replication*), ein Ampicillin-Resistenzgen (codiert für das Enzym  $\beta$ -Lactamase), den Simian-Virus-40 (SV40) early-Promotor sowie die SV40early Polyadenylierungsstelle. SVcrev und SVctat wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe Schaal mit freundlicher Unterstützung zur Verfügung gestellt.

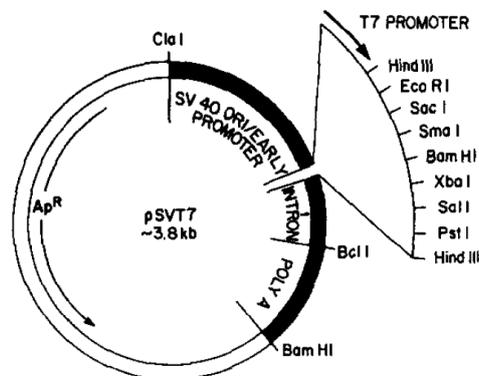


Abb.2.1: Vektorkarte des pSVT7 Vektors

- SVcrev

Wurde durch Austausch des *EcoRI-XhoI* Fragments aus pSVT7 gegen das *EcoRI-XhoI* Fragment aus pUHcrev (239,361) kloniert. Das Plasmid exprimiert die NL4-3 *rev*-cDNA Sequenz unter der Kontrolle des SV40 „early“ Promotors.

- SVctat

Enthält den *tat* ORF 3'-wärts des SV40 early Promotors. Die Bildung funktionellen Rev-Proteins wird durch eine Deletion des *BamHI/XhoI*-Fragmentes 3'-wärts des *tat* ORFs, welche das *HincII/XhoI* Fragment und den 3'-kodierenden Bereich des zweiten *rev* Exons beinhaltet, ausgeschlossen.

- pXGH5 (368)

Wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in RNA-Präparationen verwendet. Es exprimiert das menschliche Wachstumshormon (hGH) unter der Kontrolle des Maus-Metlothionein-1 Promotors (mMT1). Normalerweise wird das Gen nur in den Zellen des Hypophysen-Vorderlappens exprimiert.

- pcDNA 3.1 (+):

Der pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen) Vektor wurde für eine, auf hoher Ebene, stabile und transiente Expression in Säugetier-Zellen designt. Es besitzt einen Replikationsursprung (*ori*, *origin of replication*), eine Multiple Cloning Site, ein Ampicillin- (codiert für das Enzym  $\beta$ -Lactamase) und Neomycin- Resistenzgen (zur Selektion stabiler Zelllinien) sowie den immediate-early CMV- (Humanes Cytomegalovirus) Promotor. Des Weiteren enthält das Plasmid einen SV40 Origin zur episomalen Replikation und eine BGH-Polyadenylierungsstelle. Das pcDNA 3.1(+) Plasmid wurde zum einen als Leervektor zur Angleichung der Plasmidmenge bei Transfektionen und zum anderen auch zu Klonierungszwecken verwendet (siehe 2.2.4)

## 2. Material

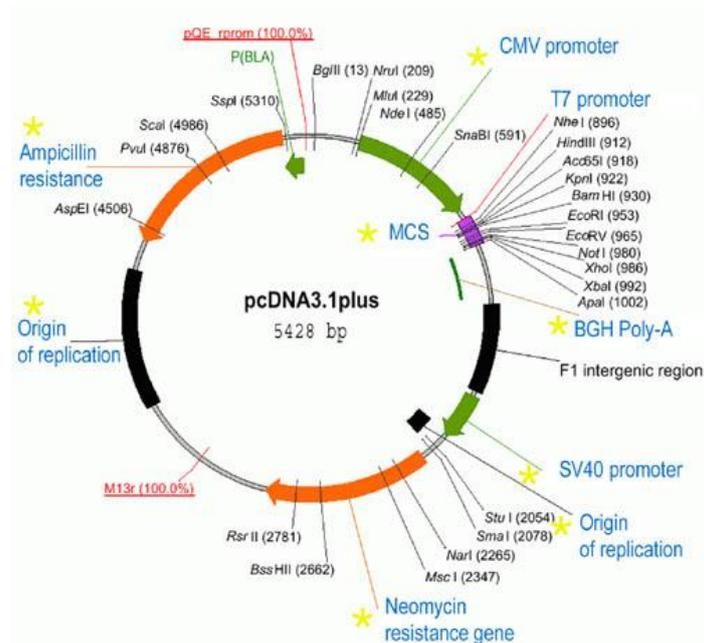


Abb.2.2: Vektorkarte des pcDNA3.1 (+) Vektors

### 2.2.4 Plasmide zur Protein Expression

#### - myr PKB:

Dieses Plasmid exprimiert für die konstitutiv aktive Akt1 (PKB $\alpha$ ) Kinase. Für die permanente Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran wurde das *lck* Myristoylierungs/Palmitoylierungs Signal (MGCWCSSNPEDD) eingefügt. Das Expressionsplasmid wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Prof. Dr. Ursula Bommhardt zur Verfügung gestellt (Na *et al*, 2003)

#### - Flag-hnRNPH1:

Wurde zur Überexpression von hnRNPH1 verwendet und enthielt ein Flag-Tag. Das Plasmid wurde mit freundlicher Unterstützung von Diplom Biologe Steffen Erkelenz zur Verfügung gestellt.

#### - pcDNA 3.1 (+) Flag Acinus S

Für die Generierung des Acinus S (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus) Expressions-Plasmids wurde die Sequenz von Acinus S mittels den Oligonukleotiden #3806/#3808 (#3806 enthielt eine BamHI, #3808 eine XhoI Schnittstelle) amplifiziert. Der pcDNA 3.1 (+) Vektor sowie das PCR-Produkt wurden dann mit den Enzymen BamH1 und XhoI einem Endonukleaseverdau unterzogen und durch anschließende Ligation zusammengefügt.

## 2. Material

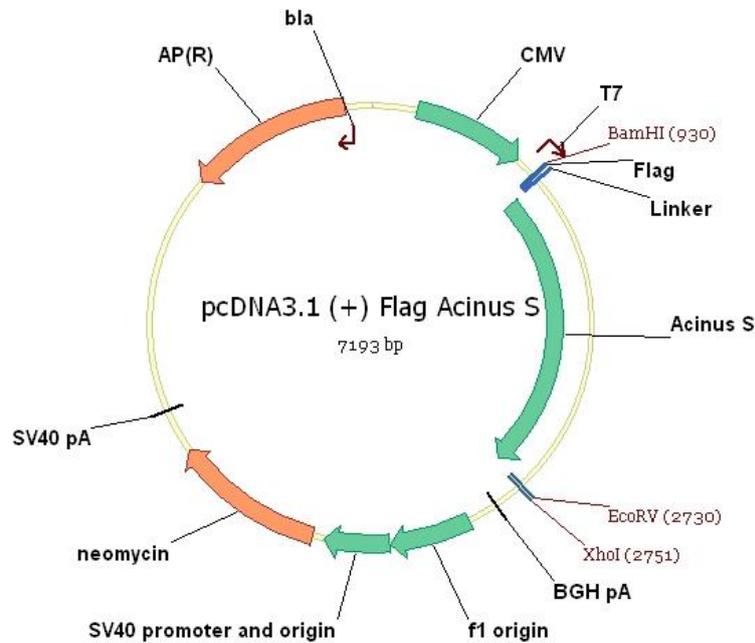


Abb.2.3: Vektorkarte des pcDNA 3.1 (+) Flag Acinus S Vektors

**#3806: 5´-(fwd) Primer für Flag Acinus S in pcDNA3.1(+)** (Tm: 64 C, 79nt):

<i>Bam</i> HI	Start	Flag	Linker
GAGCTC GGATCC ATG GACTACAAGGACGACGACGACAAG GGTGGTGGTGGT			
annealender Bereich			
GATGTTATCAGAAAGCAAAGAAGGTGAG			

**#3808: 3´-(rev) Primer für Flag Acinus S und in pcDNA3.1(+)** (Tm:71 C, 54nt):

<i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RV	Stop
CTAGA CTCGAG CGGCCGCCACTGTGCTGGATATC CTAGCGGCGCCCACCCC		
GGT		

- pcDNA 3.1 (+) Flag Acinus S Ser 422> Ala

Die Flag Acinus S Phosphomutante Ser422Ala (der Serin-Rest 422 wurde gegen ein Alanin ausgetauscht) wurde wie folgt kloniert. Das Insert wurde über die Oligonukleotide #3809/#3810 (#3809 enthielt das auszutauschende Codon für die Aminosäure Alanin) amplifiziert, wobei das Flag Acinus S Expressions-Plasmid als Template diente (siehe oben). Der pcDNA 3.1 (+) Vektor wurde dann zum einen mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I/*Avr*II (Fragment 1) und zum anderen mit *Apal*/*Avr*II (Fragment 2) verdaut. Des



## 2. Material

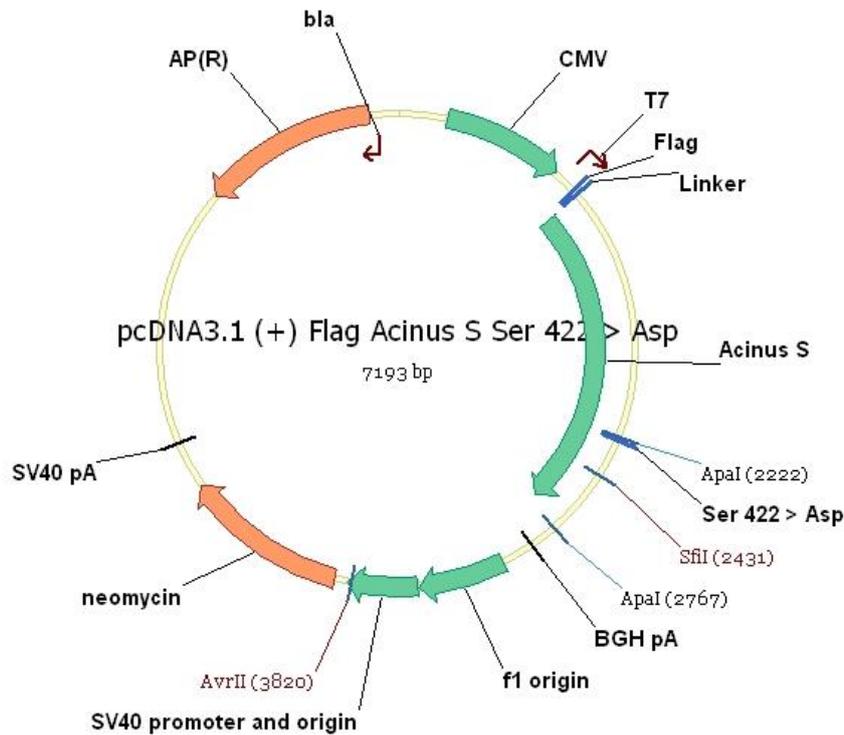


Abb.2.5: Vektorkarte des pcDNA 3.1 (+) Flag Acinus S Ser 422 > Asp Vektors

**#3922: 5´-(fwd) Primer für Flag Acinus S Ser422Asp in pcDNA3.1(+)** (Tm: 68°C, 47nt):

*ApaI* S422D annealender Bereich  
5´GAGAA GGGCCC CGTTCCCGATCGAGG GAC CGTGACCGCCGCCGCAAG

**#3810: 3´-(rev) Primer für Flag Acinus S Ser422Ala in pcDNA3.1(+)** (Tm: 68°C, 19nt):

5´CGCTCCTTGGCCCGTTCCG

### 2.2.5 Enzyme

DNAse, rekombinant, RNAse-frei

Roche, Mannheim

Superscript™ III, Reverse Transkriptase

Invitrogen, Karlsruhe

AmpliTaq®- DNA- Polymerase

Applied Biosystems, Darmstadt

Phusion™- High-Fidelity-DNA-Polymerase

Finnzymes, Frankfurt (Main)

T4-Ligase

New England Biolabs, Frankfurt (Main)

Trypsin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
LightCycler DNA-Master-SYBR- Green I	Roche, Mannheim
Antikörpergekoppelte alkalische Phosphatase	Aalto Bio Reagents, Dublin (Ireland)
Antikörpergekoppelte Peroxidase	Dianova, Hamburg
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt (Main)

### 2.2.6 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurde bei der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bestellt. Oligo(dT)-Primer (Primer p(dT)<sub>15</sub>) für die RT-PCR wurden von der Firma Roche bezogen.

#### Primer für hGH- Reporter:

#1224: 5'-TCTTCCAGCCTCCCATCAGCGTTTGG

#1225: 5'-CAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCT

#### Klonierungsprimer für Acinus S.

#3806: 5'-GAGCTCGGATCCATGGACTACAAGGACGACGACAAGGGTGGTG  
GTGGTGATGTTATCAGAAAGCAAAGAAGGTGAG

#3808: 5'-CTAGACTCGAGCGGCCGCGCCACTGTGCTGGATATCCTAGCGGCGCCC  
ACCCCGGT

#3809: 5'-AGAAGGGCCCCGTTCCCGATCGAGGGCACGTGACCGCCGCCGCAAG

# 3810: 5'-CGCTCCTTGCCCCGTTCCGG

# 3922: 5' GAGAAGGGCCCCGTTCCCGATCGAGGGACCGTGACCGCCGCCGCA  
AG

# 3811: Sequenzierprimer 5'-Ende Acinus S: 5'-TTCCTCCTTCTCCTCAGG

# 3812: Sequenzierprimer 3'-Ende Acinus S: 5'-CAGATCGTTCAGAAAGAGGC

#### Primer für hnRNP H1:

#2778: 5'-CCCCCGGATCCTTGGGCACGGAAGGTGGAGAGGG

#2779: 5'-CCCCCCTCGAGTTACTATGCAATGTTTGATTGAA AATCACTGG

5'\_24kDa\_hnRNPH1: 5'-AGCGCGCCGTTTGTTCGA

3′\_24kDa\_hnRNPH1: 5′-CTGCATGGCCATAAGCTTTTCG

Primer für HIV-1 RNA Reporter und NL 4-3

#1544: 5′-CTTGAAAGCGAAAGTAAAGC  
# 640 : 5′-TTCACTAATCGAATGGATCTGTC  
# 3392: 5′-CGTCCCAGATAAGTGCTAAGG  
# 3632: 5′-TGGATGCTTCCAGGGCTC  
# 2710: 5′-AAGGGGCAGTAGTAATACAA  
# 2588: 5′-CTTTACGATGCCATTGGGA  
# 2123: 5′-CTTTCCAGAGGAGCTTTGCT  
# 3387: 5′-TTGCTCAATGCCACAGCCAT  
# 3388: 5′-TTTGACCACTTGCCACCCAT

Primer für β-Aktin:

#3393: 5′GCACTTGAGCAGCGGTCT  
#3394: 5′CATGTTGCCAGTCAGTCTC

Primer für GAPDH:

#3602: 5′CCACTCCTCCACCTTTGAC  
#3603: 5′ACCCTGTTGCTGTAGCCA

Primer für Luciferase-Firefly:

5′-Primer: 5′-GTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATG  
3′-Primer: 5′-GTCGTTTCGCGGGCGCAACTG

### **2.2.7 Größenstandards**

Als Protein Größenstandard wurde entweder der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Siehe Abb. 2.7 A) der Firma BioRad oder der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (siehe Abb. 2.7B) der Firma Fermentas verwendet.

## 2. Material

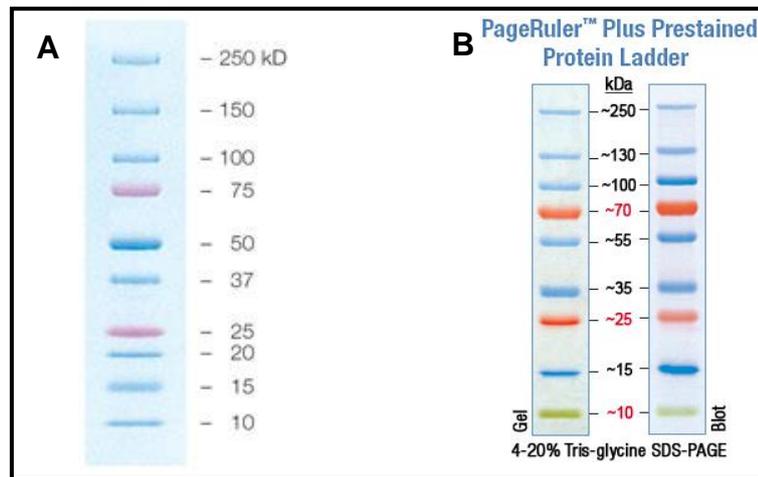


Abb.2.6: Verwendete Protein-Größenstandards

Als DNA Standard wurde die 1 kb Ladder der Firma Invitrogen oder der GeneRuler™ Ladder Mix (siehe Abb. B) der Firma Fermentas verwendet.

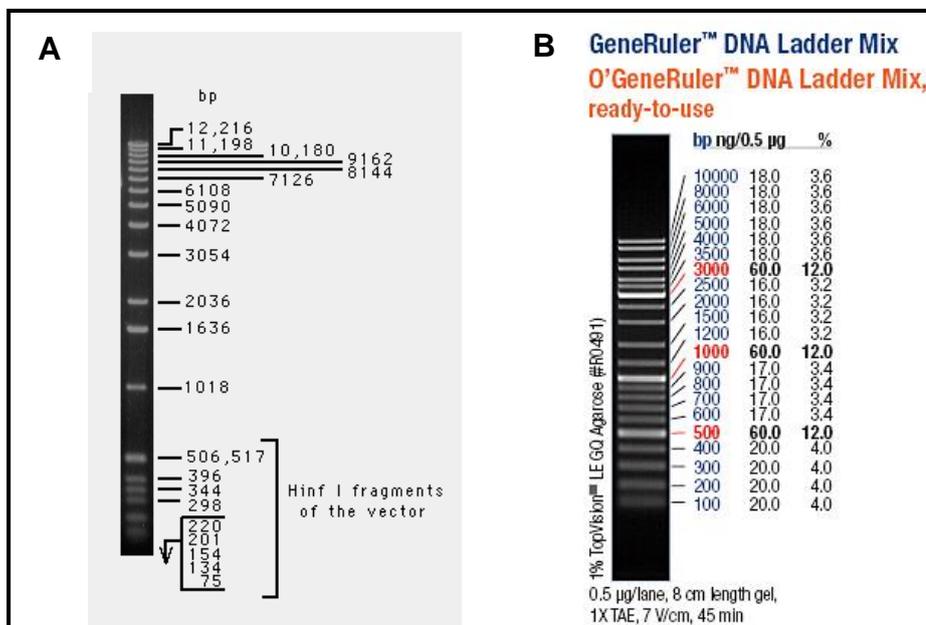


Abb.2.7: Verwendete DNA-Größenstandards

### 2.2.8 Kits und Kitsbestandteile

NucleoSpin® Plasmid Kit

Macherey-Nagel, Düren

Plasmid-Midi-Kit

Quiagen, Hilden

NucleoSpin® Extract II Kit

Macherey-Nagel, Düren

### 2.2.9 Zellkultur-Material

Das in dieser Arbeit verwendete DMEM- und RPMI-Medium sowie DPBS-CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub>, FCS, PenStrep (10.000 U/mL penicillin, 10.000 µg/mL streptomycin), 0.05% Trypsin-EDTA und Trypan Blue Stain 0.4% wurden von der Firma GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen. Flaschen, Schalen und anderes Material wurde von

der Firma TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz), Sarstedt (Nümbrecht) oder Greiner Labortechnik (Fickenhausen) bestellt.

### 2.3 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn im Text nichts anderes vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Berlin) oder Sigma (Deisenhofer) in Analysequalität bezogen.

### 2.4 Geräte

3K30, kühlbar	Sigma, Deisenhofer
Agarose- Elektrophoresekammer	Febikon, Wermelskirchen
Avanti <sup>®</sup> J-E	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank BBD 6220	Thermo, Langenselbold
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Drehtisch, regelbar	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Drehtisch, regelbar	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
DUO Therm Hybridisation Ofen OV5	Biometra, Göttingen
Eismaschine AF10	Scotsman, über Hartenstein, Würzburg
Elektrophorese System	Bio-Rad, München
Elektrophoresesystem für Minigel	BIO- RAD, München
Feinwaage AC 100	Mettler, Düsseldorf
Gel iX Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Graphit- Blotkammer	LMS, über Hartenstein, Würzburg
Graphit-Blottingkammer	Cti, über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Hera freeze (-80°C)	Thermo, Langenselbold
Hera Safe Sterilbank	Thermo, Langenselbold
Hybridisierungsofen MINI 10	Thermo Hybaid, Ulm
Kippschüttler WS5	Edmund Bühler, Tübingen
Kühlschrank	Liebherr, Bieberach
Kühlzentrifuge Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode
Kühlzentrifuge, Omnifuge 2 ORS	Heraeus Sepatch, Osterode

## 2. Material

---

Laborwaage PB3002 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Laborwaage PM 4600 Delta Range®	Mettler, Gießen
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz, Wetzlar
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim
Lumi Imager F1	Roche, Mannheim
Magnetrührer M23	GLW, Würzburg
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
Netzgerät, stabilisiert	Fischer, über Hartenstein, Würzburg
pH-Meter pH 525	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Powersupply ECPS 3000/150	Pharmacia, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL, Karlsruhe
RoboCycler Gradient 96	Startagen
Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Schüttler Certomat R und S B.	Braun Biotech International, über Hartenstein, Würzburg
Schwenktisch 3013	GLF, über Hartenstein, Würzburg
Stabilisiertes Netzgerät	Fischer, Heidelberg
Stereomikroskop Wild M8	Leica, Heidelberg
Sterilbank Steril GARD Hood Class III	Müller Labortechnik, Windhagen
Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tiefkühlschrank (-20°C)	Privileg, Quelle
Tiefkühltruhe (-70°C) C585	New Brunswick Scientific,
Tischzentrifuge	Hettich, über Hartenstein Würzburg
Tischzentrifuge 5415 R, kühlbar	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Sigma	Heraeus-Christ, Osterode
Umkehrmikroskop IM35	Zeiss, Oberkochen
UV-Transilluminator Typ IL-350.M	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortex Genie 2™	Bender und Hohbein AG, Zürich
Vortex L46	GLW, über Hartenstein, Würzburg
Wasserbad WTH 500	Köttermann, über Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
CL-1000 Ultraviolet Crosslinker	UVP, Cambridge

### **2.5 Sonstiges Material**

Zum Entwickeln der Immunblots wurden Röntgenfilme von Agfa Cronex 5 verwendet. Die Nitrocellulose Whatman® 0,45µm Poren sowie das für die Immunblots verwendete Whatman Filterpapier stammte von der Firma Schleicher und Schuell Protran® und wurden über die Firma Hartenstein, Würzburg, bezogen. Röntgenfilme und Proteingele wurden mit Hilfe des Flachbett-Scanners der Marke Hewlett Packard ScanJet 3300C aufgenommen und mit der Fotobearbeitungssoftware Adobe Photoshop cs (Adobe Systems Inc., Canada) bearbeitet.



- 70°C gelagert. Hierfür wurden 830 µl einer ÜNK mit 170 µl autoklaviertem Glycerin versetzt, gut durchmischt und bei -70°C weggefroren. Von der Glycerinkultur konnten dann bei Bedarf ÜNK angeimpft werden, indem mit einer Pipettenspitze etwas Material von der Oberfläche der Glycerinkultur gekratzt und in Selektionsmedium überführt wurde (weiteres Vorgehen siehe 3.1.1).

#### **3.1.4 Herstellung von LB- Agar-Selektionsplatten**

Es wurde 1 % (w/v) Agar-Agar (Roth, Karlsruhe) in LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurde das Ampicillin (Endkonzentration von Ampicillin betrug 100 µg/µl) zugegeben. Das Gemisch wurde dann zügig in sterile Petrischalen gegossen und bis zum vollständigen Auspolymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Erstarren wurden die Schalen um 180° gedreht und für die nächsten 6 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, so dass sich gebildetes Kondenswasser trocknen konnte. Die Platten wurden dann bei 4°C aufbewahrt und konnten unter diesen Bedingungen ca. 4 Wochen verwendet werden. Zum Wachsen der Bakterien wurden ca. 30-100 µl einer ÜNK bzw. eines Transformationsansatzes auf die Platte pipettiert und mittels autoklavierter Pipette oder abgeflammtten Drygalski-Spatel verteilt. Die Inkubation der Platten fand dann über Nacht bei 37°C statt.

#### **3.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien**

Zum Aufnehmen von Fremd-DNA aus ihrer Umgebung müssen Bakterien kompetent sein. Dies wird durch eine Modifikation ihrer Zellmembran, die eine Lipiddoppelschicht darstellt, erreicht (Chung *et al*, 1989).

##### Lösungen:

LB-Medium	(siehe 3.1.1.)
TSS (Transformation and Storage Solution):	LB-Medium
	+ 10 % (w/v) PEG 3350
	+ 5 % (v/v) DMSO
	+ 50 mM Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> oder MgCl <sub>2</sub> )
	➔ pH 6.5
	➔ steril filtrieren und aliquotiert lagern bei -20°C

### Durchführung:

DH5 $\alpha$ F'Q Bakterien (ca. 50-100  $\mu$ l) wurden zu 15 ml LB-Medium gegeben und als ÜNK bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml der ÜNK mit 200 ml LB-Medium versetzt und die Bakterien erneut unter schütteln (200 rpm) bei 37°C bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann bei 1000g und 4°C für 10 min. abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml TSS-Puffer resuspendiert. Die TSS/Bakterien Lösung wurde dann in 100  $\mu$ l Portionen in vorgekühlten Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und umgehend im flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei einer Lagerung von -70°C blieben die Bakterien für mehrere Wochen kompetent.

### **3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Zu chemisch kompetenten DH5 $\alpha$ F'Q Bakterien (auf Eis aufgetaut) wurden 1-3  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben und für 30-45 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch einem 1 minütigem Hitzeschock bei 42°C unterzogen, gefolgt von einer erneuten 2 minütigen Inkubation auf Eis. Es wurden nun 900  $\mu$ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben, die Lösung resuspendiert und dann bei 200 rpm und 37°C für eine Stunde geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden dann als ÜNK angeimpft oder auf Agar-Platten ausgestrichen (siehe 3.1.1. und 3.1.4).

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen (Chomczynski und Sacchi, 1987)**

Die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben ermöglicht es, die Zell-Lyse mit der RNA-Extraktion in einem Arbeitsschritt zu vereinen.

Durch Zugabe von Phenol und Chloroform zu den mit Solution D lysierten Zellen entstehen so nach Zentrifugation im Überstand 3 Phasen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthält, Proteine und DNA dagegen in der unteren organischen Phase enthalten sind. Durch Abnahme der wässrigen Phase und anschließender RNA-Fällung kann so die Gesamt-RNA der Zelle isoliert werden.

### 3. Methoden

---

#### Lösungen:

PBS (RNase-frei):            140 mM NaCl  
                                      6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                      2,6 mM KCl  
                                      1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      → pH 7,4

Solution D                    4 M Guanadinium Thiocyanat  
                                      25 mM Na-Citrat (pH 7,0)  
                                      0,5 % Sarcosyl  
                                      0,1 M β-Mercaptoethanol  
                                      → steril filtrieren durch 0,2 µm Filter

2 M Na-Acetat (pH 4,0), RNase-frei

Phenol zur RNA Extraktion

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

70% Ethanol (RNase-frei)

RNase-freies Isopropanol

RNase-freies ddH<sub>2</sub>O (DEPC- H<sub>2</sub>O: ddH<sub>2</sub>O wurde mit 0,1 % DEPC versetzt, unter Rühren über Nacht bei 37°C inkubieren und anschließend autoklaviert)

#### Durchführung:

Pro Well (6-Well Platten) wurden 250 000 Kulturzellen ausgesät und am nächsten Tag mit Reporter Konstrukten oder dem proviralem Plasmid pNL4-3 transfiziert (siehe auch 3.3.8). Die Zellen wurden am dritten Tag dann entweder mit der Pipette ins Medium abgespült (HEK 293T) oder mit einem Zellschaber (HeLa, TZM-bl) von der Platte gelöst. Es folgte die Überführung der Zellen in Eppendorf-Gefäße (auf Eis) und die Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 14 sec. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Es wurde nun 500 µl der Solution D in die Gefäße gegeben, resuspendiert und die Zellen auf Eis lysiert. In der Zwischenzeit wurden pro Probe 500 µl Phenol (zur RNA Isolierung), 50 µl 2 M Na-Acetat (pH 4,0) und 7,2µl β-Mercaptoethanol gemischt und anschließend zu den in Solution D lysierten Zellen pipettiert (557 µl/ Probe) und resuspendiert. Es folgte das Versetzen der Lösung mit 100 µl Chloroform/Isoamylakohol und das ca. 15 sekundige Vortexen der Proben (bis

eine Weißfärbung zu erkennen war). Die Proben wurden dann für 15 min. auf Eis inkubiert und danach bei 10000 rpm und 4°C und für 20 min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bildeten sich drei Phasen (obere wässrige Phase, intermediäre Phase und untere organische Phase), wobei 400 µl der oberen wässrigen Phase (enthielt die RNA) abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol vermischt wurde. Die Proben wurden dann 3-4 Stunden (alternativ auch über Nacht) bei -20°C gelagert (Fällung der RNA).

Nach der Fällung wurden die RNAs mittels Zentrifugation bei 12400 rpm und 4°C für 20 min. sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit 150 µl gekühltem 70% Ethanol gewaschen, wobei nach den jeweiligen Waschschritten die Proben bei 13000 rpm und 4°C für 10 min. zentrifugiert wurden. Es folgte das Abziehen des Ethanols, das Trocknen des Pellets auf Eis für ca. 15 min und die Aufnahme des Pellets in 10 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O. Das Quellen des Pellets betrug hierbei ca. 20-30 min. Die RNA konnte nun für die Konzentrationsbestimmung und anschließender RT-PCR/Nothorn Blot Methode (siehe 3.2.3 und 3.2.16) herangezogen werden. Nicht verwendete RNA konnte bei -70°C gelagert werden.

#### **3.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Absorptionsmessung photometrisch gemessen. Hierbei wurde die RNA bzw. DNA (1:69 verdünnt) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer Menge von etwa 40 µg/ml RNA bzw. von ca. 50 µg/ml im Falle von DNA. Das Verhältnis OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> gibt über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren Auskunft, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Die Ratio sollte hierbei bei Werten zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Des Weiteren gibt die Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm über Verunreinigung durch aromatische Verbindungen, wie Phenol, Peptide oder Kohlenhydrate, Auskunft. Der Quotient OD<sub>230</sub> über OD<sub>280</sub> sollte bei reinen Proben einen Wert von annähernd 2.2 betragen. Die Messwerte der hier verwendeten RNAs lagen immer im Bereich der erforderlichen Ratio.

### 3.2.3 Reverse Transkription

Mittels des Enzyms reverse Transkriptase ermöglicht die reverse Transkription das Umschreiben von RNA in cDNA (complementary). Im Zusammenhang dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um alternative Spleißprodukte, die von HIV-1 basierten Reporter-Konstrukten bzw. dem HIV-1 proviralem Plasmid NL4-3 stammten, nachzuweisen. Im Anschluss der reversen Transkription wurden daher spezifische PCRs oder real-time PCRs durchgeführt, wobei die cDNA hierbei als Template diente.

#### 3.2.3.1 DNase Verdau

Um Reste der transfizierten Plasmid-DNA zu entfernen, wurden 3-5 µg der RNA nach der Konzentrationsmessung einem DNase (Roche) Verdau unterzogen. Das Reaktionsvolumen wurde mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O so eingestellt, dass das Endvolumen 9 µl betrug. Es folgte die Zugabe von 10 Units der DNase (entsprach 1 µl), die Resuspension und die Inkubation bei 37°C für 20 min. mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für ebenfalls 20 min.

#### 3.2.3.2 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription (Umschreibung der mRNA in cDNA)

Für jede Probe wurde nun ein Reaktionsansatz von 13 µl angesetzt, bestehend aus: 1 µl 7,5 µM oligo dT<sub>(15)</sub> Primer (Roche), 1 µl 10 mM each dNTP-Mix (Quiagen), 6 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O und jeweils 5 µl der DNase verdauten RNA-Proben. Der Ansatz wurde resuspendiert und für 5 min bei 65°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein weiterer Reaktionsansatz bestehend aus: 4 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNAsin (RNase- Inhibitor, Promega) und 1 µl Superscript III (Reverse Transkriptase, Invitrogen) in PCR Gefäßen (200 µl, Starlab) angesetzt. Die 13 µl der bei 65°C inkubierten Proben wurden dann zu dem zweiten Ansatz pipettiert, kurz resuspendiert und in den PCR-Cycler gegeben (Programm: 91 min. 50°C, 15 min 72°C).

#### 3.2.4 Realtime- PCR

Die quantitative Realtime-Methode (qPCR) ermöglicht es, im Gegensatz zur klassischen RT-PCR, quantitativ Transkripte nachzuweisen. Hierbei wird die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt, indem die quantitative Information in der PCR-

### 3. Methoden

---

Reaktion von den wenigen Zyklen geliefert wird, in denen die DNA-Menge logarithmisch vom Background bis in die Plateauphase hinein ansteigt. Mittels des Fluoreszenz-Farbstoffs SYBR-Green, welcher unspezifisch in der kleine Furche der DNA interkaliert, kann die DNA am Ende jedes Elongationszykluses detektiert werden, wobei die Fluoreszenz proportional zur amplifizierten DNA-Menge ist.

In dieser Arbeit wurde der LightCycler 1.5 der Firma Roche verwendet sowie das LightCycler DNA-Master-SYBR-GreenI Kit, das ebenfalls von der Firma Roche bezogen wurde. Die Daten wurden mit der LightCycler Software Version 3.5 ausgewertet.

#### *Reaktionsansatz (20 µl):*

2 µl	cDNA-Template (1:10 verdünnt)
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub>
Je 1 µl	Primer (10 µM, HPLC aufgereinigt)
2 µl	LightCycler DNA- SYBR Green
12,8 µl	H <sub>2</sub> O PCR- Grade

#### *PCR-Bedingungen:*

<u>Initiale Denaturierung</u>	95°C	30 sec	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	0 sec	
Annealing	53°C	4 sec	
<u>Elongation</u>	72°C	10 sec	
	95°C	0 sec	
Schmelzkurve	63°C	30 sec	
	+ 0,1°C/sek bis 95°C	0 sec	

Der jeweiligen Ansätze wurde in die LightCycler Kanülen pipettiert, kurz abzentrifugiert (5 sec, 3000rpm) und mit der Apparatur in den LightCycler 1.5 gestellt.

#### **3.2.5 Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten mittels PCR (Polymerase Chain Reaktion)**

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die selektive Amplifikation von bestimmten, in geringer Menge vorhandenen, DNA-Fragmenten. Dies ermöglicht den

### 3. Methoden

---

Nachweis und die Untersuchung dieser Fragmente. Etabliert wurde diese Methode hierbei von Kary Mullis (1983). Mittels Oligonukleotid-Primern, die gegen spezifische Bereiche der zu amplifizierenden DNA gerichtet sind und thermostabilen DNA-Polymerasen aus thermophilen Archaeobakterien wird die DNA durch mehrere aufeinanderfolgende Zyklen, bestehend aus DNA-Doppelstrang Denaturierung ("Aufschmelzen" der komplementären DNA-Stränge), Annealing (Anlagerung) der Primer und der Elongation des komplementären Tochterstrangs durch die DNA-Polymerase, vermehrt. Die PCR-Zyklen sollten hierbei nicht mehr als 25- 36 Zyklen betragen, um die Amplifizierung unspezifischer DNA-Fragmente zu vermeiden.

#### Durchführung:

Die PCR-Methode wurde in dieser Arbeit hauptsächlich zur Amplifikation spezifischer alternativer HIV-1 Spleißprodukte verwendet. Hierfür wurde die AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Polymerase der Firma Applied Biosystems verwendet. Sie arbeitet mit einer Syntheseleistung von 2000-4000 Basen/Minute bei einer Temperatur zwischen 70°C-80°C. Des Weiteren besitzt die AmpliTaq<sup>®</sup>-Polymerase keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur).

Für die Reamplifizierung von PCR-Produkten zur Bandensequenzierung sowie für Klonierungsarbeiten wurde die Phusion<sup>™</sup>-High-Fidelity-DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Diese besitzt, im Vergleich zu der AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur), und weist dadurch eine viel höhere Genauigkeit bei der Synthese-Reaktion auf. Die Syntheseleistung liegt hierbei ebenfalls bei 2000-4000 Basen/min.

#### Pipettierschema für die AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (50 µl Ansatz):

4 µl	cDNA	(aus RT-PCR)
5 µl	10 x GeneAmp PCR-Buffer I	(Applied Biosystems, enthält 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
1 µl	dNTP Mix	(10 mM each, Quiagen)
1 µl	5'-Primer	(10 µM, biomers.net)
1 µl	3'-Primer	(10 µM, biomers.net)

0,25 µl AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (5 Units/µl, Applied Biosystems)

add. 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

### 3. Methoden

---

#### Pipettierschema für die Phusion™-High-Fidelity-DNA-Polymerase (50 µl Ansatz):

4 µl	cDNA	(aus RT-PCR)
10 µl	5 x Phusion™ HF PCR Buffer	(Finnzymes, enthält 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
1 µl	dNTP Mix	(10 mM each, Quiagen)
1 µl	5´-Primer	(10 µM, biomers.net)
1 µl	3´-Primer	(10 µM, biomers.net)
1,5 µl	DMSO	(100%, Finnzymes)
0,5 µl	Phusion™- DNA- Polymerase	(5 Units/µl, Applied Biosystems)
add. 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen		

Die Ansätze wurden in 200 µl PCR-Gefäßen vorbereitet und nach Zugabe der Polymerasen in den PCR-Zykler (Robocycler 96, Startagen) gegeben, wobei folgende Programme verwendet wurden:

#### Für die AmpliTaq®- DNA- Polymerase:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	3 min.; 94°C
20- 35 Zyklen	{ Denaturierung Annealing Elongation	30 sec.; 94°C
		1 min.; Temperatur je nach Primer
		1 min.; 72°C
1 Zyklus	finale Elongation	10 min.; 72°C
	Kühlung	∞; 4-8°C

#### Für die Phusion™-DNA-Polymerase:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	2 min.; 98°C
20- 35 Zyklen	{ Denaturierung Annealing Elongation	20 sec.; 98°C
		30 sec.; Temperatur je nach Primer
		1 min.; 72°C
1 Zyklus	finale Elongation	10 min.; 72°C
	Kühlung	∞; 4-8°C

Die Auswertung der PCR-Reaktionen wurde in der Regel mittels 10 % Polyacrylamidgelen (siehe 3.2.10.2) durchgeführt.

### 3.2.6 Primer und Primerdesign

Für die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ist es essentiell, diese durch spezifische Oligonukleotid-Primer zu definieren. Hierbei sollten die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren, keine Haarnadelstrukturen ausbilden und weiter sollte ihre komplementäre Sequenz in der verwendeten DNA nur einmal vorkommen. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, dass sich die Schmelztemperaturen der 3'- und 5'-Primer nicht groß unterscheiden sollten und dass der G/C-Gehalt bei ungefähr 40-60 % liegt. Die Länge des annealenden, komplementären Bereichs der Primer sollte aufgrund der Spezifität mindestens 15 Basen umfassen. Zur Berechnung der Schmelztemperatur kann folgende empirische Formel herangezogen werden:

$$T_m = 4 \sum (G,C) + 2 \sum (A,T) - 5$$

Die Primer zum Nachweis bestimmter HIV-1 Spleißprodukte wurden so designt, dass einzelne mRNAs bzw. spezifische Spleißgruppen amplifiziert werden konnten. Klonierungsprimer wurden dagegen so geschrieben, dass sie am 5'-Bereich für die Insertion des PCR-Produkts geeignete Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthielten, sowie 3-5 Basen um das Binden und Schneiden der Enzyme zu gewährleisten. Während der PCR-Reaktion wurden diese Überhänge mit den enthaltenden Schnittstellen dann Bestandteil des PCR-Produkts. Zur Expression eines sogenannten Flag-Tags wurde des Weiteren die Sequenz für den Tag zwischen die Schnittstelle und dem annealenden Bereich designt. Hierbei wurde zwischen dem Tag und dem komplementären Bereich eine Linker-Region bestehend aus 4 x Glycin Aminosäuren (eine neutrale Aminosäure, DNA-Sequenz: GGT) geschrieben.



Abb. 3.1: Schematischer Aufbau der designten Klonierungsprimer.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem Programm Vektor NTI (Invitrogen) sowie über [www.operon.com](http://www.operon.com) designt und von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) in Kartuschen-gereinigter Qualität bezogen.

#### **3.2.6.1 Primerdesign für Phosphomutanten**

Für die Generierung von Phosphomutanten wurde zum einen ein Serin-Rest durch ein Alanin (nicht phosphorylierbar) und zum anderen ein Serin-Rest durch die Aminosäure Asparaginsäure (molekulares Mimikry, imitiert die dauerhafte Phosphorylierung) ausgetauscht. Hierfür wurde wie oben beschrieben das Codon für die zu ersetzende Aminosäure in den Primer integriert, sowie die Schnittstelle, mit der das nach PCR amplifizierte Fragment dann in den Vektor kloniert werden sollte. Das ausgetauschte Codon befand sich hierbei 5´ vom anealenden Bereich und 3´ von der Schnittstelle (dazwischen konnten ebenfalls komplementäre Basen liegen). Der 3´ Primer wurde so designt, dass er ebenfalls einen annealenden Bereich sowie eine für die Insertion essentielle Schnittstelle enthielt.

#### **3.2.7 Plasmid-DNA Isolierung**

Um Plasmid-DANN, die mittels Transformation (siehe 3.1.6) in Bakterien eingebracht wurde, zu isolieren, wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen. Es folgte hierauf die Aufreinigung der DNA durch Isopropanol-Fällung oder über eine Silikagel-Matrix.

##### **3.2.7.1 Mini-Plasmidpräparation**

Zur analytischen Untersuchung von Plasmid-DNA nach einer Ligation und Transformation, wurde eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt. Die Ausbeuten die aus dieser Methode resultierten, reichten aus, um die Plasmide mittels Restriktionsverdau (siehe 3.2.8) zu untersuchen.

##### Lösungen:

Puffer 1:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A
Puffer 2:	0,2 M NaOH 1% SDS

Puffer 3: 3 M KAc; pH 5,5

100 % Isopropanol

70 % Ethanol

#### Durchführung:

Es wurden 2 ml einer ÜNK in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurde dann in 300 µl Puffer 1 resuspendiert (Resuspensionspuffer), durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 (Lysis Puffer) lysiert und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl Puffer 3 (Neutralisierungspuffer, gekühlt) und die Zentrifugation bei 11000 rpm für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und mit 700 µl 100 % Isopropanol versetzt und erneut bei 14000 rpm und Raumtemperatur für 30 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit das Pellet mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen, für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet nach dem Verwerfen des Überstands für 5 min. getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde dann in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und zur Kontrolle einem Restriktionsverdau unterzogen.

Teilweise wurde auch das NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Hierbei wurde die Aufreinigung der Plasmid-DNA durch eine Silica-Membran vorgenommen, was zu einer höheren Reinheit und Ausbeute der DNA führte. Es wurden hierfür 15 ml der ÜNK eingesetzt. Die Durchführung entsprach hierbei dem Herstellerprotokoll (<http://www.mn-net.com>; DNA and RNA Purification).

#### **3.2.7.2 DNA-Midipräparation**

Um höhere Ausbeuten der Plasmid DNA zu erzielen (z.B. für Überexpressionen oder Transfektionen) wurde das Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Ähnlich wie bei den NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel wurde die DNA hier über Silica-Membranen aufgereinigt. Hierfür wurden 100 ml ÜNK eingesetzt, die zu einer Ausbeute von 1-1,5 µg/µl führten. Die Durchführung entsprach hierbei ebenfalls dem Herstellerprotokoll (<http://www.qiagen.com/products/plasmid/>).

#### **3.2.8 Restriktionsverdau**

Zum spezifischen Verdau von DNA-Fragmenten (Linearisierung von Vektoren, Klonierung von PCR-Fragmenten) wurden Restriktionsenzyme der Firma New

England Biolabs verwendet. Hierbei entsprach die Durchführung dem Herstellerprotokoll (<http://shop.neb-online.de>; NEB- Produkte, Restriktionsenzyme).

*Standardansatz für einen Restriktionsverdau (20 µl):*

2-4 µg Plasmid- DNA; PCR- Fragmente  
2 µl 10 x BSA  
2 µl jeweiliger Puffer  
1 µl jeweiliges Restriktionsenzym

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen

*Standardansatz für einen Doppel-Restriktionsverdau (20 µl):*

1- 4 µg Plasmid-DNA; PCR-Fragmente  
2 µl 10 x BSA  
2 µl jeweiliger Puffer I  
2 µl jeweiliger Puffer II  
0,5 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen

Die Proben wurden anschließend für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend zur Kontrolle auf einem 1 % Agarosegel (siehe 3.2.10.1) aufgetrennt.

#### **3.2.9 Beladungspuffer für die DNA Gelelektrophorese**

Der in dieser Arbeit verwendete Beladungspuffer für die DNA Gelelektrophorese bestand aus 0,25 % Bromphenolblau und 30 % Glycerol und wurde als 6-fach Puffer angesetzt. War die Farbe des Puffers nach dem Ansetzen grün (Puffer war dann zu sauer), wurde 10 mM Tri-HCl dazugegeben, bis die Farbe nach blau umschlug. Die Lösung wurde dann kurz abzentrifugiert und anschließend in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben dann mit der entsprechenden Menge an Beladungspuffer versetzt (so dass der Puffer auf 1-fach verdünnt war).

#### **3.2.10 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese**

Aufgrund der negativen Ladung von Nukleinsäuren (Ribosephosphat-Rückgrat) lassen sich DNA und RNA im elektrischen Feld auftrennen. Bei der Wanderung zur

positiv geladenen Anode werden die Fragmente dabei nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Trägermaterial kann hierfür zum einen Agarose (D-Galaktose mit glykosidisch verbundener 3,6-Anhydrogalactose) oder aber auch Polyacrylamid verwendet werden. Die Nutzung von Polyacrylamidgelen hat hierbei den Vorteil, dass es im Vergleich zu Agarosegelen eine deutlich höhere Auflösung aufweist.

#### Lösungen:

5-fach TBE-Puffer (1 L)	445 mM Tris-HCl
	445 mM Borsäure
	10 mM 20 mL 0,5 M EDTA pH8.0
6-fach Beladungspuffer (siehe 3.2.9)	
Laufpuffer (1-fach TBE)	
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL in H <sub>2</sub> O bidest
10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat- Lösung (APS) in dest. H <sub>2</sub> O	
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	

#### **3.2.10.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose Gelelektrophorese**

1 % Agarose (0,5 g) wurden durch Aufkochen in 50 ml 1 x TBE-Puffer gelöst, abgekühlt, 2 µl Ethidiumbromid-Lösung dazugegeben und in einen DNA-Schlitten der Elektrophorese-Apparatur (vorher mit Spacern vorbereitet) gegossen. Es wurde der Kamm zur Beladung des Gels eingesetzt und eventuelle Luftblasen entfernt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Schlitten in die Gel-Apparatur eingesetzt, diese mit 1 x TBE-Puffer befüllt und Spacer und Kamm entfernt. Die Taschen wurden anschließend kurz mit dem Laufpuffer ausgespült und mit den Proben beladen. In die Tasche links außen wurde des Weiteren 6 µl eines DNA-Standards (siehe Abb. 3.2) gegeben. Die Gelelektrophorese lief dann bei 90 V für ca. 30 min. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel nach der Elektrophorese auf einen Tisch mit integrierter UV-Lampe gelegt, wobei das Ethidiumbromid im Gel mit der DNA interkalierte und im ultravioletten Bereich rötlich leuchtete.

### 3.2.10.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch ein 10 % Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Glasplatten sowie Spacer zuvor gründlich gereinigt und anschließend mit 70 % Ethanol gesäubert. Nach dem Zusammenbau der Apparatur wurde die Gellösung wie folgt angesetzt: 10 ml 30% Polyacrylamid (Roth), 6 ml 5 x TBE, 14 ml ddH<sub>2</sub>O, 21 µl TEMED und 420 µl APS. Die Lösung wurde resuspendiert, in die Glasapparatur gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach ca. 5 min, war das Gel auspolymerisiert und konnte in die Gelkammer eingespannt werden. Die Kammer wurde mit 1 x TBE befüllt und der Kamm entfernt, wobei die Taschen ebenfalls mit Laufpuffer ausgespült wurden. Es folgte die Beladung der Proben und des DNA-Standards. Das Gel lief bei 30 mA und voller Voltzahl für ca. 45 min. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in eine Folie eingeschlagen und mit einer Ethidiumbromidlösung bestehend aus 20 ml 1 x TBE und 3 µl Ethidiumbromid für 7 min. inkubiert und anschließend (nach dem Verwerfen der Färbelösung) wie unter 3.2.10.1 beschrieben visualisiert.

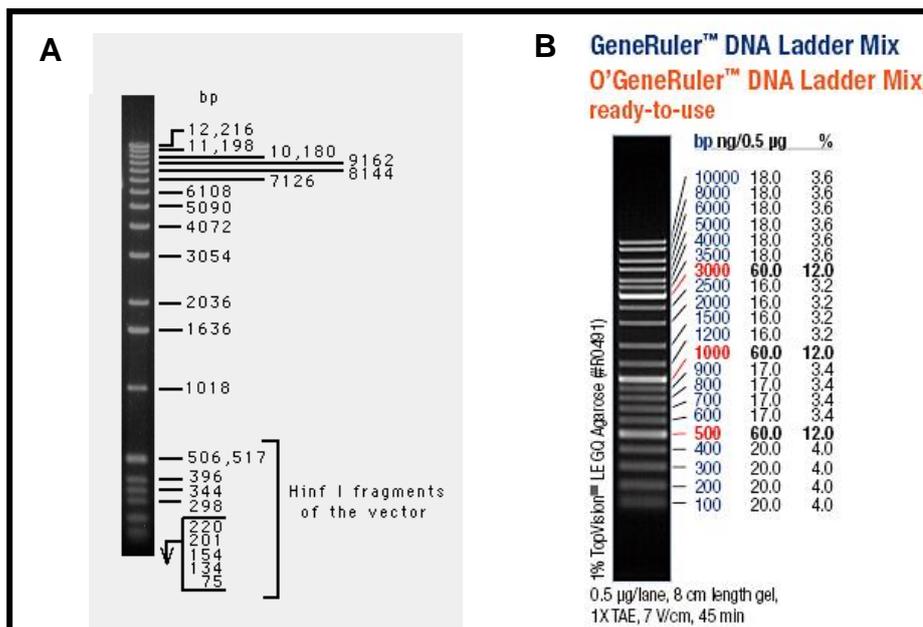


Abb. 3.2: Verwendete DNA-Standards: 1 kb Ladder der Firma Invitrogen (A) und GeneRuler™ Ladder Mix der Firma Fermentas (B).

### 3.2.11 Isolierung von aufgetrennten Nukleinsäure

Nukleinsäuren können nach der gelelektrophoretischen Auftrennung sowohl aus Agarose- als auch aus Polyacrylamidgelen isoliert werden. Dies ist zum einen für die Gewinnung des Inserts nach Restriktionsverdau nötig, als auch für die DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten.

#### 3.2.11.1 Aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung des NucleoSpin® Extract II Kits der Firma Macherey Nagel ausgeführt. Die Durchführung entsprach hierbei dem Herstellerprotokoll (<http://www.mn-net.com>, DNA and RNA Purification, DNA clean up).

#### 3.2.11.2 Aus Polyacrylamidgelen

##### Lösungen:

Elutionspuffer	0,5 M	Ammonium-Acetat
	10 mM	Magnesium-Acetat
	1 mM	EDTA, pH 8
	0,1 %	SDS
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA, pH 8

3 M Na-Acetat, pH 5

100 % Ethanol (p.A.)

70 % Ethanol (p.A.)

##### Durchführung:

Das DNA-Fragment wurde mit einem sauberen Skapell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 12-16 Stunden in 2 V Elutions-Puffer bei 37°C inkubiert. Es folgte die ein minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C, die Überführung des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß und die erneute Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 1 min. Auf ein neues Eppendorf-Gefäß wurde dann ein GF/C- Whatmann Filter gelegt und der Überstand hierauf pipettiert und filtriert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 V 100 % Ethanol für 30 min. auf Eis gefällt. Die Proben wurden dann für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl TE-Puffer und 25 µl 3 M Na-Acetat resuspendiert. Es folgte die erneute Zugabe von 2 V 100 % Ethanol und die Präzipitation der DNA für 30 min auf Eis. Die Proben wurden dann wieder bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die DNA in 15 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Hierauf folgte die Re-Amplifikation der DNA-Fragmente mittels PCR (Phusion Polymerase, siehe 3.2.5).

#### **3.2.12 Chloroform/Phenol Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Nach der Re-Amplifikation der DNA-Fragmente, konnten diese entweder über eine Agarosegel-Isolierung (siehe 3.2.11.1) oder durch Chloroform/Phenol aufgereinigt werden.

##### Lösungen:

4 M LiCl

Phenol für die DNA-Isolierung

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

100 % Ethanol (p.A., gekühlt auf -20°C)

70 % Ethanol (p.A.)

##### Durchführung:

Der komplette PCR-Ansatz (50 µl) wurde zuerst mit 150 µl ddH<sub>2</sub>O und anschließend mit 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und bei 12000 rpm und 4°C für 15 min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und erneut zentrifugiert (wie oben). Es folgte die Abnahme der oberen Phase, die Überführung dieser in ein neues Reaktionsgefäß und das Versetzen des Überstands mit 20 µl 4 M LiCl und 500 µl 100 % Ethanol (gekühlt auf -20°C). Nach der guten Durchmischung der Proben wurde die DNA für 60 min. auf Trockeneis (alternativ auch bei -20°C) gefällt, anschließend für 30 min. bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann nach kurzem Trocknen in 15 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und konnte entweder für Sequenzierungen (über die Firma GATC) oder für Klonierungen verwendet werden.

#### **3.2.13 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Für die Klonierung von Genen oder Genbereichen in einen Expressionsvektor müssen wie unter 3.2.6 beschrieben, geeignete Primer designt, das zu klonierende Fragment mittels PCR (Phusion™-DNA-Polymerase, siehe 3.2.5) vermehrt und der Vektor sowie das resultierende PCR-Produkt einem Restriktionsverdau unterzogen werden (siehe 3.2.8). Weiter erzeugten die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme überlappende Enden, die komplementäre Sequenzen zu DNA-Fragmenten besitzen, die mit demselben Enzym geschnitten wurden. Mittels der

Ligation, wobei die DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden, können Vektor und Insert dann zu einem DNA-Molekül zusammengefügt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde entweder eine 2-Fragment (beschreibt, dass das Plasmid aus 2 DNA-Segmenten kloniert wurde) oder 3-Fragment Klonierung durchgeführt. Welche Restriktionsenzyme bei den jeweiligen Konstrukten verwendet wurden ist in dem Materialteil dieser Arbeit nachzulesen.

#### **3.2.13.1 Ligation**

Wie oben erwähnt, werden durch die Ligation DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden. Hierbei wurde die T4-Ligase der Firma New England Biolabs verwendet, die enzymatisch das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuresegmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft.

In dieser Arbeit wurden nur Restriktionsenzyme verwendet, die überlappende Enden mit komplementären Sequenzen erzeugten.

*Reaktionsansatz für eine Ligation (20 µl):*

1 µl geschnittener und aufgereinigter Vektor

4 µl geschnittenes und aufgereinigtes PCR-Produkt

2 µl T4-Ligase-Puffer

1 µl T4-Ligase (5 U/µl)

→auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Der Ansatz wurde dann für 30 min. bei 37°C und anschließend über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der ligierte Vektor wurde dann für eine Transformation (siehe 3.1.6) eingesetzt und die Bakterien anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen (siehe 3.1.4).

#### **3.2.14 RNA-Gelelektrophorese**

Ähnlich wie bei der DNA-Gelelektrophorese können RNAs ebenfalls geelektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierbei wird allerdings ein anderes Puffersystem verwendet, das Formaldehyd enthält und damit die denaturierten RNA Moleküle stabilisiert und deren Degradation verhindert.

#### Lösungen:

10 x MEN (pH 7.0):	200 mM	MOPS
	50 mM	Na-Acetat
	10mM	EDTA
37% Formaldehyd		
RNA-Beladungspuffer:	1 mM	EDTA
	50%	(v/v) Glycerin
	0,25%	(w/v) Bromphenolblau
	0,25%	(w/v) Xylencyanol
	40 µg/ml	Ethidiumbromid

#### Durchführung:

Es wurde 1g Agarose abgewogen, 85 ml ddH<sub>2</sub>O dazugegeben und durch anschließendes aufkochen die Agarose gelöst. Nach dem Abkühlen der Mischung auf ca. 60°C wurden 10 ml 10x MEN und 5,5 ml 37%iges Formaldehyd beigefügt. Es folgte das gründliche Durchmischen und das Gießen der Gellösung in den Gelschlitten. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 30 min) wurde das Gel mit RNA-Laufpuffer (30 ml 10x MEN in 270 ml ddH<sub>2</sub>O) überschichtet, der Kamm entfernt und die Taschen mit dem Laufpuffer ausgespült.

Vor der Beladung des Gels wurden 2 µg RNA (mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen eingestellt) mit 2,5 µl RNA-Beladungspuffer versetzt und anschließend für 10 min. bei 70°C denaturiert. Nach der Beladung der Taschen mit den jeweiligen Proben wurden die RNA-Moleküle dann bei 60-70 V und 400 mA ca. 3 Stunden aufgetrennt. Als Größenstandards wurden die ribosomalen RNAs (18S ca. 2kb, 28S ca. 4kb) verwendet.

#### **3.2.15 Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin**

Für die Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin wurde zunächst eine PCR-Reaktion durchgeführt (siehe 3.2.5), indem die Sequenz, die als Sonde dienen sollte, mit spezifischen Primern amplifiziert wurde. Das Gelingen der Amplifikation wurde mittels Agarose Gelelektrophorese (siehe 3.2.10.1) überprüft, das Fragment aufgereinigt (siehe 3.2.11.1) und das PCR-Produkt anschließend für eine zweite

### 3. Methoden

---

Amplifizierungs-Reaktion eingesetzt, bei der die dNTPs mit Digoxigenin markiert waren (DIG-High Prime, Roche).

*Reaktionsansatz für die Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin (20 µl):*

2 µl	aufgereinigtes PCR- Produkt	
4 µl	5 x Phusion™ HF PCR Buffer	(Finnzymes, enthält 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
2 µl	10 x Digoxigenin-dNTP Mix	(Roche)
1 µl	5´-Primer	(10 µM, biomers.net)
1 µl	3´-Primer	(10 µM, biomers.net)
1,5 µl	DMSO	(100%, Finnzymes)
0,5 µl	Phusion™- DNA- Polymerase	(5 Units/µl, Applied Biosystems)

→ auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Über Agarose Gelelektrophorese (siehe 3.2.10.1) wurde der Erfolg der Reaktion überprüft (die mit Digoxigenin markierte Sonde sollte oberhalb des ursprünglichen Produkts laufen) und anschließend die Sonde in 10 ml DIG Easy Hyb Granules (Roche) gemischt. Die Sonde konnte dann für die Hybridisierung eingesetzt werden.

#### **3.2.16 Northern Blot (Transfer von RNA)**

Durch die Northern Blot Methode wird der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Molekülen (siehe 3.2.17) auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran ermöglicht. Der Transfer findet mittels Kapillarkräften statt. Nach dem Transfer wird die Membran hierbei mit spezifischen RNA-Sonden inkubiert, um einzelne RNA-Moleküle aus einem großen RNA-Gemisch nachzuweisen.

#### Lösungen:

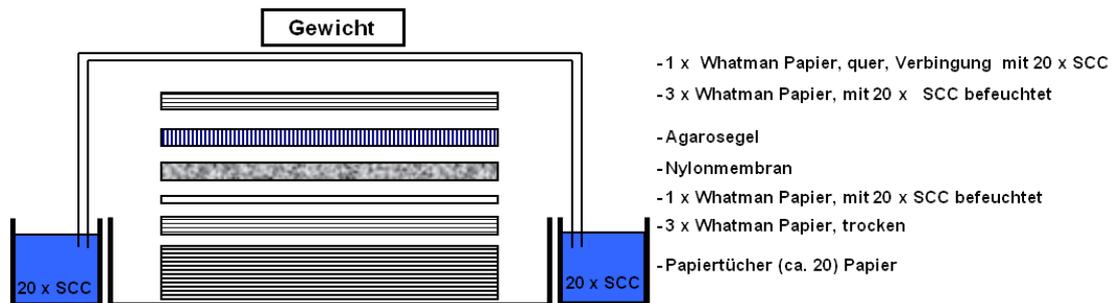
20 x SSC (pH 7,0)	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
	→ pH auf 7,0 einstellen	
2 x SSC	1:10	Verdünnung
Maleinsäure-Puffer (pH 7,5)	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl
	→ pH auf 7,5 einstellen	

0,1 % SDS

#### 10 x Blockingsäure-Lösung

#### Durchführung:

Nach dem Ablauf der Elektrophorese, wurde das Agarosegel einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 min. in 20 x SCC inkubiert. Die Nylonmembran (vorher auf die Größe des Gels zu Recht geschnitten) wurde ebenfalls einmal gewässert und anschließend für 10 min. in 20 x SCC äquilibriert.



**Abb. 3.3:** Schematischer Aufbau des Northern Blot

Für den Blotaufbau (siehe Abb. 3.3) wurden ca. 20 Papiertücher auf Größe zugeschnitten und hierauf 3 trockene Whatman Papiere positioniert. Es folgte ein, mit 20 x SSC befeuchtetes Whatman Papier und die in 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran. Auf diese wurde das Agarosegel gelegt und mit 3 Whatman Papieren (befeuchtet mit 20 x SSC) bedeckt. Rechts und links neben dem Blot wurden zwei 20 x SSC Reservoirs aufgebaut und ein langes Whatman Papier so positioniert, dass es quer auf dem oberen Whatman Papier des Blots lag und gleichzeitig eine Verbindung zu den Puffer-Reservoirs herstellen konnte. Anschließend wurde oben eine Kunststoffplatte aufgelegt und hierauf ein Gewicht gestellt. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, eine Ecke der Membran zur Orientierung abgeschnitten und die RNA auf der Membran (auf einem Whatman Papier) im UV-Crosslinker (die Apparatur wurde auf 1200 gestellt) quervernetzt. Es folgte das Einbringen der Membran in eine Hybridisierungs-Röhre und das zweifache Spülen der Membran mit ddH<sub>2</sub>O. Es wurde nun DIG Easy Hyb Granules (Roche) in die Röhre gegeben und die Membran für 2 Stunden bei 55°C prähybridisiert.

Nach dem 5-10 minütigen Aufkochen der Sonde (DIG Easy Hyb Granules, siehe 3.3.15), wurde die Prähybridisierungslösung abgekippt und die Sonde zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte über Nacht bei 55°C.

Am dritten Tag wurde nach dem entnehmen der Sonde (konnte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und so bis zu fünfmal verwendet werden) die Membran einmal mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und dann zweimal mit  $2 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS (stringent wash 1) gewaschen. Es folgte die zweimalige Inkubation der Membran mit  $0,2 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS (stringent wash 2) für jeweils 20 Minuten bei  $68^{\circ}\text{C}$ . Die Membran wurde dann erneut zweimal mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  (Überführung der Membran in ein Kunststoffgefäß), dann mit Maleinsäure-Puffer gewaschen und anschließend für mindesten 30 min. mit Blockierungs-Lösung der Firma Roche (mit Maleinsäure-Puffer auf einfach verdünnt) inkubiert. Der  $\alpha$ -Digoxigenin AP Antikörper wurde in der Zwischenzeit  $1:20000$  in  $1 \times$  Blockierungs-Lösung verdünnt und dann für mindestens 30 min. zu der Membran geben. Es folgte das dreimalige Waschen der Membran mit Maleinsäure-Puffer, die Trocknung der Membran mittels Whatman Papier und die 5 minütige Inkubation der Membran mit CDP-Star (Roche). Die Membran wurde dann erneut getrocknet, in eine Folie eingeschlagen und entwickelt (Röntgenfilm oder Lumi Imager F1).

#### **3.2.17 Entfernung gebundener Sonden**

##### Lösungen:

$0,1 \times \text{SSC}$  ( $20 \times \text{SSC}$   $1:200$  verdünnt in RNase-freiem  $\text{ddH}_2\text{O}$ )

$0,1 \%$  SDS (w/v)

##### Durchführung:

Zur Entfernung gebundener RNA-Sonden wurden  $2 \times 50 \text{ ml}$   $0,1 \times \text{SSC}/0,1 \%$  SDS (w/v) angesetzt, aufgekocht und  $50 \text{ ml}$  zu der Nylonmembran in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Lösung wurde hierbei für 15 min bei  $68^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, die Membran dann erneut 2 Stunden mit DIG Easy Hyb Granules prähybridisiert und anschließend mit einer neuen Sonde inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach 3.2.16.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975)**

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Polypeptide anhand ihrer molekularen Masse in einem Polyacrylamidgel

elektrophoretisch aufzutrennen. Durch die Zugabe von SDS, einem stark amphipatischen Reagenz, werden die Polypeptide denaturiert. An die entfaltenen Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen so einen stark negativen Charakter, so dass die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Für eine weitere Denaturierung wird  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, das alle Disulfidbrücken im Protein spaltet.

Die Polypeptidgemische wurden in diesem Fall in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt, wobei sich das SDS-Polyacrylamidgel aus einem Sammel- und Trenngel zusammensetzte. Hierbei unterschieden sich die beiden Systeme in ihrer Acrylamidkonzentration, sowie ihrem pH-Wert. Im Falle des Sammelgels kommt es zu einer lokalen und starken Fokussierung der Proteine, wohingegen die Proteine im sich anschließenden Trenngel aufgrund ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

#### **3.3.1.1 Gießen der Gele**

##### Lösungen:

A: Acrylamid-Bis-Lösung für das Trenngel  
30% (w/v) Acrylamid  
0,15% (w/v) Bis (N,N'-methylendiacylamid)

A': Acrylamid- Bis-Lösung für das Sammelgel (nach Laemmeli, 1970)  
30% (w/v) Acrylamid  
0,8% (w/v) Bis (N,N'-methylendiacylamid)

B: Trenngelpuffer (pH 8,8)  
3 M Tris-HCl  
0,4 % (w/v) SDS (Sodiumdodecylsulfate)

C: Sammelgelpuffer (pH 6,8)  
0,75 M Tris-HCl  
0,4% (w/v) SDS

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) in dest. H<sub>2</sub>O

### 3. Methoden

---

TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Elektrophoresepuffer (pH 8,8): 50 mM Tris-HCl

0,38 M Glycin

0,1% (w/v) SDS

#### Durchführung:

Es wurden 12 %-ige Minigele, sowie 12%-ige Standardgele hergestellt. Hierbei wurden zwei Glasplatten aufeinander gelegt, wobei diese durch zwei seitliche Spacer voneinander getrennt waren (Befestigung der Glasplatten mittels Metallklammern). Im Falle der Standardgele wurde auch ein unterer Spacer eingefügt. Der untere Bereich der beiden Platten wurde beim Minigel mit Tesafilm abgeklebt und mit 1% Agarose abgedichtet. Bei den Standardgelen wurden sowohl die seitlichen, als auch der untere Spacer von außen mit 1 % Agarose abgedichtet.

Es wurde zunächst die Trenngel-Lösung zusammenpipettiert (siehe Tabelle 3.1) und zwischen die Glasplatten auf die Höhe eines zuvor gemachten Strichs gegossen (es wurde zuvor der Kamm an die Glasplatten gehalten und ca. 1 cm unterhalb ein Strich getätigt). Das Trenngel wurde mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet (Luftsauerstoff würde die Polymerisierung des Gels beeinträchtigen) und so für ca. 20 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung angefertigt (siehe Tabelle 3.2). Das ddH<sub>2</sub>O wurde nun abgegossen, die Sammelgel-Lösung zwischen die Platten gegossen und der Kamm eingesetzt (ohne Luftblasen). Das Gel polymerisierte ca. 15 Minuten. Anschließend wurden die Klammern und das Tesafilm bzw. der untere Spacer entfernt und das Gel mit den Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur (Biorad) eingesetzt. Diese wurde zunächst unten, dann oben mit Elektrophorespuffer (Laufpuffer) befüllt. Der Kamm konnte nun vorsichtig entfernt und das Gel beladen werden.

**Tabelle 3.1:** Pipettierschema Trenngel

Lösungen	Minigel	Standardgel
	12%	12%
A (Trenngelacrylamid)	2 ml	8 ml
B (Trenngelpuffer)	1,25 ml	5 ml
dH <sub>2</sub> O	1,7 ml	6,85 ml
Temed	2 µl	6,7 µl
APS	50 µl	200 µl

### 3. Methoden

**Tabelle 3.2:** Pipettierschema Sammelgel

Lösungen	Minigel	Standardgel
	12%	12%
A (Trenngelacrylamid)	2 ml	8 ml
B (Trenngelpuffer)	1,25 ml	5 ml
dH <sub>2</sub> O	1,7 ml	6,85 ml
Temed	2 µl	6,7 µl
APS	50 µl	200 µl

#### 3.3.1.2 Extraktion von Proteinen aus Kulturzellen, Proben- vorbereitung

##### Lösungen:

Lysis-Puffer:      20 mM      Tris-HCl (pH 7,5)  
                         150 mM      NaCl  
                         1 mM      EDTA  
                         1 mM      EGTA  
                         1 %      Triton X 100  
                         20 mM      β-Glycerophosphat  
                         1 mM      PMSF  
                         1 Tablette Complete (Roche)

PBS (pH 7,4):      140 mM      NaCl  
                         2,6 mM      KCl  
                         6,4 mM      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
                         1,4 mM      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 x SDS Probenpuffer (nach Laemmli, 1970):      120 mM Tris- HCl  
(pH 6,8)      20% (w/v) Glycerin  
                         10% (w/v) SDS  
                         20% (w/v) β-Mercaptoethanol

##### Durchführung:

Zur Herstellung von Protein Lysaten für die Gelelektrophorese wurden 250000 Kulturzellen pro Well (6well-Platte) ausgesät und am nächsten Tag mit Reporter Konstrukten oder dem proviralem Plasmid NL4-3 transfeziert (siehe auch 3.3.8). Die Zellen wurden am dritten Tag dann entweder mit der Pipette ins Medium abgespült

(HEK 293T) oder mit einem Zellschaber (HeLa) von der Platte gelöst. Es folgte die Überführung der Suspension in Eppendorf-Gefäße (auf Eis) und die Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 14 sec. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 80 µl Lysis-Puffer aufgenommen, für 20 min. auf Eis inkubiert gefolgt von einer erneuten Inkubation bei -70°C für ebenfalls 20 min. Die Zelllysate wurden abzentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 10 min), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl 5 x SDS Probenpuffer vermischt. Nach dem Aufkochen der Proben bei 95°C konnten die Lysate dann für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Alternativ wurden die Zellen anstatt in Lysis-Puffer in 1 x SDS-Probenpuffer (1:5 Verdünnung des 5 x Puffers) aufgenommen und für die Gelelektrophorese verwendet.

#### **3.3.1.3 Isolierung des p24 Proteins aus dem Zellüberstand HIV-1 (pNL4-3) transfizierten Zellen**

Der Überstand (1 ml) von pNL4-3 transfizierten HEK 293T-Zellen wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, mit einem Saccharosekissen (bestehend aus 200 µl 20 % Saccharose) unterschichtet und für 1 Stunde bei 50000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 µl Lysis Puffer aufgenommen und die Probe mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt. Es folgte das Aufkochen der Proben bei 95°C. Die Proben wurden nun für die Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen Bradford-Test**

Zur Proteinquantifizierung wurde ein Bradford-Test (Bradford, 1976) durchgeführt. Hierbei liegt die Bestimmungsgrenze des Tests zwischen 1 und 20 µg/mL Protein.

Die Proteinkonzentrationsmessung wird hierbei durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ermöglicht, der in saurer Lösung an kationische und nichtpolare, hydrophoben Proteinreste bindet. Durch die Bindung verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs und verschiebt sich zu einem Maximum bei 595 nm.

#### Durchführung:

In dieser Arbeit wurde das Bradford-Reagenz der Firma Biorad verwendet. Die Lösung wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (das Reagenz musste Raumtemperatur annehmen) und in eine Messküvette (1 ml) vorgelegt. Es wurden nun 5 µl der Protein Lysate zu dem Reagenz pipettiert und die Lösung gründlich durchmischt. Es folgte die Messung der Proben im Photometer bei 595 nm wobei eine Messküvette nur mit Bradford-Lösung als Referenz diente. Die ermittelten Werte wurden dann in eine vorher angelegte Excel-Tabelle eingegeben und so die Angleichung der Proteinproben errechnet.

#### **3.3.1.5 Auftragung der Proben, Elektrophoresebedingungen**

Die Taschen der Polyacrylamidgele wurden mit 10-15 µl (richtete sich nach dem Probenumfang) der jeweiligen Proteinlysate beladen. Des Weiteren wurde ein Protein Standard (Biorad (A); Fermentas (B), siehe Abb. 3.4) für die spätere Größenzuordnung der Proteine in eine der äußeren Taschen pipettiert (6- 10 µl).

Nach dem Beladen des Gels wurde die Gelkammer an ein Netzgerät angeschlossen und eine konstante Stromstärke von 40 mA (Minigel) bzw. 10 mA (Standardgel) pro Gel angelegt (obere Kammer Kathode, untere Kammer Anode). Das Gel lief ca. 60 Minuten (Minigel) bzw. über Nacht (Standardgel).

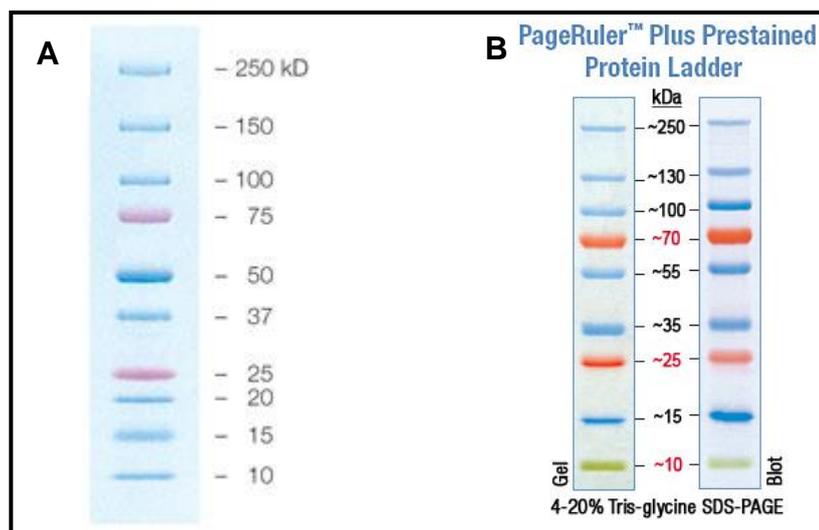


Abb. 3.4: Verwendete Proteinstandards

#### **3.3.2 Western Blot (Semidry-Elektroblot)**

Mittels des Westernblot-Verfahrens ist es möglich, gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine im semi-dry-Verfahren (nach Kyhse-Anderson, 1984) von einem

### 3. Methoden

---

Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran zu transferieren. Die Proteine werden hierbei durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen auf dem Trägermaterial immobilisiert. Dies ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen aus einem komplexen Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper (siehe 3.3.5).

#### Lösungen:

TBST:                    140 mM NaCl  
                              10 mM Tris-HCl  
                              0,05% (v/v) Tween 20

Graphitblotpuffer 1: 25 mM Tris  
                              20% (v/v) Methanol  
                              pH 10,4

Graphitblotpuffer 2: 300 mM Tris  
                              20% (v/v) Methanol  
                              pH 10,4

Graphitblotpuffer 3: 25 mM Tris  
                              40 mM DL-Norleucin  
                              20% (v/v) Methanol  
                              pH 9,4

#### Durchführung:

Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur genommen, die Spacer und Glasplatten entfernt und das Sammelgel vom Trenngel getrennt. Die Nitrocellulosemembran (Nitrocellulosemembran Whatman® 0,45µm Poren, Schleicher und Schuell Protran®) sowie 18 Lagen Whatman Papier (Whatman® Filterpapier, Schleicher und Schuell®) wurden auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Das Gel wurde nun für ca. 10 min. im Graphitblotpuffer 3 inkubiert und der Blot wie in Abb. 3.5 aufgebaut. Hierbei wurden die Lagen Whatmanpapier und die Nitrocellulose wie in Abb. 3.5 mit den unterschiedlichen Puffern behandelt. Weiter wurde die Nitrocellulose so markiert, dass das

Beladungsschema des Gels nach dem Transfer noch nachvollziehbar war. Zum Entfernen von Luftblasen wurde mittels einer Glaspipette über die jeweiligen Lagen des Blots gerollt.

Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Graphitblotkammer bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.

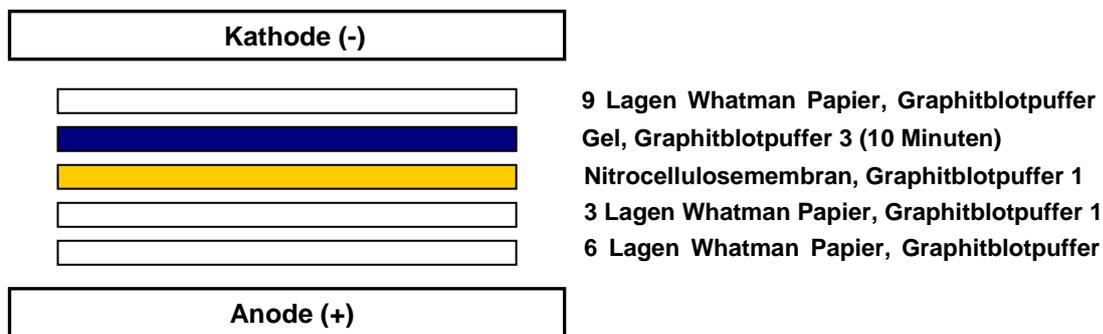


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau des Westernblots

#### 3.3.2.1 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern (Immunblot)

Der Immunblot dient zur chemischen Detektierung einzelner Proteine in einem Proteingemisch. Hierzu werden die Proteine zunächst von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe 3.3.2). Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Magermilch, wird die Nitrocellulose mit einem Primärantikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist, inkubiert. Im Anschluss findet die Inkubation der Membran mit einem Sekundärantikörper statt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und an eine Peroxidase gekoppelt ist. Dadurch kann der Antikörper mit dem *Enhanced Chemical Luminescence-detectionsystems* (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) durch Inkubation in Luminol sichtbar gemacht werden.

##### Durchführung:

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose mit Ponceau S gefärbt (Überprüfung, ob der Transfer erfolgreich war) und die Marker abgeschnitten. Diese wurden zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet. Die Membran wurde daraufhin für ca. 10 Minuten in TBST entfärbt und dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in TBST abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 3.3). Auf die Inkubation mit dem Primärantikörper folgte das 3malige waschen der Membran mit TBST für jeweils 10 Minuten bei

### 3. Methoden

Raumtemperatur. Die Nitrocellulose wurde nun mit einem an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.2) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut dreimal mit TBST für 10 min. gewaschen.

**Tabelle 3.3:** Inkubationsprotokolle der Primärantikörper (ü.N.: über Nacht; RT: Raumtemperatur)

Antikörper	Absättigung (mit 5% Milch in TBST)	Verdünnung	Inkubationszeit
anti-SR-Proteine (16H3)	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:167 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-pSR-Proteine (1H4)	2 Stunden bei Raumtemperatur	16,5 µl in 10 ml 3% BSA in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti- ERK2 (c14)	20 Minuten bei Raumtemperatur	1:500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	1 h bei RT
anti-Akt Kinase (sc- 1618)	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-Phospho-Akt (Ser 473) (193H12)	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:1000 verdünnt in 5% BSA in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-ERK2 (c14)	20 Minuten bei Raumtemperatur	1:500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	1 h bei RT
anti-hnRNP1	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-HIV-1-p24 gag	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-HIV-1-Vif Antiserum	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:1000 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C
anti-FLAG	2 Stunden bei Raumtemperatur	1:2500 in 5% Milch in TBST, pH 7,4	ü. N. bei 4°C

#### 3.3.2.2 Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)

##### Durchführung:

Die Detektierung des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels enhanced chemical luminescence-Detektionssystem (ECL, Amersham). Bei der ECL-Reaktion kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol, wobei Luminol hierbei kurzzeitig in einen angeregten Zustand versetzt wird. Unter Emission von Lichtquanten wird dieser Zustand wieder verlassen, was zur Belichtung des Röntgenfilms an der Stelle des gebundenen Antikörpers führt. Die belichtete Stelle wird nach der Entwicklung des Röntgenfilms als Schwärzung sichtbar und ist proportional zur Lichtquelle. Der Amersham Detections-Kit bestand aus zwei Reagenzien, die im Verhältnis 1:1 zusammen pipettiert und dann auf der Membran verteilt wurden. Es folgte eine Inkubation für 3 Minuten. Anschließend wurde die Nitrocellulose in eine Folie eingeschlagen und in eine Kassette gegeben, in der die Belichtung des Röntgenfilms stattfand. Es folgte die Entwicklung mittels Röntgenfilm oder Lumi Imager F.

### 3.3.3 Entfernen von gebundenen Antikörpern (Re-Blot)

Mit dieser Methode ist es möglich gebundene Antikörper von der Nitrocellulosemembran zu entfernen, um diese dann mit weiteren Antikörpern zu inkubieren, z.B. gegen ubiquitäre Proteine, zur Erstellung einer Ladekontrolle. Mittels einer Ladekontrolle ist es möglich, die gleichmäßige Beladung des Gels mit Polypeptiden nachzuweisen. So kann überprüft werden, ob Unterschiede zwischen Signalen auf dem Immunblot, auf eine ungleichmäßige Beladung des Gels mit Polypeptiden oder auf andere Gründe zurückgeführt werden kann.

#### Lösungen:

Stripping- Puffer: 31 ml 100 mM Tris-HCl, pH 6,7  
5 ml 20% SDS (entspricht 5% SDS)  
auf 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen  
390 µl β-Mercaptoethanol

TBST: siehe 3.3.2

#### Durchführung:

Die Membran wurde kurz mit TBST gewaschen und dann für 30 Minuten in dem Stripping-Puffer bei 50°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert (die Schalen wurden mit Alufolie abgedeckt und mit Klebeband versiegelt). Es folgten ein kurzer und zwei weitere Waschschriffe für je 10 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur. Die Absättigung der Nitrocellulose erfolgte in 5% Magermilchpulver in TBST für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran konnte nun mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden (weiteres Vorgehen siehe 3.3.2.1).

### 3.3.4 Labeling von Proteinen mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein

Um zu überprüfen, ob bzw. in wie weit die Inhibition des PI3K Signalwegs mit der Proteinsynthese (Translation) interferiert, wurden HEK 293T-Zellen mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein inkubiert. Die radioaktiv markierten Aminosäuren werden hierbei in die neu-synthetisierten Proteine eingebaut und können später durch Autoradiographie detektiert und nachgewiesen werden. Auf

diese Weise konnte die Beeinflussung des PI3K Signalwegs auf die Protein-Neu-Synthese ohne großen Aufwand analysiert werden.

#### Durchführung:

Zellen wurden in 6-Well Platten kultiviert (250000 Zellen/Well), über Nacht mit 50  $\mu\text{Ci/ml}$  radioaktiv markiert (Easytag Express [ $^{35}\text{S}$ ] Met-Cys Protein Labeling Mix, Perkin Elmer) und wie unter 3.3.1.2 beschrieben am nächsten Tag geerntet. Die radioaktiven Lysate wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.3.1), das Gel mit Coomassie gefärbt (siehe 3.3.5) und dann in einer Fixierlösung (250 ml ddH<sub>2</sub>O, 200 ml Methanol, 50 ml Essigsäure) für 45 min unter leichtem schütteln (25 rpm) inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O und das Überdecken des Gels mit einer Folie. Das Gel wurde nun auf eine Trocknungs-Apparatur (der Deckel der Apparatur war beheizbar) gelegt, Luftblasen entfernt und ein Vakuum angelegt. Die Trocknung des Gels betrug 2 Stunden. Das getrocknete Gel wurde abschließend in eine Kassette eingeklebt und mit einem Röntgenfilm für ca. 12 Stunden inkubiert. Des Weiteren konnte die Quantifizierung von Bandenintensitäten mittels Phosphor-Screens durchgeführt werden, wobei die Auswertung durch die Aida Image Analyser Software der Firma Raytest vorgenommen wurde.

#### **3.3.5 Färbung von SDS-Gelen (Coomassie-Färbung)**

##### Lösungen:

Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v) Serva Blau R 250 20% (v/v) Methanol (techn.) 7,5% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	20% (v/v) Methanol (techn.) 7,5% (v/v) Essigsäure

##### Durchführung:

Nachdem die Gelelektrophorese beendet war, wurde das Gel aus der Gelkammer herausgenommen, die Spacer entfernt und die Glasplatten voneinander getrennt. Es wurde nun das Sammelgel und der Agarosestreifen entfernt und das Gel über Nacht unter Schütteln in Coomassie-Färbelösung gelegt. Am nächsten Tag wurde das Gel in die Entfärbelösung gegeben, wobei diese mehrfach gewechselt wurde.

#### **3.3.6 HIV-1 p24-Antigen-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Bei der ELISA-Methode handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren. Ein nachzuweisendes Antigen wird hierbei von einem Antikörper gebunden, der wiederum von einem zweiten, Enzym gekoppelten (z.B. alkalische Phosphatase) Antikörper erkannt wird. Die vom Enzym katalysierte Reaktion führt dann zu einem Farbumschlag und dient als Nachweis des Antigens.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten HIV-1 p24-Antigen-ELISAs ist es möglich, das virale Strukturprotein p24 z.B. im Zellüberstand oder im Blut nachzuweisen, wobei hier die Proteinkonzentration auch quantitativ bestimmt werden kann.

##### Lösungen:

TBS:                    144 mM      NaCl  
                             25 mM      Tris-HCl (pH 7,5)

100 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,5)

1 M Schwefelsäure

##### Durchführung:

Es wurden 75 µl des anti-HIV-1-p24 gag Antikörper (Aalto) in 10 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,5) zu einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml verdünnt, eine 96-Well Platte mit 100 µl/Well der Antikörperlösung bestückt, mit einer Klebefolie abgedichtet und über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet.

Am nächsten Tag wurden zunächst die Zellüberstände HIV-1 transfezierter Zellen abgenommen, mit 1 % EMPIGEN (Sigma) versetzt und für 30 min. bei 56°C inkubiert (Inaktivierung des Virus). Rekombinantes HIV-1-p24 gag Protein (4 µg, Standard) der Firma Aalto wurde auf gleiche Weise behandelt und diente später als Referenz. Nach der Inaktivierung wurden sowohl für die Überstände als auch für das rekombinante p24 Protein, acht Verdünnungsreihe/Probe (jeweils 1:2 Verdünnungen) durchgeführt und in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Es folgte das Absaugen der Antikörperlösung, das zweimalige Waschen der 96-Well Platten mit 200 µl TBS/Well und das Auftragen der Proben und des Standards (100 µl/Well), wobei die Verdünnungen des Standards in den beiden links äußeren Reihen (Standard wurde doppelt aufgetragen) gegeben wurde. Die Platten wurden mit einer Klebefolie versiegelt und für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der zweite Antikörper (Aalto, gekoppelt an eine alkalische Phosphatase) angesetzt. Hierfür wurden pro Platte 12,5 ml einer Lösung bestehend aus 2 % Milchpulver, 20 % FCS, 0,5 % Tween 20 und TBS vorbereitet, indem der Antikörper 1:2000 verdünnt wurde. Die Platten wurden anschließend zunächst zweimal mit 200 µl TBS/Well gewaschen und dann gut ausgeklopft. Es folgte die Zugabe von 100 µl der Antikörperlösung/Well und die Inkubation für 45 min. bei Raumtemperatur.

Die Lösung wurde nach der Inkubation abgesaugt und jedes Well 4 x mit 200 µl AMPAK-Waschpuffer (Novo Biolabs, angesetzt nach Herstellerprotokoll) gewaschen, wobei die Platten nach jedem Waschschrift gut ausgeklopft wurden. Anschließend wurde 50 µl des Substrats (AMPAK, angesetzt nach Herstellerprotokoll) in die einzelnen Wells pipettiert und die Platten erneut 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss hieran wurden 50 µl des Amplifiers/Well (AMPAK, angesetzt nach Herstellerprotokoll) gegeben, für 5-10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion dann mit 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die einzelnen Platten konnten nun im TECAN Infinity 200 bei einer Extinktion von 492 nm gemessen werden.

Die Auswertung und Konzentrationsbestimmung wurde anschließend mit dem Programm Excel vorgenommen.

## **3.4 Zellkultur**

### **3.4.1 Kultivierung von Zellen**

Die Kultivierung von Zellen (siehe 2.1.3) wurde unter der Sterilbank und unter den bestehenden Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Das Wachstum der Zellen wurde hierbei mittels Inversmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung kontrolliert.

### **3.4.2 Passagieren adhärenter Zellen**

DMEM Medium

+ 10 % FCS

+ 1 % Pen/Strep

0.05% Trypsin-EDTA

DPBS

#### Durchführung:

Adhärente Zellen wurden in T75-Flaschen (75 cm<sup>2</sup>, TPP Techno Plastic Products AG) oder in 100 mm Schalen (Sarstedt) kultiviert und das Zellmedium, PBS und Trypsin zuvor mittels Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Das Zellmedium wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und 1,5 ml Trypsin auf den Zellen verteilt. Das Trypsin wurde abgenommen und die Zellen für ca. 5 min. bei 37°C inkubiert (Brutschrank). In der Zwischenzeit wurden T75-Flaschen oder 100 mm Schalen mit dem Namen der Zelllinie, Passage und Datum beschriftet und mit 15 ml (T75) oder 10 ml (100 mm Schale) Zellmedium gefüllt. Das Trypsin wurde anschließend durch die Zugabe von 5-10 ml Zellmedium inaktiviert, die Zellen resuspendiert und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Je nachdem, wann die Zellen erneut passagiert oder für Versuche verwendet werden sollten, wurde ein bestimmtes Volumen aus der Zellsuspension abgenommen und in die neue Flasche/Schale überführt (z.B. für den nächsten Tag 800 µl Zellsuspension). Die Zellen wurden dann bis zum nächsten Gebrauch bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert.

#### **3.4.3 Passagieren von Suspensions-Zellen**

RPMI Medium

+ 10 % FCS

+ 1 % Pen/Strep

#### Durchführung:

Suspensionszellen wurden schräggehend in T75-Flaschen kultiviert. Wie unter 3.4.2 beschrieben wurde das Zellmedium und PBS zuvor bei 37°C aufgewärmt.

Neue T75-Flaschen wurden mit dem Namen der Zelllinie, Passage und Datum beschriftet und mit 20 ml des Mediums befüllt. Die Zellen wurden in dem alten Medium resuspendiert und 2 ml dieser Suspension in die neuen Flaschen überführt. Die Zellen wurden dann bis zum nächsten Gebrauch bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.4.4 Aussäen von Kulturzellen für die Transfektion/Infektion**

Das Vorgehen entsprach hierbei den Punkten 3.4.2 und 3.4.3, nur, dass hier zuvor die Zellzahl bestimmt wurde um eine definierte Zahl an Zellen in 6-Well Platten (2 ml Medium/Well) oder T75- Flaschen (20 ml/Flasche) zu überführen.

Nach der Resuspension der Zellen (nach Inkubation mit Trypsin bei adhärenenten Zellen bzw. nach Resuspension der Suspensions- Zellen in dem alten Zellmedium) wurde zunächst die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension sowie 10 µl der Färbelösung Trypan Blue Stain 0,4% gemischt und auf ein Thoma/Neubauer Zählkammer gegen. Unter dem Mikroskop wurden nun auf dem Zählfeld alle 4 x 4 Großquadrate ausgezählt (tote, blau gefärbte Zellen wurden hierbei nicht mit gezählt). Die Zellzahl/ml wurde dann nach folgender Berechnung errechnet: Anzahl der gezählten Zellen/ Anzahl der gezählten Großquadrate x Verdünnung x 10000. Die benötigte Ausgangs-Zellzahl für eine RT-PCR/Proteinlysate betrug hierbei 250000 Zellen/Well, die für die Infektion von Suspensions-Zellen 5 Millionen Zellen/Flasche.

#### **3.4.5 Einfrieren von Zellen**

Einfriermedium: bestehend aus Zellkulturmedium plus: 10 % DMSO  
20 % FCS

Das Vorgehen entsprach hierbei den Punkten 3.4.2 und 3.4.3. Die Zellen wurden nach der Trypsin Behandlung und der Resuspension gezählt (siehe 3.4.4) und  $11 \times 10^6$  Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 200 g für 3 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Einfriemedium resuspendiert und je 1 ml in zuvor mit Bleistift beschrifteten (Zelllinie, Datum, Passage) Kryo-Röhrchen überführt. Es folgte das Wegfrieren der Röhrchen in einem mit Isopropanol befüllten Einfriebehälter für 24 Stunden bei -80°C und die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff am nächsten Tag.

#### **3.4.6 Auftauen von Zellen**

Es wurde bei 37°C aufgewärmtes Zellmedium (je nach Zelllinie) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt, die Zellen im Wasserbad aufgetaut und die Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 200 g und Raumtemperatur für 3 min., das Verwerfen des Überstands und die Resuspension der Zellen in 5 ml Zellmedium. Die Zellsuspension wurde nun in T25-Flaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.4.7 Inkubation von Kulturzellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002**

Um die den Einfluss des PI3K Signalwegs auf das HIV-1 Spleißmuster zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der PI3K Inhibitor LY294002 der Firma Cellsignaling verwendet.

Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst, so dass sich eine 50 mM Stammlösung ergab. Zwei Stunden nach Transfektion (siehe 3.4.8) wurden 2 µl der Stammlösung in 100 µl Zellmedium verdünnt und zu den Zellen gegeben (entspricht eine Endkonzentration von 50 µM). Die Zellen wurden zum Verteilen des Inhibitors etwas geschwenkt und 12-16 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

#### **3.4.8 Viabilitäts-Assay (Alamar blue®-Assay)**

Um die Zellviabilität nach Zugabe des PI3K-Inhibitors zu überprüfen wurde ein Viabilitäts-Assay (Alamar blue®-Assay) durchgeführt. Hierbei enthielt das nicht-toxische Reagenz einen REDOX-Indikator der, nach Eintritt in die Zelle, in seinen reduzierten Zustand überführt wird. Diese Überführung kann letztlich über Absorption nachgewiesen werden und gibt Aufschluss über die metabolische Aktivität und somit Viabilität der Zelle.

HeLa- und HEK 293Z-Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät, so dass die Zellzahl/Well 25000 betrug (in 180 µl Zellmedium; siehe auch 3.4.2 und 3.4.4). Die Zellen wurden am nächsten Tag mit dem PI3K-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (siehe 3.4.7; 0 µM; 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 70 µM, 80 µM, 90 µM und 100 µM LY294002) und anschließend 20 µl/Well des Alamar blue® Reagenz zugegeben (1:10 verdünnt, das Endvolumen ergab 200 µl/Well). Die Zellviabilität wurde in einem Zeitraum von 24h untersucht. Die Durchführung entsprach hierbei den Angaben des Herstellers ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

#### **3.4.9 Transfektion von Kulturzellen**

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle. Dabei ist das Prinzip ähnlich zur Transformation von Bakterien (siehe 3.1.6).

In dieser Arbeit wurden nur transiente Transfektionen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die eingeschleusten Nukleinsäuren nicht in das Genom der Zelle integriert werden (beschreibt die stabile Transfektion) und daher nicht dauerhaft in der Zelle verbleiben.

Bei den hier verwendeten Transfektionsreagenzien handelte es sich um nicht-liposomale Lipide, die unter spontaner Mizellenbildung die DNA umhüllen und so das Einbringen der Fremd-DNA in die Zelle ermöglichen.

#### **3.4.9.1 Transfektion mit FuGENE HD<sup>®</sup> (Promega)**

In dieser Arbeit wurde zum einen das Transfektionsreagenz FuGENE HD<sup>®</sup> der Firma Promega verwendet. FuGENE wurde hierbei in einem Verhältnis von 3:1 (Reagenz:DNA) eingesetzt. Die weitere Durchführung entsprach hierbei dem Herstellerprotokoll (<http://www.promega.com>).

#### **3.4.9.2 Transfektion mit TransIT<sup>®</sup>- LT1 (Mirus)**

Des Weiteren wurde das Transfektionsreagenz TransIT<sup>®</sup>-LT1 der Firma Mirus verwendet wobei das Reagenz in einem Verhältnis von 2:1 (Reagenz:DNA) eingesetzt wurde. Das weitere Vorgehen entsprach auch hier dem Herstellerprotokoll (<http://www.mirusbio.com/products/transfection>).

#### **3.4.10 Infektion von Jurkat- Zellen mit HIV-1- Isolaten**

Für die Infektion von Jurkat-Zellen wurden zum einen das Virus Isolat NL4-3 (HIV-1 Laborisolat, biologischer Titer:  $8 \times 10^7$  Infection Units/ml) sowie das Isolat NL4-3 PI 952 (biologischer Titer:  $7 \times 10^5$  IU/ml) verwendet. Die Virusstocks wurden mit freundlicher Unterstützung von Diplom. Biologe Marek Widera zur Verfügung gestellt. Zellen wurden gezählt (5 Millionen Zellen, wie unter 3.4.4 beschrieben), in einem Volumen von 5 ml in 15 ml Falcon-Röhrchen ausgesät und mit einer MOI (Molecules Of Infection) von 0,01 infiziert. Die Zellen wurden dann bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 6 Stunden kultiviert (Deckel der Röhrchen wurde nur leicht aufgedreht, so dass ein Gasaustausch stattfinden konnte) und anschließend in T25-Falschen überführt. Der Infektionszeitraum erstreckte sich hierbei über 12, 24, 48 oder 144 Stunden. Infizierte Zellen, die mit dem PI3K Inhibitor behandelt wurden (siehe 3.4.7) wurden 12 Stunden vor Zell-Ernte mit dem Inhibitor inkubiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Der PI3K Signalweg nimmt Einfluss auf die SR-Protein Phosphorylierung und das alternative Spleißen HIV-1 basierter Minigenkonstrukte in HeLa-Zellen.

Das alternative Spleißen von prä-mRNAs spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Genexpression höherer Eukaryoten, sondern auch bei der Replikation vieler Viren. Während der Replikation des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) werden durch die unterschiedliche Nutzung von vier Spleißdonoren (5' ss; D1, D2, D3, D4) und acht Spleißakzeptoren (3' ss; A1, A2, SA3, A4cab, A5, A7) mehr als 40 virale, alternativ gespleißte mRNAs generiert, die für die viralen Proteine kodieren (Purcell und Martin, 1993). Die Nutzung der jeweiligen Spleißstellen unterliegt einer strengen Regulation. Diese hängt sowohl von der intrinsischen Stärke der Spleißstellen als auch von *cis*- und *trans*-agierender Elementen ab. Da während der Infektion der Zellen durch das Virus neben einer Vielzahl zellulärer Faktoren auch Signalwege zu Gunsten der Viren beeinflusst werden, ist es von großem Interesse, die Zusammenhänge zwischen Spleißregulation und Signalwegmanipulation zu untersuchen. Ein vielversprechender Kandidat hierbei ist der PI3K Signalweg, der bereits mit dem alternativen Spleißen in Verbindung gebracht werden konnte und von dem ebenfalls gezeigt wurde, dass er durch unterschiedliche Viren, wie z.B. HIV-1, manipuliert werden kann (Patel *et al*, 2001; 2005; Blaustein *et al*, 2004; 2005; Liu *et al*, 2003; Borgatti *et al*, 1997; Chugh *et al*, 2008; Contreras *et al*, 2007; Linnemann *et al*, 2002; Schibeci *et al*, 2000; Wolf *et al*, 2001).

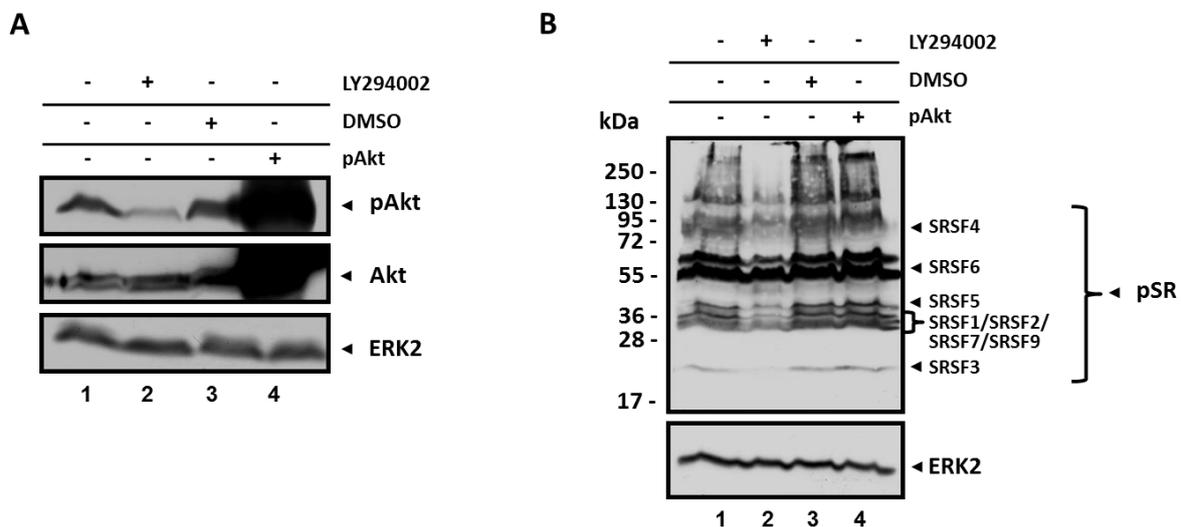
#### 4.1.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs interferiert mit der SR-Protein Phosphorylierung in HeLa-Zellen

Abhängig von ihrem Phosphorylierungszustand und ihrer relativen Position zur Spleißstelle können SR-Proteine die Nutzung von Spleißstellen fördern (siehe 1.2.4). Der PI3K Signalweg ist hierbei an der Phosphorylierung der SR-Protein in diversen Zelllinien (z.B. L6-Myoblasten, SCp2-, HT22-Zellen, primäre T-Zellen sowie *Xenopus laevis* Oocyten) beteiligt (Patel *et al*, 2001; 2005; Blaustein *et al*, 2004; 2005; Avota *et al*, 2006; Liu *et al*, 2003; Hillebrand, 2008, Zhou *et al*, 2012). Um zu klären, ob eine PI3K-vermittelte Phosphorylierung der SR-Proteine auch in HeLa-Zellen zu

## 4. Ergebnisse

beobachtet ist, wurde zunächst die SR-Protein Phosphorylierung nach Inhibition des Signalwegs sowie bei Co-Transfektion des Expressionsplasmids für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) in HeLa-Zellen untersucht.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen entweder für 12 Stunden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50  $\mu$ M) inkubiert oder die aktivierte Akt-Kinase überexprimiert. Da der Inhibitor in DMSO gelöst wurde, diente die Inkubation der Zellen mit DMSO als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen in Lysis-Puffer aufgenommen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es folgte die Inkubation der Membran mit Antikörpern die entweder phosphorylierte SR-Proteine, die phosphorylierte Akt-Kinase oder die Akt-Kinase unabhängig der Phosphorylierung erkannten (Abb.4.1.A, B). Die Detektion von ERK2 diente als Ladekontrolle.



**Abb. 4.1 Die PI3K Inhibition hat einen negativen Einfluss auf die SR-Protein Phosphorylierung.**

HeLa-Zellen wurden entweder mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50  $\mu$ M) oder DMSO behandelt. Des Weiteren wurden Zellen mit dem Expressionsplasmid (1 $\mu$ g) für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Die Proteine wurden nach Lyse der Zellen mittels 12%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion von ERK2 (c14) diente als Ladekontrolle.

A: Detektion der Akt-Kinase durch anti-Akt (sc-1618) und anti-phospho-Akt [(Ser473) (193H12)] spezifischer Antikörper. B: Nachweis der phosphorylierten SR-Proteine (pSR) mittels des phospho-SR-Protein spezifischen Antiköpers 1H4. Die jeweiligen SR-Proteine sind gekennzeichnet.

Während die Inkubation der HeLa-Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 die Zellviabilität nicht beeinträchtigte (Alamar blue® Assay; siehe Anhang, 8.1) resultierte die PI3K Inhibition in einer verminderten Phosphorylierung der Akt-Kinase und der SR-Proteine, wohingegen die Inkubation der Zellen mit DMSO erwartungsgemäß keinen Effekt zeigte (siehe Abb. 4.1.A, B; vgl. die Spuren 1,2 und 3).

Bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase konnte gegenüber den Kontrollen dagegen keine Veränderung im SR-Protein Phosphorylierungsmuster beobachtet werden (Abb. 4.1.B; vgl. Spuren 1,3 und 4).

Die Inhibition der PI3-Kinase zeigte somit auch in HeLa-Zellen, dass, unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen, der PI3K Signalweg tatsächlich die SR-Protein Phosphorylierung modulieren kann.

### **4.1.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen eines HIV-1 basierten drei-Exon-zwei-Intron Reporterkonstrukts**

Um die Relevanz des Signalwegs auf das alternative Spleißen der HIV-1 prä-mRNA zu analysieren, wurde zunächst das Spleißmuster eines HIV-1 basierten drei-Exon-zwei-Intron Konstrukts (LTR ds Ex2) analysiert (Kammler, 2006). Dieses Reporterkonstrukt enthielt die HIV-1 Spleißstellen A1 und D2 sowie das vollständige HIV-1 Exon2 mit den für den Exon2 Einschluss wichtigen SRSF4 und SRSF1 abhängigen Enhancer-Elementen (Exline *et al*, 2008; Kammler *et al*, 2006) (siehe Abb. 4.2.A). Ein weiterer Vorteil dieses Konstrukts bestand darin, dass die Erkennung des Exons2 innerhalb dieses Reporters schwach war, was sowohl die Analyse des Exon2 Ein- als auch des Ausschlusses deutlich begünstigte. Somit erlaubte das Konstrukt die Detektion des ungespleißten Transkripts (ungespleißt, Abb. 4.2.B.I) und der vier verschiedenen Spleißereignisse: herausspleißen des ersten Introns, A1 Nutzung (Abb. 4.2.B.II), herausspleißen des zweiten Introns, D2 Nutzung (Abb. 4.2.B.III) sowie die Erkennung (Abb. 4.2.B.IV) und Nicht-Erkennung des Exon2 (Abb. 4.2.B.V). Außerdem wurde das Spleißmuster eines zweiten Reporterkonstrukts untersucht, das sich vom LTR ds Ex2 dahingehend unterscheidet, dass es eine Punktmutation in der Bindestelle (M1) für das SR-Protein SRSF1 im Exon2 enthält (LTR ds Ex2  $\Delta$  M1). Hierdurch sollte eine mögliche Beeinflussung von SRSF1 durch den PI3K Signalweg zu erkennen sein.

HeLa-Zellen wurden mit den beiden Reporterkonstrukten sowie Expressionsplasmiden für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) und pXGH5 (Transfektionskontrolle) transfiziert. Weiter wurden die transfizierten Zellen für 12 Stunden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Die Auswirkungen der Inhibition sowie der Aktivierung des Signalwegs auf das Spleißmuster der Minigenkonstrukte wurden über RT-PCR-Analysen untersucht (siehe Abb. 4.3.C). Dazu wurde die Gesamt-RNA 14-16 Stunden nach Transfektion

## 4. Ergebnisse

---

isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es folgte eine PCR mit den Primern #1544 (Bindung im vorderen Exon) und #2588 (Bindung in der hinteren CAT-Sequenz) und die Auftrennung der PCR-Produkte mittels eines 10%igen Polyacrylamidgels. Des Weiteren wurden die Intensitäten der Banden gemessen (Image J) und anschließend die Verhältnisse der ungespleißten mRNAs (us) zu mRNAs mit A1 Nutzung (A1) berechnet (Abb. 4.2.D; E).

Die Inhibition des PI3K Signalwegs hatte einem deutlich erhöhten Anteil an ungespleißten Transkripten zur Folge (Abb.4.2.C, vgl. Spur 1 und 2). Während die beiden Kontrollen (Spur 1 und 3) überwiegend die Nutzung des A1 und einen eher geringen Anteil an ungespleißten mRNAs zeigten (Verhältnis us/A1: 0,65; Abb. 4.2.D), führte die PI3K Inhibition zu mehr ungespleißter als gespleißter mRNA (Verhältnis us/A1: 1,76; Abb. 4.2.D). Weiter wurde bei den Kontrollen eine geringe Menge gespleißter mRNAs mit Exon2 Erkennung detektiert, was im Falle der Inhibition nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.2.C, Spur 1 und 3). Somit deutet das Ergebnis auf eine durch die Inhibition des Signalwegs bedingte Interferenz mit der Spleißmaschinerie hin.

Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase führte im Vergleich zu den Kontrollen überraschenderweise zu einem intermediären Spleißmuster, das aber eher dem Spleißmuster in Gegenwart des Inhibitors glich. Hier konnten die ungespleißten und die Transkripte mit A1 Nutzung in vergleichbarer Menge nachgewiesen werden (Abb. 4.2.C, Spur 4; Verhältnis us/A1: 1,04; Abb. 4.2.D). Dies zeigt, dass sowohl die Inhibition als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase einen inhibitorischen Effekt auf den Spleißprozess zu haben scheint.

Während der LTR ds Ex2 Reporter überwiegend gespleißte mRNAs mit A1 Nutzung generierte, kam es im Vergleich dazu beim LTR ds Ex2  $\Delta$  M1 zu einer erhöhten Menge von ungespleißten Transkripten sowie zu einer vermehrten Nicht-Erkennung von Exon2. mRNAs mit A1 Nutzung wurden dagegen weniger produziert, was die Relevanz des ESEM für die A1 Nutzung bzw. die Erkennung des Exons unterstreicht (Abb.4.2.C, Spur 5). Dies spiegelt auch das größere Verhältnis von ungespleißten mRNAs zu mRNAs mit A1 Nutzung für die Kontrollen mit einem Ratio-Wert von 1,22 bzw. 1,12 bei DMSO Zugabe wieder (Abb. 4.2.E).



PI3K Inhibition spricht. Auch Transkripte mit nicht-erkanntem Exon2 wurden bei Anwesenheit des Inhibitors in geringerer Menge generiert.

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase ebenfalls eine höhere Menge an ungespleißten und einen etwas verringerten Anteil an mRNAs mit A1 Nutzung (Abb.4.2.C, Spur 8; Verhältnis us/A1: 1,41, Abb. 4.2.E). Des Weiteren konnte auch hier eine verringerte Nicht-Erkennung des Exon2 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten dies Ergebnisse, dass der PI3K Signalweg einen Einfluss auf das alternative Spleißen eines HIV-1 basierten Reporterkonstrukts hatte. Hierbei schienen sowohl die Inhibition als auch die Aktivierung des Signalwegs mittels pAkt Überexpression in einer erhöhten Menge an ungespleißter mRNA zu resultieren, wobei dieser Effekt im Falle der Inhibition am stärksten ausgeprägt war. Ein Grund hierfür könnte das Ausbleiben der Phosphorylierung von relevanten Faktoren für den Spleißprozess (z.B. SR-Proteine) bei Signalweg Inhibition sowie die Hyperphosphorylierung dieser Faktoren bei Aktivierung des Signalwegs sein.

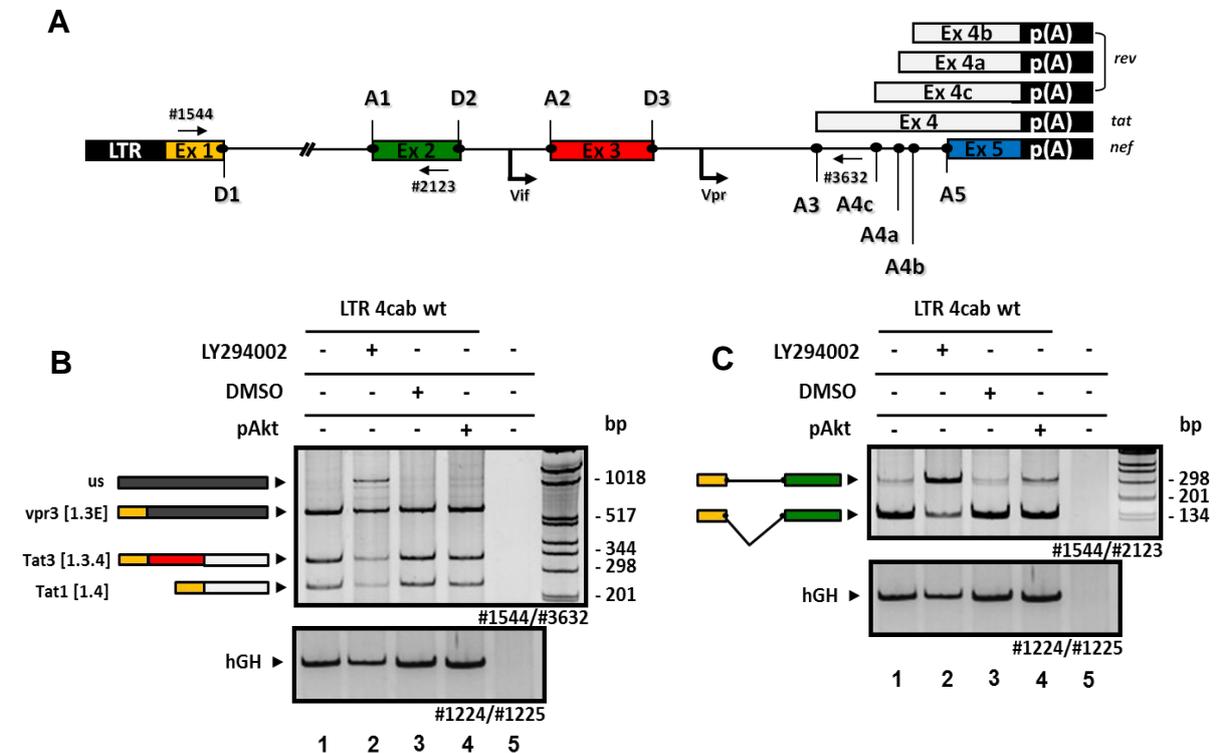
### **4.1.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen eines subgenomischen HIV-1 Reporterkonstrukts**

Wie das vorherige Experiment gezeigt hat, änderte sich das Spleißmuster eines einfach aufgebauten HIV-1 basierten Minigenkonstrukts nach Inhibition des PI3K Signalwegs und nach der Überexpression der Akt-Kinase. Es war daher von Interesse die weiteren Versuche mit subgenomischen Reporterkonstrukten, die dem genomische HIV-1 Aufbau näher standen, fortzuführen. Dies ermöglicht es, einen größeren Überblick über die Beteiligung des PI3K Signalwegs am HIV-1 alternativen Spleißen zu erlangen (z.B. welche Exone/Spleißstellen sind betroffen). Es wurde daher ein Konstrukt verwendet, das die HIV-1 Spleißstellen D1, A1, D2, A2, D3, A3, A4cab sowie A5 enthält und damit die HIV-1 Exone 1, 2, 3, 4cab und 5 (siehe Abb. 4.3.A).

Das Spleißmuster wurde mittels RT-PCR Analysen untersucht (Abb. 4.3.B, C). Hierfür wurden wie unter 4.2 beschrieben HeLa-Zellen mit dem Reporterkonstrukt sowie den Expressionsplasmiden für die aktivierten Akt-Kinase (pAkt) und pXGH5 (Ladekontrolle) transfiziert. Es folgte die Inkubation transfizierter Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder DMSO für 12 Stunden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die PCRs wurde zum einen das

## 4. Ergebnisse

Primer Paar #1544 (Bindung im Exon1)/#3632 (Bindung hinter dem Spleißakzeptor A3) verwendet, was die Detektion von Tat, Vif und Vpr mRNAs ermöglichte. Zum anderen wurde eine PCR mit dem Primer Paar #1544/#2123 (Bindung im Exon2) durchgeführt, um die Retention des HIV-1 Introns1 zu analysieren. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels eines 10%igen Polyacrylamidgels.



**Abb. 4.3 Die Inhibition des PI3K Signalwegs interferiert mit dem alternativen Spleißen eines subgenomischen HIV-1 Reporterkonstrukts.**

HeLa-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt LTR 4cab wt, dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) sowie pXGH5 (Transfektionskontrolle) transfiziert (je 1 µg) und anschließend mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO für 12 h inkubiert. Es folgte die Isolierung der Gesamt-RNA sowie das Umschreiben der mRNAs in cDNA. Für die PCRs wurden die Primer Paare #1544/#3632; #1544/#2123 und #1224/#1225 verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels eines 10%igen PAA-Gels. Für deren Visualisierung wurde das Gel in einer EtBr-Lösung gefärbt.

A: Schematische Darstellung des verwendeten LTR 4cab wt Reporterkonstrukts. Der Reporter enthielt die HIV-1 Spleißstellen: D1, A1, D2, A2, D3, A3, A4cab und A5 sowie den LTR Promotor und ein Polyadenylierungssignal am 3'-Ende. Die HIV-1 Exone sind farblich markiert und die Bindestellen der Primer angegeben.

B: Darstellung der RT-PCR Analysen mit Angabe der verwendeten Primer. Rechts sind jeweils die amplifizierte Spleißprodukte mit Exonzusammensetzung dargestellt. Ungespleißte Bereiche sind als dunkelgraue Kästchen dargestellt oder mit einem [E] gekennzeichnet.

Im Vergleich zu den Kontrollen (Abb.4.3.B, Spuren 1 und 3) resultierte die PI3K Inhibition in einer Abnahme der Tat1 [1.4], Tat3 [1.3.4] und Vpr3 [1.3E] mRNAs (Abb.4.3.B; Primer Paare #1544/#3632). Des Weiteren konnte im Falle der Inhibition eine Bande auf Höhe von ca. 1000 bp detektiert werden, bei der es sich um eine für den untersuchten Abschnitt ungespleißte mRNA handelte (Abb.4.3.B, Spur 2). Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase hatte hingegen keinen Einfluss auf das Spleißmuster (Abb.4.3.B, Spur 4). Somit scheint auch im Falle des subgenomischen

HIV-1 Konstrukts die Inhibition des PI3K Signalwegs mit dem Spleißprozess zu interferieren.

Um die Retention des Introns1 näher zu analysieren, wurde eine PCR mit dem Primer Paar #1544/#2123 durchgeführt (Abb. 4.3.A.B). Hierbei konnten zwei mRNAs nachgewiesen werden, die sich nur durch die An- oder Abwesenheit des Introns1 unterschieden. Während bei den Kontrollen das Spleißen des Introns1 dominierte, war im Falle der PI3K Inhibition der Anteil der ungespleißten RNA deutlich höher (Abb.4.3.B, vgl. Spuren 1,2 und 3). Bis auf eine leichte Erhöhung der Transkripte mit Intron1 konnte auch für die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) kein Effekt auf das Spleißmuster festgestellt werden (Abb.4.3.B, Spur 4).

Die Ergebnisse zeigten, wie schon unter 4.2, einen Einfluss der Signalweg Inhibition auf das HIV-1 Spleißmuster. Da auch hier der Anteil an ungespleißten bzw. intronhaltigen mRNAs bei Signalweg Inhibition anstieg, ist eine durch die Inhibition des PI3K Signalwegs bedingte Interferenz mit der Spleißmaschinerie zu vermuten. Wie oben bereits erwähnt, könnte hier eine durch den PI3K Signalweg bedingte Veränderung der SR-Protein Phosphorylierung eine Rolle spielen. Da die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase in diesem Versuchsteil keinen Effekt auf das Spleißmuster zeigte, kann eine eindeutige Aussage über den Einfluss der überexprimierten Akt-Kinase zu diesem Zeitpunkt noch nicht getroffen werden.

### **4.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen in HIV-1 transfizierten und infizierten Zellen.**

Wie die Versuche mit den HIV-1 basierten Minigenkonstrukten gezeigt haben, scheint der PI3K Signalweg das alternative HIV-1 Spleißen sowie die SR-Protein Phosphorylierung zu beeinflussen. Das nächste Ziel war es daher, die Zusammenhänge zwischen dem PI3K Signalweg und dem alternativen Spleißen auch im Kontext des infektiösen HI-Virus zu untersuchen.

#### **4.2.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs beeinflusst den Einschluss der HIV-1 Leader Exone**

Um einen ersten Überblick über den Einfluss des PI3K Signalwegs auf das alternative HIV-1 Spleißen zu gewinnen, wurden HIV-1 transfizierte Zellen bei Anwesenheit des PI3K-Inhibitors untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Analyse

## 4. Ergebnisse

---

auch bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase (pAkt). Hierbei sollte geklärt werden, ob die aktivierte Akt-Kinase, im Gegensatz zu den Reporterkonstrukten, bei Anwesenheit des infektiösen Virus einen deutlicheren Einfluss auf das HIV-1 Spleißmuster zeigt. Es wurden HEK 293T-Zellen mit dem proviralem HIV-1 Plasmid pNL4-3 sowie dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) und pXGH5 (Ladekontrolle) transfiziert. Transfizierte Zellen wurden für 12 Stunden in Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es folgten PCRs mit Primern für die 2- [#1544/#3392 (Bindung im Exon7)] und 4-kb Klasse [#1544/#640 (Bindung hinter dem Spleißdonor D4)] (Abb. 4.4.B, C) sowie PCRs mit den Primer Paaren #1544/#3632 und #2710 (Bindung hinter dem Spleißdonor D2) /#3392 (Abb. 4.4.D, E). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgels.

Die PI3K Inhibition wies sowohl in der 2- als auch 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs qualitative Unterschiede auf (Abb.4.4.B, C). In der 2-kb Klasse resultierte die Zugabe des PI3K-Inhibitors im Vergleich zu pNL4-3 ohne Inhibitor Inkubation (im weiteren Verlauf als Wildtyp bezeichnet) und DMSO behandelten Zellen in einem deutlichen Verlust an Tat1 [1.4.7] und Nef4 [1.3.5.7] Transkripten sowie einem Anstieg von Rev7 + 8 [1.3.4ba.7] und Nef2 [1.5.7] mRNAs (Abb.4.4.B, vgl. Spur 1,2 und 3). Innerhalb der 4-kb Klasse kam es in Gegenwart des Inhibitors zu einer Abnahme der Env1 [1.5E] und einer Zunahme der Env8 [1.3.5E] mRNAs sowie einer bis her noch nicht identifizierten Bande auf Höhe von ca. 650 bp (Abb.4.4.C, vgl. Spur 1, 2 und 3). Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase zeigte dagegen, ähnlich wie im subgenomischen Reporterkontext, sowohl bei der 2- als auch bei der 4-kb Klasse keinen Einfluss auf das HIV-1 Spleißmuster (Abb.4.4.B, C, Spur 4). Dies zeigt, dass die PI3K Inhibition auch im Kontext des Virus einen Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen ausübt, allerdings, im Gegensatz zu den Minigen-Experimenten, sich nicht in einem höheren Anteil ungespleißter bzw. intronhaltiger Transkripte äußerte.

Da die PI3K Inhibition unter anderem einen negativen Einfluss auf die Tat1 Expression zeigte, wurden als nächstes Primer verwendet, die es ermöglichten die Tat sowie Vif und Vpr mRNAs zu detektieren (#1544/#3632). Hier zeigte sich ein deutlich positiver Einfluss der PI3K Inhibition auf den Einschluss der HIV-1 Leader Exone. Die Inkubation mit dem Signalweg Inhibitor resultierte neben einer Abnahme der Tat1 [1.4.7] mRNA in einer Zunahme von Tat2 [1.2.4.7] und Tat3 [1.3.4.7] sowie

## 4. Ergebnisse

---

zur Detektion von Vif2 [1.2E]. Des Weiteren konnten zusätzliche Banden registriert werden, die durch Sequenzierung als Tat4 [1.2.3.4.7], Tat2b [1.2b.4.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] identifiziert werden konnten (Abb. 4.4.D, Spur 2). Das Exon2b repräsentiert hierbei ein alternatives HIV-1 Exon, das durch die Nutzung des kürzlich entdeckten HIV-1 Spleißdonors D2b entsteht. Dieser Donor ist im HIV-1 Intron2 98 Nukleotide hinter dem Spleißdonor D2 lokalisiert (Widera *et al*, 2010; 2012). Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase zeigte hier erneut keine deutlichen Effekte auf das Spleißmuster (Abb. 4.4.D, Spur 4). Da die bei PI3K Inhibition im höheren Maße detektierten Transkripte die Leader Exone2/2b und 3 enthielten, deutet dies auf einen spezifischen Einfluss des PI3K Signalwegs auf die Erkennung der Leader Exone2/2b und 3 hin.

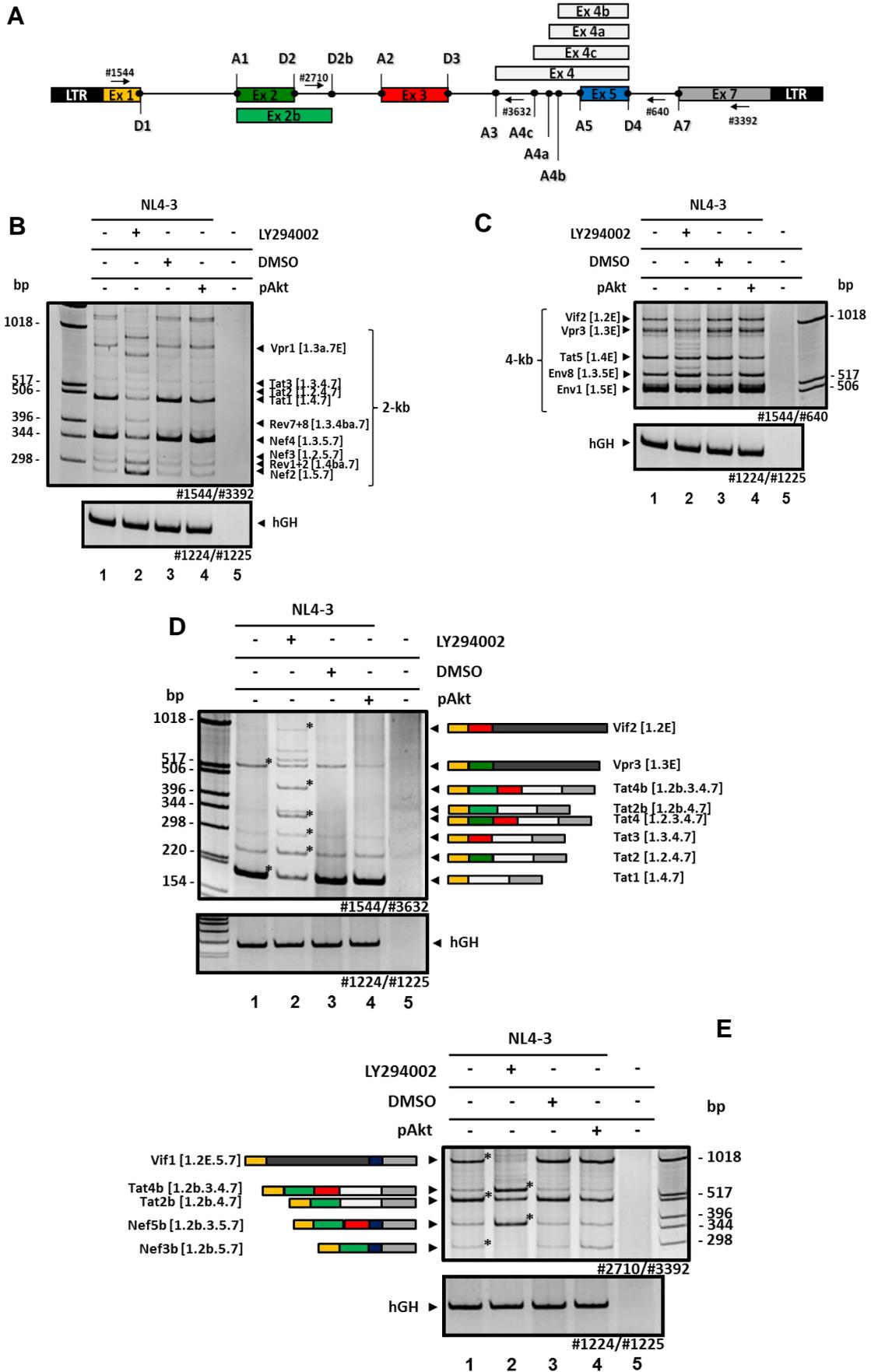
Auch die Detektion D2b-spezifischer Transkripte zeigte einen Einfluss der PI3K Inhibition auf den Einschluss der Leader Exone (Abb. 4.4.E; Primer Paar #2710/#3392). Wie in Abb. 4.4.E zu sehen ist, hatte die Anwesenheit des PI3K-Inhibitors, im Vergleich zum Wildtyp und DMSO behandelten Zellen (Spuren 1 und 3), eine Verschiebung der mRNA Verhältnisse zur Folge. Während bei NL4-3 und Zugabe von DMSO die Tat2b [1.2b.4.7] mRNA dominierte sowie Nef3b [1.2b.5.7] und 5b [1.2b.3.5.7] zu relativ gleichen Anteilen detektiert werden konnten, konnte im Falle der PI3K Inhibition eine deutliche Verschiebung der Verhältnisse zu Gunsten von Nef5b [1.2b.3.5.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] nachgewiesen werden (Abb.4.4.E, Spur 2). Weiter konnte durch die Inhibition auch ein Verlust der Bande auf Höhe von ca. 1000 bp nachgewiesen werden, bei der es sich um das Vif1 [1.2E.7] Transkript handelte. Ein deutlicher Effekt der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase auf die D2b Nutzung konnte auch hier nicht beobachtet werden (Abb. 4.4.E, Spur 4).

**Abb. 4.4. Die PI3K Inhibition beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen und zeigt einen Effekt auf den Einschluss der HIV-1 Leader Exone in HEK 293T-Zellen.**

HEK 293T-Zellen wurden mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 transfiziert, entweder für 12 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO behandelt sowie die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) überexprimiert. Das HIV-1 Spleißmuster wurde durch RT-PCR Analysen unter Verwendung der Primer Paare #1544/#3392 (2-kb Klasse), #1544/#640 (4-kb Klasse), #1544/ #3632 und #2710/#3392 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden durch ein 10 %iges PAA-Gel aufgetrennt und mittels einer EtBr-Lösung visualisiert. Die Detektion von hGH diente als Transfektionskontrolle.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit den HIV-1 Exonen (farblich dargestellt) und den HIV-1 Spleißstellen. Das alternative Exon2b ist in hellgrün, die alternativen Exone4cab in weiß dargestellt. Die Bindestellen der verwendeten Primer sind angegeben. HIV-1 Spleißmuster der 2- (B) und 4-kb Klasse (C) der mRNAs. Die jeweiligen mRNAs mit Exon Zusammensetzung sind rechts oder links neben der Abbildung gekennzeichnet. D: RT-PCR Analyse der Tat, Vpr und Vif Transkripte (#1544/#3632) sowie (E) der D2b (#2710/#3392) spezifischen Transkripte. Sternchen-markierte Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Die Exon Zusammensetzung der jeweiligen mRNAs ist ebenfalls rechts oder links neben der Abbildung dargestellt. Ungespleißte Bereiche innerhalb der Transkripte sind in dunkelgrau dargestellt und mit [E] gekennzeichnet.

## 4. Ergebnisse



Die Detektion der D2b Transkripte unterstützt daher die Hypothese, dass die Inhibition des PI3K Signalwegs die Erkennung der Leader Exone zu beeinflussen scheint. Wie das Exon1 sind die Leader Exone nicht kodierend und werden zum Bestandteil der 5´untranslatierten Region (UTR) der HIV mRNAs. Sowohl bei den Tat als auch bei den Nef mRNAs scheint der Einschluss der jeweiligen Exone2/2b und 3 in die verschiedenen mRNAs durch die Signalweg Inhibition gefördert zu sein. Allerdings dominieren hierbei die kombinierten Einschlüsse der Exone2 und 3 bzw. 2b und 3, was vermuten lässt, dass der PI3K Signalweg sowohl das HIV-1 Exon2/2b sowie das Exon3 Spleißen modulieren kann. Wie bereits erwähnt sind positiv regulierende Enhancer Elemente wesentlich an der Erkennung dieser Exone beteiligt (siehe sowohl 4.1.2 als auch 4.2.2). Allerdings lassen diese Ergebnisse vermuten, dass für den Einschluss der Leader Exone relevante hnRNP-abhängige Silencer Elemente durch PI3K Inhibition beeinflusst werden. Der fördernde Effekt auf den Einschluss der Leader Exone könnte daher durch eine Interferenz der Signalweg Inhibition mit der Funktionalität/Aktivität dieser negativ regulierenden Elemente erklärt werden.

### **4.2.2 Untersuchungen an HIV-1 Mutanten bestätigen den Effekt des PI3K Signalwegs auf die Erkennung der Leader Exone**

Für den Einschluss der Leader Exone2/2b und 3 sind Enhancer sowie Silencer Elemente von entscheidender Bedeutung. Das Exon2 enthält zwei SR-Protein abhängige Exonic Splicing Enhancer (ESE-Vif: SRSF4 und ESEM: SRSF1), die die Nutzung der Spleißstellen A1 und D2 positiv regulieren (Exline *et al*, 2008; Kammler *et al*, 2006). Darüber hinaus wurde im HIV-1 Intron2 vor kurzem ein G-run ( $G_{12-1}$ ) beschreiben, der als hnRNP F/H abhängiger Intronic Splicing Silencer (ISS) charakterisiert werden konnte und die Nutzung des Spleißdonoren D2b negativ beeinflusst. Ein indirekter Effekt des G-runs konnte hierbei auch auf den D2 nachgewiesen werden (Widera *et al*, 2010; 2012). Des Weiteren enthält das Exon3 das hnRNP A/B abhängige Silencer Element ESSV (Domsic *et al*. 2003, Bilodeau *et al*. 2001) und ein ebenfalls im Exon lokalisiertes Enhancer Element ( $ESE_{vpr}$ ), bei dessen Bindungspartnern es sich um  $Tra2\alpha$  und  $\beta$  handelt (Erkelenz *et al*, 2012). Während Mutationen, die die Funktionalität des ESSV zerstören, den Exon3 Einschluss erhöhen und dabei die Menge an ungespleißter viraler mRNA verringern

## 4. Ergebnisse

---

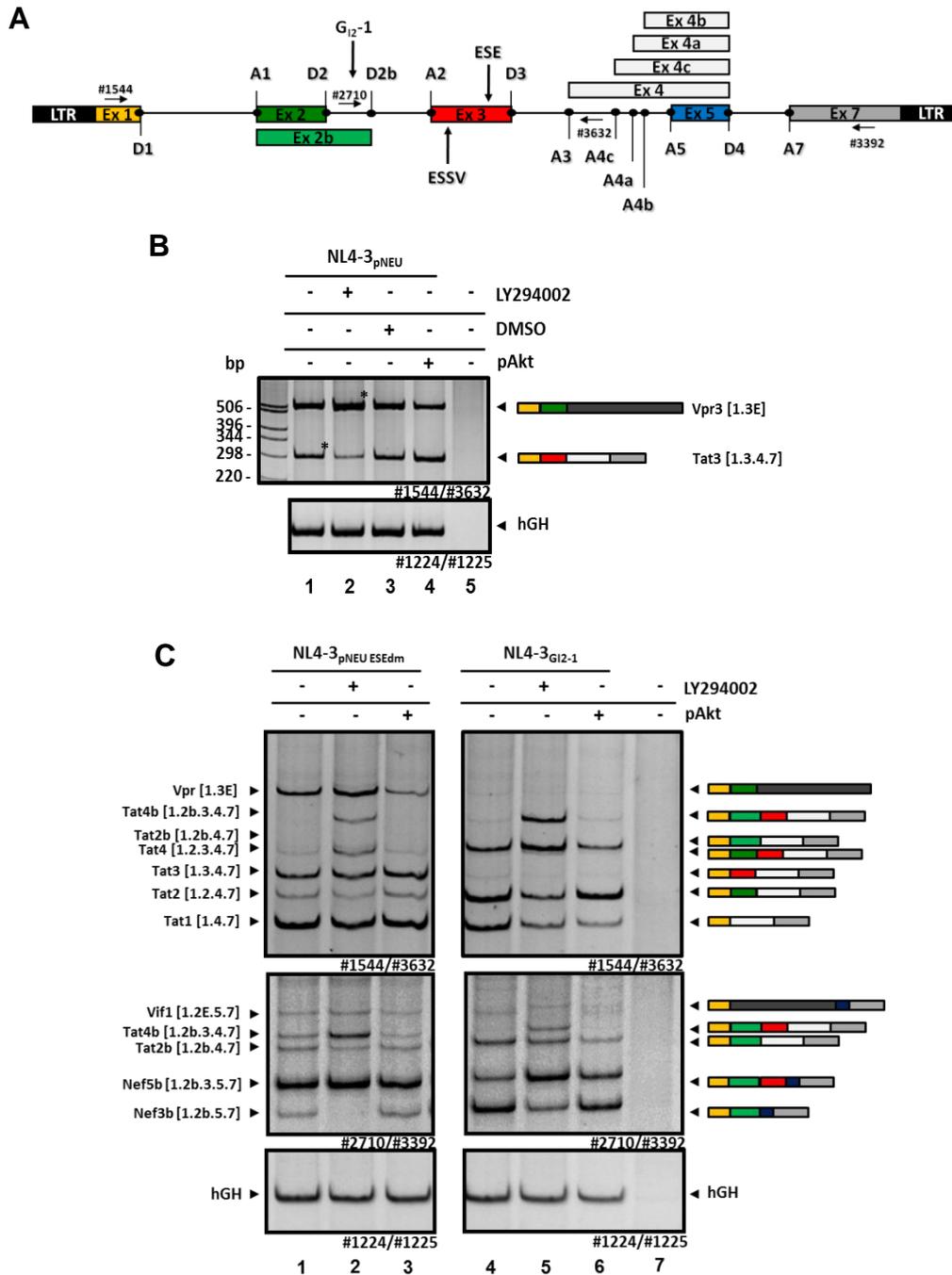
(Madsen und Stoltzfus, 2005), fördert das ESE<sub>vpr</sub> im Exon3 die Nutzung des Spleißdonors D3 (Erkelenz *et al*, 2012).

Da die vorherigen Versuche für eine Beteiligung des PI3K Signalwegs an der Erkennung der Exone2/2b und 3 sprechen, wurden als nächstes HIV-1 Mutanten untersucht, bei denen die oben beschriebenen spleißregulatorischen Elemente (SREs) mutiert waren. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob der PI3K Signalweg mit einem oder mehreren dieser SREs bzw. dessen *trans*-agierenden Faktoren interferiert. Die Mutanten wurden hierbei ausgehend vom HIV-1 Isolat NL4-3 generiert. Zur Analyse des Exon3 Einschusses wurden die HIV-1 Mutanten NL4-3<sub>pNEU</sub> und NL4-3<sub>pNEU ESE<sub>dm</sub></sub> verwendet (Erkelenz *et al*, 2012). NL4-3<sub>pNEU</sub> enthält eine stille Mutation im ESSV, NL 4-3<sub>pNEU ESE<sub>dm</sub></sub> zusätzlich zur ESSV Mutation zwei stille Mutationen im ESE<sub>vpr</sub> innerhalb des Exons3. Die Analysen am Exon2 wurden mit der HIV-1 Mutante NL 4-3 G<sub>12</sub>-1 durchgeführt. Hier war der erste G-run im HIV-1 Intron2 mutiert (Abb.4.5.A) (Widera *et al*, 2010, 2012). Die jeweiligen Mutationen innerhalb der beschriebenen HIV-1 Varianten erlaubten keine Bindung der *trans*-agierender Faktoren und inaktivierten somit die SREs.

Wie schon zuvor, wurden die Spleißmuster mittels RT-PCRs analysiert (Abb.4.5.B, C, D). Die HEK 293T-Zellen wurden mit den jeweiligen proviralen Plasmiden transfiziert und anschließend mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert. Bei den verwendeten Primeren handelte es sich um die Primer Paare #1544/#3632 und #2710/#3392 (s.o. Abb. 4.4; Abb. 4.5).

Die Mutation im ESSV resultierte in einem erhöhten Exon3 Einschuss. Es konnte für NL4-3<sub>pNEU</sub> sowie für DMSO behandelte Zellen erwartungsgemäß eine stark erhöhte Menge an Tat3 [1.3.4.7] und eine noch höhere Menge an Vpr3 [1.3E] detektiert werden (Abb.4.5.B, Spur 1 und 3). Im Falle der PI3K Inhibition war dagegen das Verhältnis zwischen diesen beiden mRNA Klassen deutlich in Richtung Vpr3 [1.3E] verschoben (Abb.4.5.B, Spur 2). Dies deutet auf eine erhöhte Nutzung des Spleißakzeptors A2 bzw. verringerte Nutzung des D3 bei Signalweg Inhibition hin. Da das ESE<sub>vpr</sub> im Exon 3 die Nutzung des D3 fördert, interferiert offensichtlich die PI3K Signalweg Inhibition mit dem fördernden Effekt des ESE<sub>vpr</sub> auf den D3. Die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Tat3 und Vpr3 zu Gunsten von Tat3 im Falle der überexprimierten Akt-Kinase würden ebenfalls hierfür sprechen (Abb.4.5.B, Spur 4).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.5 HIV-1 Mutanten bestätigen den Effekt der PI3K Inhibition auf den Einschluss der Leader Exone.**

2,5 x 10<sup>5</sup> HEK 293T-Zellen wurden mit je 1 µg der Plasmide für die jeweiligen HIV-1 Mutanten sowie pXGH5 und dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen für 12 h mit 50 µM des PI3K-Inhibitors LY294002 oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Es folgten PCRs mit den Primern #1544/#3632 und #2710/#3392 sowie die Auftrennung der PCR-Produkte mittels eines 10%igen PAA-Gels. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch Inkubation des Gels mit einer EtBr-Lösung. Die Detektion von hGH diente als Transfektionskontrolle.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit allen Exonen (farblich markiert) und Spleißstellen. Die Lokalisation der SREs ESSV, ESE<sub>vpr</sub> und G<sub>12-1</sub> sowie die Bindestellen der Primer sind angegeben. Spleißmuster der jeweiligen HIV-1 Mutanten mit mutiertem (B) ESSV (NL4-3<sub>pNEU</sub>), mutiertem (C) ESSV und ESE<sub>vpr</sub> (NL4-3<sub>pNEU</sub> ESE<sub>dm</sub>) oder mutiertem G<sub>12-1</sub> bei Modulation des PI3K Signalwegs. Sternchen-markierte Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Die Exon Zusammensetzung der jeweiligen Transkripte ist rechts oder links der Abbildung gekennzeichnet. Die verwendeten Primer sind unter der jeweiligen Darstellung angegeben. Ungespleißte Bereiche innerhalb der Transkripte sind in dunkelgrau dargestellt und mit [E] gekennzeichnet.

Im Vergleich zum Wildtyp (NL4-3, siehe Abb.4.4.D) führten die Exon3 Mutationen im ESSV und ESE<sub>vpr</sub> unabhängig der Signalweg Inhibition zu einer erhöhten A2 (Vpr3)

## 4. Ergebnisse

---

und D3 Nutzung (Tat3) (Abb.4.5.C). Bei NL4-3<sub>pNEU ESEdm</sub> dominierten Tat3 [1.3.4.7], Vpr3 [1.3E] sowie Tat1 [1.4.7], während Tat2 [1.2.4.7] und Tat4 [1.2.3.4.7] schwächer exprimiert waren. Im Vergleich dazu zeigte die PI3K Inhibition auch hier eine höhere Abundanz an mRNAs mit gemeinsamem Einschluss der Leader Exone. Die Inhibition des PI3K Signalwegs führte zu einer höheren Konzentration an Vpr3, Tat4 [1.2.3.4.7], Tat4b [1.2b.3.4.7] und zu einer geringen Menge an Tat2b [1.2b.4.7] (Abb.4.5.C, Spur 2). Bis auf eine Abnahme der Vpr3 mRNA hatte die überexprimierte, aktivierte Akt-Kinase keinen ersichtlichen Einfluss auf das Spleißmuster (Abb.4.5.C, Spur 3).

Bei Detektion der D2b mRNAs dominierte bei NL4-3<sub>pNEU ESEdm</sub> die Nef5b [1.2b.3.5.7] Transkriptisofom, wobei Nef3b [1.2b.5.7], Tat2b [1.2b.4.7] sowie Tat4b [1.2b.3.4.7] zu deutlich schwächeren (im Vergleich zu NL4-3, siehe Abb. 4.4.E) aber untereinander vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden konnten (Abb.4.5.C, Spur 1; #2710/#3392). Der inhibierte PI3K Signalweg führte dagegen wie schon in Abb.4.4.E beobachtet zu einer Verschiebung der mRNA Level in Richtung Tat4b [1.2b.3.4.7] und Nef5b [1.2b.3.5.7]. Nef3b [1.2b.5.7] konnte bei PI3K Inhibition nicht mehr detektiert werden (Abb.4.5.C, Spur 2; #2710/#3392). Die überexprimierte Akt-Kinase verschob das Verhältnis indessen leicht in Richtung Tat2b [1.2b.4.7] und Nef3b [1.2b.5.7] (Abb.4.5.C). Der durch diese Mutationen favorisierten Exon3 Einschluss resultierte somit bei PI3K Inhibition auch in einer erhöhten Erkennung der Exone2/2b. Dies lies die Vermutung zu, dass PI3K einen spezifischen Einfluss auf das Exon2/2b Spleißen hat, was im Folgenden mit der HIV-1 Mutante NL4-3 G<sub>12</sub>-1 näher untersucht wurde.

Die durch die Mutation im G-run G<sub>12</sub>-1 ausbleibende Bindung der hnRNP F/H Proteine an das ISS resultierte in einem erhöhten Exon2/2b Einschluss (#1544/#3632) (Abb.4.5.C, Spur 4). Bei NL4-3 G<sub>12</sub>-1 überwogen daher Tat2 [1.2.4.7] und Tat2b [1.2b.4.7] mRNAs, es konnte aber auch Tat1 [1.4.7] nachgewiesen werden. War der PI3K Signalweg inhibiert, konnte erneut eine erhöhte Menge an Transkripten mit dem gemeinsamen Einschluss der HIV-1 Leader Exonen detektiert werden. Durch die PI3K Inhibition kam es zum Verlust von Tat1[1.4.7] und Tat2 [1.2.4.7] und zu einer relativ erhöhten Expression von Tat2b [1.2b.4.7] mRNAs. Des Weiteren konnten im Falle der Inhibition auch Tat4 [1.2.3.4.7] und eine erhöhte Menge an Tat4b [1.2b.3.4.7] mRNAs nachgewiesen werden (Abb.4.5.C, Spur 5). Die Überexpression der aktvierten Akt-Kinase führte zu einem Verlust an Tat2b [1.2b.4.7]

und Tat1 [1.4.7] mRNAs, die Tat2 [1.2.4.7] mRNA dagegen schien nicht betroffen zu sein (Abb.4.5.C, Spur 6).

Im Falle der D2b mRNAs (#2710/#3392), dominierte bei NL4-3<sub>GL2-1</sub> Nef3b [1.2b.5.7], wohingegen Tat2b [1.2b.4.7] und Nef5b [1.2b.3.5.7] schwächer exprimiert waren aber immer noch deutlich nachgewiesen werden konnte (Abb.4.5.C, Spur 4). War der PI3K Signalweg inhibiert, so kam es ebenfalls zur Expression der Tat4b [1.2b.3.4.7] mRNAs und zu einer deutlichen Verschiebung in Richtung der Nef5b [1.2b.3.5.7] mRNA (Abb.4.5.C, Spur 5). Die Transfektion der aktivierten Akt-Kinase zeigte hier einen intermediären Phänotyp, mit einem Verlust an Tat2b [1.2b.4.7] und einer vergleichbaren Menge an Nef3b [1.2b.5.7] sowie Nef5b [1.2b.3.5.7] mRNA (Abb.4.5.C, Spur 6).

Somit resultierte der für diese Mutation favorisierte Einschluss der Exone2 und 2b bei PI3K Inhibition zusätzlich in einer begünstigten Erkennung des Leader Exons3. Dies wird durch die erhöhte Expression von mRNAs mit kombiniertem Exon2/2b und Exon3 Einschluss verdeutlicht, was ein weiteres Indiz für eine Beteiligung des PI3K Signalwegs am Spleißen der Leader Exone ist.

Darüber hinaus sprechen diese Ergebnisse für eine Modulation der für das Spleißen der Leader Exone relevanten hnRNP- und SR bzw. SR-ähnlichen Proteinen (Tra2 $\alpha$  und  $\beta$ ) durch den PI3K Signalweg. Eventuell spielt hier eine PI3K Signalweg bedingte Veränderung der post-translationalen Modifikation oder zellulären Lokalisation dieser Proteine eine Rolle.

### **4.2.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen auch in infizierten Jurkat-Zellen**

Da die Inhibition des PI3K Signalwegs bei Transfektion von HEK 293T-Zellen der proviralen pNL4-3 DNA einen Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen zeigte, war es von Interesse, das Spleißmuster auch in den HIV-1 infizierten Wirtszellen zu analysieren. HIV-1 infiziert bevorzugt T-Zellen des Immunsystems, die den CD4 Rezeptor tragen. Aus diesem Grund wurden Jurkat-Zellen verwendet, bei denen es sich um eine humane T-Lymphocytenzelllinie aus dem Blut einer 14-jährigen Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie handelt. Dies ermöglichte nicht nur die Infektion sondern auch die Re-Infektion dieser Zellen mit HIV-1, was nach Transfektion in HEK 293T-Zellen aufgrund des fehlenden CD4 Rezeptors nicht möglich war.

## 4. Ergebnisse

---

Jurkat-Zellen wurden mit einer MOI (Molecules Of Infection) von 0,01 mit dem HIV-1 Isolat NL4-3 PI 952 infiziert und nach 24, 48 und 144 Stunden geerntet. Dieses Isolat codiert, im Unterschied zu NL4-3, für ein dualtropes Hüllprotein. 12 Stunden vor der Ernte wurde ein Teil der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert. Es folgte die Isolierung der Gesamt-RNA und das Umschreiben dieser in cDNA mittels Reverser Transkriptase sowie die Amplifikation verschiedener HIV-1 RNA Klassen mit den Primer Paaren: #1544/#3392; #1544/#640; #1544/#3632 und #2710/#3392. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgels.

Zu Beginn wurde das Spleißmuster der 2- und 4-kb Klassen untersucht (#1544/#3392; #1544/#640). Im Falle der 2-kb Klasse führte auch hier die PI3K Inhibition (zum Vergleich siehe Abb.4.4.B, Spur 2) zu einem Verlust an Tat1 [1.4.7] und Nef4 [1.3.5.7] Transkripten, wobei dieser Effekt nach 144 Stunden am deutlichsten war. Ebenfalls war ein Anstieg der Rev1 + 2 [1.4ba.7] und Nef2 [1.5.7] mRNAs zu erkennen (Abb.4.6.B, Spur 2, 4 und 6).

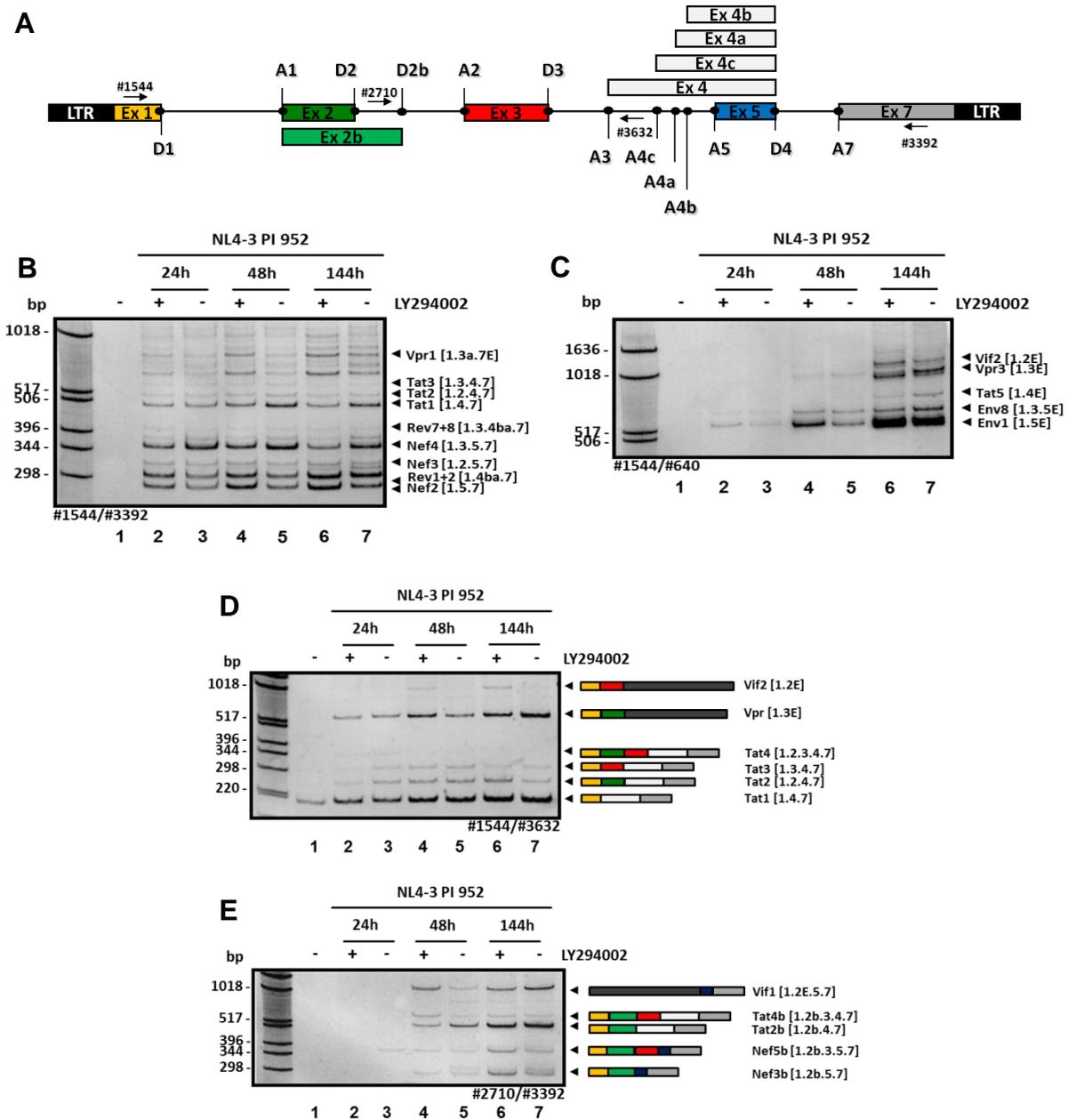
Innerhalb der 4-kb Klasse kam es bei der Inkubation mit dem Inhibitor zu einer Zunahme der Env1 [1.5E] sowie einer geringen Abnahme der Env8 [1.3.5E] und Tat5 [1.4E] mRNAs (beides nach 144 Stunden) (Abb. 4.6.C, Spur 6). Damit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den mit pNL4-3 transfizierten HEK 293T-Zellen. Hier kam es nach PI3K Inhibition zu einem Verlust der Env1 und zu einer Zunahme der Env8 Message (siehe Abb.4.4.C, Spur 2). Dies könnte durch zelltypspezifisches alternatives Spleißen erklärt werden.

Des Weiteren wurde die Expression der Tat, Vpr und Vif mRNAs näher untersucht (#1544/#3632). Im Gegensatz zu der Transfektion von HEK 293T-Zellen mit pNL4-3 DNA konnte hier keine Abnahme der Tat1 [1.4.7] mRNA bei Inkubation mit dem Signalweg Inhibitor nachgewiesen werden. Eine leichte Zunahme des Tat2 [1.2.4.7] Transkripts konnte nur nach 144 Stunden beobachtet werden, wohingegen die Expression von Tat3 [1.3.4.7] im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusst wurde (Abb.4.6D. Spur 6). Auch die mRNAs Tat4 [1.2.3.4.7], Tat2b [1.2b.4.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] konnten nicht detektiert werden. Im Einklang mit den Ergebnissen aus 4.2.1 standen dagegen die leichte Abnahme der Vpr3 [1.3E] sowie die leichte Zunahme der Vif2 [1.2E] mRNAs in Anwesenheit vom Inhibitor (Abb.4.6.D, Spur 4 und 6).

Die PI3K Inhibition zeigte im Falle der Analyse der D2b spezifischen mRNAs (#2710/#3392) eine Zunahme der Tat4b [1.2b.3.4.7] Message nach 48 Stunden

## 4. Ergebnisse

sowie eine Zunahme der Nef3b [1.2b.5.7] und Nef5b [1.2b.3.5.7] mRNAs nach 144 h (Abb.4.6.E, Spur 4 und 6).



**Abb. 4.6 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen in infizierten Jurkat-Zellen.**

$5 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit dem HIV-1 Isolat NL4-3 PI952 infiziert und nach 24 h, 48 h und 144 h geerntet, wobei die Zellen 12 h vor Ernte mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert wurden. Es folgte die Isolierung der Gesamt-RNA und die Umschreibung der mRNAs in cDNA. PCRs wurden mit den Primern #1544/#3392, #1544/#640, #1544/#3632 und #2710/#3392 durchgeführt. PCR-Produkte wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Lösung visualisiert.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit den HIV-1 Exonen (farblich markiert) und den jeweiligen Spleißstellen. Die Bindestellen der verwendeten Primer sind angegeben. HIV-1 Spleißmuster der (B) 2- und (C) 4-kb Klasse der mRNAs, sowie (D) der Tat, Vpr und Vif (#1544/#3632) und (E) D2b (#2710/#3392) spezifischen Transkripte. Die Exon Zusammensetzung der jeweiligen mRNAs ist rechts oder links neben der Abbildung dargestellt. Ungespleißte Bereiche innerhalb der Transkripte sind in dunkelgrau dargestellt und mit [E] gekennzeichnet.

Wie schon bei den mit pNL4-3 transfizierten HEK 293T-Zellen zeigte sich auch bei den infizierten Jurkat-Zellen ein Effekt der PI3K Inhibition auf das HIV-1

Spleißmuster. Der Einfluss war am deutlichsten innerhalb der 2-kb Klasse zu beobachten. Die zum Teil unterschiedlichen Auswirkungen auf das HIV-1 Spleißen in HEK 293T- und Jurkat-Zellen durch die Signalweg Inhibition spiegeln hierbei vermutlich eine zelltypspezifische Regulation des alternativen Spleißens wieder.

### **4.2.4 Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase hebt den Effekt auf den Einschluss der Leader Exone durch die Inhibition des PI3K Signalwegs auf**

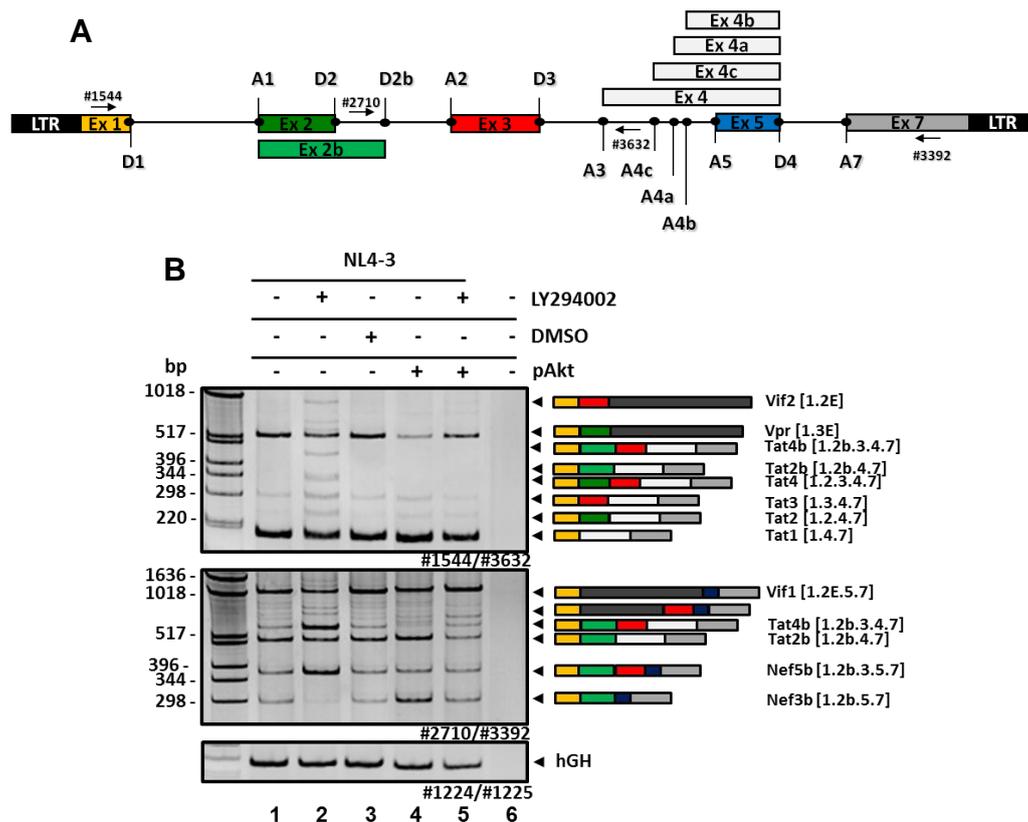
Die Akt-Kinase ist der wesentliche Effektor der PI3-Kinase und wurde in den letzten Jahren mit der Regulation des alternativen Spleißens in Verbindung gebracht (Patel, *et al.* 2001; 2005; Blaustein, *et al.* 2004; 2005; Liu *et al.*, 2003). Während in dieser Arbeit die Inhibition des PI3K Signalwegs einen Einfluss auf das HIV-1 Spleißmuster zeigte, waren die Effekte der co-exprimierten aktivierten Akt Kinase bezogen auf das HIV-1 Spleißen recht moderat. Es stellte sich daher die Frage, ob der Einfluss der PI3K Inhibition auf das HIV-1 Spleißen durch Überexpression der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) aufgehoben werden könnte.

Da sowohl HEK 293T- als auch Jurkat-Zellen Effekte durch die PI3K Inhibition auf das HIV-1 Spleißmuster zeigten (siehe Abb.4.4 und 4.6), HEK 293T-Zellen allerdings eine effizientere Transfizierbarkeit aufweisen, wurden HEK 293T-Zellen mit der proviralen pNL4-3 DNA sowie dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfiziert. Die Zellen wurden für 12 Stunden mit oder ohne dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Das Spleißmuster wurde unter Verwendung der Primer #1544/#3632 und #2710/#3392 mittels spezifischer PCR untersucht (Abb. 4.7.B).

Der durch die PI3K Inhibition hervorgerufene Effekt auf den geförderten Einschluss der Leader Exone konnte durch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase aufgehoben werden. Wie unter 4.2.1 beschrieben resultierte die alleinige Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor zunächst in einer erhöhten Expression an den mRNAs mit Einschluss der Leader Exone: Tat2 [1.2.4.7], Tat3 [1.3.4.7], Tat4 [1.2.3.4.7], Tat2b [1.2b.4.7], Tat4b [1.2b.3.4.7] und Vif2 [1.2E] (Abb.4.7.B, Spur 2; #1544/#3632). War die aktivierte Akt-Kinase allerdings bei PI3K Inhibition überexprimiert so glich der Phänotyp wieder dem Wildtyp (Abb.4.7.B, vgl. Spur 1 und 5). Die Vif2, Tat4, Tat2b und Tat4b mRNAs konnten mit dem verwendeten Primer Paar unter diesen Umständen nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.4.7.B, Spur 5).

## 4. Ergebnisse

Ähnlich verhielt es sich mit den D2b gespleißten mRNAs (Nachweis mittels Primer Paar #2710/#3392). Während der für die PI3K Inhibition kennzeichnende Phänotyp mit Verschiebung zu mehr Nef5b [1.2b.3.5.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] Transkripten auch hier reproduziert werden konnte, führte die Inkubation der Zellen mit Inhibitor bei zeitgleicher Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase zur Aufhebung des durch den Inhibitor hervorgerufenen Spleißeffekts (Abb.4.7.B, vgl. Spur 1, 2 und 5; #2710/#3392). Das Spleißmuster glich unter diesen Bedingungen ebenfalls dem des Wildtyps.



**Abb. 4.7 Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase wirkt dem Effekt des inhibierten PI3K Signalwegs entgegen.**

HEK 293T-Zellen wurden mit 1 µg der pNL4-3 DNA sowie mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (1 µg) und pXGH5 (1 µg) transfiziert. Zwei Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem PI3K-Inhibitor (LY294002, 50 µM) für 12 h inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die PCR Reaktionen wurden unter Verwendung der Primer #1544/#3632 und #2710/#3392 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Lösung visualisiert.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit allen Exonen (farblich markiert) und Spleißstellen. Die Bindestellen der verwendeten Primer sind angegeben. B: RT-PCR Analysen des HIV-1 Spleißmusters bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) und Inhibitor Inkubation. Die jeweiligen mRNAs und deren Exon Zusammensetzung ist auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. Ungespleißte Bereiche innerhalb der Transkripte sind dunkelgrau dargestellt und mit [E] gekennzeichnet.

Zusätzlich konnte für die Überexpression der Akt-Kinase sowie für die Co-Expression von pAkt bei gleichzeitiger PI3K Inhibition auf Höhe von ca. 750 bp eine Spleißvariante detektiert werden, die auf Spleißereignisse von SD3 auf SA3 und von SD4 auf SA7 zurückzuführen waren (Abb.4.7.B, Spur 3 und 5; #2710/#3392).

Der durch die PI3K Inhibition hervorgerufene Effekt auf das alternative HIV-1 Spleißen konnte somit durch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase aufgehoben werden. Die Beobachtung, dass die Überexpression der Akt-Kinase der Inhibition des übergeordneten Regulators PI3K entgegenwirken kann, ist ein weiteres Indiz für die Beteiligung des PI3K Signalwegs an der Regulation des HIV-1 alternativen Spleißens. Des Weiteren deutet dieses Ergebnis daraufhin, dass die Akt-Kinase der wesentliche Effektor der PI3K-vermittelten Spleißregulation zu sein scheint.

### **4.2.5 Die Co-Expression von hnRNP H wirkt dem Effekt der PI3K Inhibition auf den Exon2b Einschluss entgegen**

Wie die bisherigen Ergebnisse gezeigt haben, bedingt die PI3K Inhibition einen vermehrten gemeinsamen Einschluss der HIV-1 Leader Exone. Weiter deuteten die Ergebnisse mit den HIV-1 Mutanten darauf hin (4.2.2), dass es durch die Signalweg Inhibition zur Interferenz mit den Funktionen der SREs bzw. dessen *trans*-agierenden Faktoren kommt, die sowohl für das Exon2/2b als auch das Exon3 Spleißen relevant sind. Um diese Schlussfolgerungen weiter zu untermauern, wurde in diesem Versuchsteil analysiert, inwieweit die Co-Expression des hnRNP H Proteins dem Effekt auf den Einschluss der Exone2/2b bei inhibiertem PI3K Signalweg entgegenwirken kann. Wie bereits erwähnt bindet das hnRNP H Protein an den im HIV-1 Intron2 lokalisierten G-run ( $G_{12-1}$ ). Diese Bindung wiederum beeinträchtigt die Nutzung des Spleißdonors D2b sowie indirekt auch die von D2 und ist somit ein wichtiger Regulator des Exon2/2b Einschlusses. Andersherum führt die Inaktivierung dieses G-runs dazu, dass hnRNP H nicht mehr binden kann und als Konsequenz vermehrt Exon2/2b eingeschlossen wird (Widera *et al*, 2010; 2012), ein Phänotyp, der auch durch PI3K Inhibition hervorgerufen wird.

HEK 293T-Zellen wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA transfiziert sowie den Expressionsplasmiden für hnRNP H und der aktivierte Akt-Kinase (pAkt) co-transfiziert. Anschließend wurden diese mit dem Inhibitor LY294002 oder DMSO inkubiert (12 Stunden) und die Gesamt-RNA isoliert. Die PCR Reaktionen wurden mit den Primern #1544/#3632 und #2710/#3392 durchgeführt und die PCR-Produkte in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Co-Expression von hnRNP H führte zu einem abgeschwächten Effekt der PI3K Inhibition auf das HIV-1 Spleißmuster, der sich in einem verringerten Einschluss des

## 4. Ergebnisse

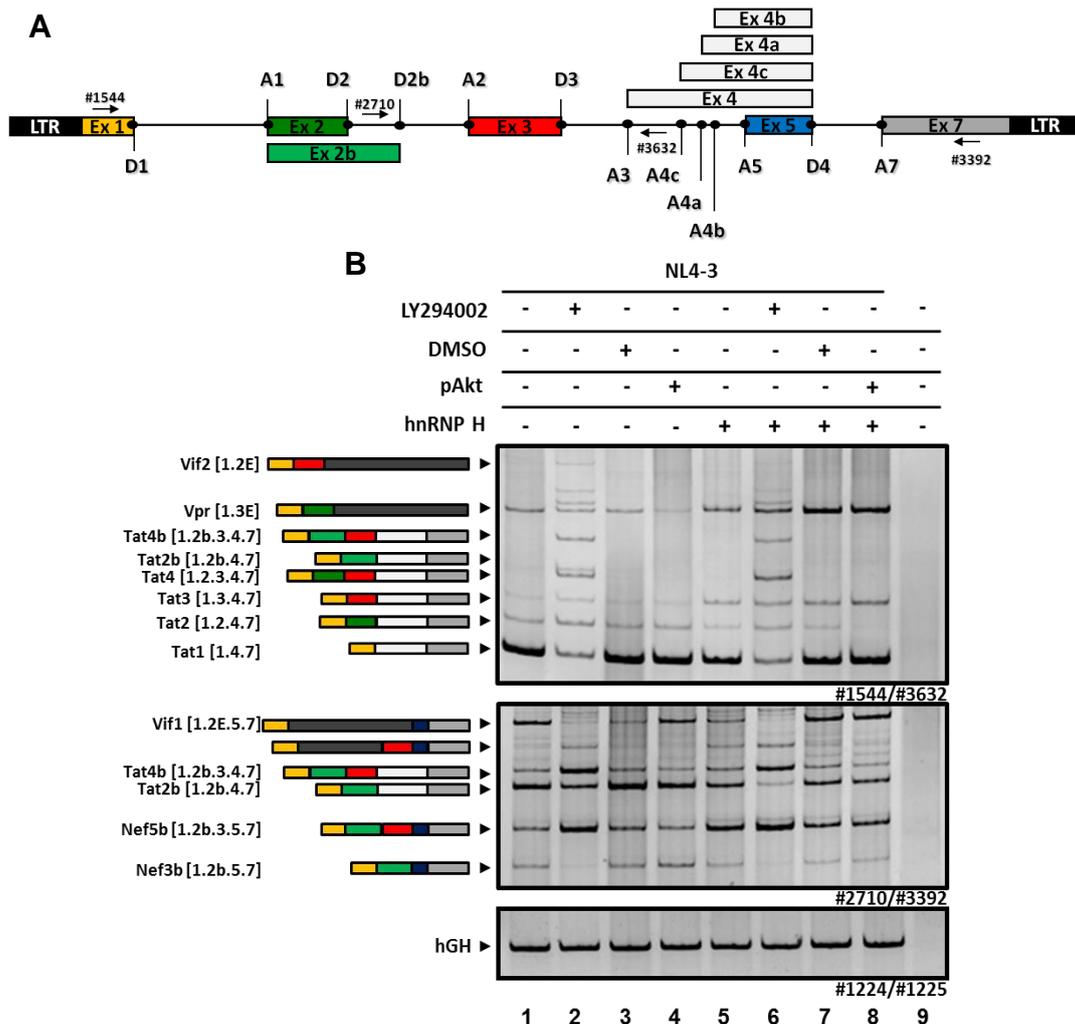
---

Exons2b äußerte. Während der inhierte PI3K Signalweg den gewohnten Phänotyp mit erhöhten Tat2b [1.2b.4.7], Tat4 [1.2.3.4.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] Transkriptisoformen zeigte, nahm die Menge der Tat2b [1.2b.4.7] mRNA bei Co-Expression von hnRNP H und zeitgleicher Inhibitor Inkubation deutlich ab (Abb.4.8.B, vgl. Spur 2 und 6; #1544/#3632). Auch ein Verlust der Tat4b [1.2b.3.4.7] sowie der Vif2 [1.2E] Message konnte nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Inhibition alleine konnte bei simultaner hnRNP H Expression ebenfalls etwas erhöhte Tat3 [1.3.4.7], Tat4 [1.2.3.4.7] und Vpr3 [1.3E] mRNA Level detektiert werden. Die gleichzeitige Expression von pAkt und hnRNP H führte dagegen zu einem Verlust des Tat2 [1.2.4.7] Transkripts (Abb.4.8.B, vgl. Spur 4 und 8; #1544/#3632).

Die PI3K Inhibition bei zeitgleicher hnRNP H Überexpression resultierte bei Detektion der D2b gespleißten mRNAs ebenfalls z.T. in einem verringerten Exon2b Einschluss (Abb. 4.8.B, vgl. Spur 2 und 6; #2710/#3392). Während die alleinige Co-Expression von hnRNP H bereits die verringerte Expression von D2b gespleißter mRNAs zur Folge hatte, konnte in Kombination mit der Inhibitor Inkubation zwar auch hier die Verschiebung der mRNAs in Richtung Nef5b [1.2b.3.5.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] beobachtet werden, Tat2b [1.2b.4.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] waren allerdings auch hier in deutlich geringere Mengen nachzuweisen (Abb. 4.8.B, vgl. Spur 2, 5 und 6; #2710/#3392). Ein Unterschied bezüglich der Nef5b Expression zwischen den Proben +LY294002 und +LY294002 +hnRNP H war jedoch nicht zu erkennen (Abb.4.8.B, vgl. Spur 2, und 6; #2710/#3392).

Auch wenn der Einfluss der PI3K Inhibition auf den Einschluss der Exone2/2b durch die hnRNP H Co-Expression nicht völlig aufgehoben werden konnte, so zeigte dieses Ergebnis doch, dass hnRNP H diesem Einfluss entgegenwirken kann. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die PI3K Inhibition mit der Funktion des G-runs ( $G_{12-1}$ ) bzw. der hnRNP H Funktion interferiert. Des Weiteren scheint der Effekt der PI3K Inhibition hauptsächlich den Einschluss des Exons2b zu betreffen, da sich die Tat2 Expression bei inhiertem Signalweg und zeitgleicher hnRNP H Überexpression im Vergleich zur Inhibitor Inkubation alleine nicht änderte.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.8 Die Überexpression von hnRNP H wirkt dem PI3K Inhibitions-bedingten Exon2b Einschluss entgegen.**

Für die RT-PCR Analysen wurden HEK 293T-Zellen mit je 1 µg der proviralen pNL4-3 DNA sowie der Expressionsplasmide für hnRNP H, der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) und pXGH5 transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen für 12 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO inkubiert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und deren Umschreibung in cDNA wurden spezifische PCR Reaktionen mit den Primern #1544/#3632 und #2710/#3392 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Lösung visualisiert. Die Detektion von hGH diente als Transfektionskontrolle.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit allen Exonen (farblich markiert) und Spleißstellen. Die Bindestellen der verwendeten Primer sind angegeben. B: Detektion der Tat, Vpr und Vif (#1544/#3632) sowie der D2b gespleißten (#2710/#3392) Transkripte bei PI3K/Akt Modulation und hnRNP H Überexpression. Links der Abbildung sind die jeweiligen HIV-1 Spleißvarianten mit Exon Zusammensetzung dargestellt. Ungespleißte Bereiche sind dunkelgrau gezeigt oder mit einem [E] gekennzeichnet.

### 4.3 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative Spleißen von hnRNP H und die SR-Protein Phosphorylierung in HIV-1 transfizierten Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der PI3K Signalweg den gemeinsamen Einschluss der HIV-1 Leader Exone fördert. Weiter lieferten sie auch Hinweise darauf, dass die PI3K Inhibition mit der Funktion spleißregulatorischer Elemente und der an sie bindenden *trans*-wirkenden Faktoren interferiert. Um der Frage

nachzugehen, inwieweit spleißregulatorische Faktoren durch den PI3K Signalweg verändert werden, wurden einige Faktoren auf den Einfluss des PI3K Signalwegs hingehend untersucht. Soweit möglich wurde hierbei die post-translationale Modifikation spleißregulatorischer Proteine (Phosphorylierung von SR-Proteinen) sowie das alternative Spleißen derer Transkripte (Spleißmuster hnRNP H) in mit HIV-1 transfizierten Zellen analysiert.

### **4.3.1 Die PI3K Inhibition beeinflusst das alternative Spleißen von hnRNP H**

Vom hnRNP H Gen sind 50 verschiedene Spleißvarianten beschreiben, die jedoch nicht alle proteinkodierend sind ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Da eine hnRNP H Überexpression den Exon2/2b Einschluss vermindert (Widera, 2010; 2012), dieser andererseits durch die PI3K Signalweg Inhibition gefördert wird, stellte sich die Frage, ob der PI3K Signalweg vielleicht auch das alternative hnRNP H Spleißen beeinflussen kann.

Daher wurden mit pNL4-3 transfizierte HEK 293T-Zellen entweder mit dem PI3K-Inhibitor oder zu Kontrollzwecken mit DMSO behandelt oder mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Das Spleißmuster wurde dann mittels RT-PCR Analysen unter der Verwendung der Primer #2778/#2779 aufgeschlüsselt.

Tatsächlich führte die Inhibition des PI3K Signalwegs zu einer Veränderung des alternativen hnRNP H Spleißens (Abb.4.9.B, vgl. Spur 1 und 2). Das hnRNP H Vollängentranskript konnte im Vergleich zum mit Wildtyp (pNL4-3) transfizierten bzw. DMSO behandelten Zellen deutlich weniger nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in den mit Inhibitor behandelten Zellen auch eine hnRNP H Spleißvariante, der die Exone2 bis 6 fehlten, in verringerter Menge nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war eine hnRNP H Spleißvariante, bei der die Exone2 bis 9 nicht eingeschlossen waren, auf Höhe von ca. 300 bp stärker vertreten (Abb.4.9.B, Spur 2). Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase zeigte dagegen keinen Effekt auf das hnRNP H Spleißmuster. Des Weiteren ergab die Recherche auf dem bioinformatischen Internet Portal ExPASy.org, dass die 3 RNA-Erkennungs Motive (RRM) von hnRNP H innerhalb der Exone1 bis 9 sowie Glycin-reiche Domänen innerhalb der Exone5 bis 11 lokalisiert sind (Abb.4.9.D). Dem Großteil der hier

## 4. Ergebnisse

---

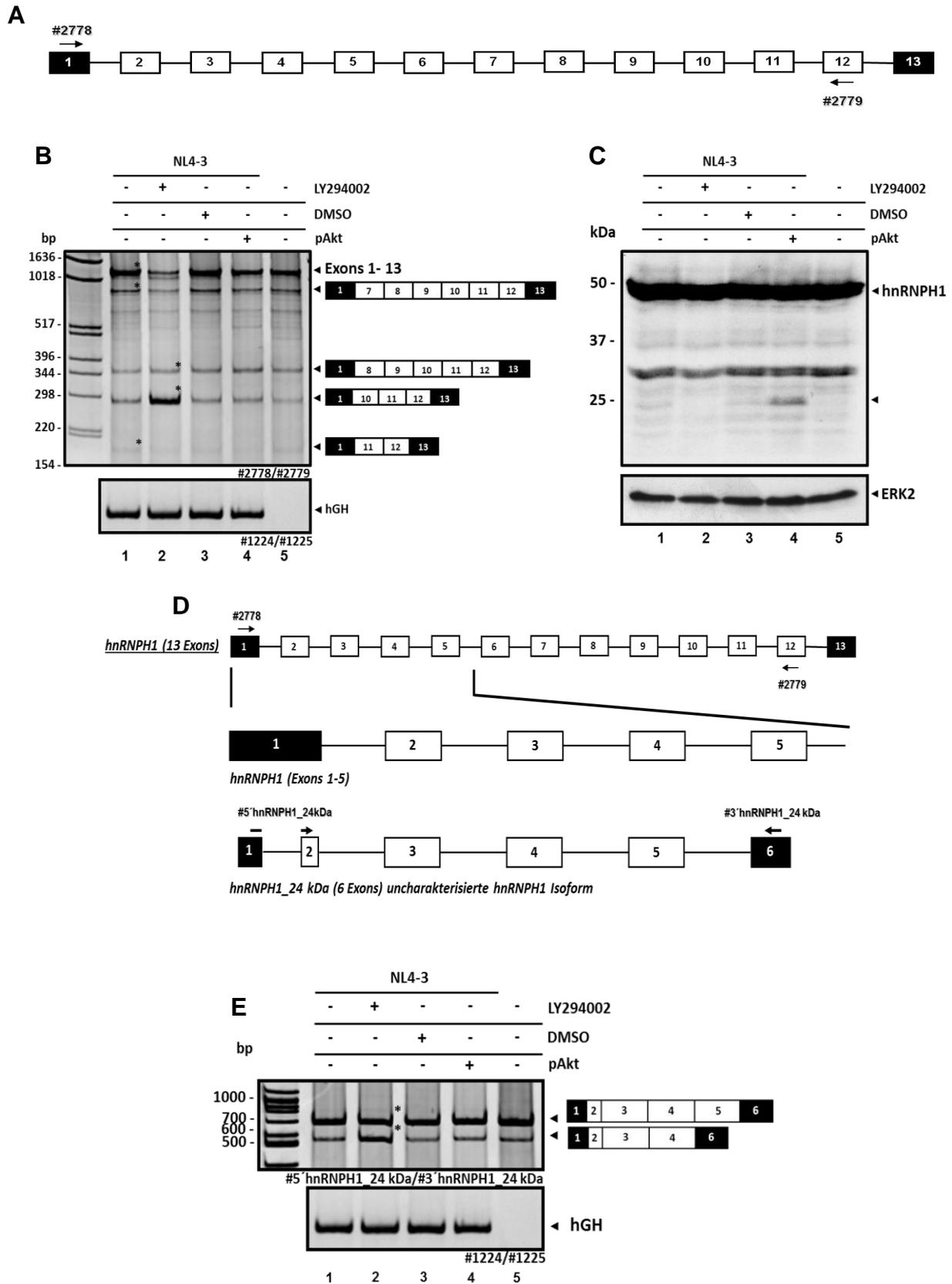
detektierten Spleißvarianten fehlten somit Teile der RRM's sowie Teile der Glycineriechen Domänen, was dessen Funktionalität somit stark beeinträchtigen sollte.

Die PI3K Inhibition führte somit auch zu Veränderungen im hnRNP H Spleißmuster, was vermuten lässt, dass der PI3K Signalweg auch den Spleißprozess zellulärer Gene beeinflusst.

Um die hnRNP H Expression auch auf Protein Ebene zu untersuchen, wurde ein Immunblot mit einem Antikörper gegen hnRNP H durchgeführt. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen wie oben beschrieben behandelt, die Proteine mittels Lysis-Puffer isoliert und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran sowie die Inkubation mit dem gegen hnRNP H gerichteten Antikörper.

Einen Einfluss der PI3K Inhibition auf die hnRNP H Protein Hauptvariante (auf Höhe von ca. 49 kDa) konnte nicht nachgewiesen werden (Abb.4.9.C, vgl. Spur 1 und 2). Aufgrund der starken Expression des hnRNP H Proteins waren Unterschiede zum Wildtyp bzw. mit DMSO behandelten oder mit der aktivierten Akt-Kinase transfizierten Zellen nur schwer erkennbar. Dagegen konnte der Rückgang einer Proteinvariante bei ca. 30 kDa sowie der Verlust einer Variante auf Höhe von ca. 24 kDa in Folge der PI3K Inhibition nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass der PI3K Signalweg auch die hnRNP H Proteinexpression beeinflusst. Interessanterweise wurde die 24 kDa Variante bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase stärker exprimiert (Abb.4.9.C, Spur 4). Bei der 24 kDa Variante könnte es sich um eine alternativ gespleißte, bisher noch nicht näher charakterisierte hnRNP H Isoform handeln (vergleiche [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org); Transkript: HNRNPH1-015). Die Exone 1 und 2 dieser Variante entstehen durch ein zusätzliches Spleißereignis, das aus dem Exon 1 des volllängigen hnRNP H Transkripts einen Bereich entfernt. Hierdurch verschiebt sich die Nummerierung der nachfolgenden entsprechend um eins, so dass die Exone 3, 4 und 5 der 24 kDa Variante den hnRNP H Exonen 2, 3 und 4 der Hauptvariante entsprechen. Das letzte Exon, Exon 6, der alternativ gespleißten hnRNP H Variante ist gegenüber dem entsprechenden Exon 5 der Hauptvariante verkürzt (Abb.4.9.D).

## 4. Ergebnisse



## 4. Ergebnisse

---

### **Abb. 4.9 Die PI3K Inhibition beeinflusst das alternative hnRNP H Spleißen.**

2,5 x 10<sup>5</sup> HEK 293T-Zellen wurden mit je 1 µg der proviralen pNL4-3 DNA sowie pXGH5 und dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) co-transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen für 12 h mit 50 µM des PI3K-Inhibitors LY294002 oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurden die Proteine sowie die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Es folgten spezifische PCRs mit den Primern #2778/#2779 und #5'hnRNPH1\_24kDa/#3'hnRNPH1\_24kDa sowie die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 10%igen PAA-Gel. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch Inkubation des Gels mit einer EtBr-Lösung. Die Detektion von hGH diente als Transfektionskontrolle. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und hnRNP H durch einen spezifischen Antikörper detektiert (Prof. Dr. D. L. Black). Der Nachweis von ERK2 diente als Ladekontrolle.

A: Schematische Darstellung des aus 13 Exonen bestehenden hnRNP H Vollängentranskripts und die Kennzeichnung der Primer Bindestellen. B: RT-PCR Analyse des hnRNP H Spleißmusters. Spleißvarianten wurden rechts neben der Abbildung mit ihrer Exon Zusammensetzung dargestellt. Mit Sternchen versehende Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. C: Immunblot Analyse der hnRNP H Protein Expression. D: Schematische Darstellung des hnRNP H Vollängentranskripts und der hnRNP H 24 kDa Isoform. Die Bindungsstellen der Primer sind angegeben. E: RT-PCR Analyse der hnRNP H 24 kDa Isoform. Spleißvarianten sind rechts der Abbildung mit ihren jeweiligen Exonen dargestellt. Mit Sternchen versehende Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert

Die PCR Analyse mittels spezifischer Primer für diese Spleißvariante zeigte allerdings keine Veränderung der Transkriptisoform, weder durch PI3K Inhibition noch durch Überexpression der aktivierten Akt-Kinase (Abb. 4.9.E, vgl. Spur 1 und 2). Jedoch konnte in diesem Zusammenhang ein alternatives Spleißprodukt detektiert werden, in der das Exon5 der 24 kDa Variante nicht eingeschlossen war. Die Expression dieser mRNA Isoform war in Gegenwart des Inhibitors, nicht jedoch bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase, stark erhöht, was die auf Ensembl beschriebene 24 kDa hnRNP H Variante als das gesuchte Protein im hnRNP H Western Blot ausschloss (Abb. 4.9.E). Dennoch zeigte dieses Ergebnis erneut, dass der PI3K Signalweg das Spleißen sowohl zellulärer als auch viraler Gene beeinflusst. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der detektierten hnRNP H Isoform auf Höhe von 24 kDa um die Expression einer PI3K Inhibitionsbedingten, alternativen hnRNP H Variante handelt. Diese Zusammenhänge konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

### **4.3.2 Die PI3K Signalweg Inhibition interferiert mit der SR-Protein Phosphorylierung und deren Protein Expression in HIV-1 transfizierten HeLa- jedoch nicht HEK 293T-Zellen**

Wie schon in 4.1.1 gezeigt, interferierte die Inhibition des PI3K Signalwegs mit der SR-Protein Phosphorylierung in humanen HeLa-Zellen. Weiter konnte in der Literatur gezeigt werden, dass auch die SR-Protein Expression im Laufe der HIV-1 Infektion moduliert wird (Dowling *et al*, 2008). Es war daher von Interesse sowohl die SR-Protein Phosphorylierung als auch deren Expression im Kontext des infektiösem Virus durch Immunblot Analysen zu untersuchen.

## 4. Ergebnisse

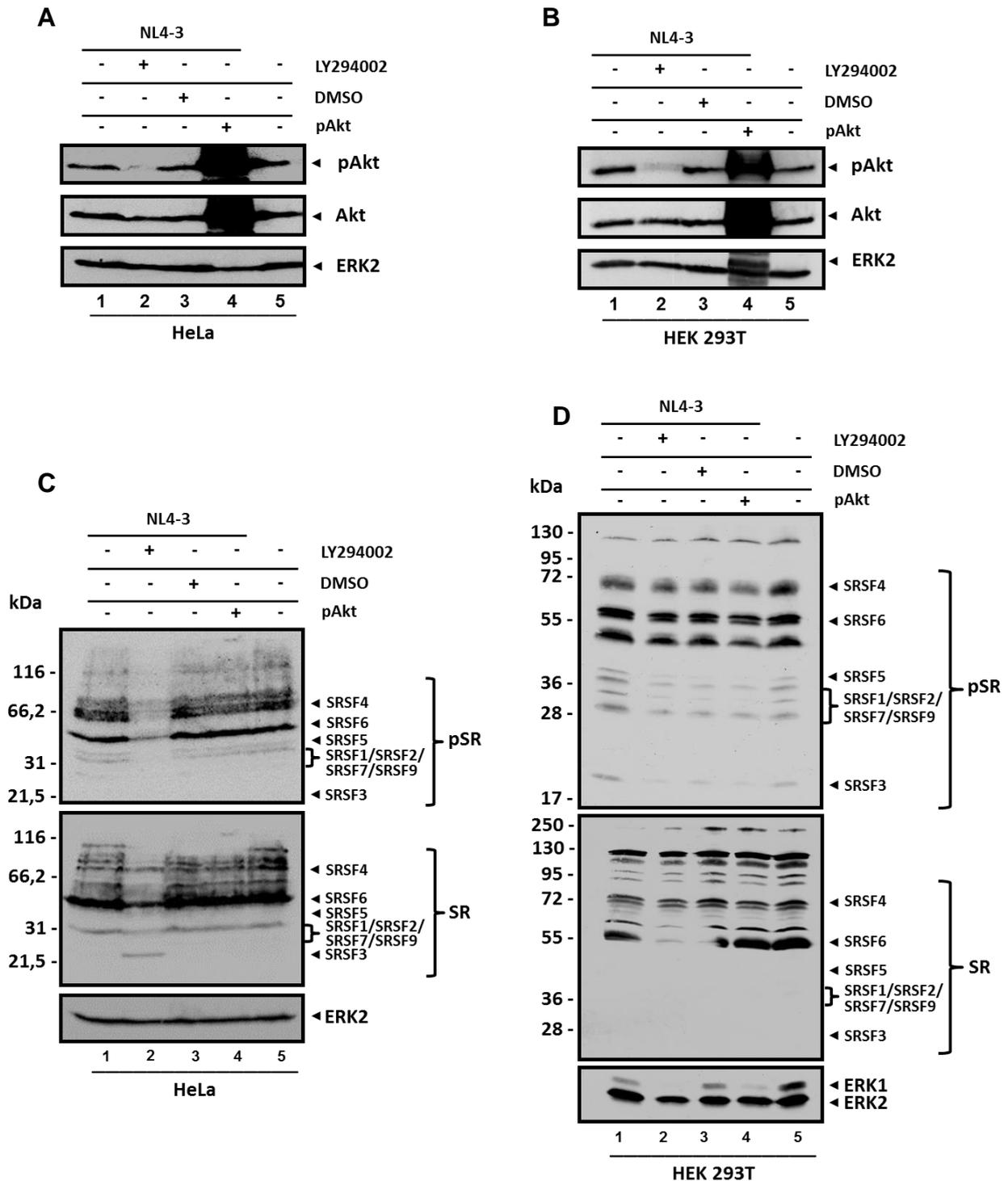
---

HeLa- und HEK 293T-Zellen wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA sowie dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde dann für 12 Stunden dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder DMSO ausgesetzt und anschließend in Lysis-Puffer aufgenommen. Es folgten die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die Membran wurde dann mit einem Antikörper gegen phosphorylierte SR-Proteine oder einem Antikörper der die SR-Proteine unabhängig ihrer Phosphorylierung erkannte inkubiert. Des Weiteren erfolgte mittels entsprechender Antikörper auch ein Nachweis der nicht phosphorylierten und phosphorylierten (pAkt) Akt-Kinase. Die Detektion von ERK2 diente als Ladekontrolle.

Die Inhibition des PI3K Signalwegs führte erwartungsgemäß auch in HIV-1 transfizierten HeLa-Zellen zu einer verminderten SR-Protein Phosphorylierung (Abb.4.10.C, vgl. Spur 1 und 2). Neben dem deutlichen Verlust der phosphorylierten Akt-Kinase (Abb.4.10.A, Spur 2) zeigte die Signalweg Inhibition in HeLa-Zellen sowohl eine deutliche verringerte Menge phosphorylierter SR-Proteine als auch eine deutlich verringerte Menge der meisten SR-Proteine unabhängig der Phosphorylierung (Abb.4.10.C, Spur 2). Die Ausnahme bildete hierbei ein SR-Protein auf Höhe von ca. 20 kDa, bei dem es sich vermutlich um SRSF3 handelte. Bezogen auf die anderen Proben zeigte dieses SR-Protein bei inhibiertem Signalweg sogar eine deutlich höhere Expression (Abb.4.10.C, vgl. Spur 1 und 2).

Weder durch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase noch durch die Transfektion der Zellen mit pNL4-3 konnte ein Einfluss auf die SR-Protein Phosphorylierung und Expression im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden (Abb. 4.10.C, vgl. Spur 1, 4 und 5). Diese Ergebnisse lassen somit nur die Aussage zu, dass die PI3K Inhibition neben der SR-Protein Phosphorylierung auch deren Expression negativ zu beeinflussen scheint. Ob hierbei Transkriptionsfaktoren oder aber sogar, wie für hnRNP H gezeigt (siehe 4.3.1), das alternative Spleißen der SR-Protein Transkripte durch PI3K verändert werden, bleibt weiter zu klären.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.10 Nachweis des negativen Effekts auf die Expression und Phosphorylierung der SR-Protein durch die PI3K Inhibition in HIV-1 transfizierten HeLa- und HEK 293T-Zellen.**

HeLa- und HEK 293T-Zellen wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA (1 µg) sowie dem Expressionsplasmid (1 µg) für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Zellen wurden dann 12 h entweder mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO kultiviert. Die Proteine wurden nach Lyse der Zellen mittels 12%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion von ERK2 (c14) diente als Ladekontrolle.

Detektion der Akt-Kinase durch Akt (sc-1618) und phospho-Akt (pAkt) [(Ser473)(193H12)] spezifische Antikörper in (A) HeLa- und (B) HEK 293T-Zellen. B: Nachweis phosphorylierter SR-Proteine (pSR) und der SR-Proteine unabhängig ihrer Phosphorylierung mittels SR-phospho spezifischen (1H4) und SR-Protein spezifischen Antikörper (16H3) in (C) HeLa- und (D) HEK 293T-Zellen. Die jeweiligen SR-Proteine sind gekennzeichnet.

Des Weiteren konnte zwar ein deutlicher Verlust der phosphorylierten Akt-Kinase in HEK 293T-Zellen bei PI3K-Inhibitor Inkubation detektiert werden (Abb.4.10.B, Spur

2), einen Einfluss auf die Phosphorylierung oder Expression der SR-Proteinen war jedoch auch hier nicht nachzuweisen (Abb.4.10.D, vgl. Spur 1 und 2). Eine Erklärung hierfür könnten zelltypspezifische Unterschiede der SR-Protein Expression sein.

Im Gegensatz dazu konnte in HEK 293T-Zellen jedoch ein Einfluss auf die ERK1 Expression beobachtet werden. Die Detektion von ERK2 diente in dieser Arbeit als Ladekontrolle, wobei der polyklonale Antikörper (c14) nicht nur ERK2 sondern zu einem geringeren Maß auch ERK1 detektieren konnte (Abb.4.10.D). ERK1 und 2 sind Kinasen innerhalb des MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) Signalwegs, der ebenfalls mit der Regulation des alternativen Spleißens in Verbindung gebracht werden konnte (Weg-Remers *et al*, 2001). Während die ERK2 Expression bei allen Proben gleichmäßig war, konnte im Falle der PI3K Inhibition sowie der Co-Expression von pAkt ERK1 nur schwach nachgewiesen werden (Abb.4.10.D, Spur 2 und 4). Die ERK1 Expression im Vergleich dazu war bei NL4-3 und DMSO zwar eine höhere, unterschied sich aber immer noch von der Expression in den Mock-Zellen, die die höchste ERK1 Expression aufwiesen (Abb. 4.12.D, vgl. Spur 1, 3 und 5).

Es besteht daher die Möglichkeit, dass die PI3K Signalweg Modulation sowie HIV-1 selbst mit der ERK1 Expression interferiert. Es bleibt daher zu klären, welche molekularen Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Auch kann über einen damit verbundenen Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen spekuliert werden.

### **4.3.3 Die Co-Expression von Acinus S und Acinus S Phosphomutanten resultiert in einem höheren Anteil intronhaltiger HIV-1 mRNAs**

Da der PI3K Signalweg ein wichtiger Regulator apoptotischer Prozesse ist (zusammengefasst in Engelman *et al.*, 2006), war ein weiterer Kandidat, der das HIV-1 Spleißen in Abhängigkeit des PI3K Signalwegs beeinflussen könnte, das apoptotische Acinus Protein (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the Nucleus). Es existiert in den 3 Isoformen Acinus L, S und S` und ist Bestandteil des an der RNA Prozessierung und Apoptose beteiligten ASAP-Komplexes (Apoptosis- and Splicing-Associated-Protein Complex) (Schwerk *et al*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Akt-Kinase Acinus S am Serin-Rest 422 phosphorylieren kann, was wiederum mit dessen Funktion bei der Chromatin Kondensation interferiert (Sahara *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2005).

## 4. Ergebnisse

---

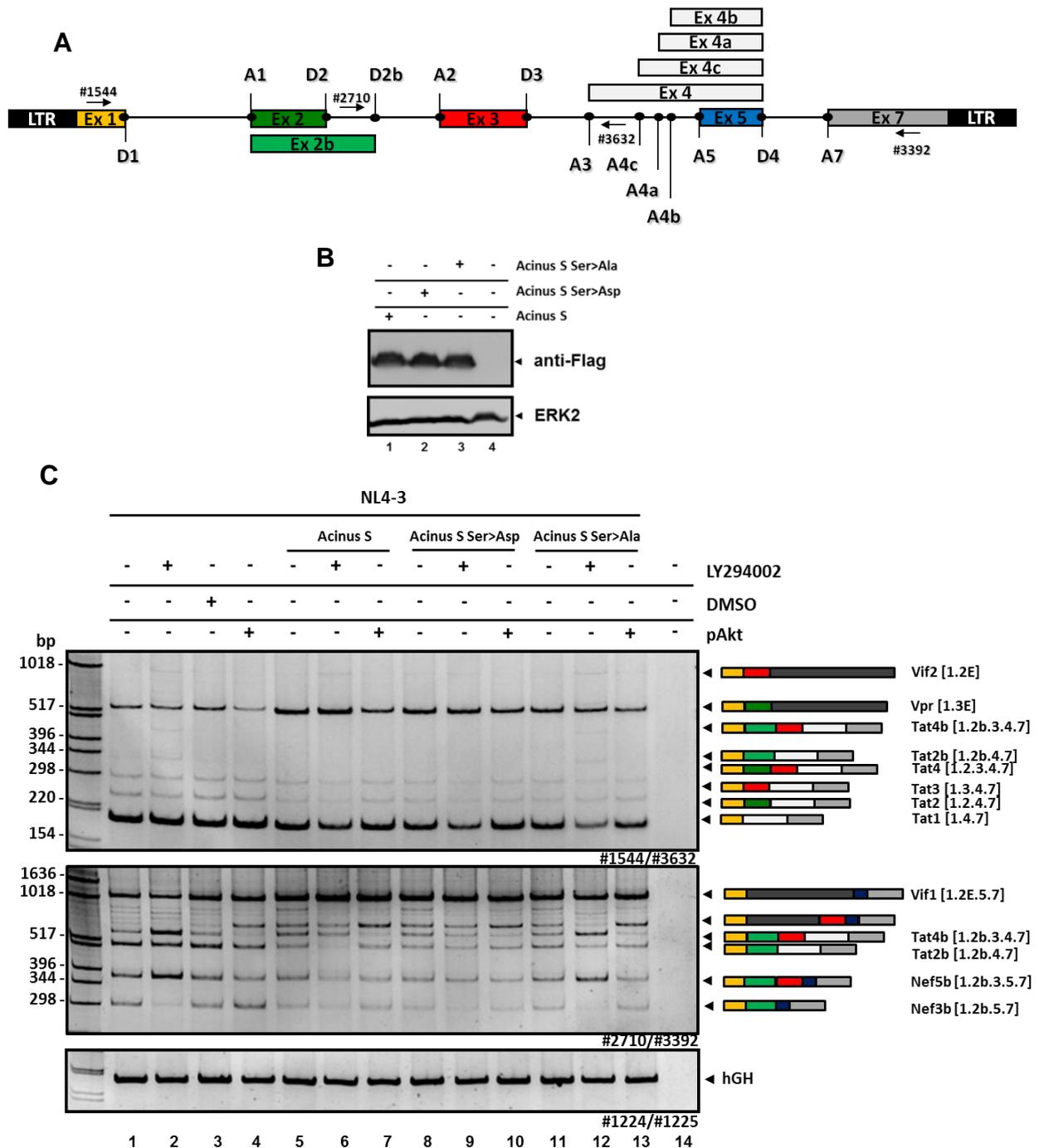
Es stellte sich daher die Frage, ob Acinus in Abhängigkeit des PI3K Signalwegs in das HIV-1 Spleißen involviert sein könnte. Um diese zu beantworten wurden Acinus Expressionsplasmide, die zum einen für Acinus S und zum anderen für Acinus S Phosphomutanten kodieren, generiert. Im Falle der Acinus S Phosphomutanten war der von der Akt-Kinase beschriebene phosphorylierbare Serin-Rest 422 entweder durch die Aminosäure Alanin (nicht phosphorylierbar) oder durch eine Asparaginsäure (molekulares Mimikry einer Phosphorylierung) ausgetauscht.

HEK 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden zusammen mit der pNL4-3 DNA und dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen mit dem PI3K-Inhibitor oder DMSO kultiviert. Anschließend wurden die HIV-1 Spleißmuster miteinander verglichen.

Da die Acinus S Plasmide einen Flag-Tag enthielten, konnte deren Proteinexpression mit einem anti-Flag Antikörper in der Immunblot Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb.4.11.B).

Ohne Co-Expression der Acinus S Plasmide konnte auch hier der gewohnte Spleißphänotyp bei PI3K Inhibition mit einer Zunahme der Tat2b [1.2b.4.7], Tat4 [1.2.3.4.7], Tat4b [1.2b.3.4.7] und Vif2 [1,2E] mRNAs reproduziert werden (Abb.4.11.C, Spur 2; #1544/#3632). Die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase zeigte dagegen eine Abnahme der Vpr3 [1.3.E] mRNA (Spur 4). Bei Überexpression von Acinus S hingegen konnte eine deutliche Zunahme an Vpr3 [1.3E] mRNA bei allen Proben festgestellt werden, die im Gegensatz zu den anderen Proben bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase jedoch etwas geringer war (Abb.4.11.C, vgl. Spur 5, 6 und 7). Des Weiteren konnte bei Acinus S Überexpression in allen Proben eine Abnahme der Tat1 [1.4.7], Tat2 [1.2.4.7] und Tat3 [1.3.4.7] mRNAs nachgewiesen werden. Die Effekte der Signalweg Inhibition konnten bei Acinus S Co-Expression nicht reproduziert werden (Abb. 4.11.C. vgl. Spur 2 und 6). Somit bestätigen diese Ergebnisse den in der Literatur beschriebenen Effekt, dass der aktive ASAP-Komplex das Spleißen inhibiert und das Verhältnis in Richtung ungespleißte bzw. intronhaltige mRNAs verschiebt (Schwerk *et al*, 2003). Des Weiteren sprechen diese Ergebnisse für eine Überlagerung des PI3K-Inhibitor Effekts durch Acinus S Co-Expression.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.11 Acinus S und Acinus S Phosphomutanten verschieben das HIV-1 Spleißmuster in Richtung intronhaltiger mRNAs.**

Für die RT-PCR Analysen wurden HEK 293T-Zellen mit je 1 µg der proviralen pNL4-3 DNA, der Expressionsplasmide für Acinus S und Acinus S Phosphomutanten, der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) sowie pXGH5 transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen für 12 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO inkubiert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und deren Umschreibung in cDNA wurden PCRs mit den Primern #1544/#3632 und #2710/#3392 durchgeführt. PCR-Produkte wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Lösung visualisiert. Die Detektion von hGH diente als Transfektionskontrolle. Zur Überprüfung der Expression der Acinus S und der Acinus S Phosphomutanten Plasmide wurde ein Immunoslot durchgeführt, wobei der Antikörper gegen den Flag-Tag der Acinus Proteine gerichtet war. Der Nachweis von ERK2 diente als Ladekontrolle.

A: Schematischer Aufbau des HIV-1 Genoms mit allen Exonen (farblich markiert), Spleißstellen und Primer Bindungsstellen. B: Immunblot zur Überprüfung der Überexpression von Acinus S und Acinus S Phosphomutanten unter Verwendung eines anti-FLAG Antikörpers. C: HIV-1 Spleißmuster bei Überexpression der Acinus S und Acinus S Phosphomutanten und PI3K/Akt Modulation. Spleißvarianten sowie deren Exon Zusammensetzung sind rechts neben der Abbildung dargestellt. Ungespleißte Bereiche sind in dunkelgrau angegeben oder mit einem [E] gekennzeichnet. Ser: Serin, Asp: Asparaginsäure, Ala: Alanin.

## 4. Ergebnisse

---

Ein ähnliches Bild ergab sich bei Co-Expression der Acinus S Variante, bei der der Serin-Rest 422 durch eine Asparaginsäure ausgetauscht war (Flag Acinus S Ser422>Asp; Abb.4.11.C, Spur 8, 9 und 10). Diese Mutation wird als molekulares Mimikry verstanden und täuscht eine ständige Phosphorylierung des Serin-Restes 422 vor. Auch hier konnte eine erhöhte Menge an Vpr3 [1.3E] mRNA und eine Abnahme der Tat mRNAs für alle Proben nachgewiesen werden. Gegenüber den anderen Proben war im Falle der co-exprimierten aktivierten Akt-Kinase (pAkt) die Zunahme der Vpr3 mRNA erneut nicht ganz so stark. Der Effekt der PI3K Inhibition war in diesem Zusammenhang nicht darstellbar (Abb.4.11.C. vgl. Spur 2 und 9).

Weiter wurde die Co-Expression der dritten Acinus S Phosphomutante, bei der der Serin-Rest 422 durch ein Alanin ausgetauscht wurde, untersucht (Flag Acinus S Ser 422>Ala; Abb.4.11.C, Spur 11, 12 und 13). Diese Mutation verhinderte eine Acinus S Phosphorylierung am Serin-Rest 422. Im Vergleich zu der Co-Expression der anderen Acinus S Varianten (Flag Acinus S und Flag Acinus S Ser422>Asp) resultierte die Überexpression von Acinus S Ser 422>Ala, in einer weniger erhöhten Vpr3 Menge. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte bei Anwesenheit des Inhibitors auch der zuvor beobachtete Spleißphänotyp wiederholt beobachtet werden (Abb.4.11.C, vgl. Spur 2 und 12). Dies deutet auf eine Relevanz des Serin-Restes bei der Acinus S Funktion innerhalb des ASAP-Komplexes hin.

Bei Detektion der D2b gespleißten mRNAs (#2710/#3392) ergab sich ein vergleichbares Bild. Auch hier führte die Überexpression von Acinus S und Acinus S Ser 422>Asp zu einer deutlichen Verschiebung der Transkripte in Richtung intronhaltiger mRNAs (Vif 1 [1.2E.5.7]). Dies war von der Inkubation mit dem Inhibitor unbenommen. Die Reproduktion des PI3K-Inhibitor Phänotyps war wie oben nur bei Co-Expression von Acinus S Ser 422>Ala möglich (Abb.4.11.C, vgl. Spur 2 und 12). Die Acinus S sowie die Acinus S Ser 422>Asp Überexpression hatte somit einen Effekt auf das alternative HIV-1 Spleißen, das sich vor allem in der Verschiebung der HIV-1 Transkripte in Richtung intronhaltiger mRNAs äußerte. Dieser Effekt war ebenfalls, jedoch in abgeschwächter Form, bei Co-Expression von Acinus S Ser 422>Ala zu beobachten. Des Weiteren konnten die Inhibitor spezifischen HIV-1 Spleißphänotypen, dargestellt durch die hier verwendeten Primer Paare nur im Falle der Acinus S Ser 422>Ala Überexpression reproduziert werden. Bezogen auf die Funktion von Acinus S innerhalb des ASAP-Komplexes sprechen diese Ergebnisse somit zunächst für eine Relevanz des Serin-Restes 422. Eine Aussage, ob bzw.

inwieweit Acinus S sowie der Serin-Reste 422 in den durch PI3K Inhibition geförderten Einschluss der HIV-1 Leader Exone involviert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden und bedarf daher weitere Untersuchungen.

### **4.4 Die PI3K Signalweg Modulation interferiert mit der HIV-1 Replikation**

Aufgrund der fehlenden Proofreading Aktivität der reversen Transkriptase und der damit verbundenen hohen Mutationsrate wirken viele anti-virale HIV-1 Threapeutika häufig nur für eine relativ kurze Zeit. Das HIV-1 Spleißen bietet hier ein alternatives Ziel für eine antivirale Therapie, da die korrekte Regulation des alternativen HIV-1 Spleißens für eine effiziente virale Replikation absolut essentiell ist (Stoltzfus, 2009). Verschiebungen innerhalb des HIV-1 Spleißmusters gehen häufig mit der verringerten Virus Replikation einher, da eine Veränderung der Verhältnisse der einzelnen viralen mRNAs eine veränderte virale Protein Expression bedingt. Dass die Virus Produktion durch selektive Hemmung oder Förderung des HIV-1 Spleißens inhibiert werden kann, konnte bereits mittels Mutationen, die die Nutzung des HIV-1 Spleißdonors D2 (und somit den Exon2 Einschluss) und die Erkennung des Exon3 beeinflussten, gezeigt werden (Exline *et al*, 2008; Madsen und Stoltzfus, 2005). Da die bisherigen Ergebnisse in Bezug auf die Inhibition des PI3K Signalwegs ebenfalls einen Einfluss auf den gemeinsamen Einschluss der Exone2/2b und 3 zeigten, war es für diese Arbeit von großem Interesse, den Einfluss der Signalweg Inhibition auch auf Ebene der Virus Replikation zu untersuchen. Des Weiteren wurde in der Literatur eine Beteiligung des PI3K Signalwegs an der viralen Transkription sowie der zellulären Translation beschrieben, was auch die Analyse dieser Prozesse im Rahmen der Arbeit interessant machte (Contreras *et al*, 2007; Wullschleger *et al*, 2006).

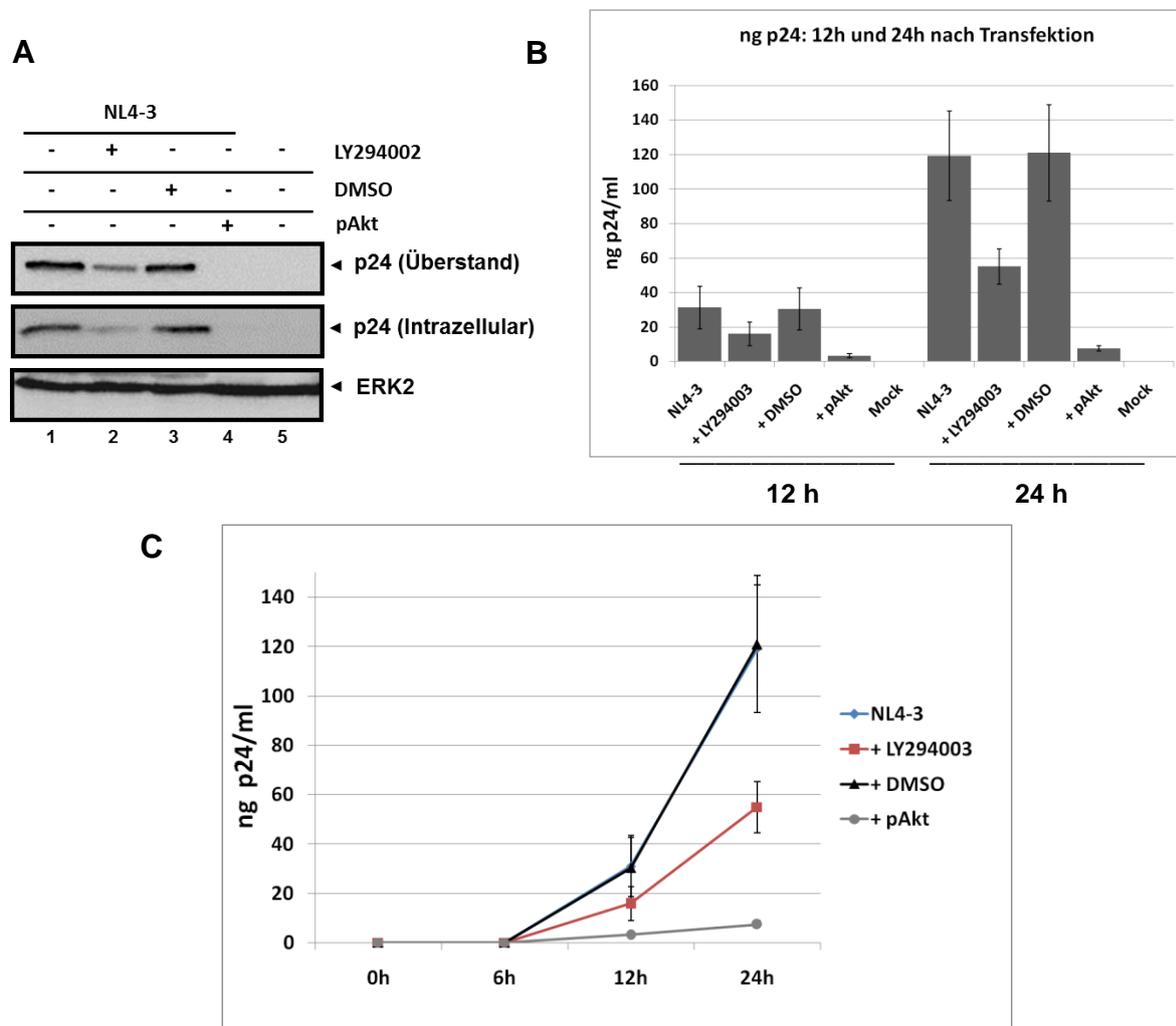
#### **4.4.1 Sowohl die PI3K Inhibition als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase haben einen negativen Einfluss auf die virale Replikation**

Die Untersuchung der viralen Replikation bei PI3K Inhibierung und pAkt Co-Expression wurde zum einen durch Immunblot Analysen und zum anderen mittels

## 4. Ergebnisse

der p24-ELISA Methode durchgeführt. Das virale Capsid-bildende Protein p24 diente hierbei als Maß für die Virus Menge.

Für die Immunblot Analysen wurden HEK 293T-Zellen mit pNL4-3 DNA transfiziert und entweder mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) co-transfiziert oder mit dem PI3K-Inhibitor oder DMSO inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und in Probenpuffer aufgenommen. Parallel wurde der Zellüberstand abzentrifugiert und das Pellet ebenfalls in Lysis- und Probenpuffer gelöst. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und die Durchführung des Immunblots, wobei ein Antikörper gegen das virale p24 Protein verwendet wurde.



**Abb. 4.12 Die PI3K Signalweg Modulation interferiert mit der viralen Replikation.**

HEK 293T-Zellen wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA (1 µg) sowie mit 1 µg des Expressionsplasmids für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert, mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) oder DMSO inkubiert und entweder 12 h (Immunblot) oder 0 h, 6 h, 12 h oder 24 h später geerntet (p24-ELISA). Aus dem Zellüberstand und den Zellen wurden anschließend die Proteine isoliert (Immunblot) oder die Zellüberstände für den p24-ELISA verwendet. In beiden Fällen fand der Nachweis des viralen p24 Proteins durch einen für dieses Protein spezifischen Antikörper statt (anti-HIV-1-p24 gag). Die Detektion von ERK2 diente als Ladekontrolle.

A: Immunblot Analyse des viralen Capsid-Proteins p24 als Standard für die virale Replikation bei pAkt Co-Expression und inhibierten (LY294002) PI3K Signalweg. B: Mengenangaben des p24 Proteins (in ng/ml) 12 h und 24 h nach Transfektion sowie (C) die Änderung der p24 Menge (in ng) über den Zeitraum von 24 h.

## 4. Ergebnisse

---

Sowohl die PI3K Inhibition als auch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase zeigten einen Einfluss auf die HIV-1 Replikation (Abb. 4.12.A). Während bei den mit pNL4-3 transfizierten unbehandelten sowie mit DMSO behandelten Zellen das virale p24 Protein intrazellulär sowie im Zellüberstand deutlich nachgewiesen werden konnte, war die Detektion im Falle der PI3K-Inhibitor Inkubation stark vermindert (Abb.4.12.A, vgl. Spur 1, 2 und 3). Interessanterweise konnte in pNL4-3 transfizierten Zellen bei zeitgleicher Überexpression der aktivierten Akt-Kinase in keiner der beiden Fraktionen p24 nachgewiesen werden (Abb.4.12.A, Spur 4).

Um diese Beobachtungen näher zu untersuchen, wurde eine Kinetik mit anschließendem p24-ELISA durchgeführt. Hierfür wurden die Zellüberstände mit HIV-1 transfizierter HEK 293T-Zellen nach 0, 6, 12 und 24 Stunden der Transfektion verwendet. Die Auswertung des ELISAs fand durch Messung der Extinktion bei 492 nm und der Konzentrationsbestimmung statt (siehe Methoden 3.3.6).

Auch hierbei konnte der Verlust der Virus Produktion verdeutlicht werden. Sowohl die Inhibition des PI3K Signalwegs als auch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase führten zu einer Abnahme der p24 Konzentration im Zellüberstand (Abb.4.12.B, C). Während das p24 Protein 6 Stunden nach Transfektion im Überstand noch nicht nachgewiesen werden konnte, stieg die p24 Konzentration nach 12 Stunden bei den mit pNL4-3 transfizierten unbehandelten und mit DMSO behandelten Zellen auf ca. 30 ng/ml an (Abb.4.12.B, C). Die Konzentration bei Anwesenheit des Inhibitors betrug zu diesem Zeitpunkt mit 15,8 ng/ml nur knapp die Hälfte, bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase mit 3,1 ng/ml sogar nur 1/10 dieser Menge. Nach 24 Stunden ergab sich ein ähnliches Bild. Im Falle der PI3K Inhibition betrug die Konzentration an p24 27,5 ng/ml, während die Proben mit pNL4-3 transfizierten unbehandelten und mit DMSO behandelten Zellen mit ca. 60 ng/ml die doppelte Menge an p24 aufwiesen (Abb.4.12.B, C). Im Vergleich dazu hatte die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase einen deutlich drastischeren Effekt auf die p24 Produktion. Während die Konzentration nach 12 Stunden 3,1 ng/ml betrug, stieg sie in den nächsten 12 Stunden lediglich auf 3,7 ng/ml an, was 1/16 der Menge der mit pNL4-3 transfizierten unbehandelten und mit DMSO behandelten Zellen entsprach (Abb.4.12.B, C).

Somit interferiert sowohl die PI3K Inhibition sowie die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase mit der HIV-1 Replikation. Hierbei war der Effekt der co-exprimierten aktivierten Akt-Kinase auf die Virus Produktion deutlich stärker ausgeprägt als die

der Signalweg Inhibition. Gründe hierfür könnten die bei PI3K Modulation hervorgerufenen Veränderungen des alternativen HIV-1 Spleißens sein. Weitere mögliche Eingriffe in den viralen Replikationszyklus durch PI3K wären Einflüsse auf die virale Transkription, Translation sowie den Rev-abhängigen mRNA Export.

### **4.4.2 Der PI3K Signalweg beeinflusst die HIV-1 LTR abhängige Luciferase Expression in TZM-bl Zellen**

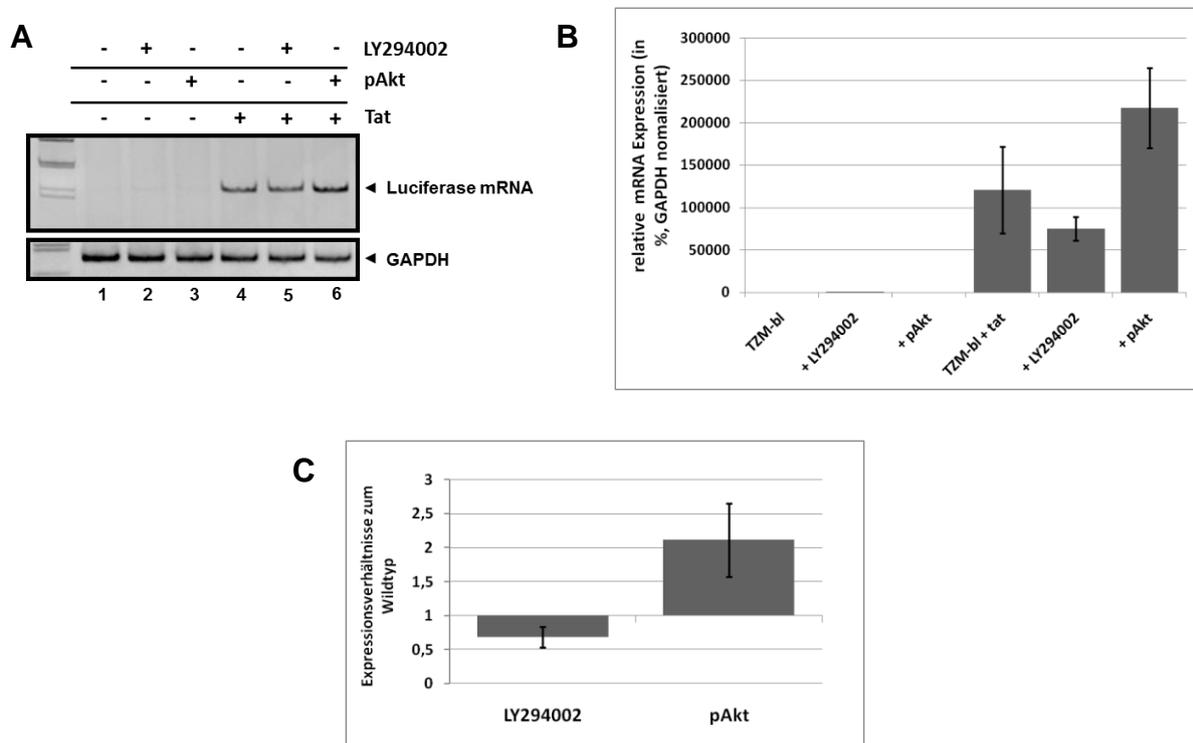
Es konnte gezeigt werden, dass der PI3K Signalweg bei der Re-Aktivierung der Virus Produktion nach der Latenzzeit in Makrophagen eine Rolle spielt, indem die Akt-Kinase die Aktivierung der HIV-1 Transkription beeinflusst (Contreras *et al*, 2007; Yik *et al*, 2003; 2005). Die Akt-Kinase ist hierbei in die Freisetzung des aktiven p-TEFb (Transkription Elongation Faktor b) Komplexes involviert, was letztlich die Bindung des Transkriptionsfaktors durch das regulatorische HIV-1 Protein Tat ermöglicht und damit die Rekrutierung von p-TEFb zum HIV- 1 Promotor. Hierdurch wird der RNA Polymerase II Komplex in einen prozessiven Elongationskomplex überführt (Karn, 1999).

In Anbetracht dessen sollten sowohl die Inhibition des PI3K Signalwegs als auch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase Effekte auf die virale Transkription zeigen. Um dies zu untersuchen, wurden TZM-bl Zellen verwendet. Diese Zellen besitzen eine Luciferase-Firefly Genkopie, die unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors steht. Unterschiede in der Transkription der Luciferase mRNA konnten daher mittels klassischer RT- sowie quantitativer real-time PCR (qPCR) nachgewiesen werden. Hierfür wurden TZM- bl Zellen wie gewohnt mit dem Inhibitor behandelt oder mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen in An- und Abwesenheit von SVctat untersucht. Die Detektion der Transkripte fand mittels Luciferase-Firefly spezifischer Primer statt. Bei der Durchführung der qPCR wurde die Menge der Luciferase auf die der GAPDH mRNAs normalisiert.

Sowohl die PI3K Inhibition als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase zeigten Effekte auf die HIV-1 Promotor-abhängige Luciferase Transkription. Während in Abwesenheit von Tat durch RT-PCR Analysen keine Luciferase mRNAs nachgewiesen werden konnten, war die Detektion in Gegenwart von Tat erwartungsgemäß möglich. Zwischen unbehandelten und PI3K-Inhibitor behandelten Zellen ließ sich allerdings kein nennenswerter Unterschied bezüglich der Luciferase

## 4. Ergebnisse

Expression beobachten. Hingegen war die Luciferase Expression bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase erhöht (Abb. 4.13.A, vgl. Spur 4, 5 und 6). Eine verringerte Luciferase Expression im Falle der PI3K Inhibition war erst nach Durchführung der qPCR detektierbar. Die Stimulation der Luciferase Transkription bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase ließ sich durch die qPCR untermauern (Abb. 4.12.B). Setzte man die Luciferase Expression der Inhibitor behandelten und der mit der aktivierten Akt-Kinase co-exprimierten Zellen ins Verhältnis zu der Expression der unbehandelten Zellen (bezogen auf die TZM-bl Zellen mit Tat Co-Expression), so stieg das Verhältnis im Falle der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase auf 2,1, während das Verhältnis bei Anwesenheit des Inhibitors auf 0,68 abnahm (Abb. 4.12.C).



**Abb. 4.13 Der PI3K Signalweg beeinflusst die Tat-abhängige Luciferase Expression in TZM-bl Zellen.**

TZM-bl Zellen wurden mit und ohne SVctat (0,5 µg) sowie mit dem Expressionsplasmid (1 µg) für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen 12 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um die Luciferase mRNA Expression zu untersuchen folgten RT- sowie real-time PCRs mit spezifischen Primern für die Luciferase Firefly Detektion.

A: Expression der Luciferase Firefly mRNA in Ab- und Anwesenheit von Tat sowie Aktivierung und Inhibierung des PI3K Signalwegs. B: Real-Time PCR Analyse der Luciferase mRNA Expression. Die Werte wurden auf GAPDH normalisiert und geben die relative mRNA Expression bezogen auf TZM-bl Zellen ohne Tat Expression wieder. C: Verhältnisse der Luciferase mRNA Expression von LY294002 und pAkt behandelten Zellen bezogen auf TZM-bl Zellen mit Tat Co-Expression (hier als Wildtyp bezeichnet).

Diese Ergebnisse spiegeln somit erwartungsgemäß einen stimulativen Effekt der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase sowie einen inhibitorischen Effekt der Signalweg Inhibition auf die Luciferase Transkription in TZM-bl-Zellen wider und

bestätigen den in der Literatur beschriebenen Einfluss des PI3K Signalwegs auf die HIV-1 Promotor Aktivität. Des Weiteren könnte dieser Effekt eine Erklärung für die Interferenz mit der viralen Replikation liefern.

### **4.4.3 Der PI3K Signalweg beeinträchtigt die Produktion der viralen mRNA-Klassen**

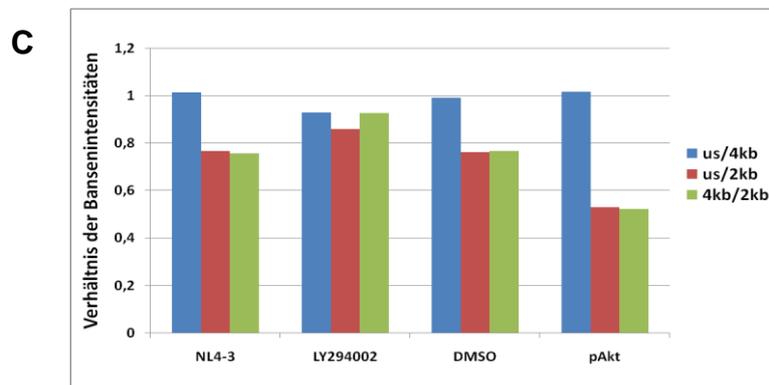
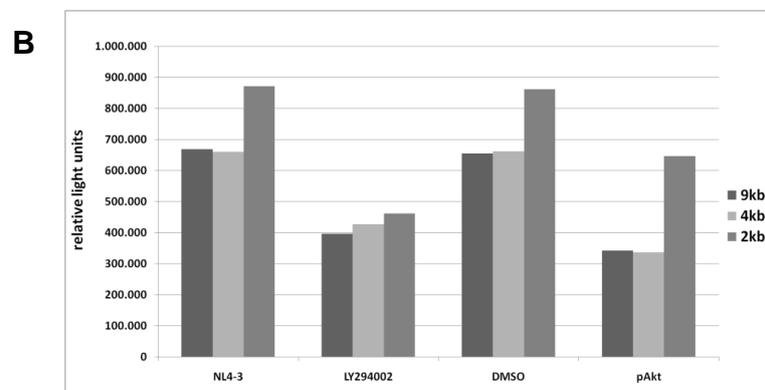
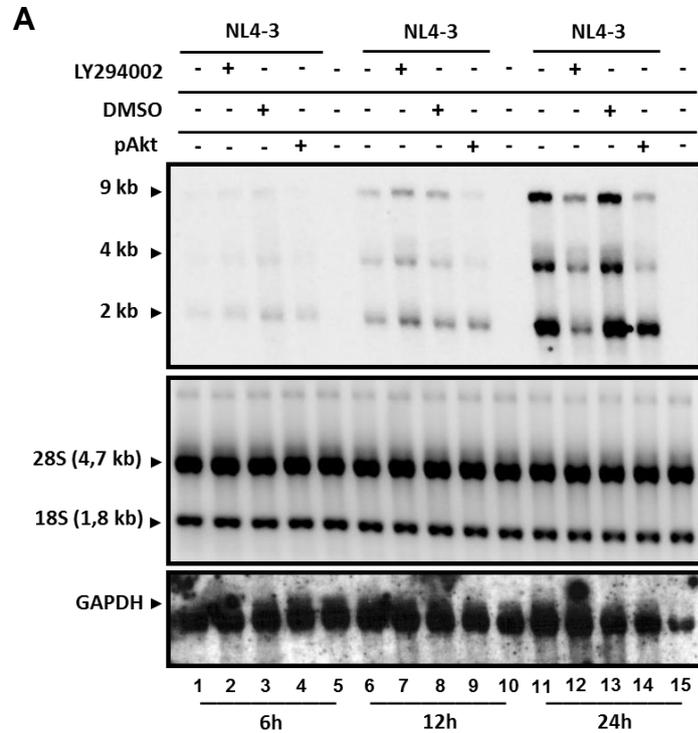
Innerhalb der viralen 2- und 4-kb mRNA Klassen erlaubten die bisher durchgeführten RT-PCRs nur eine Aussage über qualitative Unterschiede zwischen PI3K Inhibition, Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase und dem Wildtyp (NL4-3). Angaben über quantitative Unterschiede konnten bisher nicht gemacht werden. Wie unter 4.4.2 gezeigt, stört die Anwesenheit des PI3K Inhibitors die LTR abhängige Luciferase Transkription, während die Überexpression von pAkt einen fördernden Einfluss auf die mRNA Produktion aufwies. Um zu analysieren, inwieweit bzw. ob die Modulation des PI3K Signalwegs die Entstehung der verschiedenen HIV-1 mRNA Klassen beeinflusst, wurde ein Northern Blot durchgeführt. Hierfür wurde eine Digoxigenin markierte RNA-Sonde unter Verwendung der Primer #3387/#3388 hergestellt, die mit dem HIV-1 Exon 7 hybridisierte (Exon 7 ist in allen viralen mRNAs enthalten). Eingesetzte mRNAs stammten aus dem Versuchsteil 4.4.1. und wurden 6, 12 oder 24 Stunden nach Transfektion isoliert. Die Detektion der HIV-1 mRNAs fand mit einem anti-Digoxigenin Antikörper statt. Der Nachweis der ribosomalen 28S und 18S RNAs sowie die Detektion von GAPDH dienten als Kontrolle.

Sowohl die Inhibition von PI3K als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase zeigten deutliche Effekte auf die 2-, 4- und 9 (ungespleißt: us)-kb mRNA Klassen. Während 6 Stunden nach Transfektion die drei HIV-1 mRNA Klassen nur schwach nachgewiesen werden konnten, waren nach 12 Stunden bereits erste Einflüsse der PI3K/Akt Modulation zu beobachten (Abb.4.14.A, Spuren 6-10). Die Signalweg Inhibition zeigte im Vergleich zum Wildtyp und DMSO behandelten Zellen eine leicht erhöhte Expression der drei mRNA Klassen (Abb.4.14.A, vgl. Spur 6, 7 und 8). Die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase resultierte dagegen in einer deutlichen Abnahme vor allem der 4- und 9-kb mRNAs (Abb.4.14.A, Spur 9).

Nach 24 Stunden waren die Effekte noch ausgeprägter. Die Inhibition des PI3K Signalwegs zeigte hier deutlich verringerte Mengen der mRNAs aller drei Klassen (Abb.4.14.A, Spur 12). Im Falle der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase hingegen war speziell die Klasse der intronlosen 2-kb mRNAs deutlich weniger betroffen (Abb.

## 4. Ergebnisse

4.14.A, Spur 14). Dies lässt darauf schließen, dass der Rev-abhängige nukleare mRNA Export durch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase negativ beeinflusst zu sein scheint.



## 4. Ergebnisse

---

### **Abb. 4.14 Der PI3K Signalweg beeinflusst die Produktion der viralen mRNA-Klassen.**

HEK 293T-Zellen wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA sowie dem Expressionsplasmid der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) (je 1 µg) transfiziert oder mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde 6 h, 12 h und 24 h nach der Transfektion isoliert und die HIV-1 mRNA Klassen mittels eines Northern Blots analysiert. Der Nachweis der mRNA-Klassen wurde hierbei mit einer im HIV-1 Exon7 bindenden Digoxigenin gekoppelten RNA Sonde und einem anti-Digoxigenin Antikörper (anti-Digoxigenin AP, Fab Fragments Antikörper) durchgeführt.

A: Northern Blot zur Detektion der HIV-1 mRNA-Klassen bei PI3K/Akt Modulation. Die jeweiligen RNA-Klassen sind links neben der Abbildung gekennzeichnet. Der Nachweis der ribosomalen RNAs sowie die Detektion von GAPDH dienten als Ladekontrolle. B: Ergebnis der mRNA Klassen Bandenintensitätsmessungen für die jeweiligen Proben. Die Bandenintensitäten sind in relativen Lichteinheiten angegeben (relative light units). C: Verhältnisse der HIV-1 mRNA Klassen zueinander bezogen auf die Bandenintensitäten.

Einen detaillierteren Einblick lieferten die Messungen der jeweiligen RNA-Bandenintensitäten (Image J) (Abb.4.14.B). Mit diesen Daten wurden exemplarisch und repräsentativ für andere Northern Blots die Verhältnisse der Bandenintensitäten zueinander ermittelt. Beim Wildtyp (NL4-3) dominierten hier die mRNAs der 2- gegenüber denen der 9 (us)- und 4-kb Klassen (Abb. 4.14.C; Verhältnisse: 0,76 für us/2kb; 0,75 4kb/2kb). Die 9 (us)- und 4-kb Klassen RNAs waren hierbei zu relativ gleichen Teilen exprimiert (1,01 us/4kb). Diese Verhältnisse wurden durch die DMSO Zugabe nicht verändert. Im Falle der PI3K Inhibition sank das Verhältnis us/4kb leicht auf 0,92, was durch eine etwas höhere Expression der 4-kb mRNAs gegenüber der 9 (us)-kb Klasse hervorgerufen wurden. Die Verhältnisse us/2kb und 4kb/2kb stiegen dagegen auf 0,86 und 0,92 an, was dafür spricht, dass relativ gesehen, die mRNAs der 9 (us)- und 4-kb Klasse im Vergleich zum Wildtyp weniger Abnahmen als die der 2-kb Klasse (Abb.4.14.C). Bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase blieb das Verhältnis us/4kb mit 1,02 im Vergleich zum Wildtyp konstant, wohingegen die Verhältnisse us/2kb und 4kb/2kb auf 0,53 und 0,52 abnahmen, was eine deutlich stärkere Abnahme der 9 (us)- und 4-kb mRNAs im Vergleich zur denen der 2-kb Klasse bedeutete (Abb.4.14.C).

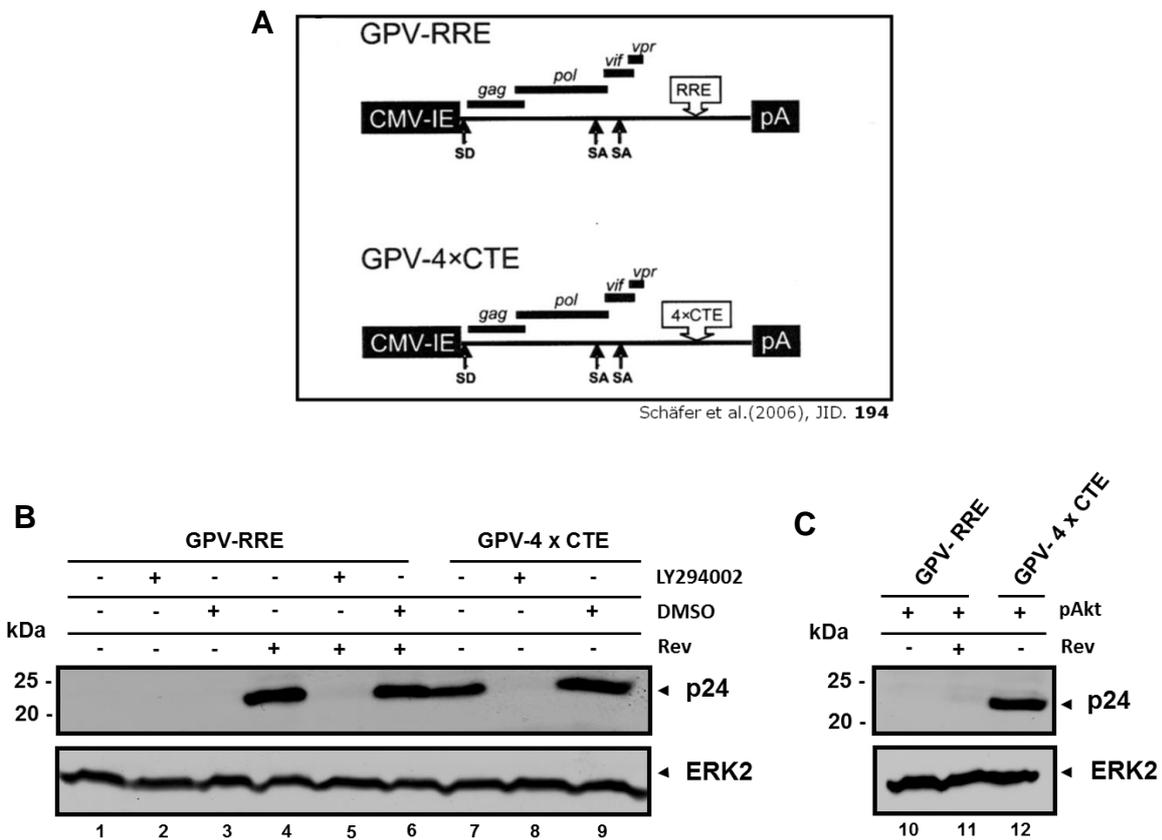
Sowohl die Inhibition von PI3K als auch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase hatten somit negative Effekte auf die Produktion der HIV-1 mRNA Klassen. Der negative Einfluss bei PI3K-Inhibitor Inkubation bestand dabei aus der Abnahme aller drei mRNA-Klassen. Hier könnten durch die PI3K Inhibition bedingte Einflüsse auf die virale Transkription sowie das HIV-1 Spleißen eine Rolle spielen. Bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase waren dagegen vor allem die intronhaltigen mRNAs der Rev-abhängigen 9- und 4-kb Klasse betroffen, während der Verlust der 2-kb Transkripte relativ moderat war. Dies deutet auf eine Interferenz der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase mit dem Rev-abhängigen mRNA Export hin.

### **4.4.4 Die PI3K Signalweg Modulation interferiert mit dem Rev-abhängigen nuklearen Export viraler mRNAs**

Da intronhaltige mRNAs im Zellkern zurück gehalten werden (Izaurralde und Mattaj, 1995), ist der Export der viralen ungespleißten (9-kb) und intronhaltigen (4-kb) RNA Klassen vom regulatorischen Rev Protein abhängig. Das HIV-1 Transaktivator Protein Rev (Rev wird von Transkriptisofomen der Klasse der 2-kb mRNAs gebildet) bindet das in der Env kodierenden Region lokalisierte Rev Response Element (RRE) und vermittelt so den Export der 9- und 4-kb mRNA Klassen aus dem Kern ins Cytoplasma (Daly, *et al*, 1989; Fischer, *et al*, 1995; Fornerod, *et al*, 1997). Rev interagiert hierbei mit CRM1 (Exportin1), dem für den nuklearen Proteinexport verantwortlichen Export Rezeptor. Weiter fungiert der eukaryotische Initiations Faktor 5A (eIF-5A) in diesem Zusammenhang als Co-Faktor (Ruhl *et al*, 1993; Elfgang *et al*, 1999; Hoffmann *et al*, 2001).

Die Northern Blot Analysen ließen aufgrund der starken Abnahme der viralen 9- und 4-kb Klassen bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase vermuten, dass der PI3K Signalweg in den Rev-abhängigen Export eingreift. Um diese Hypothese zu testen wurde sowohl ein Rev- als auch ein CTE-abhängiges Reporter Konstrukt bei PI3K/Akt Modulation verwendet (Abb.4.15.A). Beim letztgenannten handelt es sich dabei um das Constitutive Transport Element (CTE) des Mason-Pfizer Monkey Virus. Das für diese Art von Analysen oft eingesetzte CTE-Element wird durch den zellulären mRNA Export Rezeptor NXF1/TAP gebunden und ermöglicht so den nuklearen Transport intronhaltiger viraler mRNAs in das Cytoplasma (Wodrich *et al*, 2000; Izaurralde, 2004). Der intronhaltige mRNA Export der Konstrukte war somit von zwei unterschiedlichen Exportwegen (Proteinexport: CRM1; mRNA Export: NXF1/TAP) abhängig und ermöglichte so die Analyse der PI3K Beteiligung am Rev abhängigen Export.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.15 Die PI3K Signalweg Modulation hat einen negativen Einfluss auf den Rev-abhängigen nuklearen Export intronhaltiger mRNAs.**

HeLa-Zellen wurden mit je 1 µg der Reporterkonstrukte GPV-RRE und GPV-4xCTE sowie dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase (pAkt) transfiziert. Des Weiteren fand die Transfektion des GPV-RRE Konstrukts mit und ohne pcRev statt. Zellen wurden dann für 12 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294003 (50 µM) oder DMSO inkubiert und anschließend die Proteine isoliert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transfiziert. Der Antikörper war gegen das virale Capsid-Protein p24 (anti-HIV-1-p24 gag) gerichtet. Die Detektion von ERK2 diente als Ladekontrolle.

A: Schematischer Aufbau der Reporterkonstrukte. Beide Reporter enthielten den Gag-Pol Leserahmen sowie eine CMV Promotor und ein Polyadenylierungssignal. GPV-RRE wies ein RRE, GPV-4xCTE vier Tandem Wiederholungen des CTE Elements auf. SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor. Detektion des viralen p24 Proteins bei PI3K Inhibition (B) und Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase (C) in Abhängigkeit des Rev- und CTE-abhängigen mRNA Exports.

Da die Konstrukte den Gag-Pol Leserahmen sowie entweder das HIV-1 RRE (GPV-RRE) oder 4 Tandem Kopien des CTE Elements (GPV-4xCTE) enthielten (Schäfer *et al*, 2006) (Abb.4.15.A), konnte der Export ungespleißter viraler mRNA anhand von Immunblots untersucht werden. Der verwendete Antikörper war hierbei gegen das virale Capsid Protein p24 gerichtet. Unter den beschriebenen Umständen war eine Translation und somit Detektion des p24 Proteins nur bei Export der ungespleißten mRNA (codiert für p24) ins Cytoplasma möglich. Um den mRNA Export beim GPV-RRE Konstrukt zu zulassen, war weiterhin die Co-Transfektion des Rev Expressionsvektors pcRev nötig.

Im Falle des Rev-abhängigen Konstrukts (GPV-RRE) war erwartungsgemäß das virale p24 Protein nur bei Co-Expression von Rev nachzuweisen. Hier konnte für

nicht- und mit DMSO behandelte Zellen ein starkes p24 Signal detektiert werden (Abb.4.14.B, vgl. Spuren 4 und 6). Im Gegensatz dazu konnte das p24 Protein in Anwesenheit des PI3K-Inhibitors nicht nachgewiesen werden (Abb.4.14.B, Spur 5). Dies war jedoch auch bei Verwendung des CTE-abhängigen Konstrukts (GPV-4xCTE) nicht möglich (Abb.4.15.B; Spur 8). Während auch hier nicht- und mit DMSO behandelte Zellen ein deutliches p24 Signal zeigten, konnte das p24 Protein bei PI3K Inhibition nicht detektiert werden.

Auch bei Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase war beim Rev-abhängigen GPV-RRE Konstrukt ein p24 Nachweis nicht möglich (Abb.4.15.C, Spur 11). Anders verhielt es sich jedoch beim CTE-abhängigen Reporter (GPV- 4xCTE). Hier konnte das p24 Protein deutlich detektiert werden (Abb.4.15.C; Spur 12).

Sowohl die Inhibition des PI3K Signalwegs als auch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase störten somit den Rev-abhängigen Export massiv. Die p24 Detektion war bei PI3K Inhibition sowohl für das Rev- als auch für das CTE-abhängige Konstrukt nicht möglich, was darauf schließen lässt, dass die PI3K Inhibition entweder mit beiden Exportwegen interferiert oder an anderer Stelle die p24 Protein Expression stört. Da bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase der CTE-abhängige Export nicht betroffen war, deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase tatsächlich den Rev-abhängigen Export zu blockieren scheint. Hierbei könnten Effekte auf Rev selbst oder aber auch auf Co-Faktoren des Exports verantwortlich sein.

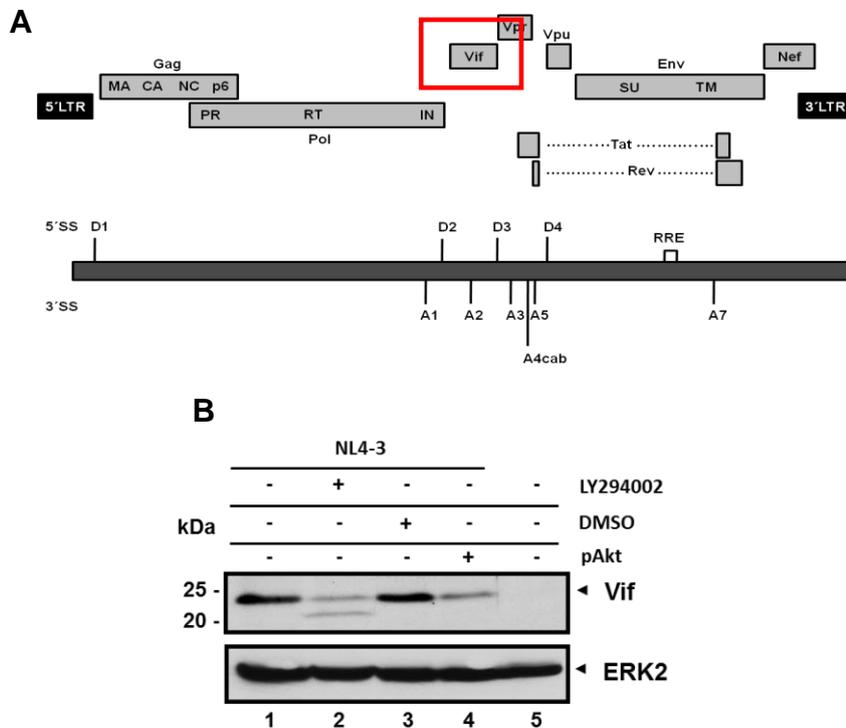
### **4.4.5 Die PI3K Signalweg Modulation beeinflusst die Expression des akzessorischen HIV-1 Proteins Vif**

Die mRNA des 23 kDa großen akzessorischen HIV-1 Proteins Vif gehört zur Rev-abhängigen Klasse der 4-kb mRNAs. Das Phosphoprotein Vif antagonisiert den Wirtsrestriktionsfaktor APOBEC und übernimmt somit eine Rolle bei der effektiven viralen Replikation (zusammengefasst in Wissing *et al*, 2010; Yang *et al*, 1996; Yang und Gabuzda, 1998).

Da die PI3K Modulation deutliche Effekte auf den Rev-abhängigen mRNA Export sowie auf die virale Replikation zeigte und weiter im Falle der PI3K Inhibition eine erhöhte Vif Expression beobachtet werden konnte (siehe Abb.4.4.D), stellte sich die Frage, inwieweit der PI3K Signalweg die Vif Expression auf Protein Ebene beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wurden mit der proviralen pNL4-3 DNA

## 4. Ergebnisse

transfizierte HEK 293T-Zellen entweder und dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase co-transfiziert oder mit dem PI3K-Inhibitor behandelt. Es folgte die Lyse der Zelle und die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Für die Immunblot Analysen wurde ein Antikörper gegen das virale Vif-Protein verwendet.



**Abb. 4.16 Der PI3K Signalweg beeinflusst die Vif-Protein Expression.**

$2,5 \times 10^5$  mit pNL4-3 DNA und dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfizierte sowie PI3K-Inhibitor (LY294002, 12 h) oder DMSO behandelte HEK 293T-Zellen wurden lysiert, die Proteine isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Inkubation mit einem Antikörper, der gegen das virale Protein Vif gerichtet war (anti-HIV-1-Vif Antiserum). Der Nachweis von ERK2 diente als Ladekontrolle.

A: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms mit den offenen Leserahmen für die viralen Proteine sowie die Angaben der HIV-1 Spleißstellen (unterer Abschnitt der Abbildung). Der Leserahmen für das Vif-Protein ist mit einem roten Kästchen markiert. [(MA= Matrix; CA= Capsid; NC= Nukleocapsid; PR= Protease; RT= reverse Transkriptase; IR= Integrase; SU= Surface (gp120); TM= Transmembran (gp41)]. B: Immunblot mit Detektion des viralen Vif Proteins bei PI3K Modulation.

Im Vergleich zu den mit pNL4-3 DNA transfizierten unbehandelten und mit DMSO behandelten Zellen zeigte sowohl die Anwesenheit des PI3K-Inhibitors als auch die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase einen deutlich verringerten Nachweis des Vif-Proteins auf Höhe von ca. 23 kDa (Abb.4.16.B, Spuren 2 und 4). Interessanterweise konnte für die PI3K Inhibition mit dem Vif Antikörper noch ein weiteres Protein auf Höhe von ca. 21 kDa detektiert werden, welches bei den anderen Proben nicht nachzuweisen war (Abb.4.16.B, Spur 2).

Die PI3K/Akt Modulation hat somit eine verringerte Vif-Protein Expression zur Folge. Im Falle der Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase ist dies vermutlich durch den Einfluss auf den Rev-abhängigen Export zu erklären, während bei PI3K Inhibition die

Interferenz mit der viralen Transkription sowie eventuell mit der Translation eine Rolle spielen könnte. Des Weiteren könnte es sich bei dem Protein unterhalb von Vif um eine durch die PI3K Inhibitions-bedingte Änderung des alternativen Spleißens generierte trunkierte Vif Variante oder aber um das dephosphorylierte Vif-Protein handeln.

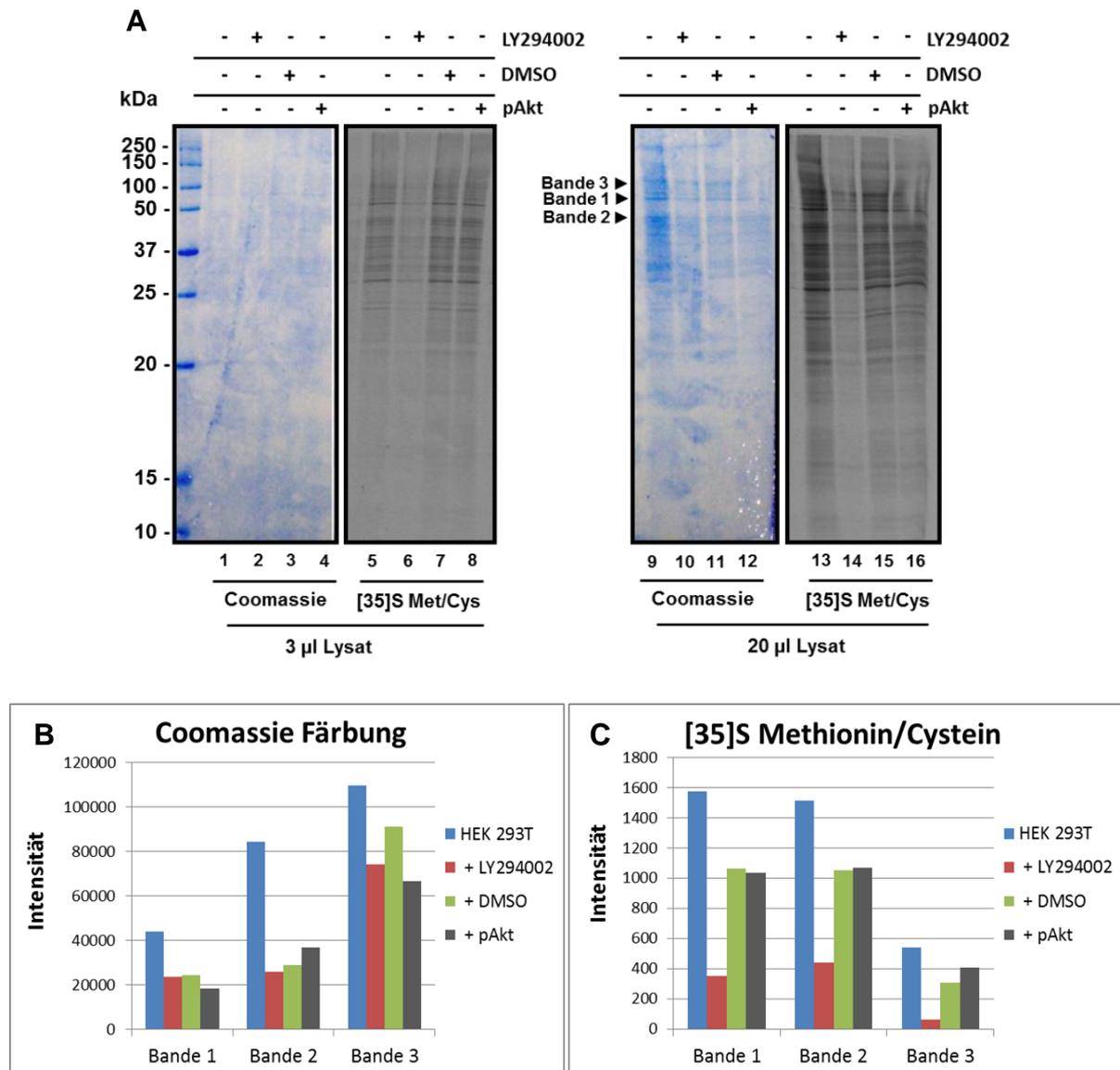
### **4.4.6 Die PI3K Inhibition beeinträchtigt die zelluläre Translation in HEK 293T-Zellen**

Neben der Beteiligung des PI3K Signalwegs an der Phosphorylierung spleißregulatorischer Proteine greift dieser auch in die Regulation der zellulären Translation ein. Die Akt-Kinase aktiviert hierbei den mTOR-Komplex 1, der die Initiation und Elongation der Proteinbiosynthese sowie der Ribosomen Biogenese fördernd beeinflusst (Wullschleger *et al*, 2006). Im Zusammenhang mit den Auswirkungen auf die Virus Replikation und um zu klären, ob der Effekt der PI3K Inhibition auf die Vif-Protein Expression eventuell auf eine Beeinflussung der viralen bzw. zellulären Translation zurückgeführt werden kann, wurde daher der Effekt der PI3K/Akt Modulation auch auf die zelluläre Translationsmaschinerie analysiert.

Hierfür wurden HEK 293T-Zellen in Ab- und Anwesenheit des PI3K-Inhibitors über Nacht mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein inkubiert. Des Weiteren wurden HEK 293T-Zellen mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Proteine von zwei unterschiedlichen Mengen an Zelllysaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte die Färbung des Gels mit Coomassie, das Trocknen des Gels und die Visualisierung der mit [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein markierten Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilms.

Die PI3K Inhibition zeigte eine Interferenz mit der zellulären Translation (Abb.4.17.A). Auch wenn die Beladung des Gels mit Proteinen zum Teil ungleichmäßig war (Abb.4.17.A, rechts; Coomassie Färbung, 20µl Lysat), zeigten die mit dem Inhibitor behandelten Zellen dennoch einen deutlichen Verlust an neu synthetisierten Proteinen (Abb.4.17.A, vgl. Spuren 6 und 14 mit 5 und 13). Die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase wies hier allerdings keinen Einfluss auf (Abb.4.17.A, vgl. Spuren 8 und 16 mit 5 und 13).

## 4. Ergebnisse



**Abb.4.17 Die PI3K Inhibition interferiert mit der zellulären Translation.**

2,5 x 10<sup>5</sup> HEK 293T-Zellen wurden über Nacht in An- und Abwesenheit des PI3K-Inhibitors LY294002 oder DMSO mit 50 µCi/ml radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein inkubiert. Des Weiteren wurden Zellen mit dem Expressionsplasmid für die aktivierte Akt-Kinase transfiziert. Es folgte die Lyse der Zellen und Isolierung der Proteine. Die Auftrennung der Proteine wurde durch eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei das Gel zum einen mit 3 µl und zum anderen mit 20 µl des Proteinlysats beladen wurde. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

A: Darstellung der Coomassie gefärbten Gele sowie die Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Die Gele wurden entweder mit 3 µl oder 20 µl des Zelllysats beladen. Intensitätsmessung dreier ausgesuchter Banden bei (B) Coomassie Färbung und (C) radioaktiver Markierung für die jeweiligen Proben. Die Messung wurde durch einen Phosphor-Screen vorgenommen und mit der Aida Image Analyser Software der Firma Raytest ausgewertet.

Bestätigt wurde dies durch die Intensitätsmessung dreier ausgewählter Protein Banden bei Coomassie Färbung und [<sup>35</sup>S] Methionin und Cystein Markierung (Phosphor-Screen, Auswertung durch die Aida Image Analyser Software der Firma Raytest). Während die erste Probe (293T, 20µl Lysat, Abb.4.17.A, rechts) aufgrund der zu hohen Proteinbeladung außer Acht gelassen wurde, war die Beladung mit Proteinen bei Inhibitor (Spur 10) und DMSO (Spur 11) behandelten sowie mit der aktivierten Akt-Kinase co-exprimierten Zellen (Spur 12) relativ vergleichbar

## 4. Ergebnisse

---

(Coomassie Färbung, Abb.4.17.B). Die Intensität der untersuchten radioaktiven Banden ergab jedoch einen deutlichen Verlust dieser Proteine bei Anwesenheit des Inhibitors, während sich die Bandenintensitäten zwischen den mit der aktivierten Akt-Kinase co-transfizierten sowie mit DMSO behandelten Zellen nicht sonderlich voneinander unterschieden (Abb.4.17.C).

Neben den Effekten auf das virale alternative Spleißen, die LTR Promotor Aktivität und dem mRNA Export, zeigte die Inhibition des PI3K Signalwegs somit auch einen deutliche Repression der zellulären Translation. Dieser Effekt könnte ebenfalls die Interferenz mit der viralen Replikation erklären. Es ist daher zu vermuten, dass die Summe der oben aufgeführten PI3K Inhibitions-Effekte für die verminderte Virus Produktion verantwortlich ist.

## 5. Diskussion

### 5.1 Der PI3K Signalweg beeinflusst das alternative HIV-1 Spleißen

Der PI3K Signalweg konnte bereits mit der Regulation des zellulären alternativen Spleißens in Verbindung gebracht werden (Patel *et al*, 2001; 2005; Blaustein *et al*, 2004; 2005; Liu *et al*, 2003; Zhou *et al*, 2012) und wird zudem durch HIV-1 während der Infektion moduliert (Linnemann *et al*, 2002; Wolf *et al*, 2001). Da diese unterschiedlichen Beobachtungen bisher noch nicht in Zusammenhang gebracht wurden, war das Ziel dieser Arbeit den Einfluss des PI3K Signalwegs auf das alternative HIV-1 prä-mRNA Spleißen zu untersuchen.

#### 5.1.1 Die Inhibition des PI3K Signalwegs hemmt die Nutzung viraler Spleißstellen in HIV-1 basierten Reporterkonstrukten

Zunächst wurde unter Verwendung des HIV-1 basierten drei-Exon-zwei-Intron Konstrukts (LTR ds Ex2) (Kammler *et al*, 2006) der Einfluss der Inhibition des PI3K Signalweges auf das alternative HIV-1 Spleißen analysiert. Die Gegenwart des PI3K-Inhibitors führte hauptsächlich zu einer Inaktivierung des Spleißakzeptors A1, was mit einer deutlichen Verschiebung zu mehr ungespleißter Reporter mRNA verbunden war (Abb.4.2.C). Da der Spleißakzeptor A1 des HIV-1 Exons2 durch den SRSF4-abhängigen (ESE-Vif) exonischen Spleißenhancer (ESE) aktiviert wird (Exline *et al*, 2008), könnte es sein, dass durch die PI3K Inhibition SRSF4 nicht phosphoryliert wird und somit der ESE-Vif inaktiv bliebe. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass die PI3K Inhibition die SRSF4 Phosphorylierung reduziert und damit die Expression der alternativ gespleißten Variante des humanen Tissue Factors (TF) beeinträchtigt (Eisenreich *et al*, 2009). Des Weiteren konnte auch ein PI3K inhibitionsbedingter Exon Ausschluss für das alternative  $\beta$ II Exon der Protein Kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ) sowie des alternativen Fibronektin EDA Exons nachgewiesen werden. Der Einschluss dieser beiden Exone wird durch die Akt-abhängige Phosphorylierung der SR-Proteine SRSF1, SRSF7 (EDA Exon) und SRSF5 ( $\beta$ II Exon) reguliert (Patel *et al*, 2001; 2005; Blaustein *et al*, 2004; 2005). Da das HIV-1 Exon2, neben dem ESE-Vif, noch einen weiteren SRSF1-abhängigen exonischen Spleißenhancer (ESEM) enthält (Kammler *et al*. 2006) könnte im Fall des HIV Spleißreporters die Verschiebung hin zur ungespleißten RNA auch auf der Nicht-Aktivierung beider *cis*-

wirkender spleißregulatorischer Elemente, dem ESE-Vif und ESEM beruhen. Hinweise hierauf lieferten die Ergebnisse, die mit dem drei-Exon-zwei-Intron Konstrukt (LTR ds Ex2  $\Delta$  M1) (Kammler *et al*, 2006) erbracht wurden, bei dem das ESEM1 mutiert ist. Die Mutation der SRSF1 Bindestelle resultierte hier ebenfalls in einer Zunahme ungespleißter Transkripte, die durch Zugabe des PI3K-Inhibitors noch deutlich gesteigert wurde (Abb.4.2.C). Da die ESEM1 Mutation allerdings nicht denselben Spleißphänotyp zeigte wie der Spleißreporter ohne Mutation und Zugabe des PI3K-Inhibitors, spricht dieses Ergebnis dafür, dass nicht nur der SRSF1-abhängige ESEM sondern auch der SRSF4-abhängige ESE-Vif durch die PI3K Inhibition gehemmt wird. Des Weiteren lässt die deutlich erhöhte Abundanz ungespleißter Transkripte durch Zugabe des Inhibitors vermuten, dass die PI3K Inhibition auch die Spleißstellen-Erkennung der flankierenden Exons hemmt, wobei auch hier eine Akt-abhängige Beeinflussung der SR-Protein Phosphorylierung einen Erklärungsansatz liefert. Darüber hinaus zeigte sich der Phänotyp der Nicht-Erkennung von HIV-1 Spleißstellen bei PI3K Inhibition nicht nur bei den drei-Exon-zwei-Intron Konstrukten sondern auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten subgenomischen HIV-1 basierten Konstrukt LTR 4cab wt (Abb.4.3.A).

Die Tatsache, dass in den für die Minigenexperimenten verwendeten HeLa-Zellen eine deutliche Reduktion phosphorylierter SR-Proteine bei PI3K Inhibition nachgewiesen werden konnte (Abb.4.1.A,B), spricht für einen damit einhergehenden Verlust der Spleißstellenerkennung. Auf der anderen Seite zeigte die Co-Expression der aktivierten Akt-Kinase (pAkt) in der Western Blot Analyse keine Veränderung der SR-Protein Phosphorylierung. Da in der HeLa Zellkultur aufgrund der hohen Menge an Wachstumsfaktoren im Zellmedium ohnehin eine erhöhte Abundanz phosphorylierter SR-Proteine zu erwarten ist, wäre es möglich, dass diese auch durch Zugabe einer aktivierten Kinase nicht noch weiter gesteigert werden konnte. Außerdem bleibt zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Arbeit ein Plasmid verwendet wurde, das die aktivierte Akt Isoform1 exprimiert. Da in der Literatur oft die Akt Isoform2 im Zusammenhang mit der SR-Protein Phosphorylierung genannt wird (Patel, *et al*. 2001; 2005; Jiang *et al*, 2009), bleibt zu klären, in welchem Maße die verschiedenen Akt Isoformen in die SR-Protein Phosphorylierung involviert sind. Tatsächlich ist zurzeit noch nicht hinreichend geklärt, wie sich die drei Akt Isoformen bezüglich ihrer Funktionen unterscheiden (Santi und Lee, 2010; Heron-Milhavet *et al*, 2011; Hers *et al*, 2011). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Akt Isoform2 im

Hinblick auf die SR-Protein Phosphorylierung eine größere Rolle spielt als die Isoform1 und mit der Verwendung der Akt Isoform2 diesbezüglich daher deutlichere Einflüsse hätten zeigen lassen.

Die Reduktion der SR-Protein Phosphorylierung im Falle der PI3K Inhibition bietet somit einen plausiblen Erklärungsansatz für die Zunahme der intronhaltigen mRNAs in Anwesenheit des PI3K-Inhibitors. Durch ihre Bindung an Exonic Splicing Enhancern (ESEs) fördern die SR-Proteine die Rekrutierung und Stabilisierung des U1 snRNPs an die 5' ss. Hierbei interagieren die SR-Proteine mit der U1-70K Untereinheit des U1 snRNPs (Eperon *et al*, 1993; Jamison *et al*, 1995; Kohtz *et al*, 1994). Für diese Interaktion ist allerdings ein bestimmter Phosphorylierungsstatus der SR-Proteine nötig (Misteli, 1999; Graveley, 2000). Ist die SR-Protein Phosphorylierung in Folge der PI3K Inhibition gestört, würde die Rekrutierung und Stabilisierung des U1 snRNPs an die 5' ss beeinträchtigt oder verhindert und die Spleißstelle damit nicht genutzt werden. Ähnlich könnte an der 3' ss die SR-Protein-vermittelte Bindung von U2AF35 und damit die Rekrutierung des U2 snRNPs reprimiert sein (Tarn und Steitz., 1995; Wu und Maniatis, 1993). Die Tatsache, dass die Akt-Kinase mit der SRSF1, 2, 4, 5, 6 und 7 Phosphorylierung in Verbindung gebracht werden konnte, würde diese Theorie unterstützen, da all diese SR-Proteine an der Regulation des HIV-1 alternativen Spleißens beteiligt sind (z.B. fördert SRSF2 durch Bindung des ESE2 die A3 Nutzung während SRSF1 durch Bindung des ESEM und des GAR Elements die A1, D2 und D4 Nutzung fördert; zusammengefasst in Stoltzfus, 2009).

Die Inhibition des PI3K Signalwegs könnte aber allerdings nicht nur mit der SR-Protein Phosphorylierung interferieren, sondern auch mit der Phosphorylierung anderer Proteine die RS-Domänen besitzen und somit zu einem späteren Zeitpunkt in die Spleißosomen-Assemblierung eingreifen. Zu diesen Spleißosom assoziierten Proteinen, die RS-Domänen aufweisen, zählen beispielsweise die Spleißfaktoren U2AF, SRm160, SRm300 oder das U1-70 K, eine Untereinheit des U1 snRNPs das zwei RS Domänen trägt und an mehreren Serin-Resten phosphoryliert werden kann. *In vitro* ist sowohl die Phosphorylierung der ersten RS-Domäne von U1-70K als auch die von SRSF1 für deren Interaktion nötig (Cao *et al*, 1998; Xiao *et al*, 1998). Wird nun spekuliert, dass der PI3K Signalweg nicht nur die Phosphorylierung von SRSF1, sondern auch unmittelbar (oder indirekt) die der RS-Domäne von U1-70K reguliert, so wäre die Spleißosom-Assemblierung gestört. Dies wiederum hätte die

Spleißinhibition zur Folge und damit verbunden eine erhöhte Abundanz ungespleißter Transkripte. Des Weiteren ist die prä-mRNA-Spleiß-ATP-abhängige RNA Helikase PRP28 für die Integration des tri-snRNPs in den B-Komplex essentiell. Für eine stabile Assoziation von PRP28 mit dem tri-snRNP ist allerdings auch die Phosphorylierung der RS-Domäne von PRP28 erforderlich. PRP28 wird hierbei von SRPK2 phosphoryliert, eine Kinase, die von der Akt-Kinase aktiviert werden kann (Mathew *et al*, 2008; Jang *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2012). Eine Interferenz mit der PRP28 Phosphorylierung würde somit zur Inhibition der Spleißosom-Assemblierung und damit zur Hemmung des Spleißprozesses führen.

Darüber hinaus resultiert die Inhibierung des PI3K Signalwegs auf längere Sicht (nach ca. 24h) in dem Auslösen von Apoptose (Liu *et al*, 2001). Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die hier verwendeten experimentellen Bedingungen die Zellviabilität nicht beeinträchtigten (Alamar blue® Assay, siehe Anhang, 8.1), so kann hier eine Beteiligung früher apoptotischer Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Während der frühen Apoptose z.B. wird U1-70K an einem Serin-Rest innerhalb seiner RRM phosphoryliert, während andere Reste durch die Protein Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert werden. Dies führt letztlich zur Clusterung der U1-70K Proteine in heterogenen ektopischen RNP-abgeleiteten Strukturen (HERDS), die letztlich als apoptotische Bodies ausgestoßen werden. Dieser Prozess scheint während der frühen Apoptose an dem Zerfall der Spleißmachinerie beteiligt zu sein (Dieker *et al*, 2008). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse könnten diese Ereignisse eine weitere Erklärung für die erhöhte Abundanz an ungespleißten bzw. intronhaltigen Transkripten sein. Des Weiteren kommt es bei der Apoptose zur Spaltung von SRPKs und damit zur Inaktivierung dieser Kinasen, was letztlich in einer verringerten Phosphorylierung von SR-Proteinen führen könnte (Utz *et al*, 1998). Auch eine PP1-vermittelte Dephosphorylierung von SR-Proteinen während anti-FAS-induzierter Apoptose wurde beschrieben (Chalfant *et al*, 2001).

Eine Beteiligung der Acinus Proteine (besitzen ebenfalls RS Domänen) als Bestandteil des ASAP-Komplexes (Apoptosis- and Splicing-Associated-Protein Complex) könnte im Fall der PI3K Inhibition ebenfalls zu einer erhöhten Abundanz an ungespleißter mRNA beitragen. Der aktive ASAP-Komplex inhibiert das Spleißen, was in einer erhöhten Abundanz ungespleißter bzw. intronhaltiger mRNAs resultiert (Schwerk *et al*, 2003). Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass die Akt-Kinase

Acinus phosphorylieren kann (Sahara *et al*, 1999; Hu *et al*, 2005). Inwieweit diese Phosphorylierung allerdings im Zusammenhang mit den Acinus Funktionen innerhalb des ASAP-Komplexes steht, ist noch ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwar der Einfluss des Acinus S Proteins sowie verschiedener Acinus S Phosphomutanten auf das HIV-1 Spleißmuster im Kontext des Virus getestet (Abb.4.11.C), ein PI3K spezifischer Effekt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigte die Überexpression der Acinus S Varianten, unabhängig von der PI3K Modulation, eine Verschiebung der Transkripte in Richtung ungespleißter bzw. intronhaltiger mRNAs. Dieser Effekt ähnelte stark dem durch den PI3K-Inhibitor hervorgerufen Spleißeffekt bei Verwendung der Minigene. Es wäre daher vorstellbar, dass das Acinus Protein bei PI3K Inhibition in mit der proviralen pNL4-3 DNA transfizierten Zellen, zumindest in dem hier untersuchten Zeitfenster, bezüglich des Spleißens keine Rolle spielt, jedoch aber im Falle der Minigene. Um die Kontrolle über die für die Virus Replikation essentiellen zellulären Mechanismen zu erlangen, interagieren und manipulieren virale Proteine mit einer Vielzahl zellulärer Faktoren und Signalwegen (zusammengefasst in Seelamgari *et al*, 2004; Jäger *et al*, 2011). Während die viralen Proteine Vpr und Vpu vor allem in der späten Replikationsphase apoptotische Vorgänge unterstützen, verhindert Nef während der frühen Replikationsphase Apoptose durch zahlreiche Interaktionen mit diversen Signaltransduktionswegen (Patel *et al*, 2002; Roumier *et al*, 2002; Akari *et al*, 2001; Casella *et al*, 1999; Roulston *et al*, 1999; Wolf *et al*, 2001). Dies verhindert den frühzeitigen Zelltod und ist damit eine Grundvoraussetzung für die Virus Replikation. So konnte gezeigt werden, dass Nef sowohl die PI3K regulatorischen p85 Untereinheit als auch die Aktivität anderer anti-apoptotischer Serin/Threonin und Tyrosin Kinasen wie Mitglieder der MAP-Kinasen stimulieren kann (Linnemann *et al*, 2002; Schragar *et al*, 2002). Somit wäre das Virus in der Lage, dem durch die PI3K Inhibition bedingtem Auslösen der Apoptose entgegenzuwirken bzw. diesen Prozess zu verlangsamen, indem das virale Nef Protein anti-apoptotische Signalwege zu Gunsten des Virus manipuliert. Da den Minigen-Konstrukten der Leserahmen für Nef fehlt, dominieren hier eventuell die durch die PI3K Inhibition ausgelösten apoptotischen Vorgänge. Im Falle des Virus wird die Nef Expression dagegen erlaubt und damit die verbundene Manipulation von Signalwegen reguliert. Es wäre somit vorstellbar, dass bei PI3K Inhibition andere den Spleißprozess betreffende PI3K Mechanismen überwiegen, die bei den Minigen Experimenten durch das Auslösen von Apoptose überdeckt werden.

Somit müsste eventuell zwischen einem auf das Spleißen bezogenen apoptotischen und nicht apoptotischen PI3K Effekt differenziert werden. Es müsste daher die Acinus S Co-Expression auch im Falle der Minigen-Konstrukte untersucht werden.

### **5.1.2 Die Inhibition des PI3K Signalwegs hat den Einschluss der Leader Exone replikationskompetenter HI-Viren zur Folge**

Während die PI3K Inhibition bei den Transfektionsexperimenten mit den subgenomischen Spleißreportern in dem Ausschluss von HIV-1 Exonen sowie der Intron Retention resultierte, führte sie bei den Transfektionsexperimenten mit der proviralen pNL4-3 DNA zu einem vermehrten Einschluss der HIV-1 Leader Exone (Tat4 [1.2.3.4.7], Tat2b [1.2b.4.7], Tat4b [1.2b.3.4.7] und Nef5b [1.2b.3.5.7]; Abb.4.4.D; E). Im Falle der überexprimierten, konstitutiv aktiven Akt-Kinase konnten dagegen bezogen auf den Ein- oder Ausschluss der Leader Exone nur moderate Effekte nachgewiesen werden. Diese äußerten sich vor allem in dem Verlust an der Vpr3 [1.3E] mRNA. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, wie oben bereits diskutiert, die hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren im Zellmedium, die eine Stimulation des PI3K Signalwegs zur Folge haben könnte. Die Einflüsse der co-exprimierten aktivierten Akt-Kinase auf das HIV-1 Spleißmuster würden unter diesen Umständen überdeckt und könnten nur schwer detektiert werden. Erst die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase bei zeitgleicher PI3K-Inhibitor Inkubation lies einen Effekt der Co-Expression erkennen. Unter diesen Bedingungen hob die aktivierte Akt-Kinase den Effekt der PI3K Inhibition auf den Einschluss der Leader Exone auf (Abb.4.7.B). Die Tatsache, dass die Überexpression der im Signalweg downstream von der inhibierten PI3-Kinase gelegenen aktivierten Akt-Kinase den Inhibitions-Effekt kompensieren konnte, deutet darauf hin, dass die Akt-Kinase einer der wesentlichen Effektoren im Hinblick auf die PI3K-vermittelte Spleißregulation zu sein scheint.

Da nicht der Ausschluss sondern der Einschluss der Leader Exone bei PI3K Inhibition gefördert war, sprechen diese Ergebnisse für einen PI3K Effekt auf die spleißregulatorischen Elemente (SREs), die den Leader Exon Einschluss negativ regulieren. Hierbei handelt es sich um das hnRNP A/B-abhängige ESSV Element im HIV-1 Exon3 sowie das hnRNP F/H-abhängige G-run Element ( $G_{12-1}$ ) im HIV-1 Intron2. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass Mutationen im ESSV und  $G_{12-1}$  ebenfalls in einem geförderten Exon3 und Exon2/2b Einschluss resultieren (Madsen und Stoltzfus, 2005; Widera *et al*, 2012). Die Verwendung dieser HIV-1

Spleißmutanten im Rahmen der vorliegenden Arbeit lieferte daher weitere Hinweise auf einen negativen Einfluss der PI3K Inhibition auf den ESSV, G<sub>12</sub>-1, da die SRE Mutationen ähnliche Spleißmuster verursachten wie die Signalweg Inhibition (Abb.4.5.C).

hnRNP Proteine können in ihrer Funktion und zellulären Lokalisation neben der Methylierung von Argininen auch durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Daher wäre die Veränderung der post-translationalen Modifikationen durch PI3K eine mögliche Erklärung für die Interferenz mit der Funktionalität des ESSV und des G<sub>12</sub>-1. Die Akt-Kinase kann z.B. hnRNP A1 am Serin-Rest 199 phosphorylieren (Jo *et al*, 2008). Es wäre somit vorstellbar, dass eine PI3K vermittelte Phosphorylierung die Bindung von hnRNP A/B an das ESSV beeinflusst bzw. sogar fördert. Weiter spielt die Interaktion mit anderen Proteinen sowie die Di- und Multimerisierung von hnRNP A/B Proteinen eine wesentliche Rolle für dessen Funktionen bezüglich der Spleißregulation (Tange *et al*, 2001; Zhu *et al*, 2001; Nasim *et al*, 2002). Diese Multimerisierung könnte durch die PI3K-vermittelte Phosphorylierung gefördert bzw. durch PI3K Inhibition gehemmt werden, was den Einschluss des Exons3 zur Folge hätte. Um diese Hypothesen zu untersuchen müssten hnRNP A/B spezifische RNA Pull-downs sowie Immunpräzipitationen bei Anwesenheit des PI3K-Inhibitors durchgeführt werden.

Des Weiteren wird über die unterschiedliche Konzentration von SR- und hnRNP-Proteinen im Kern das alternativen Spleißens reguliert. Während der frühen Phase der HIV-1 Replikation wird z.B. das SR-Protein SRSF2 in seiner Expression deutlich gesteigert, während hnRNP A/B und hnRNP H Proteine in ihrer Expression deutlich abnehmen. Innerhalb der späten Replikations-Phase konnte wiederum eine gegenteilige Expression der Proteine nachgewiesen werden (Dowling *et al*, 2008). Diese Art der Regulation muss nicht zwangsläufig auf Ebene der Expression vollzogen werden, sondern kann auch durch unterschiedliche zelluläre Lokalisation dieser Faktoren erreicht werden. So konnte von vielen hnRNP-Proteinen gezeigt werden, dass sowohl Methylierungen als auch Phosphorylierungen deren nukleo-cytoplasmatischen Transport regulieren (Michael *et al*, 1997; Habelhah *et al*, 2001; Nichols *et al*, 2000; Maggipinto *et al*, 2004; Passos *et al*, 2006). Als Antwort auf osmotischen Stress kommt es z.B. zur Aktivierung des p38 MKK<sub>3/6</sub>/p38 Signalwegs und zur Hyperphosphorylierung von hnRNP A1 in einer Region nahe der M9 Sequenz. Die Interaktion zwischen hnRNP A1 und seinem Import Rezeptor ist

daraufrin gestört und resultiert in der cytoplasmatischen Akkumulation von hnRNP A1 (Allemand *et al*, 2005; Guil *et al*, 2006; van der Houven van Oordt *et al*, 2000). Sollte der PI3K Signalweg einen ähnlichen Effekt auf hnRNP A1 haben, so würde die Inhibition des Signalwegs erheblichen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von hnRNP A1 nehmen und somit das HIV-1 Spleißen, wie z.B. den Einschluss der Leader Exone, beeinflussen. Inwieweit diese Hypothese zutrifft könnte an Hand einer Kern-Cytoplasma Trennung mit anschließendem Western Blot und einem gegen hnRNP A/B gerichteten Antikörper sowie mittels RT-PCRs geprüft werden.

Während eine Interferenz der PI3K Inhibition mit der hnRNP A1 Aktivität/Lokalisation eine mögliche Erklärung für den geförderten Exon3 Einschluss wäre, könnte das hnRNP H Protein ein geeigneter Kandidat für die Erklärung des geförderten Exon2/2b Einschusses sein. Hierfür spricht, dass die G-run Mutation (G<sub>12</sub>-1, Abb. 4.5.C) ein vergleichbares Spleißmuster verursachte wie die PI3K Inhibition unter Verwendung des Wildtyps (NL 4-3; Abb.4.4.D; E).

Erste Anhaltspunkte, dass hnRNP H tatsächlich durch den PI3K Signalweg beeinflusst werden kann, lieferten die Untersuchung des alternativen hnRNP H Spleißens (Abb.4.9.B). Hier konnte bei PI3K Inhibition ein deutlicher Verlust des Vollängentranskripts sowie eine alternative Spleißvariante in erhöhter Abundanz detektiert werden. Dieser mRNA fehlten die Exone2 bis 9 und somit sowohl die RRM's als auch die Glycin-reichen Domänen. Es ist daher fraglich, ob diese hnRNP H Isoform noch eine Funktion besitzt. Des Weiteren resultierte die Co-Expression von hnRNP H in einer verringerten Detektion an Tat2b [1.2b.4.7] und Tat4b [1.2b.3.4.7] (Abb.4.8.B) und war folglich in der Lage dem Effekt der PI3K Inhibition entgegenzuwirken.

Wie bereits für hnRNP A1 diskutiert, ist auch im Falle von hnRNP H nicht auszuschließen, dass der durch die PI3K Inhibition bedingte Effekt auf den Exon2/2b Einschluss durch Veränderungen der post-translationalen Modifikation und/oder zellulären Lokalisation von hnRNP H hervorgerufen wird. Es ist bekannt, dass hnRNP H phosphoryliert werden kann, auch wenn noch nicht hinreichend geklärt werden konnte, inwieweit diese Modifikation dessen Funktion und zelluläre Lokalisation beeinflusst (Honore *et al*, 1995; Matunis *et al*, 1994; Van Dusen *et al*, 2010). Die Glycin-Tyrosin-Arginin-reiche (GYR) Domäne innerhalb des hnRNP H Proteins interagiert mit dem Kern-Import Rezeptor Transportin1 (Van Dusen *et al*, 2010). Somit könnte eine post-translational Modifikation dieser Domäne nicht nur

für den Import von hnRNP H, sondern auch in für die Protein Interaktion von Bedeutung sein. Mutationsanalysen, in denen der phosphorylierbare Tyrosin-Rest zu einem nicht-phosphorylierbaren Alanin-Rest mutiert war, zeigten, dass dieser Austausch eine reduzierte nukleare Lokalisation von hnRNP H zur Folge hatte (Van Dusen *et al*, 2010). Eine direkte oder indirekte Beteiligung des PI3K Signalwegs bei der Modifikation dieses oder anderer phosphorylierbarer Reste würde somit die hnRNP H Lokalisation und damit verbunden den Exon2/2b Einschluss beeinflussen.

Des Weiteren sind innerhalb des HIV-1 Genoms zwar bereits eine Vielzahl von SREs bekannt, vermutlich jedoch immer noch nicht alle identifiziert. Es wäre daher möglich, dass zurzeit noch unbeschriebene SREs eine Rolle bei dem Effekt des PI3K Signalwegs auf den Leader Exon Einschluss spielen. So ist eventuell auch von Bedeutung, dass intronisch lokalisierte SR-Proteine die Nutzung eines Spleißdonors inhibieren während intronisch lokalisierte hnRNP-Proteine diese Nutzung stimulieren können (Buratti *et al*, 2007; Hicks *et al*, 2010; Ibrahim, *et al*, 2005; Shen und Mattox, 2012; Hastings *et al*, 2001; Llorian *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011; Erkelenz *et al*, 2012). Wird nun spekuliert, dass solche, im Moment noch unbeschriebenen SREs bei HIV-1 vorhanden sind, so könnte die gegenseitige Beeinflussung der Proteine (SR- und hnRNP-Proteine) sowie der Einfluss des Signalwegs auf beide Protein Familien bezüglich ihrer Bindung und Aktivität in einer dem Wildtyp unterschiedlichen Regulation der Spleißdonoren resultieren. Dies wiederum hätte sowohl eine veränderte Nutzung des D2 und D2b als auch des D3 zur Folge.

Inwieweit SR-Proteine bei dem durch die PI3K Inhibition beobachteten Effekt auf die Leader Exon Erkennung direkt involviert sind, konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zum einen sprechen die unter Verwendung des Plasmids pNL4-3<sub>pNEU</sub> erbrachten Ergebnisse (Abb. 4.5.B) für eine PI3K Inhibitions-bedingte Interferenz mit dem Tra2 $\alpha$ - und  $\beta$ -abhängigen ESE<sub>vpr</sub>. Da Tra2 $\alpha$  und  $\beta$  zu den SR-ähnlichen Proteinen gehören und ebenfalls RS-Domänen enthalten (Erkelenz *et al*, 2012) ist ein Einfluss der PI3K Inhibition auf die Tra2 $\alpha$  und  $\beta$  Phosphorylierung und damit Aktivität durchaus denkbar. Zum anderen konnte im Kontext des Virus eine verminderte Konzentration an phosphorylierten SR-Proteinen in pNL4-3 transfizierten HeLa-Zellen bei PI3K Inhibition nachgewiesen werden (Abb. 4.10.C). Interessant war, dass, bis auf zwei SR-Proteine, bei denen es sich vermutlich um SRSF3 und 4 handelt, auch die Expression der SR-Proteine bei PI3K Inhibition gestört zu seien schien. Allerdings konnte dies in den für die HIV-1 Spleiß-Experimente verwendeten

HEK 293T-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb.4.10.D). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es Unterschiede zwischen der SR-Protein Expression in beiden Zelltypen (HeLa- und HEK 293T-Zellen) gibt. Auch eine zelltypspezifische Expression von Proteinen, die an der SR-Protein Regulation beteiligt sind (z.B. SR-Protein Phosphorylierung) könnte hier eine Rolle spielen.

Da auch alle SR-Proteine alternativ gespleißt werden (Lareau *et al*, 2007), könnte die PI3K Inhibition, ähnlich wie bei hnRNP H, auch deren alternatives Spleißen beeinflussen. So konnten für alle SR-Proteine alternative Spleißvarianten nachgewiesen werden, die ein vorzeitiges Stopp-Codon (Premature Termination Codon, PTC) enthalten und somit durch den Mechanismus des Nonsense-Mediated Decay (NMD) degradiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass über das alternative Spleißen mRNAs reguliert dem NMD zugeführt werden, um gezielt die Protein Expression zu kontrollieren, ein Prozess, der als „regulated unproductive splicing and translation“ (RUST) bezeichnet wird (Lewis *et al*, 2002; Lareau *et al*, 2007). Einige SR-Proteine, wie SRSF2, sind durch einen negativen Feedback-Loop in der Lage die eigene Proteinmenge durch erhöhte Produktion an PTC-Spleißvarianten herunter zu regulieren (Sureau *et al*, 2001). Ähnliches wurde auch für SRSF3 beschrieben, wobei SRSF1 hier als Antagonist wirkt (Jumaa und Nielsen, 1997). In Anbetracht dieser Beobachtungen und der hier erbrachten Ergebnisse, dass die PI3K Inhibition das alternative hnRNP H Spleißen veränderte, könnte angenommen werden, dass die PI3K Inhibition das alternative SR-Protein Spleißen dahingehend beeinflusst, dass vermehrt PTC-Spleißvarianten produziert werden, was letztlich eine verringerte Expression von SR-Proteinen zur Folge hätte. Tatsächlich konnte in diesem Zusammenhang bereits eine Verbindung zwischen dem PI3K Signalweg und dem alternativen SR-Protein Spleißen hergestellt werden. So resultierte die Stimulation von HepG2-Zellen mit dem Hepatocyten Wachstumsfaktor (HGF) in der Aktivierung des PI3K Signalwegs und damit verbunden in der Abnahme des SRSF3 Protein Levels. Hierbei zeigte sich, dass die Abnahme von SRSF3 das alternative SRSF1 Spleißen dahingehend beeinflusste, dass vermehrt eine SRSF1 NMD-mRNA Variante prozessiert wurde die letztlich zur Degradation der mRNA und zur Abnahme der zellulären SRSF1 Protein Expression führte. Des Weiteren resultierte die Inhibition des PI3K Signalwegs mit dem PI3K-Inhibitor LY294002, ähnlich wie in dieser Arbeit, in einer deutlichen Zunahme an SRSF3 innerhalb der behandelten Zellen (Muñoz *et al*, 2012). Inwieweit diese

Mechanismen allerdings in das alternative HIV-1 Spleißen involviert sind, bleibt weiter zu klären.

Eine weitere Beobachtung innerhalb dieser Arbeit war, dass die Expression von ERK1 in HEK 293T-Zellen nicht nur durch die PI3K Modulation, sondern auch durch HIV-1 selbst beeinträchtigt war (Abb.4.10.B). Die Serin/Threonin Kinase ERK1 ist Bestandteil der Ras/Raf/MEK/ERK Signal Kaskade und gehört zu der Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Dieser Signalweg spielt, ähnlich wie der PI3K Signalweg, eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression und Apoptose und konnte ebenfalls mit der Regulation des alternativen Spleißens in Verbindung gebracht werden. Der Einschluss des Papillomavirus E6 Exons z.B. ist ein Resultat der Aktivierung des ERK Signalwegs (Rosenberger *et al*, 2010). Die Ras/Raf/MEK/ERK Signalkaskade ist auch an dem Einschluss des CD44 v5 Exons beteiligt (Weg-Remers *et al*, 2001). Des Weiteren gehört die Ras/Raf/MEK/ERK Signal Kaskade zu den Signalwegen, die durch HIV-1 während der Infektion stimuliert werden. Hierbei ist das virale Protein Tat wesentlich an der Stimulation des ERK Signalwegs beteiligt (Toschi *et al*, 2006; Shi *et al*, 2011; Kim *et al*, 2011; Gong *et al*, 2011). Jedoch wurde auch ein sogenannter "Cross-Talk" zwischen dem PI3K und ERK Signalweg beschreiben, indem sich die beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen können (zusammengefasst in Mendoza *et al*, 2011). Warum die ERK1 Expression daher durch HIV-1 und PI3K/Akt Modulation gestört ist, bleibt offen.

Die Inhibition des PI3K Signalwegs zeigte somit deutliche Effekte auf das alternative HIV-1 Spleißen, die sich jedoch bei Verwendung der Minigen-Konstrukte (höhere Abundanz intronhaltiger Transkripte) und des Virus (fördernder Einfluss auf den gemeinsamen Einschluss der Leader Exone) unterschiedlich äußerten. Da die Minigene nur Teile des HIV-1 Genoms enthalten (das drei-Exon-zwei-Intron Konstrukt enthält lediglich das HIV-1 Exon2; das subgenomische Konstrukt die Exone1-5, wobei das Intron1 stark verkürzt wurde), könnte das Fehlen von Bereichen, die weitere HIV-1 SREs enthalten, eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Spleißmuster der Minigene und der HIV-1 prä-mRNA liefern. Zudem besitzen die Minigen-Konstrukte andere terminale Spleißakzeptoren als die genomische prä-mRNA, was das alternative Spleißen ebenfalls beeinflussen könnte. Da sich das Virus zelluläre Prozesse zu seinen Gunsten aneignet und moduliert (zusammengefasst in Seelamgari *et al*, 2004; Jäger *et al*, 2011), wäre somit auch der

Zellkontext bei Transfektionen mit der proviralen DNA bzw. Minigenen zu unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der Expression zellulärer Spleißfaktoren während der Infektion, die das alternative HIV-1 Spleißen regulieren, mit Änderungen der Tat Expression und der Virus Produktion korrelieren (Dowling *et al*, 2008). Die virale Manipulation zellulärer Prozesse hat somit einen Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen, welche bei Transfektion der z.T. stark verkürzten Minigene so nicht stattfinden würde. Wie weiter oben bereits diskutiert (siehe 5.1.1) könnte in diesem Zusammenhang auch das Auslösen/Verhindern apoptotischer Vorgänge in Ab- und Anwesenheit des Virus von Bedeutung sein

### **5.2 Die PI3K Signalweg Modulation beeinflusst die virale Replikation**

Dass die Veränderung des alternativen HIV-1 Spleißens einen Einfluss auf die virale Replikation haben kann, konnte bereits anhand von Mutationsanalysen des HIV-1 Spleißdonors D2 sowie der HIV-1 spleißregulatorischen Elemente (SREs) ESE-Vif, ESSV, ESE2 und ESS2 gezeigt werden (Exline *et al*, 2008; Madsen und Stoltzfus, 2005; Zahler *et al*, 2004; Mandal *et al*, 2010). So resultierten die Mutationen, sowohl des ESSV als auch der SREs ESS2 und ESE2, in einer Abnahme ungespleißter viraler mRNA und in einer verringerten Virus Produktion (Madsen und Stoltzfus, 2005; Zahler *et al*, 2004; Mandal *et al*, 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch Messung des viralen p24 Proteins eine verminderte Virus Replikation bei PI3K/Akt Modulation nachgewiesen werden (Abb.4.12). Im Fall der PI3K Inhibition wurde die Menge an p24 Protein um ca. die Hälfte reduziert während bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase das p24 Protein nicht bzw. nur in sehr geringer Menge detektiert werden konnte. Inwieweit diese Einflüsse allerdings mit dem alternativen HIV-1 Spleißen zusammenhängen, bleibt weiter zu klären. Da die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase kaum einen Effekt auf das alternative HIV-1 Spleißen zeigte, kann dies als Grund für die drastisch reduzierte Virus Produktion ausgeschlossen werden. Bei PI3K Inhibition hingegen, ähnlich der ESSV Mutation (siehe auch Abb.4.5.B), bestand einer der dominierenden Effekte in einem erhöhten Exon3 Einschluss. Da die Konsequenz der erhöhten Exon3 Erkennung bei ESSV Mutation eine verminderte virale Replikation ist (Madsen und Stoltzfus, 2005), wäre auch im Falle der PI3K Inhibition ein solcher Einfluss auf die virale Replikation

denkbar. Auch die Beeinflussung der Funktionalität anderer SREs könnte hier eine Rolle spielen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ferner ist noch unklar, welche Funktion die Leader Exone bei der Expression der viralen Gene haben. Die Leader Exone enthalten kein AUG und sind damit nicht kodierend. Wie das HIV-1 Exon1 werden sie Teil der 5'-Leader Region der jeweiligen mRNAs in die sie eingeschlossen werden (Stoltzfus, 2009). Die Rolle der Leader Exone im mRNA Metabolismus oder der Translation ist bis jetzt allerdings nur unzureichend geklärt (Schwartz *et al*, 1990; Muesing *et al*, 1987). Die Beteiligung der Leader Exone an der RNA Stabilität wurde zwar diskutiert, die an Minigenen erhobenen Befunde (Krummheuer *et al*, 2001) konnten allerdings im Viruskontext nicht bestätigt werden (Madsen und Stoltzfus, 2006; Stoltzfus, 2009).

Da es sich bei dem PI3K Signalweg um einen zentralen Signalweg handelt, könnten hier noch andere, durch die Signalweg Inhibition ausgelöste Einflüsse involviert sein. Die Behandlung HIV-1 infizierter Makrophagen mit unterschiedlichen PI3K Inhibitoren resultierte z.B. in einer verringerten Virus Produktion. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion des viralen Proteins Tat mit dem Tumor Suppressor Protein p53, einem transkriptionellen Aktivator der Phosphatase PTEN, eine verminderte Expression des PI3K Gegenspielers PTEN zur Folge hatte (Tang und Eng, 2006; Chugh *et al*, 2008). Die Konsequenz dieser Interaktion wäre somit eine erhöhte Aktivität des PI3K Signalwegs und wurde als ein Grund für die Langlebigkeit HIV-1 infizierter Makrophagen postuliert. Das Resultat der Signalweg Inhibition wäre somit der frühzeitige Zelltod und als Folge dessen die Interferenz mit der viralen Replikation. Diese Daten stehen zunächst im Widerspruch zu der oben diskutierten Vermutung, dass HIV-1 in der Lage sein könnte, trotz PI3K Inhibition, Apoptose zu verhindern, indem es andere anti-apoptotische Signalwege aktiviert. Allerdings befand sich unter den in der Arbeit von Chugh *et al*. getesteten PI3K Inhibitoren nicht der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor LY294002. Auch wurden die Makrophagen den verschiedenen Inhibitoren 12 Tage ausgesetzt, während die Zellen im Rahmen dieser Arbeit 12 Stunden mit dem PI3K-Inhibitor inkubiert worden waren. Außerdem zeigten die in der Publikation verwendeten PI3K Inhibitoren nur einen ausgeprägten Effekt auf die Virus Produktion, wenn die Zellen zur selben Zeit Stress in Form von Stickstoffmonoxid (NO) ausgesetzt waren. Es bleibt daher zu klären, inwieweit die von Chugh *et al*. aufgedeckten Mechanismen auch eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse liefern.

Die Akt-Kinase ist auch an der Aktivierung der viralen Transkription beteiligt. Hier phosphoryliert Akt HEXIM1, ein negativ Regulator von p-TEFb, und bewirkt so die Freisetzung des aktiven p-TEFb Komplexes, was wiederum die Interaktion mit Tat und somit die virale Transkription ermöglicht (Contreras *et al*, 2007; Yik *et al*, 2003; 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) eine Rolle bei der Tat induzierten LTR-Transaktivierung spielen. Tat stimuliert hierbei die NADPH Oxidase (Nox2) abhängige  $O_2^-$  Produktion in MAGI-Zellen, wobei der PI3K Signalweg in die Tat induzierte NADPH Oxidase Stimulation involviert zu sein scheint. Diese Ereignisse haben wiederum die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs und die Transaktivierung des LTR Promotors zur Folge (Zhang *et al*, 2009; 2011). Auch im Verlauf dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die PI3K Inhibition einen hemmenden Einfluss auf die LTR-Promotor abhängige Luciferase Transkription in TZM-bl-Zellen hatte, wohingegen die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase einen stimulierenden Effekt zeigte (Abb. 4.13). Somit könnte die Störung der viralen Transkription durch die PI3K/Akt Modulation ebenfalls zur Interferenz mit der viralen Replikation beitragen. Für diese Theorie spricht auch die Analyse der HIV-1 mRNA Klassen mittels Northern Blot. Die PI3K Inhibition hatte hier den Verlust der Transkripte aller drei HIV-1 mRNA Klassen zur Folge, was durch eine Beeinträchtigung der viralen Transkription erklärt werden könnte (Abb.4.14). Da die RT-PCR Analysen, um Unterschiede im HIV-1 Spleißmuster zu erkennen, in einem nicht linearen Bereich durchgeführt wurden, war hier ein Verlust der viralen mRNAs nicht detektierbar. Im Gegensatz zur PI3K Inhibition hatte die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase vor allem einen negativen Einfluss auf die Expression der mRNAs der 4- und 9-kb Klasse. Da es sich bei den mRNAs dieser Klassen um Rev-abhängige Transkripte handelt, lag die Vermutung nahe, dass hier der von Rev-vermittelte nukleare Export intronhaltiger mRNAs gestört sein könnte. Um diese Vermutung zu testen wurden daher Konstrukte in Anwesenheit der PI3K Modulation verwendet, die für den nuklearen Export intronhaltiger Transkripte entweder das Rev Response Element (RRE) oder das Constitutive Transport Element (CTE) enthielten (Schäfer *et al*, 2006). Der Export der mRNAs war im Falle des RRE somit vom CRM1-vermittelten zellulären Protein Exportweg, im Falle der CTE Variante vom Aly/TAP-vermittelten zellulären mRNA Exportweg abhängig. Als Ergebnis dieses Experiments konnte das p24 Protein bei Überexpression der aktivierten Akt-Kinase lediglich beim CTE Konstrukt detektiert werden, was deutlich für eine Interferenz mit

dem Rev- bzw. CRM1-abhängigen Export spricht (Abb.4.15). Interessanterweise war eine Detektion des p24 Proteins bei PI3K Inhibition für beide Konstrukte nicht möglich. Da gezeigt werden konnte, dass Akt Aly/TAP im Nukelus phosphoryliert und somit die mRNA Export Aktivität von Aly/TAP stimuliert, hätte die Interferenz mit der Aly/TAP Phosphorylierung bei PI3K Inhibition eine Störung des zellulären mRNA Exports zur Folge und lieferte somit eine Erklärung für das Ergebnis mit dem CTE-abhängigen Konstrukt (Okada *et al*, 2008). Inwieweit die PI3K Inhibition mit dem Rev-abhängigen Export interferiert, bleibt allerdings weiterhin offen.

Zurzeit kann, bezogen auf diese Ergebnisse, über die molekularen Ursachen nur spekuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das virale Rev Protein an Serin-Resten phosphoryliert werden kann (Hauber *et al*, 1988). Inwieweit die Phosphorylierung der Serin-Reste allerdings einen Effekt auf die Rev Funktion beim Export hat, konnte noch nicht geklärt werden. Ebenso kann oxidativer Stress die Akkumulation von Rev im Cytoplasma bewirken (Soros und Cochrane, 2001). Die Rev Phosphorylierung wurde hierbei nicht verändert, weshalb davon ausgegangen wurde, dass andere zelluläre Faktoren, die am Rev Export beteiligt sind, beeinflusst werden. Wie oben bereits erwähnt, ist der PI3K Signalweg in die Tat induzierte NADPH Oxidase Stimulation und die damit verbundene O<sup>•</sup>-Produktion involviert (Zhang *et al*, 2009; 2011). Es wäre daher denkbar, dass durch die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase der oxidative Stress in einem solchen Maß gesteigert wird, dass Rev im Cytoplasma akkumuliert. Dies wiederum hätte die Akkumulation und Degradation intronhaltiger und ungespleißter viraler Transkripte zur Folge.

In der Literatur werden noch weitere Einflüsse der Phosphorylierung auf die Rev Funktion diskutiert, die eine Erklärung für den Effekt der überexprimierten aktivierten Akt-Kinase liefern könnten. Es wird z.B. spekuliert, dass eine Casein Kinase II- (CKII) abhängige Phosphorylierung der Rev Serin-Reste 8 und 5 zur Herabregulierung von Rev führt (Meggio *et al*, 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Serin-Reste 54 und 56 eines rekombinanten Rev Proteins die Bildung der effizienten RNA-Bindungs Konformation beschleunigt. Im Kontext der Virus Infektion sei diese Modifikation allerdings, aufgrund des hohen Angebots an RRE beinhaltenden mRNAs höchstwahrscheinlich ohne Bedeutung (Fouts *et al*, 1997). Möglich wäre auch, dass eine Rev Phosphorylierung in die Regulation der Rev Mutlimerisierung (Olsen *et al*, 1990; Malim und Cullen, 1991; Zapp *et al*, 1991) oder der Interaktion mit zellulären Faktoren involviert ist (Fankhauser *et al*, 1991;

Ruhl *et al*, 1993; Luo *et al*, 1994; Bogerd *et al*, 1995; Stutz *et al*, 1995; Fritz *et al*, 1995). Auch die Phosphorylierung zellulärer Faktoren und die dadurch mögliche veränderte Interaktion mit Rev könnten hier vermutet werden.

Der eukaryotische Initiations Faktor 5A (eIF-5A) z.B. ist ein essentieller Co-Faktor beim Rev-abhängigen Export, für den ebenfalls ein Phosphoserin-Rest (Ser-46) beschrieben wurde (Gauci *et al*, 2009). Welche Rolle die Phosphorylierung in humanen Zellen bzw. in Bezug auf den Rev-abhängigen Export spielt, ist allerdings bis jetzt ungeklärt. Hinweise auf einen möglichen Einfluss der Modifikation liefern Arbeiten, die an *Zea Mays* durchgeführt wurden. Hier störte die eIF-5A Phosphorylierung die Interaktion mit dem nuklearen Export-Komplex, was letztlich den Export von eIF-5A ins Cytoplasma verhinderte (Lebska *et al*, 2010; Lewandowska-Gnatowska *et al*, 2011). Des Weiteren resultierte die Inkubation von humanen cornealen Epithel-Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 in einer Abnahme der eIF-5A Expression, was ebenfalls die Interferenz mit dem Rev-abhängigen Export bei PI3K-Signalweg Modulation erklären würde (Ding *et al*, 2011). Darüber hinaus wurden für die beiden, ebenfalls am Rev-abhängigen Export beteiligten Co-Faktoren Sam68 und hRIP (humanes Rev interagierendes Protein) Phosphoserin-Reste identifiziert (Dephore *et al*, 2008; Daub *et al*, 2008; Olsen *et al*, 2006). Sollte der PI3K Signalweg in die Phosphorylierung einer oder mehrere dieser Co-Faktoren direkt oder indirekt involviert sein und auf diese Weise die Aktivität bzw. Interaktionen der Proteine verändern, könnte dies eine weitere Erklärung für die Störung des Rev-abhängigen Exports sein.

Es bedarf daher einer Reihe weiterer Untersuchungen, um zu ermitteln in welchen dieser Prozesse die PI3K Signalweg Modulation eingreift, um den Rev-abhängigen Export zu inhibieren. Ebenfalls ungeklärt ist, ob es sich hierbei um direkte oder indirekte Effekte des Signalwegs handelt. Sicherlich können auch andere, hier nicht erwogene Mechanismen, wie z.B. der Einfluss auf die zelluläre Exportmaschinerie, nicht ausgeschlossen werden.

Wie den bisher diskutierten Ergebnissen zu entnehmen ist, erfahren die verschiedenen Stadien des RNA-Metabolismus (Transkription, Spleißen, nuklearer mRNA Export) Veränderungen durch die PI3K/Akt Modulation. Da eine essentielle Funktion der Akt-Kinase in der Aktivierung des mTOR-Komplexes 1 besteht, der wiederum ein wichtiger Regulator der Initiation der Translation sowie der Ribosomen Biogenese ist (Wullschleger *et al*, 2006), war es weiter von Interesse, den Einfluss

der PI3K Modulation auf die Translation zu untersuchen. Hierbei konnte kein Effekt der Überexpression der aktivierten Akt-Kinase auf die Translation nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich bei PI3K Inhibition. Hier konnte ein deutlicher Rückgang neusynthetisierter Proteine detektiert werden (Abb.4.16). Akt aktiviert den mTOR-Komplex 1 indem es die negativen Regulatoren Tsc2 und PRAS40 durch Phosphorylierung inaktiviert, was die Entlassung von mTOR aus seinem inhibitorischen Komplex zur Folge hat (zusammengefasst in Guertin und Sabatini, 2009; Wullschlegler *et al*, 2006). Die Aktivierung von mTOR resultiert dann in der Phosphorylierung der eIF4E-Bindungs Proteine (4EBP's) sowie der Aktivierung von S6K 1/2 und der damit verbundenen Stimulation der Initiation und Elongation der Translation sowie der Ribosomen Biogenese (Brown *et al*, 1995; von Manteuffel *et al*, 1997; Gingras *et al*, 1998; 1999; 2001; Topisirovic *et al*, 2004; Mayer *et al*, 2004; Martin *et al*, 2004; Wang *et al*, 2001). Die Inhibition von PI3K beeinflusst somit die Aktivierung von mTOR und die Stimulation der Translation. Eine damit verbundene Konsequenz der Inhibition wäre somit auch eine beeinträchtigte Translation viraler Proteine, was ebenfalls den Einfluss der PI3K Inhibition auf die virale Replikation erklären würde.

Weiter könnte die Manipulation von SR-Proteinen in eine PI3K-abhängige Modifikation der Translation involviert sein. So konnte ein fördernder Einfluss der SR-Proteine SRSF5 und 6 auf die Translation ungespleißter HIV-1 mRNAs aufgedeckt werden (Swanson *et al*, 2010). Ebenso konnte gezeigt werden, dass SRSF1 in die Regulation der zellulären Initiation der Translation involviert ist, indem es mit mTOR interagiert und dadurch die Phosphorylierung von 4E-BP1 moduliert (Michlewski *et al*, 2008). In Anbetracht der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse bezüglich der SR-Protein Phosphorylierung und Expression wäre somit auch ein damit verbundener Effekt auf die virale Translation plausibel. Wird davon ausgegangen, dass sowohl die Phosphorylierung als auch die Expression einiger SR-Proteine durch PI3K Inhibition verändert wird, würde dies eine beeinträchtigte Translation ungespleißter viraler mRNAs und damit eine reduzierte Virus Produktion zur Folge haben.

Dass die Expression viraler Proteine tatsächlich bei PI3K/Akt Modulation verändert ist, konnte anhand des in dieser Arbeit durchgeführten Nachweises des viralen Vif Proteins gezeigt werden (Abb.4.17). Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase resultierte hier in einer deutlich reduzierten Menge an Vif im Vergleich zu den Kontrollen. Da die Vif mRNA Rev-abhängig translatiert wird, könnte dieser Effekt

durch die Interferenz der Überexpression der aktivierten Akt-Kinase mit dem nuklearen Export Rev-abhängiger mRNAs erklärt werden. Auch die PI3K Inhibition hatte eine deutlich verringerte Detektion von Vif zur Folge. Dies könnte darin begründet sein, dass die PI3K Inhibition sowohl einen Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen, die Transkription und Translation sowie eventuell dem viralen mRNA Export zeigte. Die Summe dieser Effekte könnte somit für die verringerte Vif Detektion verantwortlich gemacht werden. Überraschend war die Detektion einer zweiten Vif Isoform mit geringerem Molekulargewicht, welches mit dem Vif spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte. Wie bereits erwähnt (siehe 1.3.3.3) antagonisiert Vif die Cytidin Desaminase APOBEC3G indem es die APOBEC3G Produktion beeinträchtigt, die enzymatische Aktivität inhibiert und für die Degradation markiert (zusammengefasst in *Wissing et al, 2010; Reingewertz et al, 2010*). Da APOBEC3G in Abwesenheit von Vif in das Virus eingeschlossen wird und im viralen Genom Cytosine zu Uracile desaminiert, hat die Anwesenheit von Vif eine essentielle Bedeutung für die virale Infektiosität und Replikation. Des Weiteren handelt es sich bei Vif um ein Phosphoprotein, welches an Serin- sowie Threonin-Resten ERK1/2-abhängig phosphoryliert werden kann. Die Mutation des Threonin-Restes 96 hatte hier z.B. einen dramatischen Effekt auf die Vif Aktivität und resultierte in der Inhibition der viralen Replikation (*Yang et al, 1996; Yang und Gabuzda, 1998*). Die im Immunblot detektierte Bande unterhalb von Vif könnte daher wie folgt gedeutet werden. Zum einen könnte es sich hierbei um die durch PI3K Inhibitions-bedingte dephosphorylierte Form von Vif handeln, da diese Proteine bei Durchführung einer SDS-PAGE aufgrund ihrer verringerten Größe weiter aufgetrennt werden. Es wäre daher denkbar, dass es sich bei der in allen Proben detektierten Vif Variante um die phosphorylierte Form handelt, während in Anwesenheit des PI3K-Inhibitors zusätzlich die Detektion der dephosphorylierten Variante ermöglicht wird. Hierfür würde sprechen, dass das Protein von dem spezifischen Vif Antikörper erkannt wird. Einen weiteren Hinweis liefert auch die verringerte Expression von ERK1 bei PI3K Inhibition (*Abb.4.10.D*). Wie bereits erwähnt phosphoryliert ERK1 nicht nur Vif, sondern es konnte auch eine Verbindung mit dem PI3K Signalweg hergestellt werden (zusammengefasst in *Mendoza et al, 2011*). Hiergegen würde allerdings sprechen, dass auch im Falle der Überexpression der aktivierten Akt-Kinase ein deutlicher Verlust an ERK1 nachgewiesen werden konnte. Daher wäre auch hier die dephosphorylierte Vif Variante zu erwarten gewesen.

Zum anderen kann es sich bei dem Protein um eine alternative oder trunkeierte Vif Variante handeln, die als Konsequenz der PI3K Inhibition exprimiert wird. Da das Vif ATG im Intron2 zwischen dem Spleißdonor D2 und D2b liegt und im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PI3K Inhibition einen Einfluss auf den Einschluss der Exone2/2b sowie das alternative HIV-1 Spleißen insgesamt hat, wäre dies eine weitere nicht auszuschließende Möglichkeit. Eventuell konnte eine solche mRNA-Variante durch die Wahl der Primer bei Durchführung der RT-PCRs nicht detektiert werden. Eine daraus resultierende alternative bzw. trunkeierte Vif Protein-Variante mit den für die Antikörper Erkennung relevanten Epitopen würde daher auch von dem Vif Antikörper erkannt werden. Unterstützt wird diese Theorie durch die fortwährende Identifizierung nicht näher charakterisierte HIV-1 Spleißstellen (Chang *et al*, 2011; Delgado *et al*, 2012; Widera *et al*, 2012). Daher bleibt zu klären, ob die PI3K Inhibition eventuell ebenfalls einen Einfluss auf die Nutzung dieser Spleißstellen hat.

### 5.3 Ausblick

Um die Zusammenhänge zwischen dem alternativen HIV-1 Spleißen, der Virus Replikation und dem PI3K Signalweg besser verstehen zu können und um die molekularen Mechanismen aufzudecken, sind eine Reihe weiterer Untersuchungen nötig.

So bleibt noch zu klären, ob der PI3K Signalweg den Einfluss auf das alternative HIV-1 Spleißen direkt oder indirekt über nachgeschaltete Kinasen ausübt. Um diese Mechanismen aufzudecken, wäre der Einsatz anderer Inhibitoren, die spezifische nachgeschaltete Kinasen hemmen, zu überlegen. Sollte einer oder mehrere dieser Inhibitoren vergleichbare Effekte auf das HIV-1 Spleißmuster zeigen, wären dies erste Hinweise auf eine indirekte Beteiligung des Signalwegs.

Des Weiteren besteht die Frage, ob bzw. inwieweit der PI3K Signalweg die post-translationale Modifikation sowie die zelluläre Lokalisation von hnRNP-Proteinen beeinflusst. Hier könnten Kinase Assays sowie Immunpräzipitationen nähere Informationen liefern. Auch die Untersuchung der zellulären Lokalisation dieser Proteine bei PI3K Signalweg Modulation mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden sowie Kern-Cytoplasma Trennungen wären aufschlussreich. Zur Überprüfung der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, dass die PI3K Inhibition eventuell mit der Bindung der hnRNP-Proteine an ihre SREs interferiert, wäre die Durchführung von Pull-down Experimenten nützlich. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Analyse der Einflüsse des Signalwegs auf weitere hnRNP-Protein-abhängige HIV-1 Exone.

Die Involvierung von SR-Proteinen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Da in der Literatur eine PI3K-abhängige SR-Protein Phosphorylierung beschrieben wurde (Patel, *et al.* 2001; 2005; Blaustein, *et al.* 2004; 2005; Apostolatos *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012), wären ebenfalls, auch bezogen auf die SR-Protein Expression, weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet von großem Interesse. In Anbetracht der Tatsache, dass viele RS-Domänen beinhaltende Proteine Bestandteil des Spleißosoms sind, scheint auch eine Analyse der PI3K-abhängigen Modifikation dieser Proteine sinnvoll.

Weiter bleibt zu klären inwieweit apoptotische Mechanismen bei dem Einfluss der PI3K Modulation auf das alternative HIV-1 Spleißen eine Rolle spielen. Diesbezüglich müsste validiert werden, ob und zu welchem Maße Apoptose unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen ausgelöst wird (Nachweis von

Apoptose Markern, Vergleich von HIV-1 transfizierten und nicht transfizierten Zellen in An- und Abwesenheit des PI3K-Inhibitors). Das gezielte Auslösen von Apoptose könnte darüber Auskunft geben, in welche Richtung Apoptose das alternative HIV-1 Spleißen lenkt. In diesem Zusammenhang wäre ebenfalls eine nähere Charakterisierung der Acinus Proteine bei PI3K Signalweg Modulation aufschlussreich. Des Weiteren müsste die Beteiligung andere Signalwege (z.B. Ras/Raf/MEK/ERK Signal Kaskade) und ihr eventueller Einfluss auf apoptotische Vorgänge analysiert werden.

Bezogen auf die Replikation wäre die Aufdeckung der genauen molekularen Mechanismen im Hinblick auf die Interferenz der Überexpression der aktiven Akt-Kinase mit dem Rev-abhängigen nuklearen Export zu nennen. Hierbei müsste der Einfluss des PI3K Signalwegs auf die verschiedenen Rev Co-Faktoren näher studiert werden. Des Weiteren könnte durch Verwendung von Leptomycin B, einem bekannten CRM1 Inhibitor, geklärt werden, ob es sich hier um eine Inhibition des zellulären Protein Exportwegs oder aber tatsächlich um eine Rev-spezifische Inhibition handelt. Auch wäre es sicherlich von großem Interesse, die alternative Vif Variante zu identifizieren. Anschließend müssten ebenfalls die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung dieser Variante führen sowie die Funktionalität und der Einfluss auf die Virus Replikation genau analysiert werden.

Da die PI3K Inhibition sowohl das alternative HIV-1 als auch das hnRNP H Spleißen verändert, wäre eine genomweite Betrachtung bezogen auf das alternative Spleißen sicher lohnenswert. Hier würden sich Next Generation Sequencing Analysen anbieten, die einen Überblick über die Veränderung des alternativen Spleißens einer Vielzahl von Genen in An- und Abwesenheit von HIV-1 und dem PI3K-Inhibitor ermöglichen würden. Geeignete Kandidaten könnten dann mittels RT-PCRs sowie Western Blots näher untersucht und deren Einfluss auf die Virus Infektion und Replikation näher validiert werden.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von HIV-1 basierten Minigenkonstrukten und der proviralen NL4-3 DNA die Einflüsse der PI3K Signalwegmodulation auf das alternative Spleißen der HIV-1 prä-mRNA sowie auf die Virus Replikation untersucht.

Mittels RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass die PI3K Inhibition im Falle der HIV-1 basierten Minigenkonstrukte in einer erhöhten Abundanz ungespleißter bzw. intronhaltiger mRNAs resultierte, während im Kontext des Virus die Induktion alternativer Tat Transkriptvarianten nachgewiesen werden konnte. Als Folge der Inhibition des PI3K Signalwegs kam es zu einem vermehrten Einschluss der HIV-1 Leader Exone 2/2b und 3. Da der Einschluss dieser Exone durch die hnRNP A/B- und F/H-abhängigen Silencer Elemente ESSV und G<sub>12</sub>-1 negativ reguliert wird, wurde vermutet, dass die PI3K Inhibition mit der Funktionalität dieser spleißregulatorischen Aktivität interferiert. Unterstützt wurde diese Hypothese durch Replikationsexperimente mit ESSV und G<sub>12</sub>-1 Mutanten in Gegenwart und Abwesenheit des PI3K-Inhibitors. Zusätzlich wurde auch der Einfluss des Inhibitors unter Überexpressionsbedingungen von hnRNP H auf das alternative HIV-1 Spleißen analysiert.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die PI3K Inhibition ein verändertes hnRNP H Spleißmuster bedingt sowie die SR-Protein Phosphorylierung und Expression beeinflusst.

Des Weiteren war es im Verlauf der vorliegenden Arbeit möglich, eine Interferenz der PI3K Modulation mit der Virus Replikation nachzuweisen. Die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase lies hier nur eine sehr geringe Virus Produktion zu während die PI3K Inhibition diese auf ca. die Hälfte reduzierte. Weiterführende Experimente zeigten, dass die Überexpression der aktivierten Akt-Kinase den nuklearen Export Rev-abhängiger HIV-1 mRNAs zu blockieren scheint. Darüber hinaus beeinflusste die PI3K Inhibition neben dem alternativen HIV-1 Spleißen auch die virale Transkription sowie die zelluläre Translation. Zusammen könnten diese Effekte die reduzierte virale Replikation erklären.

Der PI3K Signalweg spielt somit eine zentrale Rolle bei dem alternativen HIV-1 Spleißen und der viralen Replikation und bietet so die Möglichkeit der Entwicklung neuer Ansätze einer antiviralen Therapie.

### 6.2 Summary

In this thesis outgoing from HIV-1 based minigenes and the proviral NL4-3 DNA the influences of the PI3K signaling modulation on the alternative HIV-1 pre-mRNA splicing and also the viral replication were investigated.

By performing RT-PCR analysis it could be shown that in the case of the minigene experiments the PI3K inhibition displayed an increased amount of unspliced or intron containing mRNAs, while the production of alternative Tat variants was demonstrated in the context of the virus. As a result of the PI3K inhibition an increased inclusion of the HIV-1 leader exons2/2b and 3 was observed. Because the inclusion of these exons is negatively regulated by the hnRNP H/F- and hnRNP A/B-dependent silencers elements ESSV and G<sub>12</sub>-1, it was suggested that the PI3K inhibition interferes with the functionality of this splicing regulatory activity. Replication experiments either with G<sub>12</sub>-1 or ESSV mutants in the presence or absence of the PI3K-Inhibitor supported this hypothesis. In addition, the influence of the inhibitor on the alternative HIV-1 splicing was analyzed under hnRNP H overexpression conditions.

Furthermore, it was shown that the hnRNP H splicing pattern as well as the SR-protein phosphorylation and expression were altered as a consequence of the PI3K inhibition. During this thesis an interference of the PI3K modulation with the viral replication was also shown. The overexpression of the activated Akt kinase nearly prevented viral production while the PI3K inhibition reduced viral production by half. In further experiments it was shown that the overexpression of the activated Akt kinase seems to block the nuclear export of Rev-dependent HIV-1 mRNAs. In addition, beside the effect on the viral splicing pattern the PI3K inhibition also showed an influence on the viral transcription and the cellular translation suggesting that the sum of all these effects could contribute to the reduced virus production. These findings demonstrate that the PI3K signaling pathway has indeed a central influence on the alternative HIV-1 splicing as well as on the viral replication and may offer a new approach for antiviral therapy.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. & Martin, M. A. (1986).** Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of virology* **59**, 284-291.
- Adamson, C. S. & Freed, E. O. (2007).** Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol* **55**, 347-387.
- Adamson, C. S. & Freed, E. O. (2010).** Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral research* **85**, 119-141.
- Ahmed, N. N., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Chan, T. O. & Tsichlis, P. N. (1997).** Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3627-3632.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. & Trono, D. (1994).** Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-864.
- Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A. & Strebel, K. (2001).** The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1299-1311.
- Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. & Cohen, P. (1996).** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* **399**, 333-338.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. & Cohen, P. (1997a).** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB* **7**, 261-269.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. & Berger, E. A. (1996).** CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Caceres, J. F. & Krainer, A. R. (2005).** Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3605-3610.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X. F., Han, J. W. & Hemmings, B. A. (1996).** Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5699-5704.
- Apostolatos, A., Song, S., Acosta, S., Peart, M., Watson, J. E., Bickford, P., Cooper, D. R. & Patel, N. A. (2012).** Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase Cdelta11 isoform. *The Journal of biological chemistry* **287**, 9299-9310.
- Arhel, N. J. & Kirchhoff, F. (2009).** Implications of Nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS. *Current topics in microbiology and immunology* **339**, 147-175.
- Avota, E., Avots, A., Niewiesk, S., Kane, L. P., Bommhardt, U., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2001).** Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nature medicine* **7**, 725-731.

- Avota, E., Harms, H. & Schneider-Schaulies, S. (2006).** Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. *Cellular microbiology* **8**, 1826-1839.
- Avota, E., Muller, N., Klett, M. & Schneider-Schaulies, S. (2004).** Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *Journal of virology* **78**, 9552-9559.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. & Tsichlis, P. N. (1991).** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-277.
- Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. (1999).** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology* **17**, 657-700.
- Berglund, J. A., Abovich, N. & Rosbash, M. (1998).** A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes & development* **12**, 858-867.
- Berglund, J. A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R. & Rosbash, M. (1997).** The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**, 781-787.
- Berkowitz, R., Fisher, J. & Goff, S. P. (1996).** RNA packaging. *Current topics in microbiology and immunology* **214**, 177-218.
- Berro, R., Pedati, C., Kehn-Hall, K., Wu, W., Klase, Z., Even, Y., Geneviere, A. M., Ammosova, T., Nekhai, S. & Kashanchi, F. (2008).** CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing. *Journal of virology* **82**, 7155-7166.
- Bilodeau, P. S., Domsic, J. K., Mayeda, A., Krainer, A. R. & Stoltzfus, C. M. (2001).** RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element. *Journal of virology* **75**, 8487-8497.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. & Ponstingl, H. (1994).** RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2587-2591.
- Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. (1991).** Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80-82.
- Black, D. L. (2000).** Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**, 367-370.
- Black, D. L. (2003).** Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* **72**, 291-336.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Coso, O. A., Bissell, M. J., Kornblihtt, A. R. & Srebrow, A. (2004).** Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21029-21037.
- Blaustein, M., Pelisch, F. & Srebrow, A. (2007).** Signals, pathways and splicing regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 2031-2048.
- Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Munoz, M. J., Wengier, D., Quadrana, L., Sanford, J. R., Muschietti, J. P., Kornblihtt, A. R., Caceres, J. F., Coso, O. A. & Srebrow, A. (2005).** Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature structural & molecular biology* **12**, 1037-1044.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. & Cullen, B. R. (1995).** Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**, 485-494.
- Bohne, J., Wodrich, H. & Krausslich, H. G. (2005).** Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. *Nucleic acids research* **33**, 825-837.

- Borgatti, P., Zauli, G., Colamussi, M. L., Gibellini, D., Previati, M., Cantley, L. L. & Capitani, S. (1997).** Extracellular HIV-1 Tat protein activates phosphatidylinositol 3- and Akt/PKB kinases in CD4+ T lymphoblastoid Jurkat cells. *European journal of immunology* **27**, 2805-2811.
- Boucher, L., Ouzounis, C. A., Enright, A. J. & Blencowe, B. J. (2001).** A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* **7**, 1693-1701.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J. P., Gallinaro, H., Lazar, E. & Jacob, M. (1981).** The conformation of chicken, rat and human U1A RNAs in solution. *Nucleic acids research* **9**, 841-858.
- Brennan, P., Babbage, J. W., Burgering, B. M., Groner, B., Reif, K. & Cantrell, D. A. (1997).** Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* **7**, 679-689.
- Briand, G., Barbeau, B. & Tremblay, M. (1997).** Binding of HIV-1 to its receptor induces tyrosine phosphorylation of several CD4-associated proteins, including the phosphatidylinositol 3-kinase. *Virology* **228**, 171-179.
- Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H. G. & Fuller, S. D. (2003).** Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *The EMBO journal* **22**, 1707-1715.
- Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B. & Schreiber, S. L. (1995).** Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441-446.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. (1989).** Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2525-2529.
- Brunet, A., Datta, S. R. & Greenberg, M. E. (2001).** Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology* **11**, 297-305.
- Buratti, E., Stuanis, C., De Prato, G. & Baralle, F. E. (2007).** SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucleic acids research* **35**, 4359-4368.
- Burge, C. B., Tuschl, T., and Sharp, P.A. (1999).** Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In *The RNA World, 2nd Ed*, pp. pp. 525–560: R.F. Gesteland, T.R. Cech, and J.F. Atkins, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Busch, A. & Hertel, K. J. (2012).** Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **3**, 1-12.
- Caceres, J. F., Misteli, T., Sreaton, G. R., Spector, D. L. & Krainer, A. R. (1997).** Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *The Journal of cell biology* **138**, 225-238.
- Caceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M. & Krainer, A. R. (1994).** Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**, 1706-1709.
- Cantley, L. C. (2002).** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.
- Cao, W. & Garcia-Blanco, M. A. (1998).** A serine/arginine-rich domain in the human U1 70k protein is necessary and sufficient for ASF/SF2 binding. *The Journal of biological chemistry* **273**, 20629-20635.
- Carson, J. H., Cui, H., Krueger, W., Schlepchenko, B., Brumwell, C. & Barbarese, E. (2001).** RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results and problems in cell differentiation* **34**, 69-81.
- Casella, C. R., Rapaport, E. L. & Finkel, T. H. (1999).** Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing. *Journal of virology* **73**, 92-100.

- Cazalla, D., Zhu, J., Manche, L., Huber, E., Krainer, A. R. & Caceres, J. F. (2002). Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Molecular and cellular biology* **22**, 6871-6882.
- Chalfant, C. E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B. J., Pettus, B. J. & Hannun, Y. A. (2001). FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 44848-44855.
- Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- Chang, S. T., Sova, P., Peng, X., Weiss, J., Law, G. L., Palermo, R. E. & Katze, M. G. (2011). Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. *mBio* **2**.
- Chasin, L. A. (2007). Searching for splicing motifs. *Advances in experimental medicine and biology* **623**, 85-106.
- Chaudhury, A., Hussey, G. S., Ray, P. S., Jin, G., Fox, P. L. & Howe, P. H. (2010). TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nature cell biology* **12**, 286-293.
- Chen, M. & Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**, 741-754.
- Chkheidze, A. N. & Liebhaber, S. A. (2003). A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* **23**, 8405-8415.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. & Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159.
- Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W. & Black, D. L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Molecular and cellular biology* **19**, 69-77.
- Chugh, P., Bradel-Tretheway, B., Monteiro-Filho, C. M., Planelles, V., Maggirwar, S. B., Dewhurst, S. & Kim, B. (2008). Akt inhibitors as an HIV-1 infected macrophage-specific anti-viral therapy. *Retrovirology* **5**, 11.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2172-2175.
- Clapham, P. R. & McKnight, A. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. *British medical bulletin* **58**, 43-59.
- Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., Dumont, J. E., Le Marchand-Brustel, Y., Erneux, C., Hue, L. & Schurmans, S. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**, 92-97.
- Coffer, P. J. & Woodgett, J. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *European journal of biochemistry / FEBS* **201**, 475-481.
- Collins, C. A. & Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nature structural biology* **7**, 850-854.

- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J. L., Bell, J. C. & Duncan, P. I. (1996).** The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *The EMBO journal* **15**, 265-275.
- Contreras, X., Barboric, M., Lenasi, T. & Peterlin, B. M. (2007).** HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS pathogens* **3**, 1459-1469.
- Cooray, S. (2004).** The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *The Journal of general virology* **85**, 1065-1076.
- Craigie, R. (2001).** HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *The Journal of biological chemistry* **276**, 23213-23216.
- Crawford, J. B. & Patton, J. G. (2006).** Activation of alpha-tropomyosin exon 2 is regulated by the SR protein 9G8 and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F. *Molecular and cellular biology* **26**, 8791-8802.
- Cujec, T. P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D. O. & Peterlin, B. M. (1997).** The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* **11**, 2645-2657.
- Cullen, B. R. (2003).** Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences* **28**, 419-424.
- Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E. & Rusche, J. R. (1989).** Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* **342**, 816-819.
- Damier, L., Domenjoud, L. & Branlant, C. (1997).** The D1-A2 and D2-A2 pairs of splice sites from human immunodeficiency virus type 1 are highly efficient in vitro, in spite of an unusual branch site. *Biochemical and biophysical research communications* **237**, 182-187.
- Datta, K., Franke, T. F., Chan, T. O., Makris, A., Yang, S. I., Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Golemis, E. A. & Tschlis, P. N. (1995).** AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Molecular and cellular biology* **15**, 2304-2310.
- Datta, S. R., Brunet, A. & Greenberg, M. E. (1999).** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* **13**, 2905-2927.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M. E. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.
- Daub, H., Olsen, J. V., Bairlein, M., Gnad, F., Oppermann, F. S., Korner, R., Greff, Z., Keri, G., Stemmann, O. & Mann, M. (2008).** Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular cell* **31**, 438-448.
- Dayton, E. T., Konings, D. A., Powell, D. M., Shapiro, B. A., Butini, L., Maizel, J. V. & Dayton, A. I. (1992).** Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Journal of virology* **66**, 1139-1151.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G. (1997).** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689.
- Delgado, E., Carrera, C., Nebreda, P., Fernandez-Garcia, A., Pinilla, M., Garcia, V., Perez-Alvarez, L. & Thomson, M. M. (2012).** Identification of new splice sites used for generation of rev transcripts in human immunodeficiency virus type 1 subtype C primary isolates. *PloS one* **7**, e30574.
- Denu, J. M. & Dixon, J. E. (1998).** Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology* **2**, 633-641.

- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J. & Gygi, S. P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10762-10767.
- Dieker, J., Cisterna, B., Monneaux, F., Decossas, M., van der Vlag, J., Biggiogera, M. & Muller, S. (2008). Apoptosis-linked changes in the phosphorylation status and subcellular localization of the spliceosomal autoantigen U1-70K. *Cell death and differentiation* **15**, 793-804.
- Dimaano, C. & Ullman, K. S. (2004). Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Molecular and cellular biology* **24**, 3069-3076.
- Ding, L., Gao, L. J., Gu, P. Q., Guo, S. Y., Cai, Y. Q. & Zhou, X. T. (2011). The role of eIF5A in epidermal growth factor-induced proliferation of corneal epithelial cell association with PI3-k/Akt activation. *Molecular vision* **17**, 16-22.
- DiNitto, J. P., Cronin, T. C. & Lambright, D. G. (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, re16.
- Dominguez, C. & Allain, F. H. (2006). NMR structure of the three quasi RNA recognition motifs (qRRMs) of human hnRNP F and interaction studies with Bcl-x G-tract RNA: a novel mode of RNA recognition. *Nucleic acids research* **34**, 3634-3645.
- Doms, R. W. (2000). Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* **276**, 229-237.
- Domsic, J. K., Wang, Y., Mayeda, A., Krainer, A. R. & Stoltzfus, C. M. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 hnRNP A/B-dependent exonic splicing silencer ESSV antagonizes binding of U2AF65 to viral polypyrimidine tracts. *Molecular and cellular biology* **23**, 8762-8772.
- Dowling, D., Nasr-Esfahani, S., Tan, C. H., O'Brien, K., Howard, J. L., Jans, D. A., Purcell, D. F., Stoltzfus, C. M. & Sonza, S. (2008). HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages. *Retrovirology* **5**, 18.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. & Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual review of biochemistry* **62**, 289-321.
- Dunn, E. F. & Connor, J. H. (2012). HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. *Progress in molecular biology and translational science* **106**, 223-250.
- Dyhr-Mikkelsen, H. & Kjems, J. (1995). Inefficient spliceosome assembly and abnormal branch site selection in splicing of an HIV-1 transcript in vitro. *The Journal of biological chemistry* **270**, 24060-24066.
- Eisenreich, A., Malz, R., Pepke, W., Ayril, Y., Poller, W., Schultheiss, H. P. & Rauch, U. (2009). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **73**, 1746-1752.
- Elfgang, C., Rosorius, O., Hofer, L., Jaksche, H., Hauber, J. & Bevec, D. (1999). Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6229-6234.
- Emerman, M. (1996). HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Current biology : CB* **6**, 1096-1103.
- Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* **7**, 606-619.
- Eperon, I. C., Ireland, D. C., Smith, R. A., Mayeda, A. & Krainer, A. R. (1993). Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *The EMBO journal* **12**, 3607-3617.

- Erkelenz, S., Mueller, W. F., Evans, M. S., Busch, A., Schoneweis, K., Hertel, K. J. & Schaal, H. (2012a). Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA*.
- Erkelenz, S., Poschmann, G., Theiss, S., Stefanski, A., Hillebrand, F., Otte, M., Stuhler, K. & Schaal, H. (2012). Tra2-mediated recognition of HIV-1 5' splice site D3 as a key factor in processing vpr-mRNA. *Journal of virology*.
- Exline, C. M., Feng, Z. & Stoltzfus, C. M. (2008). Negative and positive mRNA splicing elements act competitively to regulate human immunodeficiency virus type 1 vif gene expression. *Journal of virology* **82**, 3921-3931.
- Expert-Bezancon, A., Sureau, A., Durosay, P., Salesse, R., Groeneveld, H., Lecaer, J. P. & Marie, J. (2004). hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B. *The Journal of biological chemistry* **279**, 38249-38259.
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. & Laemmli, U. K. (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Molecular and cellular biology* **11**, 2567-2575.
- Fauman, E. B. & Saper, M. A. (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in biochemical sciences* **21**, 413-417.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-483.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060.
- Foster, J. L. & Garcia, J. V. (2007). Role of Nef in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv Pharmacol* **55**, 389-409.
- Fouts, D. E., True, H. L., Cengel, K. A. & Celander, D. W. (1997). Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation. *Biochemistry* **36**, 13256-13262.
- Francois, F. & Klotman, M. E. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *Journal of virology* **77**, 2539-2549.
- Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* **67**, 1-25.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* **26**, 13-33.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *The Journal of biological chemistry* **270**, 23883-23886.
- Freund, M., Asang, C., Kammler, S., Konermann, C., Krummheuer, J., Hipp, M., Meyer, I., Gierling, W., Theiss, S., Preuss, T., Schindler, D., Kjems, J. & Schaal, H. (2003). A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic acids research* **31**, 6963-6975.
- Fritz, C. C., Zapp, M. L. & Green, M. R. (1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**, 530-533.
- Furtado, M. R., Balachandran, R., Gupta, P. & Wolinsky, S. M. (1991). Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* **185**, 258-270.
- Gallouzi, I. E. & Steitz, J. A. (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* **294**, 1895-1901.
- Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. & Sundquist, W. I. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Current opinion in structural biology* **18**, 203-217.

- Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. (2005).** PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* **18**, 13-24.
- Garneau, D., Revil, T., Fiset, J. F. & Chabot, B. (2005).** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22641-22650.
- Gauci, S., Helbig, A. O., Slijper, M., Krijgsveld, J., Heck, A. J. & Mohammed, S. (2009).** Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Analytical chemistry* **81**, 4493-4501.
- Gelderblom, H. R., Ozel, M. & Pauli, G. (1989).** Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Archives of virology* **106**, 1-13.
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R. & Sonenberg, N. (1999).** Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* **13**, 1422-1437.
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N. (1998).** 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* **12**, 502-513.
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R. & Sonenberg, N. (2001).** Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* **15**, 2852-2864.
- Gong, J., Shen, X. H., Chen, C., Qiu, H. & Yang, R. G. (2011).** Down-regulation of HIV-1 infection by inhibition of the MAPK signaling pathway. *Virologica Sinica* **26**, 114-122.
- Gorlach, M., Burd, C. G., Portman, D. S. & Dreyfuss, G. (1993).** The hnRNP proteins. *Molecular biology reports* **18**, 73-78.
- Gottschalk, A., Neubauer, G., Banroques, J., Mann, M., Luhrmann, R. & Fabrizio, P. (1999).** Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *The EMBO journal* **18**, 4535-4548.
- Gozani, O., Feld, R. & Reed, R. (1996).** Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes & development* **10**, 233-243.
- Graveley, B. R. (2000).** Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**, 1197-1211.
- Greenway, A. L., Holloway, G., McPhee, D. A., Ellis, P., Cornall, A. & Lidman, M. (2003).** HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *Journal of biosciences* **28**, 323-335.
- Grunewald, K. & Cyrklaff, M. (2006).** Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography. *Current opinion in microbiology* **9**, 437-442.
- Guatelli, J. C. (2009).** Interactions of viral protein U (Vpu) with cellular factors. *Current topics in microbiology and immunology* **339**, 27-45.
- Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. (2009).** The pharmacology of mTOR inhibition. *Science signaling* **2**, pe24.
- Gui, J. F., Lane, W. S. & Fu, X. D. (1994).** A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* **369**, 678-682.
- Guil, S., Long, J. C. & Caceres, J. F. (2006).** hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Molecular and cellular biology* **26**, 5744-5758.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., Hentze, M. W. & Ronai, Z. (2001).** ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology* **3**, 325-330.

- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361.
- Han, S. P., Tang, Y. H. & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical journal* **430**, 379-392.
- Hanamura, A., Caceres, J. F., Mayeda, A., Franza, B. R., Jr. & Krainer, A. R. (1998). Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* **4**, 430-444.
- Hanly, S. M., Rimsky, L. T., Malim, M. H., Kim, J. H., Hauber, J., Duc Dodon, M., Le, S. Y., Maizel, J. V., Cullen, B. R. & Greene, W. C. (1989). Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes & development* **3**, 1534-1544.
- Harrich, D. & Hooker, B. (2002). Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Reviews in medical virology* **12**, 31-45.
- Hartmann, L., Theiss, S., Niederacher, D. & Schaal, H. (2008). Diagnostics of pathogenic splicing mutations: does bioinformatics cover all bases? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 3252-3272.
- Hastings, M. L., Wilson, C. M. & Munroe, S. H. (2001). A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *RNA* **7**, 859-874.
- Hauber, J., Bouvier, M., Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1988). Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **62**, 4801-4804.
- Henderson, B. R. & Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *Journal of molecular biology* **274**, 693-707.
- Heron-Milhavet, L., Khouya, N., Fernandez, A. & Lamb, N. J. (2011). Akt1 and Akt2: differentiating the aktion. *Histology and histopathology* **26**, 651-662.
- Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* **23**, 1515-1527.
- Hertel, K. J. (2008). Combinatorial control of exon recognition. *The Journal of biological chemistry* **283**, 1211-1215.
- Hicks, M. J., Mueller, W. F., Shepard, P. J. & Hertel, K. J. (2010). Competing upstream 5' splice sites enhance the rate of proximal splicing. *Molecular and cellular biology* **30**, 1878-1886.
- Hillebrand, F. (2008). Die Rolle der Akt-Kinase bei der Regulation der SR- Protein Phosphorylierung und deren Akkumulation im Zellkern von *Xenopus laevis* Oocyten. In *Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie*: Universität Würzburg.
- Hoffman, D. W., Query, C. C., Golden, B. L., White, S. W. & Keene, J. D. (1991). RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2495-2499.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Müller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J. & Dabauvalle, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *The Journal of cell biology* **152**, 895-910.
- Honore, B., Rasmussen, H. H., Vorum, H., Dejgaard, K., Liu, X., Gromov, P., Madsen, P., Gesser, B., Tommerup, N. & Celis, J. E. (1995). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 28780-28789.

- House, A. E. & Lynch, K. W. (2006).** An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nature structural & molecular biology* **13**, 937-944.
- Hsieh, A. C., Truitt, M. L. & Ruggero, D. (2011).** Oncogenic AKTivation of translation as a therapeutic target. *British journal of cancer* **105**, 329-336.
- Hu, Y., Yao, J., Liu, Z., Liu, X., Fu, H. & Ye, K. (2005).** Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *The EMBO journal* **24**, 3543-3554.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J. & Steitz, J. A. (2003).** SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Molecular cell* **11**, 837-843.
- Huang, Y. & Steitz, J. A. (2001).** Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Molecular cell* **7**, 899-905.
- Huang, Y., Yario, T. A. & Steitz, J. A. (2004).** A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9666-9670.
- Hunter, E. & Swanstrom, R. (1990).** Retrovirus envelope glycoproteins. *Current topics in microbiology and immunology* **157**, 187-253.
- Ibrahim, E. C., Schaal, T. D., Hertel, K. J., Reed, R. & Maniatis, T. (2005).** Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5002-5007.
- Izaurralde, E. (2002).** A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm. *European journal of cell biology* **81**, 577-584.
- Izaurralde, E. (2004).** Directing mRNA export. *Nature structural & molecular biology* **11**, 210-212.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Gorlich, D. (1997).** The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *The EMBO journal* **16**, 6535-6547.
- Izaurralde, E. & Mattaj, I. W. (1995).** RNA export. *Cell* **81**, 153-159.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. & Varmus, H. E. (1988).** Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-283.
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J. R., McGovern, K. E., Clarke, S. C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., Hernandez, H., Jang, G. M., Roth, S. L., Akiva, E., Marlett, J., Stephens, M., D'Orso, I., Fernandes, J., Fahey, M., Mahon, C., O'Donoghue, A. J., Todorovic, A., Morris, J. H., Maltby, D. A., Alber, T., Cagney, G., Bushman, F. D., Young, J. A., Chanda, S. K., Sundquist, W. I., Kortemme, T., Hernandez, R. D., Craik, C. S., Burlingame, A., Sali, A., Frankel, A. D. & Krogan, N. J. (2012).** Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* **481**, 365-370.
- Jamison, S. F., Pasman, Z., Wang, J., Will, C., Luhrmann, R., Manley, J. L. & Garcia-Blanco, M. A. (1995).** U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic acids research* **23**, 3260-3267.
- Jang, S. W., Liu, X., Fu, H., Rees, H., Yepes, M., Levey, A. & Ye, K. (2009).** Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *The Journal of biological chemistry* **284**, 24512-24525.
- Jiang, K., Patel, N. A., Watson, J. E., Apostolatos, H., Kleiman, E., Hanson, O., Hagiwara, M. & Cooper, D. R. (2009).** Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC $\beta$  messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* **150**, 2087-2097.
- Jo, O. D., Martin, J., Bernath, A., Masri, J., Lichtenstein, A. & Gera, J. (2008).** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal

- ribosome entry site function through Akt signaling. *The Journal of biological chemistry* **283**, 23274-23287.
- Jumaa, H. & Nielsen, P. J. (1997).** The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *The EMBO journal* **16**, 5077-5085.
- Kamma, H., Portman, D. S. & Dreyfuss, G. (1995).** Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Experimental cell research* **221**, 187-196.
- Kammler, S., Otte, M., Hauber, I., Kjems, J., Hauber, J. & Schaal, H. (2006).** The strength of the HIV-1 3' splice sites affects Rev function. *Retrovirology* **3**, 89.
- Kanopka, A., Muhlemann, O. & Akusjarvi, G. (1996).** Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**, 535-538.
- Karlsson Hedestam, G. B., Fouchier, R. A., Phogat, S., Burton, D. R., Sodroski, J. & Wyatt, R. T. (2008).** The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature reviews Microbiology* **6**, 143-155.
- Karn, J. (1999).** Tackling Tat. *Journal of molecular biology* **293**, 235-254.
- Kiledjian, M. & Dreyfuss, G. (1992).** Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal* **11**, 2655-2664.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. & Baltimore, D. (1989).** Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *Journal of virology* **63**, 3708-3713.
- Kim, Y. K., Mbonye, U., Hokello, J. & Karn, J. (2011).** T-cell receptor signaling enhances transcriptional elongation from latent HIV proviruses by activating P-TEFb through an ERK-dependent pathway. *Journal of molecular biology* **410**, 896-916.
- Klotman, M. E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. & Wong-Staal, F. (1991).** Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5011-5015.
- Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A. & Manley, J. L. (1994).** Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119-124.
- Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A. R. & Hagiwara, M. (1999).** The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *The Journal of biological chemistry* **274**, 11125-11131.
- Konarska, M. M., Vilardell, J. & Query, C. C. (2006).** Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Molecular cell* **21**, 543-553.
- Krummheuer, J., Lenz, C., Kammler, S., Scheid, A. & Schaal, H. (2001).** Influence of the small leader exons 2 and 3 on human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *Virology* **286**, 276-289.
- Kuramitsu, M., Hashizume, C., Yamamoto, N., Azuma, A., Kamata, M., Yamamoto, N., Tanaka, Y. & Aida, Y. (2005).** A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **7**, 1150-1160.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* **10**, 203-209.
- Lai, M. C., Lin, R. I., Huang, S. Y., Tsai, C. W. & Tarn, W. Y. (2000).** A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *The Journal of biological chemistry* **275**, 7950-7957.
- Lai, M. C., Lin, R. I. & Tarn, W. Y. (2001).** Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10154-10159.

- Lai, M. C. & Tarn, W. Y. (2004).** Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *The Journal of biological chemistry* **279**, 31745-31749.
- Lareau, L. F., Inada, M., Green, R. E., Wengrod, J. C. & Brenner, S. E. (2007).** Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**, 926-929.
- Lebska, M., Ciesielski, A., Szymona, L., Godecka, L., Lewandowska-Gnatowska, E., Szczegielniak, J. & Muszynska, G. (2010).** Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *The Journal of biological chemistry* **285**, 6217-6226.
- Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J. L. & Lafyatis, R. (2002).** Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes & development* **16**, 594-607.
- Lewandowska-Gnatowska, E., Szymona, L., Lebska, M., Szczegielniak, J. & Muszynska, G. (2011).** Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor on Ser2 by catalytic subunit CK2. *Molecular and cellular biochemistry* **356**, 241-244.
- Lewis, B. P., Green, R. E. & Brenner, S. E. (2003).** Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 189-192.
- Linnemann, T., Zheng, Y. H., Mandic, R. & Peterlin, B. M. (2002).** Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology* **294**, 246-255.
- Liu, H., Perlman, H., Pagliari, L. J. & Pope, R. M. (2001).** Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *The Journal of experimental medicine* **194**, 113-126.
- Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1995).** In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* **15**, 2800-2808.
- Liu, X., Mayeda, A., Tao, M. & Zheng, Z. M. (2003).** Exonic splicing enhancer-dependent selection of the bovine papillomavirus type 1 nucleotide 3225 3' splice site can be rescued in a cell lacking splicing factor ASF/SF2 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of virology* **77**, 2105-2115.
- Llorian, M., Schwartz, S., Clark, T. A., Hollander, D., Tan, L. Y., Spellman, R., Gordon, A., Schweitzer, A. C., de la Grange, P., Ast, G. & Smith, C. W. (2010).** Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1114-1123.
- Long, J. C. & Caceres, J. F. (2009).** The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical journal* **417**, 15-27.
- Luo, Y., Yu, H. & Peterlin, B. M. (1994).** Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Journal of virology* **68**, 3850-3856.
- Madsen, J. M. & Stoltzfus, C. M. (2005).** An exonic splicing silencer downstream of the 3' splice site A2 is required for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication. *Journal of virology* **79**, 10478-10486.
- Madsen, J. M. & Stoltzfus, C. M. (2006).** A suboptimal 5' splice site downstream of HIV-1 splice site A1 is required for unspliced viral mRNA accumulation and efficient virus replication. *Retrovirology* **3**, 10.
- Maehama, T. & Dixon, J. E. (1999).** PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology* **9**, 125-128.

- Maggipinto, M., Rabiner, C., Kidd, G. J., Hawkins, A. J., Smith, R. & Barbarese, E. (2004).** Increased expression of the MBP mRNA binding protein HnRNP A2 during oligodendrocyte differentiation. *Journal of neuroscience research* **75**, 614-623.
- Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1991).** HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241-248.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. (1989).** The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-257.
- Mandal, D., Feng, Z. & Stoltzfus, C. M. (2010).** Excessive RNA splicing and inhibition of HIV-1 replication induced by modified U1 small nuclear RNAs. *Journal of virology* **84**, 12790-12800.
- Manley, J. L. & Krainer, A. R. (2010).** A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & development* **24**, 1073-1074.
- Manley, J. L. & Tacke, R. (1996).** SR proteins and splicing control. *Genes & development* **10**, 1569-1579.
- Manning, B. D. & Cantley, L. C. (2007).** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995).** Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of virology* **69**, 5087-5094.
- Martin, K. A., Rzucidlo, E. M., Merenick, B. L., Fingar, D. C., Brown, D. J., Wagner, R. J. & Powell, R. J. (2004).** The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *American journal of physiology Cell physiology* **286**, C507-517.
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fisette, J. F., Revil, T. & Chabot, B. (2007).** hnRNP proteins and splicing control. *Advances in experimental medicine and biology* **623**, 123-147.
- Matheny, R. W., Jr. & Adamo, M. L. (2009).** Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**, 1264-1270.
- Mathew, R., Hartmuth, K., Mohlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R. & Luhrmann, R. (2008).** Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nature structural & molecular biology* **15**, 435-443.
- Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. (2005).** Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 386-398.
- Matunis, M. J., Xing, J. & Dreyfuss, G. (1994).** The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization. *Nucleic acids research* **22**, 1059-1067.
- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. & Baltimore, D. (1993).** A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**, 629-630.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. & Grummt, I. (2004).** mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & development* **18**, 423-434.
- Mayrand, S. H., Dwen, P. & Pederson, T. (1993).** Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to pre-mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7764-7768.
- Meggio, F., D'Agostino, D. M., Ciminale, V., Chieco-Bianchi, L. & Pinna, L. A. (1996).** Phosphorylation of HIV-1 Rev protein: implication of protein kinase CK2 and pro-directed kinases. *Biochemical and biophysical research communications* **226**, 547-554.
- Melikyan, G. B. (2008).** Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111.

- Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J. (2011).** The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* **36**, 320-328.
- Mermoud, J. E., Cohen, P. T. & Lamond, A. I. (1994).** Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *The EMBO journal* **13**, 5679-5688.
- Michael, N. L., Morrow, P., Mosca, J., Vahey, M., Burke, D. S. & Redfield, R. R. (1991).** Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in chronically infected cells is associated primarily with a shift in RNA splicing patterns. *Journal of virology* **65**, 7084.
- Michael, W. M., Choi, M. & Dreyfuss, G. (1995).** A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-422.
- Michael, W. M., Eder, P. S. & Dreyfuss, G. (1997).** The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *The EMBO journal* **16**, 3587-3598.
- Michlewski, G., Sanford, J. R. & Caceres, J. F. (2008).** The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular cell* **30**, 179-189.
- Min, H., Chan, R. C. & Black, D. L. (1995).** The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event. *Genes & development* **9**, 2659-2671.
- Misteli, T. (1999).** RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Current biology : CB* **9**, R198-200.
- Misteli, T. & Spector, D. L. (1997).** Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends in cell biology* **7**, 135-138.
- Modem, S., Badri, K. R., Holland, T. C. & Reddy, T. R. (2005).** Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic acids research* **33**, 873-879.
- Moore, M. J. & Sharp, P. A. (1993).** Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* **365**, 364-368.
- Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N. & Dreyfuss, G. (2001).** SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *The EMBO journal* **20**, 5443-5452.
- Muesing, M. A., Smith, D. H. & Capon, D. J. (1987).** Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* **48**, 691-701.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263-273.
- Munoz, U., Puche, J. E., Hannivoort, R., Lang, U. E., Cohen-Naftaly, M. & Friedman, S. L. (2012).** Hepatocyte growth factor enhances alternative splicing of the Kruppel-like factor 6 (KLF6) tumor suppressor to promote growth through SRSF1. *Molecular cancer research : MCR* **10**, 1216-1227.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. & Saraste, M. (1993).** The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends in biochemical sciences* **18**, 343-348.
- Myers, G., Korber, B., Hahn, B. H., Jeang, K. T., Mellors, J. W., McCutchan, F. E., Henderson, L. E., Pavlakis, G. N. (1995).** Human retroviruses and AIDS. A Compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In *Theoretical Biology and Biophysics Group*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
- Na, S. Y., Patra, A., Scheuring, Y., Marx, A., Tolaini, M., Kioussis, D., Hemmings, B. A., Hunig, T. & Bommhardt, U. (2003).** Constitutively active protein kinase B enhances Lck and Erk activities and influences thymocyte selection and activation. *Journal of immunology* **171**, 1285-1296.

- Nasim, F. U., Hutchison, S., Cordeau, M. & Chabot, B. (2002).** High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism. *RNA* **8**, 1078-1089.
- Nichols, R. C., Wang, X. W., Tang, J., Hamilton, B. J., High, F. A., Herschman, H. R. & Rigby, W. F. (2000).** The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Experimental cell research* **256**, 522-532.
- O'Reilly, M. M., McNally, M. T. & Beemon, K. L. (1995).** Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**, 373-385.
- Obata, T., Yaffe, M. B., Leparac, G. G., Piro, E. T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. & Cantley, L. C. (2000).** Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36108-36115.
- Okada, M., Jang, S. W. & Ye, K. (2008).** Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8649-8654.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M. & Rosen, C. A. (1990).** Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes & development* **4**, 1357-1364.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. & Mann, M. (2006).** Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G. & Hentze, M. W. (2002).** c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Molecular and cellular biology* **22**, 4535-4543.
- Otte, M. (2006).** Identifizierung von cis-wirkenden Sequenzen in den alternativen HIV-1 Leader Exonen und ihre funktionelle Bedeutung für die Spleißregulation. In *Institut für Virologie: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Passos, D. O., Quresma, A. J. & Kobarg, J. (2006).** The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochemical and biophysical research communications* **346**, 517-525.
- Patel, C. A., Mukhtar, M., Harley, S., Kulkosky, J. & Pomerantz, R. J. (2002).** Lentiviral expression of HIV-1 Vpr induces apoptosis in human neurons. *Journal of neurovirology* **8**, 86-99.
- Patel, N. A., Chalfant, C. E., Watson, J. E., Wyatt, J. R., Dean, N. M., Eichler, D. C. & Cooper, D. R. (2001).** Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 22648-22654.
- Patel, N. A., Kaneko, S., Apostolatos, H. S., Bae, S. S., Watson, J. E., Davidowitz, K., Chappell, D. S., Birnbaum, M. J., Cheng, J. Q. & Cooper, D. R. (2005).** Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase Cbeta11 alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *The Journal of biological chemistry* **280**, 14302-14309.
- Pollard, A. J., Sparey, C., Robson, S. C., Krainer, A. R. & Europe-Finner, G. N. (2000).** Spatio-temporal expression of the trans-acting splicing factors SF2/ASF and heterogeneous ribonuclear proteins A1/A1B in the myometrium of the pregnant human uterus: a molecular mechanism for regulating regional protein isoform expression in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 1928-1936.

- Pollard, V. W. & Malim, M. H. (1998).** The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* **52**, 491-532.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. & Bukrinsky, M. (1998).** Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13347-13352.
- Pozzoli, U. & Sironi, M. (2005).** Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1579-1604.
- Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T. & Manley, J. L. (1999).** The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Molecular and cellular biology* **19**, 6991-7000.
- Prasad, J. & Manley, J. L. (2003).** Regulation and substrate specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. *Molecular and cellular biology* **23**, 4139-4149.
- Purcell, D. F. & Martin, M. A. (1993).** Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of virology* **67**, 6365-6378.
- Rajpurohit, R., Lee, S. O., Park, J. O., Paik, W. K. & Kim, S. (1994).** Enzymatic methylation of recombinant heterogeneous nuclear RNP protein A1. Dual substrate specificity for S-adenosylmethionine:histone-arginine N-methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **269**, 1075-1082.
- Reingewertz, T. H., Shalev, D. E. & Friedler, A. (2010).** Structural disorder in the HIV-1 Vif protein and interaction-dependent gain of structure. *Protein and peptide letters* **17**, 988-998.
- Renkema, G. H. & Saksela, K. (2000).** Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **5**, D268-283.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. & Downward, J. (1994).** Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532.
- Roscigno, R. F. & Garcia-Blanco, M. A. (1995).** SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA* **1**, 692-706.
- Rosenberger, S., De-Castro Arce, J., Langbein, L., Steenbergen, R. D. & Rosl, F. (2010).** Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7006-7011.
- Roshal, M., Zhu, Y. & Planelles, V. (2001).** Apoptosis in AIDS. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **6**, 103-116.
- Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. & Tazi, J. (1996).** Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, 80-82.
- Roulston, A., Marcellus, R. C. & Branton, P. E. (1999).** Viruses and apoptosis. *Annual review of microbiology* **53**, 577-628.
- Roumier, T., Vieira, H. L., Castedo, M., Ferri, K. F., Boya, P., Andreau, K., Druillennec, S., Joza, N., Penninger, J. M., Roques, B. & Kroemer, G. (2002).** The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell death and differentiation* **9**, 1212-1219.
- Ruhl, M., Himmelspach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D. & et al. (1993).** Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *The Journal of cell biology* **123**, 1309-1320.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. & Tsujimoto, Y. (1999).** Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168-173.

- Sanchez-Velar, N., Udofia, E. B., Yu, Z. & Zapp, M. L. (2004).** hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes & development* **18**, 23-34.
- Sanford, J. R. & Bruzik, J. P. (1999).** SR proteins are required for nematode trans-splicing in vitro. *RNA* **5**, 918-928.
- Sanford, J. R., Ellis, J. & Caceres, J. F. (2005).** Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochemical Society transactions* **33**, 443-446.
- Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K. & Caceres, J. F. (2004).** A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes & development* **18**, 755-768.
- Sanford, J. R., Longman, D. & Caceres, J. F. (2003).** Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Progress in molecular and subcellular biology* **31**, 33-58.
- Santi, S. A. & Lee, H. (2010).** The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American journal of physiology Cell physiology* **298**, C580-591.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. (2005).** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101.
- Sauliere, J., Sureau, A., Expert-Bezancon, A. & Marie, J. (2006).** The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Molecular and cellular biology* **26**, 8755-8769.
- Schafer, B., Hauber, I., Bunk, A., Heukeshoven, J., Dusedau, A., Bevec, D. & Hauber, J. (2006).** Inhibition of multidrug-resistant HIV-1 by interference with cellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity. *The Journal of infectious diseases* **194**, 740-750.
- Schibeci, S. D., Clegg, A. O., Biti, R. A., Sagawa, K., Stewart, G. J. & Williamson, P. (2000).** HIV-Nef enhances interleukin-2 production and phosphatidylinositol 3-kinase activity in a human T cell line. *AIDS* **14**, 1701-1707.
- Schrager, J. A., Der Minassian, V. & Marsh, J. W. (2002).** HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 6137-6142.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E. M. & Pavlakis, G. N. (1990a).** Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **64**, 2519-2529.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. & Pavlakis, G. N. (1990b).** Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology* **64**, 5448-5456.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V. J., Manley, J. L., Lahti, J. M. & Reinberg, D. (2003).** ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Molecular and cellular biology* **23**, 2981-2990.
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M. E., Ghedin, E., Pumfery, A. & Kashanchi, F. (2004).** Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **9**, 2388-2413.
- Shen, H. & Green, M. R. (2004).** A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Molecular cell* **16**, 363-373.
- Shen, H., Kan, J. L. & Green, M. R. (2004).** Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular cell* **13**, 367-376.
- Shen, M. & Mattox, W. (2012).** Activation and repression functions of an SR splicing regulator depend on exonic versus intronic-binding position. *Nucleic acids research* **40**, 428-437.

- Shi, J., Qin, X., Zhao, L., Wang, G. & Liu, C. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces B7-H1 expression via ERK/MAPK signaling pathway. *Cellular immunology* **271**, 280-285.
- Shin, C., Feng, Y. & Manley, J. L. (2004). Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature* **427**, 553-558.
- Shin, C. & Manley, J. L. (2002). The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* **111**, 407-417.
- Shin, C. & Manley, J. L. (2004). Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**, 727-738.
- Singh, R., Valcarcel, J. & Green, M. R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* **268**, 1173-1176.
- Siomi, H. & Dreyfuss, G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *The Journal of cell biology* **129**, 551-560.
- Smith, C. W. & Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in biochemical sciences* **25**, 381-388.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J. & et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-778.
- Soros, V. & Cochrane, A. (2001). Alterations in HIV-1 Rev transport in response to cell stress. *Virology* **280**, 199-210.
- Soros, V. B., Carvajal, H. V., Richard, S. & Cochrane, A. W. (2001). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *Journal of virology* **75**, 8203-8215.
- Spellman, R. & Smith, C. W. (2006). Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends in biochemical sciences* **31**, 73-76.
- Stoltzfus, C. M. (2009). Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Advances in virus research* **74**, 1-40.
- Stutz, F., Neville, M. & Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* **82**, 495-506.
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. & Soret, J. (2001). SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *The EMBO journal* **20**, 1785-1796.
- Swanson, C. M., Sherer, N. M. & Malim, M. H. (2010). SRp40 and SRp55 promote the translation of unspliced human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Journal of virology* **84**, 6748-6759.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W. (1997). Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. In *Retroviruses*. Edited by J. M. Coffin, S. H. Hughes & H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY).
- Tacke, R. & Manley, J. L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Current opinion in cell biology* **11**, 358-362.
- Tang, Y. & Eng, C. (2006). PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. *Cancer research* **66**, 736-742.
- Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcarcel, J. & Kjems, J. (2001). The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *The EMBO journal* **20**, 5748-5758.
- Tange, T. O., Jensen, T. H. & Kjems, J. (1996). In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *The Journal of biological chemistry* **271**, 10066-10072.
- Tarn, W. Y. & Steitz, J. A. (1995). Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 2504-2508.

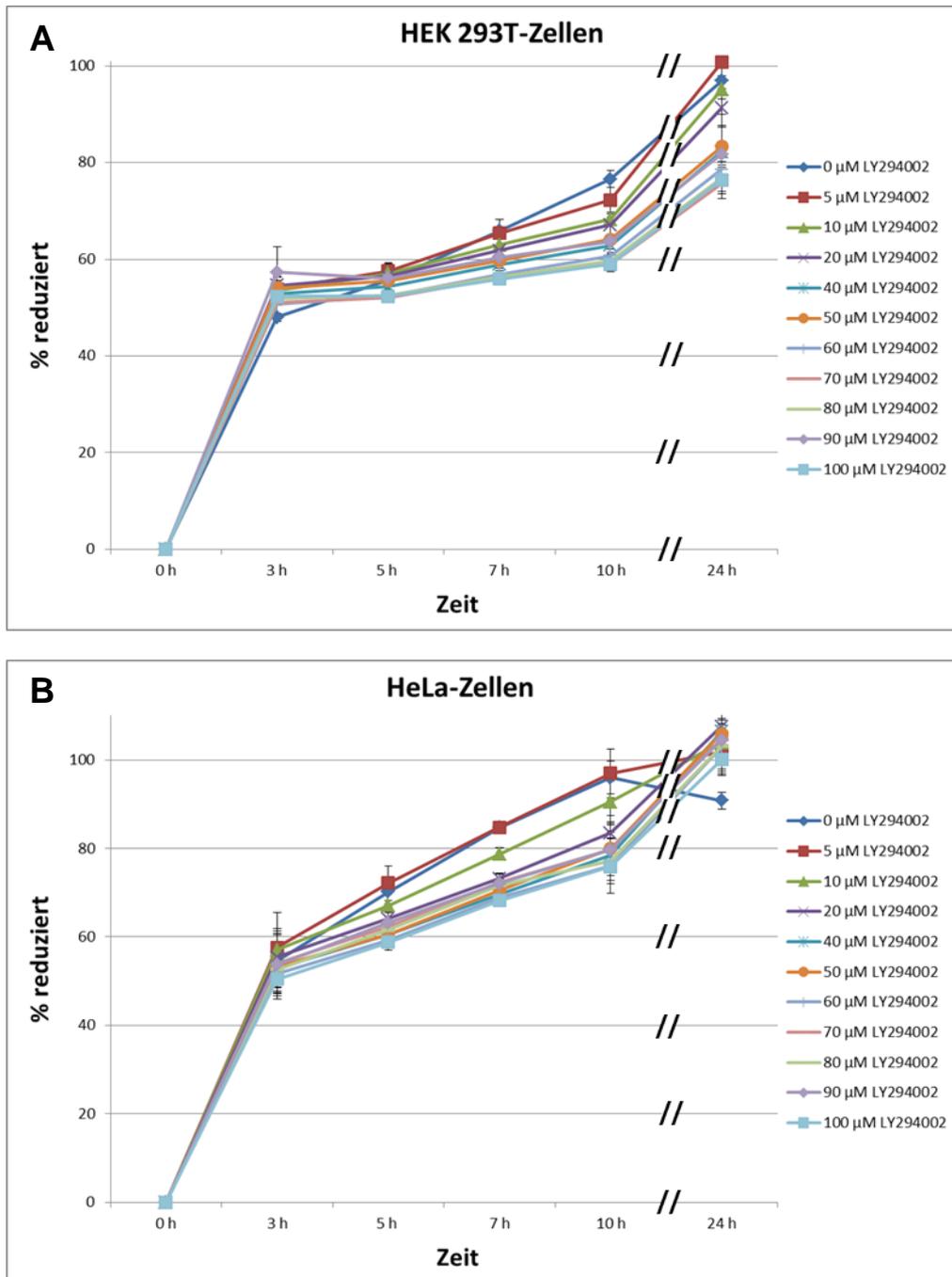
- Tarn, W. Y. & Steitz, J. A. (1996).** Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* **273**, 1824-1832.
- Thomas, J. O. & Kornberg, R. D. (1975).** An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2626-2630.
- Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M. & Borden, K. L. (2004).** Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer research* **64**, 8639-8642.
- Toschi, E., Bacigalupo, I., Strippoli, R., Chiozzini, C., Cereseto, A., Falchi, M., Nappi, F., Sgadari, C., Barillari, G., Mainiero, F. & Ensoli, B. (2006).** HIV-1 Tat regulates endothelial cell cycle progression via activation of the Ras/ERK MAPK signaling pathway. *Molecular biology of the cell* **17**, 1985-1994.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. & Greenberg, M. E. (2003).** The many forks in FOXO's road. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, RE5.
- Twyffels, L., Gueydan, C. & Krays, V. (2011).** Shuttling SR proteins: more than splicing factors. *The FEBS journal* **278**, 3246-3255.
- Utz, P. J., Hottelot, M., van Venrooij, W. J. & Anderson, P. (1998).** Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. *The Journal of experimental medicine* **187**, 547-560.
- Valcarcel, J., Gaur, R. K., Singh, R. & Green, M. R. (1996).** Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* **273**, 1706-1709.
- Valverde, R., Edwards, L. & Regan, L. (2008).** Structure and function of KH domains. *The FEBS journal* **275**, 2712-2726.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B. & Guatelli, J. (2008).** The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell host & microbe* **3**, 245-252.
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Krainer, A. R., Moscat, J. & Caceres, J. F. (2000).** The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *The Journal of cell biology* **149**, 307-316.
- Van Dusen, C. M., Yee, L., McNally, L. M. & McNally, M. T. (2010).** A glycine-rich domain of hnRNP H/F promotes nucleocytoplasmic shuttling and nuclear import through an interaction with transportin 1. *Molecular and cellular biology* **30**, 2552-2562.
- Van Maele, B. & Debyser, Z. (2005).** HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS reviews* **7**, 26-43.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. (1994).** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* **269**, 5241-5248.
- von Manteuffel, S. R., Dennis, P. B., Pullen, N., Gingras, A. C., Sonenberg, N. & Thomas, G. (1997).** The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70s6k. *Molecular and cellular biology* **17**, 5426-5436.
- Wada, K., Inoue, K. & Hagiwara, M. (2002).** Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. *Biochimica et biophysica acta* **1591**, 1-10.
- Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R. (2009).** The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718.
- Wang, E., Mueller, W. F., Hertel, K. J. & Cambi, F. (2011).** G Run-mediated recognition of proteolipid protein and DM20 5' splice sites by U1 small nuclear RNA is regulated by

- context and proximity to the splice site. *The Journal of biological chemistry* **286**, 4059-4071.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. & Proud, C. G. (2001).** Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* **20**, 4370-4379.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. & Konig, H. (2001).** Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *The EMBO journal* **20**, 4194-4203.
- Weighardt, F., Biamonti, G. & Riva, S. (1996).** The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **18**, 747-756.
- Widera, M. (2010).** Identifizierung von intronischen Spleißregulationselementen und deren funktionelle Bedeutung für die HIV-1 vif-/vpr-mRNA-Prozessierung. In *Institut für Virologie: Universität Düsseldorf*.
- Widera, M., Erkelenz, S., Hillebrand, F., Krikoni, A., Widera, D., Kaisers, W., Deenen, R., Gombert, M., Dellen, R., Pfeiffer, T., Kaltschmidt, B., Munk, C., Bosch, V., Kohrer, K. & Schaal, H. (2012).** An intronic G-run within HIV-1 intron 2 is critical for splicing regulation of vif-mRNA. *Journal of virology*.
- Wilk, T., Gross, I., Gowen, B. E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R., Krausslich, H. G., Boulanger, P. & Fuller, S. D. (2001).** Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **75**, 759-771.
- Will, C. L. & Luhrmann, R. (2011).** Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- Wipf, P. & Halter, R. J. (2005).** Chemistry and biology of wortmannin. *Organic & biomolecular chemistry* **3**, 2053-2061.
- Wissing, S., Galloway, N. L. & Greene, W. C. (2010).** HIV-1 Vif versus the APOBEC3 cytidine deaminases: an intracellular duel between pathogen and host restriction factors. *Molecular aspects of medicine* **31**, 383-397.
- Wodrich, H., Schambach, A. & Krausslich, H. G. (2000).** Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner. *Nucleic acids research* **28**, 901-910.
- Wolf, D., Witte, V., Laffert, B., Blume, K., Stromer, E., Trapp, S., d'Aloja, P., Schurmann, A. & Baur, A. S. (2001).** HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nature medicine* **7**, 1217-1224.
- Wu, J. Y. & Maniatis, T. (1993).** Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**, 1061-1070.
- Wu, S., Romfo, C. M., Nilsen, T. W. & Green, M. R. (1999).** Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**, 832-835.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. (2006).** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-484.
- Xiao, S. H. & Manley, J. L. (1997).** Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes & development* **11**, 334-344.
- Xiao, S. H. & Manley, J. L. (1998).** Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *The EMBO journal* **17**, 6359-6367.
- Xu, N., Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (2001).** Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Molecular and cellular biology* **21**, 6960-6971.
- Yang, X. & Gabuzda, D. (1998).** Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *The Journal of biological chemistry* **273**, 29879-29887.
- Yang, X., Goncalves, J. & Gabuzda, D. (1996).** Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *The Journal of biological chemistry* **271**, 10121-10129.

- Yik, J. H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J. L., Link, A. J. & Zhou, Q. (2003).** Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular cell* **12**, 971-982.
- Yik, J. H., Chen, R., Pezda, A. C. & Zhou, Q. (2005).** Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16368-16376.
- Yu, J., Wjasow, C. & Backer, J. M. (1998a).** Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *The Journal of biological chemistry* **273**, 30199-30203.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A. & Backer, J. M. (1998b).** Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Molecular and cellular biology* **18**, 1379-1387.
- Zahler, A. M., Damgaard, C. K., Kjems, J. & Caputi, M. (2004).** SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing. *The Journal of biological chemistry* **279**, 10077-10084.
- Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G. & Green, M. R. (1991).** Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7734-7738.
- Zhang, H. S., Sang, W. W., Ruan, Z. & Wang, Y. O. (2011).** Akt/Nox2/NF-kappaB signaling pathway is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. *Archives of biochemistry and biophysics* **505**, 266-272.
- Zhang, H. S. & Wu, M. R. (2009).** SIRT1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation through activating AMP-activated protein kinase. *Virus research* **146**, 51-57.
- Zhang, Z. & Krainer, A. R. (2004).** Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Molecular cell* **16**, 597-607.
- Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D. H. & Brady, J. N. (2000).** Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and cellular biology* **20**, 5077-5086.
- Zhou, Z., Qiu, J., Liu, W., Zhou, Y., Plocinik, R. M., Li, H., Hu, Q., Ghosh, G., Adams, J. A., Rosenfeld, M. G. & Fu, X. D. (2012).** The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Molecular cell* **47**, 422-433.
- Zhu, J., Mayeda, A. & Krainer, A. R. (2001).** Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Molecular cell* **8**, 1351-1361.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B. & Price, D. H. (1997).** Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes & development* **11**, 2622-2632.

## 8. Anhang

### 8.1 Alamar blue®-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität nach PI3K-Inhibitor Zugabe.



**Abb. 8.1. Alamar blue®-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität nach PI3K-Inhibitor Zugabe.**

2,5 x 10<sup>4</sup> HEK 293T- und HeLa-Zellen wurden in 96-Well Platten pro Well ausgesät und am darauffolgendem Tag mit unterschiedlichen Konzentration des PI3K-Inhibitors LY294402 inkubiert (5 μM, 10 μM, 20μM, 40 μM, 50 μM, 60 μM, 70 μM, 80 μM, 90 μM und 100 μM). Es folgte die Zugabe von 20 μl des Alamar blue® Reagenzes pro Well. Die Reduktion des Reagenzes wurde über einen Zeitraum von 24 h beobachtet wobei nach 0 h, 3 h, 5 h, 7 h, 10 h und 24 h die Absorption zur Bestimmung der Reduktion gemessen wurde (Absorptionswellenlänge: 570 nm; Referenzwellenlänge: 595 nm).

Relative Menge des reduzierten Alamar blue® Reagenzes (in Prozent) bei Zugabe der verschiedenen PI3K-Inhibitor Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in HEK 293T- (A) und HeLa-Zellen (B).

---

## 8.2 Abkürzungen

4EBP	eIF4E-Bindungs Proteine
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPS	Branch Point Sequence
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumine)
CA	Capsid (p24)
CAT	Chloramphenikol-Acetyl-Transferase
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
cDNA	copy/complementary DNA
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMDC	Dimethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DANN
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF	Eukaryotischer Translations Elongations Faktor
eIF	Eukaryotischer Translations Initiations Faktor
Env	HIV-1 Envelope-Protein
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenatridiumbromid)

EtOH	Ethanol
FBS	Fötale Rinderserum
Gag	Group specific antigen, codiert für Strukturproteine des HIV-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosine Triphosphat
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
hGH	Human Growth Hormone (Somatotropin)
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1
hnRNP	heterogenous Ribonucleoprotein Particle
IGF	Insulin-like Growth Factors
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
IN	Integrase (p32)
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
ISE	Intronic Splicing Enhancer
ISS	Intronic Splicing Silencer
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrix (p17)
mBBP	mammalian Branchpoint Binding Protein
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NC	Nucleocapsid (p7)
Nef	Negative Effector,
NES	Nuclear Export Signal
NGS	Next Generation Sequencing
NLS	Nuclear Localisation Signal
NMD	Nonsense mediated decay
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
pAkt	konstitutiv, aktive Akt-Kinase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	Phosphatidylinositol Dpendent Kinase 1

pH	pH-Wert = $-\log[H^+]$
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	PH-Domain Leucin-Rich Repeat Protein Phosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PP1/2/2a	Protein Phosphatase 1/2/2a
PPT	Polypyrimidintrakt
PR	Protease (p10)
PTC	Premature Termination Codon
p-TEFb	positive Transkription Elongation Faktor b
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
Rev	Regulator of viral Gene Expression
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reactive Oxygen Species
RRE	REV Responsive Element
RRM	RNA Recognition Motif
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase (p66/51)
RT	Reverse Transkription
RUST	Regulated Unproductive Splicing and Translation
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumlaurylsulfat
SF1	Splicing Factor 1
SHIP	Src- Homologie-2 (SH2)-beinhaltende Phosphatase
snRNA	Small Nuclear Ribonucleic Acid
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle
SRE	,Spleißregulatorisches Element
SRSF	Serin-Arginin Splicing Factor
SS	Spleißstelle
TAR	Transaktivator Responsive Element
Tat	Transcriptional Activator
TBS	Tris-Buffered Saline

U2AF	U2 auxiliary factor
ü.N.	über Nacht
us	ungespleißt
V	Volumen
Vif	Viral Infectivity Factor
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U

Weitere Abkürzungen sind im Laufe der Arbeit im Text erklärt.

### 8.3 Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
rcf	relative Zentrifugalkraft („relative centrifugal force“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)
sek	Sekunde
V	Volt
W	Watt

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Frank Hillebrand  
Geburtsdatum: 10.03.1978, Bad Driburg  
Adresse: Werstener Dorfstraße 41, 40591 Düsseldorf  
E-mail Adresse: Frank.Hillebrand@med.uni-duesseldorf.de  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Studium

- 03/2012 Beginn der Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heiner Schaal am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
- 07/2008- 02/2012 Promotion am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Abteilung Elektronenmikroskopie, an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Thema: „Der Einfluss des PI3-Kinase Signalwegs auf die Regulation des alternativen HIV-1 prä-mRNA Spleißens“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle.
- 06/2008 Abschluss des Biologiestudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 04/2008- 05/2008 Diplomprüfung an der Universität Würzburg  
Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie (Note: 1,0)  
Nebenfach: Biochemie (Note: 2,0)  
Nebenfach: Tierökologie (Note: 1,0)

- 04/2007- 12/2007 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle zum Thema: „Die Rolle der Akt-Kinase bei der Regulation der SR-Protein Phosphorylierung und deren Akkumulation im Zellkern von *Xenopus laevis* Oocyten“ (Note: 1,0)
- 09/2006- 01/2007 Fortgeschrittenenpraktikum II und Spezialpraktikum am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle zum Thema: „Die Rolle der Akt-Kinase bei der Regulation der SR-Protein Phosphorylierung und deren Akkumulation im Zellkern von *Xenopus laevis* Oocyten“
- 10/2005- 06/2006 Fortgeschrittenenpraktika I an der Universität Würzburg in den Fächern Zell- und Entwicklungsbiologie, Biochemie und Tierökologie
- 09/2005 Diplom-Vorprüfung mit der Gesamtnote gut an der Universität Würzburg in den Fächern Biologie, Chemie und Physik
- 10/2003 Beginn des Biologiestudiums (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### **Wehrdienst**

- 04/1999- 01/2000 Grundwehrdienst, zuletzt beim Marineunterstützungskommando in Wilhelmshaven

### **Berufliche Tätigkeit**

- 07/2003- 09/2003 Tätigkeit als Maurer bei der Firma Köthenbürger B. GmbH und Co KG in Paderborn

02/2000- 07/2000 Tätigkeit als Maurer bei der Firma Köthenbürger B. GmbH und Co KG in Paderborn

07/1997- 03/1999 Tätigkeit als Maurer bei der Firma Köthenbürger B. GmbH und Co KG in Paderborn

## **Berufsausbildung**

08/1994- 06/1997 Berufsausbildung zum Maurer bei der Firma Köthenbürger B. GmbH und Co KG in Paderborn (Gesamtnote: gut)

## **Schulbildung**

06/2003 Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote: 1,7)

08/2000- 06/2003 Westfalen-Kolleg Paderborn

08/1988- 06/1994 Realschule Schloß Neuhaus

1985- 1988 Comenius Grundschule in Paderborn-Elsen

## Publikationsliste

Erst-Autorenschaft:

**Hillebrand, F., Erkelenz, S., Diehl, N., Widera, M., Avota, E., Schneider-Schaulies, S., Dabauvalle, M-C., and Schaal, H. (2013).** The PI3K pathway acting on alternative HIV-1 pre-mRNA splicing. *Journal of general virology*. **In submission**

Mit-Autorenschaft:

**Erkelenz, S., Poschmann, G., Theiss, S., Stefanski, A., Hillebrand, F., Otte, M., Stuhler, K. & Schaal, H. (2012).** Tra2-mediated recognition of HIV-1 5'ss D3 as a key factor in processing vpr-mRNA. *Journal of virology*.

**Widera, M., Erkelenz, S., Hillebrand, F., Krikoni, A., Widera, D., Kaisers, W., Deenen, R., Gombert, M., Dellen, R., Pfeiffer, T., Kaltschmidt, B., Munk, C., Bosch, V., Kohrer, K. & Schaal, H. (2012).** An intronic G-run within HIV-1 intron 2 is critical for splicing regulation of vif-mRNA. *Journal of virology*.