

**Der Einfluss von HIV-1 induzierten  
Veränderungen des PI3K/Akt Signalwegs auf  
das alternative Spleißen in T-Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Nora Nadeschda Diehl**

aus Osnabrück

Düsseldorf, Februar 2016

aus dem Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Schaal

Koreferent: Prof. Dr. M. Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2016

# Meinen Eltern

„Tue es oder tue es nicht.

Es gibt kein Versuchen.“

Yoda

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
<b>1. Einleitung</b> .....	3
1.1 mRNA Prozessierung.....	3
1.1.1 Alternatives Spleißen.....	5
1.1.2 Determinanten der Spleißstellennutzung .....	9
1.1.3 Die SR Protein Familie .....	10
1.1.4 hnRNPS .....	13
1.2 Translation.....	14
1.2.1 Normale Translationstermination.....	15
1.2.2 Aberrante Termination.....	15
1.2.3 Nonsense-mediated decay .....	16
1.2.3.1 Der EJC .....	16
1.2.3.2 Aktivierung von NMD .....	18
1.2.3.3 Alternatives Spleißen und NMD .....	22
1.2.3.4 Viren und NMD .....	24
1.3 HIV-1 .....	25
1.3.1 Der Lebenszyklus von HIV-1 .....	25
1.3.2 Virales Spleißen .....	27
1.3.2.1 Die 2 kb Klasse .....	29
1.3.2.2 Die 4 kb Klasse .....	29
1.3.2.3 Die 9 kb Klasse .....	30
1.3.3 Die Genregulation von HIV-1 wird durch SR Proteine beeinflusst.....	31
1.4 Der PI3K Signalweg und Viren.....	32
1.5 Zielsetzung .....	36
<b>2. Material und Methoden</b> .....	37
2.1 Material.....	37
2.1.1 Bakterienstämme.....	37
2.1.2 Eukaryotische Zelllinien .....	37
2.1.3 Zellkulturmaterial .....	37
2.1.4 Antikörper .....	38
2.1.5 Chemikalien, Medien und Lösungen.....	39
2.1.6 Enzyme .....	39
2.1.7 Oligonukleotide.....	39
2.1.8 Größenstandards.....	41
2.1.9 Plasmide .....	42

2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	43
2.2.1.1 Kultivierung von Zellen.....	43
2.2.1.2 Passagieren von adhärennten Zellen.....	43
2.2.1.3 Passagieren von Suspensionszellen.....	43
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl.....	44
2.2.1.5 Inkubation mit Inhibitoren .....	44
2.2.1.6 Alamar blue®-Assay .....	44
2.2.1.7 Transfektion von Kulturzellen.....	45
2.2.1.8 siRNA Transfektion .....	45
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	45
2.2.2.1 Gesamt-RNA Isolierung .....	45
2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	46
2.2.2.3 DNase-Inkubation .....	46
2.2.2.4 Reverse Transkription.....	46
2.2.2.5 Semi-quantitative PCR.....	47
2.2.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels eines PAA-Gels.....	47
2.2.2.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels eines Agarose-Gels.....	48
2.2.2.8 Quantitative real-time PCR (qPCR).....	48
2.2.2.9 Herstellung einer RNA-Sonden .....	48
2.2.2.10 RNA-Gelelektrophorese .....	49
2.2.2.11 Northern-Blot.....	49
2.2.2.12 Klonieren.....	51
2.2.3 Virologische Methoden .....	53
2.2.3.1 Herstellung von Virusstocks.....	53
2.2.3.2 Infektiösitätstest über Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase-Expression in HIV-1 infizierten Zellen (X-Gal-Assay) .....	54
2.2.3.2 Titerbestimmung mittels TCID <sub>50</sub> .....	54
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	54
2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	54
2.2.4.2 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.4.3 Western-Blot .....	55
2.2.4.5 Luciferase-Assay .....	56
2.2.5 Bioinformatische Methoden .....	57
2.2.5.1 Illumina Sequenzierung.....	57
2.2.5.2 Algorithmus zur Bestimmung der intrinsischen Stärke von Spleißstellen.....	57

<b>3. Ergebnisse</b> .....	58
3.1 Der PI3K/Akt Signalweg und eine HIV-1 Infektion stehen in PM1 Zellen zueinander in Wechselwirkung.....	58
3.1.1 Der PI3K Inhibitor LY294002 und der Akt Inhibitor MK2206 unterdrücken sowohl die Threonin als auch die Serin Phosphorylierung der Akt Kinase.....	58
3.1.2 Die HIV-1 Viruspartikel Produktion kann durch Inhibition der Akt Kinase reduziert werden .....	60
3.1.3 Der Phosphorylierungszustand der Akt Kinase ändert sich im Verlauf einer HIV-1 Infektion .....	62
3.2 Sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändern die Genexpression mehrerer SR Proteine.....	63
3.2.1 Die PI3K Inhibition, ebenso wie die HIV-1 Infektion, verändern den Phosphorylierungszustand von SR Proteinen.....	64
3.2.2 Die HIV-1 Infektion und die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändern die Genexpression von <i>SRSF1</i> .....	67
3.2.3 Die HIV-1 Infektion und die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs führen zur Akkumulation eines NMD-sensitiven <i>SRSF3</i> Transkripts.....	75
3.3 Einzelne Gene zeigten nach HIV-1 Infektion ein ähnliches Expressionsprofil wie nach Inhibition der Akt Kinase .....	82
3.3.1 <i>RNA deep sequencing</i> Analysen .....	82
3.3.2 Die Expression von <i>FOSB</i> und <i>FOS</i> war sowohl nach HIV-1 Infektion als auch Akt Inhibition stark verringert .....	84
3.3.3 Veränderungen im Spleißmuster von <i>TP53</i> nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition sind zelltypabhängig.....	88
3.3.4 <i>CLK1</i> wird im Verlauf der HIV-1 Infektion und nach Akt Inhibition differentiell gespleißt .....	92
3.4 Die zelluläre NMD Aktivität verändert sich durch eine HIV-1 Infektion.....	103
3.4.1 Nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition ist die Expression UPF1-abhängiger Gene verändert.....	103
3.4.2 Endogene NMD Substrate werden durch die HIV-1 Infektion stabilisiert.....	105
3.4.3 Die NMD Aktivität verändert sich im Verlauf einer HIV-1 Infektion .....	106
3.4.4 Die NMD Aktivität wird 48 Stunden selektiv nach einer HIV-1 Infektion, nicht aber durch die Transfektion der Zellen mit proviraler DNA, verringert.....	108
3.4.5 Das zelluläre UPF1 Level hatte keinen Einfluss auf die Virus Replikation.....	109
3.4.6 Einzelne HIV-1 Transkripte sind NMD-sensitiv .....	111
<b>4. Diskussion</b> .....	114
4.1 Die Phosphorylierung der Akt Kinase wird im Verlauf einer HIV-1 Infektion verändert .....	114
4.2 Die komplexe Genregulation von <i>SRSF1</i> kann durch eine HIV-1 Infektion sowie den PI3K/Akt Signalweg moduliert werden .....	117

4.3 <i>RNA deep sequencing</i> Analysen tragen zur Identifizierung veränderter Genexpression und alternativem Spleißens nach einer HIV-1 Infektion bei .....	120
4.3.1 Die Expression von <i>FOSB</i> und <i>FOS</i> nach der HIV-1 Infektion könnte durch den PI3K/Akt Signalweg reguliert sein.....	122
4.3.2 Die Veränderungen im Spleißmuster von <i>TP53</i> nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition sind zelltypabhängig.....	125
4.4 Die Art des Einbringens proviraler DNA in eukaryotische Zellen bestimmt das Ausmaß dadurch veränderter zellulärer Abläufe .....	129
4.4 HIV-1 mRNAs werden durch eine verminderte NMD Aktivität vor der Degradation geschützt .....	133
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	138
<b>6. Anhang</b> .....	162
6.1 Alamar blue®-Assay .....	162
6.2 Fluoreszenzbilder der transfizierten <i>C/κ</i> Expressionsplasmide.....	163
6.3 qPCR Analysen zur Validierung der RNA deep sequencing Daten .....	164
6.4 Abkürzungen.....	165
6.5 Einheiten.....	169
<b>Publikationen</b> .....	171
<b>Erklärung</b> .....	172
<b>Danksagung</b> .....	173

## Zusammenfassung

Die Beteiligung des PI3K/Akt Signalwegs an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Proliferation, dem Überleben sowie der Proteinbiosynthese, macht ihn zum Ziel vielfältiger viraler Übernahmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die für ihre Aktivität entscheidende Phosphorylierung der Akt Kinase im Verlauf einer HIV-1 Infektion verändert wurde. Dabei folgte auf die anfängliche Aktivierung eine Herunterregulation der Phosphorylierung. Zudem führte die Inhibition der Kinaseaktivität durch einen pharmakologischen Inhibitor zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Virusreplikation. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen von spleißregulatorischen Proteinen, dass deren Phosphorylierung sowie Genexpression nicht nur durch die Inhibition des Signalwegs sondern auch durch eine HIV-1 Infektion verändert wurden. Die komplexe Genregulation von spleißregulatorischen Proteinen kann unter anderem durch den *Nonsense-mediated decay* (NMD) Pathway – einem translationsabhängigen RNA Qualitäts-Kontrollmechanismus, der geschädigte mRNAs erkennt und degradiert – beeinflusst werden. Solche geschädigten mRNAs entstehen üblicherweise durch Mutationen oder fehlerhaftes Spleißen, sind aber durchaus auch ein Instrument der Genregulation, entstehen also „vorsätzlich“, um die Expression entsprechender Gene zu drosseln. Sowohl nach Inhibition des Signalwegs als auch nach HIV-1 Infektion akkumulierte unter anderem das NMD-sensitive Transkript von *SRSF3*, welches durch den Einschluss eines alternativ gespleißten Exons mit einem vorzeitigen Stoppcodon gekennzeichnet ist. *RNA deep sequencing* Analysen infizierter und Akt-inhibierter Zellen haben darüber hinaus gezeigt, dass genomweit weitere NMD-sensitive Transkripte akkumulierten, die hierdurch ebenfalls der Degradation durch den NMD Pathway entronnen sind. Mit Hilfe NMD-sensitiver Reporter konnte bestätigt werden, dass die zelluläre NMD-Aktivität während einer HIV-1 Infektion verändert wurde, eine Transfektion mit der proviralen DNA für diese Modellierung jedoch nicht ausreichte. Die Behandlung von infizierten Zellen mit dem Translationsblocker Cycloheximid oder einer siRNA gegen *UPF1*, einem zentralen NMD-Faktor, haben weiterhin gezeigt, dass die HIV-1 *Tat* Transkripte NMD-sensitiv waren. Demnach scheint HIV-1 den NMD Pathway herunter zu regulieren, um seine eigenen mRNAs vor der Degradation zu schützen.

## Summary

Der PI3K/Akt Signalweg entpuppte sich hierbei als mögliche instrumentalisierte Schaltzentrale.

## Summary

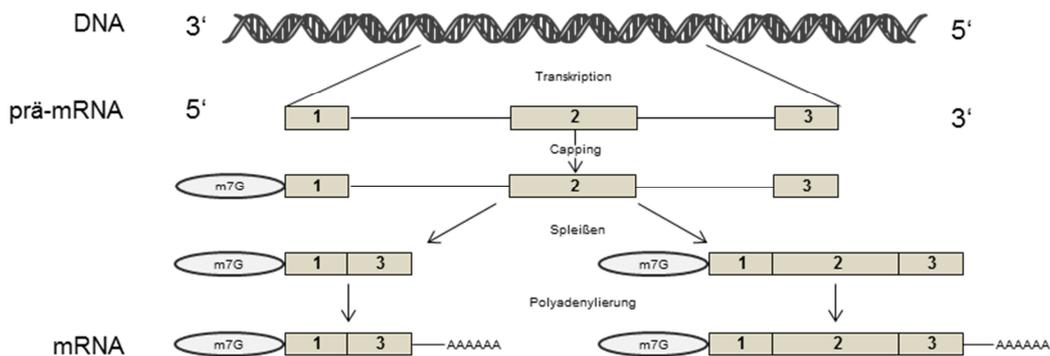
Since the PI3K/Akt signaling pathway plays a critical role in numerous cellular processes such as proliferation, survival and protein synthesis, many viruses target it. In the present study, it was shown that the phosphorylation of the Akt kinase, which is crucial for its activity, was altered during HIV-1 infection. The initial activation was followed by a downregulation of the phosphorylation. In addition, the inhibition of the kinase by a pharmacological inhibitor severely reduced the viral replication. Studies of splicing regulatory proteins further showed that their phosphorylation and gene expression have been changed not only by the inhibition of the pathway but also by an HIV-1 infection. The complex gene regulation of splicing regulatory proteins can be influenced by the nonsense mediated decay (NMD) pathway – a translation dependent surveillance mechanism that detects and degrades damaged mRNAs. Such damaged mRNAs are usually generated by mutations or defective splicing, but can in fact arise as an instrument of gene regulation, by "intentional" generation to reduce the expression of corresponding genes. Both, by inhibition of the signaling pathway and after HIV-1 infection, the NMD-sensitive transcript of *SRSF3*, which is characterized by the inclusion of an alternatively spliced exon harboring a premature stop codon, accumulated. RNA deep sequencing analyses of infected and Akt-inhibited cells have further shown that at the genome wide level additional NMD-sensitive transcripts were stabilized. With the help of NMD-sensitive reporters it was confirmed that the cellular NMD activity during HIV-1 infection has changed but that the mere transfection with proviral DNA was not sufficient for this modeling. Treatments of infected cells with the translation blocker cycloheximide or with siRNA against *UPF1*, a central NMD factor, have additionally shown that the HIV-1 *Tat* transcripts were sensitive to NMD. Accordingly, HIV-1 seems to downregulate the NMD pathway to protect its own mRNAs from degradation. The PI3K/Akt signaling pathway emerged as possible, orchestrated control center.

# 1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde das zelluläre alternative Spleißen, der *Nonsense-mediated decay* Pathway sowie der PI3K/Akt Signalweg im Kontext einer HIV-1 Infektion untersucht. Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel die Zusammenhänge dieser Bereiche näher vorgestellt.

## 1.1 mRNA Prozessierung

Die genetische Information einer Zelle ist in ihrer DNA (Desoxyribonukleinsäure) hinterlegt. Bis zur Synthese der darin codierten Proteine unterläuft die zur Vermittlung hergestellte mRNA (*messenger-Ribonukleinsäure*) einige Prozessierungsschritte (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1 Prozessierung der prä-mRNA.**

Bereits während die DNA in die noch unreife prä-mRNA übersetzt wird (Transkription), wird an ihr 5' Ende ein modifiziertes Guanin-Nukleotid (m7G) geheftet (Capping). Auch das Herausschneiden von intervenierenden, intronischen Sequenzen und alternativen Exons (Spleißen) kann bereits während der andauernden Transkription ablaufen. Schließlich wird an das 3' Ende der prä-mRNA der Poly(A)-Schwanz geknüpft (Polyadenylierung) und die nun reife mRNA kann den Zellkern verlassen.

Die Transkription der RNA beginnt zunächst mit der schrittweisen Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes an die Promotorregion der DNA [1]. Anfangs entsteht durch die Bindung der TATA-Box Bindeprotein (TBP)-Untereinheit des Transkriptionsfaktors II D (TFIID) an die DNA eine Krümmung [2], die durch die flankierende Bindung von TFIIIB und TFIIA stabilisiert wird [3, 4]. Der nun entstandene Komplex wird noch durch die Bindungen von TFIIIE und TFIIH vervollständigt. Letztere sind sowohl für die Öffnung der DNA als auch die DNA-abhängige Hydrolyse von ATP verantwortlich [5-8]. TFIIIB ist darüber hinaus für die

## 1. Einleitung

Rekrutierung des Polymerase II (Pol II) – TFIIF Komplexes notwendig [9-11]. Mit der sodann generierten Transkriptionsblase startet die Synthese der RNA. Katalysiert wird die Synthese von der DNA-abhängigen RNA Polymerase II (Pol II), die durch eine erweiterte carboxy-terminale Domäne (CTD) ausgezeichnet ist. Sie besteht aus 51 wiederholenden Heptapeptiden, von denen 21 mit der Konsensus Sequenz „YSPTSPS“ exakt übereinstimmen [12]. Während des gesamten Transkriptionszyklus unterläuft die CTD Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung. Diese sind für den reibungslosen Fortgang der Transkription notwendig [13, 14]. Ein wichtiges Merkmal des Übergangs von der Initiation zur Elongation der Transkription ist beispielsweise die Hyperphosphorylierung der CTD durch CTD-modifizierende Enzyme wie CDK7, 9 und 12 [12, 15, 16]. Das Vorkommen von Pol II-DNA Komplexen und kurzen RNA-Produkten zeigt, dass dieser Übergang zunächst nicht sehr stabil ist und mehrere Anläufe für eine erfolgreiche Elongation notwendig sind [17].

Bereits während der initialen Phosphorylierungen assoziieren Capping Enzyme an die CTD [18]. Diese generieren eine ungewöhnliche 5' zu 5' Verknüpfung zwischen einem 7-Methylguanosin und dem ersten transkribierten Nukleotid [19]. Zum einen schützt diese 5' Kappe die RNA vor dem direkten Abbau durch Exonucleasen, die diese Bindung nicht hydrolysieren können. Zum anderen dient sie als Bindestelle für den *cap-binding complex* (CBC), der während der Translationsinitiation von Bedeutung ist. Zeitgleich zur ihrer Synthese läuft bereits eine weitere prä-mRNA-Prozessierung ab: das Spleißen (Details dazu in Kapitel 1.1.1, Seite 10).

Schließlich findet die in zwei Stufen ablaufende Polyadenylierung am 3' Ende statt. Dabei erfolgt nach der endonukleolytischen Spaltung die Synthese des durchschnittlich 250 bis 300 Nukleotid langen poly Adenin (A)-Schwanzes. *Cis*-regulatorische Elemente markieren dabei die poly(A)-Stelle. Die Sequenzumgebung 100 Nukleotide auf- und abwärts einer poly(A)-Stelle ist dabei generell äußerst AU-reich [20, 21], während die Spaltungsstelle selbst häufig nur durch ein CA Dinukleotid konserviert ist. Etwa 10 bis 30 Nukleotide aufwärts der Spaltungsstelle befindet sich das hoch konservierte poly(A)-Signal (PAS) A(A/U)UAAA und etwa 40 Nukleotide abwärts das degenerierte GU-reiche *downstream element* (DSE) [22, 23].

Der *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) und *cleavage stimulating factor* (CSTF) sind zwei multimere Proteinkomplexe, die das PAS und das DSE erkennen und die Spaltung zwischen den Elementen initiieren. Die poly(A)

## 1. Einleitung

Polymerase (PAP) synthetisiert schließlich die Anheftung der Adenine und wird dabei vom *polyadenylate-binding nuclear protein 1* (PABPN1) unterstützt, das an den naszierenden poly(A)-Schwanz bindet [24]. Die mRNA kann nun aus dem Zellkern exportiert und im Cytoplasma translatiert werden.

Jüngste Forschungen zeigen, dass die meisten humanen Gene mehr als eine poly(A) Stelle besitzen. Alternative Polyadenylierungsstellen (APA) scheinen demnach weit verbreitet zu sein. Potentiell können sie die Funktion, Stabilität oder Lokalisation einer mRNA verändern [25].

Die entstehende mRNA ist während ihres gesamten Lebens niemals nackt – im Gegenteil – sie wird ständig von assoziierenden Faktoren eskortiert, mit denen zusammen sie die „*messenger ribonucleoprotein particle*“ (mRNPs) bildet. Sowohl die Komposition als auch die Position dieser Faktoren auf der mRNA entscheiden maßgeblich über ihr Schicksal. Die Komplexität und die Bedeutung dieser Regulierung verdeutlicht die Anzahl an Genen, die für Proteine mit einem „RNA recognition motif (RRM) codieren; im Menschen etwa 500 [26].

### 1.1.1 Alternatives Spleißen

Eukaryotische Gene sind modular aufgebaut: Exonische Sequenzen werden von intronischen Sequenzen unterbrochen. Diese intervenierenden Regionen werden aus der Vorläufer-mRNA entfernt. Fast immer entsteht hierdurch ein durchgängiger Leserahmen. Der als Spleißen bezeichnete Prozess findet im Nukleus statt und wird durch einen megadaltongroßen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex – dem Spleißosom – katalysiert. In seiner Zusammensetzung ist es ein äußerst dynamisches Makromolekül und stellt neben dem Ribosomen eine der komplexesten Maschinerien der Zelle dar [27].

Im Gegensatz zum konstitutiven Spleißen, bei dem die Spleißstellen stets erkannt und genutzt werden und somit die Exons immer in einer bestimmten Reihenfolge miteinander zu einem Transkript verbunden werden, können beim alternativen Spleißen mehrere Transkriptvarianten entstehen. Dies ergibt sich aus der alternativen Nutzung einiger Spleißstellen. Hierdurch wird die Synthese verschiedener Protein-Isoformen aus nur einer genetischen Vorlage ermöglicht oder es können Transkriptisoformen mit einer unterschiedlichen Halbwertszeit gebildet werden. Das alternative Spleißen liefert somit einen essentiellen Beitrag zur Protein

## 1. Einleitung

Diversität und zur regulierbaren Genexpression von Eukaryoten [28]. Evolutiv betrachtet, konnten – dank des modularen Aufbaus durch Exons und Introns – zudem vermutlich neue genetische Informationen entstehen, auch ohne dabei die codierenden Sequenzen zu beschädigen. Hierbei beschränkten sich rekombinante Ereignisse vermeintlich auf intronische Sequenzen, um so Exons verschiedener Gene miteinander zu verknüpfen [29].

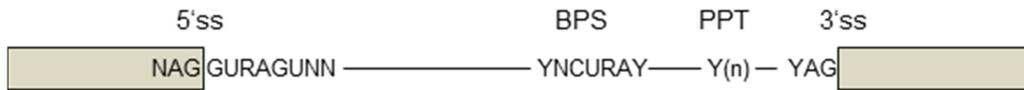
In Eukaryoten existieren zwei unterschiedliche Spleißosomen. Zum einen gibt es das U2-abhängige Spleißosom, welches die Entfernung von Typ U2-Introns katalysiert – die am häufigsten auftretende Form von Introns [30]. Zum anderen gibt es das seltener vorkommende U12-abhängige Spleißosom, das Typ U12-Introns erkennt und entfernt. Da diese Form weniger als 1% aller Introns ausmacht [31], wird im Folgenden nur auf den U2-abhängigen Spleißmechanismus eingegangen.

Das U2-abhängige Spleißosom setzt sich aus den fünf kleinen snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) U1, U2, U5, U4, U6 und zahlreichen assoziierten Proteinen zusammen [32]. Jedes snRNP besteht dabei aus einer Uracil-reichen snRNA (*small nuclear ribonucleic acid*), die als Adapter für die RNA Bindung fungiert, sieben Sm-Proteinen (im Fall der U6 snRNA LSm-Proteinen) und einer variablen Anzahl von weiteren, assoziierten Proteinen. Massenspektrometrische Analysen aufgereinigter Spleißosomen-Komplexe zeigen, dass mindestens 170 Proteine assoziiert sind, deren Anzahl innerhalb der jeweiligen isolierbaren Subkomplexe schwanken kann [27, 33].

Die genaue Erkennung von Exons und Introns wird durch konservierte Sequenzelemente ermöglicht, die von den Komponenten des Spleißosoms gebunden werden. An der 5'-Spleißstelle (5'ss), auch Spleißdonor (SD) genannt, befindet sich die degenerierte Konsensussequenz NAG/GURAGUNN (R= Purin, N= Purin oder Pyrimidin), wobei der Beginn des Introns durch ein GU-Dinukleotid an Position +1 und +2 gekennzeichnet ist [34]. An der 3'-Spleißstelle (3'ss), auch Spleißakzeptor (SA) genannt, wird das Ende des Introns in über 99% aller annotierten humanen 5'ss durch ein AG-Dinukleotid (YAG/N; Y= Pyrimidin) an Position -2 und -1 definiert. 20-40 Nukleotide stromaufwärts befindet sich die Verzweigungssequenz (BPS: *branch point sequence*) mit dem Motiv YNCURAY. Ein drittes Erkennungsmotiv der 3'ss stellt die 10-20nt lange Pyrimidin-reiche Region dar

## 1. Einleitung

(PPT: Polypyrimidintrakt), die unmittelbar vor dem AG-Dinukleotid liegt [30] (Abb. 1.2).

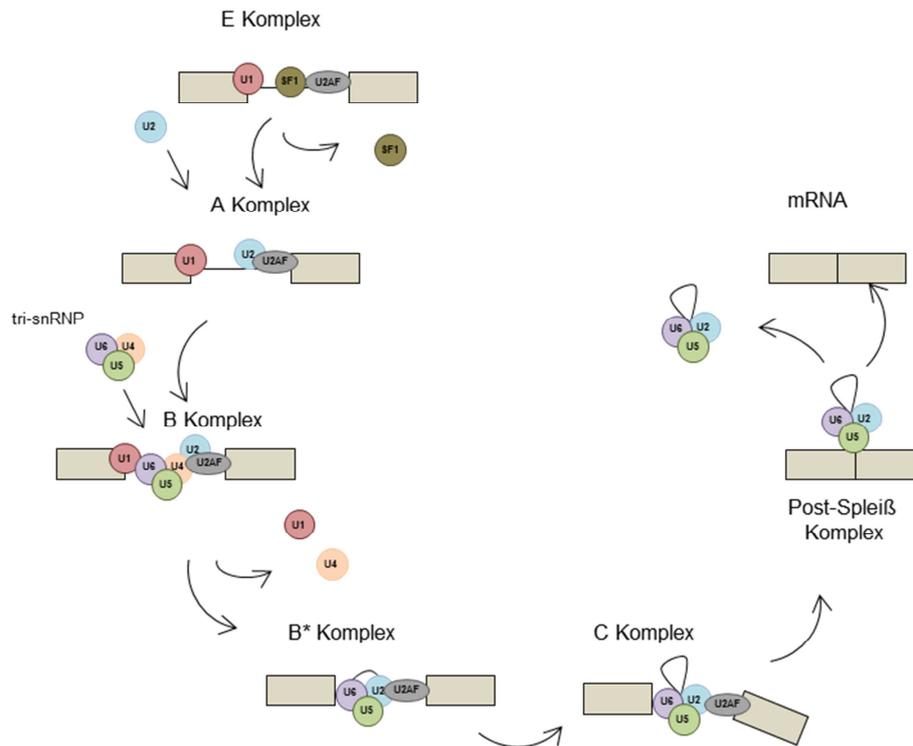


**Abbildung 1.2 Konservierte Sequenzelemente zur Erkennung der Spleißstellen.**

Die 5'ss ist durch die degenerierte Konsensussequenz NAG/GURAGUNN gekennzeichnet. Auf die weiter stromabwärts gelegene Verzweigungssequenz (BPS) folgt der Polypyrimidintrakt (PPT) und die durch ein YAG charakterisierte 3'ss. R= Purin, Y= Pyrimidin, N= Purin oder Pyrimidin.

Der Spleißzyklus beginnt mit der Bindung des U1 snRNPs an die 5'ss (Formation des E („Early“-Komplexes) (Abb. 1.3). Hierbei kann es zu Basenpaarungen der 11 Nukleotide (NAG/GTRAGTNN) der Spleißstelle mit den komplementären Nukleotiden am 5'Ende der U1 snRNA kommen [35]. Unterdessen interagieren nicht-snRNP Faktoren wie SF1/mBBP (*splicing factor 1/ mammalian branchpoint binding protein*) und U2AF (*U2 auxiliary factor*) mit dem Verzweigungspunkt und der Pyrimidin-reichen Region. Dabei kommt es zu einer kooperativen Bindung, in der das C-terminale RNA-Erkennungsmotiv (RRM: *RNA recognition motif*) von SF1/mBBP mit der 65 kDa Untereinheit (U2AF65) von U2AF reagiert [36]. Zusätzlich bindet die 35 kDa Untereinheit (U2AF35) an das AG-Dinukleotid der 3'ss. In einem weiteren Schritt bindet das U2 snRNP ATP-abhängig an die Verzweigungssequenz, sodass der A-Komplex (auch Prä-Spleißosom bezeichnet) ausgebildet wird. Dabei wird SF1/mBBP durch das U2 snRNP verdrängt. Die Reaktion wird durch die Proteinkomplexe SF3a und SF3b, sowie U2AF65 stabilisiert [37, 38]. Die Rekrutierung des vorassemblierten U4/U6 U5 tri-snRNP generiert schließlich den prä-katalytischen B-Komplex [39].

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.3 Der Spleißzyklus.**

Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Erkennung der 5'ss durch das U1 snRNP (U1) und der Bindung von SF1/mBBP und U2AF an die Verzweigungssequenz, den Polypyrimidintrakt und das AG-Dinukleotid der 3'ss (E Komplex). Die Bindung des U2 snRNPs (U2) an die Verzweigungssequenz verdrängt SF1/mBBP und der A Komplex entsteht. Das U4/U6 U5 tri-snRNP kommt hinzu und der B Komplex entsteht, aus dem durch strukturelle Umlagerungen das U1 snRNP und das U4 snRNP entlassen werden (B\* Komplex). Der nukleophile Angriff des Verzweigungsadenosins führt zur Ausbildung einer Lariatstruktur (C Komplex). Durch einen zweiten katalytischen Schritt werden die Exons miteinander verbunden, die Lariatstruktur wird degradiert und die Komponenten des Spleißosoms für einen weiteren Spleißzyklus wieder zur Verfügung gestellt.

Daraufhin kommt es zu Umlagerungen sowohl der RNA-RNA als auch der RNA-Protein Interaktionen, die zur Freisetzung der U1 und U4 snRNPs führen. Schließlich befindet sich das Spleißosom in seinem katalytisch aktiven Zustand (B\*-Komplex). Es folgt die erste von zwei aufeinanderfolgenden Transester-Reaktionen, in der die 2'OH Gruppe des Verzweigungs-Adenosins – lokalisiert in der BPS – die Phosphodiesterbindung der 5'ss nukleophil angreift. Dadurch bildet das nun freigewordene 5'-Ende des Introns mittels einer neugebildeten Phosphodiesterbindung mit dem Verzweigungsadenosin eine Lariatstruktur aus. Nach anschließenden Konformationsänderungen und der Bildung des C-Komplexes folgt der nukleophile Angriff der 3'-Hydroxygruppe des 5'-Exons auf die Phosphodiesterbindung der 3'ss, was zur Ligation der 5'- und 3'-Exons und der Freilassung des Introns führt [30]. Abschließend wird die mRNA entlassen, das Spleißosom dissoziiert und die Spleiß-Komponenten stehen nun für einen weiteren Spleißzyklus zur Verfügung.

## 1. Einleitung

### 1.1.2 Determinanten der Spleißstellennutzung

Die Erkennung der Spleißstellen innerhalb einer prä-mRNA erfordert einen nukleotidgenauen Mechanismus. Die Nutzung einer Spleißstelle wird mitunter von den intrinsischen Stärken der 5'ss (der Komplementarität zur U1 snRNA) und der 3'ss (Pyrimidingehalt des Polypyrimidintraktes und der Verzweigungssequenz) bestimmt.

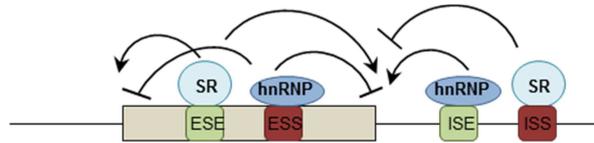
Die Bildung des RNA-Duplex zwischen dem 5'-Ende der U1 snRNA und ihrer Zielsequenz an der 5'ss ist für die Assemblierung des Spleißosoms notwendig. Die ersten Modelle zur Beschreibung der Stärke einer Spleißstelle beruhten auf der Häufigkeitsverteilung der konservierten Nukleotide der Position -3 bis +6 an der 5'ss [40]. Da diese Vorhersagen einige human pathogene Spleißstellenmutationen nicht beurteilen konnten, wurden weitere Konzepte zur Bewertung der intrinsischen Stärke einer 5'ss vorgeschlagen. Der auch in dieser Arbeit verwendete HBond-Score basiert auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der U1 snRNA und den Nukleotiden an den 11 Positionen -3 bis +8 an der 5'ss [35]. Ein weiterer Algorithmus zur Bestimmung der Stärke einer 5'ss stellt der MaxEntScore dar [41], welcher auf dem Prinzip der maximalen Entropie beruht. Solche Vorhersagen liefern durchaus eine solide Tendenz für die Einschätzung der Spleißstellennutzung, stoßen jedoch alle an gewisse Grenzen. So beruhen sie beispielsweise auf der Annahme, dass alle 5'ss durch die U1 snRNA im gleichen Register gebunden werden. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass die U1 snRNA auch alternative Register verwendet und zum Beispiel einzelne Nukleotide von der Basenpaarung auslassen – „*bulgen*“ – kann [42, 43].

Des Weiteren können diese Algorithmen allein nicht erklären, wie es zur bevorzugten Nutzung intrinsisch schwächerer gegenüber stärkeren Spleißstellen kommen kann. Es ist also offensichtlich, dass die intrinsische Stärke allein nicht ausreicht, um die Nutzung einer Spleißstelle zu definieren. Das Vorhandensein von spleißfördernden (Enhancer) oder spleißhemmenden (Silencer) Elementen in der Umgebung der Spleißstellen und ihre dazugehörigen *trans*-agierenden Proteine tragen maßgeblich zu ihrer Nutzung bei [34].

Zu den am besten charakterisierten Spleißfaktoren gehören die Proteine der SR (Serin/Arginin)- und hnRNP- (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) Familie. Ihr Beitrag zur Spleißstellennutzung ist dabei von ihrer relativen Position zu dieser

## 1. Einleitung

abhängig. SR Proteine fördern das Spleißen von einer exonischen Position, während sie es von einer intronischen reprimieren. Genau andersherum verhalten sich die hnRNPs [44] (Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4 SR und hnRNP Proteine regulieren das Spleißen.**

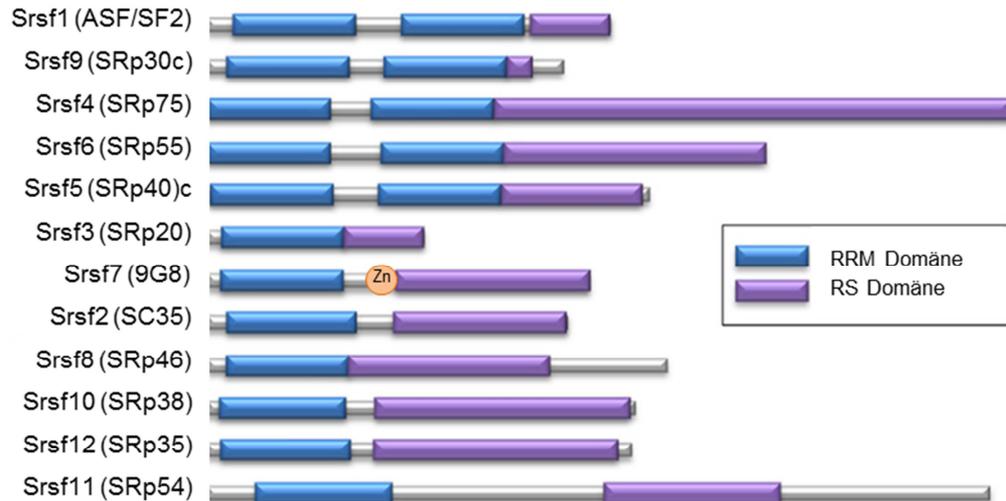
ESE (*exonic splicing enhancer*)-gebundene SR Proteine (hellblau) fördern den Exoneinschluss, während sie an ein ISS (*intrinsic splicing enhancer*) gebunden einen negativen Einfluss auf den Einschluss ausüben. hnRNP Proteine (dunkelblau) verhalten sich entgegengesetzt: Von einer exonischen Position reprimieren sie den Exoneinschluss, während sie ihn von einer intronischen Position fördern.

### 1.1.3 Die SR Protein Familie

Die Mitglieder der konservierten Familie der SR Proteine sind in eukaryotische Zellen äußerst abundant exprimiert, einige von ihnen zählen sogar zu den 2% der am stärksten translatierten Gene [45]. Sie sind durch ihre Fähigkeit charakterisiert, gleichzeitig sowohl mit RNAs als auch mit Proteinen interagieren zu können. Dafür besitzen sie ein oder zwei N-terminale RNA Erkennungsmotive (RRM), die auch ihre Substratspezifität bestimmen [46] und ihre namensgebende C-terminale Arginin und Serin-reiche RS Domäne (Serin (S) und Arginin (R)), die die Interaktion mit weiteren Proteinen erlaubt [47]. SRSF7 enthält zudem noch eine Zink-Domäne (Zn), die vermutlich zusätzlich mit RNA interagieren kann [48] (Abb.1.5). SR Proteine binden eine etwa 4-8 nukleotidlange, degenerierte Sequenz, die es ihnen ermöglicht, eine Vielzahl unterschiedlicher Gene zu regulieren [49].

Sie sind vorwiegend dafür bekannt, die Assemblierung des Spleißosoms durch die Bindung an ein ESE (*exonic splicing enhancer*) zu unterstützen [50, 51]. Dabei scheinen sie durch eine Interaktion mit dem U1 snRNP assoziierten Protein U1-70 K die Formation des E-Komplexes phosphorylierungsabhängig zu stabilisieren [52-54]. An intrinsisch schwachen 3'ss fördern sie zudem die Bindung von U2AF65 und U2AF35 [55]. Ferner unterstützen sie die Assemblierung des A-Komplexes durch Interaktion mit der Verzweigungssequenz [56].

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.5 SR Proteine.**

SR Proteine sind modular aufgebaut: Sie besitzen ein oder zwei RRM Domänen und eine RS Domäne unterschiedlicher Größe. SRSF7 besitzt zusätzlich noch eine Zink (Zn) Domäne. Abbildung modifiziert nach [57].

Für einige SR Proteine konnten neben der Beteiligung am alternativen Spleißen zahlreiche weitere Aufgaben ausgemacht werden. SRSF1 scheint vor allem auch während der Translation im Cytoplasma von Bedeutung zu sein [58, 59]. SRSF1-gebundene mRNAs können Komponenten des mTOR (*mammalian target of rapamycin*) Signalweges rekrutieren, wodurch 4E-BP (*eIF4E-binding protein*) inaktiviert wird und der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor eIF4E die Cap-abhängige Translation aktivieren kann [60]. Auch für andere SR Proteine konnte eine Beteiligung bei der Regulation der Translation nachgewiesen werden. SRSF3 zum Beispiel verstärkt die IRES- (*internal ribosome entry site*) abhängige Translation viraler mRNAs [61], während SRSF7 die Translation von ungespleißter mRNA fördert, die ein CTE (*constitutive transport element*) enthält [62]. Kürzlich konnte auch eine Rolle von SRSF1 bei der Zellantwort auf DNA Schäden ausgemacht werden. So scheint die Phosphorylierung von SRSF1, welche zu einer Veränderung des Spleißmusters bestimmter Zielgene führt, durch DNA-schädigende Einflüsse verändert zu werden [63]. Ebenso konnte die Stabilisierung bestimmter Transkripte sowie die Regulation von microRNAs und langen nicht-codierenden RNAs (lncRNAs) mit SR Proteinen in Verbindung gebracht werden [49].

Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass Transkription und Spleißen zwei voneinander unabhängige Mechanismen darstellen. Mittlerweile verdichten sich jedoch die Beweise dafür, dass das Spleißen bereits während der Transkription stattfindet oder mit dieser sogar gekoppelt ist [64-66]. In Minigen-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II

## 1. Einleitung

(Pol II) für die Rekrutierung und somit die Spleißaktivität von SRSF3 notwendig ist [67]. Umgekehrt scheint SRSF2 einen direkten Einfluss auf die Transkriptionsrate von Pol II zu haben [68, 69].

Passend zu ihrer vorherrschenden Rolle während des Spleißens sind die SR Proteine überwiegend im Nukleus lokalisiert [70, 71]. Bis auf SRSF2 und SRSF5 konnte für alle SR Proteine zudem gezeigt werden, dass sie sich zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma hin und her bewegen [72, 73]. Dabei interagieren sie mit dem mRNA Export Rezeptor TAP/NFX1 und tragen somit vermutlich zum Export von mRNAs bei [74]. SRSF3 und SRSF7 scheinen insbesondere den Export von intronlosen Transkripten zu aktivieren [75].

Für die Aktivität und Lokalisation der SR Proteine ist ihre Phosphorylierung essentiell. So ist beispielweise für die Erkennung von Spleißstellen eine Phosphorylierung notwendig, nicht aber für die Katalyse des Spleißens [76, 77]. Die Phosphorylierung von SR Proteinen wird hauptsächlich durch die SR-Protein-spezifischen Kinasen (SRPK) und die *CDC-like* Kinasen (CLK) realisiert [78-80]. Beide Gruppen phosphorylieren Serin-Reste in der RS-Domäne der SR Proteine, zeigen aber ungleiche Substratspezifitäten [79]. Außerdem unterscheiden sich die Kinasen in ihrer subzellulären Lokalisation: SRPKs lassen sich sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus nachweisen [81], während CLKs ausschließlich im Nukleus – vorwiegend gemeinsam mit SR Proteinen – lokalisieren [82]. Daher wird angenommen, dass diese beiden Kinase-Familien kooperativ die Regulation der SR Proteine übernehmen. So könnte die SRPK-abhängige Phosphorylierung für den Import in den Nukleus verantwortlich sein, während die CLKs dann dort die Feinjustierung übernehmen. Auch externe Signale können mittels Kinasen an den Spleißapparat weitergegeben werden. Als Antwort auf den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) regt die Akt Kinase die Autophosphorylierung von SRPK an, was zu ihrer vermehrten Translokation in den Nukleus und schließlich zur vermehrten SR Protein Phosphorylierung führt [83]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben der Akt-Kinase [84, 85] auch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), wie CDK13 SR Proteine, phosphorylieren können [86].

SR Proteine erfüllen neben ihrer substantiellen Funktion als spleißregulatorische Proteine also auch zahlreiche weitere Aufgaben der Genregulation inner- und außerhalb des Nukleus.

## 1. Einleitung

### 1.1.4 hnRNPS

Die hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) stellen eine weitere Gruppe von RNA-bindenden Proteinen dar. Die RRM-Domäne der hnRNPs wird durch eine  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  Struktur und zwei degenerierte RNP Konsensussequenzen RNP-1 und RNP-2 [87], mittels derer sie mit RNA-Molekülen interagieren können, charakterisiert. Des Weiteren besitzen die hnRNPs RGG-Boxen, Wiederholungen von Arginin-Glycin-Glycin-Tripeptiden, die von aromatischen Aminosäuren durchzogen sind [88]. Trotz dieser strukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die verschiedenen hnRNPs in ihrer Zusammensetzung und ihrer funktionalen Eigenschaften deutlich voneinander, weshalb sie auch in verschiedene Familien unterteilt werden.

Die Familie der hnRNPs A/B umfasst die Proteine A1, A2/B1, A3 und A0. Die hnRNPs A1 und A2/B1 sind schon lange als Repressoren des prä-mRNA Spleißens bekannt. Hierbei konnte eine antagonistische Funktionsweise gegenüber den SR-Proteinen beobachtet werden [89, 90]. Es werden derzeit verschiedene Modelle, die den Mechanismus der hnRNP A1-abhängigen Spleißregulation erklären können, diskutiert. So wird vermutet, dass die Bindung eines hnRNP A1 Proteins an die mRNA die Bindung weiterer hnRNPs zur Folge hat, wodurch die Bindung spleißfördernder SR-Proteine blockiert wird [91]. Auch kann hnRNP A1 einen direkten Einfluss auf die Assemblierung des Spleißosoms nehmen, in dem es an ein an der Verzweigungssequenz liegendes ISS (*intronic splicing silencer*) bindet und dadurch die Rekrutierung des U2 snRNPs verhindert [34]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass im Intron bindende hnRNPs den Exon Einschluss fördern können, ihre Funktion also von ihrer Position bezüglich der Spleißstelle abhängig ist [44, 92]. Weitere Aufgaben der hnRNPs A/B sind unter anderem das Verpacken von naszierenden Transkripten [93] und die Regulation von miRNAs (microRNAs) [94]. Zusammen mit Vertretern der hnRNP A/B Familie übernimmt auch hnRNP C Funktionen während des Verpackens von naszierenden viralen Transkripten. Auch ist es dazu in der Lage, die Translation bestimmter mRNAs Zellzyklus-abhängig durch die Bindung an deren IRES Sequenzen zu verstärken [95, 96].

Für das sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch vorkommende hnRNP D konnte eine Beteiligung an der Translation von HCV (Hepatitis C Virus) mRNA nachgewiesen werden, wobei ein Knockdown von hnRNP D die Virusinfektion

## 1. Einleitung

deutlich verringerte [97]. Des Weiteren ist hnRNP D an der Regulation der mRNA Stabilität bzw. dessen Abbau beteiligt [98].

Die hnRNP E/K Familie, zu denen E1, E2 und K zählen, unterscheiden sich von den restlichen hnRNPs durch den Besitz von drei KH (*K homology*) Domänen anstelle von RRM. hnRNP K scheint auch als intronischer Spleißenhancer fungieren zu können [99]. Als Ko-Faktor von p53 spielt hnRNP K darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Regulation der transkriptionalen Antwort auf DNA Schäden [100].

Für Mitglieder der Familie der hnRNP F/H Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an eine G-reiche Sequenz innerhalb der HIV-1 mRNA binden und dadurch die Nutzung einer 5'ss unterdrücken. Ein Mechanismus, der für die Virusreplikation essentiell ist [101]. Zusätzlich konnte hnRNP F eine Rolle bei der Regulation der Polyadenylierungsstelle der mRNA des Immunoglobulin Gens durch die Blockierung der Rekrutierung von Cleavage-stimulierenden Faktoren zugewiesen werden [102].

hnRNP I wurde als Polypyrimidintrakt-bindendes Protein identifiziert und wird daher auch als PTB (Polypyrimidintrakt bindendes Protein) bezeichnet [103]. Es inhibiert das Spleißen während der A-Komplex Bildung durch Interaktion mit anderen Spleißfaktoren [104]. Außerdem kann es den Exon-Einschluss durch Konkurrieren mit U2AF um die Bindungsstelle des Polypyrimidintraktes verringern [105]. Genomweite Studien haben ergeben, dass hnRNP I sowohl als Enhancer als auch als Repressor während des Spleißvorgangs agieren kann [106].

Die hnRNPs stellen demnach eine Reihe von heterogenen Proteinen dar, die entscheidende Rollen beim mRNA-Metabolismus übernehmen.

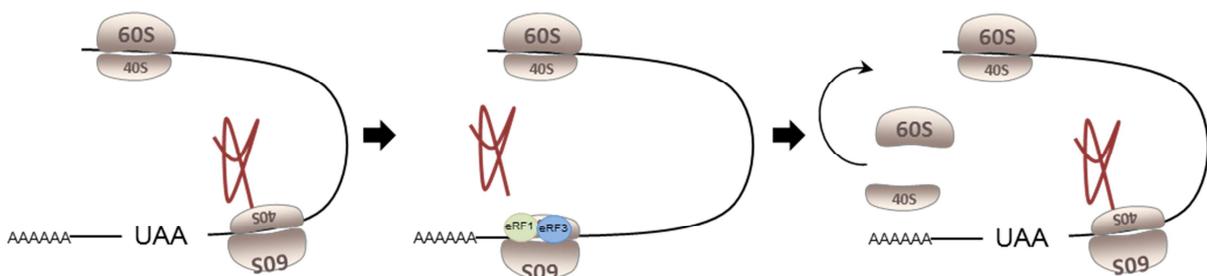
## 1.2 Translation

Die eukaryotische Translation beginnt mit der Bindung des *ternary complex* (TC), bestehend aus der Initiator Methionyl-tRNA (Met-tRNA) und der GTP-gebundenen Form des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF2) an die kleine (40S) Untereinheit des Ribosoms, wodurch der 43S prä-Initiationskomplex (PIC) entsteht. Dieser bindet an das 5'-Ende der mRNA und scannt diese solange, bis das entsprechende komplementäre Anticodon zur Met-tRNA gefunden ist. Daraufhin wird die 60S Untereinheit rekrutiert und der 80S Initiationskomplex gebildet, sodass die Elongationsphase starten kann [107].

## 1. Einleitung

### 1.2.1 Normale Translationstermination

Die Translation wird beendet, sobald das Ribosomen – ausgelöst durch das Erkennen eines Stoppcodons (UAA, UAG oder UGA) – an dieser Position anhält. Dabei initiiert der eukaryotische Terminationsfaktor 1 (eRF1 „*eucaryotic release factor I*“) präzise eine zu dem Stoppcodon passende tRNA, die üblicherweise die Anheftung einer weiteren Aminosäure an die entstehende Peptidkette vermittelt [108]. Durch eRF1 kommt es stattdessen jedoch zur Hydrolyse der synthetisierten Peptidkette [109]. Unterstützt wird dieser Prozess durch die GTPase Funktion eines weiteren eukaryotischen Terminationsfaktors eRF3 („*eucaryotic release factor III*“) [110, 111]. Um nun Raum für das nachfolgende Ribosom zu schaffen, dissoziiert der 80S Komplex unter ATP Verbrauch mit Hilfe des „*ATP-binding cassette subunit family E member 1*“ (ABCE1) [112] (Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6 Die Translationstermination.**

Die Erkennung eines Stoppcodons (UAA) führt zu Bindung der eukaryotischen Terminationsfaktoren 1 und 3 (eRF1 und eRF3) an das Ribosom und dem Entlassen der synthetisierten Peptidkette. Die Untereinheiten (60S und 40S) dissoziieren, um eine neue Translationsrunde zu initiieren.

### 1.2.2 Aberrante Termination

Der mehrstufige Prozess der mRNA Prozessierung verläuft – wie jeder andere biologische Ablauf – nicht fehlerfrei. Um die Synthese von potentiell schädlichen Proteinen zu verhindern bzw. keine unnötigen Ressourcen zu vergeuden, wird die Integrität der synthetisierten mRNAs daher bereits während der initialen Translationsphase im Cytoplasma überprüft [113, 114]. Es existieren drei verschiedene Qualitäts-Kontroll-Mechanismen, die unterschiedliche Merkmale einer fehlerhaften mRNA erkennen. Der „*No-Go decay*“ beseitigt mRNAs, die aufgrund von Sekundärstrukturen oder bestimmten Sequenzelementen wie Stem-loops, Pseudoknoten oder beschädigten Basen mit stagnierenden Ribosomen besetzt sind

## 1. Einleitung

[115]. Der „*Non-Stop decay*“ ist für fehlerhafte mRNAs verantwortlich, denen ein Stoppcodon im Leseraster fehlt [116].

Der „*Nonsense-mediated decay*“ (NMD) Mechanismus ist bislang wohl der meiststudierte mRNA-Qualitäts-Kontrollapparat. Er wurde ursprünglich als Instrument zur Erkennung von Mutationen verstanden, die durch das Vorkommen eines vorzeitigen Stoppcodons („*premature stop codon*“ PTC) gekennzeichnet sind und deren resultierendes Protein daher C-terminal trunziert wäre. Bereits in den 90er Jahren wurde bekannt, dass ca. 30% aller erblichen Genmutationen auf ein solches vorzeitiges Stoppcodon zurückzuführen sind [117]. Später wurde jedoch deutlich, dass NMD – neben seiner Funktion als Wächter über die Unversehrtheit der mRNA – auch eine entscheidende post-transkriptionale Drehschraube für die Regulation zahlreicher physiologischer Gene darstellt [118]. So konnte durch genomweite Studien gezeigt werden, dass ca. 5-10% des Transkriptoms von *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* durch NMD verändert wird [119-121]. Eine ähnliche Größenordnung von sogenannten endogenen NMD Transkripten wird für humane Zellen angenommen [122, 123].

Im folgenden Abschnitt werden sowohl die NMD-auslösenden Eigenschaften einer mRNA, als auch der bisherige Wissenstand zu den molekularen Abläufen der mRNA Degradation beschrieben.

### 1.2.3 Nonsense-mediated decay

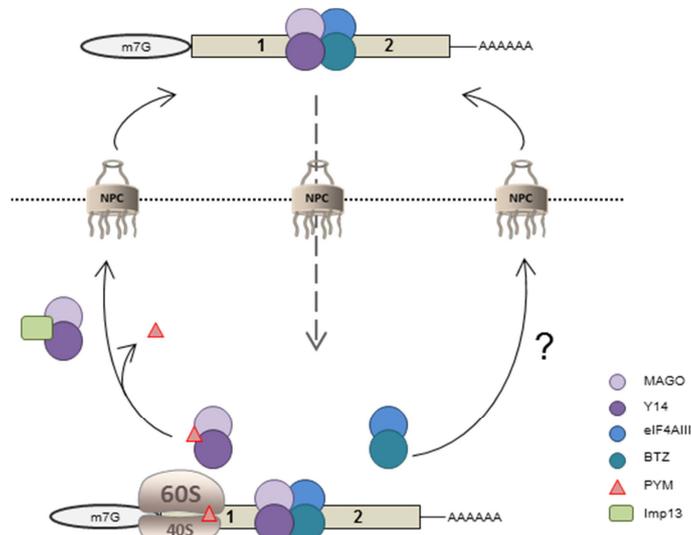
#### 1.2.3.1 Der EJC

Der EJC (*exon junction complex*) ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, der während des Spleißvorgangs im Zellkern etwa 20 Nukleotide stromaufwärts der meisten Spleißjunctions abgelegt und erst im Zuge der Translation im Cytoplasma beseitigt wird [124, 125]. Der EJC dient als Kommunikator zwischen nukleären und cytoplasmatischen Prozessen und erweist sich als molekulare Erklärung für die fördernde Wirkung des nukleären Spleißens auf die Translation [126, 127].

Das EJC-Grundgerüst wird von vier Proteinen gestellt, die bis zu ihrer Entladung während der Translation permanent an der mRNA haften bleiben: Barentsz (BTZ), MAGO, Y14 und eIF4AIII. Sie bilden die Bindungsplattform für weitere, assoziierte, transiente Bindungspartner, wie z.B. den Export Faktoren REF/Aly und Tap oder den NMD-Faktoren aus der UPF Familie [128].

## 1. Einleitung

eIF4AIII und der MAGO-Y14 Dimer binden bereits an die mRNA, bevor der Spleißvorgang vollständig abgeschlossen ist [129, 130]. Die Bindung dieser Proteine ist dabei nicht abhängig von bestimmten RNA Sequenzen. Vielmehr – so zeigte die Aufklärung der Kristallstruktur – umklammert der Komplex die RNA unabhängig von seiner Nukleotidsequenz. Welche Determinanten genau für diese Interaktion notwendig sind, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Bekannt ist, dass das DEAD-box Protein eIF4AIII dabei ATP-abhängig die RNA bindet, während MAGO-Y14 diese Bindung durch die Inhibierung der eIF4AIII ATPase-Aktivität stabilisiert [131, 132]. BTZ schließt sich diesem prä-EJC erst an, wenn die mRNA bereits vom Spleißosom getrennt ist [130] (Abb. 1.7).



**Abbildung 1.7 Der Exon-Junction-Complex (EJC).**

Die Komponenten des EJC MAGO, Y14, eIF4AIII und BTZ assemblieren auf einer Spleißjunction und fördern unter anderem den nukleären Export der mRNA. Der Dissoziationsfaktor PYM reguliert schließlich die Dissoziation der Komponenten während der Translation. Der Rücktransport in den Nukleus von MAGO-Y14 wird durch Imp13 reguliert. Für eIF4AIII und BTZ ist der Mechanismus noch nicht aufgeklärt. Verändert nach [125].

Der cytoplasmatische Dissoziationsfaktor PYM interagiert schließlich mit MAGO-Y14 und stellt sicher, dass die Disassemblierung des EJC von der mRNA erst während der Translation stattfindet, da seine Aktivität von der Assoziation mit dem Ribosom abhängt [133-135].

Aufgrund der 10-30fach höheren Menge von Exon-Exon-Junctions im Verhältnis zu den einzelnen Komponenten des EJC in Zelllysaten scheint das Recycling der einzelnen Bestandteile des EJC unabdingbar zu sein [125]. Für das MAGO-Y14 Heterodimer konnte bereits gezeigt werden, dass der Importfaktor Importin 13 (Imp13) für den Rücktransport in den Nukleus verantwortlich ist [136]. Dabei blockiert

## 1. Einleitung

diese Bindung die Oberfläche von MAGO-Y14 derart, dass sie für eine weitere Bindung wie z.B. mit PYM unzugänglich ist und so der Verbleib von PYM im Cytoplasma gewährleistet wird [137]. Der Rücktransport von BTZ und eIF4AIII konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass ein ähnlicher Importweg existiert und eine erneute Assemblierung der EJC Komponenten im Nukleus stattfindet.

### 1.2.3.2 Aktivierung von NMD

Um als vorzeitiges Stoppcodon (PTC) erkannt zu werden, muss dieses mindestens 50-55 Nukleotide stromaufwärts einer Exon-Exon Grenze positioniert sein [138, 139]. Transkripte, die ein PTC beinhalten, jedoch intronlos sind, sind demnach immun gegen NMD [140, 141]. Spleißen ist also eine notwendige Voraussetzung, um vorzeitige Stoppcodons zu identifizieren und die entsprechende mRNA zu degradieren. Dass die Translation für die Durchführung von NMD notwendig ist, ist unumstritten [142, 143]. Ob NMD jedoch ausschließlich während der initialen Translationsrunde [144] oder – wie neuere Studien postulieren – auch in den darauffolgenden stattfinden kann, bleibt weiter zu bestätigen [145, 146].

Aberrante sowie die normale Translationstermination starten sobald das Stoppcodon die A-Seite eines translatierenden Ribosoms betritt. Während die normale Termination anschließend jedoch schnell und effizient verläuft, scheint die aberrante Termination hingegen zeitverzögert zu erfolgen. So konnte an normalen Stoppcodons in „Toeprint“ Analysen kein Ribosom detektiert werden, während es an Vorzeitigen stets noch nachzuweisen war [147, 148]. Der genaue Mechanismus, wie das Vorkommen eines PTCs schließlich die Degradation des Transkripts hervorruft, ist nicht endgültig entschlüsselt. Es wird jedoch vermutet, dass UPF1 (*up frameshift protein 1*) und PABPC1 um die Bindung mit dem Ribosomen-assoziierten Faktor eRF3 konkurrieren und der Abstand von PABPC1 zum Stoppcodon schließlich entscheidet, ob die mRNA dem NMD zugeführt wird.

Das 130 kDa große UPF1 gilt als zentrales NMD Protein und gehört zu der Helikase Super Familie 1 (SF1). Identifiziert wurden die UPFs durch Studien in Hefen, in denen ihre Mutationen die Stabilität einer mRNA mit einer +1 „frameshift“ Mutation erhöhen konnten [149]. UPF1 weist eine RNA-abhängige ATPase und eine 5'-3' RNA Helikase Aktivität auf, die für ihre direkte RNA Bindung verantwortlich und somit für die Funktion als NMD Faktor essentiell ist [150-152]. UPF1 ist ein multifunktionales

## 1. Einleitung

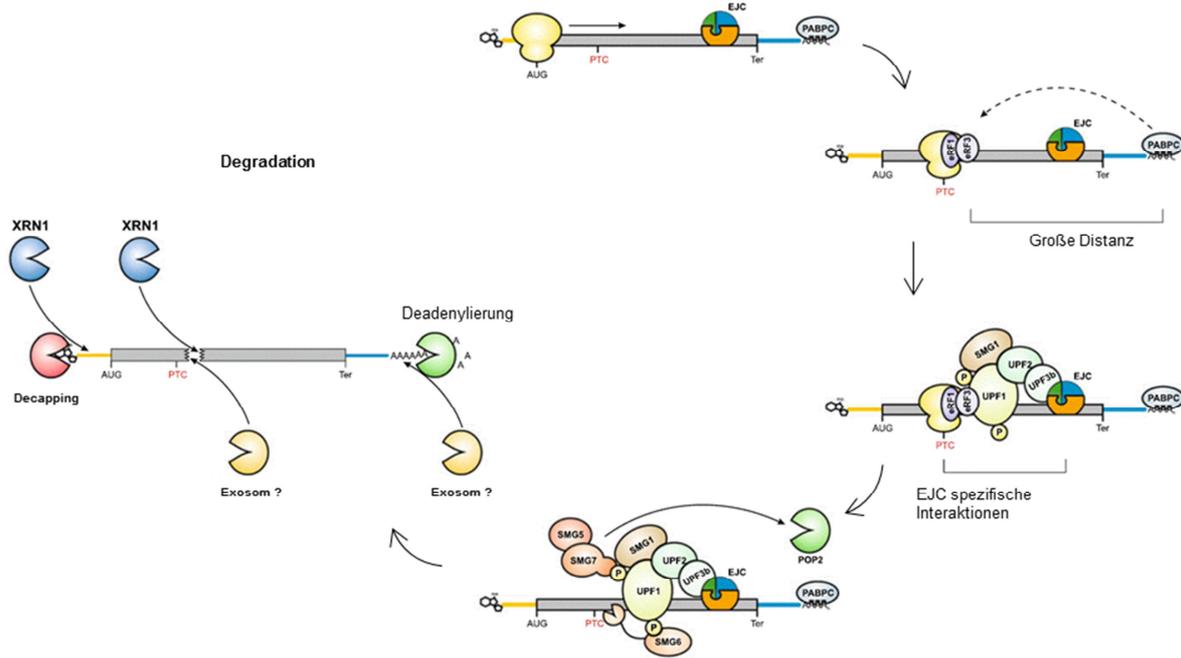
Protein, das zudem auch in der DNA Reparatur und der Telomer Homöostase eine Rolle spielt [153, 154].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass UPF1 ausschließlich an das terminierende Ribosom durch Interaktion mit eRF1 und eRF3 rekrutiert wird [155]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass es generell auf gespleißten Transkripten – vorzugsweise in der 3'untranslatierten Region (3'UTR) – bindet [156-158]. Die Bindung scheint dabei unabhängig von der NMD Eigenschaft des Transkripts zu sein.

Ein Modell zum Ablauf von NMD, wenn UPF1 in der 3'UTR bindet, schlägt vor, dass PABPC1 und UPF1 um die Interaktion mit dem Terminationsfaktor eRF3 konkurrieren. Dabei scheint die Interaktion mit PABPC1 zu dominieren, denn die UPF1-eRF3 Interaktion lässt sich mit zunehmenden Mengen von PABPC1 aufheben [159] und künstlich platziertes PABPC1, stromabwärts eines ansonsten erkannten PTCs, kann die Degradation verhindern [147, 160]. Wenn das PTC jedoch weit genug von der PABPC1 Bindestelle entfernt ist, überwiegt die UPF1 Interaktion mit eRF3. Die unterschiedlichen Bindestellen von UPF1 und PABPC1 an eRF3 [161-163] und die Tatsache, dass mutiertes PABPC1, welches nicht mehr in der Lage ist mit eRF3 zu interagieren, trotzdem noch NMD inhibieren kann, deuten jedoch auf einen weitaus komplexeren Vorgang als schlichte Konkurrenz um die Bindung hin [164, 165] (Abb. 1.8).

Ein weiteres Modell zur Erklärung der auf die Erkennung eines PTCs folgende Degradation bezieht die Translationsinitiation mit ein. Die mRNA liegt während der Translation nicht als starres, unflexibles Molekül vor – eher bilden seine beiden Enden eine ringartige Struktur aus, sodass die Re-Assoziation der Ribosomen zügig ablaufen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PABPC1 mit dem Initiationsfaktor eIF4G, welcher die Zirkularisierung der mRNA auslöst, für die PABPC1-abhängige NMD Inhibition notwendig ist [165]. Außerdem kann eIF4G, in ähnlicher Weise wie PABPC1, im artifiziellen System NMD entgegensteuern und PABPC1 verliert diese Fähigkeit, wenn die Interaktion mit eIF4G zuvor verhindert wurde [164, 165]. Es scheint also ein komplexes Zusammenwirken von Translationstermination, mRNA Zirkularisierung und NMD Aktivierung zu existieren.

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.8 Modell zur Degradation eines NMD-sensitiven Transkripts.**

Sobald das Ribosom ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC) erkennt, wird es von den Translationsterminationsfaktoren eRF1 und eRF2 gebunden. Die Distanz zwischen dem am poly(A)-Schwanz gebundenen PABPC und eRF3 ist für eine effiziente Interaktion zu groß. Stattdessen bindet UPF1 an eRF3 und der stromabwärts gelegene EJC dient als Bindungsplattform für UPF3b und UPF2. SMG1 phosphoryliert schließlich UPF1, wodurch das SMG5/7 Heterodimer als auch die Endonuklease SMG6 rekrutiert werden. SMG6 schneidet das Transkript und SMG5/7 rekrutieren den Deadenylierungskomplex POP2. Die NMD Komponenten werden von der mRNA entlassen. Die Exonuklease XRN1 degradiert das Transkript in 5' zu 3' Richtung und das Exosom in 3' zu 5' Richtung. Verändert nach [166].

Bekannt ist, dass die nicht-enzymatischen Komponenten der NMD Maschinerie, UPF2 und UPF3, die Brücke zwischen UPF1 und dem EJC bilden und die Helikase-Funktion von UPF1 unterstützen [152]. Aktiviert wird UPF1 durch die Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase verwandten Protein Kinase SMG1 (*suppressor with morphogenetic effect on genitalia*) [167-170]. Phosphoryliertes UPF1 dient schließlich als Bindungsplattform für die weiteren NMD Kern-Faktoren SMG5, SMG6 und SMG7 [171] und interagiert direkt mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF3, um die eIF3-vermittelte kontinuierliche Translationsinitiation zu verhindern [172]. Da sowohl die Phosphorylierung als auch die De-Phosphorylierung für den reibungslosen Ablauf von NMD essentiell sind, wird angenommen, dass UPF1 einem zyklischen Phosphorylierungsablauf unterliegt [166], was zu einem Umbau des geladenen mRNP Komplexes führt.

Die letztendliche Degradation der mRNA kann schließlich über zwei Wege ablaufen: der SMG6-vermittelten endonukleären Spaltung oder der SMG5-SMG7-vermittelten Deadenylierung/Decapping. Auf ersteren ist man durch die Beobachtung gestoßen,

## 1. Einleitung

dass das Ausschalten der exonukleären Degradationsmaschinerie nicht ausreicht, um NMD-sensitive Transkripte zu stabilisieren. Dagegen konnte eine Anhäufung von 3'-und 5'-RNA Fragmenten nach Ausschalten der 5'-3' Exonuklease XRN1 oder des 3'-5' degradierenden Exosoms bemerkt werden; Indizien, die auf eine Endonuklease-Aktivität hindeuteten [173]. Schnell konnte SMG6 als die verantwortliche Nuklease ausgemacht werden, die in der näheren Umgebung des PTCs die Spaltung durchführt [174, 175]. Die entstandenen Fragmente werden schließlich von XRN1 und dem Exosom degradiert.

Die zweite Route verläuft über das SMG5-SMG7 Heterodimer, wobei SMG5 und SMG7 über ihre N-terminalen Domänen miteinander verbunden sind [176, 177]. SMG7 ist hierbei der entscheidende Faktor, der über seinen C-Terminus schließlich direkt mit POP2 – der katalytischen Untereinheit des CCR4-NOT Deadenylierungskomplexes – interagiert [178, 179]. Es folgt das DCP2-abhängige Decapping und der 5'-3' gerichtete Abbau der mRNA durch die Exonuklease XRN1 [180] (Abb. 1.8).

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die SMG6-abhängige Degradation den bevorzugten Abbaumechanismus darstellt [181, 182]. Eine vollständige Stabilisierung von PTC-Transkripten kann jedoch nur erzielt werden, wenn beide Wege ausgeschaltet sind. Weitere Arbeiten deuten auf einen dritten Degradationsmechanismus hin; hierbei interagiert das „*proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2*“ (PNRC2) direkt mit UPF1 und dem Decapping Komplex DCP1, was schließlich zum exonukleären Abbau der mRNA führt [183, 184].

Neben dem Vorkommen eines EJC gibt es noch ein weiteres Merkmal, das die Degradation der mRNA durch NMD auszulösen scheint: eine lange 3'untranslatierte Region (3'UTR). Die Bindung von UPF1 an 3'UTRs ist zwar ubiquitär, scheint jedoch stark längenabhängig zu sein [185]. So konnte mittels Reporterkonstrukten nachgewiesen werden, dass ein EJC hinter einem Stoppcodon zwar NMD fördert, aber für die Degradation nicht unbedingt erforderlich ist. Vielmehr scheint bei Stoppcodons, die im letzten Exon lokalisiert sind, die Distanz zwischen ihnen und dem poly(A)-Schwanz entscheidend zu sein [186]. Viele humane mRNAs haben allerdings eine sehr lange 3'UTR (> 400 Nukleotide), lösen aber dennoch kein NMD aus. Singh und Kollegen spekulieren daher, dass es bestimmte *cis*-Elemente hinter dem Stoppcodon gibt, die dem NMD entgegenwirken könnten. Ein potentieller

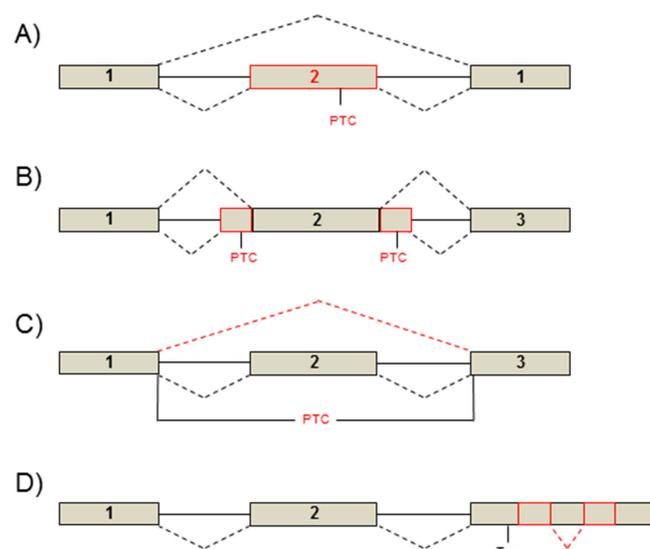
## 1. Einleitung

Kandidat für die Bindung an ein solches *cis*-Element ist PABPC1, das – wie schon erwähnt – die Interaktion zwischen eRF3 und UPF1 verhindern kann, wenn es nah genug hinter einem Stoppcodon bindet [159]. Das Vorhandensein solcher Elemente konnte bei einigen humanen mRNAs bestätigt werden, die besonders A/U reiche Sequenzen aufweisen; eine bevorzugte Bindesequenz für PABPC1 [187]. Da dies aber nicht für alle mRNAs mit langen 3'UTRs – die resistent gegen NMD sind – zutrifft, muss es noch weitere Mechanismen geben, die es erlauben der Degradation durch NMD zu entgehen.

Es bleibt also weiter zu ergründen, warum nicht alle langen 3'UTRs für NMD sensitiv sind und ob lediglich die Komposition der auf ihnen bindenden *trans*-Faktoren entscheidend ist. Klar ist jedoch, dass mRNAs mit solch langen 3'UTRs auch durch den SMG6-vermittelten endonukleären Verdau degradiert werden [188].

### 1.2.3.3 Alternatives Spleißen und NMD

Alternatives Spleißen kann durch den Einschluss eines sogenannten „*Poison Exons*“ oder durch die alternative Nutzung einer 5'ss oder 3'ss zur Einführung eines PTCs führen. Ferner kann der Ausschluss eines Exons zur Verschiebung des Leserahmens und somit in der Entstehung eines PTCs resultieren. Auch kann ein weiteres Spleißereignis im 3'UTR ein vormals normales Stoppcodon in ein vorzeitiges umwandeln (Abb. 1.9).



**Abbildung 1.9 Alternatives Spleißen und die Generierung eines PTCs.**

Eine mRNA kann durch alternatives Spleißen NMD-sensitiv werden. Ein PTC kann durch den Einschluss eines Exons (A), durch die Nutzung alternativer 3'ss oder 5'ss (B), durch den Ausschluss eines Exons (C) oder das Herausspleißen eines Introns im 5'UTR in Erscheinung treten.

## 1. Einleitung

Die Entdeckung zahlreicher PTC enthaltener Spleißvarianten, in Verbindung mit bioinformatischen Vorhersagen, hat zu der Überlegung geführt, dass die Verknüpfung von alternativem Spleißen und NMD eine weitere Ebene der post-transkriptionalen Genregulation darstellen könnte [189-193]. Eine kurze Zeit später publizierte Studie postulierte hingegen eine untergeordnete Rolle von an alternativem Spleißen gekoppeltem NMD [194]. Bei den etwa 3000 mittels Microarray untersuchten Kassetten-Exon Ereignissen konnten weder gewebespezifische Expressionsunterschiede in den PTC Isoformen noch eine Reduktion des totalen Transkriptlevels bei Zunahme der jeweiligen PTC Isoform beobachtet werden. Dies wäre durchaus zu erwarten gewesen, wenn die Generierung der PTC Isoform einen Einfluss auf die Genregulation haben sollte.

Auch wenn die Verknüpfung von alternativem Spleißen mit NMD für das gesamte Genom noch in Frage gestellt ist, so ist unumstritten, dass die Genexpression von einigen Mitgliedern der beiden Familien der spleißregulatorischen Proteine – SR Proteine und hnRNPs – auch über NMD reguliert wird [189, 195, 196]. SR Proteine codieren sogar sogenannte „ultrakonservierten Bereiche“, die zwischen Maus und Mensch hoch konserviert sind und die Verknüpfung von alternativem Spleißen mit NMD erlauben [197, 198]. Später konnten diese Gene um Komponenten des Spleißosoms erweitert werden [199]; ein eindeutiger Hinweis darauf, dass der Prozess des Spleißens selber stark durch NMD reguliert wird. In einigen Fällen wird das unproduktive Spleißen sogar durch eine Autoregulation realisiert, in dem die SR Proteine ihre eigene mRNA binden und so die Entstehung der PTC Variante fördern. SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF4 und SRSF 7 scheinen dadurch ein homöostatisches Level ihrer Proteinmenge zu gewährleisten [189, 195, 196, 200-202]. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass SR Proteine – die vorwiegend für ihre spleißfördernde Wirkung bekannt sind – ihre PTC Varianten durch einen Exon-Einschluss regulieren, während die hnRNPs – die vorwiegend für ihre spleißreprimierende Wirkung bekannt sind – ihre PTC Varianten durch das Nicht-Einbinden eines Exons regulieren [198].

Weiterhin sollen SR-Proteine an der generellen Regulation des NMD Pathways involviert sein. Eine erhöhte Expression einiger SR Proteine (SRSF2, SRSF5, SRSF6), insbesondere jedoch von SRSF1, führte zu erhöhter NMD Aktivität und ist abhängig von der Anwesenheit ihrer RS-Domäne [203].

## 1. Einleitung

Auch wenn die genauen Hintergründe der Verknüpfung von alternativem Spleißen und NMD noch im Dunklen liegen, so verdichten sich die Hinweise auf ein komplexes Regulationsnetzwerk, das es vor allem spleißregulatorischen Proteinen selbst erlaubt, ihre Expression mittels NMD zu regulieren.

### 1.2.3.4 Viren und NMD

Im Wesentlichen bestehen Viren aus Nukleinsäuren – DNA oder RNA – und Proteinen, sie besitzen weder Cytoplasma noch einen Zellkern, noch verfügen sie über Apparate wie Ribosomen oder Mitochondrien. Für ihre Vermehrung sind sie vollständig auf die Ressourcen ihres Wirtes angewiesen. Um sich zu vervielfältigen, müssen sie also ihre Nukleinsäure offenlegen. Virale Genome weisen jedoch untypische Eigenschaften wie überlappende Leserahmen, polycistronische RNAs oder sehr lange 3'UTRs auf, was häufig der Kompaktheit ihres Genoms geschuldet ist. Es ist daher anzunehmen, dass ihre RNAs potentielle NMD Auslöser sind und NMD somit ein Teil der Pathogenabwehr darstellt [204]. In einem genomweiten siRNA (*small interfering RNA*) Screen konnten die NMD Faktoren UPF1, SMG5 und SMG7 als Restriktionsfaktoren für eine Semliki Forest Virus (SFV) Infektion identifiziert werden [205]. Die Deletion dieser Gene führte zur Stabilisierung der viralen RNA und einem starken Anstieg der Replikation. Auch für einige Vertreter der Retroviren konnte eine Stabilisierung ihrer Transkripte nach verringerter zellulärer NMD Aktivität nachgewiesen werden [206-208]. Auf der anderen Seite scheinen Viren Strategien erworben zu haben, um der Degradation durch NMD zu entgehen. Das Rex Protein des humanen T-Zell Leukämie Virus Typ I (HTLV-1) scheint allein bereits die Aktivität von NMD drosseln zu können, vermutlich, um den Abbau der eigenen, ungespleißten mRNA zu verhindern [208].

Das Rous Sarcoma Virus (RSV) hingegen verfügt über ein RNA Stabilitätselement, das die Erkennung durch NMD verhindert [209, 210]. Dieses AU-reiche Element enthält zwei Stem-loop Strukturen, die in 20 verschiedenen Geflügel-Viren konserviert sind [211]. Es scheint also, dass das Entkommen von NMD bei Retroviren weit verbreitet ist.

Das Hepatitis C Virus (HCV) core Protein interagiert direkt mit dem EJC Protein PYM und verhindert so dessen Interaktion mit Y14 und Magoh, wodurch NMD inhibiert wird [212]. Ob diese Interaktion tatsächlich auf das Abschalten von NMD abzielt oder einen anderen Zweck erfüllt, bleibt zu untersuchen. Denn die Unterbindung der

## 1. Einleitung

Wechselwirkungsmöglichkeit von PYM führt nicht – wie zu erwarten wäre – zu einer erhöhten Virusreplikation, sondern schränkt diese ein.

### 1.3 HIV-1

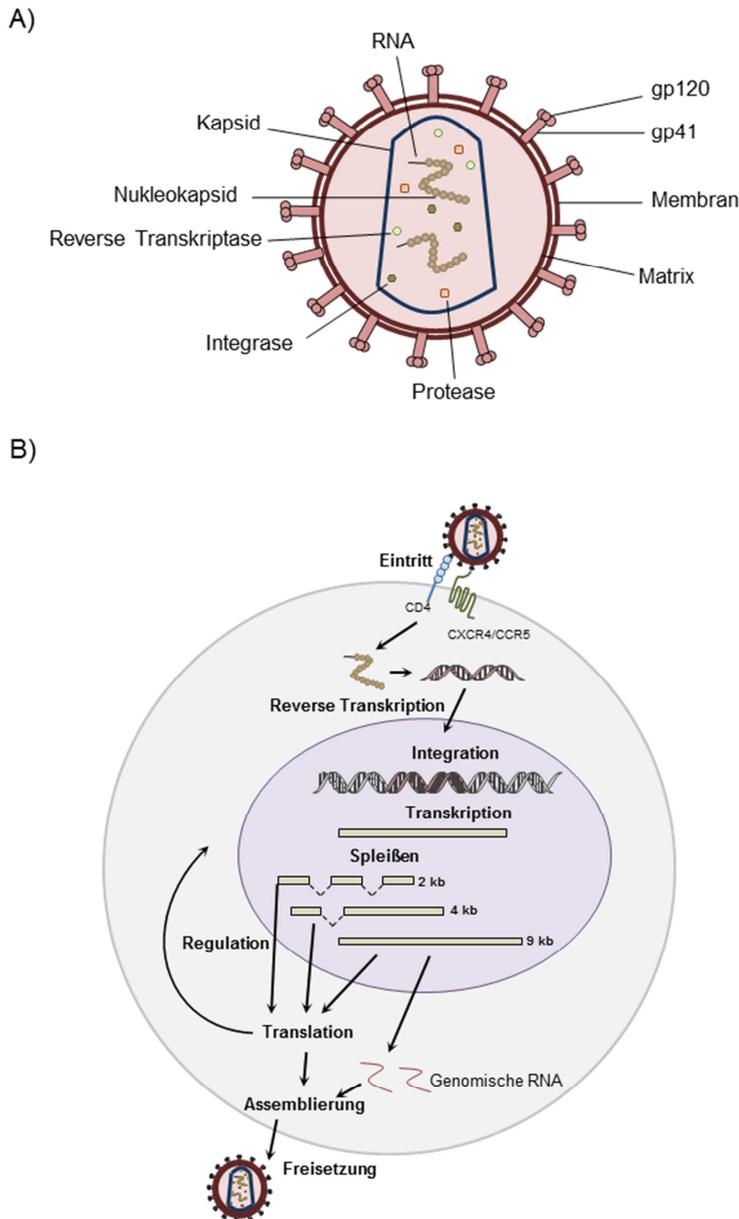
Anfang der 80er Jahre wurde von den ersten Patienten berichtet, die unter dem *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) litten [213]. Eine zuvor nicht gekannte, äußerst schnelle Verbreitung deutete auf eine verheerende Epidemie hin. Zwei Jahre danach konnte ein Retrovirus – später bekannt als HIV-1 (*human immunodeficiency virus 1*) – als Ursache für die erworbene Immunschwäche ausgemacht werden [214]. Der raschen Sequenzierung des viralen Genoms [215-217] folgte die Entwicklung von Nachweistests, sodass Infizierte schnell diagnostiziert werden konnten. Andauernde Forschungen haben schließlich zu der Entwicklung einer hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) geführt, einem Cocktail aus Medikamenten, die den viralen Lebenszyklus an unterschiedlichen Stellen hemmen. Die Behandlung mit HAART wandelt die vormals tödliche in eine behandelbare aber immer noch chronische Infektion um. Patienten sind gegenwärtig ihr Leben lang auf die Einnahme dieser Medikamente angewiesen. Allerdings haben nur knapp ein Drittel aller weltweit Infizierten überhaupt Zugang zu dieser Therapie [218].

#### 1.3.1 Der Lebenszyklus von HIV-1

HIV-1 infiziert Zellen des Immunsystems, die den CD4 Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dazu zählen T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen [219-222]. Die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 interagieren zunächst mit dem CD4-Rezeptor, wobei gp120 durch Konformationsänderungen die Bindungsstelle des obligaten Co-Rezeptors freilegt [222, 223] (Abb. 1.10.A, B). Ob es sich dabei um den Chemokin-Rezeptor CXCR4 oder CCR5 handelt, definiert der V3 Loop im gp120 des jeweiligen HIV-Stamms [224]. Schließlich fusioniert das Virus gänzlich mit der Wirtzellmembran und das Nukleokapsid wird ins Cytoplasma freigesetzt. Durch die Virus-codierte reverse Transkriptase (RT) wird das einzelsträngige RNA (+) Genom in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben. Initiiert wird die Transkription durch eine zuvor in das Viruspartikel selektiv verpackte zelluläre tRNA, die an der Primer Bindestelle (PBS) im viralen Genom bindet [225]. Durch die fehlende Korrekturlese-Funktion der RT entsteht in etwa 1 falscher Einbau pro 1000 bis

## 1. Einleitung

10.000 Basen. Ein Umstand, der eine Quasispezies entstehen lässt, die die Ursache einer raschen Resistenzentwicklung gegen die anti-retrovirale Therapie darstellt [226, 227].



**Abbildung 1.10 Struktur und Replikationszyklus von HIV-1.**

(A) Das Virion ist von einer Lipid-Doppelmembran umschlossen, aus der das Glykoprotein herausragt. Gp 41 interagiert dabei mit der Matrix. Das Nukleokapsid ist in das Kapsid eingebettet und umschließt die zwei Kopien des viralen RNA Genoms. Neben der reversen Transkriptase befinden sich noch die virale Integrase sowie die virale Protease im Kapsid. (B) Nach dem rezeptorvermittelten Eintritt in die Wirtszelle wird das virale Genom revers transkribiert. Es folgt der Import in den Nukleus und die Integration in das Wirtsgenom. Massives alternatives Spleißen führt schließlich zur Synthese der viralen Proteine, die entweder an der Regulation der Replikation innerhalb der Zelle beteiligt sind oder mit der genomischen RNA in neue Virione verpackt werden.

In Form eines prä-Integrations-Komplexes (PIK) gelangt die dsDNA schließlich in den Zellkern und wird mittels der viralen Integrase in das Wirtsgenom integriert [228-230]

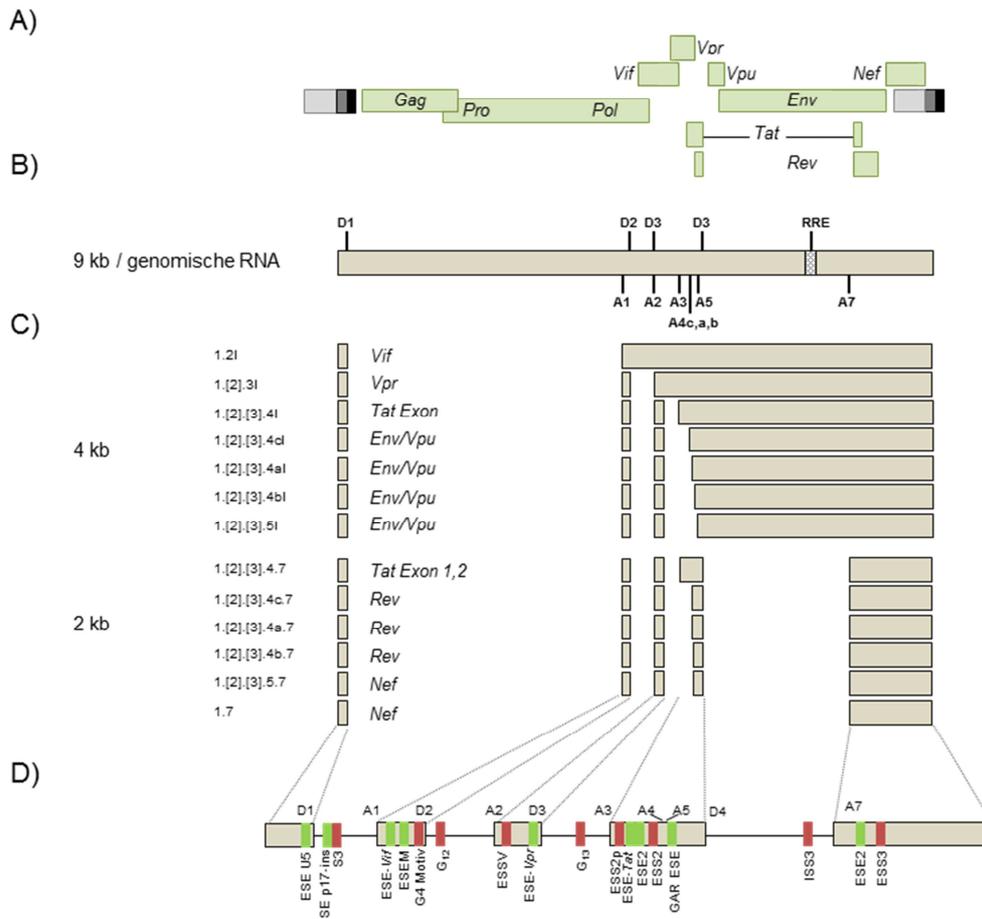
## 1. Einleitung

(Abb. 1.10.B). Ab diesem Zeitpunkt wird das virale Genom als Provirus bezeichnet und wird von nun an wie die wirtseigene DNA behandelt. Die anfängliche Transkriptionsrate ist jedoch sehr gering. Erst wenn ausreichende Mengen des Tat Proteins (*trans-activator of transcription*) synthetisiert wurden, verläuft die Transkription effizient. Tat bindet an TAR (*transactivation-responsive region*), einer Stem-loop Struktur, die auf allen naszierenden HIV-1 Transkripten ausgebildet wird. Tat rekrutiert den zellulären Elongationsfaktor b (pTEF-b), der die C-terminale Domäne von Pol II hyperphosphoryliert und so die transkriptionale Prozessivität fördert [231]. Die Information über das gesamte virale Proteom ist in nur einem Primär-Transkript hinterlegt. Ausgiebiges alternatives Spleißen ermöglicht schließlich die passgenaue Synthese aller viralen Proteine.

### 1.3.2 Virales Spleißen

Die Translation beginnt stets am ersten, von der kleinen ribosomalen Untereinheit erkannten AUG am 5'-Ende einer mRNA. Bei HIV-1 führt die Translation des ungespleißten Transkripts zur Synthese von Gag und Gag/Pol. Um die übrigen sieben Proteine (Vif, Vpr, Tat, Rev, Nef, Vpu und Env) zu translatieren, müssen translationsinhibierende 5'-gelegene AUGs mittels alternativem Spleißen aus der prä-mRNA entfernt werden. Damit die mehr als 40 unterschiedlichen mRNA Isoformen generiert werden können, ist das Virus auf den zellulären Spleißapparat angewiesen [232, 233] (Abb. 1.11). Dabei ist die zeitliche Organisation innerhalb des viralen Lebenszyklus von großer Bedeutung. Direkt nach erfolgreicher Infektion wird die vollständig gespleißte 2 kb (Kilobasen) mRNA Klasse mit den Leserahmen für Tat, Rev und Nef produziert. Es folgt die Herstellung der intronhaltigen 4 kb mRNA Klasse mit den Leserahmen für Vif, Vpr, Vpu und Env. Später, im Verlauf der Infektion gelangt dann auch die ungespleißte 9 kb RNA Klasse, die sowohl für das Gag-Pol Polyprotein als auch für die virale genomische RNA für neu entstehende Virione codiert, in das Cytoplasma (Abb. 1.11.B).

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.11 Das HIV-Genom.**

Die offenen Leserahmen von HIV-1 sind in grünen Rechtecken dargestellt. Die flankierenden LTRs sind dreifarbig abgebildet: Die U3 Region ist hellgrün, die R Region ist dunkelgrün und die U5 Region schwarz unterlegt. Die ungespleißte mRNA dient sowohl als genomische RNA als auch als Transkript für *gag/pol* (A). Die Positionen der 3' ss und 5' ss innerhalb des viralen Genoms, sowie das RREs (*Rev responsive element*), das den Export ungespleißter und intronhaltiger mRNAs aus dem Zellkern ermöglicht, sind gezeigt (B). Die viralen Transkripte der 4 und 2 kb Klasse schließen alle das nicht-codierende Exon 1 ein. Die ebenfalls nicht-codierenden Exons 2 und 3 werden alternativ gespleißt (in Klammern) (C). Positionen der bisher beschriebenen spleißregulatorischen Elemente innerhalb des HIV-1 Genoms sind gezeigt. Enhancer sind in grün und Silencer in rot dargestellt. Die Abbildung wurde nach [233] verändert und mit Daten aus [101, 234-236] ergänzt.

Für die Generierung dieser unterschiedlichen Transkripte werden mindestens vier Spleißdonoren (SD1, SD2, SD3 und SD4) und acht Spleißakzeptoren (SA1, SA2, SA3, SA4cab, SA5, SA7) in unterschiedlicher Kombination genutzt. Dabei wird Exon 1 durch die Nutzung des SD1 – der auch als Hauptspleißdonor bezeichnet wird – in jedes Transkript eingeschlossen. Die ebenfalls nicht-codierenden Exons 2 und 3 werden zumindest in einige Transkripte eingeschlossen [233]. Um die Nutzung der unterschiedlichen Spleißstellen zu regulieren, ist auch das HIV-1 Genom reich an *cis*-regulatorischen Elementen. Eine Übersicht der bisher beschriebenen Elemente liefert die Abbildung 1.11.D.

## 1. Einleitung

### 1.3.2.1 Die 2 kb Klasse

Die intronlose Klasse der mRNAs codiert für die regulatorischen Proteine Tat und Rev sowie das akzessorische Protein Nef.

Tat ist – wie bereits oben beschrieben (s. Kapitel 1.3.1, Seite 27) – maßgeblich für die verstärkte virale Transkription verantwortlich. Die Tat codierenden Transkripte differieren in dem Einschluss der Exons 2 und/oder 3 sowieso dem Spleißen am SD4. Transkripte, in denen der SD4 nicht genutzt wird, werden der 4 kb Klasse zugeordnet [232]. Diese codieren entsprechend für das Ein-Exon-codierende Tat, das über eine vergleichbare Enzymaktivität wie das Zwei-Exon-codierende Tat verfügt (Abb. 1.11.C).

Die *Rev* Transkripte unterscheiden sich ebenfalls maßgeblich durch den Einschluss der nicht-codierenden Exons 2 und/oder 3 und der Nutzung der Akzeptoren 4cab. Rev vermittelt den Export intronhaltiger viraler mRNAs aus dem Zellkern in das Cytoplasma, die andernfalls im Kern zurückgehalten würden [237]. Dabei bindet Rev an das Rev Response Element (RRE), einer Sekundärstruktur, lokalisiert in der Env codierenden Region [238-241]. Für den Export der Rev-gebundenen mRNAs nutzt das Virus den zellulären Protein-Exportweg indem das Leucin-reiche nukleäre Export Signal (NES) von Rev an den Export Rezeptor CRM1 bindet [242, 243]. Die 2 kb mRNAs selbst werden – da sie kein Intron enthalten – mittels des NXF1/Tap mRNA Exportwegs exportiert [244].

Das Aktivitätsspektrum von Nef ist sehr breit. Zahlreiche zelluläre Interaktionspartner wurden identifiziert [245-247]. Zu nennen ist die für das Virus essentielle T-Zell Aktivierung und die Blockierung von Apoptose [248-250]. Auch die HIV-1 charakteristische Persistenz wird von Nef unterstützt. Maßgeblich dafür ist die Herunterregulierung von CD4 und MHC I-Rezeptoren, wodurch die Erkennung durch das Immunsystem erschwert wird [247]. Die Spleißvarianten von *Nef* unterscheiden sich ebenfalls durch den Einschluss der Exons 2 und/oder 3 sowie des Exons 5.

### 1.3.2.2 Die 4 kb Klasse

Die mRNAs der 4 kb Klasse sind gespleißt, enthalten aber dennoch ein Intron. Sie werden Rev-abhängig aus dem Zellkern exportiert und codieren für Env und die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu [232] (Abb. 1.11.C).

Die *Env* Transkripte kombinieren den Einschluss der Exons 2, 3, 4cab und 5, sodass 16 alternative mRNAs generiert werden können. Das entstehende Vorläufer

## 1. Einleitung

Glykoprotein gp160 wird im trans-Golgi von zellulären Proteasen in die reifen Glykoproteine gp120 und gp41 gespalten. Sie dienen – wie in Kapitel 3.1 beschrieben – dem Andocken des Virus an die Zielzelle [251].

Die *Vif* mRNA entsteht durch das Spleißen von SD1 auf SA1. Da das *Vif* AUG im Intron 2 lokalisiert ist, muss die Nutzung des SD2 unterdrückt werden. Der Einschluss des Exons 2 wird dabei positiv von SRSF1- und SRSF4-abhängigen ESEs unterstützt [252]. *Vif* ist ein entscheidender Antagonist des Wirtsrestriktionsfaktors APOBEC3G (A3G), einer Cytidin-Deaminase, die in neu assemblierte Virionen verpackt wird und in der anschließenden Infektion im viralen Genom Cytosin zu Uracil Substitutionen durchführt, was schließlich zu einem Abbruch der Infektion führt. Um genau dies zu verhindern, vermittelt *Vif* die proteosomale Degradation von A3G [253].

*Vpr* mRNAs entstehen durch das Spleißen von SD1 auf SA2, wobei das nicht-codierende Exon 2 zusätzlich in einige Transkripte eingeschlossen wird [232]. Die Funktionen von *Vpr* sind vielseitig und reichen von der Beteiligung am Import des prä-Integrationskomplexes über die Förderung des Zellzyklus Arrests bis hin zur Modulation der Apoptose und der Transkriptionsaktivität [228, 254-256].

Das akzessorische Protein *Vpu* wirkt, genau wie *Vif*, ebenfalls einem Wirtsrestriktionsfaktor entgegen: Das Transmembran Protein Tetherin hält in Abwesenheit von *Vpu* naszierende Virione an der Zelloberfläche zurück. *Vpu* reguliert dessen Expression sowie die von CD4 herunter [257]. Codiert wird *Vpu* von einer bi-cistronischen mRNA, die zusätzlich das Env Glykoprotein codiert.

### 1.3.2.3 Die 9 kb Klasse

Die 9 kb RNA Klasse setzt sich aus zwei ungespleißten RNAs zusammen, die sich nur in ihrer Funktion unterscheiden. Zum einen wird die ungespleißte RNA als virales Genom für naszierende Virione verwendet, zum anderen codiert sie als mRNA für die Strukturproteine (Gag) sowie die viralen Enzyme (Pol) (Abb. 1.11.B). Da die Gene in einem anderen Leserahmen hinterlegt sind, ist für die Translation von Pol ein ribosomaler Frameshift notwendig [258]. Beide Gene werden schließlich als Polyproteine (Pr55 und Pr160) exprimiert und durch die, beim Ausstülpen der Viruspartikel aktivierte, virale Protease in die inneren Strukturproteine p17 (Matrix), p24 (Kapsid), p7 (Nukleokapsid), p6 und in die Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und Protease gespalten.

### 1.3.3 Die Genregulation von HIV-1 wird durch SR Proteine beeinflusst

Das alternative HIV-1 Spleißen wird durch die kombinatorische Verwendung von *cis*-regulierenden Elementen gesteuert. Der GAR ESE in Exon 5 wird beispielsweise von SRSF1 und SRSF5 gebunden und ist für die Generierung der *Rev*, *Nef* und *Vpu/Env* mRNAs notwendig [259]. SRSF4 und SRSF6 fördern durch die Inhibition von SD3 die *Vpr* mRNA Produktion [260]. Neben der Spleißregulation scheinen einige SR Proteine aber noch an der weiteren Genregulation von HIV-1 beteiligt zu sein. SRSF5 und SRSF6 sollen die Translation der ungespleißten Gag/Pol mRNA unterstützen [261], wobei der genaue Mechanismus noch nicht entschlüsselt wurde. Weiter kann SRSF1 an das TAR Element binden und es wird vermutet, dass SRSF1 so, in der frühen Phase der Infektion, die virale Transkription gewährleistet, bis es durch Tat substituiert wird [262, 263].

Die veränderte Expression von SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF7 und SRSF5 durch Überexpression oder siRNA Behandlung beeinträchtigt die virale Replikation [264-267]. Selbst die Überexpression der SR Protein Kinasen CLK1 und CLK2 hat – zumindest in HIV-1 exprimierenden Zelllinien – einen Einfluss auf die Replikation [268]. Ein ausgewogenes Level an SR Proteinen ist für den viralen Lebenszyklus also von immenser Bedeutung, und es ist daher wahrscheinlich, dass ihre Expression durch das Virus reguliert werden kann. Bisher ist jedoch wenig über den Einfluss einer HIV-1 Infektion auf die Expression der SR Proteine bekannt. In der T-Lymphozyten Zelllinie H9 wurde eine zwei- bis dreifache Hochregulierung von SRSF2 48 Stunden nach HIV-1 Infektion dokumentiert [269], während SRSF7 60 Stunden nach Infektion in den T-Zelllinien MT-4 und Molt-4 deutlich herunterreguliert wurde [270]. Makrophagen stellen ein Langzeit-Reservoir für HIV-1 dar. Der Verlauf der Infektion zeichnet sich hier durch einen initialen Anstieg, gefolgt von einem Rückgang der Virionen Produktion, aus. Tat scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen, denn dessen verringerte Expression – im Verhältnis zu anderen viralen Proteinen – geht mit einer gesenkten Produktion einher. Dies scheint nicht auf die Stabilität, sondern auch auf das Spleißen der *Tat* Transkripte zurückzuführen zu sein. Dowling und Kollegen konnten eine initiale Hochregulierung von SRSF2 und eine Herunterregulierung von hnRNP Proteinen beobachten, die das *Tat* Spleißen fördern. Im Verlauf der Infektion dreht sich dieses Verhältnis um und weniger *Tat* Transkripte werden generiert [271]. Dies kann bedeuten, dass das Virus durch die

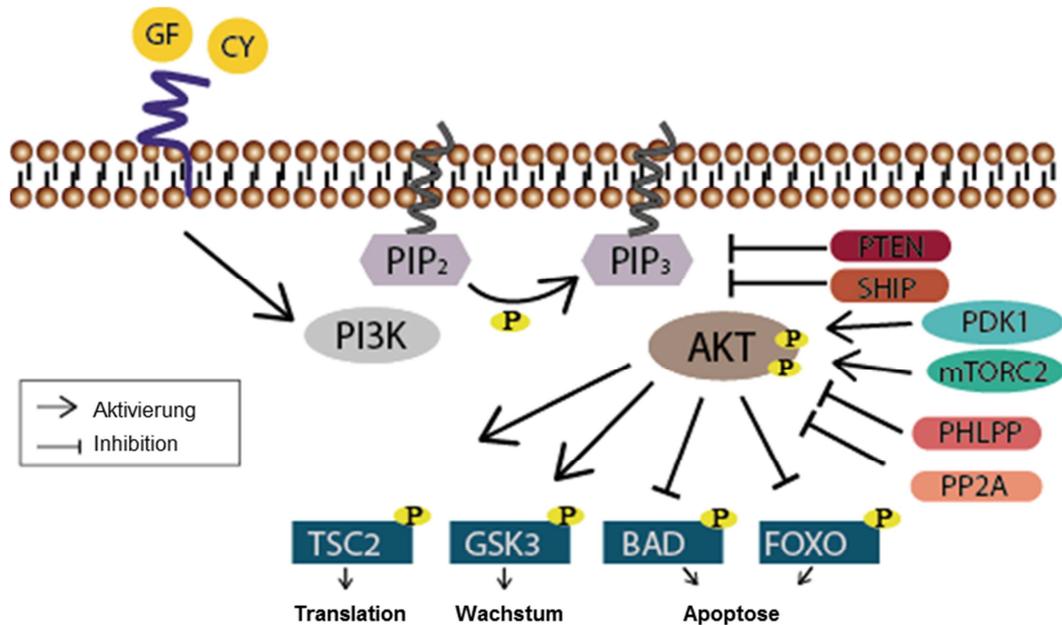
## 1. Einleitung

Verschiebung des zellulären Expressionsniveaus spleißregulatorischer Proteine den Wechsel zwischen akuter und latenter Phase reguliert.

### 1.4 Der PI3K Signalweg und Viren

Der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) /Akt Signalweg reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse wie Apoptose, Autophagie, Translation und RNA Prozessierung. PI3K wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Cytokinen an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) aktiviert [272] (Abb. 1.12). Daraufhin phosphoryliert sie die dritte OH-Gruppe des Inositolringes von membranständigen Phosphatidylinositollipiden zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphaten (PIP<sub>3</sub>). Diese fungieren schließlich als Andockstation für Proteine, die eine Lipid-Binde-Domäne besitzen. Der wohl bekannteste Effektor der PI3K ist die Akt Kinase [273]. Nach der Bindung an PIP<sub>3</sub> wird Akt durch die Phosphoinosit-abhängige Kinase 1 (PDK1) am Threonin 308 und durch den *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) am Serin 473 phosphoryliert. Die aktivierte Akt Kinase transloziert schließlich ins Cytoplasma und in den Zellkern, wo sie zahlreiche nachgeschaltete Moleküle phosphorylierungsabhängig reguliert. Dazu zählen unter anderem die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), die für das Zellwachstum wichtig ist, sowie das pro-apoptotische *Bcl-2-associated death protein* (BAD), das durch die Akt Kinase inaktiviert wird [274]. Unterbrochen werden kann diese Signalkaskade entweder durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> mittels PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) und SHIP (*Src homology domain 2 containing inositol-5-phosphatase*) oder durch die Akt Dephosphorylierung mittels PP2A (Protein Phosphatase 2A) und PHLPP (*H domain and leucine-rich repeat protein phosphatase*) [275-277] (Abb. 1.12).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.12 Der PI3K/Akt Signalweg.**

PI3K wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren (GF) oder Cytokinen (CY) an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (blau) aktiviert. Daraufhin phosphoryliert sie membranständige Phospholipide (PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>), die schließlich die Bindung der Akt Kinase erlauben. Akt wird daraufhin durch PDK1 und mTORC2 phosphoryliert und reguliert Prozesse wie Translation, Wachstum oder Apoptose durch die Phosphorylierung weiterer Proteine. Die Kaskade kann entweder durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> mittels PTEN oder SHIP oder durch die Dephosphorylierung von Akt mittels PHLPP oder PP2A beendet werden. Die Abbildung wurde nach [278] verändert.

Da der PI3K/Akt Signalweg ein solch breites Spektrum an zellulären Funktionen übernimmt, repräsentiert er ein häufiges Ziel viraler Einflussnahme [278]. Im Folgenden werden einige Beispiele dieser Interaktionen vorgestellt.

Bereits bei der ersten Interaktion – dem Andocken des Virus an die Zelloberfläche – können Signalkaskaden in ihrer Funktion verändert werden. Endozytose ist ein häufig verwendeter viraler Eintrittsmechanismus, da er zum einen ein unauffälliges Eindringen ermöglicht und zum anderen einen Transport in subzelluläre Kompartimente zulässt [279, 280]. Bei diesem pH-abhängigen Mechanismus – der eigentlich der Aufnahme extrazellulärer Moleküle dient – wird das Virus zunächst in das frühe Endosomen eingeschlossen. Reift dieses schließlich zum späten Endosomen mit einem niedrigeren pH-Wert, erfolgen konformative Änderungen des viralen Glykoproteins, die die Fusion mit der endosomalen Membran auslösen [280]. Der PI3K/Akt Signalweg scheint diesen Prozess bei einigen Viren zu unterstützen. Die Bindung des Influenza A Virus an den N-Acetylneuraminsäure Rezeptor beispielsweise resultiert in der Zusammenlagerung von sogenannten Lipid Rafts, die Signalmoleküle enthalten und den PI3K/Akt Signalweg stimulieren. Diese Aktivierung verstärkt wiederum die Internalisierung des Virus [281-283]. Ähnlich verhält es sich

## 1. Einleitung

beim Eintritt des Vaccinia Virus (VACV), das mit Integrin  $\beta$  in Lipid Rafts co-lokalisiert und so PI3K/Akt-abhängig die Aufnahme des Virus stimuliert [284]. Des Weiteren scheinen das Zaire Ebola Virus (ZEBOV), das Hepatitis C Virus (HCV) und das Herpes simplex Virus (HSV-1) auf einen PI3K/Akt abhängigen Eintritt angewiesen zu sein [285-287]. In keinem der beschriebenen Fälle konnte jedoch die genaue Beteiligung des Signalwegs an der Endozytose molekular aufgeklärt werden.

Zunehmende Hinweise deuten auch auf eine Beteiligung von Signalwegen bei der Regulation von alternativem Spleißen hin. Dies ermöglicht der Zelle eine schnelle Reaktion auf externe Stimuli durch die Produktion alternativer Isoformen, ohne auf eine neue Transkriptionsrunde angewiesen zu sein. Die Akt Kinase phosphoryliert SRPKs, die daraufhin in den Nukleus translozieren und SR Proteine modifizieren [83, 288]. Eine direkte Phosphorylierung durch Akt konnte bereits für SRSF1, SRSF7 und SRSF5 beobachtet werden [84, 85, 289, 290]. Auch ein Vertreter der hnRNP Familie scheint Akt-abhängig reguliert zu werden. Die Phosphorylierung von hnRNP L führt zum Ausschluss einer Exon-Kassette im Transkript der Caspase 9, die für eine anti-apoptotische Isoform codiert [291]. Diesen Aufgabenbereich der Akt Kinase scheinen sich auch einige Viren zu Nutze gemacht zu haben.

Das Masern Virus (MV) etwa interferiert mit der PI3K/Akt Aktivierung, was zu einer verminderten SR Protein Phosphorylierung führt. Dadurch entsteht eine konstitutiv aktive Isoform von SHIP, SIP110, die in vermehrtem PIP<sub>2</sub> Level und somit weniger PI3K Aktivität in der Zelle resultiert [292]. Einige Viren gebrauchen den zellulären Spleißapparat, um ihr eigenes Codierungspotential zu steigern oder den Verlauf der Infektion durch die zeitlich versetzte Prozessierung von Transkripten zu regulieren. Zwei DNA-Viren, Adenovirus und HSV-1, verändern den Phosphorylierungsstatus einiger SR Proteine zu Gunsten ihrer Replikation, indem sie die Aktivität von PP2A und SRPK1 modifizieren [293, 294]. Wie wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, ist HIV-1 von dem PI3K/Akt Signalweg für das korrekte Spleißen seiner prä-mRNA abhängig. Die Inhibition desselbigen führt zu einem veränderten Spleißmuster und zu einer signifikanten Reduktion der viralen Replikation [295]. Einher mit dieser Beobachtung geht, dass der Phosphorylierungsstatus von sechs SR Proteinen und fünf anderen spleißregulatorischen Proteinen direkt nach der HIV-1 Infektion verändert ist [296].

## 1. Einleitung

Ein einfacher, jedoch effektiver Weg für eine infizierte Zelle, die Replikation eines Virus einzuschränken, ist der programmierte Zelltod. Um also seine Vermehrung zu gewährleisten, muss das Virus die Apoptose verzögern oder gar verhindern. Das Überleben der Zelle zu gewährleisten, ist eine der zentralen Funktionen des PI3K/Akt Signalwegs [297, 298]. Die Interaktion von HIV-1 Nef mit PI3K resultiert in der inhibitorischen Phosphorylierung des pro-apoptotischen Faktors BAD und verhindert so den vorzeitigen Zelltod der infizierten T-Zellen [250]. Auch für Influenza A Virus *non-structural protein 1* (NS1) konnten eine direkte Interaktion mit PI3K und nachfolgende anti-apoptotische Signale ausgemacht werden [299-301]. Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) codiert in seinem etwa 150 Kilobasen (kb) großen Genom eine eigene Serin/Threonin Kinase. Bis jedoch ausreichende Mengen von dieser viralen Us3 Kinase synthetisiert sind, um die Aktivität der Akt Kinase zu imitieren, wird diese durch das Virus in aktiver Form gehalten [302]. Auch zwei weitere Mitglieder der Herpes Viren Familie nutzen den Signalweg, um den Tod der Wirtszellen zu verhindern: das humane Zytomegalievirus (HCMV) und das Epstein-Barr Virus (EBV) [303, 304].

Da sie keine eigenen Komponenten für die Synthese von Proteinen codieren, sind Viren von der zellulären Translationsmaschinerie abhängig. Sie müssen gewährleisten, dass ihre mRNAs effizient vom Ribosomen erkannt und in ausreichenden Mengen translatiert werden. Eine der Akt Kinase nachgeschaltete Kinase ist mTOR (*mammalian target of rapamycin*) innerhalb des mTOR Komplex 1 [305], die die Cap-abhängige Translationsinitiation reguliert. Einige Viren wie HCMV, EBV, VACV und HPV nutzen offenbar diese Akt/mTOR Route, um die Translationsaktivität der Wirtszelle zu erhöhen [306-310].

Die Modulierung des PI3K/Akt Signalweges scheint also eine gängige virale Strategie zu sein, um diverse zelluläre Prozesse zu Gunsten einer Infektion zu steuern. Eine Übersicht über alle bisher beschriebenen Viren, die den Signalweg nutzen, zeigt Tabelle 1.1.

## 1. Einleitung

**Tabelle 1.1 Viren die mit dem PI3K/Akt Signalweg interagieren.**

Viren, die unterschiedliche regulatorische Bereiche des Signalwegs für ihre Replikation nutzen

<b>Eintritt</b>	<b>Spleißen</b>	<b>Überleben der Zelle</b>	<b>Translation</b>
Influenza VACV HCV ALV HSV-1 ASFV	Adenovirus MV	HIV-1 Influenza VACV HCV CPXV DENV JEV HCMV Rotavirus EBV RSV CVB3 ARV VACV HCMV	Adenovirus EBV HPV

### 1.5 Zielsetzung

Zahlreichen Viren konnte schon eine Interaktion mit dem PI3K/Akt Signalweg nachgewiesen werden. Es mangelt jedoch bisher an Untersuchungen über den Einfluss des Signalwegs auf die HIV-1 Replikation. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen inwieweit der PI3K/Akt Signalweg möglicherweise im Verlauf einer HIV-1 Infektion verändert wird. Da wir bereits zeigen konnten, dass die Aktivität von PI3K für das Spleißen der HIV-1 mRNAs essentiell ist und der Signalweg an der Regulation von spleißregulatorischen Proteinen beteiligt ist, sollte weiter untersucht werden, ob die Aktivität und Genexpression von spleißregulatorischen Proteinen nach Inhibition des Signalwegs und/oder HIV-1 Infektion verändert war. Schließlich sollten mittels Transkriptomanalysen Gene identifiziert werden, die sowohl nach HIV-1 Infektion als auch nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändert exprimiert waren.

Da erste Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Aktivität der zellulären NMD Maschinerie nach der HIV-1 Infektion verändert war, wurde nachfolgend der Einfluss einer Infektion auf den NMD Pathway untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5 $\alpha$ F'IQ (Invitrogen Life Technologies) wurde für die Transformation und Vervielfältigung von Plasmid-DNA verwendet.

#### 2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die humane Zelllinie HeLa-CD4<sup>+</sup> oder auch HeLa-T4<sup>+</sup> genannt, wurde für die Transfektion von Plasmid-DNA verwendet. Sie stammt aus dem Epithelgewebe eines humanen Cervix-Adenocarcinoms. Aufgrund einer stabil integrierten Genkopie des CD4-Rezeptors kann sie zudem mit HIV-1 infiziert werden [219].

Die TZM-bl Zelllinie ist ein Derivat der HeLa-Zellen. Sie exprimiert je eine Genkopie der  *$\beta$ -Galaktosidase* und der *firefly* Luciferase unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors und erlaubt daher die quantitative Analyse einer Infektion.

HEK 293T Zellen wurden für die Vervielfältigung des HI-Virus verwendet. Sie stammen aus embryonalen Nierenzellen, exprimieren das Simian Virus 40 (SV40) *large* Antigen und zeichnen sich durch eine hohe Transfizierbarkeit aus.

Die Suspensions-Zelllinie PM-1 ist ein Derivat der HuT 78 Zellen. Dabei handelt es sich um Zellen eines kutanen T-Lymphoms. Molt 4 Zellen sind ebenfalls T-Lymphoblasten. Sie stammen aus Zellen einer akuten lymphatischen Leukämie. Beide Zelllinien wurden für die Infektionsexperimente mit HIV-1 verwendet.

#### 2.1.3 Zellkulturmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete DMEM-Medium, das RPMI-Medium, das IMDM-Medium, das FCS (Fetal Calf Serum), DPBS -CaCl<sub>2</sub> -MgCl<sub>2</sub>, PenStrep (10.000 U/mL penicillin, 10.000  $\mu$ g/mL streptomycin), 0.05% Trypsin-EDTA sowie das Trypan Blue Stain 0.4% wurden von der Firma GIBCO, das Opti-MEM® wurde von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1.4 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie wurden jeweils über Nacht mit der Membran inkubiert.

**Tabelle 1.** Verwendete Primärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Anti-HIV-1-p24 Gag	polyklonal, Schaf	1:2000 in 5% Milch in TBST	Aalto Bio Reagents
Anti-Phospho-SR-Proteine (1H4)	monoklonal, Maus	1:1000 in 3% BSA in TBST	Invitrogen
Anti-SRSF1	monoklonal, Maus	1:2000 in 5% Milch in TBST	Zymed
Anti-SRSF3	monoklonal, Maus	1:2000 in 5% Milch in TBST	Sigma
Anti-Phospho-Akt (Ser473)	monoklonal, Kaninchen	1:1000 in 3% BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-Akt (Thr308)	monoklonal, Kaninchen	1:1000 in 3% BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Anti-ERK2 (c14)	polyklonal, Ziege	1:500 in 5% Milch in TBST	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Digoxigenin AP, Fab Fragments Antikörper	polyklonal, Schaf	1:20000 in 1 x Blockierungslösung	Roche

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Sie wurden jeweils für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert.

**Tabelle 2.** Verwendete Sekundärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Anti-Ziege-Peroxidase	1:7500 in 5% Milch in TBST	Dianova
Anti-Maus-Peroxidase	1:2500 in 5% Milch in TBST	Dianova
Anti-Kaninchen-Peroxidase	1:2500 in 5% Milch in TBST	Dianova
Anti-Schaf-Peroxidase	1:2500 in 5% Milch in TBST	Dianova

## 2. Material und Methoden

### 2.1.5 Chemikalien, Medien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von den Firmen Merck, Serva Sigma-Aldrich und Roth bezogen. Die Zusammensetzung der Medien und Lösungen sind entweder im jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder in gängigen Laborhandbüchern aufgeführt.

### 2.1.6 Enzyme

Die Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind folgende:

DNAse, rekombinant, RNAse-frei	Roche
Superscript™ III, reverse Transkriptase	Invitrogen
AmpliTaQ®-DNA-Polymerase	Applied Biosystems
Phusion™- High-Fidelity-DNA-Polymerase	Finnzymes
LightCycler DNA-Master-SYBR-Green I	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Lambda Protein Phosphatase	New England Biolabs
Trypsin	Gibco Life Technologies

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Die Oligo(dT)-Primer für die reverse Transkription wurden von der Firma Roche bezogen.

#### **Oligonukleotide für RT-PCR Analysen:**

#640	TTCACTAATCGAATGGATCTGTC
#1224	TCTTCCAGCCTCCCATCAGCGTTTGG
#1225	CAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCT
#1544	CTTGAAAGCGAAAGTAAAGC
#2122	CTAATTCTCCCCGCTTAAT
#2648	AGTGATTCAGAACCGTCAAG
#2649	TCCACCACCGTCTTCTTTAG
#3392	CGTCCCAGATAAGTGCTAAGG

## 2. Material und Methoden

#3393 GCACTTGAGCAGCGGTCT  
#3394 CATGTTGCCAGTCAGTCTC  
#4003 GCCGCATTTTTTAACCCT  
#4004 CTCTCTCTTCTCCTATCTCT  
#4602 CGCTCCATGAATCCTGGTAA  
#4646 CAACGTGTGGCCACATATTCT  
#4647 CTGCTTATGATAATGTCAACAAAGTTCG  
#4699 TTGAAAGCTGGTCTGGTCCTGA  
#4700 CTCACCATCATCACACTGGAA  
#4701 TCATTCAGCTCTCGGAACATC  
#4814 GCGCTTCAGCAAGCCGAGTCCT  
#4816 AACTAGGGAACCCACTGCTTAAG  
#4817 TGCTGGGATTACAGGCGTGAG  
#4820 CCAGAAGAGCTGAGACATCCG  
#4821 GCCAAGCAGCTGAGAGGTTACT  
#4975 CTCCAGTGCCAAAACCTCCAGT  
#4976 GTGCTCATTACGGTGGGTGAA  
#4977 GCAGAAGATCCTTCTGTAGTATA  
#4978 ACCTTCCAGACCAATGATCTCTT  
#4979 ATAAACTAGCAGCAGCTAAATGCAG  
#4980 TTGTGGGCCACCAGCACAAACT  
#4981 TTATCACCATTGGCAATGAGCGCT  
#4982 GCATATAAGTCCTTACGGATGTCA  
#4985 ATCCTTGATGCTAGGTTCTGGTGT  
#4986 ATTGAGGGGCTTCTTGATGGTTG  
#5061 GAGAATCCGAAGGGAAAGGAATA  
#5062 TTCCTTCTCCTTCAGCAGGTTG  
#5065 TCGGCGTGGTGGTGTGATGTGC  
#5066 GCACCTCCGCGCCAAGAACT  
#5090 GTATTCAGATGTTCCAGAACTTGTATT  
#5092 CAGCAGTCATAAAAGAAGGAAGAGA  
#5189 CTGCAGAATTCGCCCTTCTG  
#5192 TCGCCCTTTCCTAGCACTGC  
#5260 GAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAA

## 2. Material und Methoden

#5261 AGTTTGTGTCGAACTTGCTGTAGGT  
#5296 ATTGTATTTTAAGTGATGTCATAGACAGG  
#5328 CTTGGACTTCGGAGTTTTGCCATTG  
#5329 GCCCTGGAAGTTGTTTCATGCTCT  
#5364 ACAACGAGGGTGTCTGCTC  
#5365 TCAGCTCCTCTGCCCCGAAA  
#5366 CGGAACCGCCCAGGATCAG  
#5367 GATTGTTGGCACTGGAGTAAC  
#5368 GACCTCGTGAATCGCCCCC  
#5369 CCTTTCATATGGTAACACCA  
#5427 CTTCCCATCCAACATCTTCTACGA  
#5428 ACACAGGACAGGATGATGAAGTC

### **Oligonukleotide für Klonierungen**

#4950 GCGACTAGTAAGTTTTTCTGCTTATACAGTTTACTGCTG  
GTAAAATAAGGAGTAAGCGGCTTAAA  
#4951 GCGGCCACTGTCTTCTTATGCACAGCCAGCCTTTGATCCAGAAAAA  
AGAATTACTTTAAGCCGCTTACTCCTT  
#5483 GCGGGATCCTTGTCTAGAGTGATTGCTGTTGGTTAATAT  
ATGTCAACCAAAGGATGGACCACCATGGAGAA  
#5484 GCGGGATCCCATTTCTGCCAAAGTCAACACTACCGTCTTGACGG  
TTCTCCATGGTGGTCCATCC

### **Oligonukleotide für die Erstellung einer RNA-Sonde:**

#3387 TTGCTCAATGCCACAGCCAT  
#3388 TTTGACCACTTGCCACCCAT

### **2.1.8 Größenstandards**

Als Größenstandard für Proteine wurde der „Precision Plus Protein Pre-stained Standards“ der Firma Bio-Rad verwendet. Als DNA-Größenstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix der Firma Fermentas benutzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1.9 Plasmide

#### SRSF3 Spleißreporter

Genomische DNA wurde mit den Primern #4950 und #4951 amplifiziert, mittels *KpnI* und *AflIII* verdaut und in das zuvor verdaute Plasmid-Rückgrat pT-Bbeta Designer exon 7 c1c3 IVS (freundlicherweise von Anna-Lena Brillen zur Verfügung gestellt) ligiert.

#### SRSF3 NMD-sensitiver Reporter

Das PCR-Produkt der Primer #5483 und #5483 wurde mit *BamHI* verdaut und in den mit *BamHI* linearisierten *SRSF3* Spleißreporter ligiert.

#### CLK1 Spleißreporter

Die Spleißreporter *CLK1* Ex4 Ex5 DE del Ex7, *CLK1* Ex4 12,3 Ex5 DE del Ex7 und *CLK1* Ex4 15,6 Ex5 DE del Ex7 wurden freundlicherweise von Hanna Heinrichs zur Verfügung gestellt.

#### TP53-i9 Minigen

Das *TP53-i9* Minigen wurde freundlicherweise von Dr. Jean-Christophe Bourdon, Universität von Dundee, zur Verfügung gestellt.

#### NMD-Reporter

Die Triosephosphate isomerase (TPI) Reporter, die  $\beta$ -Globin Reporter sowie die NMD-Luciferase Reporter wurden freundlicherweise von Dr. Niels Gehring, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

#### Expressionsplasmide

Für die SRSF1 Überexpression wurde pCMV SF2/A2 (freundlicherweise von Dr. Steffen Erkelenz zur Verfügung gestellt), für die Überexpression der CLKs wurden GFP-CLK1, GFP-CLK2, GFP-CLK3 und GFP-CLK4 (freundlicherweise von Dr. John Bell, Universität von Ottawa, zur Verfügung gestellt) und für die Akt Überexpression pcAkt (freundlicherweise von Dr. Frank Hillebrand zur Verfügung gestellt) verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden ausschließlich unter der Sterilbank bearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Flaschen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Das Wachstum der Zellen wurde mittels Mikroskopie beobachtet. Der Wechsel des Mediums erfolgte 1-2mal pro Woche. Die Suspensionszellen wurden schräggehend kultiviert.

##### 2.2.1.2 Passagieren von adhärenenten Zellen

Nach der Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml Trypsin vorsichtig über alle Zellen verteilt und wieder abgenommen. Es folgte eine Inkubation von ca. 5 min bei 37°C im Brutschrank bis die Zellen sich sichtbar von dem Flaschenboden lösten. Durch die Zugabe von 10 ml Medium wurde das Trypsin schließlich inaktiviert und die resuspendierten Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Etwa 2 ml der Zellsuspension wurden dann in einer neuen T75-Flasche in 10 ml Medium ausgesät.

##### 2.2.1.3 Passagieren von Suspensionszellen

Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und etwa 2 ml davon in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt. Etwa 1mal pro Woche wurden die Zellen im Medium bei 500 g für 3 min abzentrifugiert, mit 5 ml PBS gewaschen und schließlich in frisches Medium aufgenommen.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin behandelt. Nach der Resuspendierung der Zellen in 10 ml Medium, wurden 10 µl der Suspension zu 10 µl Trypan Blue Stain 0,4% gegeben. 10 µl des Gemischs wurden auf eine Neubauer Zählkammer überführt. Lichtmikroskopisch wurde die Anzahl der Zellen innerhalb aller vier Großquadrate auf der Zählkammer bestimmt.

Die Berechnung der Gesamtanzahl der Zellen in 1 ml erfolgte mit der Formel

$$\frac{a}{4} * 2(c) * 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}.$$

a = Anzahl der gezählten Zellen

c = Verdünnung

### 2.2.1.5 Inkubation mit Inhibitoren

Alle verwendeten Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Die verwendeten Konditionen sind in Tabelle 3 angegeben.

**Tabelle 3** Konditionen der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration	Inkubationsdauer
LY294002	50 µM	Bis zu 24 Stunden
MK2206	5 µM	Bis zu 48 Stunden
Cycloheximid	50 mg/ml	6 Stunden
Actinomycin D	5 mg/ml	Bis zu 6 Stunden

### 2.2.1.6 Alamar blue®-Assay

Um die Zellviabilität nach Zugabe der verschiedenen Transfektionsreagenzen zu testen, wurde ein Alamar blue® -Assay durchgeführt. Dafür wurden 20.000 HeLa-CD4+ Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät und mit Plasmid-DNA wie in 2.2.1.7 angegeben, transfiziert. Sofern angegeben, wurden die Zellen 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe des Alamar blue® Reagenz und die Auswertung nach Herstellerangaben (Invitrogen).

## 2. Material und Methoden

### 2.2.1.7 Transfektion von Kulturzellen

Für die transiente Transfektion wurden 250.000 Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid unter Verwendung von Mirus TransIT<sup>®</sup>-LT1 (Mirus Bio LLC) oder Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transfiziert. PEI (Polyethylenimin, Sigma-Aldrich) wurde in der Konzentration 1 mg/ml eingesetzt und im Verhältnis 2:1 zur DNA eingesetzt. Dazu wurde das entsprechende Volumen von PEI mit DMEM auf 100 µl aufgefüllt und für 5 min inkubiert. Das Gemisch wurde zur Plasmid-DNA gegeben und für weitere 20 min inkubiert. Es folgte die tröpfchenweise Zugabe auf die Zellen.

### 2.2.1.8 siRNA Transfektion

8 Stunden nach der Transfektion mit Plasmid-DNA oder Infektion mit HIV-1 wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit PBS gewaschen und in antibiotikafreiem Medium weiterkultiviert. 1,5 µl der siRNA (20 µM) wurden mit 248,5 µl Opti-MEM und 245 µl Opti-MEM<sup>®</sup> mit 5 µl RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) vermischt. Beide Lösungen wurden zusammengeführt und nach 15minütiger Inkubation bei RT auf die Zellen gegeben. 24 Stunden später wurde das Medium gegen ein antibiotikahaltiges Medium ausgetauscht und für weitere 16 Stunden inkubiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Gesamt-RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung für die *RNA deep sequencing* Analysen erfolgte unter Anwendung des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers.

Für alle anderen Anwendungen wurde die RNA nach der Methode von [311] isoliert. Dafür wurden die Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 14000 rpm und 4°C für 15 sec zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl der Solution D (4 M Guanadinium Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat (pH 7,0), 0,5% Sarcosyl, 0,1 M β-Mercaptoethanol) resuspendiert und die Zellen auf Eis lysiert. 500 µl Phenol, 50 µl 2 M Na-Acetate (pH 4,0) und 7,2µl β-Mercaptoethanol wurden zu den lysierten Zellen pipettiert (557 µl/Probe) und resuspendiert. 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol wurden hinzugefügt

## 2. Material und Methoden

und solange gevortext, bis eine Weißfärbung zu erkennen war (etwa 15 sec). Die Proben wurden schließlich für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 10000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. 400 µl der oberen wässrigen Phase wurden abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol vermischt. Die Proben wurden dann für mindestens 1 Stunde bei - 20°C gelagert. Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 20 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 150 µl gekühltem 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss für etwa 10 min auf Eis getrocknet und in 10 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm (NanoDrop 1000 Spectralphotometer, ND-1000 Version-3.7.0) bestimmt und anschließend auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### **2.2.2.3 DNase-Inkubation**

Für einen DNase-Verdau wurden je 1 µg RNA und 10 Units/ µl (entspricht 1 µl) RNase-freie DNase I (Roche) eingesetzt. Das Volumen wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und das Gemisch zunächst bei 37°C für 40 min und anschließend bei RT für 20 min inkubiert. Abschließend erfolgte eine Inaktivierung der DNase bei 70°C für 5 min.

### **2.2.2.4 Reverse Transkription**

Mittels der reversen Transkription lassen sich aus der Gesamt-RNA durch die Verwendung von Oligo(dT) Primern, die spezifisch an Poly-A-Schwänze binden, die mRNAs in cDNA umschreiben.

Dazu wurden zu 9 µl der DNase-verdauten RNA, 2 µl Oligo(dT)-Primer (7,5 µM, Roche Molecular Biochemicals), 8 µl Desoxynukleosidtriphosphat (2,5 mM each, Qiagen) und 7 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt, um die Entstehung von Sekundärstrukturen zu verhindern. In PCR-Gefäßen (200µl, Starlab) wurden je 8 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl DTT (0,1 M, Invitrogen), 2 µl Ribonuclease Inhibitor (20-40 U/µl, Promega) und 2 µl SuperScript III RNase-H Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen) vorgelegt und die Proben hinzupipettiert. Im Robocycler Gradient 96

## 2. Material und Methoden

(Stratagene) erfolgte schließlich die reverse Transkription bei zunächst 50°C für 60 min und dann bei 70°C für 15 min.

### 2.2.2.5 Semi-quantitative PCR

Eine PCR ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Erfolgt die Amplifikation im linearen Bereich, lässt die Menge der erhaltenen Produkte einen Rückschluss über die verhältnismäßige Quantität des Startermoleküls zu. Wird synthetisierte cDNA (2.2.2.4) als Template verwendet, gibt die anschließende PCR mit spezifischen Primer Auskunft über die relative mRNA-Menge des jeweiligen Gens.

Für eine Reaktion wurden je 2 µl cDNA, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (Roche), 2 µl Desoxynukleosidtriphosphat (2,5 mM each, Qiagen), 10 pmol 3'- und 5'-Primer sowie 0,125 µl AmpliTaq (5 units/µl, Roche) eingesetzt und das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt.

Das Programm des Robocyclers Gradient 96 (Stratagene) oder des TProfessional Trios (Biometra) wurde für jedes Primerpaar durch Veränderungen verschiedener Parameter ermittelt. Es wurde sich dabei an den folgenden Einstellungen orientiert:

26-36 Zyklen	Initiale Denaturierung	94°C	3 Minuten
	Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	Schmelztemperatur – 5°C	30-60 Sekunden
	Elongation	72°C	1 Minute
	Abschließende Elongation	72°C	10 Minuten

### 2.2.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels eines PAA-Gels

PCR-Produkte wurden mittels Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde ein 10%iges, natives PAA-Gel (10 ml PAA-30, 6 ml 5 x TBE, 14 ml ddH<sub>2</sub>O, 420 µl 10 x APS, 21 µl TEMED) angesetzt, in die vorher vorbereitete Gelapparatur gegossen und der entsprechende Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die mit 1 x TBE gefüllte Gelkammer gespannt. Nach dem Beladen der Proben lief das Gel bei 30 mA für etwa 1-2 Stunden. Anschließend wurde es für ca. 5 min in einer EtBr-Lösung (20 ml 1 X TBE, 3 µl Etbr) inkubiert und im Gel-Dokumentationssystem Gel iX Imager von Intas visualisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels eines Agarose-Gels

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten auf einem 1%igen Agarose Gel wurde die entsprechende Gel-Lösung (0,5 g Agarose (Biozym), 50 ml 1 x TBE) aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden ca. 2 µl EtBr hinzugegeben und die die Lösung in die Gelapparatur gegossen. Nach der Auspolymerisation des Gels wurde die Kammer mit 1 x TBE gefüllt, die Proben beladen und das Gel bei ca. 80 V für etwa 30 min laufen gelassen. Die Visualisierung der Banden erfolgte im Gel-Dokumentationssystem Gel iX Imager von Intas.

### 2.2.2.8 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für die quantitative Bestimmung von Transkripten wurde die real-time PCR (qPCR) verwendet. Die qPCRs wurden im LightCycler 1.5 (Roche) mit Hilfe des gebrauchsfertigen Precision qPCR MasterMix (PrimerDesign Ltd) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus 5 µl Precision qPCR MasterMix, jeweils 0,5 µl der HPLC aufgereinigten Primer (10 µM) sowie und 1 µl cDNA. Das Gesamtvolumen wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt.

Die angewandten Konditionen waren folgende:

40 Zyklen	Enzym Aktivierung	95°C	10 Minuten
	Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	Annealing	60°C	1 Minute
	Schmelzkurve	63°C+ 0,1°C/sek bis 95°C	30 Sekunden

Die Daten wurden anschließend mit der LightCycler Software Version 3.5 ausgewertet.

### 2.2.2.9 Herstellung einer RNA-Sonden

Für den spezifischen Nachweis von RNA wurden RNA-Sonden hergestellt, die aus Digoxigenin (DIG)-markierter DNA bestanden. Nach einer wie in Abschnitt 2.2.2.5 durchgeführten PCR mit spezifischen Primern, die ein 200-300 bp großes Fragment des zu detektierenden Transkriptes amplifizieren, wurde der Erfolg der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.7) überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt wie in Abschnitt 2.2.2.12 aufgereinigt und in einer erneuten PCR als

## 2. Material und Methoden

Template unter der Verwendung von DIG-markierten dNTPs (DIG-High Prime, Roche) eingesetzt. Dazu wurden 2 µl des PCR-Produktes, 4 µl 5 x Phusion HF PCR Puffer (Finnzymes), 2 µl 10 x Digoxigenin-dNTP Mix, je 10 pmol der spezifischen Primer, 0,5 µl Phusion-DNA-Polymerase (5 Units/µl, Finnzymes) gemischt und das Volumen auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde überprüft, ob das erhaltene Produkt durch die Markierung mit DIG größer geworden ist. Abschließend wurde es mit 10 ml DIG Easy Hyb Granules (Roche) gemischt. Eine Sonde konnte bei Lagerung auf -20°C bis zu fünfmal verwendet werden.

### **2.2.2.10 RNA-Gelelektrophorese**

Um RNA elektrophoretisch aufzutrennen, wurde 1 g Agarose mit 85 ml ddH<sub>2</sub>O versetzt und kurz aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 60°C abgekühlt war, wurden 10 ml 10 X MEN pH 7 (200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA) und 5,5 ml 37%iges Formaldehyd hinzugegeben. Das Gemisch wurde in die Gelapparatur gegossen und nach dem Erhärten des Gels wurde die Kammer mit RNA-Laufpuffer (30 ml 10x MEN in 270 ml ddH<sub>2</sub>O) gefüllt. Es wurden je 1-8 µg RNA mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen eingestellt, mit 2,5 µl RNA Loading Dye (Fermentas) versetzt und bei 70°C für 10 min denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 400 mA und 60-70 V für ca. 3 Stunden.

### **2.2.2.11 Northern-Blot**

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA kann durch den Transfer auf eine Membran immobilisiert werden. Anschließend können spezifische RNA-Moleküle unter der Verwendung einer DIG-Sonde (Abschnitt 2.2.2.9) sichtbar gemacht werden.

Nach der Auftrennung der RNA (Abschnitt 2.2.2.10) wurde das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 20 x SSC pH 7 (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat) für 10 min inkubiert. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge in einer Plastikschaale aufgebaut:

## 2. Material und Methoden

20 Papiertücher

3 Whatman Papiere

1 Whatman Papier (in 20 x SSC getränkt)

Positiv geladene Nylonmembran (in 20 x SSC getränkt)

Agarosegel

3 Whatman Papiere (in 20 x SSC getränkt)

Rechts und links neben den Blot wurde je eine mit 20 x SSC gefüllte Plastischale gestellt. Ein Whatman Papier wurde anschließend so gelegt, dass es quer über den Blot verlief und mit beiden Puffer-Reservoirs verbunden war. Der Blot wurde schließlich mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Nachdem Abbau des Blots wurde die RNA mittels eines Crosslinkers auf der Nylonmembran quervernetzt. Diese wurde anschließend in eine Hybridisierungsröhre überführt und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte eine Prä-Hybridisierung der Membran mit DIG Easy Hyb Granules (Roche) in einem Hybridisierungssofen bei 55°C für 2 Stunden. Die Sonde wurde für 10 min aufgekocht und nach dem Entfernen der Prä-Hybridisierungslösung zu der Membran gegeben. Daran schloss eine Inkubation bei 55°C über Nacht an. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst einmal mit ddH<sub>2</sub>O und schließlich zweimal mit Stringent Wash 1 (2 x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Es folgte die zweimalige Inkubation mit Stringent Wash 2 (0,2 x SSC, 0,1% SDS) bei 68°C für je 20 Minuten im Hybridisierungssofen.

Nach erneutem zweimaligen Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, dem Überführen der Membran in ein Kunststoffgefäß und dem Waschen mit Maleinsäure-Puffer pH 7,5 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl), wurde sie für 30 min mit 1 x Blockier-Lösung (Roche) bei RT inkubiert. Nachdem Abgießen der Lösung wurde der  $\alpha$ -Digoxigenin AP Antikörper (1:20000 verdünnt mit 1 x Blockier-Lösung) für mindestens 30 min zu der Membran gegeben. Schließlich wurde diese dreimal mit Maleinsäure-Puffer gewaschen und für 5 min mit CDP-Star (Roche) inkubiert. Die Visualisierung der Banden erfolgte im Gel-Dokumentationssystem Gel iX Imager von Intas.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.12 Klonieren

#### PCR

Die DNA Fragmente für die Herstellung der Mini-Gene wurden mittels PCR nach folgendem Protokoll amplifiziert:

5  $\mu\text{L}$  10x Expand High Fidelity Buffer (Roche)  
1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM, Qiagen)  
1  $\mu\text{L}$  5' Primer (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )  
1  $\mu\text{L}$  3' Primer (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )  
0.5  $\mu\text{L}$  High Fidelity Taq DNA polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ , Roche)  
2  $\mu\text{L}$  Plasmid DNA (~20 ng)  
ad. 50  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O

Die Amplifizierung erfolgte im Robocycler Gradient 96 (Stratagene) oder im TProfessional Trio (Biometra) nach folgendem Programm:

36 Zyklen	Initiale Denaturierung	94°C	3 Minuten
	Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	56°C	1 Minute
	Elongation	72°C	1 Minute
	Abschließende Elongation	72°C	10 Minuten

5  $\mu\text{L}$  des PCR-Produkts wurden zur Überprüfung der richtigen Größe des Fragments auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

#### Phenol/Chloroform-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mittels Phenol/Chloroform nach [311] durchgeführt. Dafür wurde der PCR-Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 100  $\mu\text{l}$  Phenol und 100  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol vermischt und für 15 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isomyalkohol versetzt und zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 20  $\mu\text{l}$  4 M LiCl und 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%; gekühlt auf -20°C) hinzugegeben. Es folgte die Fällung der DNA auf Trockeneis für mindestens 30 min. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 14000 rpm und 4°C

## 2. Material und Methoden

zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen. Abschließend wurde die DNA in 15 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **Restriktionsverdau**

Zum spezifischen Verdau von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Verdau wurde für 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die PCR-Produkte wurden erneut mittels Phenol/Chloroform aufgereinigt. Kontroll-Verdaue wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt.

### **Aufreinigung von DNA aus einem Low-Melt Agarose Gel**

Die verdauten Plasmide wurden auf einem 0.8% Low-Melt Agarose Gel (Sieve GP Agarose, Biozym, Germany) in TBE  $\frac{1}{10}$  E Puffer (89 mM Tris Borat pH 8, 0.2 mM EDTA) bei 30 mA aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht (320nm) ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Um die restlichen Enzyme zu inaktivieren und die Agarose zu schmelzen, wurden die Proben bei 65°C für 10 Minuten inkubiert.

### **Ligation von DNA Fragmenten**

Für die Ligation eines PCR-Fragments in das Plasmid-Rückgrat wurden folgende Komponenten bei 16°C über Nacht inkubiert:

1 µL	T4 DNA Ligase (400 U/mL, NEB)
2 µL	10x T4 Ligase Puffer
1 µL	Plasmid (Low-Melt)
2-4 µL	PCR-Fragment
ad. 20 µL dH <sub>2</sub> O	

### **Transformation**

6 µl der Ligation oder 1 µl aufgereinigter Plasmid-DNA wurden zu den auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten DH5αF'λQ Bakterien gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch einem 1,5minütigem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Es folgte eine 2minütige Inkubation auf Eis. 800 µl LB-Medium (10 g Bacto™ Trypton (BD), 5 g Hefeextrakt (Roth), 10 g NaCl; pH 7.5 (NaOH)) wurden zu den Bakterien gegeben bei 200 rpm und 37°C für 1-2 Stunden inkubiert.

## 2. Material und Methoden

400 µl der transformierten Zellen wurden auf Agar-Platten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag in 5 ml LB-Kulturen über Nacht vervielfältigt.

### **Mini-Plasmidpräparation**

2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 14000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 resuspendiert (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 µg/ml RNase A) und die Bakterien durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl Puffer 3 (3 M KAc; pH 5,5) und die Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen und mit 700 µl 100% Isopropanol versetzt und erneut bei 14000 rpm für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde schließlich für 5 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für Restriktionsverdauung verwendet.

### **Midi-Plasmidpräparation**

Für die Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid-Midi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **Sequenzierung von DNA**

Die Verifizierung der eingebrachten DNA Sequenzen in das entsprechende Plasmid-Rückgrat wurde durch Sequenzierungen bei Beckman Coulter Genomics durchgeführt.

## **2.2.3 Virologische Methoden**

### **2.2.3.1 Herstellung von Virusstocks**

Zur Herstellung von Virusüberständen wurden jeweils  $6,5 \times 10^6$  HEK 293T-Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 Stunden mit je 9 µg proviraler Plasmid DNA unter Anwendung von PEI (1 mg/ml) transfiziert. 52 Stunden wurde der Zellüberstand abgenommen, in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert (Hettich, Rotanta 460R), in Cryo-Röhrchen (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3.2 Infektiösitätstest über Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase-Expression in HIV-1 infizierten Zellen (X-Gal-Assay)

Um die Konzentration funktioneller infektiöser Einheiten (IU, *infectious units*) im Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurden TZM-bl-Zellen verwendet. In einer 96 Well-Platte wurden pro Well  $6 \times 10^3$  TZM-bl-Zellen kultiviert und nach 24 h mit 100  $\mu$ l Virusüberständen verschiedener Verdünnungsstufen in 8 Replikaten infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und durch Zugabe von 100  $\mu$ l Fixierlösung (0,8% Formaldehyd; 0,25% Glutaraldehyd; in PBS) für 10 min bei 4°C fixiert und anschließend zweimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Die Blaufärbung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 100  $\mu$ l X-Gal-Lösung (0,4 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid, 4 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 4 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 2 mM  $MgCl_2$  in PBS) und Inkubation bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt, die fixierten Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 50% Glycerol (in PBS) überschichtet. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch.

### 2.2.3.2 Titerbestimmung mittels TCID<sub>50</sub>

Zur Bestimmung des Virustiters wurde der TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infecion Dose*) bestimmt. Dieser Wert beschreibt die Dosis infektiöser Einheiten, die benötigt wird, um 50% einer Zellkultur zu infizieren. Hierfür wurde die Anzahl der Wells eines X-Gal-Assays (Abschnitt 2.2.3.1) lichtmikroskopisch ermittelt, bei denen mindestens eine blau gefärbte Zelle vorhanden war. Die Kalkulation des TCID<sub>50</sub>/ml erfolgte mittels der Formel:

$$\frac{D_s^{\left(\frac{N}{R}+0,5\right)} D_0 * 1000}{D_s V}$$

$D_s$ : alle weiterführenden Verdünnungen, N: Summe der positiv gefärbten Wells, R: Anzahl der Replikate pro Verdünnungsstufe,  $D_0$ : erste eingesetzte Verdünnungsstufe, V: Volumen der zugegebenen Virusverdünnungen in ml.

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden in 2 ml PBS abgekratzt und für 15 sec bei 14000 rpm zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS

## 2. Material und Methoden

gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl 2,5 x SDS-Probenpuffer (60 mM Tris-HCl, 10% Glycerin, 5% SDS, 10% β-Mercaptoethanol; pH 6,8) aufgenommen.

### **2.2.4.2 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit dem Mini-Protean II Komplettsystems (BioRad) durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein 12%iges Trenngel gemischt (3,6 ml PAA-30; 1,9 ml 2M Tris-HCl pH 8; 45 µl 20% SDS; 3,8 ml ddH<sub>2</sub>O; 18 µl TEMED; 108 µl 10%APS) und so gegossen, dass oberhalb ca. noch 1/3 zwischen den Glasplatten frei blieb. Die Lösung wurde mit Isopropanol beschichtet. Nachdem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol weggeschüttet. Es folgte das Gießen des 5%igen Sammelgels (1,2 ml PAA-30; 0,9 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8; 33,8 µl 20% SDS; 1,6 ml 60% Saccharose; 3,1 ml ddH<sub>2</sub>O; 9 µl TEMED; 90 µl 10%APS).

Die Proteinlysate wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Gelkammer wurde mit 1 x Lämmli (0,1% SDS, 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycerol) gefüllt und das Gel bei 20-30 mA für ca. 2 Stunden laufen gelassen.

### **2.2.4.3 Western-Blot**

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können durch den Transfer auf eine Membran immobilisiert und durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht werden.

Für den Transfer wurde die Mini Trans-Blot cell (BioRad) verwendet. Alle folgenden Bestandteile wurden in Transferpuffer (25mM Tris pH 8,8; 192 mM Glycin; 20% MeOH; 0,1% SDS) getränkt und von der Anode ausgehend in folgender Reihenfolge aufgebaut:

## 2. Material und Methoden

1 Schwamm

2 Whatman Papiere

Gel

Nitrozellulose-Membran

2 Whatman Papiere

1 Schwamm

Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer gefüllt. Es wurde eine Spannung von zunächst 100 V und 150 mA für 15 min und anschließend von 100 V und 150 mA für 20 min angelegt.

Der Erfolg des Protein-Transfers auf die Membran wurde mittels reversibler Ponceau-Färbung kontrolliert (Ponceau-Färbelösung: 2% Ponceau-S; 30% Trichloressigsäure; 30% Sulfosalicylsäure) und die Färbung im Anschluss mit TBST ausgewaschen.

Es folgte die Absättigung der Membran in Milchpulver-Lösung (5% Milchpulver in TBST) für mindestens eine Stunde. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert (s. Tab. 1) und dann dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Die Nitrocellulose wurde nun mit einem an eine Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (s. Tab. 2) für 1 Stunde inkubiert und anschließend erneut dreimal mit TBST für 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *enhanced chemical luminescence* (ECL)-Detektionssystems (Amersham) nach Herstellerangaben im Advanced Fluoreszenz u. ECL Imager von Intas. Zum erneuten Verwenden der Membran für Detektion der Ladekontrolle wurde die ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.4.5 Luciferase-Assay**

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen 2mal mit 2 ml PBS gewaschen, in 500 µl 2x Lysis-Puffer (PJK) aufgenommen und für 15 min bei 4°C und 800 rpm geschüttelt. Je 20 µl der Suspension wurde auf eine Well einer 96-Well Platte pipettiert. Die Zugabe des Substrats (PJK) und die Auslese der Emission erfolgte durch den Infinite® 200 (Tecan).

## 2. Material und Methoden

### 2.2.5 Bioinformatische Methoden

#### 2.2.5.1 Illumina Sequenzierung

Die Gesamt-RNA wurde mittels des AllPrep DNA/RNA/Protein Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die cDNA Synthese, die Library Erstellung, die Detektion der Sequenzen mit der Illumina Plattform sowieso die Erstellung der FASTQ Dateien wurde von Beckman Coulter Genomics durchgeführt. Das anschließende Alignment der FASTQ Dateien wurde mit TopHat (v 2.0.3) unter der Verwendung des ENSEMBL Referenzgenoms (Version 74) durchgeführt. Für die Expressionsanalysen wurde die Anzahl der alignten Reads, die über eine EJ verliefen, mittels R und CRAN rbamtools und Bioconductor spliceSites packages berechnet und die Anzahl pro Millionen gegappter reads (rmpg) wurde normalisiert [312].

Die Bearbeitung der FASTQ Dateien wurde von Dr. Wolfgang Kaisers (Universität Düsseldorf) durchgeführt.

#### 2.2.5.2 Algorithmus zur Bestimmung der intrinsischen Stärke von Spleißstellen

Spleißdonorstärken wurden mit Hilfe des HBond-Scores [35] bestimmt ([https://www2.hhu.de/rna/html/hbond\\_score.php](https://www2.hhu.de/rna/html/hbond_score.php)). Spleißakzeptorstärken wurden mittels des MaxEntScore Algorithmus ([http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq\\_acc.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html)) ermittelt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Der PI3K/Akt Signalweg und eine HIV-1 Infektion stehen in PM1 Zellen zueinander in Wechselwirkung

Der PI3K/Akt Signalweg reguliert zahlreiche Prozesse innerhalb eukaryotischer Zellen. Dieses breite Spektrum macht ihn für ganz unterschiedliche Viren angreifbar, die ihn zu ihrem eigenen Vorteil nutzen [278].

Auch für HIV-1 Nef wurde bereits eine Interaktion mit dem Signalweg nachgewiesen [250, 313]. Bisher mangelt es jedoch an entsprechenden Untersuchungen der Interaktionen zwischen HIV-1 und dem Signalweg unter Infektionsbedingungen.

Im folgenden Kapitel wurde daher der Frage nachgegangen, ob eine Inhibition der Akt Kinase die HIV-1 Virusreplikation beeinflussen kann. Parallel wurde untersucht, ob sich umgekehrt die HIV-1 Infektion auf die Phosphorylierung der Akt Kinase auswirkt. Zuvor sollte aber die Effektivität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren des Signalwegs überprüft werden.

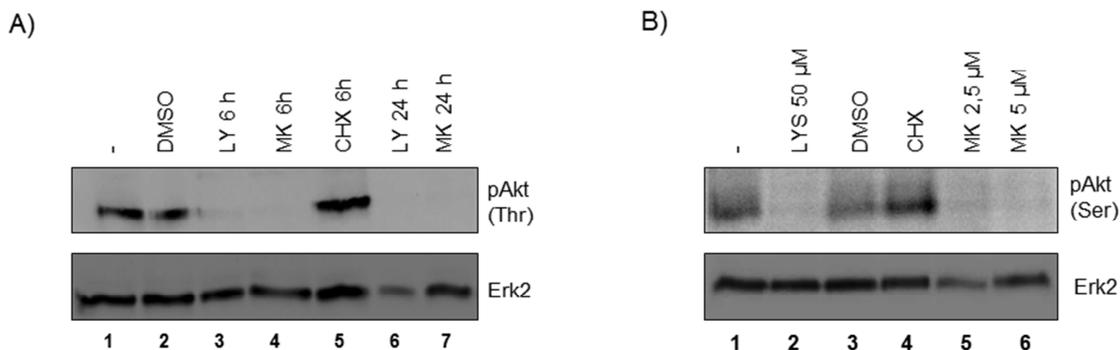
#### 3.1.1 Der PI3K Inhibitor LY294002 und der Akt Inhibitor MK2206 unterdrücken sowohl die Threonin als auch die Serin Phosphorylierung der Akt Kinase

Für die Aktivierung der Akt Kinase sind zwei Phosphorylierungsschritte erforderlich, die durch zwei Kinasen katalysiert werden: Zunächst phosphoryliert PDK1 das Threonin an Position 308, anschließend mTORC2 das Serin an Position 473. Erst wenn beide Aminosäuren phosphoryliert sind, ist die Akt Kinase enzymatisch aktiv. Der PI3K Signalweg kann durch die Zugabe von Inhibitoren an unterschiedlichen Stellen unterbrochen werden. Entweder am Beginn durch Inhibition der PI3K Aktivität oder nachgeschaltet durch Inhibition der Akt Aktivität. Im Folgenden wurden die Auswirkungen von zwei reversiblen Inhibitoren auf die Akt Aktivierung einzeln getestet: LY294002 ist gegen die PI3K gerichtet, während MK2206 die Akt Kinase inhibiert.

Um die Effektivität der beiden Phosphorylierungsinhibitoren zu testen, wurde jeweils ein Inhibitor für 6 oder 24 Stunden HeLa-CD4+ Zellen zugesetzt, die Proteinlysate in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und entweder mit einem phosphorylierungsspezifischen Antikörper gegen Threonin 308 oder Serin 473 der

### 3. Ergebnisse

Akt Kinase inkubiert. Die Akt Threonin Phosphorylierung blieb bereits nach 6 Stunden Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  LY294002 aus (Abb. 3.1 A, Spur 3). Auch die für die vollständige Aktivierung essentielle Serin 473 Phosphorylierung wurde durch den PI3K Inhibitor umfassend gehemmt (Abb. 3.1 B, Spur 2). In der hier verwendeten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  sollte LY294002 keine anderen Lipid- oder Protein-Kinasen inhibieren [314]. Durch die Verwendung des Akt-spezifischen Inhibitors MK2206 kann jedoch die Inhibition anderer PI3K Effektoren wie S6K oder Rac [315, 316] ausgeschlossen werden. Der allosterische Inhibitor der Akt Kinase MK2206 kann zudem in sehr geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Bereits 2,5  $\mu\text{M}$  verhinderten die Serin 473 Phosphorylierung fast gänzlich und 5  $\mu\text{M}$  vollständig (Abb. 3.1 B, Spur 5 und 6). Die Threonin 308 Phosphorylierung konnte bereits nach 6 Stunden Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A, Spur 4). Wie zu erwarten war, zeigten weder das Lösungsmittel der Inhibitoren DMSO, noch der Translationshemmer Cycloheximid einen Einfluss auf die Akt Phosphorylierung (Abb. 3.1 A, B). Letzteres wurde eingesetzt, um zu bestätigen, dass die Antikörper spezifisch die Phosphoepitope erkennen und ihr Nachweis translationsunabhängig ist. Im Anschluss wurden die Membranen zum Nachweis gleichmäßiger Proteinmengen mit einem Antikörper gegen Erk2 inkubiert.



**Abbildung 3.1 LY294002 und MK2206 inhibieren die Phosphorylierung der Akt Kinase.**

HeLa-CD4<sup>+</sup> wurden für die angegebenen Zeiträume mit DMSO (24 Stunden), LY294002 (50  $\mu\text{M}$ ), Cycloheximid (CHX, 50 mg/ml) oder MK2206 (MK, 5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Proteine wurden isoliert, mittels einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch phosphorylierungsspezifische Antikörper gegen Threonin 308 (A) und Serin 473 (B) wurde die Phosphorylierung der Akt Kinase detektiert. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle.

Beide Inhibitoren sind also für die Inaktivierung der Akt Kinase geeignet. Da MK2206 jedoch spezifisch gegen die Akt Kinase gerichtet ist und andere der PI3K nachgeschalteten Kinasen unbeeinflusst lässt, ist MK2206 sicherlich geeigneter für

### 3. Ergebnisse

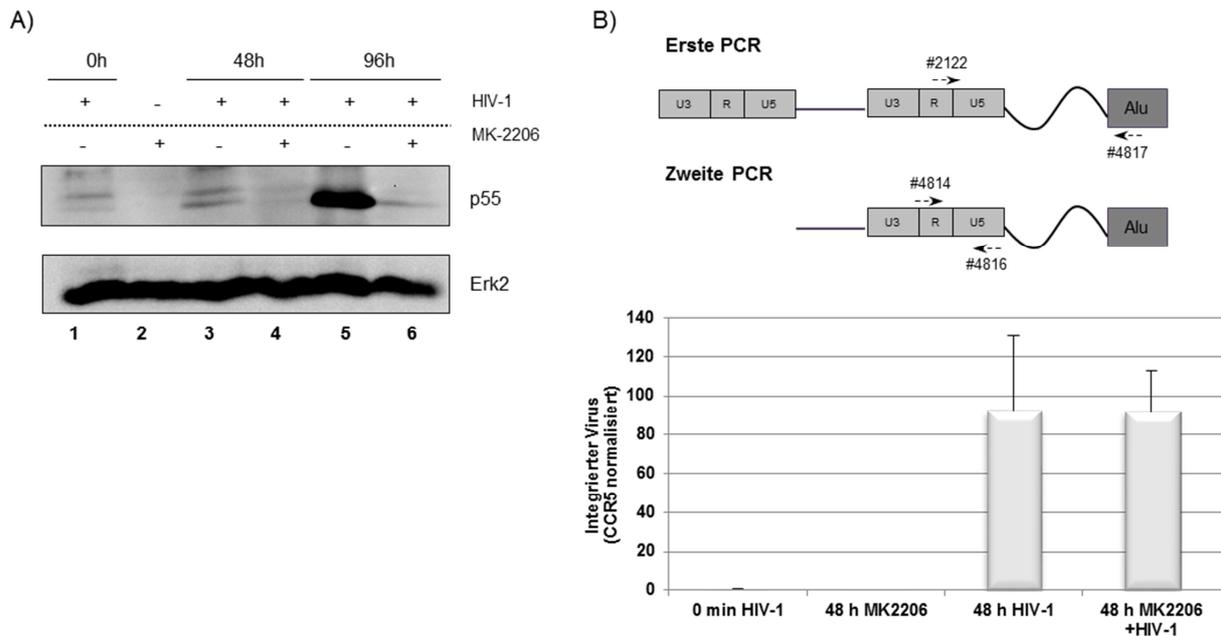
Untersuchungen, die ausschließlich die Aufklärung Akt-abhängiger Regulationsmechanismen zum Ziel haben.

#### **3.1.2 Die HIV-1 Viruspartikel Produktion kann durch Inhibition der Akt Kinase reduziert werden**

Wir konnten bereits einen Zusammenhang zwischen HIV-1 Partikelproduktion und der Aktivität des PI3K/Akt Signalwegs nachweisen [295]. Eine frühe Inhibition der PI3K durch LY94002 führte im Fall einer Transfektion des proviralen Genoms pNL4-3 zu einem veränderten viralen Spleißmuster und einer deutlich verminderten Virusreplikation.

Um nun zu untersuchen, ob der PI3K Signalweg bzw. die Aktivität der Akt Kinase die HIV-1 Replikation beeinträchtigen kann, wurden dualtrophe T-Zellen (PM1) mit HIV-1, in Abwesenheit und Anwesenheit von MK2206, infiziert. Für die Infektion wurden Viruspräparationen mit einem definierten biologischen Titer verwendet. Hierzu wurden HEK293T Zellen mit proviraler DNA transfiziert und die viralen Partikel, 52 Stunden später, aus dem Überstand abzentrifugiert. Der biologische Titer wurde mittels eines X-Gal-Assays bestimmt. Dazu wurden TZM-bl Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen des infektiösen Überstands infiziert und 48 Stunden später mit X-Gal inkubiert. Die Zellen codieren für das *β-Galaktosidase* Gen unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promoters, sodass der Titer mittels der durch das Enzym entstandenen Blaufärbung ermittelt werden konnte. Die Infektion mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,5 wurde entweder für 0, 48 oder 96 Stunden zugelassen. Im Fall der 48 Stunden andauernden Infektion wurden 5  $\mu$ M des Akt Inhibitors MK2206 30 Minuten vor der Infektion und im Fall der 96 Stunden andauernden Infektion 48 Stunden vor der Ernte hinzugegeben. Eine längere Inkubationszeit mit dem Inhibitor führte andernfalls zum Ablösen der Zellen. Immunoblot Analysen der geernteten Proteine zeigten, dass die Abundanz des viralen Capsid-bildenden Vorläuferproteins p55 – als Marker für die virale Replikation – stark vermindert war, wenn die Zellen zuvor dem Akt Inhibitor ausgesetzt waren (Abb. 3.2 A). Zum Nachweis gleichmäßiger Proteinmengen wurde die Membran nach Behandlung mit einer Re-Blot Lösung mit einem Antikörper gegen Erk2 behandelt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.2 MK2206 vermindert die HIV-1 Replikation.**

PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit 50  $\mu$ M MK2206 behandelt und/oder 30 Minuten später mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. (A) Die Proteine wurden isoliert, mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von p55 erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle. (B) Die DNA wurde isoliert und mittels einer Nested-PCR amplifiziert. Die erste PCR erfolgte mittels der gekennzeichneten Primer #2122 und #4817. Die zweite, quantitative PCR wurde mit den Primern #4814 und #4816 im LightCycler 1.5 (Roche) durchgeführt. Für die Normalisierung wurden die Primer #4820 und #4821 (CCR5) verwendet.

Um auszuschließen, dass die verminderte p55 Menge nicht auf einen blockierten Viruseintritt in die Zelle, sondern tatsächlich auf eine beeinträchtigte Virusreplikation zurückzuführen war, wurde mittels Nested-PCR an DNA Proben die Integration des Virus in das Wirtsgenom untersucht. Bei einer Nested-PCR dient das amplifizierte Produkt aus der ersten PCR als Template für die zweite PCR. Dadurch wird sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität der Methode erhöht. Das Primer-Paar für die erste PCR wurde so gewählt, dass zunächst ein Abschnitt beginnend in der U3 Region der Virus-DNA bis zum nächst gelegenen Alu-Elementes im Chromosom amplifiziert wurde (Abb. 3.2 B). Alu-Elemente sind repetitive Sequenz-Abschnitte, die etwa 10% des humanen Genoms ausmachen und sich somit für den Nachweis von zufällig integrierter Virus-DNA eignen [317]. In der zweiten PCR-Reaktion wurden die Primer so ausgewählt, dass mit ihnen ausschließlich DNA viralen Ursprungs vervielfältigt werden konnte. Diese PCR wurde im Anschluss auf das T-Zell spezifische Haushaltsgen CCR5 normalisiert (n=5). Da die Inhibitor Behandlung keinen Einfluss auf die Integration des Virus in das Genom zeigte (Abb. 3.2 B), kann geschlussfolgert werden, dass die HIV-1 Replikation durch Inhibition der Akt Kinase

### 3. Ergebnisse

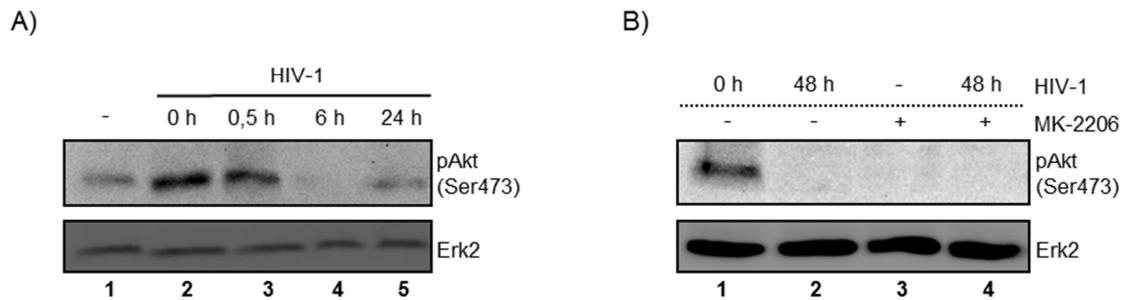
verringert werden kann und zwar zu einem Zeitpunkt, der der Integration in das Wirtsgenom nachgeschaltet ist.

#### **3.1.3 Der Phosphorylierungszustand der Akt Kinase ändert sich im Verlauf einer HIV-1 Infektion**

Da die HIV-1 Replikation durch den Inhibitor der Akt Kinase deutlich verringert werden konnte (Abb. 3.2 A), war es nun von Interesse zu schauen, ob – umgekehrt – auch die Infektion einen Einfluss auf die Phosphorylierung der Akt Kinase ausüben würde.

Hierzu wurde in einem Western-Blot geprüft, ob sich der Phosphorylierungszustand und damit die Aktivität der Akt Kinase im Verlauf der HIV-1 Infektion ändert. Für den Phosphoepitop Nachweis wurde der Serin-spezifische Antikörper verwendet, da die Serin Phosphorylierung an Position 473 als Kennzeichen der vollständigen Aktivierung der Kinase gilt. Die zu untersuchenden Zelllysate der infizierten PM1 Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten der HIV-1 Infektion geerntet. Unmittelbar nach Zugabe der Viruspartikel in das Zellkulturmedium war bereits eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung zu beobachten (Abb. 3.3 A, Spur 2). 30 Minuten später nahm die Phosphorylierung leicht ab (Abb. 3.3 A, vgl. Spur 2 mit 3) und nach 6 Stunden lag der Phosphorylierungsgrad sogar unter dem Niveau nicht-infizierter Zellen (Abb. 3.3 A, vgl. Spur 1 mit 4). Nach 24 Stunden entsprach der Phosphorylierungsgrad hingegen wieder dem Niveau nicht-infizierter Zellen (Abb. 3.3 A, vgl. Spur 1 mit 5). 48 Stunden nach Infektion konnte, ebenso wie nach Zugabe des Akt Inhibitors MK2206, keine Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.3 B, Spur 2 und 3). Dies deutet darauf hin, dass die Akt Kinase im Verlauf der HIV-1 Infektion reguliert wird: Nach der Aktivierung folgt eine Inaktivierung. Die anfängliche Aktivierung könnte eine Erklärung für die eingeschränkte Virusreplikation sein (Abb. 3.2 A). Da die Phosphorylierung der Akt Kinase 48 Stunden nach HIV-1 Infektion nicht mehr nachweisbar war und dies mit der Zugabe des Akt Inhibitors MK2206 vergleichbar war, sollte als nächstes geprüft werden, ob auch die Expression zellulärer Gene nach Inhibition des Signalwegs und HIV-1 Infektion einer vergleichbaren Regulation unterliegt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.3 Die Phosphorylierung der Akt Kinase verändert sich im Lauf einer HIV-1 Infektion.**

PM1 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und/oder mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5 μM) behandelt (B). Die Proteine wurden isoliert, auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und Akt mittels eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers (Ser473) nachgewiesen. Die Detektion von Erk2 diente als Ladekontrolle.

### 3.2 Sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändern die Genexpression mehrerer SR Proteine

Um von einer genomischen RNA alle alternativen mRNAs für die effiziente Translation der einzelnen HIV-1 Proteine bereitzustellen, bedient sich HIV-1 ausgiebig der zellulären Spleißmaschinerie (Kapitel 1.3.2, Seite 33). Für das alternative Spleißen werden dabei sowohl das Spleißosom als auch die spleißregulatorischen Proteine des Wirtes verwendet. Auch der PI3K/Akt Signalweg ist an der Regulation vom zellulären Spleißen, etwa durch die Phosphorylierung von SR Proteinen oder deren Kinasen, beteiligt [83, 85, 318]. Darüber hinaus konnten wir bereits zeigen, dass die Aktivität der PI3K für das korrekte Spleißen der HIV-1 prä-mRNAs notwendig ist [295].

Da den SR Proteinen als spleißregulierende Proteine eine übergeordnete Rolle zukommt, wurde im Folgenden zunächst das Phosphorylierungsmuster einiger SR Proteine nach HIV-1 Infektion und im Vergleich dazu nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs untersucht. Der Vergleich sollte zeigen, ob auch die Phosphorylierung dieser spleißregulatorischen Komponenten gleichermaßen sowohl durch die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs reguliert werden kann, da wir bereits gesehen hatten, dass HIV-1 nach einer anfänglichen Aktivierung diesen Signalweg im weiteren Verlauf einer Infektion – vergleichbar zu den Inhibitoren – blockiert.

### 3. Ergebnisse

#### **3.2.1 Die PI3K Inhibition, ebenso wie die HIV-1 Infektion, verändern den Phosphorylierungszustand von SR Proteinen**

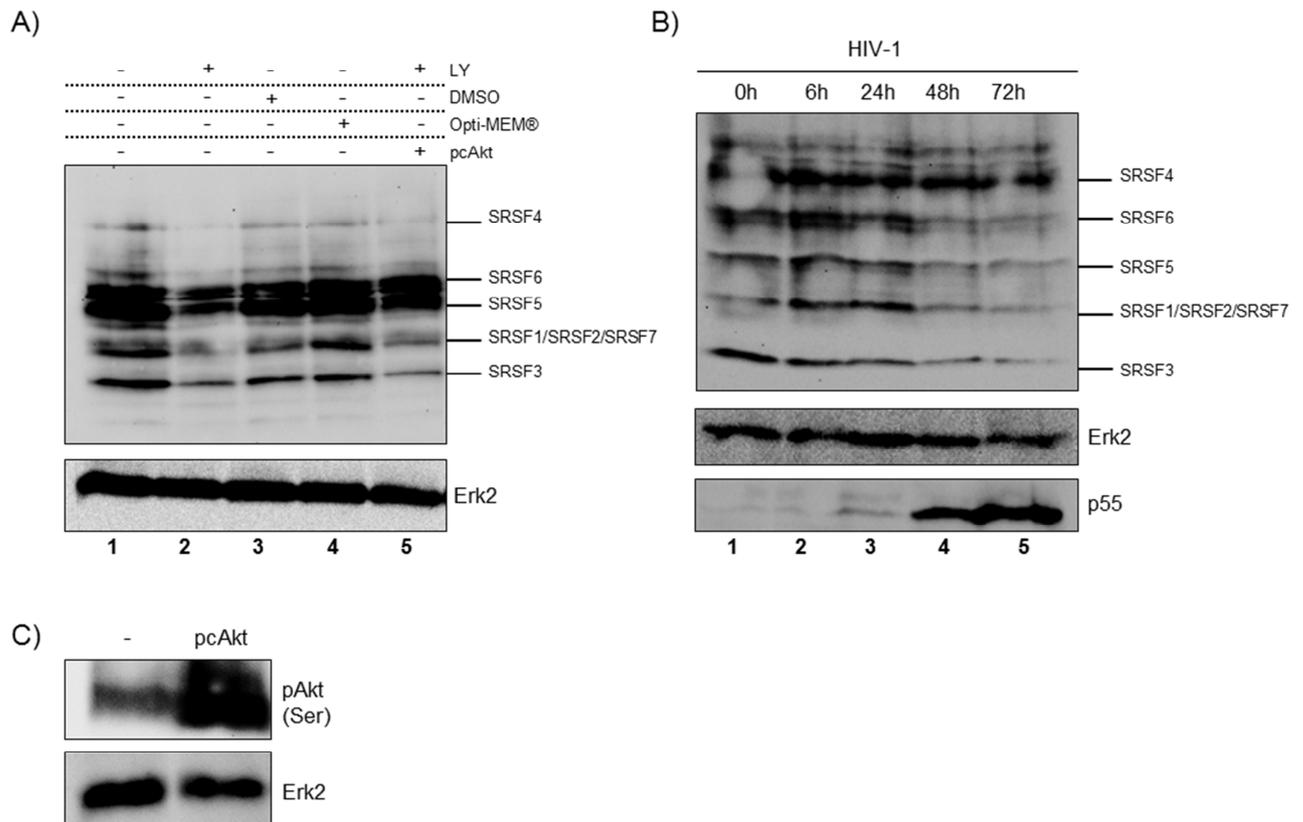
Die Phosphorylierung der SR Proteine spielt sowohl für ihre spleißregulatorische Aktivität als auch ihre zelluläre Lokalisation eine Rolle (Kapitel 1.1.3, Seite 16). Zunächst sollte daher bestätigt werden, dass die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs – wie bereits in HEK293T Zellen gezeigt [83, 295] – auch die Phosphorylierung der SR Proteine in HeLa-CD4+ Zellen beeinträchtigt. Dafür wurden die Zellen 16 Stunden mit dem PI3K Inhibitor LY294002 inkubiert und das Zelllysate mittels eines SDS-Gels aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch einen Antikörper, der phosphorylierte SR Proteine erkennt (1H4). Erk2 diente als Ladekontrolle. Die Inhibition der PI3K führte zu einem deutlichen Rückgang der Nachweisbarkeit phosphorylierter SR Proteine, während die Inkubation nur mit dem Lösungsmittel DMSO erwartungsgemäß keinen Unterschied zeigte (Abb. 3.4 A, vgl. Spuren 1 bis 3). Um zu überprüfen, dass die verminderte Phosphorylierungs-Nachweisbarkeit spezifisch der Inhibition der Akt Kinase zuzuschreiben war, wurden die Zellen 24 Stunden vor der LY294002 Inkubation in einem Parallel-Ansatz auch mit einer konstitutiv aktiven Isoform der Kinase transfiziert, die durch LY294002 nicht gehemmt werden kann. Die Expression der aktivierten Akt Kinase durch das Plasmid pcAkt wurde in einem weiteren Blot mit dem Serin-spezifischen Antikörper bestätigt (Abb. 3.4 C). Die Co-Transfektion zeigte allerdings kein einheitliches Bild: SRSF5 und SRSF6 zeigten wieder den Phosphorylierungsstatus vergleichbar dem ohne Inhibitorbehandlung, während SRSF1/SRSF2/SRSF7 und SRSF3 immer noch eine verringerte Phosphorylierung zeigten (Abb. 3.4 A, Spur 5). Dies lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren neben der Akt Kinase notwendig sind, um diese SR Proteine zu phosphorylieren. Da SRSF1, SRSF2 und SRSF7 ein vergleichbares Molekulargewicht haben, konnten diese SR Proteine im Blot nicht voneinander unterschieden werden. Die Verwendung eines anderen Mediums (Opti-MEM®) sollte zeigen, dass Inhaltsstoffe wie Insulin, L-Glutamin oder Wachstumsfaktoren, die bekanntermaßen den PI3K/Akt Signalweg aktivieren, keinen weiteren Einfluss auf die Phosphorylierung der SR Proteine ausübten (Abb. 3.4 A, Spur 4). Um nun zu überprüfen, ob das Phosphorylierungsmuster der SR Proteine nach einer HIV-1 Infektion gleichermaßen verändert war, wurden PM1 Zellen mit der gewonnenen Virus-Stock Präparation aus Abschnitt 3.1.2 (Seite 66) mit einer MOI von 0,5 für 0, 6,

### 3. Ergebnisse

24, 48 oder 72 Stunden infiziert. Die Proteine wurden geerntet, geblottet und ebenfalls mit dem 1H4 Antikörper inkubiert. Der Nachweis von p55 diente als Infektionskontrolle. Auffällig war zunächst, dass sich der Phosphorylierungsstatus der SR Proteine bereits schon in den beiden unbehandelten Zelllinien (HeLa-CD4<sup>+</sup> und PM1) stark unterschied (vgl. Abb. 3.4 A Spur 1 mit 3.4 B Spur 1). Dies war nicht gänzlich unerwartet, da alternatives Spleißen und somit auch der Aktivierungszustand von SR Proteinen zwischen unterschiedlichen Zelltypen stark variieren kann [319, 320]. In Epithelzellen wie HeLa Zellen kann der Phosphorylierungsgrundzustand also ein vollkommen anderer sein als in T-Zellen wie z.B. den hier verwendeten PM1 Zellen. Dennoch sollte ein externer Stimulus, wie beispielweise die Inhibition eines Signalwegs oder die Infektion mit einem Virus, zu äquivalenten Veränderungen führen, wenn die molekularen Regulationsmechanismen die gleichen sind.

Interessanterweise ähnelte die Phosphorylierungs-Nachweisbarkeit der SR Proteine 48 nach HIV-1 Infektion tatsächlich dem Muster nach der PI3K Inhibition (vgl. Abb. 3.4 A, Spur 2 mit 3.4 B, Spur 4). Einzig die Phosphorylierung von SRSF4 schien durch die HIV-1 Infektion kaum verändert. Bemerkenswert war zudem, dass die Phosphorylierung einiger SR Proteine (SRSF1/SRSF2/SRSF7, SRSF5 und SRSF6) nach 6 Stunden Infektion zunächst anstieg. Die HIV-1 Infektion und die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs führten also gleichermaßen zu einer verringerten Nachweisbarkeit der Phosphorylierung von SR Proteinen. Dabei schien die PI3K, nicht aber die Akt Kinase, an der Phosphorylierung von allen hier detektierten SR Proteinen beteiligt gewesen zu sein. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass der hier verwendete Antikörper zwar die SR Proteine phosphospezifisch erkennt, jedoch bei dessen Verwendung grundsätzlich nicht zwischen Phosphorylierungsabnahme oder Abnahme der gesamten Proteinmenge diskriminiert werden kann. Die hier beobachtete Abnahme hätte also auch auf eine insgesamt verminderte SR Proteinmenge zurückzuführen sein können. Dies wiederum hätte allein schon durch alternatives Spleißen verursacht werden können, nämlich dann, wenn eine veränderte Aktivität jener spleißregulatorischer Proteine hervorgerufen worden wäre, die an der Spleißstellenerkennung dieser SR codierenden Transkripte beteiligt war.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.4 Die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und die Infektion mit HIV-1 verringern die SR-Protein Phosphorylierung.**

(A) HeLa-CD4+ Zellen wurden für 24 Stunden mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50  $\mu$ M), mit DMSO oder mit Opti-MEM® inkubiert. Alternativ wurden sie mit einem Expressionsplasmid der aktivierten Akt Kinase transfiziert und 24 Stunden später für weitere 24 Stunden mit LY294002 (LY, 50  $\mu$ M) behandelt. (B) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5).

Die Proteine wurden nach der Isolierung mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die SR-Proteine mittels eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers nachgewiesen (1H4). Die entsprechenden SR-Proteine sind gekennzeichnet. Die Detektion von p55 diente als Infektionskontrolle. (C) HeLa-CD4+ Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid der aktivierten Akt Kinase transfiziert. 48 Stunden später wurden die Proteine wie oben beschrieben behandelt und die phosphorylierte Akt Kinase mittels eines spezifischen Antikörpers (Ser473) nachgewiesen. Erk2 diente als Ladekontrolle.

Eine Besonderheit der SR Proteine sind ihre sogenannten ultrakonservierten Bereiche, die zwischen humanen und murinen Genen konserviert sind und deren Vorhandensein bereits experimentell bestätigt wurde [197]. Werden diese Bereiche alternativ gespleißt, sollen so potentiell NMD-sensitive Transkripte erzeugt werden, die degradiert werden und somit insgesamt zu einer verringerten Genexpression beitragen. Es wird vermutet, dass diese Eigenschaft den SR Proteinen eine Möglichkeit der Regulation ihrer Proteinmenge über die mRNA-Ebene bietet. Daher wurde im folgenden Abschnitt exemplarisch für zwei SR codierende Gene untersucht, ob das Spleißmuster dieser speziellen ultrakonservierten Bereiche von *SRSF1* und *SRSF3* durch den Signalweg oder eine HIV-1 Infektion verändert wird.

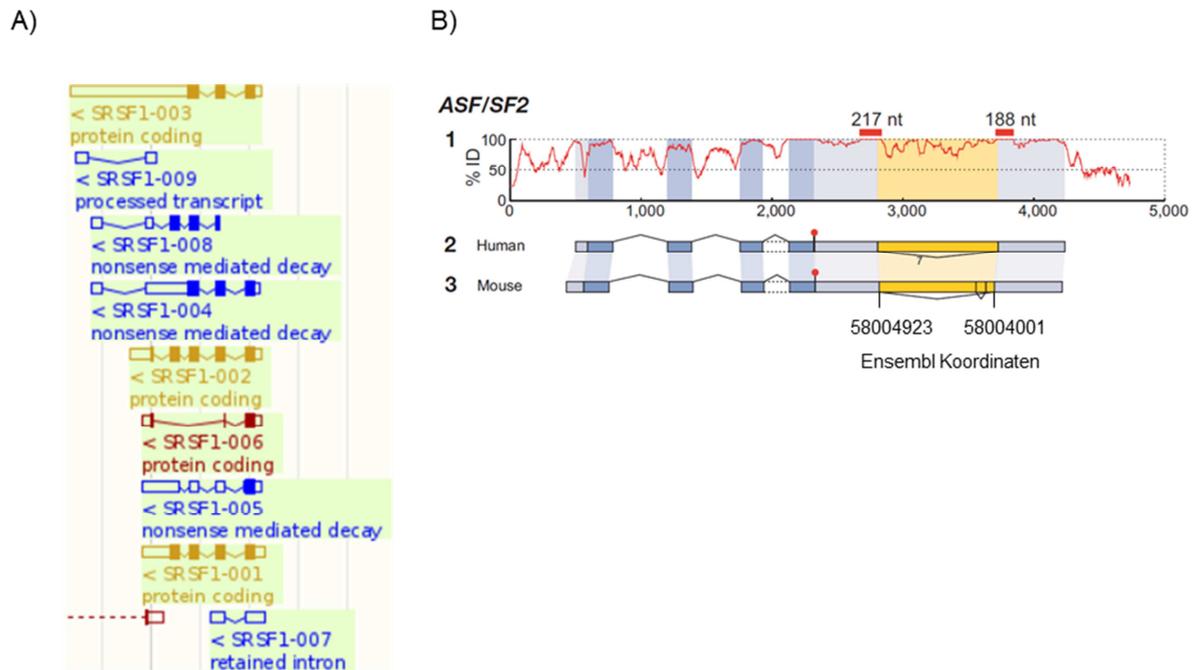
### 3. Ergebnisse

#### **3.2.2 Die HIV-1 Infektion und die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändern die Genexpression von *SRSF1***

Die Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene beziehen sich auf die Ensembl Datenbank Version 74. *SRSF1* (früher *ASF/SF2*) ist auf dem Minusstrang codiert und in Ensembl mit neun Transkriptvarianten annotiert, wovon vier proteincodierend sein sollen (Abb. 3.5 A). Diese sollen in Proteine von etwa 27 kDa (Transkript 001), 30 kDa (Transkript 002), 22 kDa (Transkript 003) und 8 kDa (Transkript 006) translatiert werden. Über die Funktionen dieser Isoformen ist bisher nichts beschrieben. Wird in der Literatur von *SRSF1* gesprochen, so ist wohl überwiegend das von Variante 001 codierte gemeint. Zwei weitere Transkripte werden nicht translatiert (009 und 007) und die drei Übrigen (008, 004 und 005) sollen dem NMD Pathway zugeführt werden. Ensembl beinhaltet hauptsächlich automatische Annotationen, die im Einzelfall manuelle Ergänzungen enthalten können ([http://www.ensembl.org/info/docs/genebuild/genome\\_annotation.html](http://www.ensembl.org/info/docs/genebuild/genome_annotation.html)).

Dies bietet einerseits den Vorteil, dass viele potentielle Transkriptvarianten aufgeführt werden, geht allerdings auch mit dem Nachteil einher, dass das tatsächliche Vorkommen aller Varianten nicht zwangsläufig experimentell bestätigt sein muss. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf den ultrakonservierten Bereichen der SR Proteine, da diese – wie bereits erwähnt – einem besonderen Regulationsmechanismus unterliegen. Die ultrakonservierten Bereiche von *SRSF1* liegen im 3'UTR und flankieren ein Intron, dass, wenn es herausgespleißt wird (Abb. 3.5 B), zu der NMD-sensitiven Transkriptisoform 004 (Abb. 3.5 A) führen soll [197]. Andererseits haben Akaike et al. gezeigt, dass dieses Transkript stabiler ist und vergleichsweise langsam degradiert wird, da durch das Spleißen Bindestellen für miRNAs entfernt werden, die andernfalls das Transkript destabilisieren [321]. Die Auswirkung des Spleißens im 3'UTR auf die Eigenschaft des resultierenden Transkripts ist also nicht endgültig geklärt. Unbeachtet dessen scheint dieses Spleißereignis eine spezielle Form der Regulation für *SRSF1* darzustellen und wurde sowohl nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs als auch der Infektion mit HIV-1 näher betrachtet.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.5 Für *SRSF1* sind neun Transkriptvarianten annotiert und es weist zwei ultrakonservierte Elemente im 3'UTR auf.**

(A) Bei Ensembl Version 74 (<http://dec2013.archive.ensembl.org/index.html>) sind drei proteincodierende Transkripte (rot und gelb), zwei prozessierte Transkripte (blau) und drei Transkripte, die dem NMD zugeführt werden sollen (blau), annotiert. (B) *SRSF1* hat im 3'UTR zwei zwischen Mensch und Maus hochkonservierte Bereiche (217 Nucleotide und 188 Nucleotide), die die Spleißstellen (Ensembl Koordinaten: 58004923 und 58004001) überlappen (modifiziert nach [197]).

Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass sie zwischen den zwei Transkriptvarianten, die sich durch den Einschluss (im Folgenden als *WT* bezeichnet) oder den Ausschluss (im Folgenden als *3'UTR $\Delta$ Int* bezeichnet) des Introns im 3'UTR unterscheiden (Abb. 3.6 A). HeLa Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit dem PI3K Inhibitor LY294002 inkubiert und die RNA aufgereinigt. Nach erfolgter Umschreibung in cDNA wurden für die anschließende PCR die Primer (#5296/#4602) verwendet, die spezifisch in der 3'UTR von *SRSF1* binden (Abb. 3.6 A, Pfeile). Eine Stunde nach Inhibition der PI3K war bereits eine deutliche Verschiebung von der *WT* hin zur *3'UTR $\Delta$ Int* Variante zu beobachten (Abb. 3.6 B, vgl. Spuren 4 und 5). Mit längerer Inhibitionszeit verstärkte sich diese Entwicklung noch etwas (Abb. 3.6 B, Spuren 6 und 7). Die Inhibition der Akt Kinase mit MK2206 zeigte nach 48 Stunden in PM1 Zellen ebenso einen deutlichen Unterschied im Spleißmuster hin zu einer stärkeren Expression des *3'UTR $\Delta$ Int* Transkripts (Abb. 3.6 C). Das Abschalten des PI3K/Akt Signalwegs führte also zu einem vermehrten Spleißen im 3'UTR von *SRSF1*.

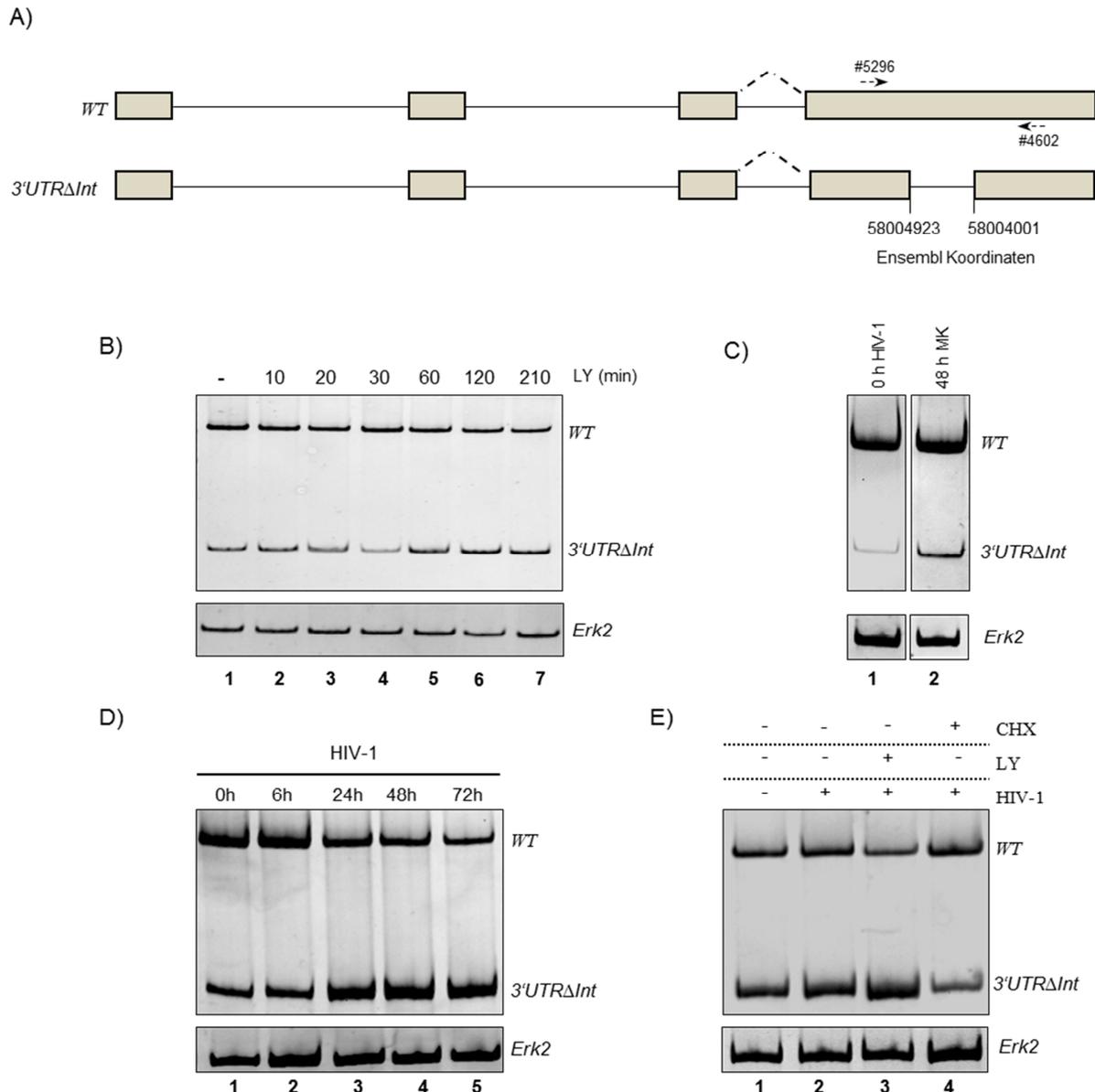
Um das *SRSF1* Spleißen im Verlauf einer HIV-1 Infektion analysieren zu können, wurden PM1 Zellen mit einer MOI von 0,5 für die angegebenen Zeiträume infiziert

### 3. Ergebnisse

und die RNA geerntet, in cDNA umgeschrieben und wie zuvor mit den Primern #5296 und #4602 amplifiziert. 24 Stunden nach Infektion war eine erhebliche Verschiebung zu Gunsten der *3'UTRΔInt* Variante zusehen, die auch 72 Stunden nach Infektion noch anhielt (Abb. 3.6 D). Das Spleißmuster von *SRSF1* war also nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs wie auch nach HIV-1 Infektion gleichermaßen verändert. Wurde in HeLa-CD4+ Zellen nun sowohl die PI3K inhibiert als auch mit HIV-1 infiziert und 48 Stunden später die RNA untersucht, war die Verschiebung hin zu der *3'UTRΔInt* Transkriptvariante noch deutlicher sichtbar (Abb. 3.6 E, vgl. Spur 2 und 3).

Zur Funktion der *3'UTRΔInt* Variante gibt es, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Befunde: Akaike et al. postulieren, dass diese Transkriptvariante eine erhöhte Stabilität aufweist [321], während Lareau et al. sie als NMD-sensitives Transkript einstufen [197]. Da die Degradation einer mRNA mittels NMD von der Translation abhängig ist (s. Kapitel 1.2.3, Seite 16), erlaubt die Verwendung des Translationshemmers Cycloheximid (CHX) eine Akkumulation von NMD-sensitiven Transkripten. CHX ist ein häufig verwendeter Translationshemmer, um zu prüfen, ob ein bestimmtes Transkript NMD-sensitiv ist. Um zu testen, ob das *3'UTRΔInt* Transkript mittels NMD degradiert wird, wurden HeLa-CD4+ Zellen 6 Stunden vor ihrer Ernte mit CHX behandelt und das Spleißmuster von *SRSF1* betrachtet. Interessanterweise kam es jedoch nicht zur Akkumulation der putativ NMD-sensitiven Variante *3'UTRΔInt* (Abb. 3.6 E, Spur 4). Der Translationsblocker unterband sogar die HIV-1 induzierte Veränderung des Spleißmusters (Abb. 3.6 E, vgl. Spur 2 und 4). Da das Transkript also nicht dem NMD Pathway zugeführt wird, ist davon auszugehen, dass *3'UTRΔInt* eine proteincodierende Transkriptvariante darstellt, die im Verlauf der HIV-1 Infektion zunimmt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.6 Die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und die Infektion mit HIV-1 führen zu vermehrtem Spleißen im 3'UTR von *SRSF1*.**

(A) Schematische Darstellung der *SRSF1* Transkripte *WT* und *3'UTRΔInt*, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die gestrichelten Linien zeigen ein alternatives Spleißereignis. Die in der RT-PCR verwendeten Primer (#5296/#4602) zum Nachweis der Spleißvarianten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Ensembl Koordinaten der Spleißstellen im 3'UTR sind angegeben. (B) HeLa Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50  $\mu$ M) behandelt. (C) PM1 Zellen wurden für 0 Stunden mit HIV-1 infiziert oder für 48 Stunden mit dem Akt Inhibitor MK2206 (MK, 5  $\mu$ M) inkubiert. (D) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. (E) HeLa-CD4+ Zellen wurden für 48 Stunden mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5) und zusätzlich mit LY294002 (LY, 50  $\mu$ M) oder Cycloheximid (CHX, 50 mg/ml) behandelt. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der in (A) gekennzeichneten Primer (#5296/#4602) amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Färbung unter UV-Licht visualisiert. Die Amplifizierung von *Erk2* mittels der Primer #4646 und #4647 diente als Ladekontrolle.

Um die Protein Expression von *SRSF1* nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs bzw. nach HIV-1 Infektion vergleichen zu können, wurden HeLa-CD4+ Zellen für den angegebenen Zeitraum entweder mit LY294002 inkubiert oder HIV-1 infiziert. Die Zelllysate wurden in Probenpuffer aufgenommen und die Proteine mittels SDS-Gel

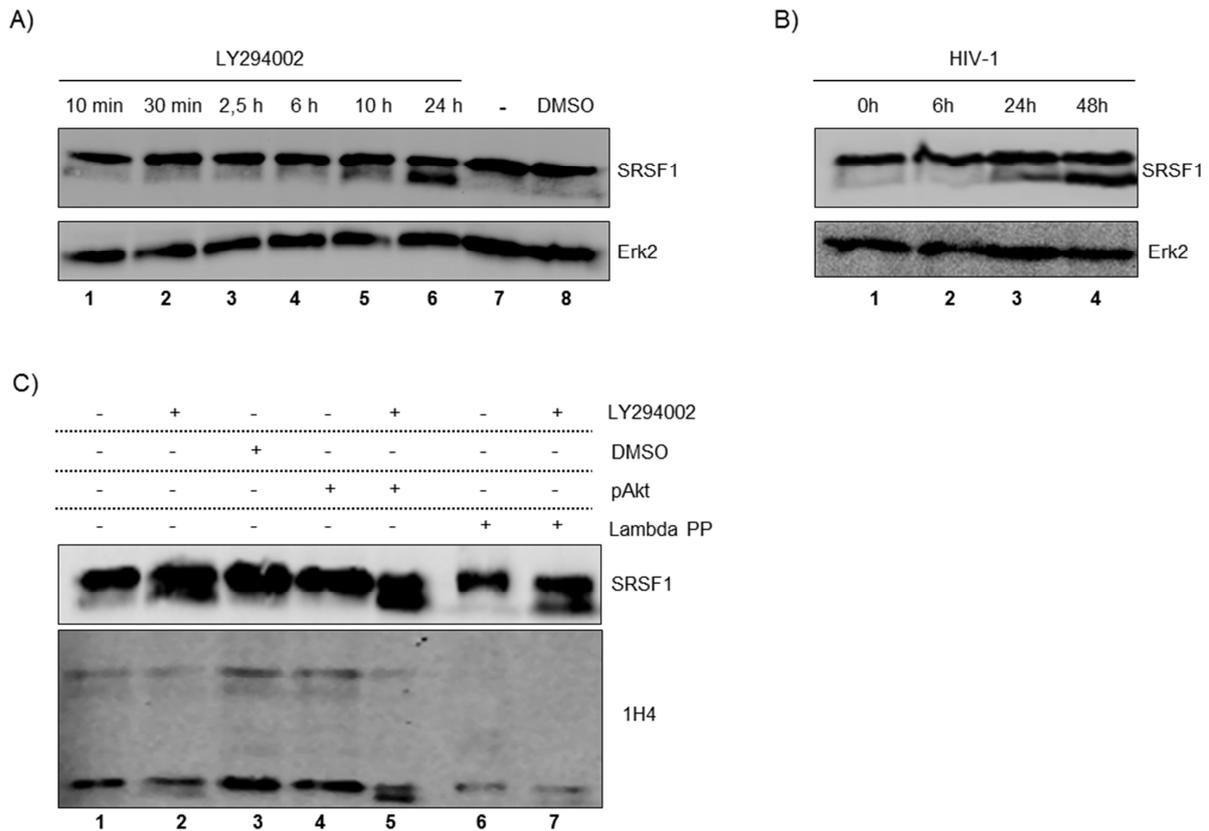
### 3. Ergebnisse

elektrophoretisch aufgetrennt. SRSF1 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der gebundene Antikörper wurde anschließend mittels einer Re-Blot Lösung entfernt und die Membran mit einem Erk2 spezifischen Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. Bereits 30 Minuten nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs war neben der zu erwartenden Haupt-Isoform von etwa 27 kDa bereits schwach eine zweite, etwa 10 kDa kleinere Isoform sichtbar (Abb. 3.7 A, Spur 2). Nach 24 Stunden erreichte diese sogar ein Expressionslevel vergleichbar dem der zu erwartenden Isoform. Ein entsprechendes Bild zeigte sich auch nach der Infektion mit HIV-1 in PM1 Zellen: 24 Stunden nach Infektion war die zusätzliche Bande deutlich sichtbar und erreichte nach 48 Stunden ebenfalls eine gleichwertige Expression wie die zu erwartende Isoform (Abb. 3.7 B).

Sollte die Entstehung dieser zusätzlichen Bande Akt-abhängig reguliert sein, so sollte die Co-Expression einer aktivierten Akt Kinase der Expression entgegenwirken, da die Inhibition von PI3K diese Kinase nicht in ihrer Aktivität beeinflussen kann. 24 Stunden vor der Inhibition von PI3K wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit einer konstitutiv aktiven Kinase transfiziert und 48 Stunden später die Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen und erneut mit einem SRSF1-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Expression einer aktiven Akt Kinase konnte der Entstehung der zusätzlichen Bande jedoch nicht unterbinden (Abb. 3.7 C, vgl. Spur 2 und 5), was eher für eine Akt-unabhängige Regulation spricht.

Da SRSF1 ein Phosphoprotein ist, sollte die Behandlung des Zelllysates mit einer Phosphatase Aufschluss darüber geben, ob es sich bei der zweiten, etwas kleineren Bande um die dephosphorylierte Variante des Proteins handelte. Diese Beobachtung würde auch mit der verringerten Phosphorylierung aller SR Proteine übereinstimmen (Abb. 3.4 B). Entsprechend müsste es sich bei der stets vorhandenen, größeren Variante um die phosphorylierte Form handeln. Die Intensität dieser Bande konnte jedoch durch die Zugabe einer Lambda Phosphatase nicht geschwächt werden (Abb. 3.7 C, Spur 7). Die erfolgte Wirkung der Phosphate wurde mittels Re-Blot des phosphospezifischen 1H4 Antikörpers bestätigt (Abb. 3.7 C). Die Bandenintensitäten dieses Re-Blots waren für alle Proben recht schwach, da die Bindungseigenschaften dieses phosphospezifischen Antikörpers nach Behandlung mit einer Re-Blot Lösung stark beeinträchtigt waren. Ob es sich bei dem Protein mit der kleineren Masse allerdings um die mittels RT-PCR detektierte *3'UTRΔInt* Variante handelte, bleibt zu untersuchen. Da es sich bei der *3'UTRΔInt* Variante allerdings um eine Veränderung

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.7 Die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und die Infektion mit HIV-1 führen zur Entstehung einer weiteren SRSF1 Isoform.**

(A) HeLa-CD4+ Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (50 μM) oder für 24 Stunden mit DMSO behandelt. (B) PM1 wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. (C) HeLa-CD4+ Zellen wurden für 24 Stunden mit LY294002 (50 μM) oder DMSO behandelt. Alternativ wurden sie für insgesamt 48 Stunden mit einer konstitutiv aktiven Akt Kinase transfiziert und 24 Stunden vor der Ernte mit LY294002 (50 μM) behandelt.

Die Proteine wurden isoliert, unbehandelte und mit LY294002 (50 μM) behandelte Zellen wurden zusätzlich mit einer Lambda Phosphatase inkubiert (Lambda PP) und mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt. Es folgten der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und der Nachweis von SRSF1 mit einem spezifischen Antikörper. Die Detektion von Erk2 fungierte als Ladekontrolle. Der Nachweis der phosphorylierten SR Proteine diente als Kontrolle für die Phosphatase-Behandlung (C).

im nicht-codierenden Bereich des Gens handelte, ist ein Zusammenhang dieser Varianten eher unwahrscheinlich. Außerdem konnte für das veränderte *SRSF1* Spleißen eine Akt-Abhängigkeit gezeigt werden (Abb. 3.6 C), während die Entstehung der zusätzlichen Bande im Western-Blot Akt-unabhängig reguliert zu sein schien (Abb. 3.7 C). Theoretisch könnte es sich bei der zweiten Bande auch um die alternativ gespleißte Isoform 2 handeln, die allerdings nicht 10 kDa sondern nur 5 kDa kleiner ist, aber mit unterschiedlichem Laufverhalten der Proteine im Gel zu erklären wäre. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, die jedoch das Vorhandensein dieser Variante in PM1 Zellen nicht bestätigen. Daher sollen massenspektrometrische Analysen in Zukunft Auskunft über die Identität dieser Variante geben.

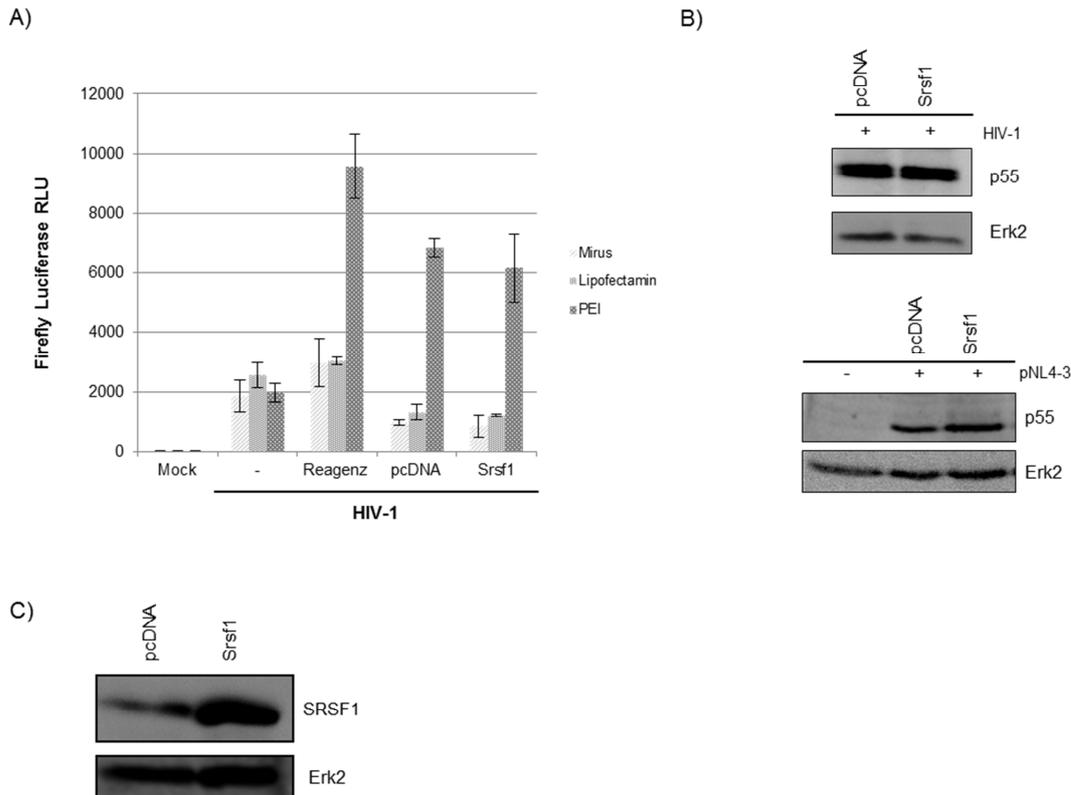
### 3. Ergebnisse

Die Zunahme der *3'UTR $\Delta$ Int* Variante auf RNA-Ebene war nach HIV-1 Infektion sehr auffällig und die Variante scheint nicht NMD-sensitiv zu sein (Abb. 3.6). Folgt man nun den Ergebnissen von Akaike et al., so handelt es sich bei dem herausgespleißten Bereich um Bindestellen für microRNAs, die das Transkript normalweiser destabilisieren [321]. Ist die *3'UTR $\Delta$ Int* Variante also ein stabileres Transkript, würde man im Verlauf einer HIV-1 Infektion mehr SRSF1 Protein erwarten. Dies war tatsächlich auch im Western-Blot ersichtlich (Abb. 3.7 B, vgl. Spur 1 mit 3 und 4). Es wurde bereits beschrieben, dass erhöhte SRSF1 Level in der Zelle für die Replikation von HIV-1 nachteilig sein können [262]. Wenn SRSF1 also einen zellulären Restriktionsfaktor für das Virus darstellt, sollte, auch in dem hier angewandten experimentellen Kontext, die HIV-1 Replikation durch eine *SRSF1* Überexpression beeinträchtigt werden.

Dafür wurde zunächst überprüft, ob allein schon die Transfektion der Zellen mit Plasmid DNA oder ob allein schon durch das verwendete Transfektionsreagenz die Replikation des Virus beeinflusst werden könnte. Zu diesem Zweck wurden HeLa-CD4+ Zellen für 24 Stunden mit drei häufig verwendeten Transfektionsreagenzen (Mirus TransIT-LT1, Lipofectamine® 2000, PEI) mit oder ohne Zugabe eines nicht codierenden Plasmids inkubiert. Dann wurden die Zellen mit HIV-1 infiziert und 52 Stunden später der infektiöse Überstand geerntet und hiermit TZM-bl Zellen infiziert. Die Reportzelllinie TZM-bl besitzt neben der Kopie des  *$\beta$ -Galaktosidase* Gens noch eine unabhängig integrierte Kopie des *Luciferase* Gens. Beide stehen unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promoters, was den HIV-1 Nachweis durch zwei verschiedene Assays erlaubt. In diesem Fall wurde die Infektiösität mittels der Messung der Luciferase Aktivität bestimmt. Die Proteine wurde in Lysis-Puffer aufgenommen und die Luciferase Aktivität gemessen. Dabei zeigten die Transfektionsreagenzen Mirus TransIT-LT1 und Lipofectamine® 2000 alleine keinen Einfluss auf die Luciferase Aktivität (Abb. 3.8 A). Die Zugabe von Polyethylenimin (PEI) hingegen zeigte einen drastischen Anstieg der Luciferase Aktivität. Es wurde bereits gezeigt, dass PEI die Infektion unter bestimmten Bedingungen tatsächlich verstärken kann [322]. Die Transfektion der Zellen mit dem Klonierungsvektor pcDNA (Leervektor) verringerte die Infektiösität des Virus kaum. Außerdem gab es zwischen den verschiedenen Reagenzien keinen Unterschied in Bezug auf die Mortalität der Zellen (s. Kapitel 6.1, Seite 162). Die Transfektion der Zellen mit dem *SRSF1*

### 3. Ergebnisse

codierenden Plasmid zeigte ebenfalls nur eine, vergleichbar zu der Transfektion des Leervektors, schwache Verringerung der Luciferase Aktivität (Abb. 3.8.A).



**Abbildung 3.8 Die Überexpression von SRSF1 zeigt keinen nachteiligen Einfluss auf die HIV-1 Replikation.**

(A) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenzen Mirus, Lipofectamin2000 oder PEI alleine oder mit dem Leervektor pcDNA oder dem Expressionsplasmid für *SRSF1* transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit HIV-1 infiziert. 52 Stunden später wurde der Überstand geerntet und die Reporterzelllinie TZM-bl mit diesem für 48 Stunden inkubiert. Diese Reporterzelllinie codiert eine Kopie des *firefly* Luciferase-Gens unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors. Die Proteine wurden in Lysis-Puffer aufgenommen und die Luciferase Aktivität mittels eines Luminometers bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus fünf Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung gezeigt. (B) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Mirus mit dem Leervektor pcDNA oder dem Expressionsplasmid für *SRSF1* transfiziert und 24 Stunden später entweder mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert oder der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine geerntet, mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und p55 mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. (C) HeLa Zellen wurden mit dem Leervektor pcDNA oder dem Expressionsplasmid für *SRSF1* transfiziert. 24 Stunden später wurden die Proteine isoliert, auf einem 12%igem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und SRSF1 mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Detektion von Erk2 diente als Ladekontrolle.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen Mirus-vermittelt mit dem *SRSF1* exprimierenden Plasmid transfiziert und 24 Stunden später für 48 Stunden mit proviraler DNA (pNL4-3) transfiziert oder mit HIV-1 infiziert. Anschließend wurden die Zelllysate in Probenpuffer aufgenommen, die Proteine mittels eines SDS-Gels getrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Eine verstärkte *SRSF1* Expression hatte weder auf die Transfektion noch auf die Infektion des Virus einen Einfluss, denn auch die Produktion des viralen Proteins p55 war nicht beeinträchtigt (Abb. 3.8 B). Dass das *SRSF1* Expressionsplasmid

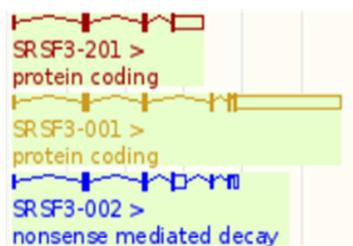
### 3. Ergebnisse

tatsächlich zu erhöhten Proteinmengen führte, wurde mit einem spezifischen Antikörper bestätigt (Abb. 3.8 C). Die künstlich erhöhte SRSF1 Menge stellte offensichtlich keinen Nachteil für das Virus durch etwaige zellregulierte Abwehrmechanismen dar. Welche Bedeutung die veränderte *SRSF1* Genexpression also für eine HIV-1 Infektion hat, und ob *SRSF1* tatsächlich ein Wirtsrestriktionsfaktor ist, erfordert weitere Untersuchungen zu.

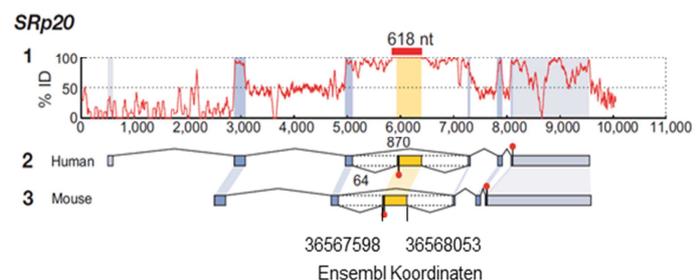
#### 3.2.3 Die HIV-1 Infektion und die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs führen zur Akkumulation eines NMD-sensitiven *SRSF3* Transkripts

Ein weiteres SR Protein, dessen Genexpression in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet wurde, war *SRSF3* (vormals *SRp20*). Für das Gen sind in Ensembl (Version 74) auf dem Plusstrang drei Transkriptvarianten annotiert. Die zwei proteincodierenden Varianten unterscheiden sich durch einen verkürzten C-Terminus: Das Protein der Variante 001 ist 19 kDa und das der Variante 201 14 kDa groß (Abb. 3.9 A). Für diese Varianten sind allerdings bisher keine unterschiedlichen Funktionen publiziert. Das potentiell NMD-sensitive Transkript (002) schließt zusätzlich das Exon 4 mit ein, in welchem sich auch die ultrakonservierten Elemente befinden [197] (Abb. 3.9 B). Ähnlich wie bei *SRSF1* gibt es auch hierbei, bezüglich der Funktion dieser Transkriptvariante, unterschiedliche Annahmen: Transkript (002) soll dem NMD zugeführt werden [197] oder codiert für eine Proteinisoform [323].

A)



B)



**Abbildung 3.9 Für *SRSF3* sind drei Transkriptvarianten annotiert und es weist ein Exon 4 überlappendes ultrakonserviertes Element auf.**

(A) In Ensembl (Version 74, <http://dec2013.archive.ensembl.org/index.html>) sind für *SRSF3* zwei proteincodierende Transkripte (rot und gelb) und ein Transkript, welches dem NMD zugeführt werden soll (blau), annotiert. (B) *SRSF3* (vormals *SRp20*) hat eine zwischen Mensch und Maus hochkonservierte Region (618 Nukleotide), die das Exon 4 (Ensembl Koordinaten: 36599821 und 36600276) überlappt (modifiziert nach [197]).

### 3. Ergebnisse

Im Folgenden wurde untersucht, ob das *SRSF3* Exon 4 Spleißen – wie bereits für den ultrakonservierten Bereich für *SRSF1* gezeigt – durch eine HIV-1 Infektion oder Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändert wird. Um beide Varianten mittels RT-PCR nachweisen zu können, wurden Primer (#4003/#4005) verwendet, die an Sequenzen des Exons 3 und 5 binden (Abb. 3.10 A, Pfeile).

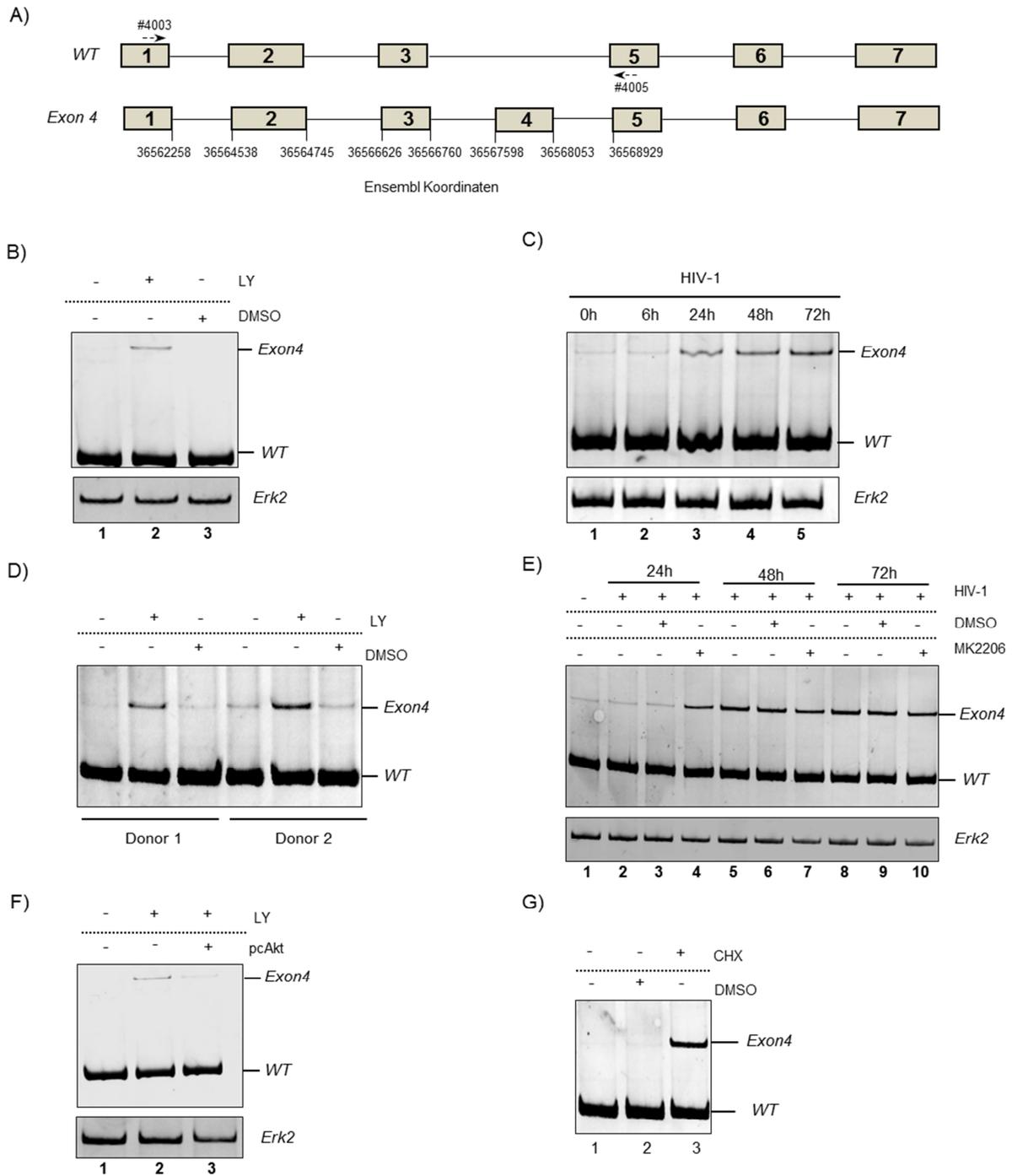
Zunächst wurde die Auswirkung der Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs auf das *SRSF3* Spleißen in HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden mit dem Inhibitor LY294002 inkubiert und anschließend die RNA aufgereinigt. Nach der Umschreibung in cDNA folgte die semi-quantitative PCR. Die Inhibition führte zu einem deutlichen Anstieg der *Exon 4* Variante (Abb. 3.10.B). Erneut wurde überprüft, ob eine HIV-1 Infektion einen ähnlichen Phänotyp zeigt. PM1 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit HIV-1 infiziert, die RNA aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit den Primern #4003 und #4005 amplifiziert. Ebenso wie die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs führte die HIV-1 Infektion ebenfalls nach 24 Stunden zu einem deutlich vermehrten *Exon 4* Einschluss, der auch noch 72 Stunden nach der Infektion deutlich zu beobachten war (Abb. 3.10 C). Der Vergleich der beiden Zelllinien HeLa-CD4<sup>+</sup> (Abb. 3.10 B) und PM1 (Abb. 3.10 C) zeigte, dass sich das alternative Spleißen von *SRSF3* unterschied. In unbehandelten HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen war die *Exon 4* Variante fast gar nicht exprimiert, während in unbehandelten PM1 Zellen bereits eine leichte Expression zu erkennen war (Abb. 3.10 B und C, Spur1). Da bereits dieser Unterschied zwischen zwei Zelllinien zu sehen war, sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass der Einfluss des Signalwegs und der HIV-1 Infektion auf das Spleißen nur eine Beobachtung in bestimmten Zelllinien waren. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs in primären Fibroblasten, die von zwei unterschiedlichen Probanden durch eine Hautbiopsie gewonnen worden waren, zu einer vergleichbaren Akkumulation des *Exon 4* Transkripts führte. Auch hier resultierte die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs in einem verstärkten Einschluss des Exons 4 (Abb. 3.10 D). Der Einfluss von PI3K konnte also auch in primären Zellen beobachtet werden. Ferner zeigte der Vergleich der RNA Proben der beiden Probanden, dass auch hier die basale Expression des *Exon 4* Transkripts individuell variierte (Abb. 3.10 D, vgl. Spur 1 und Spur 4). Um auch den Einfluss einer Infektion in einer anderen Zelllinie zu bestätigen, wurde eine weitere T-Zelllinie (Molt4) mit HIV-1 für 24 bzw. 48 Stunden infiziert. Außerdem wurden einige Proben

### 3. Ergebnisse

jeweils 30 Minuten zuvor mit MK2206 behandelt. Etwas zeitverzögert war der vermehrte *Exon 4* Einschluss auch in Molt4 Zellen zu beobachten. Hier war 48 Stunden nach der Infektion eine deutliche Akkumulation des Transkripts zu sehen (Abb. 3.10 E, Spur 5). Die Inhibition der Akt Kinase führte bereits nach 24 Stunden zu einem vergleichbaren Phänotyp (Abb. 3.10 E, Spur 4), was auf eine Akt-abhängige Regulation des *Exon 4* Spleißens hindeutet. Um dies zu bestätigen, wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit der konstitutiv aktiven Form der Akt Kinase transfiziert und 48 Stunden später, für weitere 24 Stunden, die PI3K mit LY294002 inhibiert. Während die Inhibition von PI3K den Einschluss des Exons 4 förderte, konnte die aktivierte Akt Kinase diesem entgegenwirken (Abb. 3.10 F, vgl. Spur 2 und 3); ein deutlicher Hinweis auf eine Akt-abhängige Regulation. Schließlich wurde überprüft, ob der *Exon 4* Einschluss ein NMD-sensitives Transkript entstehen lässt. Dafür wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen für 6 Stunden mit CHX inkubiert, die RNA aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der Primer #4003 und #4005 amplifiziert. Die Akkumulation der *Exon 4* Variante zeigte, dass sie tatsächlich dem NMD Pathway zugeführt wird (Abb. 3.10 G).

Der vermehrte Einschluss des Exons 4 nach HIV-1 Infektion kann also entweder im veränderten Spleißen oder in einer verminderten NMD Aktivität begründet liegen. Um zunächst die Spleißregulation unabhängig von möglichen NMD Einflüssen zu betrachten, wurde ein Reporter hergestellt, der, anders als das endogene Transkript, über keinen offenen Leserahmen verfügt. Dafür wurde das *Exon* mit 150 bp der jeweilig flankierenden 5' und 3' Intronsequenzen in einen Drei-*Exon*-Reporter kloniert (Abb. 3.11 A). HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden zunächst mit diesem Reporter transfiziert und 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert oder proviraler DNA (pNL4-3) transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die RNA aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der Primer #2648/ #2649 amplifiziert (Abb. 3.11 A, Pfeile).

### 3. Ergebnisse



### 3. Ergebnisse

#### **Abbildung 3.10 Die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und die Infektion mit HIV-1 führen zum verstärkten Vorkommen der NMD-sensitiven Transkriptvariante von *SRSF3*.**

(A) Schematische Darstellung der *SRSF3* Transkripte, die das Exon 4 entweder ausschließen (*WT*) oder einschließen (*Exon 4*). Die Ensembl Koordinaten der Spleißstellen, die von den mit Pfeilen gekennzeichneten in den RT-PCR Analysen verwendeten Primern #4003 und #4004 abgedeckt werden, sind angegeben.

(B) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden für 24 Stunden mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50 µM) oder DMSO behandelt. (C) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5). (D) Primäre Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50 µM) oder DMSO behandelt. (E) Molt4 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert, mit DMSO und/oder dem Akt Inhibitor MK2206 (5 µM) behandelt. (F) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden für 24 Stunden mit LY294002 (LY, 50 µM) behandelt und/oder 24 Stunden zuvor mit einem Expressionsplasmid der konstitutiv aktiven Akt Kinase transfiziert. (G) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden für 6 Stunden mit DMSO oder dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX, 50 mg/ml) behandelt.

Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der in (A) gekennzeichneten Primer #4003 und #4005 amplifiziert. Die Produkte wurden mit Hilfe eines 10%igen PAA-Gels aufgetrennt und mit EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Erk2 diente als Ladekontrolle.

Die HIV-1 Infektion führte – im Unterschied zu der endogenen Situation – zu einem deutlich vermehrten Ausschluss des Exons 4 (Abb. 3.11 A, Spur 2). Die Transfektion der proviralen DNA hingegen zeigte keinen vermehrten Exon Ausschluss, was darauf hindeutet, dass nicht die Expression der viralen Proteine der Auslöser für den vermehrten Ausschluss war, sondern vermutlich die Infektion selbst. Die reine Betrachtung des Spleißens von Exon 4 zeigte also – wenn vom NMD Pathway entkoppelt – eine Regulation in die gegensätzliche Richtung, also zum vermehrten Exon 4 Ausschluss. Daraufhin wurde der Reporter so verändert, dass er einen ORF enthielt, um ihn, wie das endogene Transkript, mit dem NMD Pathway zu koppeln (Abb. 3.11 A). Die Transfektion von HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit diesem Reporter zeigte, dass die Einführung des ORFs das Verhältnis der beiden Transkriptvarianten zu Gunsten von mehr Exonausschluss, also weniger NMD-sensitivem Transkript, veränderte (Abb. 3.11, vgl. A Spur 1 mit B Spur 1), was der endogenen Situation entsprach. Der Einfluss einer HIV-1 Infektion auf diesen Reporter konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet werden. Das Spleißmuster des nicht NMD-sensitiven Reporters deutet jedoch darauf hin, dass der vermehrte Exon 4 Einschluss nach HIV-1 Infektion (Abb. 3.10 C) nicht in einer veränderten Spleißregulation, sondern eher in einer veränderten NMD-Aktivität begründet liegt.

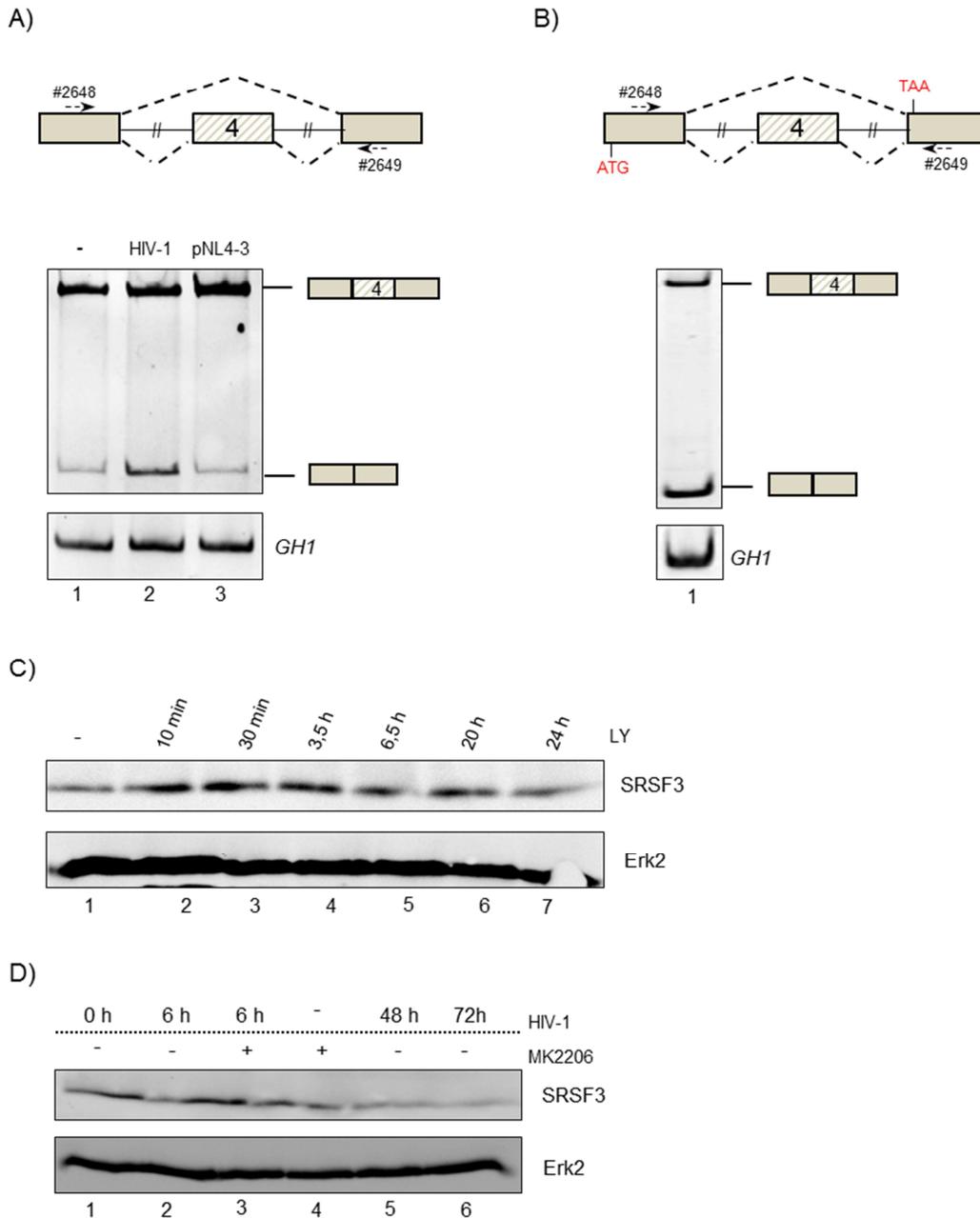
Da es sich bei dem endogenen *Exon 4* Transkript um eine NMD-sensitive mRNA handelt, ist davon auszugehen, dass diese nicht in ein Protein translatiert wird. Weil sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition der Akt Kinase zu einer vermehrten Abundanz dieser *Exon 4* Variante führten, sollte sich die Proteinmenge von *SRSF3* unter diesen Bedingungen ebenfalls verringern. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> für unterschiedliche Zeiträume mit dem PI3K Inhibitor LY294002

### 3. Ergebnisse

behandelt und die geernteten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von SRSF3 erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers. Im Einklang mit der Zunahme der putativ NMD-sensitiven *Exon 4* Variante, verringerte sich die Proteinmenge 24 Stunden nach Inhibition des Signalwegs (Abb. 3.11 C). Gleiches galt in PM1 Zellen sowohl für die HIV-1 Infektion als auch für die Inhibition von Akt durch MK2206: Beide Konditionen zeigten eine verringerte Proteinexpression 48 Stunden nach der Behandlung (Abb. 3.11 D, Spur 4 und 5). Die Änderung der mRNA Isoformen resultierte demnach tatsächlich in einer verringerten Proteinmenge.

Die erhöhte Abundanz des NMD-sensitiven *SRSF3* Transkripts nach HIV-1 Infektion könnte auf eine Beeinträchtigung der gesamten zellulären NMD Aktivität hindeuten. Weitere Untersuchungen zur NMD Aktivität nach einer HIV-1 Infektion folgten daher (Kapitel 3.4).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.11 Ein reiner *SRSF3*-Spleißreporter spiegelt das endogene Spleißmuster nach HIV-1 Infektion nicht wieder.**

(A) Schematische Darstellung des *SRSF3*-Spleißreporters, der das *SRSF3* Exon 4 mit 100 Nukleotiden der stromabwärts und -aufwärts liegenden Intronsequenz enthält. Die in der RT-PCR verwendeten Primer #2648 und #2649 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem Report und dem Kontrollplasmid pXGH5 (GH1) transfiziert und 24 Stunden später mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert oder mit der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert. 48 Stunden später wurde die RNA geerntet, in cDNA umgeschrieben und mittels der eingezeichneten Primer #2648 und #2649 amplifiziert. Die Produkte wurden mittels eines 12%igen PAA-Gels aufgetrennt und mit einer EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. (B) In den Reporter (A) wurde ein Leserahmen eingefügt (ATG= Startcodon, TAA= Stoppcodon). HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem Reporter und dem Kontrollplasmid pXGH5 (GH1) transfiziert. Die RNA wurde weiter behandelt wie in (A) beschrieben. Die Amplifizierung von GH1 mittels der Primer #1224 und #1225 diente als Nachweis der gleichmäßigen Transfektion. (C) HeLa-CD4+ Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50µM) behandelt. (D) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und/oder mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5 µM) behandelt. Die Proteine wurden isoliert, auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und *SRSF3* mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle.

### 3. Ergebnisse

#### **3.3 Einzelne Gene zeigten nach HIV-1 Infektion ein ähnliches Expressionsprofil wie nach Inhibition der Akt Kinase**

Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt, veränderte die HIV-1 Infektion den Phosphorylierungsstatus der Akt Kinase. Umgekehrt beeinträchtigte die Inhibition der Akt Kinase schon vor einer Infektion diese maßgeblich. Ferner zeigten sowohl der Signalweg als auch die Infektion einen Einfluss auf die Phosphorylierungen einiger SR Proteine und die Genexpression von *SRSF1* und *SRSF3*.

Aufgrund dieser Beobachtungen sollten mittels *RNA deep sequencing* Analysen transkriptomweit Gene und Exon-Exon-Junctions identifiziert werden, die nach Infektion und Inhibition gleichermaßen verändert reguliert sind.

##### **3.3.1 RNA deep sequencing Analysen**

*RNA deep sequencing* Analysen erlauben sowohl einen Überblick über das gesamte zelluläre Genexpressionsprofil zu gewinnen, als auch die Expression und das Spleißmuster einzelner Gene im Detail zu betrachten. Aus diesem Grund wurde das zelluläre Transkriptom sowohl nach HIV-1 Infektion als auch nach Akt Inhibition (MK2206) in PM1 Zellen betrachtet.

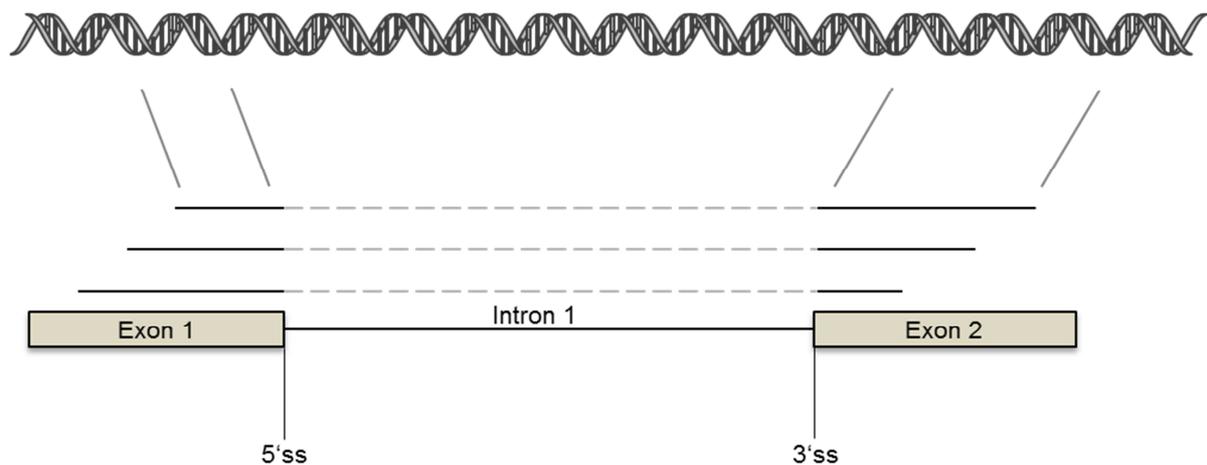
Die verfügbaren Informationen für einen HIV-1 Replikationszyklus schwanken deutlich, je nach verwendeten Inhibitoren, Mutationen oder Zellen [324]. Es herrscht jedoch Konsens darüber, dass nach spätestens 52 Stunden eine neue Generation von infektiösen Virionen ins Cytoplasma entlassen wird. In dieser Arbeit wurden daher ein früher (6 Stunden) und ein später (48 Stunden) Zeitpunkt nach der Infektion untersucht. Insgesamt wurden 6 unterschiedliche Zustände gewählt: 0 Stunden nach Infektion (0h HIV-1), 6 Stunden nach Infektion (6h HIV-1), 6 Stunden nach Infektion und Inhibition (6h HIV-1+MK), 48 Stunden nach Infektion (48h HIV-1), 48 Stunden nach Inhibition (48h MK) und 48 Stunden nach Infektion und Inhibition (48h HIV-1+MK).

Die Inhibitor Behandlung erfolgte stets 30 Minuten vor der Infektion. Die RNA wurde zu den genannten Zeitpunkten aufgereinigt. Die Qualitätsprüfung, die cDNA Synthese sowie die Sequenzierung wurden von *Beckmann Coulter* durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden gegen das Referenzgenom Ensembl (Version 74) gemapped. Das Alignment sowie die Generierung der Excel-Dateien wurden, wie in Abschnitt 2.2.5.1 (Seite 63) genauer beschrieben, von Dr. Wolfgang Kaisers

### 3. Ergebnisse

(Universität Düsseldorf) durchgeführt. Um ausschließlich die Reads zu berücksichtigen, die von prozessierter mRNA stammen, wurden nur sogenannte ExonJunction-Reads verwendet. Ein sequenzierter Read kann entweder vollständig innerhalb eines Exons oder auch in zwei aufeinanderfolgenden Exons mappen und so nach dem Mapping an die genomische Referenz einen Gap enthalten. Start- und Endpunkt solcher Gaps sollten dann in der Regel der jeweiligen 5'- bzw. 3'-Spleißstelle entsprechen (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12 Ausschließlich ExonJunction Reads wurden bei den *RNA deep sequencing* Analysen berücksichtigt.**

Die generierten Gap-Reads konnten Exon Junctions zugeordnet werden. Dabei wurde ein Teil der Sequenz auf ein Exon gemappt und endete an der entsprechenden 5'-Spleißstelle (5'ss). Die übrige Sequenz wurde auf ein folgendes Exon gemappt, wobei die Sequenz mit der 3'-Spleißstelle (3'ss) beginnen musste. Die durchgezogenen Linien stellen die tatsächlich gemappten Reads dar, die an unterschiedlichen Positionen beginnen bzw. enden können. Die gestrichelten Linien entsprechen der Intronsequenz, die aus der prä-mRNA herausgespleißt wird.

Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden in den gemappten Reads der Sequenzierung Exongrenzen erst als solche bewertet, wenn mindestens 5 Reads genau an dieser Position (5'-Spleißstelle) endeten und gleichzeitig an der anderen Position (3'-Spleißstelle) gemappt werden konnten. Die einzelnen Reads konnten dabei unterschiedliche Start- bzw. Endpunkte haben, je nachdem an welcher Position des Transkripts der Read gemappt wurde. Die Streuung dieser Start- bzw. Endpunkte für eine Junction sowie die Anzahl der gemappten Reads ergaben schließlich den Qualitätsscore (gqs – gap quality score). Auch alternative Spleißdonor- bzw. Akzeptornutzung sowie alternativ gespleißte Transkripte konnten so detektiert werden.

Die im Folgenden verwendete Einheit zum Vergleich der Daten ist rpmg (*reads per million gaps*). Diese Einheit berücksichtigt die Gesamtzahl aller Reads pro einer Millionen Gaps in dieser Probe und bietet so ein Maß zur Normalisierung. Um die

### 3. Ergebnisse

Verlässlichkeit der Daten zu überprüfen, wurden exemplarisch einige Gene anhand von vier Proben mittels qPCR validiert (s. Anhang 6.3, Seite 164). Dabei wurden die Gene so gewählt, dass sie für mindestens eine Kondition eine veränderte Expression aufzeigten. Die rpmg Werte stimmten mit den qPCR Werten sehr gut überein, sodass der Datensatz für weitere Analysen verwendet wurde.

Genexpressionsprofile nach einer HIV-1 Infektion, die mit Hilfe von Microarrays erstellt wurden, gibt es bereits zahlreiche [325-330]. Der Schwerpunkt bei diesen Untersuchungen lag dabei auf Clusteranalysen, die die Erfassung globaler Expressionsunterschiede von ganzen biologischen Prozessen zum Ziel hatten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber sollte vielmehr die Expression einzelner Gene detaillierter betrachtet werden. Dabei waren vor allem auch Veränderungen im alternativen Spleißen von Interesse.

Im Folgenden werden daher einzelne Beispiele sowohl für veränderte Genexpression als auch für verändertes Spleißen nach HIV-1 Infektion und Inhibition der Akt Kinase vorgestellt.

#### **3.3.2 Die Expression von *FOSB* und *FOS* war sowohl nach HIV-1 Infektion als auch Akt Inhibition stark verringert**

Um Gene zu identifizieren, deren Expression sich nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition gleichermaßen veränderte, wurde der Mittelwert der rpmgs aller ExonJunction-Reads eines jeden Gens für alle Konditionen berechnet. Im Anschluss wurde das Verhältnis zum Ausgangswert berechnet (0h HIV-1).

Die auffälligste Regulation sowohl nach der HIV-1 Infektion als auch Inhibition von Akt zeigten dabei Mitglieder der Fos Genfamilie. Diese Familie besteht aus vier Mitgliedern: FOS, FOSB, FOSL1 und FOSL2. Zusammen mit Mitgliedern der JUN Familie (JUN, JUNB und JUND) bilden sie den Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1. Dieser reguliert zahlreiche Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Cytokin Produktion oder Onkogenese [331]. Das *FOSB* Gen codiert drei alternative Transkripte (Abb. 3.13 A), wobei im Folgenden nur die Transkriptvariante 1 betrachtet wurde, da für die Junctions von Exon 2 auf Exon 4 (Variante 2) und von Exon 4 auf Exon 5 (Variante 3) eine zu vernachlässigende Anzahl an Reads gezählt wurden und die darüber hinaus auch nicht den Qualitätsstandards entsprachen.

6 Stunden nach HIV-1 Infektion war die Expression aller drei Junctions dieser Variante bereits um etwa ein Drittel verringert. Die zusätzliche Vorbehandlung mit

### 3. Ergebnisse

MK2206 führte zu diesem Zeitpunkt sogar zu einer weiteren Reduktion um etwa die Hälfte (Abb. 3.13 B). 48 Stunden nach HIV-1 Infektion, Inhibition oder beidem war die Expression auf etwa 2-3% herunter reguliert. In einigen der Proben war die Expression sogar unter das Detektionslimit gefallen. Ebenso drastisch verlief die Expression des *FOS* Gens, welches nur für eine Transkriptvariante codiert (Abb. 3.13 A und B). Auch hier war nach 48 Stunden in allen drei Konditionen nur noch ein Bruchteil der Ausgangsexpression zu detektieren. Um die Daten experimentell zu bestätigen, wurden erneut PM1 Zellen mit HIV-1 infiziert oder MK2206 behandelt. Es wurde außerdem der zusätzliche Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion und Inhibition betrachtet. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit den spezifischen Primern #4979 und #4980 (*FOSB*) und #5061 und #5062 (*FOS*) amplifiziert (Abb. 3.13 A, Pfeile). Die RT-PCRs bestätigten die Daten der RNA Sequenzierung: Die Expression beider Gene ging sowohl nach HIV-1 Infektion als auch nach Akt Inhibition verloren. *Fos* war dabei bereits nach 24 Stunden weder in den Inhibitor-Proben noch in den infizierten Proben zu detektieren, während *FOSB* 24 und 48 Stunden nach Inhibition noch eine geringe, aber absteigende Expression aufwies (Abb. 3.13 C).

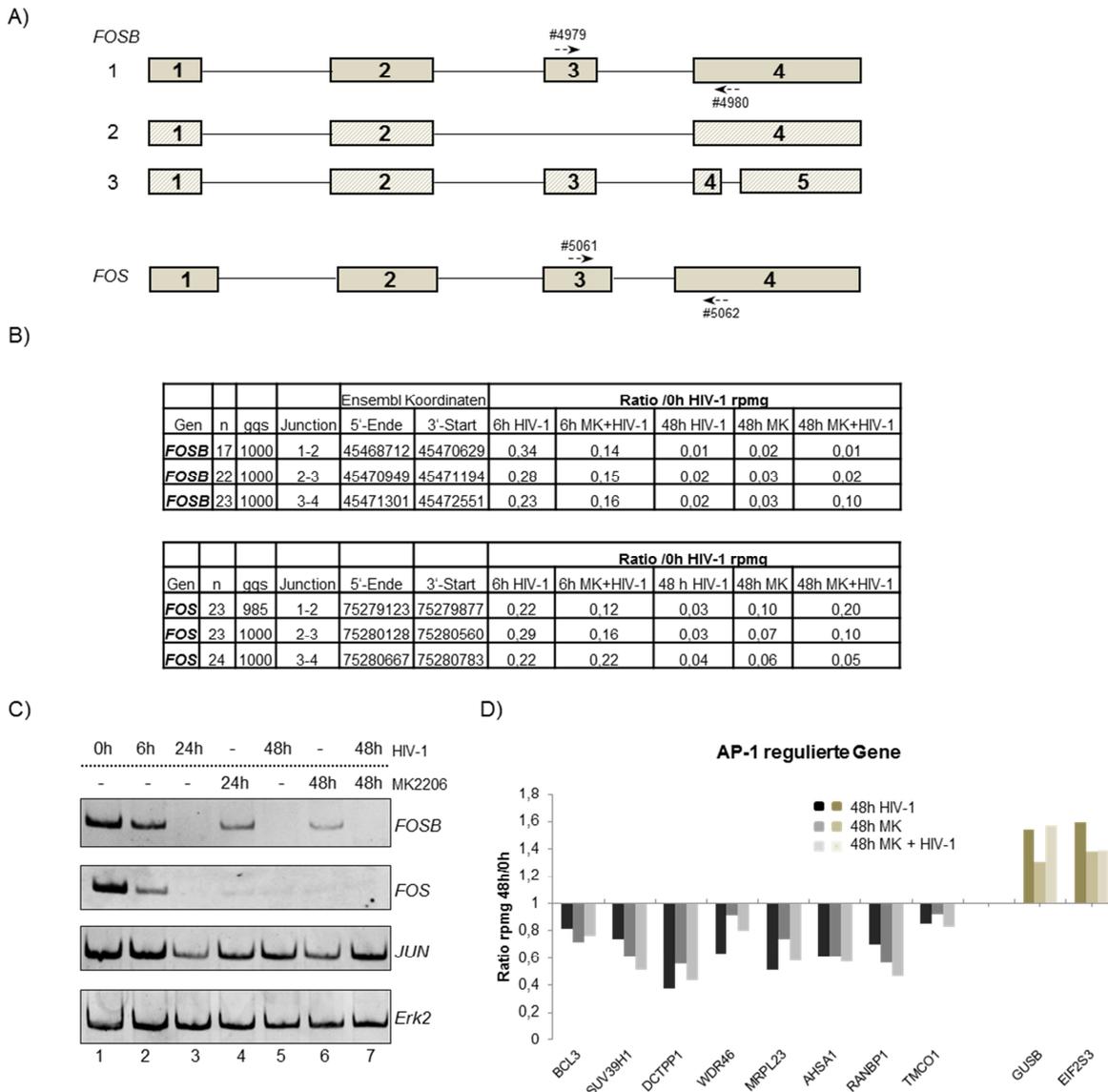
Da die Fos Proteine zusammen mit den JUN Proteinen den AP-1 Komplex bilden, sollte auch die Expression dieser Familie betrachtet werden. Bei allen drei Mitgliedern handelt es sich jedoch um intronlose Gene, sodass die Auswertung ihrer Expression in den Sequenzierungsdaten zunächst nicht berücksichtigt wurde. Aus diesem Grund wurden RT-PCR Analysen von ihnen durchgeführt. Für *JUNB* und *JUND* konnte kein spezifisches PCR Produkt amplifiziert werden. *JUN* zeigte in der RT-PCR mit den Primern #5065 und #5066 24 Stunden nach HIV-1 Infektion und 48 Stunden nach Akt Inhibition eine verringerte Expression (Abb. 3.13 C), die jedoch nicht mit dem Verlust der *FOSB* und *FOS* Expression zu vergleichen war. Um zu überprüfen, ob der Verlust der *FOSB* und *FOS* Genexpression dennoch ausreichte, um die Expression von AP-1 regulierten Genen zu verändern [332], wurden solche 48 Stunden nach Infektion und Inhibition in den Sequenzierungsdaten betrachtet. Dabei zeigten die positiv regulierten Gene tatsächlich eine verringerte Expression, während die negativ regulierten Gene eine erhöhte Expression aufwiesen (Abb. 3.13 D). Die verringerte *FOS* und *FOSB* Expression wirkte sich also nachweislich auf die Expression von AP-1 Zielgenen aus.

### 3. Ergebnisse

Im Gegensatz zu den hier präsentierten Daten haben Gibellini et al. gezeigt, dass HIV-1 Tat die Expression von *FOS* in Jurkat Zellen hochreguliert [333, 334]. Die Expression von *Tat* durch ein Plasmid zeigte dabei im Gegensatz zur Zugabe von extrazellulärem *Tat* ins Medium eine starke Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Zellen, also der vorherigen Behandlung mit Phytohaemagglutinin. Vergleicht man nun die basale Expression von *FOS* zwischen den in dieser Arbeit verwendeten PM1 Zellen und den von Gibellini verwendeten Jurkat Zellen, variierte diese bereits stark. Während PM1 Zellen eine starke *FOS* Expression aufwiesen (Abb. 3.13 C, Spur 1), war sie in unbehandelten Jurkat Zellen nicht nachzuweisen [334]. Die basale Expression von *FOS* war zwischen PM1 und HeLa Zellen hingegen vergleichbar (vgl. Abb. 3.13 C und Abb. 3.14).

Wegen der geringen Transfektionseffizienz von PM1 Zellen wurden daher HeLa Zellen verwendet, um zu überprüfen, ob die transiente Transfektion von *Tat* alleine oder aller viralen Proteine (pNL4-3) bei dieser basalen Expression einen Einfluss auf die *FOS* Expression zeigten. Auch wurde der Inhibitor MK2206 alleine oder in Kombination mit *Tat* oder pNL4-3 hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben mittels RT-PCRs. Die Transfektion von *Tat* und pNL4-3 führte zu einer leichten Abnahme der *FOS* Expression, während die Inhibition der Akt Kinase keinen Effekt zeigte (Abb. 3.14). Die erhöhte Expression von *FOS* nach Transfektion von *Tat* – wie in Jurkat Zellen – konnte in HeLa Zellen nicht erzielt werden. Der starke Verlust der *FOS* Expression – wie in PM1 Zellen nach Inhibitor Behandlung – konnte ebenfalls in HeLa Zellen nicht reproduziert werden. Zusätzlich wurde noch die Expression von *FOSB* in HeLa Zellen betrachtet. Die basale Expression war im Vergleich zu PM1 Zellen deutlich geringer und wurde – im Gegensatz zu den PM1 Zellen – durch den Inhibitor stark erhöht (Abb. 3.14, Spur 2). Die Transfektion von *Tat* oder pNL4-3 zeigte hingegen keinen Einfluss.

### 3. Ergebnisse



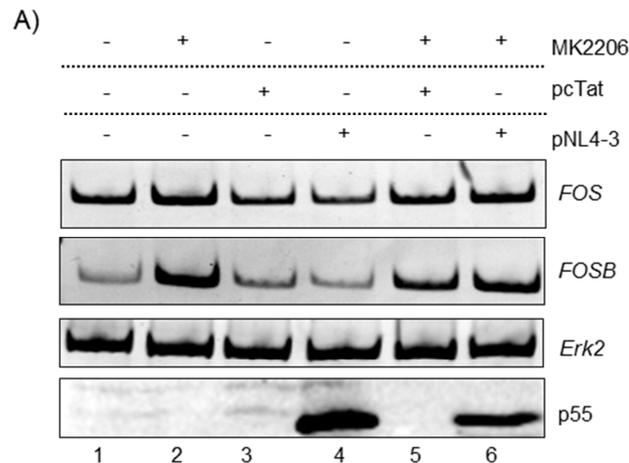
**Abbildung 3.13 Die Expression von *FOSB* und *FOS* geht nach Inhibition der Akt Kinase und Infektion mit HIV-1 verloren.**

(A) Schematische Darstellung der Transkriptvarianten von *FOSB* und *FOS*, die mittels der *RNA deep sequencing* Analysen detektiert wurden. Die in den RT-PCR Analysen verwendeten Primer #4979 und #4980 (*Fosb*) und #5061 und #5062 (*FOS*) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Für die jeweiligen ExonJunctions-Reads von *FOS* und *FOSB* sind die Anzahl der Proben, in denen sie detektiert wurden (n), der Qualitätsscore (gqs= *gap quality score*), die Koordinaten der 5'- und 3'-Spleißstellen (<http://dec2013.archive.ensembl.org/index.html>), sowie die gebildeten Ratios der rpmps (*reads per million gaps*) aufgelistet. (C) PM1 Zellen wurden mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und/oder mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5  $\mu$ M) für den entsprechenden Zeitraum inkubiert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit den in (A) gekennzeichneten Primern amplifiziert. Zusätzlich wurde die Expression des intronlosen Gens *JUN* mit den Primern #5065 und #5066 betrachtet. Die Amplifizierung von *Erk2* diente mit den Primern #4646 und #4647 als Ladekontrolle. (D) Die rpmpg Werte publizierter AP-1 regulierter Gene der jeweiligen Kondition wurden zu den rpmps der 0 h Werte ins Verhältnis gesetzt.

Die Regulation der *FOS* Gene war also stark vom verwendeten Zelltyp abhängig und ließ sich auch nicht, wie in Jurkat Zellen, durch transfiziertes Tat erhöhen. Auch die Transfektion der proviralen DNA hatte keinen Einfluss auf die Expression der Gene. Ob die Infektion mit HIV-1 in HeLa Zellen eine Rolle spielt, muss in HeLa-CD4+ Zellen überprüft werden. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Genregulation zwischen

### 3. Ergebnisse

unterschiedlichen Zelllinien deuten aber darauf hin, dass die Übertragbarkeit sehr stark eingeschränkt ist. Auch zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression dieser Gene für die Zelle nicht essentiell sind und, dass das Expressionslevel auch für die HIV-1 Infektion keine wesentliche Bedeutung hatte, da die Viruspartikelproduktion unabhängig des vorhandenen Expressionslevels in den unterschiedlichen Zelllinien nicht beeinträchtigt schien.



**Abbildung 3.14 In HeLa Zellen steigert die Inhibition der Akt Kinase die Expression von *FOSB*.**

HeLa Zellen wurden mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5  $\mu$ M) inkubiert, mit einem Expressionsplasmid für Tat und/oder der proviralen DNA pNL4-3 für 48 Stunden transfiziert. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der spezifischen Primer #4979 und #4980 (*FOSB*) und #5061 und #5062 (*FOS*) amplifiziert. *Erk2* (#4646 und #4647) diente als Ladekontrolle. Zusätzlich wurden die Proteine isoliert, mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und p55 mittels eines spezifischen Antikörpers als Infektionskontrolle nachgewiesen.

#### 3.3.3 Veränderungen im Spleißmuster von *TP53* nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition sind zelltypabhängig

Neben der Veränderung der Expression von Genen konnten mittels der RNA Sequenzierungsdaten auch Veränderungen im alternativen Spleißen aufgezeigt werden.

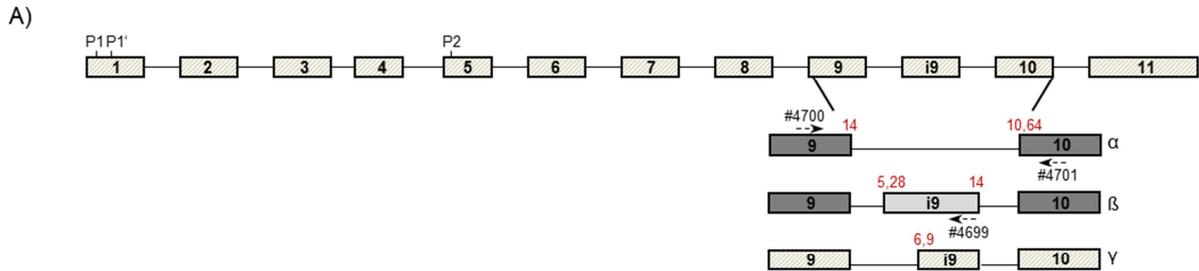
Für das Tumorsuppressorgen *TP53* sind in Ensembl insgesamt 28 Transkriptisoformen annotiert. In der Literatur werden jedoch stets nur 9 alternative Isoformen beschrieben, deren Vorkommen auch experimentell bestätigt worden war. Dabei können 3 verschiedene Promotoren genutzt sowie das Exon i9 komplett ein- ( $\beta$  Variante) oder ausgeschlossen ( $\alpha$  Variante) oder ein alternativer Akzeptor genutzt werden ( $\gamma$  Variante) (Abb. 3.15 A). Mittels der Transkriptomdaten konnte die Nutzung zwischen den Promotoren P1 und P1' nicht unterschieden werden, da beide im

### 3. Ergebnisse

ersten Exon lokalisiert sind. Die Nutzung zwischen P1/P1' und P2 ergibt sich jedoch aus der Verteilung der Reads, deren Junctions in beiden Varianten vorkommen (Exon 5-11) und derer, die nur in den Varianten mit P1/P1' vorkommen (Exon 1-5). Werden beide exprimiert, so sollte davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Reads der Exon 5-11 – durch die Summierung aller Varianten – höher ist als die der Exon 1-5, da diese nur für die Varianten P1/P1' genutzt werden. Da sich allerdings eine gleichmäßige Verteilung zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass nur die Varianten mit P1/P1' exprimiert wurden. Diese Varianten unterscheiden sich schließlich noch durch den unterschiedlichen Einschluss des Exons i9. In Abbildung 3.15 A sind zur Bewertung der intrinsischen Spleißstellenstärke für die Spleißdonoren von Exon 9 und i9 der H-Bond Score, sowie für die Akzeptoren der Exons i9 und 10 der MaxEnt Score angegeben (S. Kapitel 1.1.2, Seite 9). Die Donoren von Exon 9 und Exon i9 waren mit einem HBS von 14 gleich stark bewertet, während die Akzeptoren der  $\beta$  und  $\gamma$  Variante im Exon i9 etwa nur halb so stark sind wie der im Exon 10, der in allen 3 Transkripten verwendet wird. Würden also nur die intrinsischen Stärken betrachtet, so würde von einem verstärkten Vorkommen der  $\alpha$  Variante auszugehen sein. Dies traf auch für alle Konditionen in den Transkriptomanalysen zu; die  $\alpha$  Variante war die am stärksten exprimierte Variante. Interessanterweise konnte für diese Variante eine etwa 2fache Reduktion bereits 6 Stunden nach der HIV-1 Infektion beobachtet werden (Abb. 3.15 B). Auch 48 Stunden nach Infektion und Inhibition war diese Variante noch 2fach herunterreguliert, interessanterweise aber nicht 48 Stunden nach gleichzeitiger Infektion und Inhibition (Abb. 3.15 B). Die  $\beta$  Variante wurde sowohl nach Infektion als auch nach Inhibition massiv herunter reguliert: 48 Stunden nach Inhibition etwa 4fach und 48 Stunden nach Infektion etwa 10fach. Die  $\gamma$  Variante konnte in keiner der Proben detektiert werden. Um die Resultate der Sequenzierungen zu validieren, wurden erneut PM1 Zellen mit HIV-1 infiziert und mit dem Inhibitor behandelt, die RNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR wurde mit drei Primern durchgeführt, da das Produkt von Exon i9 flankierenden Primern andernfalls zu groß gewesen wäre: #4700 in Exon 9, #4699 in Exon i9 und #4701 in Exon 10 (Abb. 3.15 A, Pfeile). Die zwei zu erwartenden Produkte unterschieden sich so um 100 bp. Wie erwartet, war die  $\alpha$  Variante in allen HIV-1 Proben leicht und die  $\beta$  Variante stark herunterreguliert (Abb. 3.15 C, Spur 2, 3, 5 und 7). Die Inhibition der Akt Kinase führte ebenfalls zur verminderten Expression der  $\beta$  Variante, wenn auch

### 3. Ergebnisse

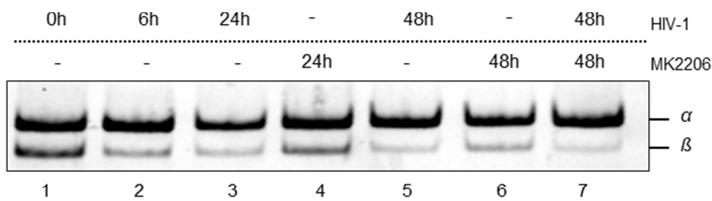
in einem geringeren Ausmaß (Abb. 3.15 C, vgl. Spur 3 und 4, 5 und 6). Die gleichzeitige Infektion und Inhibition zeigte den größten Unterschied bzgl. des Verhältnisses der beiden Transkriptvarianten zueinander (Abb. 3.15 C, Spur 7).



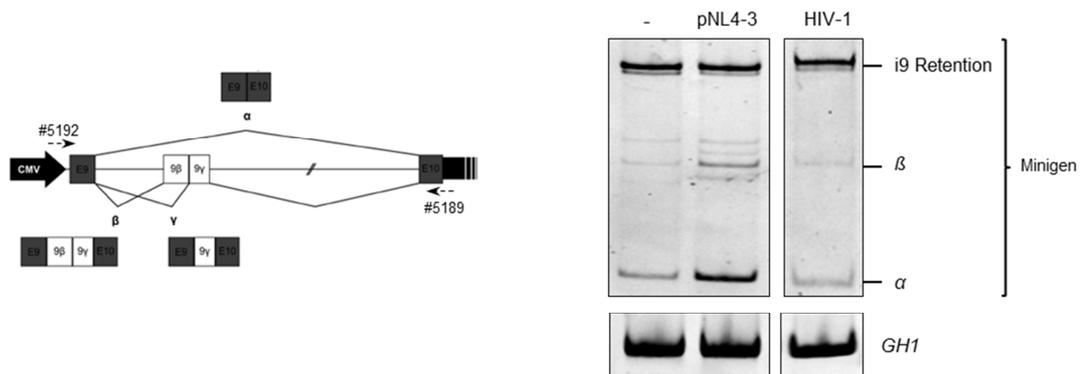
B)

Gen	Junction	Variante	Ensembl Koordinaten		Ratio/0h HIV-1 rpmg				
			5'-Ende	3'-Start	6h HIV-1	6h MK+HIV-1	48h HIV-1	48h MK	48h MK+HIV-1
<i>TP53</i>	9-i9	$\beta$	7673207	7670715	0,16	0,12	0,11	0,37	0,09
<i>TP53</i>	9-10	$\alpha$	7673535	7670715	0,50	0,55	0,61	0,62	0,95
<i>TP53</i>	i9-10	$\beta$	7673535	7673339	0,09	0,33	0,07	0,24	0,30

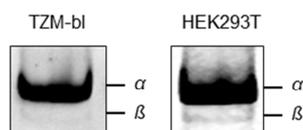
C)



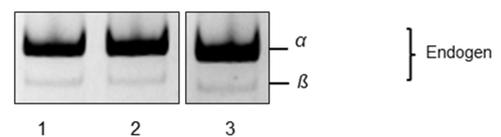
D)



E)



F)



### 3. Ergebnisse

#### **Abbildung 3.15 *TP53* wird nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und der HIV-1 Infektion anders gespleißt.**

(A) Schematische Darstellung des *TP53* Gens. Das Gen hat drei verschiedene Promotoren: P1, P1' und P2. Außerdem kann das Exon i9 alternativ eingeschlossen werden. Die in den RT-PCRs verwendeten Primer #4700, #4699 und #4701 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die intrinsischen Stärken der Spleißdonoren (H-Bond Score) und Akzeptoren (MaxEnt-Score) sind in rot angegeben. (B) Für die Exon i9 betreffenden ExonJunctions sind die Ensembl Koordinaten sowie die mit den entsprechenden rpmgs (*reads per million gaps*) gebildeten Ratios aufgelistet. (C) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5) und/oder mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5  $\mu$ M) behandelt. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der in (A) gezeigten Primer #4700, #4699 und #4701 amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. (D) Das *TP53-i9* Minigen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die alternativen Exons sind in weiß dargestellt (entnommen aus [335]). HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem Minigen und dem Kontrollplasmid pXGH5 transfiziert und 24 Stunden später mit der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert oder mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit den gekennzeichneten Primern #5192 und #5189 amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels EtBr-Lösung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Amplifizierung von GH1 diente als Transfektionskontrolle. (E) RNA aus TZM-bl und HEK293T Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der Primer aus (A) amplifiziert. (F) Die cDNA aus (D) wurde ebenfalls mit den Primern für endogenes *TP53* aus (A) amplifiziert.

Die *TP53* Expression ist nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition also nicht nur vermindert, vielmehr ist zusätzlich auch noch der Einschluss des Exon i9 verringert.

Um die Regulation des Exons i9 umfassender analysieren zu können, wurden HeLa-CD4+ Zellen mit einem *TP53-i9* Minigen transfiziert [335]. Dieses steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und enthält die natürlichen Sequenzen des Exons 9, Exons i9 und Exons 10 und die SV40 Polyadenylierungsstelle (Abb. 3.15 D). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert oder mit HIV-1 infiziert (MOI 0.5). Die RNA wurde aufgereinigt und die erstellte cDNA mittels spezifischer Primer – die zwischen endogenem und transfiziertem *TP53* diskriminieren – amplifiziert (Abb. 15.3 D). Als Transfektionskontrolle wurde die konstitutiv gespleißte GH1 mRNA des co-transfizierten Reporter pXGH5 amplifiziert. Überraschenderweise zeigte das Minigen ein völlig anderes Spleißmuster als das endogene Gen. Bereits die nicht behandelte Probe zeigt nur eine schwache  $\alpha$  und  $\beta$  Expression, die nicht die natürliche Situation widerspiegelte (Abb. 3.15 D). Am stärksten wurde eine zusätzliche Bande exprimiert, die im natürlichen Kontext nicht nachzuweisen war. Der Größe nach zu urteilen handelte es sich hierbei um die Retention des in dem Minigen verkürzten Introns 9. Auch die Transfektion der proviralen DNA zeigte ein unerwartetes Muster: Sowohl die  $\alpha$  als auch die  $\beta$  Variante wurden, anders als in der endogenen infektiösen Situation, hochreguliert. Die Infektion mit HIV-1 hatte auf das Spleißen des Minigens keinen Einfluss (Abb. 3.15 D). Dass keine Expressionsunterschiede zu erkennen waren, könnte im heterologen Promotor des Minigens begründet liegen. Die Unterschiede im Spleißmuster allerdings könnten zelltypabhängig sein. Für die Transkriptomanalysen wurde die T-Zelllinie PM1 verwendet, um eine möglichst

### 3. Ergebnisse

wirtsnahe Infektion nachzustellen. Nachteil dieser Zelllinie ist jedoch, dass sie sich mit herkömmlichen Methoden nicht transfizieren lässt. Daher wurde in dieser Arbeit für Transfektionsexperimente stets die HeLa-CD4<sup>+</sup> Zelllinie verwendet, die durch die zusätzliche Expression des CD4-Rezepts mit HIV-1 infiziert werden kann.

Um nun zu überprüfen, ob es sich um eine zelltypspezifische Expression handelte, wurde die endogene Expression von *TP53* in HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen ohne und 48 Stunden nach pNL4-3 Transfektion bzw. HIV-1 Infektion mittels RT-PCR bestimmt. In unbehandelten HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen war die  $\beta$  Variante, die in PM1 Zellen von HIV-1 herunterreguliert wird, bereits kaum vorhanden (Abb. 3.15 F). Des Weiteren war nach Transfektion oder Infektion weder ein Unterschied in der Expression noch im Spleißmuster zu beobachten (Abb. 3.15 F). In diesen Zellen wurde die Regulation von *TP53* also nicht durch HIV-1 beeinflusst. Dass kein Unterschied im Spleißen der  $\beta$ -Variante nachzuweisen war, könnte auch an der bereits sehr geringen Ausgangsexpression liegen. Eventuell sind die Bedingungen in HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen ohne HIV-1 Infektion bereits so, dass sie die Synthese  $\beta$  Variante unterdrücken.

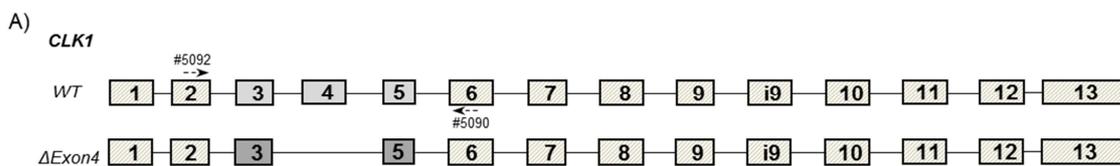
Zusätzlich wurde die *TP53* Expression noch in zwei weiteren effizient transfizierbaren (TZM-bl und HEK293T), aber eben nicht T-Zelllinien, betrachtet. Jedoch war auch hier die endogene Expression mit der in PM1 Zellen nicht zu vergleichen (Abb. 3.15 E). Die Wahl der jeweiligen Zelllinie – wie es bei den *Fos* Genen bereits beobachtet wurde – kann die Ergebnisse stark beeinflussen. Für weitere Untersuchungen müsste eine Zelllinie gefunden werden, die sowohl infizierbar als auch transfizierbar ist, als auch zu PM1 Zellen ein vergleichbares Muster der *TP53* Expression aufweist.

#### **3.3.4 *CLK1* wird im Verlauf der HIV-1 Infektion und nach Akt Inhibition differentiell gespleißt**

Ein weiteres Gen, dessen Transkriptisoformen nach HIV-1 Infektion und Inhibition der Akt Kinase eine auffällig andere Verteilung aufwiesen, war *CLK1*. Interessanterweise gehört *CLK1* zur Klasse der Cdc2-like Superfamilie, die unter anderem SR Proteine phosphorylieren (s. Kapitel 1.1.3, Seite 6). Ein verändertes Spleißen von *CLK1* könnte also eine weitere Ebene der Genregulation nach einer HIV-1 Infektion darstellen. In Ensembl (Version 74) sind 14 verschiedene Transkriptvarianten annotiert. In den Transkriptomdaten lassen sich jedoch nur zwei Varianten unterscheiden: die *WT* Variante und die  $\Delta$ Exon 4 Variante. Insgesamt setzt sich *CLK1* aus 13 Exons zusammen und die beiden Varianten unterscheiden sich nur

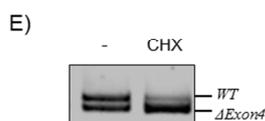
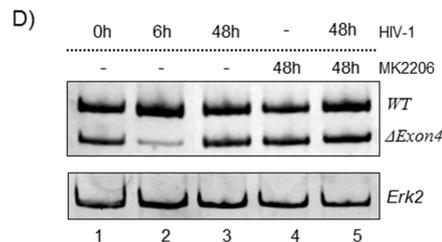
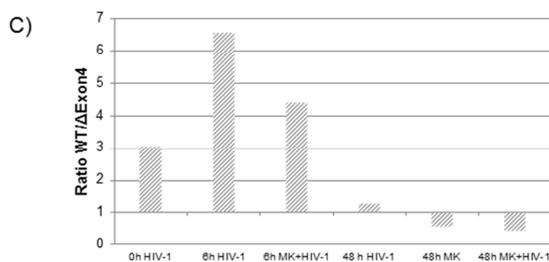
### 3. Ergebnisse

durch den Ein- oder Ausschluss des Exons 4. Die Veränderung des Spleißmusters lässt sich also analysieren, wenn die Nutzung der Junction von Exon 3 auf Exon 4 und Exon 4 auf Exon 5 (*WT*: Abb. 3.14 A, hellgrau unterlegt) mit der der Junction von Exon 3 auf Exon 5 verglichen wird ( $\Delta$ *Exon4*: Abb. 3.16 A, dunkelgrau unterlegt). Alle anderen Junctions kommen in beiden Transkriptvarianten vor und zeigten daher ein Gemisch der Reads von beiden Isoformen. 6 Stunden nach HIV-1 Infektion war bereits eine sehr leichte Hochregulierung aller konstitutiv gespleißten Exons zu erkennen (Abb. 3.16 B). Dabei hat sich interessanterweise das Verhältnis von *WT* zu  $\Delta$ *Exon4* Variante stark verändert: von 3 (0h HIV-1) auf 6,6 (Abb. 3.16 C). Exon 4 wurde also doppelt so häufig eingeschlossen. Die gleichzeitige Inhibition der Akt Kinase zeigte nach 6 Stunden – deutlicher als die alleinige Infektion – bereits einen 2fachen Anstieg der konstitutiv gespleißten Exons (Abb. 3.16 B).



B)

Gen	Proben	qqs	Junction	Variante	Ensembl Koordinaten		Ratio /0h HIV-1 rpmg				
					5'-Ende	3'-Start	6h HIV-1	6h MK+HIV-1	48 h HIV-1	48h MK	48h MK+HIV-1
<i>CLK1</i>	24	1000	12-13	Beide	200853903	200853449	1.11	2.27	2.21	1.72	2.20
<i>CLK1</i>	24	1000	11-12	Beide	200854616	200853993	1.17	2.30	2.13	1.74	2.22
<i>CLK1</i>	24	1000	10-11	Beide	200855004	200854695	1.14	2.19	2.24	1.69	2.22
<i>CLK1</i>	24	1000	9-10	Beide	200856682	200855086	1.13	1.96	2.12	1.64	2.25
<i>CLK1</i>	24	1000	8-9	Beide	200856891	200856811	1.29	1.76	2.22	1.65	2.36
<i>CLK1</i>	24	1000	7-8	Beide	200857718	200856985	1.11	1.78	2.32	1.73	2.43
<i>CLK1</i>	24	1000	6-7	Beide	200857973	200857884	1.26	1.86	2.27	1.70	2.43
<i>CLK1</i>	24	1000	5-6	Beide	200859680	200858089	1.19	1.59	2.39	1.84	2.45
<i>CLK1</i>	24	1000	4-5	<i>WT</i>	200860125	200859746	1.65	1.99	1.82	0.67	0.96
<i>CLK1</i>	24	1000	3-5	$\Delta$ <i>Exon4</i>	200861238	200859746	0.77	1.39	4.15	3.93	6.56
<i>CLK1</i>	24	1000	3-4	<i>WT</i>	200861238	200860215	1.69	2.01	1.65	0.69	0.83
<i>CLK1</i>	24	1000	2-3	Beide	200861702	200861466	1.29	1.62	2.39	1.70	2.55
<i>CLK1</i>	24	1000	1-2	Beide	200864564	200861862	1.73	2.12	2.44	1.87	2.54



### 3. Ergebnisse

#### **Abbildung 3.16 CLK1 wird nach Inhibition der Akt Kinase und im Verlauf einer HIV-1 Infektion differentiell gespleißt.**

(A) Schematische Darstellung der mittels *RNA deep sequencing* Analysen detektierten Transkriptvarianten von *CLK1*, die entweder das Exon 4 einschließen (*WT*) oder ausschließen ( $\Delta$ *Exon4*). Die in den RT-PCRs verwendeten Primer #5092 und #5090 sind mit Pfeilen gekennzeichnet und die Ensembl-Koordinaten der betreffenden Exons eingezeichnet. (B) Für die jeweiligen ExonJunctions von *CLK1* sind die Anzahl der Proben in denen sie detektiert wurden (*n*), der Qualitätsscore (*gqs*= *gap quality score*), die Koordinaten der 5'- und 3'-Spleißstellen (<http://dec2013.archive.ensembl.org/index.html>), sowie die gebildeten Ratios der *rpmgs* (*reads per million gaps*) aufgelistet. (C) Für die jeweilige Kondition ist das Verhältnis der *rpmgs* der *WT* Variante zur  $\Delta$ *Exon4* Variante dargestellt. (D) PM1 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und/oder dem Akt Inhibitor MK2206 (5  $\mu$ M) behandelt. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der in (A) gekennzeichneten Primer #5092 und #5090 vervielfältigt. Die Amplifikate wurden mittels eines 10%igen PAA-Gels aufgetrennt und mit Hilfe einer EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. (E) PM1 Zellen wurden für 6 Stunden mit dem Translationsblocker Cycloheximid (CHX, 50 mg/ml) inkubiert und die aufgereinigte RNA wie in (D) beschrieben, weiterverarbeitet.

Aber auch hier war das Verhältnis von *WT* zu  $\Delta$ *Exon4* Variante höher als der Ausgangswert (2,8 auf 4,3) (Abb. 3.16 C). 48 Stunden nach Infektion wurde das Gen mehr als 2fach hochreguliert, zu erkennen an der Anzahl der Reads für die ExonJunction Reads der konstitutiv gespleißten Exons (Abb. 3.14 B). Gleichzeitig hat sich das Verhältnis *WT* zu  $\Delta$ *Exon4* drastisch gewendet. Jetzt wurden beide Varianten etwa gleich stark exprimiert, was einer Veränderung des *WT* zu  $\Delta$ *Exon4* von 3 auf 1,2 entsprach (Abb. 3.16 C). Die alleinige Inhibition der Kinase nach 48 Stunden zeigte auch einen fast 2fachen Anstieg der ExonJunction-Reads der konstitutiven Exons, dabei aber eine noch extremere Verschiebung zur  $\Delta$ *Exon4* Variante hin als nach Infektion zum gleichen Zeitpunkt. Hier drehte sich das Verhältnis um: von 3 auf 0,5 (Abb. 3.16 C). Die gleichzeitige Inhibition und Infektion zeigte bezüglich der konstitutiven Exons ein ähnliches Bild wie die Infektion alleine, also eine mehr als 2fache Hochregulation. Das Verhältnis von *WT* zu  $\Delta$ *Exon4* Variante veränderte sich ähnlich stark wie nach der Inhibition von 3 auf 0,4 (Abb. 3.16 C). Es scheint also, dass sich bei gleichzeitiger Behandlung der extremere Phänotyp durchsetzt, also mehr Exon 4 Ausschluss. Die RNA Sequenzierungsdaten wurden mittels RT-PCR unter Verwendung der Exon 4 flankierenden Primer #5090 und #5092 bestätigt (Abb. 3.16 A und D). Zur Funktion der  $\Delta$ *Exon4* Variante gibt es – wie schon bei *SRSF1* und *SRSF3* – zwei unterschiedliche Befunde: Duncan et al. beschrieben sie als eine katalytisch inaktive Form der Kinase codierenden Variante [336], während Hillman et al. sie als NMD-sensitives Transkript identifizierten, da der durch den Exonausschluss entstehende Frameshift zur Entstehung eines vorzeitiges Stoppcodons führt [193]. Um zu überprüfen, ob das Transkript tatsächlich NMD sensitiv war, wurden PM1 Zellen für 6 Stunden mit dem Translationsblocker CHX inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine RT-PCR mit den Primern #5090/#5092 durchgeführt. Die Behandlung zeigte eine starke Akkumulation der

[94]

### 3. Ergebnisse

$\Delta Exon4$  Variante (Abb. 3.16 E). Durch den Ausschluss des Exon 4 wird das Transkript also NMD-sensitiv. Da diese Variante in infizierten Zellen hoch reguliert wird, deutet dies erneut auf eine verminderte NMD-Aktivität nach einer HIV-1 Infektion hin.

Insgesamt war die Expression von *CLK1* nach HIV-1 Infektion und Inhibition der Akt Kinase hoch reguliert. Dabei veränderte sich aber das Verhältnis der *WT* zur  $\Delta Exon4$  Variante im Verlauf der Infektion: Dem deutlichen Anstieg des Exon 4 Einschlusses (6 Stunden nach Infektion) folgte ein deutlicher Shift zum vermehrten Ausschluss (48 Stunden nach Infektion). Für die anderen drei Mitglieder der Cdc2-like Superfamilie konnten nur leichte Expressionsunterschiede nach der HIV-1 Infektion ausgemacht werden. Unterschiede im Spleißmuster waren hier nicht zu beobachten.

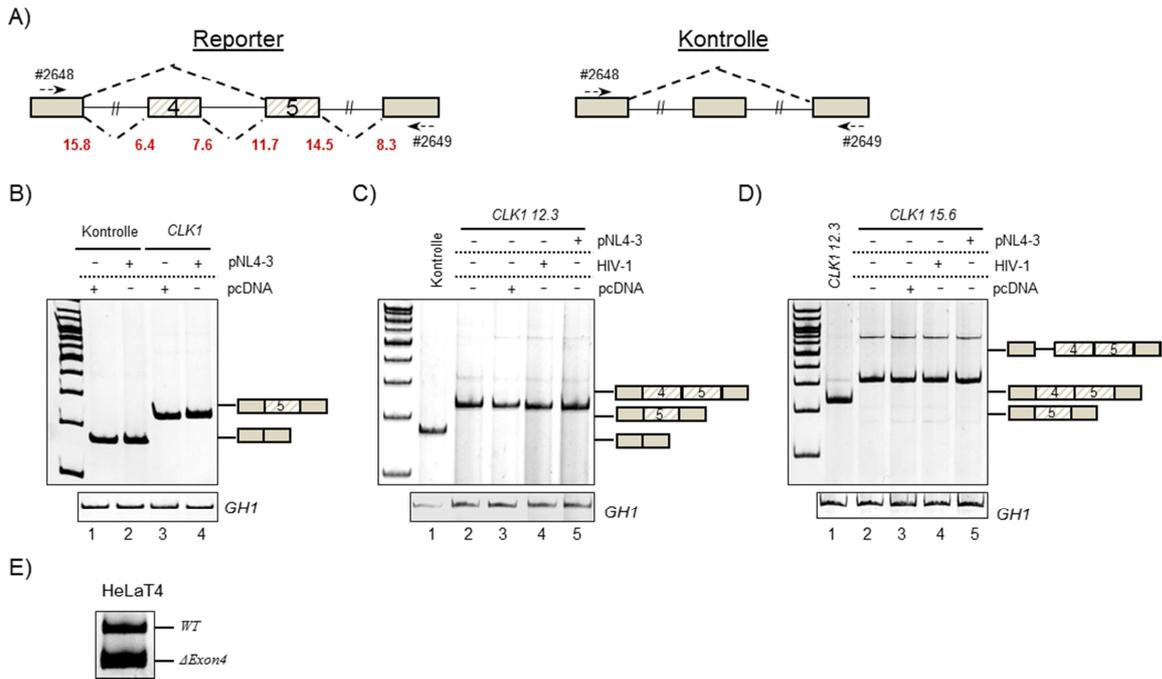
Um die Regulation des *CLK1* Exon 4 Spleißens unabhängig von der NMD Aktivität zu betrachten, wurde ein Spleißreporter ohne ORF hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die genomischen Sequenzen des Exons 4 und Exons 5 inklusive 150 bp der jeweiligen Intronsequenzen in einen Reporter mit 2 flankierenden Exons kloniert (Abb. 3.17 A). HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem Plasmid transfiziert und 24 Stunden später mit der proviralen DNA oder einem Leervektor transfiziert. Als Kontrolle wurde das Ausgangskonstrukt des Spleißreporters ohne die *CLK1* Exons verwendet. 48 Stunden später wurde die RNA isoliert und RT-PCRs mit den spezifischen Primern #2648 und #2649 durchgeführt. Es konnte jedoch lediglich ein Einschluss des *CLK1* Exon 5 beobachtet werden (Abb. 3.17 B, Spur 3 und 4). Das hier zu untersuchende Exon 4 wurde – auch bei Co-Transfektion der viralen DNA – nicht erkannt. Dies entsprach nicht der endogenen Situation in PM1 Zellen (Abb. 3.16 D, Spur 1). Da der Transfektionsversuch nicht in den PM1 Zellen durchgeführt werden konnte, wurden wiederum HeLa-CD4+ Zellen verwendet und hier deren endogene Expression von *CLK1* betrachtet. Anders als in unbehandelten PM1 Zellen war in HeLa-CD4+ Zellen ein deutlicher höherer Ausschluss des Exons 4 zu beobachten (Abb. 3.17 E). Dies könnte entweder auf eine andere Verteilung spleißregulatorischer Proteine oder auf eine höhere NMD Aktivität in HeLa-CD4+ Zellen zurückzuführen sein. Um den Reporter der endogenen Situation von PM1 Zellen anzupassen (mehr Exon 4 Einschluss), wurde daher der sehr geringe H-Bond Score (HBS) des Spleißdonors von Exon 4 durch Basenaustausche zunächst von 7,6 auf 12,3 erhöht. Nach erfolgter Transfektion wurden HeLa-CD4+ Zellen 24 später mit

### 3. Ergebnisse

der proviralen DNA transfiziert oder mit HIV-1 infiziert. Bei diesem Konstrukt konnte nur ein sehr leichter Einschluss des Exons 4 beobachtet werden (Abb. 3.17 C, Spur 2-5), was immer noch nicht der endogenen Situation entsprach. Ein Einfluss des Virus konnte – vermutlich auf Grund des geringen Exon 4 Einschlusses – auch nicht ausgemacht werden. Deshalb wurde die intrinsische Stärke des Spleißdonors noch weiter auf einen HBS von 15,6 erhöht. Nach Transfektion und RT-PCR zeigten sich jetzt nur noch Transkripte, die Exon 4 einschlossen (Abb. 3.17 D, Spur 2-5). Hinzu kam ein weiteres Transkript, in dem das Intron 1 zurückgehalten wurde. Der Spleißdonor war jetzt also so stark, dass das Exon immer eingeschlossen wurde. Zwischen Proben unbehandelter und infizierter Zellen konnte aber wieder kein Unterschied im Spleißmuster nachgewiesen werden. Die endogene Regulation ließ sich mittels dieses Spleißreporters nicht rekonstruieren. Das veränderte Verhältnis der beiden *CLK1* Transkripte scheint also nicht durch eine veränderte Spleißregulation – wie bereits bei *SRSF3* beobachtet – sondern vielmehr auf eine veränderte NMD Aktivität, die das Transkript akkumulieren lässt, zurückzuführen zu sein.

Inwieweit sich die Akkumulation der putativ NMD-sensitiven Variante nach HIV-1 Infektion auf die Proteinmengen von CLK1 auswirkte, konnte mit dem verwendeten Antikörper nicht überprüft werden, da kein Signal detektierbar war. Es ist aber zu vermuten, dass 6 Stunden nach Infektion zunächst mehr Protein synthetisiert wurde, da mehr Exon 4 Einschluss nachzuweisen war. Dies sollte sich dann im weiteren Verlauf der Infektion verändern, da schließlich deutlich mehr von der nicht codierenden NMD-sensitiven Variante vorhanden war. Es ist also wahrscheinlich, dass auch die Proteinmengen von CLK1 während der Infektion schwanken.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.17 Das Spleißmuster von *CLK1* kann mit einem Spleißreporter nicht nachgestellt werden.**

(A) Schematische Darstellung des *CLK1*-Spleißreporters, der die *CLK1* Exons 4 und 5 sowie 10 Nucleotide der aufwärts und abwärts liegenden Intronsequenzen enthält. Die intrinsischen Stärken der Spleißdonoren (H-Bond Score) und der Spleißakzeptoren (MaxEnt Score) sind rot gekennzeichnet. Also Kontrolle wurde das für die Klonierung verwendete Ausgangsplasmid pT-Bbeta Designer exon 7 c1c3 IVS benutzt. (B) HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem *CLK1*-Spleißreportern und dem Kontrollplasmid pXGH5 transfiziert (GH1) und 24 Stunden später mit dem Leervektor pcDNA oder der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert. (C) Die intrinsische Stärke des Spleißdonors im Exon 4 wurde von 7,6 auf 12,3 erhöht. HeLa-CD4+ wurden mit dem Reporter transfiziert und 24 Stunden später mit dem Leervektor pcDNA, der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert oder mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. (D) Die intrinsische Stärke des Spleißdonors im Exon 4 wurde weiter auf 15,6 erhöht und anschließend wie in (C) beschrieben, weiter verarbeitet, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der in (A) gekennzeichneten Primer #2648 und #2649 amplifiziert. Zum Nachweis der gleichmäßigen Transfektion wurde GH1 mittels der Primer #1224 und #1225 des co-transfizierten Plasmids pXGH5 amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 10%igen PAA Gel aufgetrennt und mit Hilfe einer EtBr-Lösung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Klonierungen sowie die Transfektionsexperimente wurden von Hanna Heinrichs im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. (E) RNA aus HeLa-CD4+ Zellen (HeLaT4) wurden aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels der Primer #5092 und #5090 aus Abbildung 3.16 A amplifiziert. Die Amplifikate wurden nach Auftrennung in einem 10%igen PAA Gel mittels EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

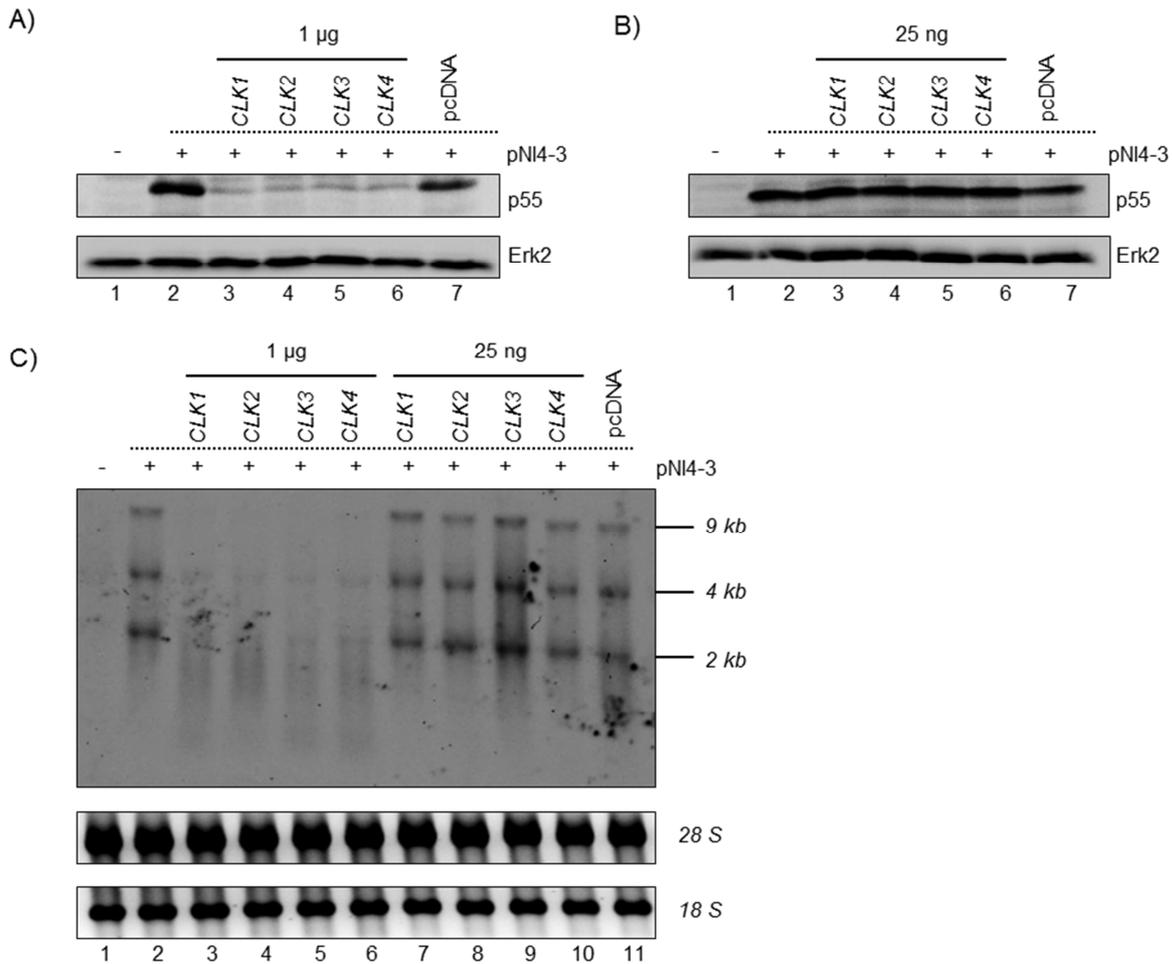
Wong und Kollegen haben gezeigt, dass sich die Überexpression der vier *CLKs* unterschiedlich auf eine HIV-1 Infektion auswirken [268]. Dabei zeigte die Überexpression von *CLK1* einen positiven, von *CLK2* einen negativen und von *CLK3* und *CLK4* gar keinen Effekt auf die Virus Replikation. Für diese Versuche hatten sie HeLa Zellen verwendet, in denen das stabil integrierte HIV-1 Genom durch Zugabe von Doxycyclin aktiviert werden konnte.

Um nun zu überprüfen, ob die Überexpression der Kinasen auch unter den hier, in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen, einen Einfluss auf die HIV-1 Replikation hat, wurden zunächst HeLa-CD4+ Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transfiziert. Da es sich um GFP-Fusionsproteine handelte, konnte die erfolgreiche Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden (s. Anhang 6.2, Seite

### 3. Ergebnisse

163). 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit jeweils einem der *CLK* Expressionsplasmide wurden die Zellen erneut, aber diesmal mit der proviralen DNA, transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Proteinlysate mittels Western-Blot auf die Produktion des viralen Proteins p55 untersucht (Abb. 3.18 A). Überraschenderweise zeigte die Überexpression aller vier Kinasen einen drastischen Rückgang der Virusreplikation. Um zu bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um einen spezifischen Effekt der Kinasen handelte, wurde die Menge der DNA der jeweiligen Kinase von 1 µg auf 250 ng reduziert und mit 750 ng Leervektor aufgefüllt. Wieder wurde mittels Western Blot die virale Replikation betrachtet (Abb. 3.18 B). Tatsächlich hatte jetzt keine der Kinasen mehr einen Effekt auf die Produktion der viralen Proteine. Es scheint sich also um einen spezifischen Effekt zu handeln. CLKs phosphorylieren SR Proteine, die wiederum maßgeblich an der Regulation des alternativen Spleißens – auch von viraler mRNA – beteiligt sind. Aus diesem Grund sollten die drei viralen mRNA Klassen nach der Überexpression im Northern-Blot betrachtet werden. Die RNA aus den wie oben beschriebenen Proben wurde isoliert und mittels eines formaldehydhaltigen Agarosegels der Größe nach aufgetrennt. Die Detektion der viralen RNAs erfolgte mittels einer Sonde, die gegen das in allen viralen Transkripten enthaltene Exon 7 gerichtet war. Der Nachweis der ribosomalen 28S und 18S RNA diente dem Nachweis der vergleichbaren RNA Mengen zwischen den Proben (Abb. 3.18 C). Interessanterweise zeigt die Transfektion von 1 µg der Kinasen nicht, wie vermutet, ein verändertes Spleißmuster, sondern die Degradation der viralen RNAs. In allen vier Proben war nur noch ein „Schmier“ der RNAs nachzuweisen (Abb. 3.18 C). Hingegen konnte bei der Transfektion von 25 ng kein Unterschied zu der nicht transfizierten oder mit einem Leervektor transfizierten Probe beobachtet werden (Abb. 3.18 C, vgl. Spuren 7 bis 10 mit 2 und 11). Lediglich die Transfektion von *CLK3* zeigte stärkere Banden aller drei RNA Klassen. Dies konnte aber nicht reproduziert werden und kann hier daher vermutlich auf eine erhöht eingesetzte RNA Menge zurückgeführt werden. Die Überexpression der Kinasen resultierte also in keiner spezifischen Veränderung des Spleißens, sondern schien die generelle Stabilität der viralen RNAs zu beeinträchtigen. Anders als Wong et al. in ihrem System beobachtet haben, war hier kein Unterschied zwischen den einzelnen Kinasen nachzuweisen.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.18 Die Ko-Transfektion der CLKs beeinträchtigt die virale Replikation, wenn das virale Genom zuvor mittels Transfektion in die Zellen eingebracht wurde.**

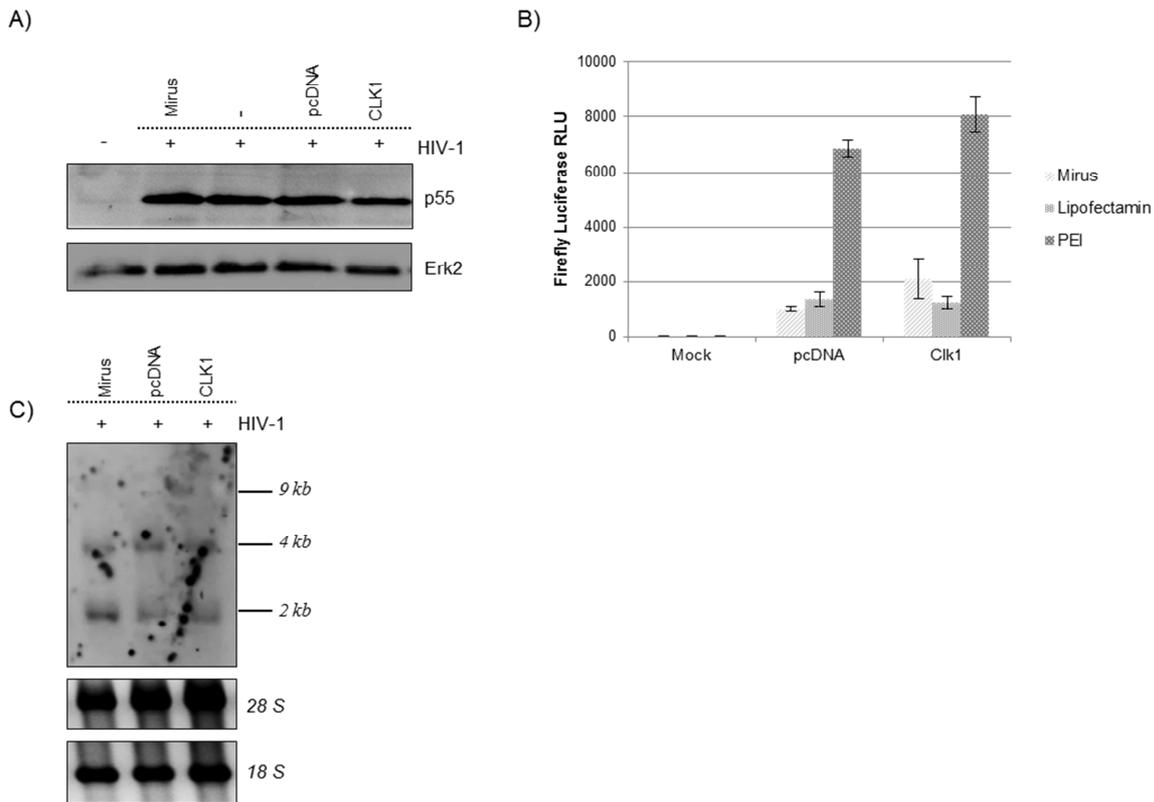
HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden der CLKs in den angegebenen Mengen oder dem Leervektor pcDNA transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit der proviralen DNA pNL4-3 für 48 Stunden. (A - B) Die Proteine wurden isoliert, auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet und p55 mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle. (C) Die RNA wurde aufgereinigt, in einem EtBr-haltigen Auftragspuffer auf einem 1%igen Formaldehyd-haltigen Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer HIV-1 Exon7 bindenden Digoxigenin gekoppelten RNA Sonde inkubiert. Die jeweiligen HIV-1 RNA Klassen sind gekennzeichnet. Der Nachweis erfolgte mittels eines anti-Digoxigenin Antikörpers. Der Detektion der ribosomalen RNAs diente als Ladekontrolle.

Da nur für *CLK1* eine veränderte Genexpression nach HIV-1 Infektion beobachtet wurde, wurde der Einfluss ihrer Überexpression auf die HIV-1 Replikation nach Infektion betrachtet (Abb. 3.16). HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit 1 µg *CLK1* Expressionsplasmid transfiziert. Als Kontrolle wurde nur das Transfektionsreagenz hinzugegeben, gar nichts oder die Zellen wurden mit einem Leervektor transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Infektion mit HIV-1 (MOI 0,5) und weitere 48 Stunden später wurden Proteinlysate gerntet und mittels Western Blot die virale p55 Produktion nachgewiesen. Die Überexpression von *CLK1* zeigte überraschenderweise keinen Einfluss auf die p55 Produktion, wenn die Zellen mit

### 3. Ergebnisse

HIV-1 infiziert und nicht mit der proviralen DNA transfiziert worden waren (Abb. 3.19 A). Um zu überprüfen, inwieweit die gebildeten viralen Partikel gleichsam infektiös waren, wurden erneut HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit dem Leervektor pcDNA oder dem Expressionsplasmid für CLK1 mittels Mirus, Lipofectamine® 2000 oder PEI transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit HIV-1 infiziert und nach weiteren 52 Stunden der Überstand geerntet und TZM-bl Reporter Zellen damit infiziert. In diesen Zellen steht die Produktion der *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle des HIV LTR Promoters, sodass die Luciferase Aktivität als Maß für die Infektiosität der viralen Partikel herangezogen werden konnte. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Proteine geerntet und die Luciferase Aktivität bestimmt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Infektiosität, wenn *CLK1* überexprimiert war (Abb. 3.19 B). Ebenfalls unverändert war die Expression aller drei viraler mRNA Klassen (Abb. 3.19 C). Um dennoch ausschließen zu können, dass etwaige Spleißeffekte innerhalb der drei mRNA Klassen im Northern-Blot nicht detektiert werden konnten, wurden RT-PCR Analysen mittels verschiedener spezifischer HIV-1 Primer durchgeführt (Abb. 3.20 A, Pfeile). Diesmal wurden alle vier Kinase-Expressionsvektoren transfiziert und erneut 24 Stunden später mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und die Zellen nach weiteren 48 Stunden aufgearbeitet. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Primer amplifiziert. Alle Proben zeigten, unabhängig der jeweiligen *CLK* Überexpression, innerhalb der 4 kb und der 2 kb Klassen das gleiche Spleißmuster (Abb. 3.20 B). Dass die Überexpression der Kinasen jedoch generell einen Einfluss – zumindest auf das konstitutive Spleißen – haben konnte, zeigte das Spleißmuster des mitgeführten Kontrollplasmids GH1.

### 3. Ergebnisse



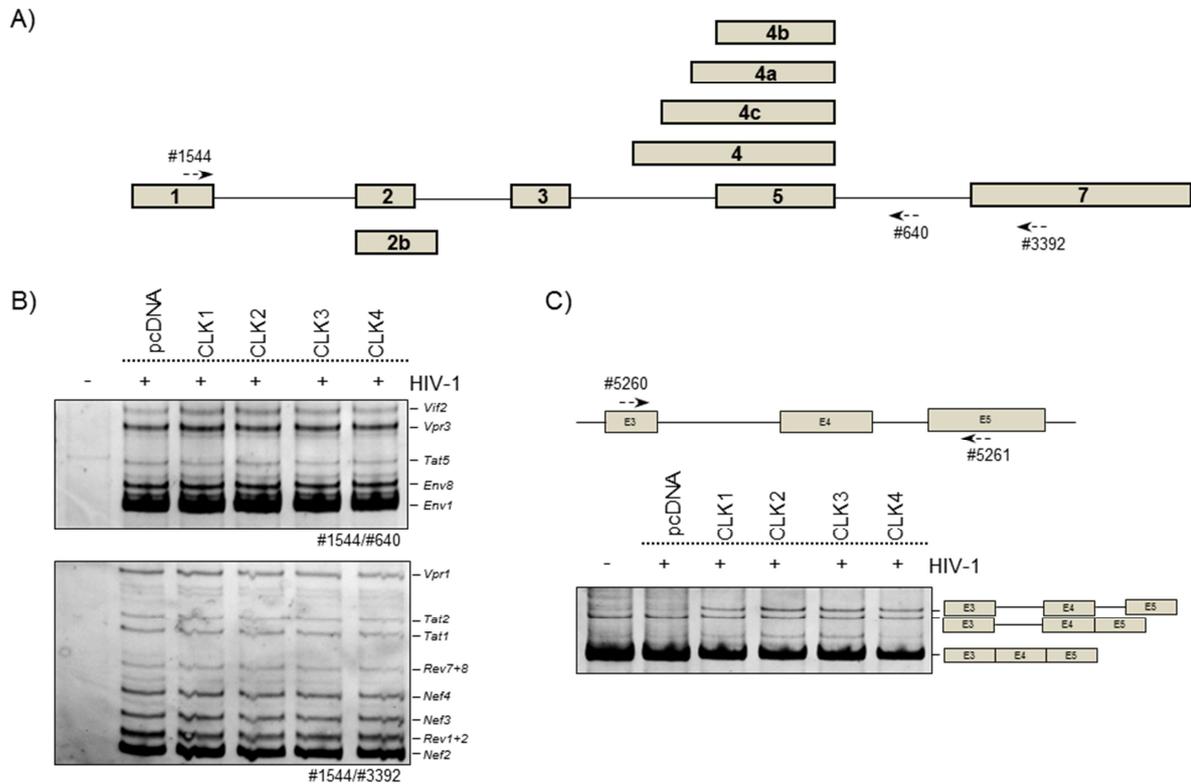
**Abbildung 3.19 Die Überexpression von *CLK1* hat keinen Einfluss auf die virale Replikation nach Infektion mit HIV-1.**

(A) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Mirus behandelt und/oder mit dem Leervektor pcDNA oder dem *CLK1* Expressionsplasmid transfiziert und 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert. 48 Stunden später wurden die Proteine geerntet, auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von p55 erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle. (B) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Mirus, Lipofectamin2000 oder PEI mit dem Leervektor pcDNA transfiziert und 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert. 52 Stunden danach wurden TZM-bl Zellen mit dem geernteten Überstand für 48 Stunden inkubiert. Diese codieren für Firely Luciferase, dessen Transkriptionseinheit unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors steht. Die Proteine wurden lysiert und die Luciferase-Aktivität im Luminometer gemessen. (C) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit Mirus alleine oder mit dem Leervektor pcDNA oder dem *CLK1* Expressionsplasmid transfiziert und 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert. 48 Stunden später wurde die RNA aufgereinigt, in einem EtBr-haltigen Auftragspuffer auf ein 1%iges Formaldehyd-haltiges Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer HIV-1 Exon7 bindenden Digoxigenin gekoppelten RNA Sonde inkubiert. Die jeweiligen HIV-1 RNA Klassen sind gekennzeichnet. Der Nachweis erfolgte mittels eines anti-Digoxigenin Antikörpers. Die Detektion der ribosomalen RNAs diente als Ladekontrolle.

Die Überexpression aller vier Kinasen führte hier zu einer drastischen Verringerung der komplett gespleißten Variante, während die Intronretention beider Introns zunahm (Abb. 3.20 C). Obwohl also die Expression von *CLK1* im Lauf einer HIV-1 Infektion verändert wurde, scheint die Überexpression keinen Einfluss auf die HIV-1 Infektion auszuüben. Deutet man den Verlauf der *CLK1* Expression während einer HIV-1 Infektion so, dass nach 6 Stunden aufgrund des vermehrten Spleißens der *WT*-Variante mehr Protein synthetisiert wird, so könnte eine zusätzlich erhöhte Menge durch eine Überexpression womöglich keinen weiteren Effekt auf eine HIV-1 Infektion haben. Die erhöhte Abundanz der  $\Delta$ Exon 4 Variante 48 Stunden nach Infektion könnte, wie auch schon bei SRSF3 beobachtet, auf eine verringerte NMD

### 3. Ergebnisse

Aktivität nach einer Infektion hindeuten. Diese Hypothese wurde im nächsten Abschnitt überprüft.



**Abbildung 3.20 Die Überexpression der CLKs hat keinen Einfluss auf das HIV-1 Spleißen.**

(A) Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die in den RT-PCRs verwendeten Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) HeLa-CD4+ Zellen wurden mit dem Leervektor pcDNA oder den Expressionsplasmiden der vier CLKs transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert und weitere 48 Stunden später wurde die RNA aufgereinigt. Es folgte die Umschreibung in cDNA und die Amplifizierung mittels der in (A) gekennzeichneten Primer #1544 und #640 oder #1544 und #3392. Die Produkte wurden mittels eines 10%igen PAA-Gels aufgetrennt und mit einer EtBr-Lösung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die jeweiligen HIV-1 Transkripte sind gekennzeichnet. (C) Die cDNA aus (B) wurde mit den gekennzeichneten Primern #5260 und #5261 des Plasmids pXHG5 amplifiziert und wie in (B) beschrieben weiter behandelt.

Insgesamt konnten mit Hilfe der Transkriptomdaten Beispiele für eine veränderte Genexpression nach HIV-1 Infektion aufgezeigt werden. Für die anschließende Aufklärung der molekularen Regulation kann jedoch offensichtlich nicht einfach aus technischen Gründen auf eine andere Zelllinie – auch wenn diese die gewünschten Voraussetzungen (sowohl mit HIV-1 infizierbar als auch mit Reporter-Plasmiden transfizierbar) erfüllt – zurückgegriffen werden, da die intrinsischen molekularen Gegebenheiten bereits stark voneinander abweichen können. Auch scheinen Ergebnisse aus Transfektionsversuchen mit der proviralen DNA nicht zwangsläufig auf eine Virusinfektion übertragbar zu sein.

### 3. Ergebnisse

#### **3.4 Die zelluläre NMD Aktivität verändert sich durch eine HIV-1 Infektion**

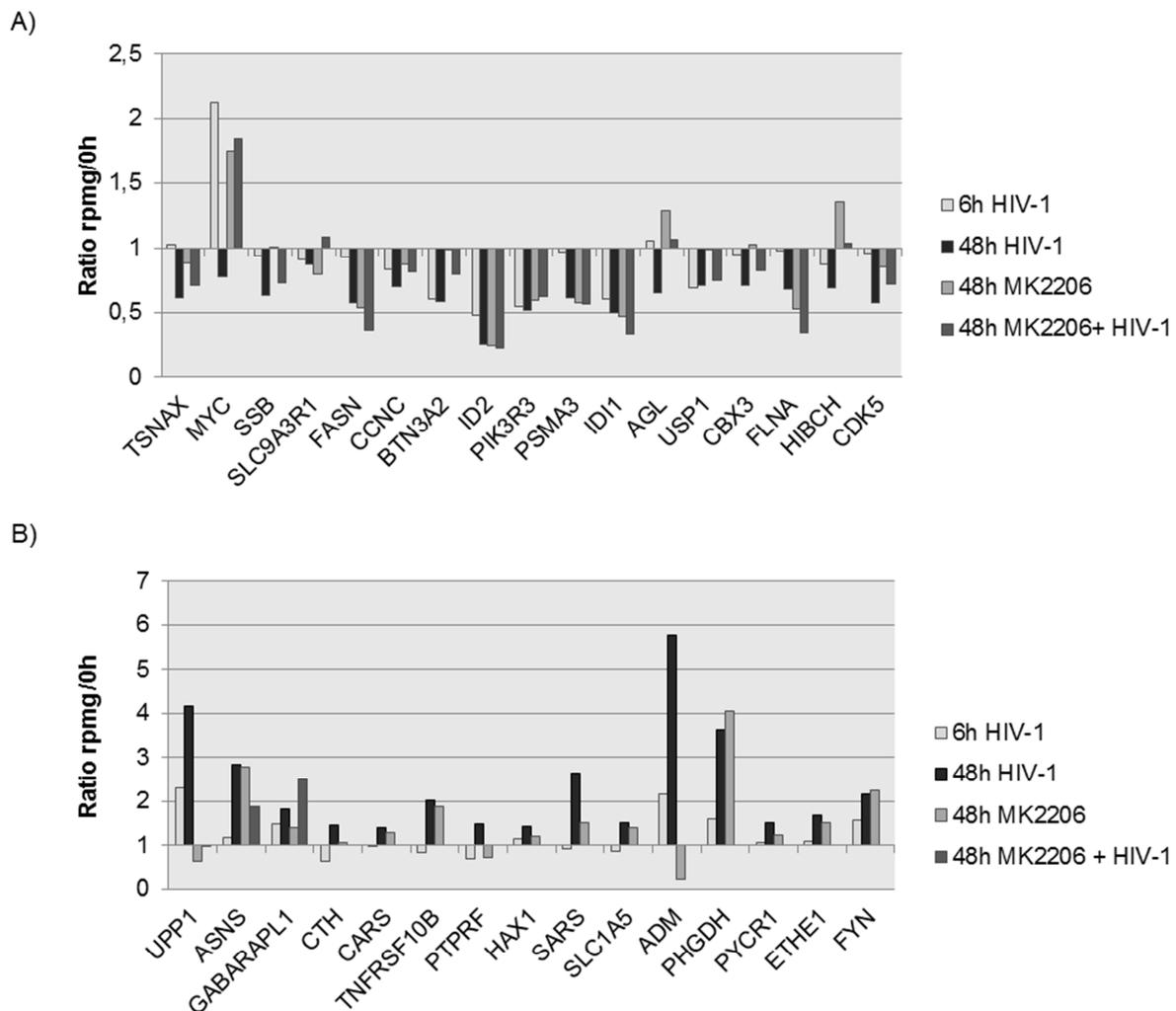
Sowohl für *SRSF3* als auch für *CLK1* konnte nach der HIV-1 Infektion eine erhöhte Abundanz der NMD-Transkriptisoformen detektiert werden. Dies kann entweder in einem veränderten alternativen Spleißen, das die Herstellung der NMD-sensitiven Transkriptvarianten begünstigt, oder in einer verminderten zellulären NMD Aktivität, die die NMD-sensitiven Transkripte akkumulieren lässt, begründet liegen. Da die Spleißregulation von beiden Genen in einem NMD-unabhängigen Reportersystem (ohne ORF) nicht nachgestellt werden konnte und daher vermutlich keine spleißregulatorischen Proteine für das veränderte Spleißmuster nach der HIV-1 Infektion verantwortlich waren, sollte nun überprüft werden, ob vielleicht generell die NMD Aktivität nach einer HIV-1 Infektion verändert war. Für das Retrovirus HTLV-1 konnte bereits gezeigt werden, dass es seine eigene RNA vor der Degradation schützt, in dem es die zelluläre NMD Aktivität herunterreguliert [208]. Im folgenden Abschnitt wurde mittels unterschiedlicher Methoden daher untersucht, ob auch eine HIV-1 Infektion die zelluläre NMD Aktivität beeinflussen kann.

##### **3.4.1 Nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition ist die Expression UPF1-abhängiger Gene verändert**

Derzeit existiert keine Datenbank mit NMD-sensitiven Transkripten. Um dennoch die gewonnenen Transkriptomdaten nach möglichst vielen NMD-abhängig regulierten Genen untersuchen zu können, wurden Gene ausgewählt, deren Expression sich durch eine *UPF1* siRNA Expression hatte verändern lassen [122]. Durch die Herunterregulierung des Upf1 Proteins sollten sich, wegen der hiermit verbundenen verringerten NMD-Aktivität, nämlich genau solche Transkriptisoformen anhäufen, die NMD-sensitiv sind. Für die Berechnung der Expression der ausgewählten Gene wurde jeweils der maximale rpmg-Wert der Proben ins Verhältnis zum Ausgangswert (0h HIV-1) gesetzt. Die 15 publizierten Gene, die nach *UPF1* Knockdown heruntergeliert waren, zeigten in den Transkriptomdaten alle, auch 48 Stunden nach HIV-1 Infektion, eine verringerte Expression, während die 17 Gene, die nach *UPF1* Knockdown hochreguliert waren, nach der Infektion auch verstärkt exprimiert waren (Abb. 3.21 A und B). Damit stehen die hier gewonnen Transkriptomdaten im Einklang mit den zuvor unabhängig hiervon erhobenen publizierten Befunden von Mendell und

### 3. Ergebnisse

Mitarbeitern [122]. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Mehrzahl der Gene auch 48 Stunden nach der Inhibition der Akt Kinase. Sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Akt Inhibition veränderten also gleichermaßen die Expression einer Gruppe von Genen, die UPF1-abhängig reguliert werden. Dies deutet darauf hin, dass die NMD-Aktivität tatsächlich durch die Infektion oder die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändert werden könnte. In den nächsten Abschnitten wird diese Hypothese experimentell untersucht.



**Abbildung 3.21 Gene, die nach *UPF1* Knockdown herunterreguliert sind, waren es auch nach Akt Inhibition und HIV-1 Infektion.**

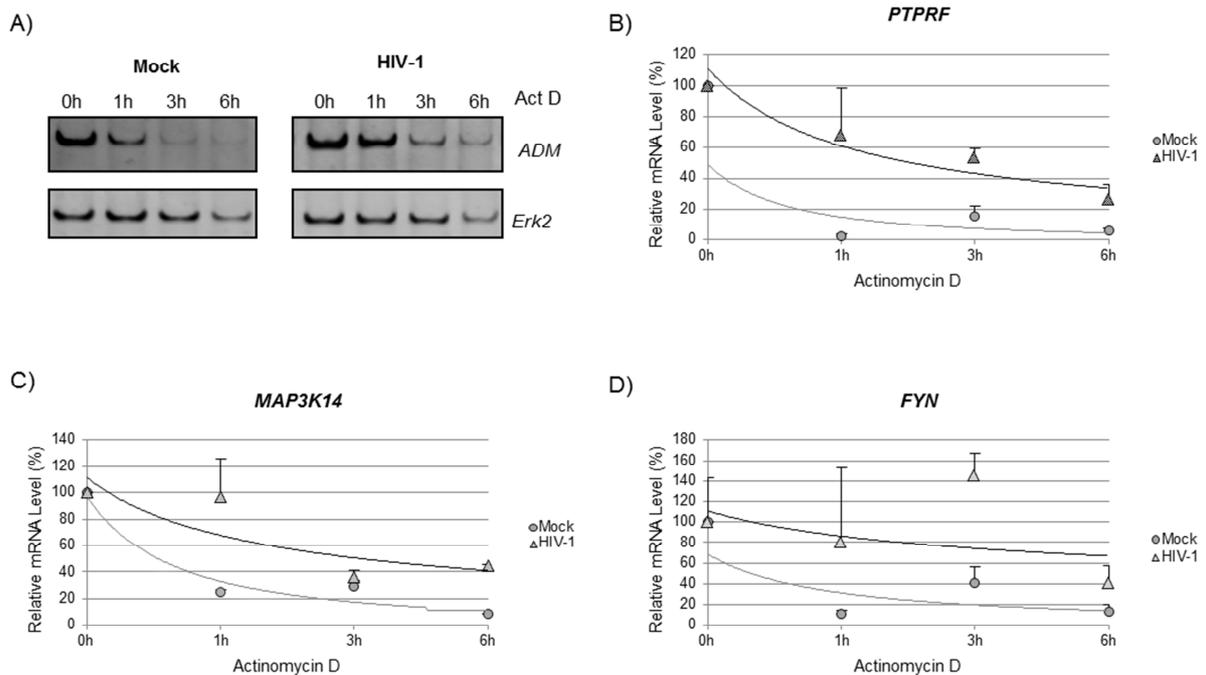
Aus den *RNA deep sequencing* Analysen genierten rpms publizierter Gene [122], die nach *UPF1* Knockdown herunter (A) oder hoch (B) reguliert werden, wurden für die jeweilige Kondition zum Ausgangswert ins Verhältnis gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### **3.4.2 Endogene NMD Substrate werden durch die HIV-1 Infektion stabilisiert**

Unter der Annahme, dass eine HIV-1 Infektion die zelluläre NMD Aktivität verändert, wurde die Stabilität von endogenen NMD Substraten nach einer Infektion experimentell bestimmt. Hierzu wurden HeLa-CD4+ Zellen, die nicht oder bereits für 48 Stunden mit HIV-1 infiziert waren, für 1, 3 oder 6 Stunden mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D inkubiert. Von den hier ausgewählten mRNAs war bereits gezeigt worden, dass sie NMD-sensitiv sind (*MAP3K14*, *PTPRF*) oder es war ihnen nachgesagt worden (*FYN*, *ADM*) [122, 208]. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die mit semi-quantitativer PCR erstellten Amplifikate wurden auf einem PAA-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 3.22 A). Die mRNAs von *Adm* sind in den HIV-1 infizierten Proben deutlich stärker und länger stabil, während das nicht NMD-sensitive Kontrollgen *Erk2* zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben keinen Unterschied zeigte (Abb. 3.22 A). Für die weiteren Gene wurden die mRNA Levels mittels qPCR quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte auch hier mit Hilfe von *Erk2*. Alle drei Gene zeigten bereits vor der Actinomycin D Behandlung eine etwas erhöhte Abundanz in HIV-1 infizierten Zellen. Die Graphen zeigen weiter, dass die NMD sensitiven mRNAs durch eine Infektion stabilisiert wurden und ihr Abbau mehr Zeit in Anspruch nahm (Abb. 3.22 B-C). Dies könnte durch eine HIV-1 induzierte Herunterregulierung der NMD Aktivität bedingt gewesen sein, was zu einer längeren Halbwertszeit der Transkripte führte.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.22 Eine HIV-1 Infektion stabilisiert endogene NMD-sensitive Transkripte.**

HeLa-CD4+ Zellen wurden für 48 Stunden mit HIV-1 infiziert und für 0, 1, 3 oder 6 Stunden mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D (Act D, 5 mg/ml) behandelt. Die RNA wurde aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. (A) Die cDNA wurde mittels der spezifischen Primer für Adm #5328 und #5329 amplifiziert, die Produkte auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und mit Hilfe einer EtBr-Lösung unter UV-Licht sichtbar gemacht. (B-D) Die cDNA wurde in Realtime PCR Assays mit HPLC-aufgereinigten Primern für *PTPRF* #5368 und #5369, für *MAP3K14* #5364 und #5365 und für *FYN* #5366 und #5367 eingesetzt, um die Mengen der mRNAs zu quantifizieren. Zur Normalisierung wurde das Primerpaar #4046 und #4047 verwendet, um die Menge von *Erk2* zu bestimmen. Die Detektion der Fluoreszenz wurde im LightCycler 1.5 (Roche) durchgeführt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

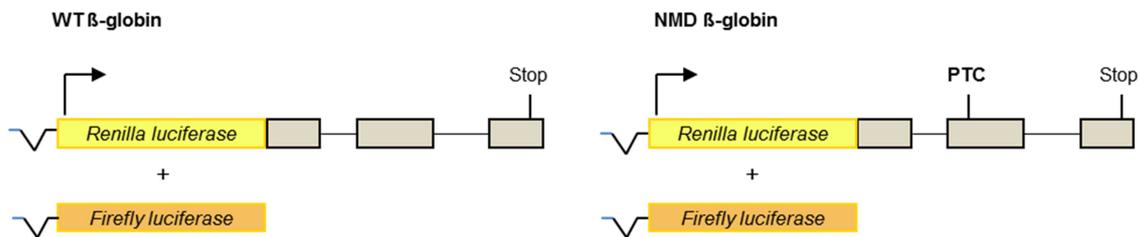
#### 3.4.3 Die NMD Aktivität verändert sich im Verlauf einer HIV-1 Infektion

Um die NMD Aktivität nach einer HIV-1 Infektion quantifizieren zu können, wurde ein NMD Reporter System verwendet, das auf einer *Nonsense-Mutation* im humanen  $\beta$ -Globin Transkript (NS39) basiert [337]. Dabei wurde das  $\beta$ -Globin Gen – mit oder ohne Mutation an Position 39 – an das 3'-Ende eines *Renilla Luciferase* ORFs fusioniert (Abb. 3.23 A). Die Co-Transfektion eines für die *Firefly Luciferase* codierenden Plasmids diente der Normalisierung. War die NMD Aktivität erhöht, so wurde mehr von dem NS39 Transkript abgebaut und weniger Lumineszenz konnte gemessen werden. Verringert sich jedoch die NMD Aktivität, so war eine stärkere Lumineszenz zu detektieren. Das *WT* Transkript wurde hingegen nicht von der NMD Aktivität beeinflusst, da es gegenüber der NMD Aktivität unempfindlich ist. Schließlich lässt sich mittels der Bestimmung des Verhältnisses von NS39 und WT  $\beta$ -Globin Lumineszenz die NMD Aktivität der Zellen bestimmen. HeLa-CD4+ Zellen wurden mit den Reporter Konstrukten transfiziert und 24 Stunden später für unterschiedliche

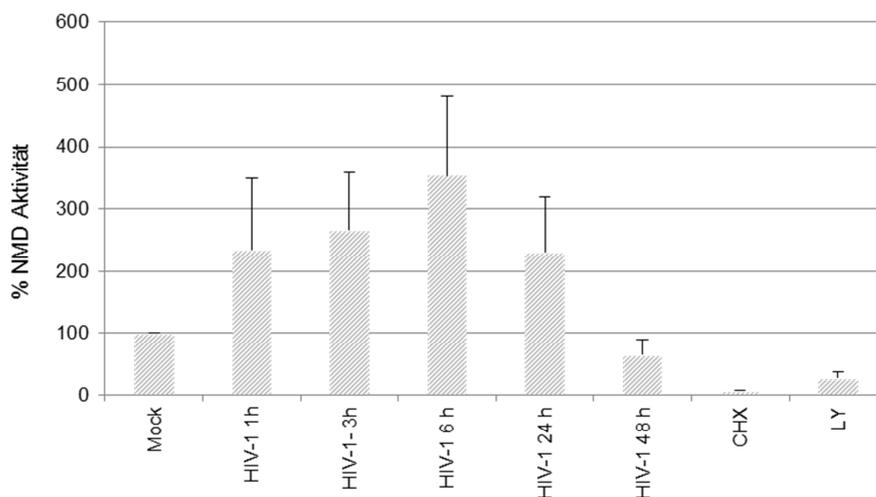
### 3. Ergebnisse

Zeiträume mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5), mit dem Translationsblocker CHX oder dem PI3K Inhibitor LY294002 behandelt.

A)



B)



**Abbildung 3.23 Die zelluläre NMD-Aktivität verändert sich während einer HIV-1 Infektion.**

(A) In dem Reporter ist das  $\beta$ -globin Gen hinter den ORF der Renilla Luciferase kloniert. Die NMD-Variante hat im Vergleich zur WT Variante ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC) im zweiten Exon. Ein Expressionsplasmid für die Firefly Luciferase wurde für die Normalisierung stets co-transfiziert. (B) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem WT oder dem NMD Konstrukt und dem Firefly Expressionsplasmid transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Infektion mit HIV-1 (MOI 0,5) für die angegebenen Zeiträume, die Behandlung mit Cycloheximid (CHX, 50 mg/ml) für 6 Stunden oder mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (LY, 50  $\mu$ M) für 24 Stunden. Die Proteine wurden lysiert, die Renilla und Firefly Aktivität im Luminometer bestimmt und die NMD Aktivität berechnet.

Die Proben wurden in Lysis-Puffer aufgenommen und die jeweilige Lumineszenz im Luminometer bestimmt. Interessanterweise war eine Stunde nach der Infektion ein mehr als 2facher Anstieg der NMD-Aktivität zu beobachten (Abb. 3.23 B). Dieser steigerte sich nach 6 Stunden sogar auf etwas mehr als das 3fache und fiel nach 24 Stunden wieder auf das 2fache zurück. 48 Stunden nach Infektion zeigte sich schließlich die erwartete Herunterregulation der NMD Aktivität auf etwa 60%. Die NMD Aktivität veränderte sich also im Laufe der Infektion: Einer starken Hochregulation folgte ein starker Abfall. Die Hemmung der Translation durch CHX

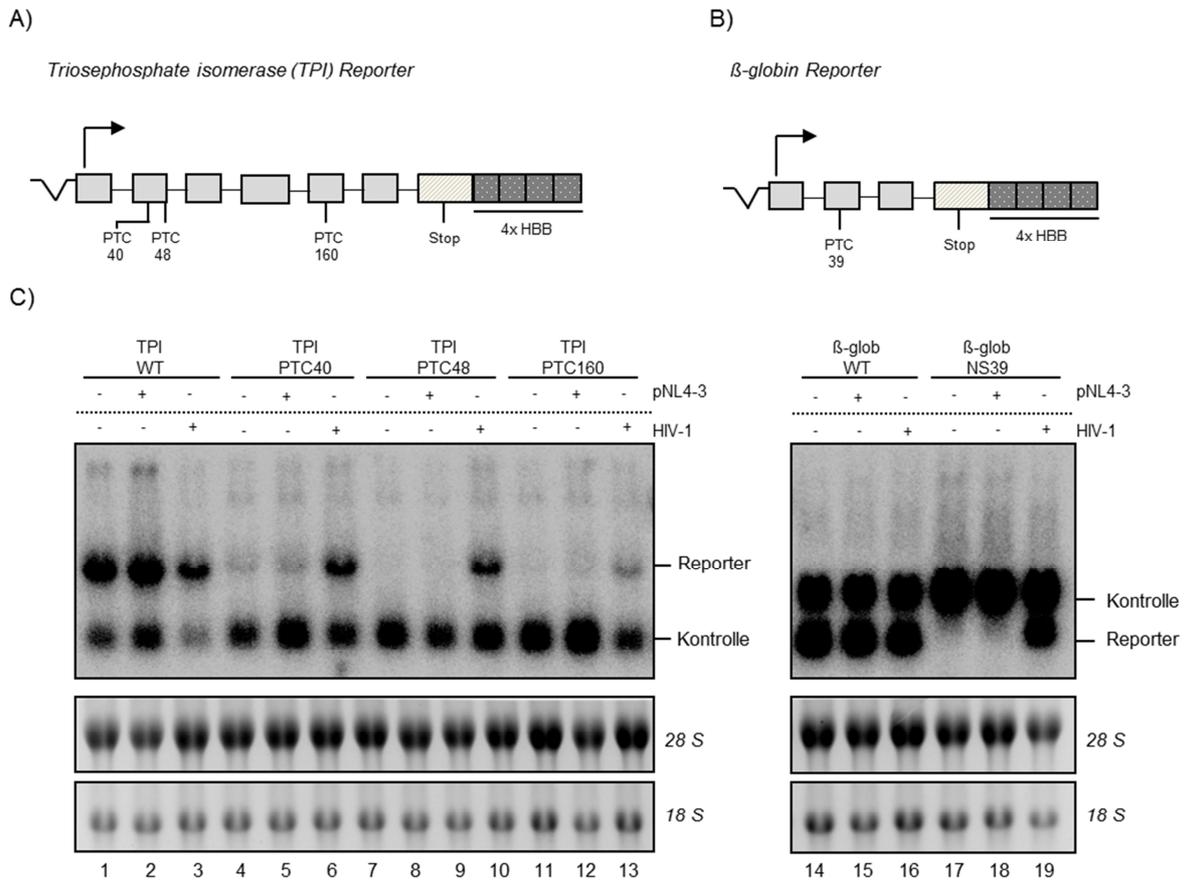
### 3. Ergebnisse

führte wie erwartet zu einem drastischen Rückgang von unter 10%, während auch der PI3K Inhibitor zu einer Aktivität von nur noch etwa 30% führte (Abb. 3.23 B).

#### **3.4.4 Die NMD Aktivität wird 48 Stunden selektiv nach einer HIV-1 Infektion, nicht aber durch die Transfektion der Zellen mit proviraler DNA, verringert**

Um die NMD Aktivität auch auf mRNA-Ebene nachvollziehen zu können, wurde ein weiteres Reportsystem verwendet. Es wurden vier Reporter verwendet, die auf dem *Triosephosphat Isomerase (TPI)* Gen basieren: die WT Sequenz und drei Varianten, die an unterschiedlichen Stellen ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC) enthalten (Position 40, 48 oder 160) (Abb. 3.24 A) (Gehring). Des Weiteren wurden zwei Reporter verwendet, die auf dem  *$\beta$ -Globin* Gen basieren: die WT Variante und die Variante mit einem PTC an Position 39 (Abb. 3.24 B). HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen entweder mit der proviralen DNA transfiziert, mit HIV-1 infiziert oder nicht behandelt. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Aufreinigung der RNA, die auf einem formaldehydhaltigen Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt wurde. Die Detektion der Reporter mRNA erfolgte mittels einer spezifischen Sonde, die gegen das 3'-Ende aller Reporter hybridisierte. Als Kontrolle diente bei den *Tpi* Reportern das *WT  $\beta$ -Globin* Konstrukt und bei den  *$\beta$ -globin* Konstrukten eine modifizierte Version des *WT  $\beta$ -Globin* Konstrukts mit 300 zusätzlichen Basen. Die *WT* Varianten beider Konstrukte unterschieden sich nach Infektion oder Transfektion nicht (Abb. 3.24 C, Spur 1-3 und 14-16). Die NMD-sensitiven mRNAs aller vier PTC Reporter zeigten hingegen eine starke Akkumulation nach der HIV-1 Infektion, nicht aber nach der Transfektion der proviralen DNA. Das  *$\beta$ -Globin* Konstrukt zeigte dabei den stärksten und das *Tpi* PTC 160 Konstrukt den schwächsten Phänotyp (Abb. 3.24 C, Spur 17-19 und 11-13). Die Herunterregulierung der NMD Aktivität war also spezifisch auf die Infektion zurückzuführen. Die Expression aller viralen Proteine, die auch nach der Transfektion der Zellen mit proviraler DNA gebildet wurden, vermag nicht die NMD Aktivität zu inhibieren.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.24 Eine HIV-1 Infektion, nicht aber eine Transfektion mit pNL4-3, verringert die zelluläre NMD Aktivität.**

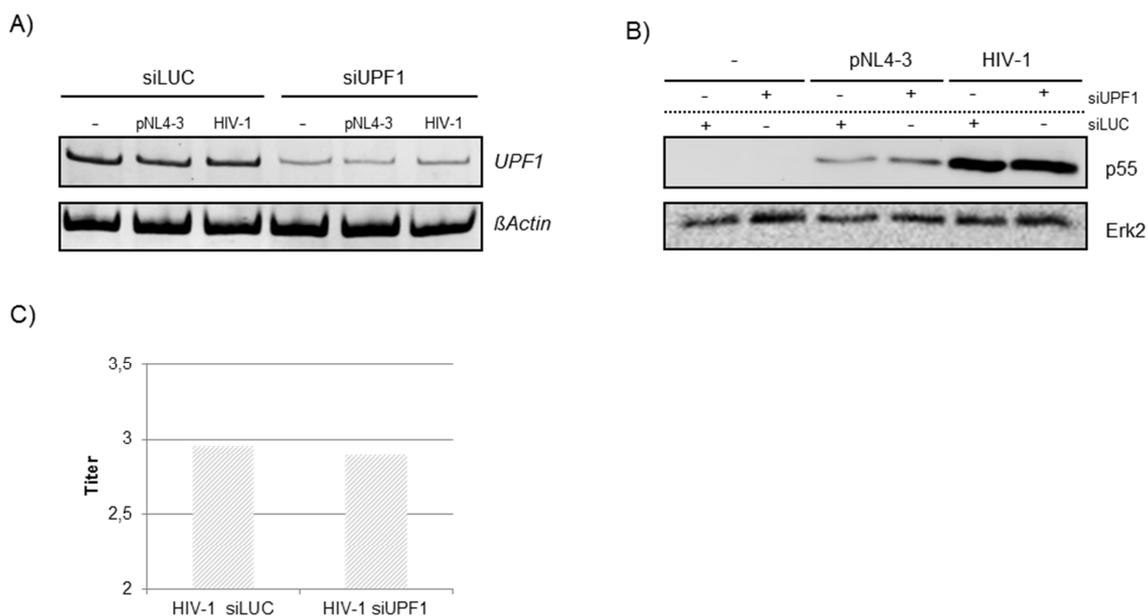
(A) Die Triosephosphate isomerase (TPI) Reporter haben an der Position 40, 48 oder 160 ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC). (B) Der  $\beta$ -Globin Reporter hat ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC) an Position 39. Die WT-Varianten haben jeweils kein PTC. Am 3'-Ende ist jeweils in vierfacher Ausführung die Bindesequenz für die Sonde. (C) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit den entsprechenden Reportern und der jeweiligen Kontrolle transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Infektion mit HIV-1 (MOI 0,5) oder die Transfektion mit pNL4-3. Nach 48 Stunden wurde die RNA isoliert, mittels eines 1% Agarose-Gels aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis erfolgte mittels einer spezifischen Sonde. Der Detektion der ribosomalen RNAs diente als Ladekontrolle. Der Northern Blot wurde in Kooperation mit Volker Böhm, Institut für Genetik in Köln, durchgeführt.

#### 3.4.5 Das zelluläre UPF1 Level hatte keinen Einfluss auf die Virus Replikation

Da die zelluläre NMD Aktivität durch die HIV-1 Infektion beeinflusst wurde, sollte nun überprüft werden, ob eine Verringerung des zentralen NMD Faktors UPF1 die HIV-Replikation beeinflussen kann. Dafür wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit der proviralen DNA transfiziert oder dem HI-Virus infiziert. 8 Stunden später wurden die Zellen mit einer siRNA gegen *UPF1* (siUPF1) oder gegen die in dieser Zelle nicht exprimierte *Luciferase* (siLUC) mRNA transfiziert. 40 Stunden später wurden die Proteine und die RNA aufgereinigt. Die erfolgreiche Herunterregulierung der *Upf1* mRNA wurde mittels RT-PCR bestätigt, während siLUC erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die *UPF1* Expression hatte (Ab. 3.25 A).

### 3. Ergebnisse

Die viralen Proteine wurden mittels Western-Blot detektiert. Eine verringerte *Upf1* Expression führte bei der Transfektion der proviralen DNA zu keiner veränderten p55 Produktion (Abb. 3.25 B). Bei der Infektion mit HIV-1 zeigte die *UPF1* siRNA, wenn überhaupt, eher einen negativen Einfluss auf die p55 Produktion (Abb. 3.25 B). Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Infektiosität der neu gebildeten viralen Partikel nach *UPF1* Herunterregulation betrachtet. Dafür wurden TZM-bl Zellen mit dem erhaltenen Überstand infiziert und ein X-Gal Assay, wie in 3.1.2 beschrieben, durchgeführt. Es konnte, wenn überhaupt, lediglich ein sehr schwacher Einfluss auf die Virus Replikation ausgemacht werden (Abb. 3.25 C).



**Abbildung 3.25 Eine Herunterregulation von *UPF1* scheint keinen Einfluss auf die HIV-1 Replikation auszuüben.**

HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert oder mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. 8 Stunden später wurden die Zellen mit einer siRNA gegen *UPF1* (siUPF1) oder gegen das nicht exprimierte *Luciferase* Gen (siLUC) transfiziert. Nach 44 Stunden wurden die RNA, die Proteine sowie der Überstand geerntet. (A) Die RNA wurde mit den Primern #5427 und #5428 (*Upf1*) und #3392 und #3394 (*beta-actin*) RT-PCR Analysen unterzogen. Die Amplifikate wurde mittels eines 10%igen PAA-Gels aufgetrennt und durch EtBr-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. (B) Die Proteine wurde mit Hilfe eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und p55 mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von Erk2 diente als Ladekontrolle. (C) TZM-bl Zellen wurden für 48 Stunden mit dem infektiösen Überstand inkubiert. Der Nachweis der Infektiosität erfolgte mittels eines X-Gal-Assays und der Titerbestimmung mittels TCID<sub>50</sub>.

Ajamian et al. haben 2008 gezeigt, dass UPF1 in HIV-1 RNPs co-lokalisiert und unabhängig von seiner NMD Funktion für die HIV-1 Replikation wichtig ist [338]. Die siRNA Behandlung führte nicht – wie erwartet – zu einer gesteigerten viralen Replikation. Grund hierfür könnte die von Ajamian et al. gezeigte Rolle von Upf1 während der HIV-1 Replikation unabhängig von seiner NMD Funktion sein.

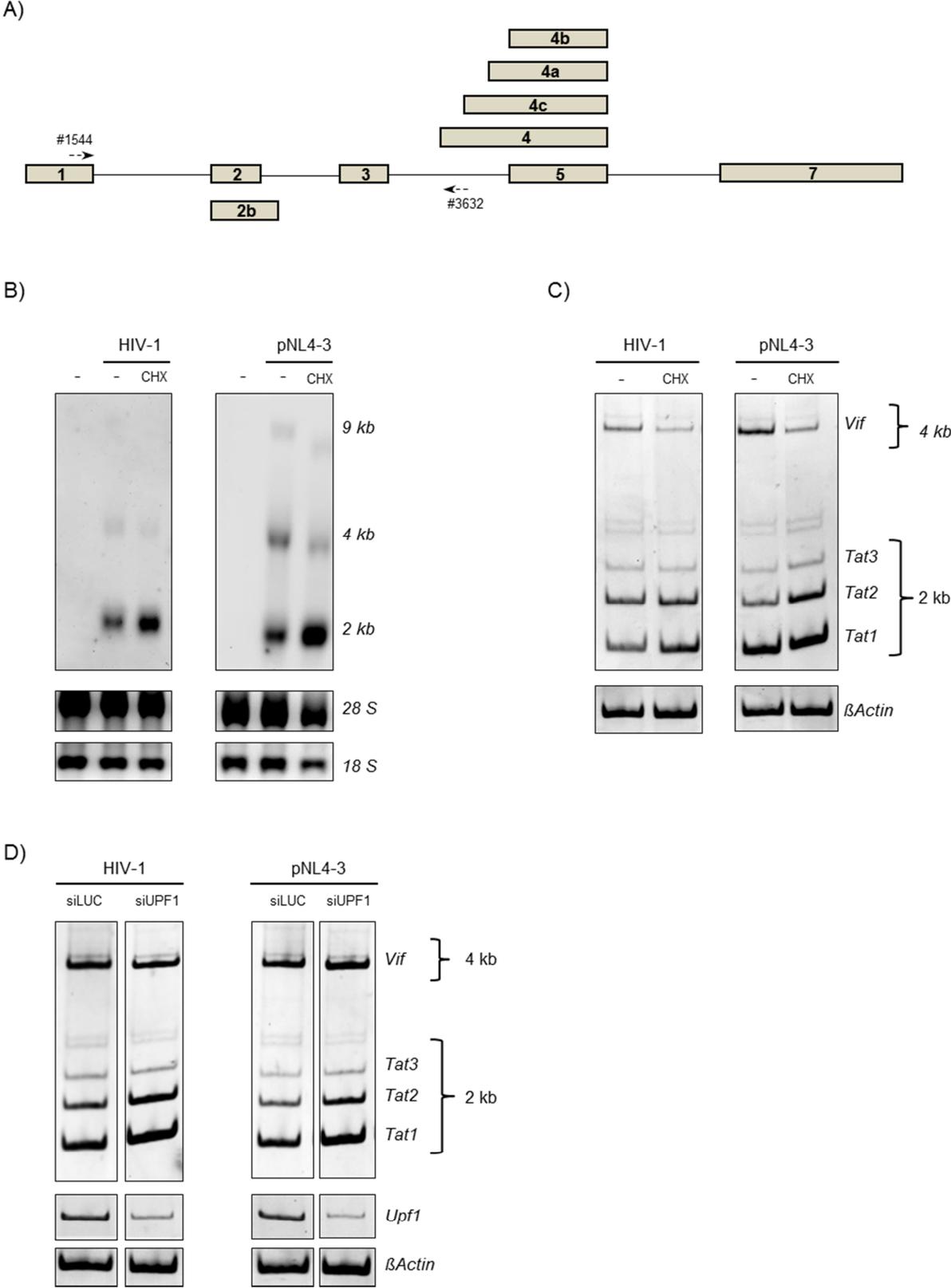
### 3. Ergebnisse

#### **3.4.6 Einzelne HIV-1 Transkripte sind NMD-sensitiv**

Wird NMD als ein zellulärer Abwehrmechanismus betrachtet [204, 210], ließe sich die anfängliche Hochregulation der NMD Aktivität als Zellantwort auf die Infektion verstehen (Abb. 3.23). Im weiteren Verlauf der Infektion könnte die NMD Aktivität schließlich durch virale Mechanismen herabgesetzt werden. Wenn dies der Fall wäre, ist davon auszugehen, dass sich eine Herunterregulation der NMD Aktivität positiv auf die HIV-1 Virusreplikation auswirken würde; insbesondere dann, wenn zudem viruseigene mRNAs NMD sensitiv wären. Um diese Hypothese zu testen, wurden HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen mit HIV-1 infiziert oder der proviralen DNA transfiziert. Nach 42 Stunden wurde der Translationsblocker Cycloheximid hinzugegeben und weitere 6 Stunden inkubiert. Die RNA wurde isoliert und die drei viralen mRNA Klassen im Northern Blot dargestellt (Abb. 3.26 B). Sowohl die infizierten als auch die transfizierten Proben zeigten nach CHX Behandlung eine deutliche Akkumulation der 2 kb Klasse (Abb. 3.26 B). Interessanterweise war der Effekt in den transfizierten Zellen noch stärker, was vermutlich damit zusammenhängt, dass hier – anders als in den infizierten Zellen – die NMD Aktivität nicht bereits schon herunterreguliert war (Abb. 3.24). Da Transkripte aus der 2 kb Klasse betroffen waren, wurden diese nach erfolgter cDNA Synthese mittels spezifischer Primer in RT-PCR Analysen näher untersucht. Es zeigte sich, dass spezifisch die Tat Transkripte nach CHX Behandlung akkumulierten (Abb. 3.26 C), ein starker Hinweis darauf, dass diese NMD sensitiv sind. Die *Vif* Transkripte nahmen hingegen ab, ein häufiges Bild nicht-NMD-sensitiver Transkripte nach CHX Behandlung. Um diese Beobachtung unabhängig von CHX zu wiederholen, wurden Zellen wie in Abbildung 3.23 beschrieben mit einer siRNA gegen *UPF1* transfiziert. Auch hier zeigten die RT-PCRs, dass die Menge an Tat Transkripten nach Schwächung der NMD Maschinerie akkumulierte (Abb. 3.26 D). Hier war ebenfalls der Unterschied in transfizierten Zellen stärker als in den infizierten. Außerdem war in Abwesenheit von CHX, wie erwartet, keine Reduktion der *Vif* Transkripte nachweisbar.

Die Protektion der Tat Transkripte vor der Degradation durch NMD könnte also eine Erklärung für die verringerte NMD Aktivität in HIV-1 infizierten Zellen darstellen.

### 3. Ergebnisse



### 3. Ergebnisse

#### **Abbildung 3.26 HIV-1 Tat Transkripte sind NMD-sensitiv.**

(A) Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die in den RT-PCR Analysen verwendeten Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit HIV-1 infiziert oder der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert. Nach 42 Stunden wurden die Zellen mit dem Translationsblocker Cycloheximid (50 mg/ml) behandelt und 6 Stunden später die RNA isoliert. Sie wurde mittels eines 1%igen formaldehydhaltigen Agarose-Gels aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis der HIV-1 spezifischen RNA Klassen erfolgte mittels einer HIV-1 Exon7 bindenden Digoxigenin gekoppelten RNA Sonde. Die jeweiligen HIV-1 RNA Klassen sind gekennzeichnet. Der Detektion der ribosomalen RNAs diente als Ladekontrolle. (C) Die Probenbehandlung erfolgte wie in (B). Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, mittels der HIV-1 spezifischen Primer #1544 und #3632 amplifiziert und die Produkte auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer EtBr-Färbung unter UV-Licht. Die Amplifizierung von  $\beta$ -Actin mit den Primern #3392 und #3394 als Ladekontrolle. (D) HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit der proviralen DNA pNL4-3 transfiziert oder mit HIV-1 (MOI 0,5) infiziert. 8 Stunden später wurden die Zellen mit einer siRNA gegen UPF1 (siUPF1) oder gegen das nicht exprimierte Luciferase Gen (siLUC) transfiziert. Nach 44 Stunden wurden die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und wie in (C) beschrieben, weiter behandelt. *UPF1* wurde mittels der Primer #5427 und #5428 als Kontrolle für die erfolgte Herunterregulation amplifiziert.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse eine Wechselwirkung zwischen dem PI3K/Akt Signalweg und einer HIV-1 Infektion. Außerdem führten sowohl die Inhibition des Signalwegs als auch die HIV-1 Infektion zu Veränderungen der SR Protein Phosphorylierung sowie der Genexpression von *SRSF1* und *SRSF3*. Neben der veränderten Expression der Transkriptionsfaktoren *FOS*, *FOSB* und *TP53*, konnte außerdem gezeigt werden, dass die zelluläre NMD Aktivität nach einer Infektion herunterreguliert war.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Phosphorylierung der Akt Kinase wird im Verlauf einer HIV-1 Infektion verändert

Der PI3K/Akt Signalweg – einer der zentralen eukaryotischen Signaltransduktionskaskaden – wurde bereits mit zahlreichen viralen Interaktionspartnern in Verbindung gebracht. Durch die Aktivierung dieses Signalwegs scheint die Mehrzahl der Viren vor allem von dem erleichterten Eintritt in die Zelle und deren verlängertem Überleben zu profitieren [278]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine HIV-1 Infektion diesen Signalweg reguliert. Der in dieser Arbeit verwendete Virusstamm pNL4-3 ist T-trop, verwendet also neben CD4 den Chemokinrezeptor CXCR4 als Co-Rezeptor [339].

Als eine der frühesten Antworten auf die Infektion von PM1 Zellen mit HIV-1 ließ sich eine gesteigerte Phosphorylierung der Akt Kinase nachweisen (Abb. 3.3). Diese sehr schnelle Antwort auf das Virus macht eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung wahrscheinlich. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen, nach denen bereits lösliches HIV-1 gp120 den PI3K/Akt Signalweg über beide Co-Rezeptoren (CCR5 und CXCR4) stimulieren konnte [340, 341]. Dies scheint offenbar auch der Fall zu sein, wenn nicht nur lösliches gp120, sondern virusgebunden an die Zelle bindet. Wie diese Aktivierung mechanistisch abläuft, ist bisher jedoch nicht geklärt. Denkbar wäre, ähnlich wie bei der Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Infektion, dass die Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs mit Veränderungen im zellulären Cytoskelett und damit der Aktivierung des Rho-GTPase Signalwegs zusammenhängt [287]. Ein *Crosstalk* der beiden Signalwege, auch bei der HIV-1 Infektion, scheint insofern möglich [342], da auch Interaktionen von gp120 mit CD4 und CXCR4 zu Veränderungen des Cytoskeletts und zur Aktivierung des Rho-GTPase Signalwegs führen [343-345].

Im weiteren Verlauf der HIV-1 Infektion liegt die Akt Kinase schließlich dephosphoryliert vor (Abb. 3.3). Nach Stimulation der Akt Kinase durch Wachstumsfaktoren bleibt die Phosphorylierung der Kinase nicht beständig [346] und der Knockdown der Protein Phosphatase PHLPP erhöht das Phosphorylierungsniveau der Kinase enorm [347]. Die Phosphatasen der Akt Kinase

#### 4. Diskussion

scheinen demzufolge permanent aktiv zu sein und für eine andauernde Aktivierung benötigt es einen andauernden Stimulus. Die beobachtete Dephosphorylierung kann also das Resultat einer ausbleibenden Stimulation oder einer Unterbrechung deren Signalweitergabe sein. Möglicherweise verhindert also ein weiterer Regulationsmechanismus während der Infektion die fortlaufende Aktivierung des Signalwegs. Ein möglicher Kandidat für diese Inhibierung ist Nef, von dem bereits gezeigt wurde, dass es die durch den „*Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor*“ vermittelte Signaltransduktion empfindlich stören kann, indem es die Assoziierung von PI3K mit dem PDGF Rezeptor verhindert [313]. Dies erscheint auch vom zeitlichen Ablauf äußerst plausibel, da Nef in die Virus Partikel inkorporiert wird und demzufolge nach dem Eintritt des Virus in die Zelle bereits vorhanden ist und die Inhibierung regulieren könnte [348].

Interessant ist zudem, dass die HIV-1 Replikation durch die Vorbehandlung mit dem Akt-spezifischen Inhibitor MK2206 erheblich vermindert werden konnte (Abb. 3.2 A). Das Virus scheint demzufolge – zumindest für bestimmte Abläufe innerhalb des Replikationszyklus – von der Aktivität der Kinase abhängig zu sein. Dabei stört dessen Inhibition einen Schritt im viralen Replikationszyklus, der der Integration der viralen DNA in das Wirts-Genom nachgeschaltet ist (Abb. 3.2 B). Es muss also davon ausgegangen werden, dass die anfängliche Phosphorylierung der Kinase auch Prozesse zu einem späteren Zeitpunkt im viralen Replikationszyklus reguliert. Da wir bereits zeigen konnten, dass das virale Spleißmuster durch die Aktivität der PI3K verändert werden kann [295], wäre dies ein möglicher Erklärungsansatz. Vorstellbar wäre, dass die anfängliche Phosphorylierung der SR Proteine durch den PI3K/Akt Signalweg bedingt ist (Abb. 3.4) [83-85]. Dadurch könnte es zu alternativen Spleißereignissen kommen, die für die virale Replikation notwendig sind. Für das Masern Virus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das virale Attachment den PI3K/Akt Signalweg inhibiert und mittels alternativen Spleißens dadurch eine Isoform einer Lipid Phosphatase entsteht, die die Immunantwort auf das Virus unterdrücken kann [292]. Signaltransduktion und die dadurch erzeugten Effekte können also zwei zeitlich voneinander entkoppelte Prozesse sein.

Im weiteren Verlauf der Infektion wird die Phosphorylierung der SR Proteine SRSF6, SRSF5, SRSF1/SRSF2/SRSF7 und SRSF3 schließlich verringert. Dies ist ebenfalls nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs zu beobachten, wobei die Akt Kinase zumindest für die Phosphorylierung von SRSF5 und SRSF6 verantwortlich zu sein

#### 4. Diskussion

scheint (Abb. 3.4 A). Da zu diesem Zeitpunkt der Infektion die Akt Kinase selbst auch nicht phosphoryliert ist, wäre für SRSF5 und SRSF6 eine Akt-abhängige Regulation denkbar. Für SRSF5 wurde bereits nach Insulinstimulation eine Akt-abhängige Phosphorylierung beschrieben, die schließlich zu einem veränderten Spleißen der PKC $\beta$  II mRNA in Skelettmuskelzellen führte [84, 318]. Interessanterweise wurden sowohl SRSF5 als auch SRSF6 bereits mit dem alternativen Spleißen der HIV-1 mRNAs in Verbindung gebracht. Dabei bindet SRSF5 an ein ESE im Exon 5 und fördert so das Spleißen der *Env*, *Vpu*, *Rev*, and *Nef* Transkripte [349]. Ferner verstärkt SRSF6 die Nutzung des Spleißakzeptors A3 und ist somit in der frühen Phase der Infektion für die Generierung der *Tat* Messages wichtig [235]. Außerdem konnte ein fördernder Einfluss von SRSF5 und SRSF6 auf die Translation ungespleißter HIV-1 mRNAs aufgedeckt werden [261]. Dass SR Proteine für ihre Funktion als spleißregulatorische Proteine phosphoryliert sein müssen, ist bekannt. In welchem Phosphorylierungszustand SRSF5 und SRSF6 allerdings für die Förderung der Translation ungespleißter mRNAs sein müssen, hingegen nicht. Es wäre daher denkbar, dass die Dephosphorylierung im Verlauf der Infektion zur einer Änderung der Funktion der beiden SR Proteinen innerhalb des viralen Replikationszyklus führt. Da die durchschnittliche Generationszeit einer viralen Generation etwa 52 Stunden beträgt [324], erscheint es plausibel, dass 48 Stunden nach Infektion die Translation ungespleißter mRNA gefördert würde, während zuvor das Spleißen begünstigt war. Die Aktivität der Akt Kinase könnte also für verschiedene Prozesse im viralen Replikationszyklus von Bedeutung sein, wenngleich es für die mechanistische Aufklärung noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Interessant ist zudem, dass die Überexpression der Akt Kinase im Fall einer pNL4-3 Transfektion zu einem kompletten Ausbleiben der viralen Replikation, jedoch nicht – wie die Inhibition – zu Veränderungen im viralen Spleißmuster, führte [350]. Ein ausbalanciertes und vermutlich zeitlich abgestimmtes Niveau der Akt Phosphorylierung scheint also für die Replikation notwendig und die Aktivierung/Inaktivierung kann dabei verschiedene zelluläre und somit auch virale Prozesse beeinflussen.

Die Akt Kinase stellt daher ein mögliches Ziel antiviraler Therapie dar. Die virale Replikation kann dabei nicht nur in T-Zellen (Abb. 3.2), sondern auch in Makrophagen, Zellen, die für HIV-1 häufig ein Langzeitreservoir darstellen, durch die

## 4. Diskussion

Inhibition der Akt Kinase unterbunden werden [351]. Dass Inhibitoren der Kinase auch tatsächlich für therapeutische Zwecke verwendet werden können, belegen präklinische Studien mit verschiedenen Akt Inhibitoren für die Behandlung unterschiedlicher Krebsarten [352].

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten mehrere Veränderungen der Genexpression sowohl nach HIV-1 Infektion als auch nach PI3K/Akt Inhibition beobachtet werden. Die möglichen Zusammenhänge werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### **4.2 Die komplexe Genregulation von *SRSF1* kann durch eine HIV-1 Infektion sowie den PI3K/Akt Signalweg moduliert werden**

SRSF1 ist ein überaus vielseitiges SR Protein. Neben der Beteiligung am alternativen Spleißen ist es sowohl am TAP/NFX1-abhängigen mRNA Export [74, 353], an der mTOR-abhängigen Translation [58, 60], der Prozessierung von microRNAs [354] und der Stabilität des Genoms durch Assoziierung mit Chromatin beteiligt [355]. Die Genregulation von *SRSF1* selbst ist dabei äußerst komplex und umfasst mehrere Regulationsebenen [200].

Dem in der vorliegenden Arbeit betrachteten Spleißereignis kommt dabei eine nicht unerhebliche, wenn auch bisher nicht eindeutig aufgeklärte, Funktion zu [200, 321]. Die Bedeutung wird zudem dadurch untermalt, dass – obwohl das Spleißereignis in der untranslatierten 3'-Region stattfindet – die Sequenzen in dieser Region zwischen Mensch und Maus hochkonserviert sind [197].

Sowohl nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs als auch nach der Infektion mit HIV-1 entstanden deutlich mehr Transkripte, in denen das Intron im 3'UTR heraus gespleißt war (Abb. 3.6). Eine Stunde nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und zwischen 6 und 24 Stunden nach der HIV-1 Infektion war dieser Wechsel bereits deutlich zu erkennen. Da die Akt Kinase zu diesem Zeitpunkt der Infektion ebenfalls dephosphoryliert vorliegt, ist es möglich, dass die HIV-1 abhängige Veränderung durch die Inhibition des Signalwegs reguliert wird (Abb. 3.3).

Die Nutzung des Spleißdonors im *SRSF1* 3'UTR kann durch einen intronischen SRSF3-abhängigen Silencer unterdrückt werden und eine Herunterregulation von SRSF3 begünstigt die Spleißstellennutzung [356]. Auch nach Inhibition des Signalwegs und HIV-1 Infektion war eine verringerte *Srfs3* Expression zu beobachten (Abb. 3.11). SRSF3 könnte also der regulierende Faktor sein, dessen Abwesenheit

#### 4. Diskussion

das Spleißen im *SRSF1* 3'UTR begünstigt. Eine Überexpression mit SRSF3 bei gleichzeitiger Infektion mit HIV-1 könnte in Zukunft Auskunft darüber geben.

Wie bereits erwähnt, sind für die *SRSF1* 3'UTR $\Delta$ Int Variante verschiedene Funktionen publiziert. Dass sie dem NMD zugeführt wird [197], konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Sollte es sich um eine stabilere Variante handeln, wie Akaike et al. es vorschlagen [321], könnte dies erklären, warum die SRSF1 Proteinmenge, zu der beide Transkriptvarianten gleichermaßen beitragen können, nicht abnahm, obwohl weniger von dem *WT* Transkript gespleißt wurde (Abb. 3.6 und 3.7). Möglich ist auch, dass die *SRSF1* 3'UTR $\Delta$ Int Variante, worauf die Daten einer weiteren Gruppe hindeuten, im Kern zurückgehalten wird und somit nicht als Matrize für die Translation zur Verfügung steht [200]. Ob sie dann im Kern als regulatorische mRNA fungieren könnte, bleibt offen.

Auffallend war, neben dem veränderten Spleißen im nicht-codierenden 3'UTR Bereich, das Auftauchen einer zweiten, kleineren Proteinisoform von SRSF1 nach Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und der Infektion mit HIV-1 (Abb. 3.7.A und B). Grundsätzlich gibt es für eine solche zusätzliche Isoform mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Dass es sich um eine dephosphorylierte Isoform handelt, konnte mittels einer Phosphatase-Behandlung ausgeschlossen werden (Abb. 3.7.C). Auch die Möglichkeit, dass es sich um eine Isoform eines alternativ gespleißten Transkriptes handelt, wurde durch die Transkriptomdaten nicht unterstützt. Zwar konnte die Nutzung eines alternativen Promotors durch die vorliegenden Daten nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden, jedoch erkennt der verwendete Antikörper von SRSF1 ein N-terminales Epitop und würde daher vermutlich eine solche daraus resultierende N-terminal verkürzte Proteinisoform nicht detektieren. Die Tatsache, dass die Entstehung dieser weiteren Isoform PI3K- und HIV-1- jedoch nicht Akt-abhängig war (Abb. 3.7.C), lässt darüber hinaus vermuten, dass die beobachtete Akt Phosphorylierung während der HIV-1 Infektion über PI3K läuft. Weitere Effektoren der PI3K müssten folglich für die Entstehung dieser Variante verantwortlich sein. Da hinsichtlich dieser Proteinisoformen in der Literatur bisher keinerlei Informationen vorliegen, ist für weitere Erklärungen die Bestimmung der Identität der Isoform durch massenspektrometrische Analysen abzuwarten.

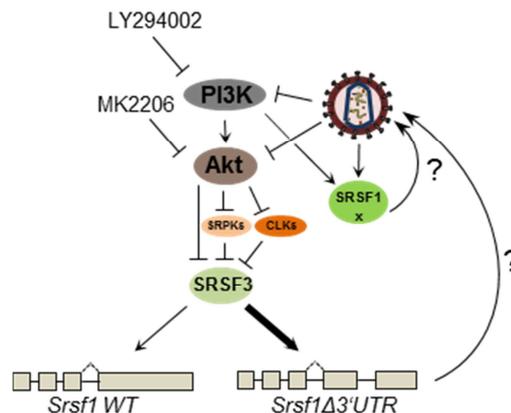
#### 4. Diskussion

Für SRSF1 wurde bereits eine Beteiligung an der Regulation der HIV-1 Transkription nachgewiesen. Diese wird durch die Tat-vermittelte Rekrutierung von P-TEFb verstärkt, wodurch die C-terminale Domäne von Pol II phosphoryliert und somit die Prozessivität der Transkription gefördert wird [231]. SRSF1 kann überlappende Sequenzen des Tat Bindungsmotivs TAR binden und die Transkription solange unterstützen, bis ausreichend Tat Protein synthetisiert ist [263]. Zuviel SRSF1 inhibiert hingegen die HIV-1 Replikation, da Tat dann vom TAR Element verdrängt wird [357]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein negativer Effekt einer SRSF1 Überexpression auf die HIV-1 Replikation nach Transfektion oder Infektion ausgemacht werden. Mögliche Ursachen für diese unterschiedlichen Resultate könnten zum einen die unterschiedlichen betrachteten Zeitpunkte nach der HIV-1 Infektion bzw. Transfektion sein: Paz et al. haben die Zellen zunächst infiziert, 96 Stunden später mit einem SRSF1-EGFP Plasmid transfiziert und anschließend nach unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 24 und 96 Stunden den viralen Überstand geerntet und die Infektiösität bestimmt. Das bedeutet, dass in allen Fällen die Infektion mindestens 120 Stunden andauerte. Zum anderen wurde die Infektion mit einer MOI von etwa 100 und nicht wie in dieser Arbeit von 0,5 durchgeführt. Es ist also davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt mit dieser MOI bereits alle Zellen infiziert waren. Möglicherweise war das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Zeitfenster daher noch zu früh gewählt, um die inhibitorische Wirkung von SRSF1 zu beobachten. Zu dem hier betrachteten Zeitpunkt sind bei einer MOI von 0,5 vermutlich noch nicht alle Zellen synchron infiziert, sodass einige Zellen sich noch in der frühen Phase der Infektion befinden und eine erhöhte SRSF1 Menge sich noch positiv auswirken und Tat ersetzen könnte. Bei bereits fortschreitender Infektion hat eine höhere SRSF1 Menge hingegen einen dominant negativen Einfluss und SRSF1 verdrängt Tat vom TAR Element. Folglich würde die Überexpression zu diesem Zeitpunkt noch keinen negativen Einfluss auf die gesamte HIV-1 Replikation ausüben können.

Zusammenfassend lässt sich für die Regulation der *SRSF1* Genexpression folgendes Modell vorschlagen (Abb. 4.1): Sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs führen, entweder direkt oder durch die Inhibierung der SR Protein Kinasen wie SRPK und CLK, zur verminderten Phosphorylierung zahlreicher SR Proteine. Dabei resultiert insbesondere die

## 4. Diskussion

verminderte Spleißaktivität von SRSF3 zu einem vermehrten Spleißen des Introns im 3'UTR von *SRSF1*. Außerdem entsteht durch die Infektion und die Inhibition von PI3K eine zusätzliche Proteinisoform von SRSF1 (SRSF1x). Die Bedeutung des Spleißereignisses und der weiteren Proteinisoform für die HIV-1 Infektion muss allerdings noch ermittelt werden. Auch bleibt zu klären, ob die HIV-1 induzierten Veränderungen tatsächlich PI3K-vermittelt reguliert werden.



**Abbildung 4.1** Das Spleißen im 3'UTR von *SRSF1* nach einer HIV-1 Infektion könnte durch den PI3K/Akt Signalweg reguliert werden.

Die Infektion mit HIV-1 sowie die Inhibition von PI3K durch LY294002 oder von Akt durch MK2206 führen, entweder direkt oder indirekt, durch die SR Protein Kinasen SRPK oder CLK, zu einem verminderten Vorkommen phosphorylierten SRSF3. Weniger aktives SRSF3 fördert wiederum die Entstehung der  $\Delta 3'UTR$  Variante von *SRSF1*. Darüber hinaus entsteht durch die Infektion und die Inhibition von PI3K durch LY294002 eine weitere, bisher nicht identifizierte Proteinisoform von SRSF1 (SRSF1x). Die möglichen Funktionen der generierten Varianten innerhalb der Infektion bleiben aufzuklären.

### 4.3 RNA deep sequencing Analysen tragen zur Identifizierung veränderter Genexpression und alternativem Spleißens nach einer HIV-1 Infektion bei

Die Entwicklung der neuen Generation von Sequenzierungen (NGS; „next generation sequencing“), oder auch Hochdurchsatz-Sequenzierungen, eröffnet völlig neue Einblicke in die komplexen Mechanismen der Genexpression [358, 359]. Im Vergleich zu den bis dahin verwendeten Microarray-Analysen bietet NGS die Möglichkeit, bisher nicht annotierte Transkripte und regulatorische RNAs zu identifizieren, sowie Spleißstellen nukleotidgenau zu erkennen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen dienten der Identifizierung einzelner Gene, deren Expression oder deren Spleißprofil nach einer HIV-1 Infektion und Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs verändert waren. Die

#### 4. Diskussion

Schwierigkeit bei genomweiten Untersuchungen von Transkriptionsunterschieden liegt in der Reproduzierbarkeit, beziehungsweise der Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Versuchsaufbauten. Vergleichsstudien von drei unabhängigen siRNA Screens – die zum Ziel hatten, essentielle Gene für die HIV-1 Replikation zu identifizieren – zeigen die Problematik solcher Untersuchungen auf [360-363]. In allen drei Screens wurden zusammen 842 Gene identifiziert, die die HIV-1 Replikation hemmen sollten, wenn sie herunterreguliert waren. Dabei stimmten insgesamt lediglich drei Gene in allen drei Screens überein [360, 364]. Zwar haben Brass et al. und Zhou et al. HeLa Zellen, König et al. dagegen HEK293T Zellen verwendet, die Anzahl der von ihnen gemeinsam identifizierten Gene ist dennoch unerwartet niedrig. Die Studie verdeutlicht, dass die virale Replikation in unterschiedlichem Kontext von unterschiedlichen zellulären Faktoren abhängen kann. Hinzu kommen die gewählten Zeitpunkte der Untersuchung, der Virusstamm, die Screening-Methode und nicht zuletzt die Filterkriterien, mittels derer ein Gen als notwendig für die Replikation bewertet wird [360]. Gleiche Einschränkungen gelten sicherlich auch für die Betrachtung des zellulären Transkriptoms nach einer HIV-1 Infektion, obgleich es dazu noch keine Metaanalyse gibt. Bei diesen Analysen kommen neben den genannten methodischen Unterschieden noch Einschränkungen durch die Methode der Sequenzierung selbst hinzu. Dazu zählen Differenzen in der Fragmentierung und der Länge der zu sequenzierenden Sequenzen, niedrig exprimierte Gene werden häufig unterschätzt und ganze Vollängentranskripte können häufig nicht sequenziert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Expressionsunterschiede und Spleißstellennutzungen konnten mittels RT-PCR Analysen in PM1 Zellen reproduziert werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass in anderen Zellen andere Regulationsabläufe für einzelne Gene gelten. Mit Hilfe der Sequenzierungsdaten konnte darüber hinaus eine veränderte NMD Aktivität in infizierten Zellen bestätigt werden. Dabei waren nicht Komponenten des Pathways selbst, sondern vielmehr solche Transkripte, die üblicherweise durch NMD degradiert werden, in ihrer Expression überrepräsentiert (Abb. 3.21). Die reduzierte NMD Aktivität nach einer HIV-1 Infektion könnte möglicherweise ein genereller viraler Mechanismus zum Schutz der eigenen Transkripte sein, da er sowohl in T-Zellen also auch in der Epithelzelllinie HeLa-CD4+ bestätigt werden konnte.

## 4. Diskussion

### 4.3.1 Die Expression von *FOSB* und *FOS* nach der HIV-1 Infektion könnte durch den PI3K/Akt Signalweg reguliert sein

Der nukleäre Transkriptionsfaktor AP-1 setzt sich aus Jun Homodimeren oder JUN/FOS Heterodimeren zusammen und reguliert hauptsächlich die Zellproliferation [365]. Einigen Viren, wie dem feline Immundefizienzvirus (FIV), dem Foamy Virus, dem Papillomavirus, sowie dem Retrovirus HTLV-1 (humanes T-lymphotropes Virus 1), wurde bereits eine Interaktion mit AP-1 – entweder zur Unterstützung viraler oder zellulärer Transkription – nachgewiesen [366] [367] [368] [369] [370, 371].

Mittels *RNA Deep Sequencing* Analysen und Verifizierung durch RT-PCR Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit eine drastische Herunterregulation der Genexpression der AP-1 Komponenten *FOS* und *FOSB* nach HIV-1 Infektion nachgewiesen werden. Dabei war bereits 6 Stunden nach der Infektion nur noch ein Drittel der Ausgangsexpression vorhanden (Abb. 3.13). Nach 24 und 48 Stunden waren keine Transkripte mehr zu detektieren. Die Expression der anderen AP-1 Komponente, *JUN*, war hingegen nicht beeinträchtigt. Die transkriptionelle Regulation der *FOS* und *JUN* Gene scheint also von unterschiedlichen Faktoren abhängig zu sein. Dennoch konnten funktionale Auswirkungen auf die Transkription AP-1 regulierter Gene bestätigt werden (Abb. 3.13.D), die Herunterregulation von *FOS* alleine reichte also aus, um die Funktion von AP-1 einzuschränken.

Hinsichtlich der Regulation der *FOS* Gene gibt es nach einer HIV-1 Infektion bislang keine Untersuchungen, aber die Auswirkung der *FOS* Überexpression auf die Replikation des Virus wurde bereits vielfach untersucht. Im 5'UTR des HIV-1 Genoms, stromabwärts von dem TAR Element, wurde ein *cis*-regulatorisches Element identifiziert, das durch FOS stimuliert werden kann [372]. Der fördernde Effekt war jedoch nur in den Zellen zu beobachten, die natürlicherweise – durch die Expression des CD4-Rezeptors – mit HIV-1 infiziert werden konnten. Andere Zellen zeigten bei der Überexpression von FOS keine gesteigerte Aktivität des in einen Reporter eingebrachten LTR Promotors. Die Gruppe hatte zuvor bereits gezeigt, dass die Aktivität des Promotors durch Phorbol Ester (PMA) und dem proinflammatorischen Cytokin TNF $\alpha$  in HIV-1 infizierbaren Epithelzellen, nicht aber in solchen, die nicht infizierbar waren, gesteigert werden kann [373]. Anschließend haben weitere Gruppen eine Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Zelltyp auf den Einfluss von FOS auf den LTR Promotor ausgemacht. Dabei konnte in der Jurkat T-

#### 4. Diskussion

Zelllinie kein Zusammenhang zwischen FOS und der HIV-1 LTR Aktivität nachgewiesen werden [374, 375]. Später wurde eine weitere AP-1 Bindungsstelle im HIV-1 Genom in der codierenden Region von *PoI* gemappt, deren Mutation zu einer Verminderung der viralen Replikation führte [376]. Die funktionalen Untersuchungen in dieser Studie wurden aber in HeLa Zellen durchgeführt, weil Colin und Mitarbeiter in Jurkat Zellen auch keine Aktivierung durch AP-1 beobachten konnten [376]. Die Autoren vermuten, dass die AP-1 Elemente im HIV-1 Genom zelltypspezifisch reguliert werden. Ein Einfluss von FOS auf die HIV-1 Replikation ist also unstrittig, scheint aber strikt vom zellulären Umfeld abhängig zu sein. Da das Virus sowohl in den in dieser Arbeit verwendeten PM1 Zellen als auch in den Jurkat Zellen replizieren kann, scheint FOS kein zellulärer Faktor zu sein, von dem das Virus in T-Zellen abhängt („*dependency factor*“). Diese These wird zusätzlich durch eine Untersuchung gestützt, die zwar zeigt, dass Vpr die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 über die Aktivierung von TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) post-translational stimulieren kann und Mutationen im Vpr diese Aktivierung verhindern, sie jedoch kaum einen Einfluss auf die virale Replikation zeigen [377].

Auch die Inhibition der Akt Kinase durch den Inhibitor MK2206 führte zu einem Verlust der *FOS* und zu einer deutlichen Verminderung der *FOSB* Genexpression (Abb. 3.13 C). In einem geringeren Ausmaß war auch die *JUN* Expression vermindert. Der Promotor von *FOS* enthält ein Serum-responsives Element (SRE), das unter anderem durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF („*epidermal growth factor*“) oder durch Insulin stimuliert werden kann [378]. Auch die Expression von *JUN* kann durch Zugabe von Serum induziert werden [379, 380]. Da der PI3K/Akt Signalweg ebenfalls durch Wachstumsfaktoren oder Insulin aktiviert werden kann [272], scheint ein Zusammenhang durchaus plausibel. Zwar ist der MAP-Kinase-Signalweg („*mitogen-activated protein*“) in der EGF-abhängigen Regulation der Expression von *FOS* und *JUN* beteiligt, konnte aber als nicht der alleinige Signalweg ausgemacht werden [381]. Tatsächlich wurde kürzlich eine Beteiligung von PI3K, zumindest in Prostatazellen, an der Expression von *FOS* beobachtet [382]. Bei der Untersuchung des Einflusses von Ultraschall auf das Verheilen von Knochenbrüchen wurde außerdem gezeigt, dass die Aktivität von PI3K und Akt die Bindung von FOS und JUN an die Promotorsequenz des untersuchten Zielgens BMP-2 (*bone morphogenetic protein*) verstärkt [383]. Auch die Beteiligung an der

#### 4. Diskussion

Regulation von Apoptose – einer der Hauptaufgaben des PI3K/Akt Signalwegs – wurde für AP-1 nachgewiesen. Hier zeigt sich jedoch erneut, wie divergent die Regulation in unterschiedlichen Zellen/Geweben durch AP-1 ist: In einigen Systemen induziert AP-1 apoptotische Abläufe, in anderen ist es für das Überleben notwendig [384]. Auch wenn die zu Grunde liegenden molekularen Abläufe bisher noch unbekannt sind, scheint ein Zusammenspiel des PI3K/Akt Signalwegs und der Expression der *FOS* Gene wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer Link zwischen der Akt und *FOS* Regulation aufgezeigt werden. Ob die nach HIV-1 Infektion beobachtete Herunterregulation von *FOS* und *FOSB* jedoch Akt-abhängig reguliert ist, bleibt zu untersuchen. Es ist auch denkbar, dass die verringerte Expression der Gene nur ein Nebeneffekt der Inhibition des Signalwegs durch das Virus darstellt, nicht aber das eigentliche Ziel der Inhibition ist. Dafür spricht auch, dass die *FOS* Expression, wie bereits erwähnt, nur in positiver Korrelation zu der viralen Replikation gebracht wurde. Außerdem erfolgt in den verwendeten PM1 Zellen, trotz geringer oder gar keiner *FOS* Genexpression, dennoch eine virale Replikation. Die Funktion der AP-1 Komponenten während einer HIV-1 Infektion scheint also sehr stark Zelltypspezifisch zu sein. Dennoch kann gerade die Untersuchung in unterschiedlichen Zelltypen helfen, molekularbiologische Zusammenhänge aufzudecken – wie etwa die Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Signalwege.

Ungeachtet der bisher genannten Untersuchungen ist bekannt, dass die *FOS* mRNAs nur eine äußerst kurze Halbwertszeit von durchschnittlich etwa 20 Minuten haben (im Vergleich dazu: Die Halbwertszeit der  *$\beta$ -Globin* mRNAs liegt bei über 20 Stunden) [385]. Vermutlich kann die Zelle aufgrund der kurzen Halbwertszeit dieser für Transkriptionsfaktoren codierenden mRNAs äußerst schnell auf externe Stimuli reagieren, was erneut die Verknüpfung von Signalwegen und *FOS* Expression verdeutlicht. Die Betrachtung der Genexpression von *FOS* und *FOSB* zu weiteren Zeitpunkten nach einer Infektion könnte also mehr Aufschluss über die Regulation liefern. Für das Polyomavirus konnte beispielweise eine stark fluktuierende Expression der *FOS* mRNA beobachtet werden: 1 Stunde nach Infektion erfolgte eine starke Hochregulierung, während 6 Stunden danach keine mRNA mehr detektiert werden konnte, 12 Stunden später aber dann wieder eine maximale Expression zu beobachten war [386]. Die Expression wird dabei durch

#### 4. Diskussion

unterschiedliche virale Genprodukte reguliert. Eine zeitlich stark schwankende Regulation von *FOS* und *FOSB* nach einer HIV-1 Infektion wäre also auch durchaus denkbar, insbesondere wenn man die unterschiedliche Aktivität der Akt Kinase während der Infektion betrachtet.

#### **4.3.2 Die Veränderungen im Spleißmuster von *TP53* nach HIV-1 Infektion und Akt Inhibition sind zelltypabhängig**

*TP53* codiert für den Tumorsupressor p53, zu dem es – nicht zuletzt wegen seiner Bedeutung für viele Krebsarten – schon vielzählige Untersuchungen gibt; allein bei PubMed erzielt das Schlagwort 79.047 Hits. p53, auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, ist ein Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität verantwortlich ist und somit der Entstehung von Krebs entgegenwirkt. Als Antwort auf verschiedene Stresssignale wird p53 aktiviert und kann unter anderem den Zellzyklus anhalten oder, je nach Schaden, auch den Zelltod auslösen und so die Vermehrung geschädigter Zellen verhindern [387, 388]. p53 bindet als Tetramer an p53-responsive Elemente (p53Res), um weitere Gene zu aktivieren, die an der Tumorsuppression beteiligt sind [389]. Es wird davon ausgegangen, dass p53 durch das eigene alternative Spleißen zelluläre Abläufe differentiell regulieren kann. Diese These wird durch die unterschiedlichen Expressionsprofile der Isoformen in verschiedenen Geweben unterstützt [390]. Die Nutzung von alternativen Promotoren und alternativem Spleißen generiert 9 verschiedene Transkriptisoformen. Durch den Einschluss des Exons i9 entsteht das *p53β* Transkript, das für ein am C-Terminus um 52 Aminosäuren verkürztes Protein codiert. Dadurch fehlt ihm die Tetramerisierungsdomäne und DNA kann zumindest *in vitro* nicht gebunden werden [389, 390]. *p53β* bindet vermutlich nur im Komplex mit p53 an bestimmte p53-responsive Elemente [391].

*RNA Deep Sequencing* Analysen haben gezeigt, dass die gesamte Genexpression von *TP53* sowohl nach HIV-1 Infektion als auch nach Inhibition der Akt Kinase um etwa das 2fache verringert war (Abb. 3.15 B). Darüber hinaus war die  $\beta$ -Variante, gekennzeichnet durch den Einschluss des Exons i9, nach Infektion um etwa das 5fache und nach Inhibition um etwa das 3fache herunterreguliert. Es war also nicht nur die Transkription des Gens sondern auch das alternative Spleißen verändert. Diesen zwei Beobachtungen können unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen. Die Transkription von *TP53* kann durch AP-1 verstärkt werden, so dass der hier

#### 4. Diskussion

beobachtete Verlust der Expression der AP-1 Komponenten FOS und FOSB für die geringere Transkription von *TP53* eine plausible Erklärung liefert (Abb. 3.13) [392]. Dass *TP53* durch unterschiedliche Promotornutzung und alternatives Spleißen verschiedene Transkriptisoformen generiert, wurde erst 2005 entdeckt [390] und über die Regulation ist noch nicht sehr viel bekannt. Die Beteiligung der auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spleißfaktoren SRSF1 und SRSF3 sowie den SR-Protein Kinasen CLKs wurde aber bereits nachgewiesen. Dabei verstärkt die Verwendung von TG003, einem Inhibitor der CLKs, und der Knockdown von *SRSF1* die Entstehung der p53 $\beta$  und p53 $\gamma$  Isoformen [335]. Auch wurde in Untersuchungen von Tumoren eine positive Korrelation zwischen SRSF1 Expression und der p53 $\alpha$  Variante dokumentiert. SRSF1 fördert also den Ausschluss des Exons i9 [335]. In den vorliegenden Untersuchungen ist ein kausaler Zusammenhang zwischen der veränderten Expression von SRSF1 und dem Spleißen von *TP53* aber eher unwahrscheinlich, da der vermehrte Exon i9 Ausschluss bereits 6 Stunden nach HIV-1 Infektion zu beobachten war, einem Zeitpunkt, zu dem die SRSF1 Expression noch nicht verändert war (Abb. 3.6, 3.7 und 3.15). Interessant ist aber, dass zu diesem Zeitpunkt die Expression der *CLK1 WT* Variante bereits erhöht war (Abb. 3.16), was auch mit einer erhöhten SR Protein Phosphorylierung 6 Stunden nach Infektion einherging (Abb. 3.4.C). Da die Inhibition von CLK1 durch TG003 den Exon-Einschluss erhöht, kann spekuliert werden, ob, umgekehrt, mehr CLK1 den Exon-Ausschluss fördert. Es ist also durchaus plausibel, dass weitere SR Proteine neben SRSF1 bei dieser Regulation eine Rolle spielen. Für SRSF3 konnte bereits eine Bindung im Exon i9 nachgewiesen werden, die den Exon-Ausschluss fördert [393]. Dies ist allerdings nicht mit dem hier beobachteten Verlust des SRSF3 Proteins in Einklang zu bringen (Abb. 3.11 C und D). Daher ist zu vermuten, dass hnRNP Proteine ebenfalls am Spleißen des Exons i9 beteiligt sind. Die Regulation von hnRNP Proteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, andere Untersuchungen deuten aber auch hier auf einen Einfluss des PI3K/Akt Signalwegs hin [291, 350]. Zur weiteren Aufklärung der Spleißregulation konnte das beobachtete endogene Spleißmuster in PM1 Zellen mittels eines Minigens jedoch nicht nachgestellt werden (Abb. 3.15 D). Dies kann zum einen in dem nicht endogenen Promotor des Minigens begründet liegen, da Transkription und Spleißen zwei miteinander gekoppelte Mechanismen sind [394, 395]. So kann die Transkriptionsgeschwindigkeit durchaus das Spleißen eines Primärtranskripts

#### 4. Diskussion

beeinflussen. Die Verwendung des endogenen Promotors in dem Minigen kann sicherlich weitere Hinweise dazu liefern. Zum anderen sind die Minigen Versuche aufgrund der effizienten Transfizierbarkeit in HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen durchgeführt worden. Das endogene Spleißmuster der Zellen zeigt aber bereits, dass die  $\beta$ -Variante – anders als in den PM1 Zellen – in unbehandeltem Zustand fast gar nicht exprimiert wird (Abb. 3.15 F). Es scheint also, als fördern bestimmte Konditionen, wie zum Beispiel die Phosphorylierung verschiedener SR Proteine – die zwischen den Zelltypen bereits deutlich abweicht (Abb. 3.4) [396] – in HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen bereits den Ausschluss des Exon i9, sodass weitere Veränderungen, wie die HIV-1 Infektion, keinen zusätzlichen Einfluss mehr ausüben können. Die Transfektion der proviralen DNA hingegen zeigte eine verstärkte Expression sowohl der  $\beta$ - als auch der  $\alpha$ -Variante, was eher auf die Förderung der Transkription als auf verändertes alternatives Spleißen hindeutet (Abb. 3.15). Die Nukleotransfektion®, eine Technik bei der die DNA direkt in den Nukleus eingebracht wird, führt in T-Zellen etwa 24 Stunden lang zu einer erhöhten Transkription [397]. Es ist also nicht auszuschließen, dass *off-targets* Effekte durch die pNL4-3 Transfektion die Transkription des Minigens verändern. Im Abschnitt 4.4 (Seite 129) werden noch weitere Punkte hinsichtlich zellulärer Effekte, die von einer Transfektion ausgehen können, erörtert.

Auch die Rolle von p53 während einer HIV-1 Infektion wurde bereits vielfach untersucht – wenngleich die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen häufig noch im Dunkeln liegen. In PBMCs wird die *TP53* mRNA beispielsweise Interferon-abhängig durch eine HIV-1 Infektion hochreguliert, während die Proteinlevels dabei zunächst unverändert bleiben [326]. Es sind weitere Trigger, wie zum Beispiel DNA Schäden, die durch die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom entstehen können, notwendig, um das p53 Protein zu stabilisieren und die Degradation zu verhindern. Die Autoren vermuten dahinter eine antivirale Immunantwort, die es der Zelle ermöglicht, durch bereits synthetisierte mRNAs schnell auf weitere Trigger reagieren und Apoptose auslösen zu können [326]. Der beobachtete Anstieg der *TP53* mRNA Levels nach HIV-1 Infektion war dabei zwingend abhängig von der IFN-1 Expression. Da T-Zellen wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PM1 Zellen nicht zu den IFN-1 produzierenden Zellen zählen, könnte das Fehlen von IFN-1 in dem hier untersuchten System eine Ursache für die nicht beobachtete Hochregulation von *TP53* sein. Es wurde bereits gezeigt, dass HIV-1 durch Proteine

#### 4. Diskussion

wie Nef und Tat, die p53 binden und seine pro-apoptotische Funktion unterbinden, dem Zelltod entgegen wirken und Latenz erzeugen [326, 398, 399]. Möglicherweise wird die *TP53* Expression in Abwesenheit von IFN-1 durch HIV-1 direkt herunterreguliert, sodass dem Zelltod bereits auf Transkriptionsebene entgegensteuert werden kann. Eine Infektion der Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit IFN-1 könnte Aufschluss darüber geben.

Ein weiterer negativer Einfluss von p53 auf die Replikation von HIV-1 wurde bei der viralen Transkription beobachtet. In Microglia Zellen und Astrozyten verhindert ein erhöhtes p53 Level die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne von Pol II, hält so die Transkription viraler mRNAs an und verringert die Replikation [400]. Auch Yoon et al. [401] haben einen negativen Effekt von p53 auf die virale Transkription ausgemacht, in dem es über die Protein Kinase PKR Tat inaktiviert. Es scheint also eine Anzahl an Gründen zu geben, warum eine niedrige p53 Expression für das Virus vorteilhaft ist.

Ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Herunterregulation von *TP53* tatsächlich eine Bedeutung für die virale Replikation hat, muss weiter untersucht werden. Unabhängig davon kann die Aufklärung der Spleißregulation des Exons i9 weiteren Aufschluss über die Interaktion des Virus mit dem zellulären Spleißapparat liefern. Es wurde gezeigt, dass insbesondere der Knockdown von p53 $\beta$  und p53 $\gamma$  in etwa 35% weniger apoptotischen Zellen resultierte [335]. Möglich ist also, dass neben der verringerten Transkription gerade die verringerte Expression der  $\beta$ -Variante nach HIV-1 Infektion von Bedeutung ist. Lange Zeit war man zwar davon ausgegangen, dass der für eine HIV Infektion kennzeichnende Verlust von T-Zellen in dem Zelltod der infizierten Zellen begründet liegt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass nicht die infizierten Zellen selbst – was einen deutlichen Nachteil für das Virus ergeben würde – sterben, sondern die nicht-permissiven, ruhenden, abortiv infizierten Bystander-Zellen durch Pyroptose, einer Form der Apoptose, die durch Entzündungsreaktionen ausgelöst wird, sterben [402]. p53 könnte also ein möglicher Schalter sein, der zum Überleben infizierter Zellen beiträgt.

Hinsichtlich der Rolle der Akt Kinase ist noch bemerkenswert, dass die Aktivität von Akt offensichtlich für die Stabilisierung von p53 nach DNA Schäden benötigt wird [403]. Es ist also denkbar, dass die HIV-1 ausgelöste Akt Inhibition die p53-vermittelte Apoptose zusätzlich unterdrückt. Dies erscheint auch vom zeitlichen Ablauf sinnvoll zu sein, wenn man bedenkt, dass die DNA Schäden auslösende

## 4. Diskussion

Integration zu einem Zeitpunkt stattfindet, an dem die Kinase bereits dephosphoryliert vorliegt (Abb. 3.3). Die Funktion von p53 könnte folglich auf mehreren Ebenen durch HIV-1 gestört werden.

### **4.4 Die Art des Einbringens proviraler DNA in eukaryotische Zellen bestimmt das Ausmaß dadurch veränderter zellulärer Abläufe**

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sind bei verschiedenen Experimenten, abhängig davon ob die provirale DNA mittels Infektion oder Transfektion in die Zelle eingebracht wurde, völlig unterschiedliche Ergebnisse erzielt worden. Der *SRSF3* Spleißreporter zeigte beispielweise nur nach der HIV-1 Infektion, nicht aber nach der Transfektion mit proviraler DNA einen erhöhten Exonausschluss (Abb. 3.11 A). Ebenso zeigten die NMD Reporter, dass die NMD Aktivität nur durch eine Infektion, nicht aber eine Transfektion der proviralen DNA gehemmt werden konnte (Abb. 3.24). Dagegen zeigte das TP53 Minigen nur nach der Transfektion, nicht aber nach der Infektion eine verstärkte Transkription (Abb. 3.15 D). Ebenso zeigte die Überexpression der CLKs nur einen massiven Einfluss auf die virale Replikation, wenn die Zellen mit der proviralen DNA transfiziert, nicht aber infiziert worden waren (Abb. 3.18). Im Fall der Infektion zeigte die Überexpression überhaupt keinen Einfluss auf die virale Replikation (Abb. 3.19).

Für die Transfektion von Säugerzellen können unterschiedliche Reagenzklassen wie beispielweise Calcium-Phosphat, Polyethylenimin oder Lipide verwendet werden [404]. Dabei ist der zu Grunde liegende Mechanismus bei allen Reagenzien ähnlich: Die DNA bindet durch die Zugabe positiv geladener Teilchen an die Zellmembran, wird durch Endozytose aufgenommen und in Endosomen eingeschlossen. Wie die DNA schließlich aus den Endosomen entkommt und in den Zellkern gelangt, ist unzureichend geklärt. Die Transfektionseffizienz ist jedoch entscheidend davon abhängig wie effektiv die DNA aus dem Endosomen entlassen wird. Während der Reifung der Endosomen verschmilzt sie nämlich mit dem Lysozym, sodass es zum Abfall des pH-Werts kommt und der hydrolytische Abbau der DNA durch Hydrolasen beginnt. Substanzen wie Glycerin oder DMSO, die dem Abfall des lysosomalen pH-Werts entgegenwirken, können die Transfektionseffizienz daher steigern. Die genaue Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transfektionsreagens Mirus® ist zwar nicht veröffentlicht, es setzt sich jedoch aus

#### 4. Diskussion

Lipiden und Proteinen/Polyaminen zusammen, die die negative geladene DNA umschließen, sodass es schließlich auch zur Aufnahme durch Endozytose kommt. Das dadurch künstlich erzeugte Vorkommen cytosolischer DNA ist für die Zelle üblicherweise ein Merkmal eines eingedrungenen Virus oder Bakteriums. Die Erkennung solcher Nukleinsäuren ist Teil des angeborenen Immunsystems und wurde ursprünglich nur Makrophagen und dendritischen Zellen zugeschrieben, die die DNA als *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) durch *pattern recognition receptors* (PRRs) wie den Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen [405]. Unterdessen ist jedoch bekannt, dass weitaus mehr Zellen über Sensoren verfügen, die cytosolische DNA erkennen. Die zyklische GMP-AMP Synthase (cGAS) katalysiert bei Bindung von DNA die Synthese von cGAMP, was wiederum das Transmembran Protein STING (*stimulator of interferon responsive genes*) im endoplasmatischen Retikulum bindet und letztlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 mündet. IRF3 initiiert schließlich die Transkription von Interferonen [406, 407]. Die Transfektion der Zellen mit einem Plasmid könnte also per se eine Immunantwort erzeugen und so womöglich Kaskaden auslösen, die die von den viralen Proteinen ausgelösten Mechanismen überlagern. Untermauert wird diese These durch eine Studie von Jacobsen et al. [408]. Sie haben Veränderungen im zellulären Transkriptionsprofil nach Transfektion mit einem Reportergen oder einem Leervektor durch unterschiedliche Transfektionsreagenzen betrachtet. Dabei haben sie festgestellt, dass beide Plasmide die Expression von Genen induzieren, die mit der zellulären Immunantwort auf fremde DNA zusammenhängt. Das zelluläre Transkriptom wird also tatsächlich nach einer Transfektion mit einem beliebigen Plasmid verändert. Außerdem haben die Autoren, in Abhängigkeit des verwendeten Transfektionsreagenz, gravierende Unterschiede in der Anzahl der veränderten exprimierten Gene (von 78 bis 1026) beobachten können. Das künstliche Einbringen von DNA in eine Zelle kann also tatsächlich ungewollte Reaktionen auslösen, die mit der ursprünglichen, experimentellen Fragestellung nicht im Zusammenhang stehen (sogenannte *off-target* Effekte).

Es ist also durchaus vorstellbar, dass durch die Transfektion von Zellen mit pNL4-3 beispielweise der cGAS-STING Pathway aktiviert wird, der die durch das Virus nach einer natürlichen Infektion ausgelösten Signale, die beispielsweise zur Reduzierung der NMD Aktivität führen, überlagert (Abb. 3.24). Die Tatsache, dass die Infektion mit HIV-1, nicht aber die Transfektion von pNL4-3 [350] das Phosphorylierungsmuster

#### 4. Diskussion

der SR Proteine verändert, könnte weiter erklären, warum die Infektion, nicht aber die Transfektion, das Spleißmuster des *SRSF3* Spleißreporters verändert (Abb. 3.11). Untersuchungen der Spleißregulation des PTC Exons 4 von *SRSF3*, unabhängig seiner NMD Sensitivität, haben gezeigt, dass der Einschluss des Exons durch *SRSF3* selbst gefördert wird [409]. Die während der Infektion beobachtete Dephosphorylierung der SR Proteine, unter anderem von *SRSF3*, könnte also den Exonausschluss im Minigen fördern. Dieser Spleißeffekt ist jedoch von der durch die verringerte NMD Aktivität beobachteten Akkumulation der PTC-Variante, also dem Einschluss des Exons 4, zu trennen. In der endogenen Situation überwiegt die verringerte NMD Aktivität nach HIV-1 Infektion, sodass mehr Transkripte, die das Exon 4 einschließen, akkumulieren. Die Transfektion mit pNL4-3 zeigte hingegen, aus den genannten Gründen, keinen der beiden Effekte.

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur Unterschiede in der Zellantwort auf die Transfektion oder die Infektion beobachtet, sondern auch gravierende Replikationsunterschiede, je nachdem ob die Zellen transfiziert oder infiziert worden waren. Dies ist in Anbetracht der Tatsache, dass viele Untersuchungen, die den Einfluss zellulärer Faktoren auf die HIV-1 Replikation untersuchen, die Zellen transfizieren, aber meist nicht infizieren, von enormer Bedeutung. Die Überexpression der CLKs führte im Fall der Transfektion der Zellen mit pNL4-3 zu einer massiven Degradation der viralen mRNAs, während die Replikation nach einer Infektion nicht betroffen war (Abb. 3.18 und 3.19). Bei einer Transfektion wird die virale DNA über Endozytose aufgenommen und gelangt schließlich in den Zellkern. Dort wird sie extrachromosomal transkribiert und modifiziert. Bei einer Infektion findet zunächst die reverse Transkription im Cytoplasma statt, der Prä-Integrationskomplex gelangt in den Nukleus und die DNA wird in das Wirtsgenom integriert. Die darauffolgenden Schritte wie Spleißen und mRNA-Export unterscheiden sich zwischen beiden Methoden nicht. Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse sprechen jedoch dafür, dass die Transkription im Fall der Transfektion bereits stattgefunden haben muss und lässt auch einen vorzeitigen Abbruch der Transkription unwahrscheinlich erscheinen, da andernfalls kein Signal mit der im letzten Exon bindenden Sonde zu erwarten gewesen wäre (Abb. 3.18). Es handelt sich daher vermutlich um die Degradation der bereits synthetisierten RNAs und nicht um etwaige Transkriptionsabbruchprodukte. Ein möglicher Unterschied zwischen den

#### 4. Diskussion

mRNAs, die von der transfizierten proviralen DNA bzw. von dem infizierten Virus stammten, könnten die vorhandenen Mengen sein, die bei der Transfektion größer sind (vgl. Abb. 3.18 C und 3.19 C). Wie dieser Unterschied allerdings zur Degradation führen kann, muss weiter untersucht werden. Da die Transfektion mit dem Leervektor nicht zur Degradation der viralen mRNAs führte, muss es sich um spezifische Eigenschaften der überexprimierten Kinasen handeln.

Wong et al. haben hinsichtlich der Bedeutung der CLKs für HIV-1 gänzlich andere Ergebnisse erzielt [268]. Die Überexpression von CLK1 zeigte eine 3fache Erhöhung der Gag Expression, während die Überexpression von CLK2 diese um etwa das 4fache reduzierte. CLK3 und CLK4 zeigten hingegen eine moderate Reduktion. Bemerkenswert ist, dass die Inhibition durch TG003 – einem Inhibitor von CLK1, CLK4 und CLK2 – keinen Effekt auf die virale Replikation zeigte, während Chlorhexidin – ein Inhibitor von CLK2, CLK3 und CLK4 – eine 4fache Reduktion aller viralen Proteine bedingte. Die Inhibition von CLK2, dessen Überexpression einen negativen Effekt auf die Replikation ausübte, zeigte wiederum einen negativen Einfluss. Es scheint also, dass eine ausgeglichene Menge von CLK2 für die Replikation entscheidend ist.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der vorliegenden Arbeit und der Veröffentlichung von Wong et al. könnten sowohl im verwendeten Zellsystem als auch in der zeitlichen Abfolge der Experimente begründet liegen. Wong et al. haben eine HeLa Zelllinie verwendet, in der das HIV-1 Genom stabil integriert ist und dessen Transkription durch einen TetON Promotor mittels der Zugabe von Doxycyclin oder der Transfektion eines konstitutiv aktiven TetO transkriptionellen Aktivators reguliert werden kann. Dabei wurden sowohl Tat als auch das TAR Element im viralen Genom durch Mutationen inaktiviert. Die Transkriptionsrate unterliegt also keiner natürlichen Regulation. Zusätzlich erfolgte die Transfektion der Kinasen parallel zur Induktion der viralen Replikation. Die Expression der CLKs erfolgte also zu einem anderen Zeitpunkt als in der vorliegenden Arbeit (bereits 24 Stunden vor der Infektion). Die Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass zumindest die Expression der *CLK1* mRNAs während einer Infektion verändert wird (Abb. 3.16). Es ist also durchaus möglich, dass die fördernde bzw. inhibierende Wirkung der Kinasen stark vom Zeitpunkt innerhalb der Infektion abhängen.

### **4.4 HIV-1 mRNAs werden durch eine verminderte NMD Aktivität vor der Degradation geschützt**

Der *Nonsense-mediated decay* Pathway war ursprünglich als reiner Entsorger von fehlerhaften mRNAs verstanden worden. Unterdessen gilt er jedoch als wichtiger Bestandteil der post-transkriptionalen Genregulation. Derzeit tragen außerdem immer neue Erkenntnisse zu einer Beteiligung von NMD in der Abwehr gegen Pathogene bei. In Pflanzen wurde NMD bereits als genereller viraler Restriktionsmechanismus definiert [410, 411]. Aber auch für humane Pathogene scheint er eine wichtige Rolle zu spielen, betrachtet man die immer größer werdende Zahl von Pathogenen, für die Interaktionen mit dem NMD Pathway beschrieben werden [204, 210].

Die anfängliche starke Hochregulation von NMD nach einer HIV-1 Infektion (Abb. 3.23) könnte also eine Abwehrreaktion der Zelle auf das eingedrungene Virus sein. Selbst wenn bisher kein direkter Zusammenhang zwischen einer Infektion und dem Verstärken von NMD in humanen Zellen beschrieben wurde, so deuten Untersuchungen an Viren dennoch darauf hin. Die Replikation des Semliki Forest Virus (SFV), einem Virus mit einem positiven RNA Genom, kann durch den Knockdown der NMD Faktoren *UPF1*, *SMG5* oder *SMG7* deutlich verstärkt werden [205]. Das Rous-Sakrom-Virus (RSV) besitzt sogar ein RNA Stabilitätselement (RSE) stromabwärts des *Gag* ORFs, das die virale mRNA vor der Degradation durch NMD schützt. Durch die Deletion oder Inversion des Elements wird die mRNA degradiert. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn eine trans-dominante Variante von *UPF1* exprimiert wird, die den NMD Pathway inhibiert [206, 209, 412]. Das Vorhandensein eines solchen Elements deutet außerdem darauf hin, dass das Virus sich bereits an NMD als Abwehrmechanismus angepasst hat. Vermutlich existiert also schon länger eine Co-Evolution zwischen Zelle und Virus bezüglich NMD. Für das Retrovirus HTLV-1 sind bereits zwei virale Proteine – Tax und Rex – identifiziert worden, die die NMD Aktivität absenken können und so die virale Replikation fördern [207, 208].

Auch im Verlauf der HIV-1 Infektion kommt es nach der anfänglichen Hochregulation schließlich zu einem starken Abfall der NMD-Aktivität (Abb. 3.23.), einhergehend mit der Akkumulation endogener NMD-Substrate (Abb. 3.22, 3.21, 3.16, 3.10). Interessanterweise zeigte die Inhibition der Akt Kinase einen vergleichbaren Phänotyp und deren Phosphorylierung wird während einer HIV-1 Infektion nach anfänglicher Stimulation gehemmt (Abb. 3.3). Bisher gibt es kaum Literatur, die einen

#### 4. Diskussion

Zusammenhang zwischen NMD und zellulären Signalwegen herstellt. Es wurde lange Zeit angenommen, dass NMD ein Mechanismus ist, der keiner Aktivierung bedarf, stets aktiv ist und im Fall einer sensitiven mRNA die Degradation ausführt. Sowohl die Untersuchungen zu den viralen Interaktionen als auch die Tatsache, dass NMD in hypoxischen Zellen herunterreguliert ist [413], deuten jedoch auf eine Verknüpfung von NMD mit extrinsischen Signalen hin. Tatsächlich wurde kürzlich eine Insulin-vermittelte Förderung der Translation, die mit erhöhter Bindung von UPF1 an PTC Transkripten und erhöhter NMD Aktivität einherging, aufgedeckt [414]. Dabei kommt es zur einer verstärkten Akt Phosphorylierung, während der Knockdown von Akt zu einer 2,5fachen Herunterregulation der NMD Aktivität führt. Der PI3K/Akt Signalweg könnte also ein möglicher Kommunikator sein, über den HIV-1 die NMD Aktivität reguliert, obgleich die genauen molekularen Mechanismen noch aufzuklären sind. Auch die Tatsache, dass die Transfektion der proviralen DNA nicht ausreicht (Abb. 3.24), um NMD zu inhibieren, bestärkt die Vermutung einer signalwegabhängigen Regulation. Außerdem ist eine Beteiligung der SR Proteine in Betracht zu ziehen. Insbesondere für SRSF1 wurde gezeigt, dass es die NMD Aktivität fördern kann [203]. Es wird vermutet, dass es entweder die EJC-Bildung stabilisiert oder hierbei die geförderte Translationsinitiation durch SRSF1 eine Rolle spielt. Interessant ist, dass die RS Domäne von SRSF1 für die Förderung von NMD essentiell ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass SRSF1 für diesen Prozess in phosphorylierter Form vorliegen muss. Da im Fall der HIV-1 Infektion und der PI3K/Akt Inhibition zwar nicht insgesamt weniger SRSF1 aber vermutlich weniger phosphoryliertes SRSF1 vorhanden ist (Abb. 3.4), kann also weiter spekuliert werden, dass möglicherweise durch diese Dephosphorylierung die fördernde Wirkung von SRSF1 auf die NMD Aktivität verhindert wird.

Die Nukleinsäure-abhängige Helikase UPF1 ist zwar ein essentieller Bestandteil des NMD Pathways, ist aber durchaus noch in andere zelluläre Prozesse wie der DNA Replikation oder der Telomer Homöostase involviert [154, 415]. Ajamin et al. haben gezeigt, dass UPF1 eine Komponente des HIV-1 RNPs (*ribonucleoprotein*) ist und – entkoppelt von dessen Rolle im NMD Pathway – den Export genomischer HIV-1 RNAs unterstützt [338, 416]. Dabei haben sie nach UPF1 Knockdown einen Verlust von Gag beobachtet, der sich allerdings durch die Expression einer siRNA resistenten Variante von UPF1 nicht wieder ausgleichen ließ. *Off-target* Effekte

#### 4. Diskussion

können also nicht ausgeschlossen werden. Für die Untersuchungen der HIV-1 Replikation haben sie Zellen mit der proviralen DNA transfiziert und nicht infiziert, was, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, in manchen Untersuchungen zu unterschiedlichen Resultaten führen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein Einfluss des UPF1 Knockdowns auf die Replikation, weder nach pNL4-3 Transfektion noch nach HIV-1 Infektion, ausgemacht werden (Abb. 3.25). Auch Serquina et al. konnten keine Abnahme der viralen Proteinsynthese nach UPF1 Knockdown nachweisen [417]. Außerdem konnten sie die Steigerung der viralen Replikation nach UPF1 Überexpression, wie von Ajamini et al. gezeigt, nicht bestätigen. Allerdings haben sie beobachtet, dass Virionen, die in Zellen ohne UPF1 gereift sind, weniger infektiös waren. Auch dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden (Abb. 3.24). Ein Unterschied zwischen dem hier durchgeführten Experiment und dem von Serquina et al. ist die verwendete Indikator-Zelllinie, die für den Nachweis der Infektiösität der Viren benutzt wurde. Da sie aus unterschiedlichen Tumorgeweben stammen (TZM-bl: Adenokarzinom, GHOST-CXCR4: Osteosarkom), ist eine andere Antwort auf die Virus Infektion auf Grund von Entartungen nicht auszuschließen.

UPF1 ist ein Phosphoprotein und die Phosphorylierung durch SMG1 ist für die NMD Aktivität entscheidend [418, 419]. Denkbar wäre also, dass die Infektion lediglich die Phosphorylierung von UPF1 stört, dadurch die NMD Aktivität herunterreguliert wird, dies aber keinen Einfluss auf die NMD-unabhängigen Funktionen von UPF1 hat, die für den HIV-1 Replikationszyklus notwendig sind. Festzuhalten ist, dass UPF1 eine Rolle in der HIV-1 Replikation zu spielen scheint. Es bedarf weiterer Studien, die die genauen Mechanismen aufklären.

Die beobachtete Herunterregulation der NMD Aktivität nach HIV-1 Infektion könnte – wie im Fall von HTLV-1 [207, 208] – die viralen mRNAs vor der Degradation durch NMD schützen. HIV-1 hat, wie alle Retroviren, ein äußerst kompaktes Genom mit teilweise überlappenden ORFs und einer *frameshift site*. Auffällig sind auch die langen 3'UTRs der mRNAs, an die UPF1 längenabhängig bindet [185]. Die Bindung könnte die HIV-1 mRNAs NMD-sensitiv machen, wodurch PABPC1 an der Bindung mit den Release Faktoren gehindert würde. Interessanterweise sind aber gerade die mRNAs mit den längsten 3'UTRs – *Vif* und *Vpr* – nicht NMD sensitiv, dafür aber *Tat* Messages (Abb. 3.16). Denkbar wäre, dass weitere Faktoren – ähnlich wie PABPC1

#### 4. Diskussion

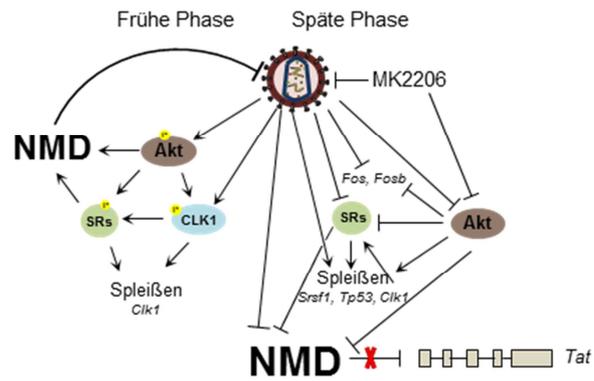
und eIF4G, deren Bindung an die mRNA NMD verhindern kann [164, 165] – im Intron 2 und Intron 3 stromabwärts vom *Vif* beziehungsweise *Vpr* ORF binden. Beim Semliki Forest Virus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der etwa 400 Nukleotid lange 3'UTR keine Rolle für die NMD Sensitivität der RNAs spielt [205]. Ähnliche Untersuchungen bei HIV-1 können Aufschluss darüber geben, welche Eigenschaften einige mRNAs NMD sensitiv macht und andere vor der Degradation schützt. Weitere Studien sind also erforderlich, um die molekularen Details der Interaktion von HIV-1 mit dem NMD Pathway zu beleuchten.

#### **Schlussfolgerungen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die HIV-1 Infektion als auch die Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs die zelluläre Genexpression verändern. Folgendes Modell kann aus den Daten vorgeschlagen werden (Abb. 4.2): Das Attachment des HI-Virus 1 an die Zellmembran führt zur Phosphorylierung der Akt Kinase. Diese fördert wiederum die Phosphorylierung der SR Proteine, die zur Generierung von Spleißvarianten, wie zum Beispiel der WT-Variante von *CLK1*, beitragen, die für den weiteren Verlauf der Infektion essentiell sein könnten. Andererseits fördern sowohl die Aktivierung der Akt Kinase, als auch die Aktivität der SR Proteine die zelluläre NMD Aktivität. Sowohl die Akt als auch die SR Protein Phosphorylierung wird schließlich herunterreguliert, was die NMD Aktivität senkt und die viralen *Tat* Transkripte vor der Degradation schützt. Neben der Herunterregulierung der NMD Aktivität kommt es durch die Veränderungen des SR Protein Pools zu alternativen Spleißereignissen, wie beispielweise im Fall von *TP53*, wodurch die Generierung eines pro-apoptotischen Transkripts eingeschränkt wird. Außerdem werden die Gene der Transkriptionsfaktoren *FOS* und *FOSB* herunterreguliert, die üblicherweise die Transkription von *TP53* fördern. Auch das Spleißen von *SRSF1* wird massiv verändert. Von der generierten Variante müssen allerdings noch funktionale Assays zeigen, welche Bedeutung sie innerhalb der Infektion hat.

Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Virus, dem PI3K/Akt Signalweg, den SR Proteinen und dem NMD Pathway könnten also die zellulären Bedingungen zugunsten der viralen Replikation verändern.

## 4. Diskussion



**Abbildung 4.2 Modell zu HIV-1 induzierten Veränderungen des PI3K/Akt Signalwegs auf die zelluläre Genexpression.**

In der frühen Phase der HIV-1 Infektion kommt es zur Phosphorylierung der Akt Kinase und der SR Proteine. Dies führt wiederum zum veränderten Spleißen zellulärer Gene wie von *CLK1*. Außerdem wird dadurch die NMD Aktivität hochreguliert. Im weiteren Verlauf der Infektion wird der PI3K/Akt Signalweg inhibiert, einhergehend mit einer verringerten SR Protein Phosphorylierung, Veränderungen der zellulären Genexpression (*FOS*, *FOSB*) sowie alternativen Spleißmustern (*SRSF1*, *TP53*, *CLK1*). Außerdem führt die verringerte Aktivität der SR Proteine und des Signalwegs zu einer verringerten NMD Aktivität, was die viralen *tat* Transkripte vor der Degradation schützt.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015,**16**:129-143.
2. Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 1993,**365**:520-527.
3. Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Usheva AA, Hisatake K, Lee DK, *et al.* Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 1995,**377**:119-128.
4. Kostrewa D, Zeller ME, Armache KJ, Seizl M, Leike K, Thomm M, *et al.* RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 2009,**462**:323-330.
5. Conaway RC, Conaway JW. An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989,**86**:7356-7360.
6. Flores O, Lu H, Reinberg D. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIH. *J Biol Chem* 1992,**267**:2786-2793.
7. Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J* 1996,**15**:1666-1677.
8. Goodrich JA, Tjian R. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 1994,**77**:145-156.
9. Sawadogo M, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985,**82**:4394-4398.
10. Buratowski S, Zhou H. Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993,**90**:5633-5637.
11. Ha I, Roberts S, Maldonado E, Sun X, Kim LU, Green M, *et al.* Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev* 1993,**7**:1021-1032.
12. Prelich G. RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function. *Eukaryot Cell* 2002,**1**:153-162.
13. Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW. Rna Polymerase-ii Is a Glycoprotein - Modification of the CooH-Terminal Domain by O-Glcnac. *Journal of Biological Chemistry* 1993,**268**:10416-10424.
14. Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 2005,**19**:1401-1415.
15. Saunders A, Core LJ, Lis JT. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006,**7**:557-567.
16. Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 2000,**14**:2452-2460.
17. Pal M, Luse DS. Strong natural pausing by RNA polymerase II within 10 bases of transcription start may result in repeated slippage and reextension of the nascent RNA. *Mol Cell Biol* 2002,**22**:30-40.
18. McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, *et al.* The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 1997,**385**:357-361.

## 5. Literaturverzeichnis

19. Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011,**2**:277-298.
20. Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 2005,**33**:201-212.
21. Legendre M, Gautheret D. Sequence determinants in human polyadenylation site selection. *BMC Genomics* 2003,**4**:7.
22. Chen F, MacDonald CC, Wilusz J. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 1995,**23**:2614-2620.
23. Tian B, Graber JH. Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012,**3**:385-396.
24. Chan S, Choi EA, Shi Y. Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011,**2**:321-335.
25. Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 2013,**14**:496-506.
26. Maris C, Dominguez C, Allain FH. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* 2005,**272**:2118-2131.
27. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 2009,**136**:701-718.
28. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010,**463**:457-463.
29. Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Dujardin G, Petrillo E, Munoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013,**14**:153-165.
30. Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011,**3**.
31. Levine A, Durbin R. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res* 2001,**29**:4006-4013.
32. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014,**15**:108-121.
33. Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 2003,**12**:5-14.
34. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003,**72**:291-336.
35. Freund M, Asang C, Kammler S, Konermann C, Krummheuer J, Hipp M, *et al.* A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res* 2003,**31**:6963-6975.
36. Berglund JA, Abovich N, Rosbash M. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* 1998,**12**:858-867.
37. Gozani O, Feld R, Reed R. 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 Dev* 1996,**10**:233-243.
38. Valcarcel J, Gaur RK, Singh R, Green MR. Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* 1996,**273**:1706-1709.
39. Gottschalk A, Neubauer G, Banroques J, Mann M, Luhrmann R, Fabrizio P. Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *EMBO J* 1999,**18**:4535-4548.

## 5. Literaturverzeichnis

40. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987,**15**:7155-7174.
41. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004,**11**:377-394.
42. Roca X, Akerman M, Gaus H, Berdeja A, Bennett CF, Krainer AR. Widespread recognition of 5' splice sites by noncanonical base-pairing to U1 snRNA involving bulged nucleotides. *Genes Dev* 2012,**26**:1098-1109.
43. Roca X, Krainer AR. Recognition of atypical 5' splice sites by shifted base-pairing to U1 snRNA. *Nat Struct Mol Biol* 2009,**16**:176-182.
44. Erkelenz S, Mueller WF, Evans MS, Busch A, Schoneweis K, Hertel KJ, *et al.* Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* 2013,**19**:96-102.
45. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 2011,**147**:789-802.
46. Mayeda A, Sreaton GR, Chandler SD, Fu XD, Krainer AR. Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol Cell Biol* 1999,**19**:1853-1863.
47. Wu JY, Maniatis T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 1993,**75**:1061-1070.
48. Cavaloc Y, Popielarz M, Fuchs JP, Gattoni R, Stevenin J. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO J* 1994,**13**:2639-2649.
49. Anko ML. Regulation of gene expression programmes by serine-arginine rich splicing factors. *Semin Cell Dev Biol* 2014,**32**:11-21.
50. Sun Q, Mayeda A, Hampson RK, Krainer AR, Rottman FM. General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes Dev* 1993,**7**:2598-2608.
51. Lavigne A, La Branche H, Kornblihtt AR, Chabot B. A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev* 1993,**7**:2405-2417.
52. Staknis D, Reed R. SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol Cell Biol* 1994,**14**:7670-7682.
53. Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Luhrmann R, Garcia-Blanco MA, *et al.* Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 1994,**368**:119-124.
54. Xiao SH, Manley JL. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J* 1998,**17**:6359-6367.
55. Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA* 2001,**7**:806-818.
56. Shen H, Kan JL, Green MR. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol Cell* 2004,**13**:367-376.
57. Blanco FJ, Bernabeu C. The Splicing Factor SRSF1 as a Marker for Endothelial Senescence. *Front Physiol* 2012,**3**:54.

## 5. Literaturverzeichnis

58. Karni R, Hippo Y, Lowe SW, Krainer AR. The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008,**105**:15323-15327.
59. Blaustein M, Quadrona L, Risso G, Mata Mde L, Pelisch F, Srebrow A. SF2/ASF regulates proteomic diversity by affecting the balance between translation initiation mechanisms. *J Cell Biochem* 2009,**107**:826-833.
60. Michlewski G, Sanford JR, Caceres JF. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* 2008,**30**:179-189.
61. Bedard KM, Daijogo S, Semler BL. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J* 2007,**26**:459-467.
62. Swartz JE, Bor YC, Misawa Y, Rekosh D, Hammarskjold ML. The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem* 2007,**282**:19844-19853.
63. Leva V, Giuliano S, Bardoni A, Camerini S, Crescenzi M, Lisa A, *et al.* Phosphorylation of SRSF1 is modulated by replicational stress. *Nucleic Acids Res* 2012,**40**:1106-1117.
64. Kim E, Du L, Bregman DB, Warren SL. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 1997,**136**:19-28.
65. Du L, Warren SL. A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 1997,**136**:5-18.
66. de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, *et al.* A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* 2003,**12**:525-532.
67. de la Mata M, Kornblihtt AR. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol* 2006,**13**:973-980.
68. Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu XD. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 2008,**15**:819-826.
69. Ji X, Zhou Y, Pandit S, Huang J, Li H, Lin CY, *et al.* SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell* 2013,**153**:855-868.
70. Caceres JF, Misteli T, Sreaton GR, Spector DL, Krainer AR. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 1997,**138**:225-238.
71. Misteli T, Caceres JF, Spector DL. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 1997,**387**:523-527.
72. Caceres JF, Sreaton GR, Krainer AR. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 1998,**12**:55-66.
73. Sapra AK, Anko ML, Grishina I, Lorenz M, Pabis M, Poser I, *et al.* SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol Cell* 2009,**34**:179-190.
74. Huang Y, Gattoni R, Stevenin J, Steitz JA. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 2003,**11**:837-843.
75. Huang Y, Steitz JA. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 2001,**7**:899-905.

## 5. Literaturverzeichnis

76. Mermoud JE, Cohen P, Lamond AI. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 1992;**20**:5263-5269.
77. Mermoud JE, Cohen PT, Lamond AI. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J* 1994;**13**:5679-5688.
78. Gui JF, Lane WS, Fu XD. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 1994;**369**:678-682.
79. Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Caceres JF, Pawson T, *et al.* SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem* 1996;**271**:24569-24575.
80. Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, *et al.* The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* 1996;**15**:265-275.
81. Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, *et al.* SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 1998;**140**:737-750.
82. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Scheit KH, Bell JC. The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res* 1998;**241**:300-308.
83. Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, *et al.* The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. *Mol Cell* 2012.
84. Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K, *et al.* Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase Cbeta11 alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem* 2005;**280**:14302-14309.
85. Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L, *et al.* Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 2005;**12**:1037-1044.
86. Berro R, Pedati C, Kehn-Hall K, Wu W, Klase Z, Even Y, *et al.* CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing. *J Virol* 2008;**82**:7155-7166.
87. Birney E, Kumar S, Krainer AR. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res* 1993;**21**:5803-5816.
88. Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993;**62**:289-321.
89. Mayeda A, Krainer AR. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 1992;**68**:365-375.
90. Bai Y, Lee D, Yu T, Chasin LA. Control of 3' splice site choice in vivo by ASF/SF2 and hnRNP A1. *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:1126-1134.
91. Zhu J, Mayeda A, Krainer AR. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* 2001;**8**:1351-1361.
92. Martinez-Contreras R, Fisette JF, Nasim FU, Madden R, Cordeau M, Chabot B. Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS Biol* 2006;**4**:e21.
93. Huang M, Rech JE, Northington SJ, Flicker PF, Mayeda A, Krainer AR, *et al.* The C-protein tetramer binds 230 to 240 nucleotides of pre-mRNA and

## 5. Literaturverzeichnis

- nucleates the assembly of 40S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol* 1994,**14**:518-533.
94. Guil S, Caceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 2007,**14**:591-596.
  95. Kim JH, Paek KY, Choi K, Kim TD, Hahm B, Kim KT, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol Cell Biol* 2003,**23**:708-720.
  96. Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Parthoens E, Haegman M, Beyaert R, *et al.* A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *EMBO J* 2007,**26**:158-169.
  97. Paek KY, Kim CS, Park SM, Kim JH, Jang SK. RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 2008,**82**:12082-12093.
  98. Xu N, Chen CY, Shyu AB. Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 2001,**21**:6960-6971.
  99. Expert-Bezancon A, Le Caer JP, Marie J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *J Biol Chem* 2002,**277**:16614-16623.
  100. Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* 2005,**123**:1065-1078.
  101. Widera M, Erkelenz S, Hillebrand F, Krikoni A, Widera D, Kaisers W, *et al.* An intronic G run within HIV-1 intron 2 is critical for splicing regulation of vif mRNA. *J Virol* 2013,**87**:2707-2720.
  102. Veraldi KL, Arhin GK, Martincic K, Chung-Ganster LH, Wilusz J, Milcarek C. hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. *Mol Cell Biol* 2001,**21**:1228-1238.
  103. Patton JG, Mayer SA, Tempst P, Nadal-Ginard B. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 1991,**5**:1237-1251.
  104. Sharma S, Kohlstaedt LA, Damianov A, Rio DC, Black DL. Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat Struct Mol Biol* 2008,**15**:183-191.
  105. Matlin AJ, Southby J, Gooding C, Smith CW. Repression of alpha-actinin SM exon splicing by assisted binding of PTB to the polypyrimidine tract. *RNA* 2007,**13**:1214-1223.
  106. Xue Y, Zhou Y, Wu T, Zhu T, Ji X, Kwon YS, *et al.* Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol Cell* 2009,**36**:996-1006.
  107. Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* 2014,**83**:779-812.
  108. Chavatte L, Frolova L, Kisselev L, Favre A. The polypeptide chain release factor eRF1 specifically contacts the s(4)UGA stop codon located in the A site of eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem* 2001,**268**:2896-2904.
  109. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, *et al.* The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 2000,**100**:311-321.
  110. Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtsov S, Kisselev L, *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two

## 5. Literaturverzeichnis

- interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J* 1995,**14**:4065-4072.
111. Frolova L, Le Goff X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M, Kisselev L. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* 1996,**2**:334-341.
112. Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, *et al.* The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* 2010,**37**:196-210.
113. Harigaya Y, Parker R. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010,**1**:132-141.
114. Shoemaker CJ, Green R. Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* 2012,**19**:594-601.
115. Doma MK, Parker R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 2006,**440**:561-564.
116. Klauer AA, van Hoof A. Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012,**3**:649-660.
117. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 1999,**8**:1893-1900.
118. Smith JE, Baker KE. Nonsense-mediated RNA decay--a switch and dial for regulating gene expression. *Bioessays* 2015,**37**:612-623.
119. Lelivelt MJ, Culbertson MR. Yeast Upf proteins required for RNA surveillance affect global expression of the yeast transcriptome. *Mol Cell Biol* 1999,**19**:6710-6719.
120. Rehwinkel J, Letunic I, Raes J, Bork P, Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* 2005,**11**:1530-1544.
121. Ramani AK, Nelson AC, Kapranov P, Bell I, Gingeras TR, Fraser AG. High resolution transcriptome maps for wild-type and nonsense-mediated decay-defective *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2009,**10**:R101.
122. Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 2004,**36**:1073-1078.
123. Wittmann J, Hol EM, Jack HM. hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 2006,**26**:1272-1287.
124. Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 2000,**19**:6860-6869.
125. Bono F, Gehring NH. Assembly, disassembly and recycling: the dynamics of exon junction complexes. *RNA Biol* 2011,**8**:24-29.
126. Wiegand HL, Lu S, Cullen BR. Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,**100**:11327-11332.
127. Nott A, Le Hir H, Moore MJ. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 2004,**18**:210-222.
128. Le Hir H, Andersen GR. Structural insights into the exon junction complex. *Curr Opin Struct Biol* 2008,**18**:112-119.
129. Mishler DM, Christ AB, Steitz JA. Flexibility in the site of exon junction complex deposition revealed by functional group and RNA secondary structure alterations in the splicing substrate. *RNA* 2008,**14**:2657-2670.

## 5. Literaturverzeichnis

130. Gehring NH, Lamprinaki S, Hentze MW, Kulozik AE. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* 2009,**7**:e1000120.
131. Bono F, Ebert J, Lorentzen E, Conti E. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* 2006,**126**:713-725.
132. Andersen CB, Ballut L, Johansen JS, Chamieh H, Nielsen KH, Oliveira CL, *et al.* Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* 2006,**313**:1968-1972.
133. Dostie J, Dreyfuss G. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol* 2002,**12**:1060-1067.
134. Bono F, Ebert J, Unterholzner L, Guttler T, Izaurralde E, Conti E. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO Rep* 2004,**5**:304-310.
135. Gehring NH, Lamprinaki S, Kulozik AE, Hentze MW. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell* 2009,**137**:536-548.
136. Mingot JM, Kostka S, Kraft R, Hartmann E, Gorlich D. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J* 2001,**20**:3685-3694.
137. Bono F, Cook AG, Grunwald M, Ebert J, Conti E. Nuclear import mechanism of the EJC component Mago-Y14 revealed by structural studies of importin 13. *Mol Cell* 2010,**37**:211-222.
138. Zhang J, Sun X, Qian Y, LaDuca JP, Maquat LE. At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Mol Cell Biol* 1998,**18**:5272-5283.
139. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 1998,**23**:198-199.
140. Maquat LE, Li X. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* 2001,**7**:445-456.
141. Brocke KS, Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum Mol Genet* 2002,**11**:331-335.
142. Belgrader P, Cheng J, Maquat LE. Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993,**90**:482-486.
143. Carter MS, Doskow J, Morris P, Li S, Nhim RP, Sandstedt S, *et al.* A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem* 1995,**270**:28995-29003.
144. Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 2001,**106**:607-617.
145. Durand S, Lykke-Andersen J. Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013,**20**:702-709.
146. Rufener SC, Muhlemann O. eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013,**20**:710-717.

## 5. Literaturverzeichnis

147. Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2004,**432**:112-118.
148. Peixeiro I, Inacio A, Barbosa C, Silva AL, Liebhaber SA, Romao L. Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res* 2012,**40**:1160-1173.
149. Culbertson MR, Underbrink KM, Fink GR. Frameshift suppression *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors. *Genetics* 1980,**95**:833-853.
150. Bhattacharya A, Czaplinski K, Trifillis P, He F, Jacobson A, Peltz SW. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 2000,**6**:1226-1235.
151. Cheng Z, Muhlrud D, Lim MK, Parker R, Song H. Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J* 2007,**26**:253-264.
152. Chamieh H, Ballut L, Bonneau F, Le Hir H. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol* 2008,**15**:85-93.
153. Azzalin CM, Lingner J. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* 2006,**5**:1496-1498.
154. Chawla R, Redon S, Raftopoulou C, Wischnewski H, Gagos S, Azzalin CM. Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO J* 2011,**30**:4047-4058.
155. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, *et al.* Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2006,**20**:355-367.
156. Kurosaki T, Maquat LE. Rules that govern UPF1 binding to mRNA 3' UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013,**110**:3357-3362.
157. Zund D, Gruber AR, Zavolan M, Muhlemann O. Translation-dependent displacement of UPF1 from coding sequences causes its enrichment in 3' UTRs. *Nat Struct Mol Biol* 2013,**20**:936-943.
158. Hurt JA, Robertson AD, Burge CB. Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. *Genome Res* 2013,**23**:1636-1650.
159. Singh G, Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* 2008,**6**:e111.
160. Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 2008,**27**:736-747.
161. Kononenko AV, Mitkevich VA, Atkinson GC, Tenson T, Dubovaya VI, Frolova LY, *et al.* GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. *Nucleic Acids Res* 2010,**38**:548-558.
162. Cosson B, Berkova N, Couturier A, Chabelskaya S, Philippe M, Zhouravleva G. Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol Cell* 2002,**94**:205-216.

## 5. Literaturverzeichnis

163. Kervestin S, Li C, Buckingham R, Jacobson A. Testing the faux-UTR model for NMD: analysis of Upf1p and Pab1p competition for binding to eRF3/Sup35p. *Biochimie* 2012,**94**:1560-1571.
164. Joncourt R, Eberle AB, Rufener SC, Muhlemann O. Eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay by two genetically separable mechanisms. *PLoS One* 2014,**9**:e104391.
165. Fatscher T, Boehm V, Weiche B, Gehring NH. The interaction of cytoplasmic poly(A)-binding protein with eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 2014,**20**:1579-1592.
166. Fatscher T, Boehm V, Gehring NH. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell Mol Life Sci* 2015.
167. Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2001,**15**:2215-2228.
168. Denning G, Jamieson L, Maquat LE, Thompson EA, Fields AP. Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase-related kinase: characterization of the human SMG-1 RNA surveillance protein. *J Biol Chem* 2001,**276**:22709-22714.
169. Hodgkin J, Papp A, Pulak R, Ambros V, Anderson P. A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1989,**123**:301-313.
170. Pulak R, Anderson P. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev* 1993,**7**:1885-1897.
171. Okada-Katsuhata Y, Yamashita A, Kutsuzawa K, Izumi N, Hirahara F, Ohno S. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res* 2012,**40**:1251-1266.
172. Isken O, Kim YK, Hosoda N, Mayeur GL, Hershey JW, Maquat LE. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 2008,**133**:314-327.
173. Gatfield D, Izaurralde E. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 2004,**429**:575-578.
174. Huntzinger E, Kashima I, Fauser M, Sauliere J, Izaurralde E. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* 2008,**14**:2609-2617.
175. Eberle AB, Lykke-Andersen S, Muhlemann O, Jensen TH. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2009,**16**:49-55.
176. Fukuhara N, Ebert J, Unterholzner L, Lindner D, Izaurralde E, Conti E. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* 2005,**17**:537-547.
177. Jonas S, Weichenrieder O, Izaurralde E. An unusual arrangement of two 14-3-3-like domains in the SMG5-SMG7 heterodimer is required for efficient nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2013,**27**:211-225.
178. Unterholzner L, Izaurralde E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 2004,**16**:587-596.
179. Loh B, Jonas S, Izaurralde E. The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes Dev* 2013,**27**:2125-2138.

## 5. Literaturverzeichnis

180. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, *et al.* Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2005,**12**:1054-1063.
181. Schmidt SA, Foley PL, Jeong DH, Rymarquis LA, Doyle F, Tenenbaum SA, *et al.* Identification of SMG6 cleavage sites and a preferred RNA cleavage motif by global analysis of endogenous NMD targets in human cells. *Nucleic Acids Res* 2015,**43**:309-323.
182. Lykke-Andersen S, Chen Y, Ardal BR, Lilje B, Waage J, Sandelin A, *et al.* Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes. *Genes Dev* 2014,**28**:2498-2517.
183. Cho H, Kim KM, Kim YK. Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Mol Cell* 2009,**33**:75-86.
184. Lai T, Cho H, Liu Z, Bowler MW, Piao S, Parker R, *et al.* Structural basis of the PNRC2-mediated link between mRNA surveillance and decapping. *Structure* 2012,**20**:2025-2037.
185. Hogg JR, Goff SP. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 2010,**143**:379-389.
186. Buhler M, Steiner S, Mohn F, Paillusson A, Muhlemann O. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin- $\mu$  mRNA depends on 3' UTR length. *Nat Struct Mol Biol* 2006,**13**:462-464.
187. Toma KG, Rebbapragada I, Durand S, Lykke-Andersen J. Identification of elements in human long 3' UTRs that inhibit nonsense-mediated decay. *RNA* 2015.
188. Boehm V, Haberman N, Ottens F, Ule J, Gehring NH. 3' UTR length and messenger ribonucleoprotein composition determine endocleavage efficiencies at termination codons. *Cell Rep* 2014,**9**:555-568.
189. Jumaa H, Nielsen PJ. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J* 1997,**16**:5077-5085.
190. Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 2004,**13**:91-100.
191. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,**100**:189-192.
192. Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, *et al.* Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* 2003,**19 Suppl 1**:i118-121.
193. Hillman RT, Green RE, Brenner SE. An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol* 2004,**5**:R8.
194. Pan Q, Saltzman AL, Kim YK, Misquitta C, Shai O, Maquat LE, *et al.* Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* 2006,**20**:153-158.
195. Lejeune F, Cavaloc Y, Stevenin J. Alternative splicing of intron 3 of the serine/arginine-rich protein 9G8 gene. Identification of flanking exonic splicing enhancers and involvement of 9G8 as a trans-acting factor. *J Biol Chem* 2001,**276**:7850-7858.

## 5. Literaturverzeichnis

196. Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, Stevenin J, Soret J. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J* 2001,**20**:1785-1796.
197. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* 2007,**446**:926-929.
198. Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, O'Brien G, *et al.* Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* 2007,**21**:708-718.
199. Saltzman AL, Kim YK, Pan Q, Fagnani MM, Maquat LE, Blencowe BJ. Regulation of multiple core spliceosomal proteins by alternative splicing-coupled nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 2008,**28**:4320-4330.
200. Sun S, Zhang Z, Sinha R, Karni R, Krainer AR. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat Struct Mol Biol* 2010,**17**:306-312.
201. Anko ML, Morales L, Henry I, Beyer A, Neugebauer KM. Global analysis reveals SRp20- and SRp75-specific mRNPs in cycling and neural cells. *Nat Struct Mol Biol* 2010,**17**:962-970.
202. Anko ML, Muller-McNicoll M, Brandl H, Curk T, Gorup C, Henry I, *et al.* The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol* 2012,**13**:R17.
203. Zhang Z, Krainer AR. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell* 2004,**16**:597-607.
204. Rigby RE, Rehwinkel J. RNA degradation in antiviral immunity and autoimmunity. *Trends Immunol* 2015.
205. Balistreri G, Horvath P, Schweingruber C, Zund D, McInerney G, Merits A, *et al.* The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts Mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe* 2014,**16**:403-411.
206. LeBlanc JJ, Beemon KL. Unspliced Rous sarcoma virus genomic RNAs are translated and subjected to nonsense-mediated mRNA decay before packaging. *J Virol* 2004,**78**:5139-5146.
207. Mocquet V, Neusiedler J, Rende F, Cluet D, Robin JP, Terme JM, *et al.* The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J Virol* 2012,**86**:7530-7543.
208. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, *et al.* Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect* 2013,**15**:491-505.
209. Weil JE, Beemon KL. A 3' UTR sequence stabilizes termination codons in the unspliced RNA of Rous sarcoma virus. *RNA* 2006,**12**:102-110.
210. Quek BL, Beemon K. Retroviral strategy to stabilize viral RNA. *Curr Opin Microbiol* 2014,**18**:78-82.
211. Weil JE, Hadjithomas M, Beemon KL. Structural characterization of the Rous sarcoma virus RNA stability element. *J Virol* 2009,**83**:2119-2129.
212. Ramage HR, Kumar GR, Verschueren E, Johnson JR, Von Dollen J, Johnson T, *et al.* A combined proteomics/genomics approach links hepatitis C virus infection with nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell* 2015,**57**:329-340.
213. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously

## 5. Literaturverzeichnis

- healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981,**305**:1425-1431.
214. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983,**220**:868-871.
215. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985,**40**:9-17.
216. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985,**313**:277-284.
217. Rabson AB, Martin MA. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* 1985,**40**:477-480.
218. UNAIDS UN. UNAIDS 2013 report of the global AIDS epidemic. 2013.
219. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986,**47**:333-348.
220. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998,**93**:681-684.
221. Sharova N, Swingler C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J* 2005,**24**:2481-2489.
222. Clapham PR, McKnight A. HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* 2001,**58**:43-59.
223. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, *et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996,**85**:1135-1148.
224. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999,**17**:657-700.
225. Saadatmand J, Kleiman L. Aspects of HIV-1 assembly that promote primer tRNA(Lys3) annealing to viral RNA. *Virus Res* 2012,**169**:340-348.
226. Gao F, Chen Y, Levy DN, Conway JA, Kepler TB, Hui H. Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. *J Virol* 2004,**78**:2426-2433.
227. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 1995,**69**:5087-5094.
228. Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 1998,**273**:13347-13352.
229. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989,**86**:2525-2529.
230. Van Maele B, Debyser Z. HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* 2005,**7**:26-43.
231. Ott M, Geyer M, Zhou Q. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* 2011,**10**:426-435.
232. Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 1993,**67**:6365-6378.
233. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012,**2**:a006916.

## 5. Literaturverzeichnis

234. Widera M, Hillebrand F, Erkelenz S, Vasudevan AA, Munk C, Schaal H. A functional conserved intronic G run in HIV-1 intron 3 is critical to counteract APOBEC3G-mediated host restriction. *Retrovirology* 2014,**11**:72.
235. Erkelenz S, Hillebrand F, Widera M, Theiss S, Fayyaz A, Degrandi D, *et al.* Balanced splicing at the Tat-specific HIV-1 3' splice site A3 is critical for HIV-1 replication. *Retrovirology* 2015,**12**:29.
236. Erkelenz S, Poschmann G, Theiss S, Stefanski A, Hillebrand F, Otte M, *et al.* Tra2-Mediated Recognition of HIV-1 5' Splice Site D3 as a Key Factor in the Processing of vpr mRNA. *J Virol* 2013,**87**:2721-2734.
237. Izaurralde E, Mattaj IW. RNA export. *Cell* 1995,**81**:153-159.
238. Zapp ML, Hope TJ, Parslow TG, Green MR. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991,**88**:7734-7738.
239. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989,**338**:254-257.
240. Dayton ET, Konings DA, Powell DM, Shapiro BA, Butini L, Maizel JV, *et al.* Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *J Virol* 1992,**66**:1139-1151.
241. Daly TJ, Cook KS, Gray GS, Maione TE, Rusche JR. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* 1989,**342**:816-819.
242. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995,**82**:475-483.
243. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997,**90**:1051-1060.
244. Izaurralde E. A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm. *Eur J Cell Biol* 2002,**81**:577-584.
245. Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, Cornall A, Lidman M. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J Biosci* 2003,**28**:323-335.
246. Renkema GH, Saksela K. Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front Biosci* 2000,**5**:D268-283.
247. Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* 2005,**121**:315-332.
248. Linnemann T, Zheng YH, Mandic R, Peterlin BM. Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology* 2002,**294**:246-255.
249. Schibeci SD, Clegg AO, Biti RA, Sagawa K, Stewart GJ, Williamson P. HIV-Nef enhances interleukin-2 production and phosphatidylinositol 3-kinase activity in a human T cell line. *AIDS* 2000,**14**:1701-1707.
250. Wolf D, Witte V, Laffert B, Blume K, Stromer E, Trapp S, *et al.* HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* 2001,**7**:1217-1224.
251. Freed EO. HIV-1 Gag: flipped out for PI(4,5)P(2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,**103**:11101-11102.

## 5. Literaturverzeichnis

252. Exline CM, Feng Z, Stoltzfus CM. Negative and positive mRNA splicing elements act competitively to regulate human immunodeficiency virus type 1 vif gene expression. *J Virol* 2008,**82**:3921-3931.
253. Wissing S, Galloway NL, Greene WC. HIV-1 Vif versus the APOBEC3 cytidine deaminases: an intracellular duel between pathogen and host restriction factors. *Mol Aspects Med* 2010,**31**:383-397.
254. Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr Biol* 1996,**6**:1096-1103.
255. Kino T, Gragerov A, Slobodskaya O, Tsopanomichalou M, Chrousos GP, Pavlakis GN. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* 2002,**76**:9724-9734.
256. Zhao RY, Li G, Bukrinsky MI. Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol* 2011,**6**:216-229.
257. Guatelli JC. Interactions of viral protein U (Vpu) with cellular factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009,**339**:27-45.
258. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 1988,**331**:280-283.
259. Asang C, Hauber I, Schaal H. Insights into the selective activation of alternatively used splice acceptors by the human immunodeficiency virus type-1 bidirectional splicing enhancer. *Nucleic Acids Res* 2008,**36**:1450-1463.
260. Tranell A, Fenyo EM, Schwartz S. Serine- and arginine-rich proteins 55 and 75 (SRp55 and SRp75) induce production of HIV-1 vpr mRNA by inhibiting the 5'-splice site of exon 3. *J Biol Chem* 2010,**285**:31537-31547.
261. Swanson CM, Sherer NM, Malim MH. SRp40 and SRp55 promote the translation of unspliced human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* 2010,**84**:6748-6759.
262. Paz S, Caputi M. SRSF1 inhibition of HIV-1 gene expression. *Oncotarget* 2015,**6**:19362-19363.
263. Paz S, Krainer AR, Caputi M. HIV-1 transcription is regulated by splicing factor SRSF1. *Nucleic Acids Res* 2014.
264. Ropers D, Ayadi L, Gattoni R, Jacquenet S, Damier L, Branlant C, *et al.* Differential effects of the SR proteins 9G8, SC35, ASF/SF2, and SRp40 on the utilization of the A1 to A5 splicing sites of HIV-1 RNA. *J Biol Chem* 2004,**279**:29963-29973.
265. Jacquenet S, Decimo D, Muriaux D, Darlix JL. Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and 9G8 on HIV-1 RNA splicing and virion production. *Retrovirology* 2005,**2**:33.
266. Jablonski JA, Caputi M. Role of cellular RNA processing factors in human immunodeficiency virus type 1 mRNA metabolism, replication, and infectivity. *J Virol* 2009,**83**:981-992.
267. Wong RW, Balachandran A, Ostrowski MA, Cochrane A. Digoxin Suppresses HIV-1 Replication by Altering Viral RNA Processing. *PLoS Pathog* 2013,**9**:e1003241.
268. Wong R, Balachandran A, Mao AY, Dobson W, Gray-Owen S, Cochrane A. Differential effect of CLK SR Kinases on HIV-1 gene expression: potential novel targets for therapy. *Retrovirology* 2011,**8**:47.
269. Maldarelli F, Xiang C, Chamoun G, Zeichner SL. The expression of the essential nuclear splicing factor SC35 is altered by human immunodeficiency virus infection. *Virus Res* 1998,**53**:39-51.

## 5. Literaturverzeichnis

270. Ryo A, Suzuki Y, Arai M, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, *et al.* Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000,**16**:995-1005.
271. Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, *et al.* HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages. *Retrovirology* 2008,**5**:18.
272. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001,**114**:1439-1445.
273. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007,**129**:1261-1274.
274. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997,**91**:231-241.
275. Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 1999,**9**:125-128.
276. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 1999,**24**:186-191.
277. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005,**18**:13-24.
278. Diehl N, Schaal H. Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses* 2013,**5**:3192-3212.
279. Thorley JA, McKeating JA, Rappoport JZ. Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma* 2010,**244**:15-24.
280. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2010,**79**:803-833.
281. Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 2004,**6**:929-936.
282. Eierhoff T, Hrinčius ER, Rescher U, Ludwig S, Ehrhardt C. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* 2010,**6**:e1001099.
283. Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, *et al.* The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One* 2011,**6**:e16324.
284. Izmailyan R, Hsao JC, Chung CS, Chen CH, Hsu PW, Liao CL, *et al.* Integrin beta1 mediates vaccinia virus entry through activation of PI3K/Akt signaling. *J Virol* 2012,**86**:6677-6687.
285. Saeed MF, Kolokoltsov AA, Freiberg AN, Holbrook MR, Davey RA. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog* 2008,**4**:e1000141.
286. Liu Z, Tian Y, Machida K, Lai MM, Luo G, Fong SK, *et al.* Transient Activation of the PI3K-AKT Pathway by Hepatitis C Virus to Enhance Viral Entry. *J Biol Chem* 2012,**287**:41922-41930.
287. Tiwari V, Shukla D. Phosphoinositide 3 kinase signalling may affect multiple steps during herpes simplex virus type-1 entry. *J Gen Virol* 2010,**91**:3002-3009.
288. Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, *et al.* Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J Biol Chem* 2009,**284**:24512-24525.

## 5. Literaturverzeichnis

289. Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, *et al.* Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC $\beta$ 1 messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 2009,**150**:2087-2097.
290. Shultz JC, Goehe RW, Wijesinghe DS, Murudkar C, Hawkins AJ, Shay JW, *et al.* Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a. *Cancer Res* 2010,**70**:9185-9196.
291. Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehe RW, Hoeflerlin LA, Shultz MD, *et al.* hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *J Biol Chem* 2013,**288**:8575-8584.
292. Avota E, Harms H, Schneider-Schaulies S. Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. *Cell Microbiol* 2006,**8**:1826-1839.
293. Estmer Nilsson C, Petersen-Mahrt S, Durot C, Shtrichman R, Krainer AR, Kleinberger T, *et al.* The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins. *EMBO J* 2001,**20**:864-871.
294. Sciabica KS, Dai QJ, Sandri-Goldin RM. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J* 2003,**22**:1608-1619.
295. Hillebrand F, Erkelenz S, Diehl N, Widera M, Noffke J, Avota E, *et al.* The PI3K pathway acting on alternative HIV-1 pre-mRNA splicing. *J Gen Virol* 2014,**95**:1809-1815.
296. Wojcechowskyj JA, Didigu CA, Lee JY, Parrish NF, Sinha R, Hahn BH, *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Reveals Extensive Cellular Reprogramming during HIV-1 Entry. *Cell Host Microbe* 2013,**13**:613-623.
297. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999,**13**:2905-2927.
298. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008,**415**:333-344.
299. Hale BG, Jackson D, Chen YH, Lamb RA, Randall RE. Influenza A virus NS1 protein binds p85 $\beta$  and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,**103**:14194-14199.
300. Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, *et al.* Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* 2007,**81**:3058-3067.
301. Zhirnov OP, Klenk HD. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* 2007,**12**:1419-1432.
302. Benetti L, Roizman B. Protein kinase B/Akt is present in activated form throughout the entire replicative cycle of deltaU(S)3 mutant virus but only at early times after infection with wild-type herpes simplex virus 1. *J Virol* 2006,**80**:3341-3348.
303. Yu Y, Alwine JC. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol* 2002,**76**:3731-3738.
304. Dawson CW, Tramontanis G, Eliopoulos AG, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 2003,**278**:3694-3704.

## 5. Literaturverzeichnis

305. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010,**40**:310-322.
306. Kudchodkar SB, Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. Human cytomegalovirus infection alters the substrate specificities and rapamycin sensitivities of raptor- and rictor-containing complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,**103**:14182-14187.
307. Moody CA, Scott RS, Amirghahari N, Nathan CO, Young LS, Dawson CW, *et al.* Modulation of the cell growth regulator mTOR by Epstein-Barr virus-encoded LMP2A. *J Virol* 2005,**79**:5499-5506.
308. Zaborowska I, Walsh D. PI3K signaling regulates rapamycin-insensitive translation initiation complex formation in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 2009,**83**:3988-3992.
309. Pim D, Massimi P, Dilworth SM, Banks L. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 2005,**24**:7830-7838.
310. Spangle JM, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J Virol* 2010,**84**:9398-9407.
311. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987,**162**:156-159.
312. Kaisers W, Schaal H, Schwender H. rbamtools: an R interface to samtools enabling fast accumulative tabulation of splicing events over multiple RNA-seq samples. *Bioinformatics* 2015,**31**:1663-1664.
313. Graziani A, Galimi F, Medico E, Cottone E, Gramaglia D, Boccaccio C, *et al.* The HIV-1 nef protein interferes with phosphatidylinositol 3-kinase activation 1. *J Biol Chem* 1996,**271**:6590-6593.
314. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994,**269**:5241-5248.
315. Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, *et al.* PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 1995,**5**:393-403.
316. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994,**14**:4902-4911.
317. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002,**3**:370-379.
318. Patel NA, Chalfant CE, Watson JE, Wyatt JR, Dean NM, Eichler DC, *et al.* 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. *J Biol Chem* 2001,**276**:22648-22654.
319. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 2008,**321**:956-960.
320. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008,**456**:470-476.

## 5. Literaturverzeichnis

321. Akaike Y, Kurokawa K, Kajita K, Kuwano Y, Masuda K, Nishida K, *et al.* Skipping of an alternative intron in the srsf1 3' untranslated region increases transcript stability. *J Med Invest* 2011,**58**:180-187.
322. Owada T, Miyashita Y, Motomura T, Onishi M, Yamashita S, Yamamoto N. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection via increased membrane fluidity by a cationic polymer. *Microbiol Immunol* 1998,**42**:97-107.
323. Jumaa H, Guenet JL, Nielsen PJ. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1997,**17**:3116-3124.
324. Murray JM, Kelleher AD, Cooper DA. Timing of the components of the HIV life cycle in productively infected CD4+ T cells in a population of HIV-infected individuals. *J Virol* 2011,**85**:10798-10805.
325. Imbeault M, Giguere K, Ouellet M, Tremblay MJ. Exon level transcriptomic profiling of HIV-1-infected CD4(+) T cells reveals virus-induced genes and host environment favorable for viral replication. *PLoS Pathog* 2012,**8**:e1002861.
326. Imbeault M, Ouellet M, Tremblay MJ. Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4+ T cells. *Retrovirology* 2009,**6**:5.
327. van 't Wout AB, Lehrman GK, Mikheeva SA, O'Keeffe GC, Katze MG, Bumgarner RE, *et al.* Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines. *J Virol* 2003,**77**:1392-1402.
328. Levine AJ, Horvath S, Miller EN, Singer EJ, Shapshak P, Baldwin GC, *et al.* Transcriptome analysis of HIV-infected peripheral blood monocytes: gene transcripts and networks associated with neurocognitive functioning. *J Neuroimmunol* 2013,**265**:96-105.
329. Lefebvre G, Desfarges S, Uyttebroeck F, Munoz M, Beerenwinkel N, Rougemont J, *et al.* Analysis of HIV-1 expression level and sense of transcription by high-throughput sequencing of the infected cell. *J Virol* 2011,**85**:6205-6211.
330. Peng X, Sova P, Green RR, Thomas MJ, Korth MJ, Proll S, *et al.* Deep sequencing of HIV infected cells: insights into nascent transcription and host-directed therapy. *J Virol* 2014.
331. Zhou H, Zarubin T, Ji Z, Min Z, Zhu W, Downey JS, *et al.* Frequency and distribution of AP-1 sites in the human genome. *DNA Res* 2005,**12**:139-150.
332. Ohnishi YN, Sakumi K, Yamazaki K, Ohnishi YH, Miura T, Tominaga Y, *et al.* Antagonistic regulation of cell-matrix adhesion by FosB and DeltaFosB/Delta2DeltaFosB encoded by alternatively spliced forms of fosB transcripts. *Mol Biol Cell* 2008,**19**:4717-4729.
333. Gibellini D, Caputo A, Capitani S, La Placa M, Zauli G. Upregulation of c-Fos in activated T lymphoid and monocytic cells by human immunodeficiency virus-1 Tat protein. *Blood* 1997,**89**:1654-1664.
334. Gibellini D, Re MC, Ponti C, Celeghini C, Melloni E, La Placa M, *et al.* Extracellular Tat activates c-fos promoter in low serum-starved CD4+ T cells. *Br J Haematol* 2001,**112**:663-670.
335. Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC. Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ* 2014,**21**:1377-1387.
336. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Bell JC. In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 1997,**17**:5996-6001.

## 5. Literaturverzeichnis

337. Boelz S, Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. A chemiluminescence-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Biophys Res Commun* 2006,**349**:186-191.
338. Ajamian L, Abrahamyan L, Milev M, Ivanov PV, Kulozik AE, Gehring NH, *et al.* Unexpected roles for UPF1 in HIV-1 RNA metabolism and translation. *RNA* 2008,**14**:914-927.
339. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986,**59**:284-291.
340. Francois F, Klotman ME. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *J Virol* 2003,**77**:2539-2549.
341. Balabanian K, Harriague J, Decrion C, Lagane B, Shorte S, Baleux F, *et al.* CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2004,**173**:7150-7160.
342. Campa CC, Ciraolo E, Ghigo A, Germena G, Hirsch E. Crossroads of PI3K and Rac pathways. *Small GTPases* 2015,**6**:71-80.
343. del Real G, Jimenez-Baranda S, Mira E, Lacalle RA, Lucas P, Gomez-Mouton C, *et al.* Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J Exp Med* 2004,**200**:541-547.
344. Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Rojas A, Martinez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, *et al.* Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* 2007,**9**:838-846.
345. Yoder A, Yu D, Dong L, Iyer SR, Xu X, Kelly J, *et al.* HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* 2008,**134**:782-792.
346. Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *J Biol Chem* 2005,**280**:5581-5587.
347. Brognard J, Sierceki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 2007,**25**:917-931.
348. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 1996,**70**:4283-4290.
349. Caputi M, Freund M, Kammler S, Asang C, Schaal H. A bidirectional SF2/ASF- and SRp40-dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression. *J Virol* 2004,**78**:6517-6526.
350. Hillebrand F. Der Einfluss des PI3-Kinase Signalwegs auf die Regulation des alternativen HIV-1 prä-mRNA Spleißens. *Doctoral dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg* 2013.
351. Chugh P, Bradel-Tretheway B, Monteiro-Filho CM, Planelles V, Maggirwar SB, Dewhurst S, *et al.* Akt inhibitors as an HIV-1 infected macrophage-specific anti-viral therapy. *Retrovirology* 2008,**5**:11.
352. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010,**19**:1355-1366.
353. Lai MC, Tarn WY. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 2004,**279**:31745-31749.

## 5. Literaturverzeichnis

354. Wu H, Sun S, Tu K, Gao Y, Xie B, Krainer AR, *et al.* A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Mol Cell* 2010,**38**:67-77.
355. Loomis RJ, Naoe Y, Parker JB, Savic V, Bozovsky MR, Macfarlan T, *et al.* Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol Cell* 2009,**33**:450-461.
356. Munoz U, Puche JE, Hannivoort R, Lang UE, Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Hepatocyte growth factor enhances alternative splicing of the Kruppel-like factor 6 (KLF6) tumor suppressor to promote growth through SRSF1. *Mol Cancer Res* 2012,**10**:1216-1227.
357. Paz S, Lu ML, Takata H, Trautmann L, Caputi M. The SRSF1 RNA Recognition Motifs are strong inhibitors of HIV-1 replication. *J Virol* 2015.
358. Carninci P. Is sequencing enlightenment ending the dark age of the transcriptome? *Nat Methods* 2009,**6**:711-713.
359. Jiang Z, Zhou X, Li R, Michal JJ, Zhang S, Dodson MV, *et al.* Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cell Mol Life Sci* 2015,**72**:3425-3439.
360. Bushman FD, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, *et al.* Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathog* 2009,**5**:e1000437.
361. Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, *et al.* Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 2008,**135**:49-60.
362. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, *et al.* Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008,**319**:921-926.
363. Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, *et al.* Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 2008,**4**:495-504.
364. Houzet L, Jeang KT. Genome-wide screening using RNA interference to study host factors in viral replication and pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011,**236**:962-967.
365. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001,**20**:2390-2400.
366. Inoshima Y, Kohmoto M, Ikeda Y, Yamada H, Kawaguchi Y, Tomonaga K, *et al.* Roles of the auxiliary genes and AP-1 binding site in the long terminal repeat of feline immunodeficiency virus in the early stage of infection in cats. *J Virol* 1996,**70**:8518-8526.
367. Meiering CD, Rubio C, May C, Linial ML. Cell-type-specific regulation of the two foamy virus promoters. *J Virol* 2001,**75**:6547-6557.
368. Maurer B, Serfling E, ter Meulen V, Rethwilm A. Transcription factor AP-1 modulates the activity of the human foamy virus long terminal repeat. *J Virol* 1991,**65**:6353-6357.
369. Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer* 2005,**113**:951-960.
370. Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* 2003,**278**:43620-43627.

## 5. Literaturverzeichnis

371. Peloponese JM, Jr., Jeang KT. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J Biol Chem* 2006,**281**:8927-8938.
372. Roebuck KA, Brenner DA, Kagnoff MF. Identification of c-fos-responsive elements downstream of TAR in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type-1. *J Clin Invest* 1993,**92**:1336-1348.
373. Omary MB, Brenner DA, de Grandpre LY, Roebuck KA, Richman DD, Kagnoff MF. HIV-1 infection and expression in human colonic cells: infection and expression in CD4+ and CD4- cell lines. *AIDS* 1991,**5**:275-281.
374. Naghavi MH, Nowak P, Andersson J, Sonnerborg A, Yang H, Tracey KJ, *et al.* Intracellular high mobility group B1 protein (HMGB1) represses HIV-1 LTR-directed transcription in a promoter- and cell-specific manner. *Virology* 2003,**314**:179-189.
375. Canonne-Hergaux F, Aunis D, Schaeffer E. Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J Virol* 1995,**69**:6634-6642.
376. Colin L, Vandenhoudt N, de Walque S, Van Driessche B, Bergamaschi A, Martinelli V, *et al.* The AP-1 binding sites located in the pol gene intragenic regulatory region of HIV-1 are important for viral replication. *PLoS One* 2011,**6**:e19084.
377. Liu R, Lin Y, Jia R, Geng Y, Liang C, Tan J, *et al.* HIV-1 Vpr stimulates NF-kappaB and AP-1 signaling by activating TAK1. *Retrovirology* 2014,**11**:45.
378. Fisch TM, Prywes R, Simon MC, Roeder RG. Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev* 1989,**3**:198-211.
379. Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 1988,**334**:629-631.
380. Ryder K, Nathans D. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988,**85**:8464-8467.
381. Chen DB, Davis JS. Epidermal growth factor induces c-fos and c-jun mRNA via Raf-1/MEK1/ERK-dependent and -independent pathways in bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003,**200**:141-154.
382. Shankar E, Song K, Corum SL, Bane KL, Wang H, Kao HY, *et al.* Signaling Network Controlling Androgenic Repression of c-Fos in Prostate Adenocarcinoma Cells. *J Biol Chem* 2016.
383. Hou CH, Hou SM, Tang CH. Ultrasound increased BMP-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun, and AP-1 pathways in cultured osteoblasts. *J Cell Biochem* 2009,**106**:7-15.
384. Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 2003,**85**:747-752.
385. Knippers R. *Molekulare Genetik*: Thieme; 2006.
386. Zullo J, Stiles CD, Garcea RL. Regulation of c-myc and c-fos mRNA levels by polyomavirus: distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987,**84**:1210-1214.
387. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007,**8**:275-283.
388. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992,**358**:15-16.
389. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010,**2**:a000927.

## 5. Literaturverzeichnis

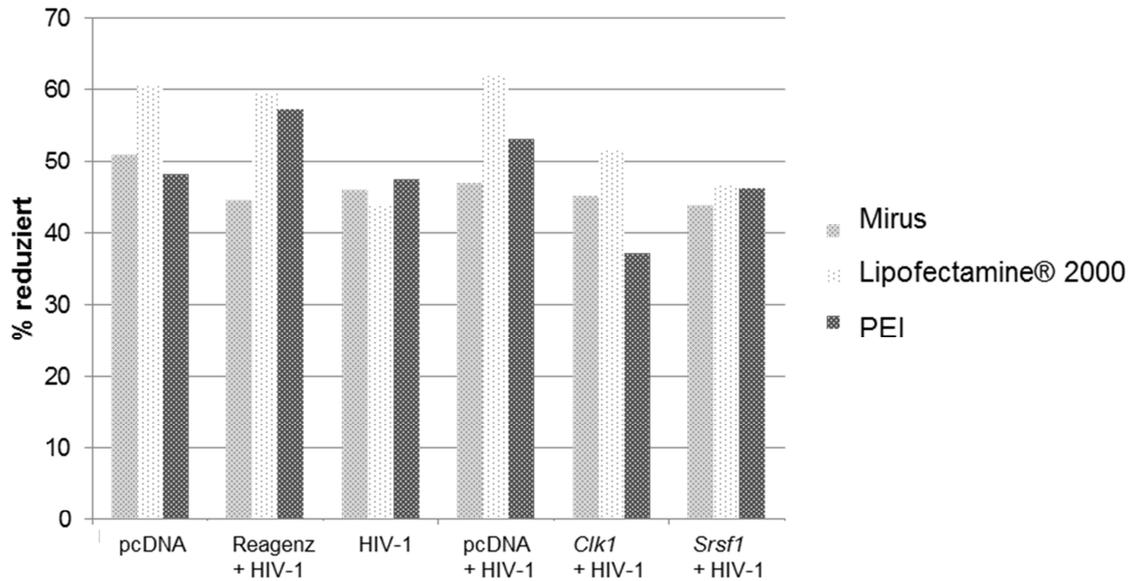
390. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, *et al.* p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005,**19**:2122-2137.
391. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, *et al.* p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2009,**11**:1135-1142.
392. Wei J, Noto J, Zaika E, Romero-Gallo J, Correa P, El-Rifai W, *et al.* Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of p53 protein isoforms and p53 response to cellular stresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012,**109**:E2543-2550.
393. Tang Y, Horikawa I, Ajiro M, Robles AI, Fujita K, Mondal AM, *et al.* Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53beta, an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene* 2012.
394. Das R, Yu J, Zhang Z, Gygi MP, Krainer AR, Gygi SP, *et al.* SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2007,**26**:867-881.
395. Bentley DL. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet* 2014,**15**:163-175.
396. Hanamura A, Caceres JF, Mayeda A, Franza BR, Jr., Krainer AR. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 1998,**4**:430-444.
397. Zhang M, Ma Z, Selliah N, Weiss G, Genin A, Finkel TH, *et al.* The impact of Nucleofection(R) on the activation state of primary human CD4 T cells. *J Immunol Methods* 2014,**408**:123-131.
398. Longo F, Marchetti MA, Castagnoli L, Battaglia PA, Gigliani F. A novel approach to protein-protein interaction: complex formation between the p53 tumor suppressor and the HIV Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995,**206**:326-334.
399. Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* 2002,**76**:2692-2702.
400. Mukerjee R, Claudio PP, Chang JR, Del Valle L, Sawaya BE. Transcriptional regulation of HIV-1 gene expression by p53. *Cell Cycle* 2010,**9**:4569-4578.
401. Yoon CH, Kim SY, Byeon SE, Jeong Y, Lee J, Kim KP, *et al.* p53-derived Host Restriction of HIV-1 Replication by PKR-mediated Tat Phosphorylation and Inactivation. *J Virol* 2015.
402. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, *et al.* Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 2014,**505**:509-514.
403. Boehme KA, Kulikov R, Blattner C. p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008,**105**:7785-7790.
404. Jansohn M. *Gentechnische Methoden*. 4. Auflage ed. München: Elsevier Spektrum akademischer Verlag; 2007.
405. Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology* 2013,**218**:1312-1321.
406. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009,**461**:788-792.
407. Shu C, Li X, Li P. The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014,**25**:641-648.

## 5. Literaturverzeichnis

408. Jacobsen L, Calvin S, Lobenhofer E. Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *Biotechniques* 2009,**47**:617-624.
409. Jumaa H, Nielsen PJ. Regulation of SRp20 exon 4 splicing. *Biochim Biophys Acta* 2000,**1494**:137-143.
410. Garcia D, Garcia S, Voinnet O. Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants. *Cell Host Microbe* 2014,**16**:391-402.
411. Jeong HJ, Kim YJ, Kim SH, Kim YH, Lee IJ, Kim YK, *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. *Plant Cell Physiol* 2011,**52**:2147-2156.
412. Withers JB, Beemon KL. Structural features in the Rous sarcoma virus RNA stability element are necessary for sensing the correct termination codon. *Retrovirology* 2010,**7**:65.
413. Gardner LB. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol Cell Biol* 2008,**28**:3729-3741.
414. Park J, Ahn S, Jayabalan AK, Ohn T, Koh HC, Hwang J. Insulin Signaling Augments eIF4E-Dependent Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells. *Biochim Biophys Acta* 2015.
415. Azzalin CM, Lingner J. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 2006,**16**:433-439.
416. Ajamian L, Abel K, Rao S, Vyboh K, Garcia-de-Gracia F, Soto-Rifo R, *et al.* HIV-1 Recruits UPF1 but Excludes UPF2 to Promote Nucleocytoplasmic Export of the Genomic RNA. *Biomolecules* 2015,**5**:2808-2839.
417. Serquina AK, Das SR, Popova E, Ojelabi OA, Roy CK, Gottlinger HG. UPF1 is crucial for the infectivity of human immunodeficiency virus type 1 progeny virions. *J Virol* 2013,**87**:8853-8861.
418. Kurosaki T, Li W, Hoque M, Popp MW, Ermolenko DN, Tian B, *et al.* A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation. *Genes Dev* 2014,**28**:1900-1916.
419. Deniaud A, Karuppasamy M, Bock T, Masiulis S, Huard K, Garzoni F, *et al.* A network of SMG-8, SMG-9 and SMG-1 C-terminal insertion domain regulates UPF1 substrate recruitment and phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 2015,**43**:7600-7611.

## 6. Anhang

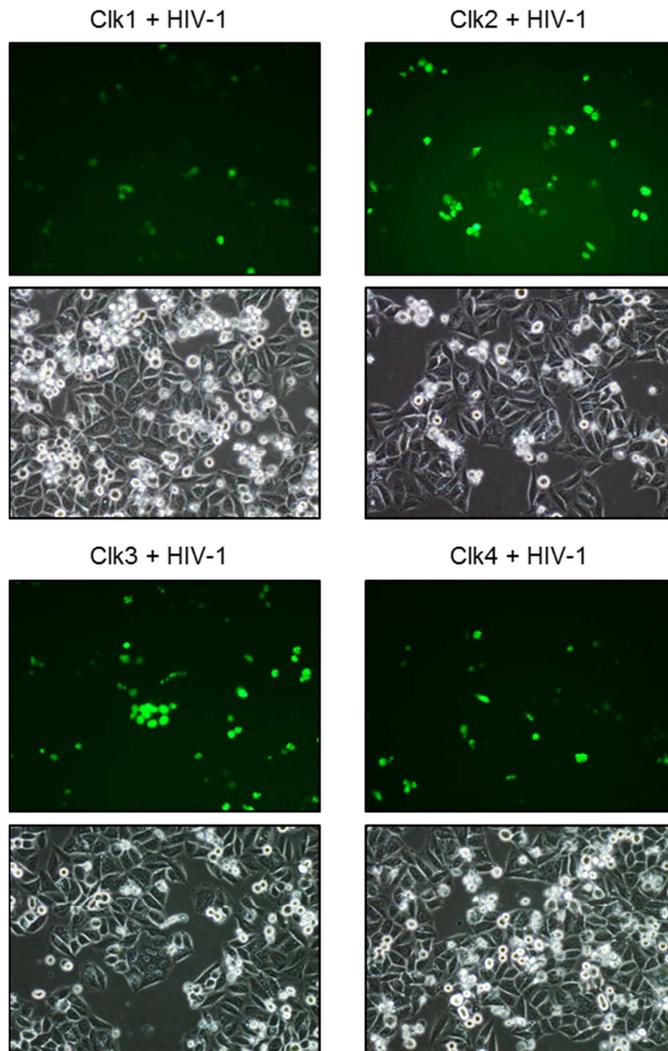
### 6.1 Alamar blue®-Assay



**Abbildung 6.1. Die unterschiedlichen Transfektionsreagenzen beeinflussen die Zellviabilität gleichermaßen.**

$2 \times 10^4$  HelaCD4<sup>+</sup> Zellen wurden pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät und mit oder ohne den angegebenen Plasmiden mittels der Transfektionsreagenzen Mirus, Lipofectamine® 2000 oder PEI transfiziert. Sofern angegeben, wurden die Zellen 24 Stunden später mit HIV-1 infiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe des Alamar blue® Reagenz und die Auswertung nach Herstellerangaben (Invitrogen). Relative Menge des reduzierten Alamar blue® Reagenz in Prozent ist dargestellt.

## 6.2 Fluoreszenzbilder der transfizierten *Clk* Expressionsplasmide

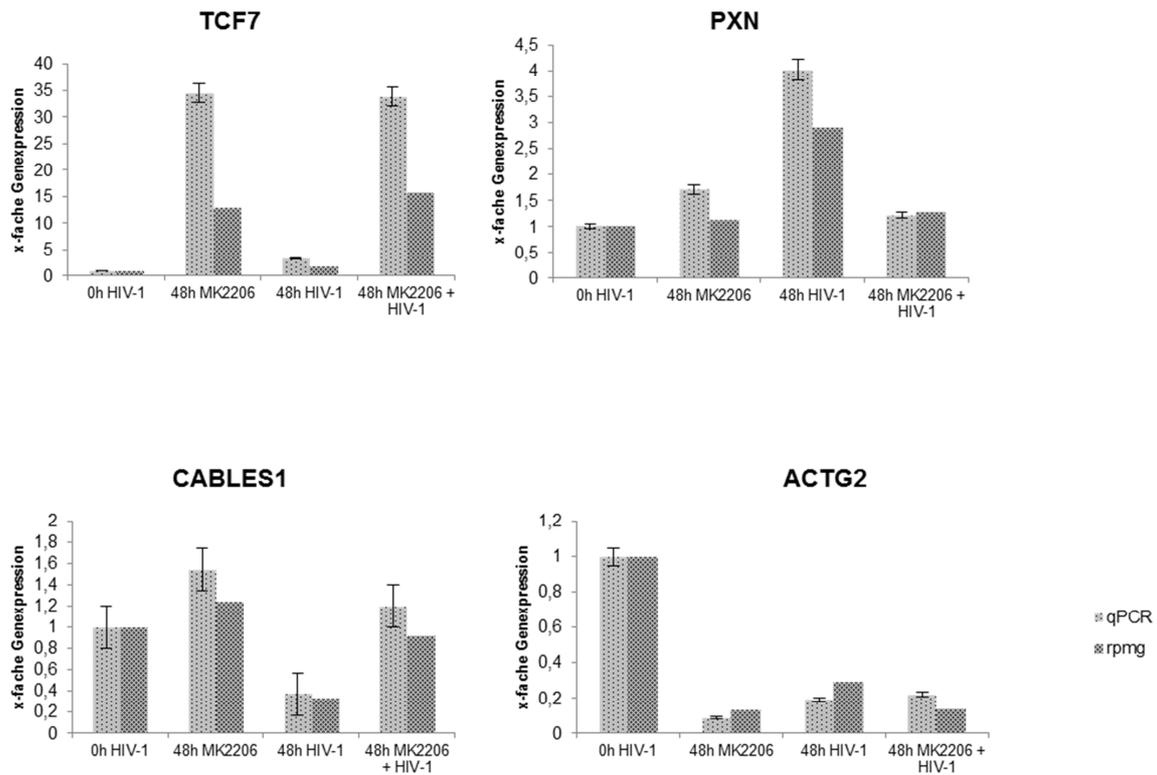


**Abbildung 6.2 Co-Expression der transfizierten *CLK* Expressionsplasmide.**

HeLa-CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Mirus mit den *CLK* Expressionsplasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Infektion mit HIV-1 (MOI 0,5). Weitere 48 Stunden später wurde die Expression der GFP-getaggten Plasmide mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

## 6. Anhang

### 6.3 qPCR Analysen zur Validierung der RNA deep sequencing Daten



**Abbildung 6.3** qPCR Analysen bestätigen die Daten der *RNA deep sequencing* Analysen.

PM1 Zellen wurden für 0 oder 48 Stunden mit HIV-1 infiziert (MOI 0,5). Alternativ wurden sie 30 min vor der Infektion mit dem Akt Inhibitor MK2206 (5  $\mu$ M) für 48 Stunden behandelt oder ausschließlich mit dem Inhibitor. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der Gene mit den Primern #4985 und #4986 (*TCF7*), #4975 und #4976 (*PXN*), #4977 und #4978 (*CABLES1*) und #4981 und #4982 (*ACTG2*) ermittelt. Für jede Kondition ist darüber hinaus der durchschnittliche rpmg Wert des Gens aus den *RNA deep sequencing* Analysen gezeigt.

## 6. Anhang

### 6.4 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death protein
bp	Basenpaare
BPS	<i>branch point sequence</i>
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumine)
CBC	<i>cap-binding complex</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	<i>copyDNA</i>
CHX	Cycloheximid
CLK	CDC2-like Kinase
CPSF	<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CSTF	<i>cleavage stimulating factor</i>
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CTE	<i>constitutive transport element</i>
ddH <sub>2</sub> O	Deionisiertes und destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMDC	Dimethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSE	<i>downstream element</i>

## 6. Anhang

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
EJC	exon junction complex
Env	HIV-1 Envelope-Protein
eRF	<i>eucaryotic release factor</i>
ESE	<i>exonic splice enhancer</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Gag	<i>Group Specific Antigen</i> , HIV-1
gqs	<i>gap quality score</i>
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
GH1	<i>human growth hormone 1</i>
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus 1</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
HTLV-1	humanen T-Zell Leukämie Virus Typ I
IN	Integrase (p32), HIV-1
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
ISE	<i>intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>intronic splicing silencer</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrix (p17), HIV-1
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>

## 6. Anhang

miRNA	<i>microRNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MV	Masern Virus
NC	Nucleocapsid (p7), HIV-1
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
Nef	<i>Negative Effector</i> , HIV-1
NES	Nukleares Export Signal
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PABPN1	<i>polyadenylate-binding nuclear protein 1</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PAS	poly(A)-Signal
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	Phosphoinosit-abhängige Kinase 1
pH	pH-Wert = $-\log[\text{H}^+]$
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	PH-Domain Leucin-Rich Repeat Protein Phosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK	Prä-Integrationskomplex
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PNRC2	<i>proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2</i>
Pol II	Polymerase II

## 6. Anhang

poly (A)	poly Adenin
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPT	Polypyrimidintrakt
PR	Protease (p10), HIV-1
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTB	Polypyrimidintrakt bindendes Protein
PTC	<i>premature termination codon</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensins homolog</i>
qPCR	quantitative PCR
rpmg	<i>reads per million gaps</i>
RRE	Rev Response Element
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RSE	RNA Stabilitätselement
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	Siehe
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumlaurylsulfat
SFV	Semliki Forest Virus
SHIP	<i>Src homology domain 2 containing inositol-5-phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMG1	<i>suppressor with morphogenetic effect on genitalia</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
SR	Serin/Arginin
SRE	Serum-responsives Element

## 6. Anhang

SS	Spleißstelle
STING	<i>stimulator of interferon responsive genes</i>
TAR	<i>transactivation-responsive region</i>
Tat	<i>trans-activator of transcription</i>
TBP	TATA-Box Bindeprotein
TC	<i>ternary complex</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
ü.N.	über Nacht
U2AF	<i>U2 auxiliary factor</i>
UPF1	<i>up frameshift protein 1</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VACV	Vaccinia Virus
Vif	<i>Viral Infectivity Factor</i>
Vpr	<i>Viral Protein R</i>
Vpu	<i>Viral Protein U</i>
WT	Wild-Typ
ZEBOV	Zaire Ebola Virus

### 6.5 Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

## 6. Anhang

M	Molar
mA	Milliampere
m	Milli, $10^{-3}$
$\mu$	Micro, $10^{-6}$
min	Minuten
n	Nano, $10^{-9}$
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)
sec	Sekunde
U	Unit
V	Volt
W	Watt

## Publikationen

**Diehl N**, Schaal H. Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses* 2013,**5**:3192-3212.

Hillebrand F, Erkelenz S, **Diehl N**, Widera M, Noffke J, Avota E, *et al.* The PI3K pathway acting on alternative HIV-1 pre-mRNA splicing. *J Gen Virol* 2014,**95**:1809-1815.

Erklärung

## **Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde bei keiner anderen Institution vorgelegt. Außerdem habe ich bisher keine erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Nora Diehl

Düsseldorf, der

Danksagung

## **Danksagung**

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Heiner Schaal für stetige Hilfestellungen, Diskussionen, wissenschaftliche Freiräume und motivierende Worte bedanken!

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die bereitwillige Übernahme des Referats und konstruktive Diskussionen in gemeinsamen Sitzungen.

Dr. Wolfgang Kaisers möchte ich für die bioinformatischen Lösungen danken.

Mein Dank gilt auch der Jürgen Manchot Stiftung und der Graduiertenschule „Moleküle der Infektion II (MOI II)“.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Timm und Prof Dr. Hartmut Hengel dafür bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Virologie fertigstellen konnte.

Besonders möchte ich mich bei Anna-Lena-Brillen, Steffen Erkelenz, Isabel Heide, Hanna Heinrichs, Frank Hillebrand, Claus Lenski, Lisa Müller, Jan Otto Peter, Frank Ujak, Lara Walotka, Björn Wefers und Marek Widera für den abwechslungsreichen Laboralltag bedanken!

Mein unermeßlicher Dank gilt meinen Eltern.