

Der Einfluss von Spleißstellen auf die Rev-abhängige
HIV-1 *env*-Expression

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Susanne Kammler

aus Duisburg

Düsseldorf

2003

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

Referent(in): Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Korreferent(in): PD Dr. Heiner Schaal
Prof. Dr. Werner Kunz

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 02.02.2004

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	7
Abkürzungen	9
Einheiten	11
1 Einleitung	12
1.1 Das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)	12
1.2 Die Transaktivierung der viralen Transkription durch Tat	15
1.3 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNAs	18
1.3.1 Zwei Trans-Ester-Reaktionen bilden die chemische Grundlage des Spleißens .	18
1.3.2 Exon/Intron-definierende Sequenzelemente der prä-mRNA	20
1.3.3 Die Assemblierung des Spleißosoms	21
1.3.4 <i>Cis</i> -wirkende, spleißregulierende Sequenzen	24
1.3.4.1 Die hnRNP-Proteinfamilie	24
1.3.4.2 Die SR-Proteinfamilie und SR-ähnliche Proteine	24
1.3.5 Das alternative Spleißen der polycistronischen HIV-1 prä-mRNA	28
1.3.5.1 Die HIV-1 Spleißstellen	29
1.3.5.2 <i>Cis</i> -wirkende, spleißregulierende Elemente im HIV-1 Genom	30
1.4 Regulierte Expression gespleißter und intronhaltiger HIV-1 Transkripte durch Rev	32
1.4.1 Der nukleocytoplasmatische mRNA-Export	32
1.4.2 Die Retention intronhaltiger RNAs im Kern	34
1.4.3 Der Export intronhaltiger HIV-1 mRNAs durch Rev	35
1.4.3.1 Die Rev/RRE-Interaktion vermittelt den Export intronhaltiger HIV-1 mRNAs	35
1.4.3.2 Interagiert Rev mit dem Spleißprozess?	37
1.5 Zielsetzung	39
2 Material und Methoden	40
2.1 Material	40
2.1.1 Chemikalien und Medien	40
2.1.2 Restriktionsendonukleasen	40
2.1.3 <i>E.coli</i> -Stämme	40
2.1.4 Zellkultur	40
2.1.5 Oligonukleotide	41

2.1.6	Rekombinante Plasmide	41
2.1.6.1	Env-Expressionsvektoren.....	41
2.1.6.2	Spleißkassetten mit einem Intron (pASV SDx/RRE/SAx pA).....	44
2.1.6.3	Plasmide zur Kotransfektion.....	49
2.1.6.4	Plasmide zur <i>in vitro</i> Transkription	50
2.1.6.5	Plasmide zur Protein-Expression	51
2.2	Methoden	52
2.2.1	Klonierung rekombinanter Plasmide.....	52
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	52
2.2.1.2	Restriktion und Aufreinigung von Plasmidfragmenten über Low melt Gelelektrophorese	52
2.2.1.3	Herstellung kompetenter <i>E.colis</i> mit Rubidium-Chlorid	52
2.2.1.4	Transformation kompetenter <i>E.colis</i>	53
2.2.1.5	Analytische Präparation von Plasmid-DNA	53
2.2.2	Präparative Plasmid-Isolierung über CsCl-Gradienten bzw. Anionen-Austauscher-Säulen	54
2.2.3	Zellkultur.....	54
2.2.4	Transfektion mittels Elektroporation bzw. nicht-liposomalem Transfektionsreagenz (Fugene™6)	55
2.2.5	Proteinanalysen mittels Western Blot.....	56
2.2.5.1	Proteinpräparation aus HeLa-Zellen.....	56
2.2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	56
2.2.5.3	Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay	57
2.2.5.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.2.5.5	Western Blot	57
2.2.6	RNA-Analysen mittels Northern Blot.....	58
2.2.6.1	Präparation von Gesamt-RNA.....	58
2.2.6.2	Präparation von Kern- und Cytoplasma-RNA mit hypotonischem Lysispuffer.....	59
2.2.6.3	Isolierung polyadenylierter RNA	60
2.2.6.4	Northern Blot-Analyse	60
2.2.6.5	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung von DIG-gekoppelten RNA-Sonden	61
2.2.7	Protein/RNA-Elektrophorese-Mobilitäts-Shift (EMSA).....	61
2.2.7.1	Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem ASF/SF2- bzw. Rev-Protein mit Histidin-tag.....	61
2.2.7.2	<i>In vitro</i> Transkription von [³² P]-markierten Transkripten.....	62
2.2.7.3	EMSA.....	62
2.2.8	<i>In vitro</i> Spleiß-Assay	63
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Der Spleißdonor	64
3.1.1	Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA ermöglicht das Spleißen und die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte	64
3.1.1.1	Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA ermöglicht die <i>env</i> -Expression	64
3.1.1.2	Die Positionen –1 bis –3 der Spleißdonorsequenz können zur Bindung der U1 snRNA beitragen.....	67

3.1.1.3	Eine zentrale Fehlbasenpaarung zwischen SD4 und der U1 snRNA verhindert die <i>env</i> -Expression und kann durch zusätzliche Bindungen in den Positionen -1 und +8 ausgeglichen werden	70
3.1.1.4	Die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zur U1 snRNA beeinflusst die Spleiß-effizienz <i>in vitro</i>	72
3.1.1.5	Ein neuer Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA-Bindestellen	74
3.1.1.6	Die 5'-wärts des SD4 liegende Exon 5-Sequenz beeinflusst das Spleißen und die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte	76
3.1.2	Spleißen und Stabilisierung der prä-mRNA sind differenzierbare Funktionen der U1 snRNA-Bindung.....	78
3.1.2.1	Die Position +1 der Spleißdonorsequenz ist für das Spleißen, aber nicht für die Stabilisierung der RNA essenziell	78
3.1.2.2	Eine U1 snRNA-Bindestelle im 5'-Leader stabilisiert ein Transkript ohne funktionellen Spleißdonor	80
3.1.2.3	Die RNA-Stabilisierung durch die U1 snRNA-Bindestelle erfolgte auf der Ebene der prä-mRNA.....	82
3.1.3	Die Tat/TAR-Interaktion ermöglicht die <i>env</i>-Expression von intrinsisch instabilen Transkripten ohne funktionellen Spleißdonor.....	84
3.1.3.1	Die Transaktivierung des HIV-1 LTRs durch Tat ermöglicht die Env-Expression einer spleißdefekten Mutante	84
3.1.3.2	Die Tat/TAR-Interaktion ermöglicht die <i>env</i> -Expression einer spleißdefekten Mutante auch unter der Kontrolle eines SV40early-Promotors.....	88
3.1.3.3	Die Effizienz der Env-Expression einer spleißdefekten Mutante geht mit dem Transaktivierungspotential von Tat einher	90
3.1.3.4	Die Transfektion von replikationskompetenten COS-7 Zellen führt zu einem erhöhten Expressionsniveau, erlaubt aber nicht die Env-Expression einer spleißdefekten Mutante	92
3.2	Der Spleißakzeptor	94
3.2.1	Die Effizienz des SA7 beeinflusst die Rev-abhängige Expression ungespleißter mRNA.....	95
3.2.1.1	Der SA7 ist nicht essenziell für die Rev-abhängige <i>env</i> -Expression	95
3.2.1.2	Der Austausch des SA7 gegen einen β -Globin Spleißakzeptor inhibiert die Rev-abhängige Expression ungespleißter mRNA	97
3.2.1.3	Eine Verbesserung der Spleißeffizienz des SA7 konkurriert mit der Rev-abhängigen <i>env</i> -Expression	99
3.2.1.4	Die Effizienzsteigerung des Spleißakzeptors führt <i>in vitro</i> zur ASF/SF2-unabhängigen Bildung von Lariat-Intermediaten.....	102
3.2.1.5	Rev zeigt <i>in vitro</i> keinen inhibierenden Einfluss auf das Spleißen von HIV-Konstrukten.....	104
3.2.2	Die HIV-1 Spleißakzeptoren – Ein Vergleich der Spleißeffizienz und der Rev-Reaktivität.....	106
3.2.2.1	Die HIV-1 Spleißakzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und ihrer Reaktion auf Rev	106
3.2.2.2	Die Spleißeffizienz und die Rev-Reaktivität der HIV-1 Spleißakzeptoren wird durch die nachfolgenden Exonsequenzen beeinflusst.....	110
3.2.3	Untersuchung der Spleißakzeptor-Effizienz am Beispiel des HIV-1 SA5	114
3.2.3.1	Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) enthält einen bidirektionales ESE	114
3.2.3.2	Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) bindet <i>in vitro</i> ASF/SF2	116
3.2.3.3	ASF/SF2 und SRp40 tragen zur Funktion des Exon 5-ESE <i>in vitro</i> bei.....	118
3.2.3.4	Der geringe Polypyrimidingehalt ist der entscheidende, aber nicht der einzige Grund für die geringe Spleißeffizienz des SA5 in Abwesenheit des ESE	120

3.2.3.5	Die Anzahl und die Position der Pyrimidine im Polypyrimidintrakt können die Spleißeffizienz entscheidend beeinflussen	123
4	Diskussion	126
4.1	Die Bedeutung der Spleißstellen für die Rev-Funktion	126
4.1.1	Die Rev-Funktion ist unabhängig von einem funktionellen Spleißdonor	126
4.1.2	Die Rev-Funktion konkurriert mit der Effizienz des Spleißakzeptors	128
4.2	Die Bedeutung der Spleißstellen für die RNA-Stabilität	130
4.2.1	Die Kernretention von Transkripten ohne Spleißakzeptor kann durch Rev aufgehoben werden	130
4.2.2	Die Inaktivierung des Spleißdonors führte zur Degradation der prä-mRNA	130
4.2.3	Spleißen und Stabilisierung sind trennbare Funktionen der U1 snRNA	132
4.3	Experimentelle Bestimmung der Spleißeffizienz von HIV-1 Spleißstellen ...	134
4.3.1	Die Ergebnisse der SD4-Mutationsanalyse können zur Beschreibung von funktionellen Spleißdonorsequenzen verwendet werden	134
4.3.2	Die Nutzung der Positionen -3, +7 und +8 in der U1 snRNA-Bindung trägt zur geringen Konservierung der Spleißdonorsequenz bei	135
4.3.3	Die Erkennung von Spleißdonoren im HIV-1 Genom	136
4.3.4	Die HIV-1 Akzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und ihrer Regulation durch Rev	138
4.3.5	Exondefinition im HIV-1	139
4.4	Perspektiven	143
5	Zusammenfassung	145
	Literaturverzeichnis	147
	Publikationen	173
	Lebenslauf	175

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Virologie des Universitäts-Klinikums Düsseldorf ausgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn PD Dr. Heiner Schaal für das interessante Thema, für seine experimentellen Anregungen, seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für seine motivierenden Worte im passenden Moment.

Herrn Prof. Dr. Werner Kunz und Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die bereitwillige Übernahme des Referats und ihr Interesse an meiner Arbeit.

PD. Dr. Ortwin Adams, Corinna Asang, Martina Austrup, Volker Budinger, Marcel Freund, Marianne Hipp, Carolin Konermann, Dr. Cathrin Krempe, Jörg Krummheuer, Cordula Leurs, Imke Meyer, Kornelia Neveling, Magdalena Stosik und Maria Thieme für die konstruktive Zusammenarbeit, für unzählige Hilfeleistungen und dafür, dass man mit euch nicht nur gut arbeiten sondern auch gut feiern konnte.

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologie für die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Jorgen Kjems, Dr. Thomas O. Tange, Jacob Nilsen und Annette Dirac für den konstruktiven Aufenthalt an der Universität Aarhus und für ihre Gastfreundschaft.

meiner Familie, Jörg Krummheuer und Dr. Katja Kapp für ihre Unterstützung.

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ALV	Avian Leukosis Virus
Amp	Ampicillin
[α - ³² P]ATP	[α - ³² P] markiertes Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ASF/SF2	Alternative splicing factor/Splicing factor 2, ein SR-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPS	Verzweigungssequenz (branch point sequence)
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	copyDNA
CP	Creatin-Phosphat
CRS	Cis-acting repressive sequence
CTE	Constitutive transport element
ddH ₂ O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DMDC	Dimethyldicarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	Exon junction complex
Env	HIV-1 Envelope-Protein, wird gespalten in gp120 und gp41
<i>env</i>	kodiert das HIV-1 Env Protein
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum)
<i>gag</i>	Group specific antigen, kodiert für Strukturproteine des HIV-1
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
hgh	humanes Wachstumshormon
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1
INS	Instability sequence
IPTG	Isopropyl-1-thio- β D-galactopyranoside
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer

Abkürzungen und Einheiten

LB	LB-Medium (Luria broth base medium)
LTR	Long terminal repeat
Luc	Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i>
MLV	Murines Leukämie Virus (murine leukemia virus)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NE	Kernextrakt (nuclear extract)
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
pA	Polyadenylierungssignal
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	$-\log[H^+]$
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
PPT	Polypyrimidin-Trakt
Rev	HIV-1 Regulationsprotein (regulator of virion protein expression)
RRM	RNA-Bindedomäne (RNA recognition motif)
RRE	Rev-Bindestelle in HIV-1 Transkripten (Rev responsive element)
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Reverse Transkriptase bzw. Reverse Transkription
SA	Spleißakzeptor, 3'-Spleißstelle
SD	Spleißdonor, 5'-Spleißstelle
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
SRp	SR (Serin/Arginin-reiches)-Protein
SSC	Standard saline citrate
TAR	Tat-Bindestelle in HIV-1 Transkripten (trans-activation response region)
Tat	HIV-1 Regulationsprotein (Trans-activator of transcription)
U2AF	U2 snRNP auxiliary factor
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
vgl.	vergleiche
w/v	weight per volume

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
l	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minute
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
sek	Sekunde
U	Unit
V	Volt
W	Watt

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)

1981 wurden in den USA die ersten Fälle von AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) beschrieben (125, 244). Es handelt sich dabei um eine erworbene Immunschwäche, die, nach einer oft über Jahre andauernden symptomlosen Phase, zu zunehmenden Defekten in der zellvermittelten Immunantwort führt. Als auslösender Erreger wurde ein Retrovirus identifiziert (14, 113). Die verschiedenen Isolate wurden unter dem Namen Humanes Immundefizienz Virus (HIV) zusammengefasst und der Familie der Lentiviren zugeordnet (71, 120, 138). Bis heute hat sich HIV zu einer Pandemie entwickelt. Für das Jahr 2002 wurde die Zahl der weltweit infizierten Personen vom AIDS Programm der Vereinten Nationen (UNAIDS) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit 42 Millionen angegeben (<http://www.who.int/hiv/facts/en/>, AIDS epidemic update Dec 2002). Allein 2002 infizierten sich schätzungsweise 5 Millionen Menschen mit HIV und 3,1 Millionen Menschen starben an den Folgen der Infektion. Trotz intensiver Bemühungen steht bis heute kein Impfstoff gegen HIV zur Verfügung. Um mit den auftretenden Resistenzen gegen die vorhandenen Medikamente Schritt halten zu können, ist es von essenzieller Bedeutung die vielfältigen Interaktionen zwischen HIV und der Wirtszelle auf molekularer Ebene zu verstehen.

Der Infektionszyklus von HIV-1 (Abb. 1, (253)) beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Membran der Wirtszelle. Das virale Oberflächenprotein (SU) gp120, ein Spaltprodukt des Env-Proteins (gp160), interagiert mit dem zellulären CD4-Rezeptor und einem zellulären Chemokinrezeptor, der als Korezeptor dient. Makrophagentrope Viren interagieren dabei mit dem Korezeptor CCR5, T-Zelltrope Viren mit dem CXCR4-Rezeptor (210). Die mit der Rezeptor-Bindung einhergehende Konformationsänderung des gp120 ermöglicht die Membranfusion durch den N-Terminus des mit gp120 assoziierten Transmembranproteins (TM) gp41 (106, 306). Nach der Infektion der Zelle wird die virale (+)RNA von der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben. Die dsDNA wird, als Bestandteil eines Präintegrationskomplexes, aktiv durch die Kernporen in den Zellkern transportiert (78, 103) und dort als Provirus stabil in das Genom der Wirtszelle integriert (42, 76).

Die Virusreplikation unterliegt den zellulären Regulationsmechanismen. Im Vergleich zur Transkription und Prozessierung zellulärer RNAs zeigen sich jedoch einige Besonderheiten. So steht das Virusgenom unter der Kontrolle eines einzigen Promotors im 5'-LTR und wird, unter der Regulation des viralen Proteins Tat, von der zellulären RNA-Polymerase II (RNAP II) in eine polycistronische prä-mRNA transkribiert (218). Diese prä-mRNA von ca. 9,2 kb

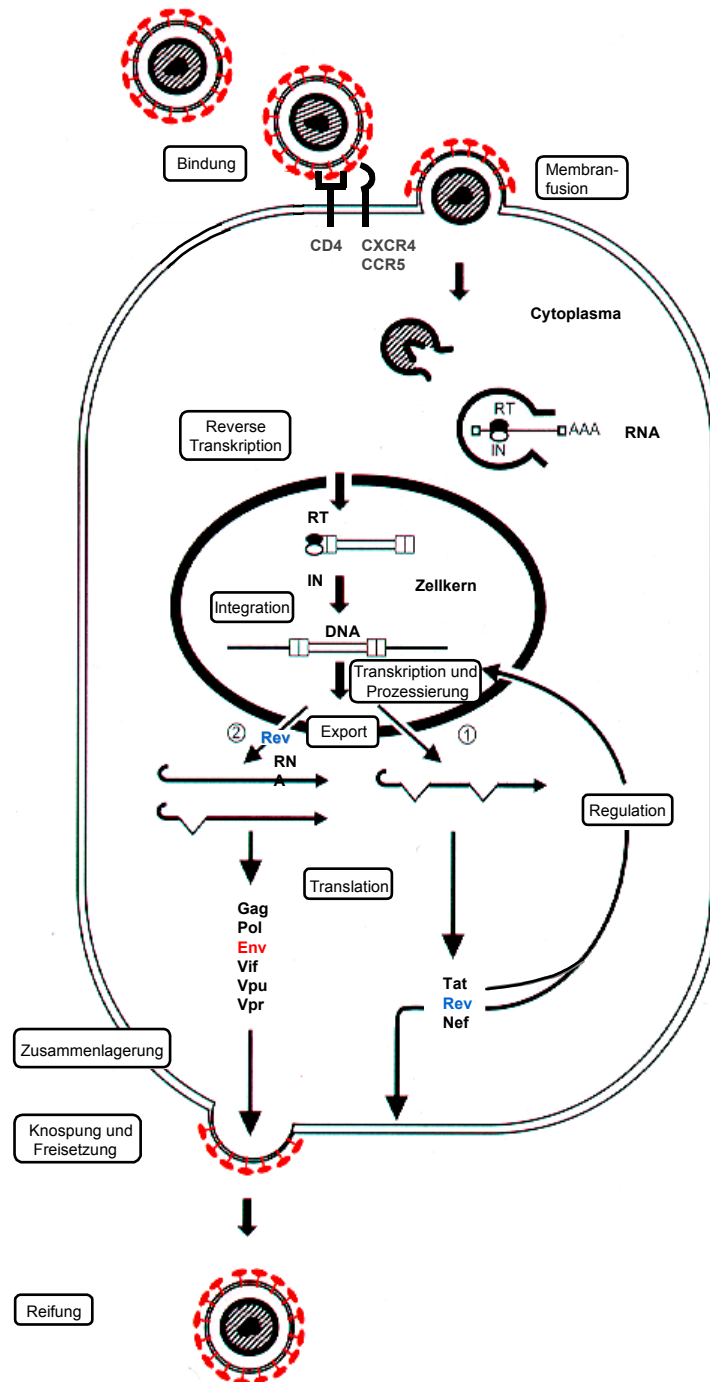


Abb. 1: Schematische Darstellung des HIV-1 Replikationszyklus

(modifiziert nach [253]). Die Bindung von HIV-1 an die Wirtszelle und die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran werden über die Interaktion der viralen Glykoproteine gp120 und gp41 (Env, rot) mit dem CD4-Rezeptor und einem Chemokin-Korezeptor (CXCR4, CCR5) vermittelt. Die virale (+)RNA wird von der viralen Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben, in Form eines Präintegrationskomplexes in den Zellkern importiert und von der viralen Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle integriert. Tat transaktiviert die Transkription der polycistronischen prä-mRNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Nach der Prozessierung durch zelluläre Enzyme werden in der frühen Infektionsphase gespleißte Transkripte in das Cytoplasma exportiert [1], die die Proteine Tat, Rev, Nef und, je nach Isolat, auch Tev kodieren. Rev wird in den Kern importiert und ermöglicht in der späten Infektionsphase den Export von intronhaltigen mRNAs in das Cytoplasma [2]. Nach Translation der intronhaltigen mRNAs, die für die Proteine Gag, Pol, Env, Vif, Vpu und Vpr kodieren, beginnt die Zusammenlagerung der Virusbestandteile an der Zellmembran, gefolgt von der Freisetzung neuer Virionen und der Reifung zum infektiösen Virus.

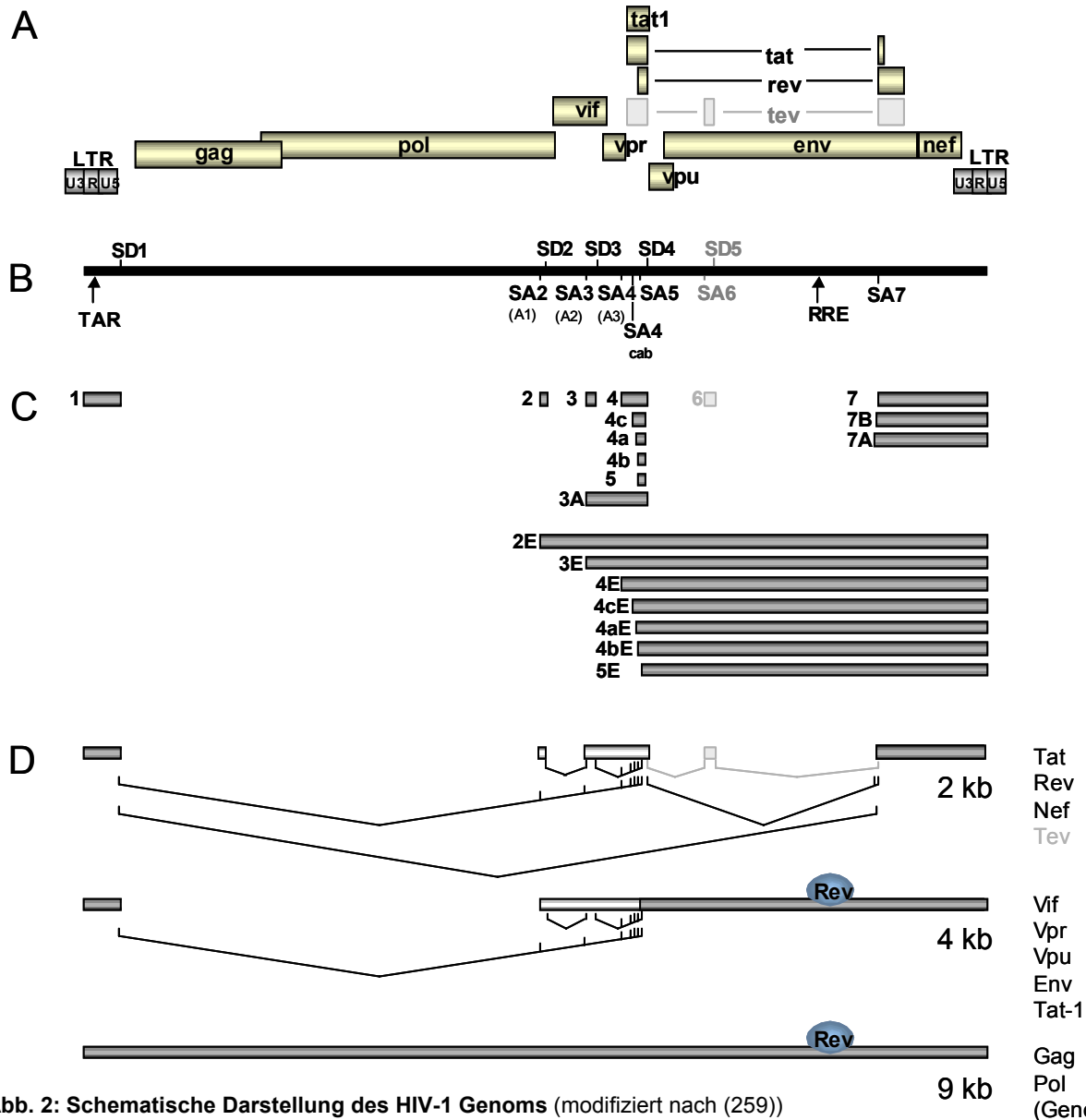


Abb. 2: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms (modifiziert nach (259))

A: Offene Leserahmen (ORFs, gelb) im HIV-1 Genom: gag (group specific antigen) kodiert den Vorläufer für die Strukturproteine des Viruskapsids (p17, p24 und p9/p7); pol (Polymerase) kodiert den Vorläufer für die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase; env (envelope, gp160) wird gespalten in das extrazelluläre Membranprotein (SU, gp120) und das Transmembranprotein (TM, gp41); vif (virion infectivity factor), vpr, vpu (virusprotein R und U) und nef (negative factor) kodieren akzessorische Proteine; tat (siehe 1.2) und rev (siehe 1.4) kodieren die essenziellen Regulationsproteine. Der tev-ORF (grau) wird im HIV-1 Isolat NL4-3, das in dieser Arbeit verwendet wurde, nicht exprimiert (siehe 1.3.5.2). Das Genom wird am 5'- und 3'-Ende von LTRs (long terminal repeats) begrenzt, die bei der Reversen Transkription aus den Regionen U3, U5 (unique 3'/5') und R (repeat) entstehen. Der 5'-LTR enthält den HIV-Promotor, der 3'-LTR die Polyadenylierungssequenz.

B: Spleißstellen und RNA-Sekundärstrukturen der HIV-1 prä-mRNA. SD: Spleißdonor (5'-Spleißstelle); SA: Spleißakzeptor (3'-Spleißstelle). Die Spleißstellen SD5 und SA6 (grau) werden in der NL4-3 Sequenz nicht genutzt. In der neueren Literatur wird parallel eine teilweise abweichende Nummerierung der Spleißakzeptoren verwendet (in Klammern). TAR (trans-activation response sequence) ist die Bindesequenz des viralen Transkriptionsaktivators Tat; RRE (rev responsive element) ist die Bindesequenz von Rev.

C: Die Nomenklatur der viralen Exons.

D: Darstellung der viralen mRNA-Klassen. In der frühen Infektionsphase wird die prä-mRNA zu vollständig gespleißten Transkripten der 2 kb Klasse prozessiert. In der späten Phase werden durch die Bindung von Rev an das RRE auch intronhaltige mRNAs der 4 und 9 kb Klasse in das Cytoplasma exportiert. Einige Abschnitte (dunkelgrau) kommen jeweils in allen Transkripten der jeweiligen RNA-Klassen vor. Die 5'-Sequenzen der 2 und 4 kb Klasse variieren (weiß) durch alternatives Spleißen. Dünne Linien symbolisieren Spleißereignisse. Rechts sind die von den verschiedenen mRNA-Klassen exprimierten Genprodukte angegeben.

(Abb. 2B) enthält mindestens 9 verschiedene offene Leseraster (Open reading frames, ORFs). Von diesen ORFs werden die bei allen Retroviren vorkommenden Enzyme und Strukturproteine Gag, Pol und Env, sowie zusätzlich die regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu translatiert (Abb. 2A) (105). Die Nutzung der sich teilweise überlagernden ORFs wird durch alternatives Spleißen der prä-mRNA gewährleistet. Die regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie das akzessorische Protein Nef, werden von vollständig gespleißten Transkripten exprimiert (Abb. 2D). Große Teile der *gag/pol*- sowie der *env*-Sequenz liegen jedoch in Bereichen, die als Intron definiert sind. Das virale Protein Rev-vermittelt den nukleocytoplasmatischen Export intronhaltiger Transkripte und ermöglicht damit die Expression der Strukturproteine und Enzyme, sowie die Bereitstellung vollständiger Genomsequenzen für neue Virione. In den folgenden Abschnitten werden die molekularen Grundlagen der viralen Transkriptionsregulation durch Tat, das Spleißen eukaryotischer und viraler RNAs sowie der mRNA-Export durch Rev beschrieben.

1.2 Die Transaktivierung der viralen Transkription durch Tat

Bei der reversen Transkription entstehen am 5'- und am 3'-Ende der proviralen DNA identische Sequenzwiederholungen (Long terminal repeats, LTRs). Bei der nachfolgenden Virusreplikation wird jedoch selektiv die Promotorsequenz im 5'-LTR für die virale Transkription genutzt. Der Transkriptionsstart befindet sich an der Grenze zwischen der U3- und der R-Region (Abb. 2A) (4, 275). Ausgehend vom HIV-1 Promotor können zwei Transkriptklassen generiert werden: kurze, nicht polyadenylierte und nicht kodierende Transkripte, die durch vorzeitige Termination der RNA-Polymerase II (RNAP II) entstehen sowie polyadenylierte Vollängentranskripte (168). Die Entstehung der ca. 60 nt kurzen Abbruch-Transkripte (168, 272) ist abhängig vom IST (inducer of short transcripts), einem transkriptionsaktivierenden DNA-Element, dessen core-Region von -5 bis +26 reicht (326). Am 3'-Ende der entstehenden Transkripte bildet sich ein „pause hairpin“. Diese RNA-Sekundärstruktur trägt zur Verlangsamung und nachfolgender Dissoziation der RNAP II vom Transkript bei (272). Auch bei eukaryotischen Genen, wie z. B. *c-myc*, *c-fos* oder *HSP70*, ist eine Regulation der Genexpression durch Verzögerung der RNAP II 20-60 Nukleotide 3'-wärts des Promotors beschrieben worden (290). Dieses „promoter proximal pausing“ kann durch positive Transkriptionselongationsfaktoren (pTEF) aufgehoben werden, die den RNAP II Initiationskomplex in einen prozessiven Elongationskomplex überführen (279, 327). Für die Transkription von HIV-1 Vollängentranskripten ist die Ausbildung einer zweiten RNA-Sekundärstruktur, TAR (Trans-activation response) nötig.

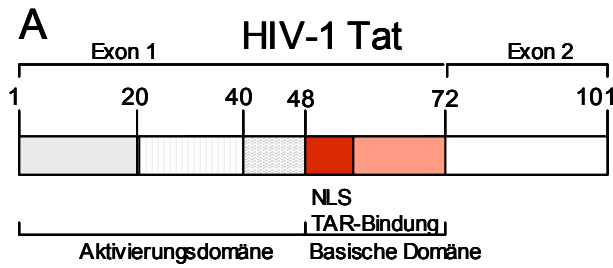
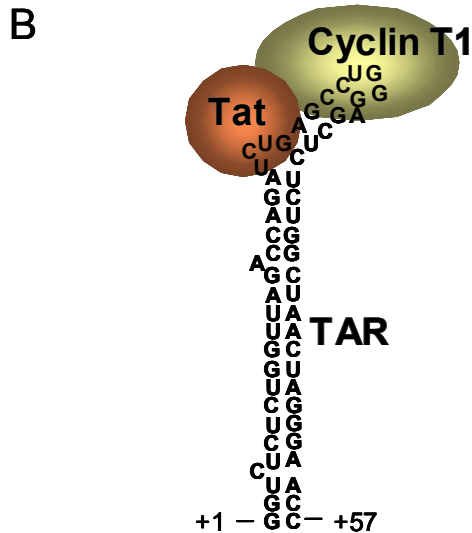


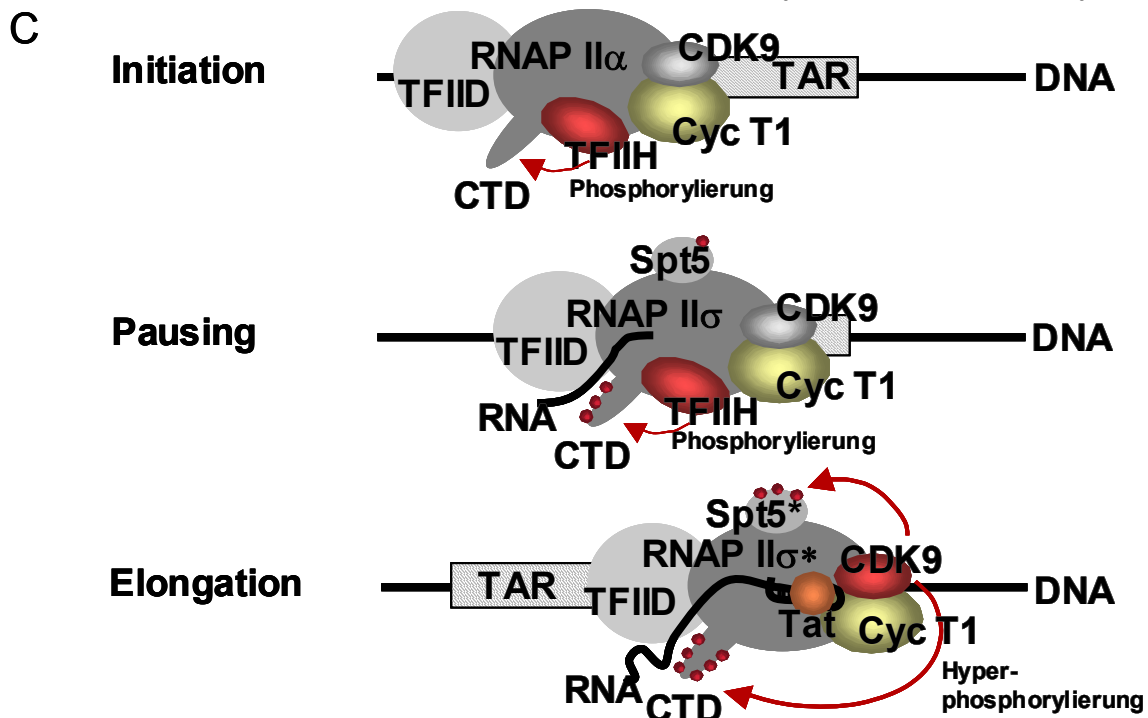
Abb. 3: Die Transaktivierung der viralen Transkription durch Tat

A: Schematische Darstellung der Tat-Protein-Domänen (modifiziert nach (161, 199)). Das 5'-Exon (AS 1-72) kodiert für eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AS 1-48). Sie besteht aus einer sauren, prolinreichen Region (AS 1-20), die eine amphipathische α -Helix ausbildet, einer cysteinreichen Region (AS 21-40) und einer hochkonservierten Core-Domäne (AS 40-48). Die basische Domäne (AS 48-72) enthält das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die TAR-Bindesequenz. Der C-terminale Bereich der basischen Domäne trägt zur Kernlokalisierung und zur Tat/TAR-Bindung bei. Das 2. kodierende Exon (AS 72-101) ist unter Zellkulturbedingungen für die Funktion von Tat nicht essenziell.



B: Die TAR RNA-Sekundärstruktur wird am 5'-Ende aller HIV-1 Transkripte (Pos +1 bis +59) ausgebildet. An TAR bindet Tat und sein zellulärer Cofaktor Cyclin T1, eine Untereinheit des positiven Transkriptions-Elongationsfaktors p-TEFb.

C: Tat verhindert die Termination der Transkription (modifiziert nach (32)). Bei der Transkriptionsinitiation phosphoryliert der Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (RNAP II α). Der bereits assoziierte, positive Transkriptionsfaktor b (p-TEFb), aus den Untereinheiten Cyclin abhängige Kinase 9 (CDK9) und Cyclin T1, ist inaktiv. Danach verlässt TFIIH den Transkriptionskomplex. Die Ausbildung eines pausing hairpins, einer RNA-Sekundärstruktur am 5'-Ende des Transkripts, verlangsamt die RNAP II, was in Abwesenheit von Tat und Spt5 zum Transkriptionsabbruch führt. Durch die Tat/TAR/CyclinT1-Interaktion wird die CDK9 aktiviert. Die aktivierte CDK9 hyperphosphoryliert die CTD der RNAP II (RNAP II σ^*) und phosphoryliert Spt5. Dadurch wird die Elongation der Transkripte ermöglicht.



TAR ist in der R-Region des 5'-LTRs von +1 bis +59 lokalisiert und konkurriert mit der Ausbildung des pause hairpins (272). Erst durch die Bindung des viralen Regulationsproteins Tat (Trans-activating factor) an TAR (Abb. 3B) (20, 163, 332, 335) kann die RNAP II in einen prozessiven Elongationskomplex überführt werden.

Tat ist daher für die Virusreplikation essenziell und führt, abhängig von Zelltyp und Versuchssystem, zu einer 10-300-fachen Erhöhung der viralen Genexpression (7, 104, 168, 336). Es ist ein, je nach HIV-Isolat, 86 bzw. 101 Aminosäuren langes, RNA-bindendes Protein, das von zwei Exons kodiert wird (Abb. 3A). Das erste Exon (AS 1-72), das in der Zellkultur für die Funktionsfähigkeit von Tat ausreichend ist (161, 390), enthält zwei funktionelle Domänen (199): die N-terminale Aktivierungsdomäne (AS 1-48) (82) und eine basische Domäne (AS 49-72), die für die Kernlokalisierung von Tat (144, 300) und für die Bindung an TAR (Abb. 3B) verantwortlich ist (285, 299, 378).

Es gibt unterschiedliche Befunde darüber, ob die Tat/TAR-Interaktion die Transkriptionsinitiation fördern kann (161, 169, 205). Allgemein anerkannt ist dagegen die Funktion der Tat/TAR-Wechselwirkung in der Transkriptionselongation (94, 172, 243, 366). Bereits 1987 war für Tat erstmalig eine Funktion als Anti-Terminationsfaktor vorgeschlagen worden (168). *In vitro* sind für die Bindung von Tat nur der Stamm und der Bulge von TAR nötig, für die Transaktivierung *in vivo* jedoch die komplette Struktur einschliesslich des Loops (163). Diese Beobachtung und Komplementationsversuche in Nagerzellen, in denen nur eine geringe Transaktivierung durch Tat erfolgt (6), führten zu der Vermutung, dass ein zellulärer Faktor an der Transaktivierung beteiligt ist. Als Cofaktor wurde das humane Cyclin T1 identifiziert, das direkt mit Tat und dem TAR-Loop interagiert (379) und die Assoziation von Tat an den Transkriptionskomplex vermittelt (92, 403). Cyclin T1 ist eine Untereinheit des zellulären, positiven Transkriptionselongationsfaktors b (p-TEFb oder TAK, Tat associated kinase) (279). Die zweite Untereinheit von p-TEFb, die Cyclin-abhängige Kinase 9 (CDK9), wird durch die Tat/TAR/CyclinT1-Interaktion aktiviert und hyperphosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der RNAP II (Abb. 3C) (65, 114, 400). Die Phosphorylierung der CTD ist ein entscheidender Schritt bei der Umwandlung des Transkriptionsinitiationskomplexes in einen prozessiven Elongationskomplex (183, 265). Ein weiterer Cofaktor, dessen Phosphorylierung durch die aktivierte CDK9 den Transkriptionsabbruch verhindert, ist Spt 5 (32, 176).

Die Aktivität von Tat wird durch Acetylierungen reguliert. Die reversible Acetylierung von Lysinresten durch Histon Acetyl-Transferasen (HAT) wurde zuerst bei den Histonen der Nukleosomen beschrieben und führt dort zur Aktivierung von Transkriptionseinheiten durch die Destabilisierung der Nukleosomenstruktur. Neben Histonen werden aber auch andere, an der Transkription beteiligte Regulationsproteine durch HATs acetyliert (162, 186, 346).

Für Tat konnte die Assoziation mit den HATs p300/CBP (CREB binding protein), p300/PCAF (CBP-associated factor) und hGCN5 gezeigt werden (15, 72, 85, 152, 175, 271). Nach einem Modell von Bres und Mitarbeitern (38) bindet zunächst pCAF im Bereich der Aminosäuren 20-40 an Tat und acetyliert das Lysin in Position 28. Das an Lys²⁸ acetylierte Tat ist in der Lage p-TEFb und TAR zu binden und rekrutiert dadurch p-TEFb an den Transkriptionskomplex. Um jedoch eine weitere Elongation der Transkripte zu ermöglichen, muß die Tat/TAR-Bindung wieder gelöst werden. Dies geschieht durch Acetylierung des Tat Lys⁵⁰ durch p300. Der von TAR dissoziierte, an Lys⁵⁰ acetylierte Tat/p-TEFb Komplex ist nun wieder Substrat für pCAF und kann an den prozessiven Elongationskomplex binden.

1.3 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNAs

Die HIV-1 Vollängentranskripte werden, wie die meisten eukaryotischen prä-mRNAs, ko- bzw. posttranskriptional zu reifen mRNAs prozessiert. Dazu zählt die Übertragung einer m7Gppp-Gruppe (Cap) auf das 5'-Ende und die Polyadenylierung des 3'-Endes (325) sowie das Herausspleißen von nichtkodierenden Intronsequenzen und das Zusammenfügen der kodierenden Exonsequenzen.

1.3.1 Zwei Trans-Ester-Reaktionen bilden die chemische Grundlage des Spleißens

Die chemische Grundlage des Spleißens bilden zwei Trans-Ester-Reaktionen (Abb. 4A). Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe eines Adenosins, das nahe dem 3'-Ende des Introns in der Verzweigungssequenz (BPS) lokalisiert ist, auf die 3'-5'-Phosphodiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns. Dabei wird das 5'-terminale Nukleotid des Introns über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnukleotid verknüpft. Als Zwischenprodukte entstehen eine Lariatstruktur aus Intron und 3'-Exon (Lariat Intermediat) sowie das freie 5'-Exon. Die freie 3'-Hydroxy-Gruppe des 5'-Exons reagiert im zweiten Schritt nukleophil mit der 3'-5'-Phosphodiesterbindung des 3'-Exons. Dabei werden die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden und das verzweigte Intron (Lariat) freigesetzt (47, 190).

Neben den grundsätzlichen Gemeinsamkeiten im Ablauf der Spleißreaktion existieren bei der Organisation eukaryotischer Intron- und Exonsequenzen speziesspezifische Unterschiede. Während bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur ca. 4 % der Gene einzelne, kurze Introns in der Nähe des 5'-Endes der RNA enthalten, können Intronsequenzen in Vertebraten bis zu 90 % der Transkriptlänge ausmachen. Humane Gene bestehen aus durchschnittlich 9 und im Einzelfall aus über 300 Exons. Während die

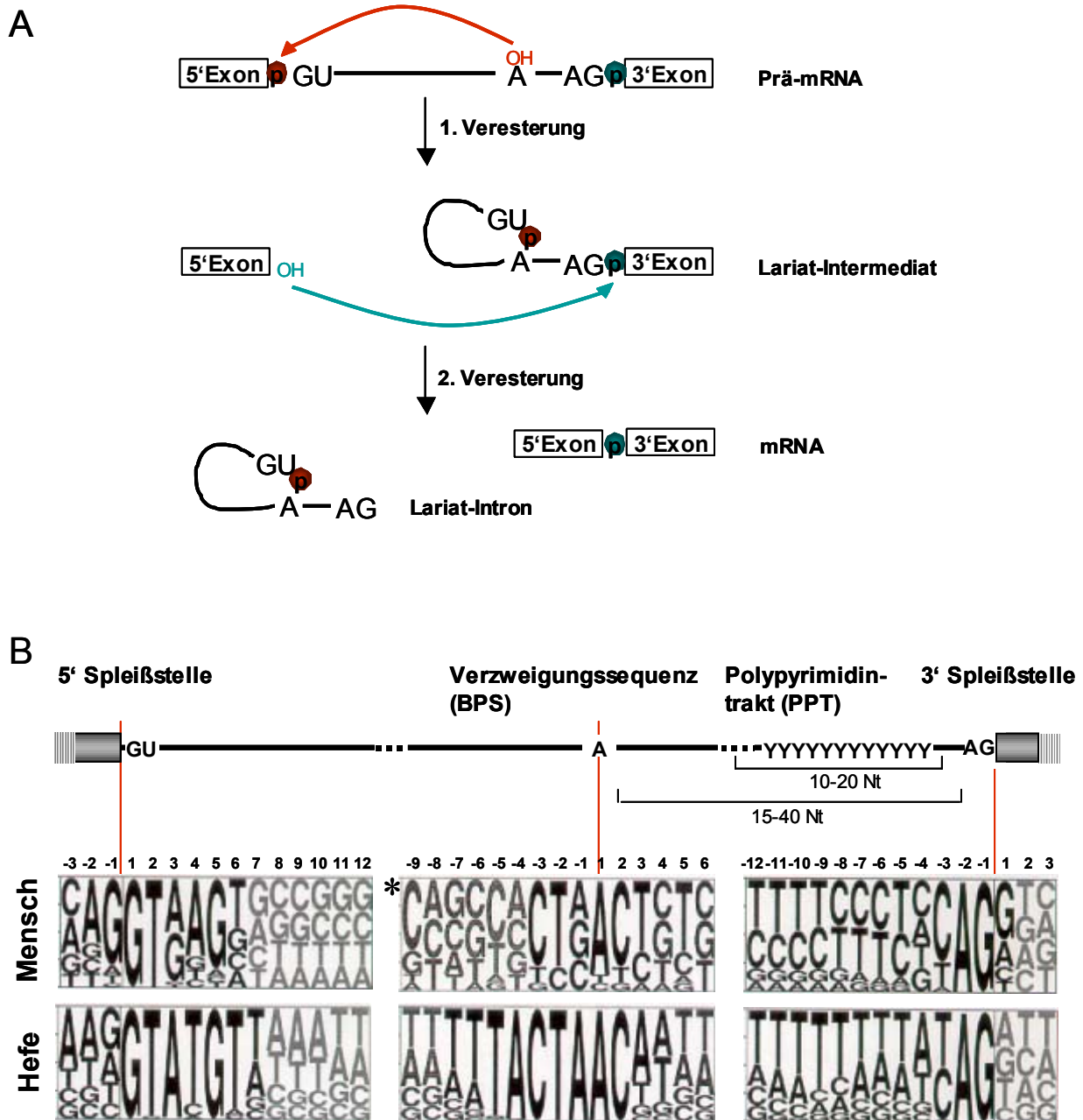


Abb. 4: Das Spleißen eukaryotischer und viraler RNAs

A: Schematische Darstellung des RNA-Spleißens. Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe des Adenosins in der Verzweigungssequenz (BPS) auf die 3'-5'-Phosphodiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns. Dabei wird das 5'-terminale Nucleotid des Introns über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnucleotid verknüpft. Als Zwischenprodukte entstehen eine Lariatstruktur aus Intron und 3'-Exon (Lariat-Intermediat) sowie das freie 5'-Exon. Die freie 3'-Hydroxy-Gruppe am Ende des 5'-Exons reagiert im zweiten Schritt nukleophil mit der 3'-5'-Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle. Dabei werden die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden und das verzweigte Intron (Lariat) freigesetzt (47).

B: Spleißsignale in Introns des U2-Typs beim Menschen und bei der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Dargestellt sind die Sequenzen der 5'-Spleißstelle, der Verzweigungssequenz (BPS) und der 3'-Spleißstelle (47). Die Häufigkeit der Nucleotide in den jeweiligen Positionen wird durch die Höhe der entsprechenden Buchstaben repräsentiert, die von oben nach unten mit abnehmender Häufigkeit angeordnet sind. Die Sequenzdaten stammen aus ca. 200 Hefe-Introns und aus ca. 1700 humanen Introns. *: Das Piktogramm für die humanen Verzweigungssequenz basiert auf 14 experimentell bestimmten Sequenzen aus Säuger-Introns. Über den Piktogrammen sind die Abfolge und die Abstände zwischen den Sequenzen in einem humanen Intron schematisch dargestellt. Y steht für die Pyrimidine des Polypyrimidintrakts, die der 3'-Spleißstelle vorangehen.

Exons im Durchschnitt nur eine Länge von 150 Nukleotiden bis maximal 17 kb aufweisen, sind Intronsequenzen durchschnittlich 3 kb bis maximal 800 kb lang (A. Krainer, pers. Mitteilung, RNA-meeting 2003, Wien). Eine zusätzliche Komplexität entsteht durch alternative Spleißereignisse. Dabei können von einer prä-mRNA durch die Kombination verschiedener Spleißstellen unterschiedliche mRNAs prozessiert werden. Die Anforderungen, die beim Spleißen einer prä-mRNA erfüllt sein müssen, umfassen daher, neben der Katalyse der Trans-Ester-Reaktionen, die räumliche Organisation der prä-mRNA, die nukleotidgenaue Definition und Erkennung von Intron- und Exonsequenzen und die Regulation der jeweils korrekten Spleißstellenauswahl bei alternativen Spleißereignissen. Dies wird durch ein Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen Sequenzelementen der prä-mRNA und Komponenten der zellulären Spleißmaschinerie, dem Spleißosom, ermöglicht.

1.3.2 Exon/Intron-definierende Sequenzelemente der prä-mRNA

Auf der Ebene der prä-mRNA sind die Exon/Intron-Grenzen durch drei charakteristische Sequenzabschnitte gekennzeichnet: die 5'-Spleißstelle oder Spleißdonor (SD), die 3'-Spleißstelle oder Spleißakzeptor (SA) mit dem vorgelagerten, meist 10-20 Nukleotide langen Polypyrimidin-Trakt (PPT), sowie die ca. 15-40 Nukleotide 5'-wärts des Spleißakzeptors gelegene Verzweigungssequenz (branch point sequence, BPS) (Abb. 4B). Bei der statistischen Auswertung der Sequenzen von Exon/Intron-Grenzen weisen die Gene der Hefe eine deutliche Konservierung der 5'-Spleißstellen auf, die in den Positionen +1 bis +6 durch die Sequenz /GTATGT (/ bezeichnet die Exon/Intron-Grenze und +1 das erste Nukleotid des Introns) gekennzeichnet sind. Im Gegensatz dazu sind die Sequenzen der 5'-Spleißstellen humaner Gene sehr heterogen. In der Konsensussequenz AG/GTRAGT (R=A oder G) ist neben den Nukleotiden GT, über die sich diese sogenannten kanonischen Spleißstellen definieren, nur das Purin in Position +3 nahezu 100 % konserviert. Ähnliches gilt für die Verzweigungssequenz. Diese ist ebenfalls in der Hefe hochkonserviert (TACTAAC), während sich humane Verzweigungsstellen nur durch eine degenerierte Konsensussequenz YNYURAY (Y = Pyrimidin, R = Purin, N = beliebig) beschreiben lassen. Die 3'-Spleißstelle eines Introns ist bei allen Eukaryoten durch die Sequenz YAG/ und eine Präferenz der vorangehenden Nukleotide für Pyrimidine gekennzeichnet (47). Neben diesen kanonischen Introns, die aufgrund der intronbegrenzenden Nukleotide auch als GT-AG-Introns bezeichnet werden, wurden in seltenen Fällen auch andere Sequenzen gefunden. Eine Analyse humaner Introns ergab zum Beispiel neben 99,2 % GT-AG-Introns auch geringe Mengen von GC-AG- (0,7 %) und AT-AC-Introns (0,05 %) (93).

1.3.3 Die Assemblierung des Spleißosoms

Die nukleotidgenaue Erkennung der Exon/Intron-Grenzen wird durch ein Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen den konservierten Bereichen der Spleißstellen und Komponenten des Spleißosoms ermöglicht. Das Spleißosom, ein in seiner Komplexität dem Ribosom vergleichbarer Ribonukleoprotein-Komplex (41), setzt sich aus mehr als 50 Proteinen und 5 nukleären Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs) zusammen (47, 190, 382). Diese snRNPs bestehen aus spezifischen Proteinkomponenten und kurzen, uracilreichen RNAs (U snRNA). Die hauptsächlich vorkommenden Spleißosomen des U2-Typs enthalten U1-, U2- und U4/U6.U5tri-snRNAs. Im Zusammenhang mit der Entdeckung von AT-AC Introns wurden zusätzlich Spleißosomen des U12-Typs gefunden (46, 215). Diese Spleißosomen enthalten, neben der gemeinsamen U5 snRNA, funktionelle Analoga in Form der U11, U12, U4atac und U6atac snRNAs (139, 365). Bei der Assemblierung des Spleißosoms auf der prä-mRNA binden die U snRNAs, unterstützt von Proteinkomponenten, an komplementäre Sequenzen der 5'- und 3'-Spleißstellen, sowie der Verzweigungssequenz (47).

Die Assemblierung des Spleißosoms (Abb. 5A) beginnt mit der Bildung des sogenannten E-Komplexes (249) („Commitment Komplex“ bei der Hefe). Einer der ersten Schritte ist dabei die Assoziation des U1 snRNPs an den Spleißdonor, wobei das freie 5'-Ende der U1 snRNA mit den komplementären Basen im Bereich der 5'-Spleißstelle Wasserstoff-Brücken-Bindungen ausbilden kann (3, 164, 255, 294, 386, 404) (Abb. 5B.1). Bei der Hefe konnte gezeigt werden, dass Proteine des Cap-bindenden Komplexes (CBC) sowie des U1 snRNPs die Wechselwirkung zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA stabilisieren (280, 397). Das U1 snRNP Protein U1C kann z. B. *in vitro*, in Abwesenheit des freien 5'-Endes der U1 snRNA, spezifisch an die ersten vier Nukleotide des Introns (GUAU) binden. Die Bindung von U1C könnte also der Duplexbildung zwischen Spleißdonor und der U1 snRNA vorrausgehen (87). Zur Erkennung der 3'-Spleißstelle bindet zunächst der Spleißfaktor SF1/mBBP (Splice factor 1/mammalian branch point binding protein) an die Verzweigungssequenz. Von den beiden Untereinheiten des Heterodimers U2AF (U2 auxiliary factor) bindet U2AF65 an die Polypyrimidinsequenz und die kleinere Untereinheit U2AF35 an das AG-Dinukleotid der 3'- Spleißstelle (248, 287, 407). Dabei lässt sich zwischen AG-abhängigen und -unabhängigen Introns unterscheiden (389). AG-unabhängige Introns sind nicht auf ein AG-Dinukleotid und die damit einhergehende Bindung von U2AF35 angewiesen. Sie besitzen stattdessen einen verlängerten Polypyrimidintrakt. Das weist darauf hin, dass die einzelnen Elemente der 3'-Spleißstelle additiv zur Erkennung der Intron/Exon-Grenze beitragen können. Die Rekrutierung von U2AF bereitet die komplementäre Bindung des U2 snRNPs, das in dieser Phase bereits mit dem E-Komplex assoziiert vorliegt (150), an die BPS vor (282). Bereits in diesem frühen

Stadium der Spleißosomassemblierung scheint sich eine Verbindung zwischen der 5'- und der 3'-Spleißstelle auszubilden. So konnte bei der Hefe eine Verbindung zwischen BBP an der Verzweigungssequenz und dem U1 snRNP an der 5'-Spleißstelle durch Prp40 (pre-mRNA processing protein 40) gezeigt werden (66) und in Metazoen ist eine Interaktion zwischen U2AF und U1-70K über SR-Proteine beschrieben worden (388) (siehe 1.3.4.2). Die Umwandlung des Spleißosoms zum A-Komplex ist durch die ATP-abhängige Verdrängung des SF1/mBBP durch die U2 snRNA gekennzeichnet (17, 254), die über komplementäre Basenpaarungen an die Verzweigungssequenz bindet (Abb. 5B.2) (26). Wie bei der U1 snRNA-Bindung an die 5'-Spleißstelle, lässt auch hier die Degeneration der Konsensussequenz in Metazoen bereits erkennen, dass die Bindung der U2 snRNA durch Proteinfaktoren unterstützt wird. Dabei handelt es sich um sechs U2 snRNP Proteine, die Komponenten der essenziellen Spleißfaktoren SF3a und SF3b sind. Diese binden 5'- und 3'-wärts der Verzweigungssequenz, sowie am Verzweigungsnukleotid selbst (127, 191, 384). Die Positionierung von SF3b am Verzweigungsnukleotid kurz vor der ersten Trans-Ester-Reaktion und seine Konservierung von der Hefe über Metazoen bis hin zu den seltenen Spleißosomen des U12-Typs deutet darauf hin, dass es sich um einen kritischen Faktor im katalytischen Zentrum des Spleißosoms handeln könnte (55, 190, 385). Der Komplex B entsteht mit dem Eintritt des U4/U6.U5 tri-snRNP. Er enthält alle für das Spleißen nötigen Komponenten, liegt jedoch zunächst in einer inaktiven Form vor. Die Aktivierung des Spleißosoms erfolgt durch Umlagerungen der RNA/RNA-Bindungen. Die RNA-Duplexstruktur zwischen der U4 und der U6 snRNA wird zugunsten einer Bindung der U6 snRNA an die 5'-Spleißstelle aufgelöst (Abb. 5B.3). Die dabei verdrängte U1 snRNA und die U4 snRNA verlassen das Spleißosom. Im Komplex C erfolgen abschließend die Transveresterungen, die zur Verknüpfung der Exons und der Freisetzung des Intron-Lariats führen (257, 343).

Die Mechanismen, die das Auftrennen bestehender RNA-Duplexe und die Umlagerungen zu neuen RNA/RNA-Interaktionen im Spleißosom triggern, laufen unter ATP-Verbrauch und der Beteiligung von DExD/DExH (Asp-Glu-X-Asp/His)-box Helikasen ab (81, 141, 383). In der Hefe konnte gezeigt werden, dass Prp8 (pre-mRNA processing protein 8) während der Spleißreaktion mit der 5'-Spleißstelle und der BPS interagiert (367) und die Auflösung der U4/U6 snRNA Bindung vermittelt (197, 198). An der Ablösung der U1 snRNA von der 5'-Spleißstelle, zugunsten der Duplexbildung mit der freien U6 snRNA, ist Prp28 beteiligt (344). Bei der Assoziation des U2 snRNPs an die prä-mRNA interagieren Prp 5, 9, 11 und 21 miteinander und mit der U2 snRNA (266, 301). Prp43 und Prp22 sind am Zerfall des Spleißosoms nach Abschluss der Spleißreaktion beteiligt (10, 319). DExD/DExH Proteine können außerdem die Freisetzung von Proteinen regulieren, die an die prä-mRNA gebunden sind (159, 318). Dies konnte z. B. für die Freisetzung von U1C von der 5'-Spleißstelle durch Prp28 gezeigt werden (62).

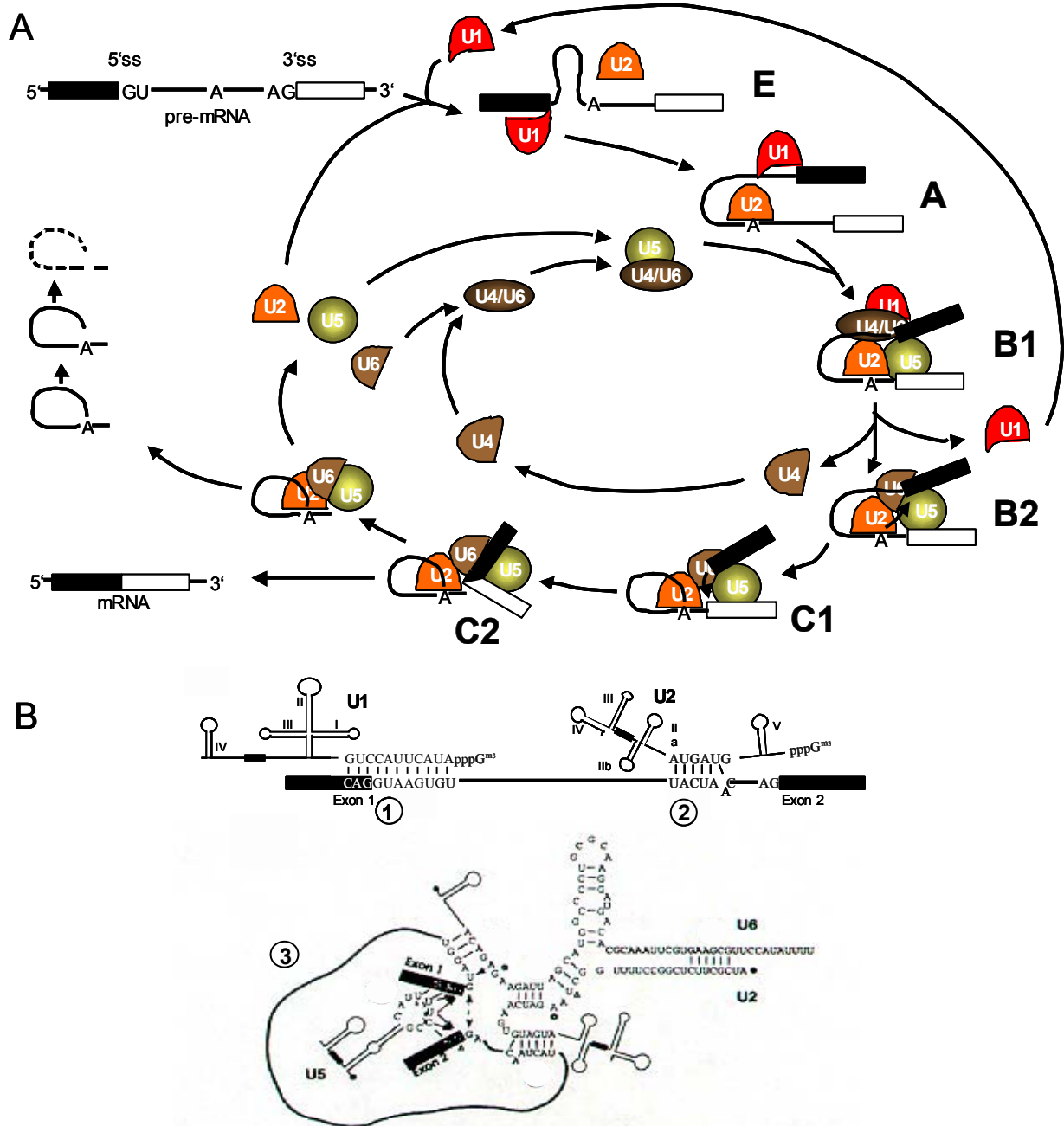


Abb. 5: Die Assemblierung des Spleißosoms

A: Die U snRNAs in der Spleißosomassemblierung (modifiziert nach (254)). Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Bildung des E-Komplexes. SR-Proteine und Proteine des U1 snRNP-Komplexes vermitteln die Bindung der U1 snRNA an den Spleißdonor. Zur Erkennung der 3'-Spleißstelle bindet der Spleißfaktor SF1/mBBP an die Verzweigungssequenz und das Heterodimer U2AF65/35 (U2 auxiliary factor) an die Polypyrimidinsequenz und an das AG-Dinukleotid der 3'-Spleißstelle. Bereits in diesem frühen Stadium etabliert sich über U2AF und U1-70K eine Verbindung zwischen der 5'- und der 3'-Spleißstelle. Das U2 snRNP assoziiert wahrscheinlich bereits lose mit dem E-Komplex. Die Verdrängung von SF1/mBBP durch das U2 snRNP kennzeichnet die Umwandlung zum A-Komplex. Mit dem Eintritt des tri-snRNP U4/U6.U5 entsteht der Komplex B. Er enthält alle für das Spleißen nötigen Komponenten, ist aber inaktiv. Die Umlagerungen der RNA/RNA-Interaktionen führt zur Verdrängung der U1 snRNA an der 5'-Spleißstelle durch die U6 snRNA. U1 und U4 snRNA verlassen das Spleißosom. Im spleißaktiven C-Komplex finden zwei Trans-Ester-Reaktionen statt, die die Exons miteinander verknüpfen. Das Intron-Lariat wird degradiert und die freigewordenen U snRNPs stehen für den nächsten Spleißzyklus zur Verfügung.

B: Mögliche Basenpaarungen zwischen U snRNAs und komplementären prä-mRNA Sequenzen: zwischen der U1 snRNA und dem Spleißdonor [1] (modifiziert nach (164)), zwischen der U2 snRNA und der Verzweigungssequenz [2] und zwischen der U6-, U5- und U2 snRNA und den Exon/Intron-Grenzen im aktiven Spleißosom [3] (nach (190)).

1.3.4 *Cis*-wirkende, spleißregulierende Sequenzen

Neben den bisher beschriebenen Sequenzen der 5'- und 3'-Spleißstelle und der BPS können *cis*-wirkende Elemente in Introns und Exons die Spleißeffizienz und die Auswahl von Spleißstellen in alternativen Spleißereignissen beeinflussen. Sie lassen sich unterteilen in spleißfördernde ESEs oder ISEs (exonic/intronic splicing enhancer) und in ESS bzw. ISS (exonic/intronic splicing silencer)-Elemente, die das Spleißen inhibieren. An diese regulatorischen Sequenzen binden Mitglieder der SR- oder hnRNP-Proteinfamilien (334). Die SR-Proteine zeigen dabei meist eine spleißfördernde Wirkung (28, 129, 130, 356), während hnRNPs oft eine inhibierende Wirkung ausüben (59, 402). Eine strikte Trennung gibt es dabei jedoch nicht (51, 132, 166, 193, 262).

1.3.4.1 Die hnRNP-Proteinfamilie

Die hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) gehören mit zu den häufigsten Proteinen im Zellkern. Sie wurden zuerst als Chromatin-assoziierte RNA-Bindeproteine beschrieben. hnRNPs binden bereits kotranskriptional an naszierende Transkripte und verpacken diese, in Analogie zu den Nukleosomen der DNA, in ca. 700 Nukleotide umfassende Protein/RNA-Komplexe (18, 86, 337). Neben dieser strukturgebenden Funktion sind die ca. 30 bekannten Mitglieder der hnRNP-Familie an der Regulation der Transkription, des alternativen Spleißens, der Polyadenylierung, des mRNA-Exports und der Translation beteiligt. Sie interagieren dabei mit der RNA durch ein oder mehrere RNA-Bindemotive vom RRM (RNA recognition motif)-, RGG (Arginine/Glycine rich box)- oder KH (hnRNP K homology domain)-Typ (193, 329).

Bisher konnte den hnRNPs A/B, A1, hnRNP I (= PTB, Polypyrimidintrakt bindendes Protein) und hnRNP H eine Funktion bei alternativen Spleißprozessen zugeordnet werden. Die Bindung dieser hnRNPs an ESS-Sequenzen führte z. B. beim *β-Tropomyosin*-Gen der Ratte, beim humanen *SMN2* (survival motor neuron 2), sowie bei der HIV-1 prä-mRNA zur Spleißinhibition bzw. zum Herausspleißen von Exonsequenzen aus dem Transkript (exon skipping) (27, 49, 59, 115, 170, 262, 375). Aus Untersuchungen an HIV-1 Silencer Elementen ist bekannt, dass die Spleißosomassemblierung nach der Ausbildung des E-Komplex, aber vor Ausbildung des A-Komplex inhibiert wird (331, 360). In einem Fall konnte gezeigt werden, dass die Bindung von hnRNP A/B mit der Bindung von U2AF65 konkurriert (84).

1.3.4.2 Die SR-Proteinfamilie und SR-ähnliche Proteine

Mitglieder der SR-Proteinfamilie konnten bisher in allen untersuchten Metazoen, in Pflanzen (119, 207, 221, 222), in *Schizosaccharomyces pombe* (133, 228), jedoch nicht in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden werden. In Säugern sind bisher elf verschiedene SR-

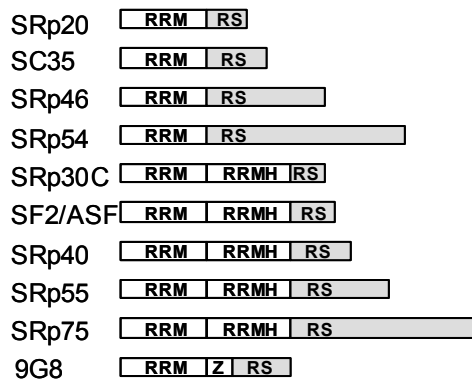
Proteine identifiziert (129, 328) (Abb. 6A), deren Funktionen in vielfältiger Art und Weise mit dem Spleißen assoziiert sind. Als erstes SR-Protein wurde Anfang der 90er Jahre ASF/SF2 (Alternative Splicing Factor/ Splicing Factor 2) aus Kernextrakten aufgereinigt (116, 187). In *in vitro* Experimenten stellte sich heraus, dass es sich um einen konstitutiven Spleißfaktor handelt, der das Spleißen in einer normalerweise spleißinaktiven S100-Fraktion aus HeLa Zell-Extrakt rekonstituiert. ASF/SF2 kann aber auch die Auswahl von alternativ genutzten Spleißstellen beeinflussen (116, 188, 189).

Allen SR-Proteinen gemeinsam ist ein modularer Aufbau aus ein oder zwei N-terminalen RNA-Bindedomänen (RNA recognition motif, RRM) und einer C-terminalen Arginin/Serinreichen (RS)-Domäne, die namensgebend für die Protein-Familie war (298) (Abb. 6A). Die RS-Domäne vermittelt Interaktionen mit anderen RS-Domänen-tragenden Proteinen. Neben der SR-Proteinfamilie selbst, sind dies auch einige am prä-mRNA Metabolismus beteiligte Proteine, die als SR-ähnliche Proteine (SR-related proteins, SRrps) bezeichnet werden (Abb. 6A) (29). Dazu gehören z. B. beide Untereinheiten des Pyrimidintrakt-bindenden Proteins U2AF, einige snRNP-Proteine (U1-70 K, U5-100K, U4/U6.U5-27K), Spleißregulatoren (z.B. Tra), Spleißkoaktivatoren (SRm160/SRm300), RNA-Helikasen (hPrp16) und mehrere Proteinkinasen (129). Die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine in nukleären „Speckles“ und ihre Interaktionen untereinander werden durch Phosphorylierung der Serinreste der RS-Domänen reguliert (74, 136, 167, 251, 252, 391). In vielen Fällen sind RRM- und RS-Domänen zwischen verschiedenen SR-Proteinen austauschbar (57, 246, 376). Die RRM-Domänen können, je nach Protein und untersuchter Funktion, an sehr spezifische, aber auch an stark degenerierte RNA-Konsensussequenzen binden (354, 355). Diese Unterschiede in der Spezifität könnten damit zusammenhängen, dass SR-Proteine sowohl redundante als auch spezifische Funktionen im Spleißprozess ausüben, die unterschiedliche Anforderungen an die Konservierung ihrer Bindesequenzen stellen (56, 149, 219, 309, 356).

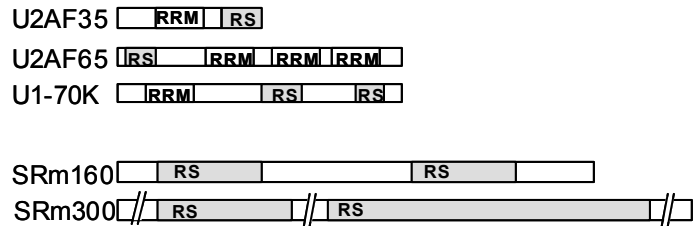
SR-Proteine binden bereits kotranskriptional an die prä-mRNA und sind praktisch an allen Schritten der Spleißosomassemblierung beteiligt. Dazu gehören die Erkennung der Spleißstellen und die Rekrutierung von Spleißfaktoren an die prä-mRNA (129). Anhand von *in vitro* Experimenten entstand die Vorstellung, dass ASF/SF2 direkt oder 5'-wärts der 5'-Spleißstelle bindet und über die Interaktion mit U1-70K die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle unterstützen kann (Abb. 6B.1) (158, 184). In U1 snRNA depletierten, spleißinaktiven Kernextrakten konnte durch die Zugabe hoher Konzentrationen von SR-Proteinen die Spleißfunktion wiederhergestellt werden (77, 224, 363, 364). 3'-wärts der 3'-Spleißstelle gebundene SR-Proteine können die Bindung von U2AF unterstützen (Abb. 6B.2). Bei der Anlagerung des U4/U6.U5 tri-snRNPs an das Spleißosom

A

SR-Proteine



SR-ähnliche Proteine



B

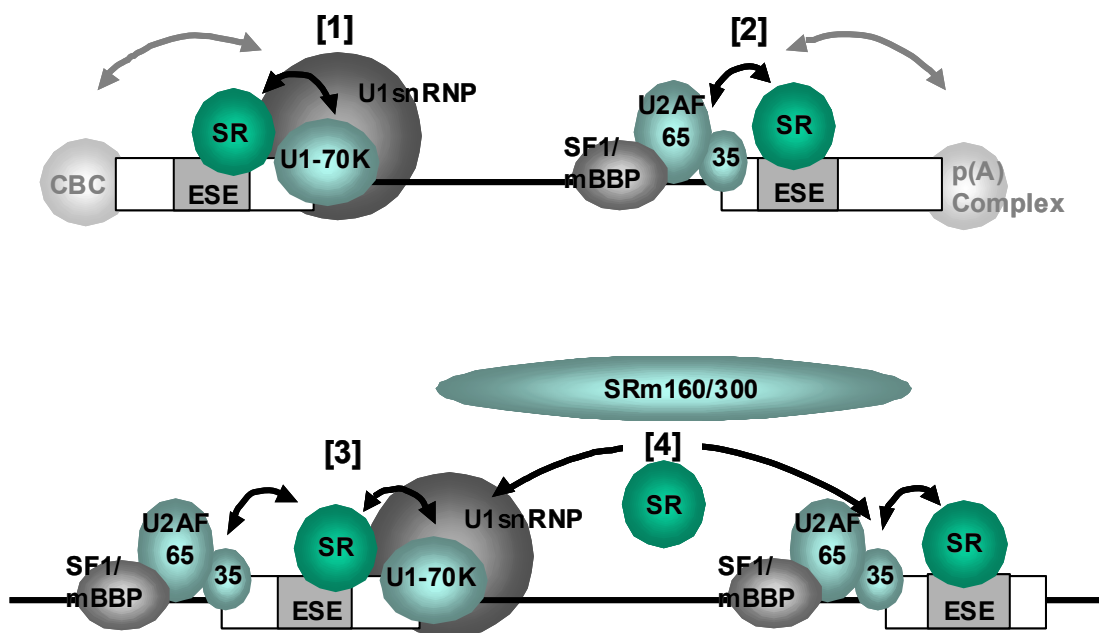


Abb. 6: SR-Proteine tragen zur Erkennung von Intron- und Exonsequenzen bei

A: Proteindomänen ausgewählter humaner SR- und SR-ähnlicher Proteine (modifiziert nach (129)). RS: Arginin/Serin-reiche Domänen, RRM: RNA-bindende Domäne, RRMH: RRM Homology motif, Z : Zinc knuckle.

B: SR- und SR-ähnliche Proteine unterstützen die Erkennung von Spleißstellen und die Definition von Intron- und Exonsequenzen (modifiziert nach (28, 129, 287)). Im E-Komplex wird durch die Interaktion von SR-Proteinen (z.B. ASF/SF2) mit der SR-Domäne von U1-70K das U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle rekrutiert [1]. SR-Proteine können außerdem mit der SR-Domäne von U2AF35 interagieren [2], was die Assoziation von U2AF35, 65 und SF1/mBBP an die 3'-Spleißstelle und die Verzweigungssequenz fördert und die Voraussetzung für die Anlagerung des U2 snRNPs im A-Komplex ist. Die terminalen Exons werden zusätzlich am 5'-Ende durch Interaktion mit dem CBC (cap binding complex) und am 3'-Ende mit dem poly(A) Komplex definiert (graue Pfeile). In internen Exons bilden SR-Proteine nach dem Exon-Definitions-Modell (19) eine exonübergreifende Interaktion zwischen der 3'- und 5'-Spleißstelle [3]. Hinweise gibt es auch auf die Überbrückung von Introns [4] durch die Interaktion zwischen U2AF35 und U1-70K über SR-Proteine (U2AF recruitment model) oder durch die Interaktion des SR-ähnlichen Proteins SRm160/300 mit SR-Proteinen an Spleißdonor, Spleißakzeptor und U2 snRNP (Coactivator model) (129).

könnten Interaktionen zwischen SR-Proteinen und U4/U6.U5-27K eine Rolle spielen (296). SR-Proteine sind jedoch nicht nur essenzielle Spleißfaktoren in konstitutiven Spleißprozessen (246, 308), sondern können auch eine Funktion als Spleißregulatoren in alternativen Spleißereignissen ausüben (129, 356, 371). Ein gut untersuchtes Beispiel für die Spleißregulation durch SR-Proteine ist das geschlechtsspezifische, alternative Spleißen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Eines der zentralen Gene der Geschlechtsdetermination *doublesex (dsx)*, enthält in Exon 4 das sogenannte dsx repeat element (dsxRE). Es handelt sich dabei um ein ESE, das aus sechs, 13 nt langen Sequenzwiederholungen und einem purinreichen Element besteht. Die SR-Proteine RBP1, Tra2 und das weibchenspezifische Tra interagieren miteinander und sind dadurch in der Lage, an das dsxRE zu binden. Dies führt zur Aktivierung des 5'-wärts liegenden Spleißakzeptors und damit zum Herausspleißen des 5'-wärts liegenden Introns. Das Exon 4 wird so in das weibchenspezifische Transkript eingeschlossen, während es in Männchen geskippt wird (229, 371). Im Gen *fruitless* stimuliert die Bindung von Tra, Tra2 und RBP1 an ein zu dsxRE vergleichbares Element die weibchenspezifische Nutzung der nachfolgenden 5'-Spleißstelle (311).

Neben diesen Funktionen in der Spleißosomassemblierung und in der Regulation alternativer Spleißprozesse sind SR-Proteine mutmaßlich an der Definition von Exon- und Intronsequenzen beteiligt (Abb. 6B, siehe auch 1.4.2). Nach dem sogenannten Exon-Definitions-Modell (19, 291) kennzeichnen Exon-überspannende Interaktionen zwischen Spleißkomponenten der 3'- und 5'-Spleißstellen die in Vertebraten meist kurzen Exonsequenzen, welche von bis zu 10-fach längeren Intronsequenzen flankiert werden können. Die SR-Proteine nehmen dabei, durch ihre Interaktion mit U2AF35 an der 3'-Spleißstelle und U1-70K an der 5'-Spleißstelle, eine Schlüsselposition in der Exondefinition ein (Abb. 6B.3) (286). Bindestellen für SR-Proteine konnten dementsprechend in konstitutiven Exons identifiziert werden (246, 308). Das Exon-Definitions-Modell schließt jedoch nicht aus, dass SR- und/oder SR-ähnliche Proteine auch eine Überbrückung von Introns vermitteln können. Dies bietet sich besonders zur Definition von kurzen Intronsequenzen an (295, 357). Dabei werden sowohl eine Interaktion zwischen U2AF35 und U1-70K über SR-Proteine (U2AF recruitment model) als auch eine Interaktion von SR- oder SR-ähnlichen Proteinen an der 5'- und 3'-Spleißstelle mit dem SRm160/300-Komplex (Co-activator model) diskutiert (Abb. 6B.4) (90, 109, 129, 388). Für die Erkennung des 5'-terminalen Exons sind außerdem Interaktionen zwischen dem Spleißdonor und Cap-bindenden Proteinen beschrieben worden (216), während die Erkennung des 3'-terminalen Exons im Zusammenhang mit der Prozessierung des 3'-Endes erfolgt (75).

1.3.5 Das alternative Spleißen der polycistronischen HIV-1 prä-mRNA

Das alternative Spleißen eukaryotischer Gene ermöglicht die Expression strukturell ähnlicher Proteinisoformen, die sich in einigen Domänen unterscheiden und dementsprechend unterschiedliche Funktionen ausüben können. Ein außergewöhnliches Beispiel dafür ist das *dscam*-Gen aus *Drosophila melanogaster*, das für ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie mit variablen Ig- und Transmembrandomänen kodiert und potentiell mehr als 38 000 alternativ gespleißte Isoformen generieren kann (310). Im humanen Genom exprimieren mehr als die Hälfte der Gene mindestens 2 durch alternatives Spleißen entstandene Proteinisoformen (39, 204). Dadurch lässt sich das kodierende Potential eines Organismus vervielfachen. Weiterhin kann durch alternatives Spleißen die Stabilität oder die Lokalisation einer RNA variieren oder eine zusätzliche Regulationsebene für gewebe- oder entwicklungspezifische Transkripte geschaffen werden. Bei HIV gewährleistet alternatives Spleißen, dass alle viralen Proteine auch translatiert werden können. Durch den polycistronischen Aufbau der viralen prä-mRNA wird die Translation der weiter 3'-wärts liegenden ORFs, z. B. durch das effiziente Translationsstartcodon von Tat (313, 317), inhibiert. Daher müssen Transkripte generiert werden, in denen die zu exprimierenden Leserahmen möglichst an erster Position liegen.

Um sein vollständiges Genom zu exprimieren, generiert HIV-1 mit Hilfe der zellulären Spleißmaschinerie mehr als 30 alternativ gespleißte Transkripte. Einige davon sind multicistronisch und können, abhängig von der Effizienz des ersten Translationsstartcodons, mehr als ein Protein exprimieren (95, 112, 256, 281, 292, 313, 314). In der frühen Infektionsphase (177) werden vollständig gespleißte Transkripte der sogenannten 2 kb Klasse prozessiert (Abb. 2D) (274, 313). Alle RNAs dieser Klasse enthalten das Exon 1 und das Exon 7. Die auch als *tat/rev*-Intron 2 bezeichnete Sequenz von Spleißdonor 4 (SD4) auf Spleißakzeptor 7 (SA7) ist herausgespleißt. Die Varianz der 2 kb Transkripte liegt hauptsächlich im 5'-Bereich. Spleißereignisse von SD1 auf wahlweise SA3, 4 oder 4cab generieren Transkripte mit dem *tat*- bzw. *rev*-ORF an erster Position. Wird auf den SA5 oder den SA7 gespleißt, entsteht ein *nef*-Transkript. Die Nutzung von SA6, 7A oder 7B, die zu Varianten von Tat und Rev mit bisher ungeklärten Funktionen führt, ist ineffizient und nicht in allen Isolaten möglich (281, 381). Weitere RNA-Varianten können durch den Einbau der nicht kodierenden Exons 2 und 3 entstehen, die einen Einfluss auf die RNA-Stabilität ausüben können (195). Große Teile der *gag/pol*- sowie der *env*-Sequenz liegen in Bereichen, die in den 2 kb RNAs als Intron definiert sind. In der späten Infektionsphase müssen daher intronhaltige Transkripte der 4 und 9 kb Klasse (Abb. 2D) unter Umgehung des Spleißens in das Cytoplasma exportiert werden (281, 313). Bei der 4 kb Klasse unterbleibt das Spleißen des *tat/rev* Introns 2 von SD4 auf SA7. Durch

Spleißvarianten im 5'-Bereich entstehen Transkripte die *vif*, *vpr*, *tat* exon 1 oder *vpu* als ersten ORF tragen (315). Env wird als zweiter ORF von bicistronischen *vpu/env*-Transkripten translatiert. Bei der 9 kb Klasse handelt es sich um ein ungespleißtes Vollängentranskript, von dem Gag, oder nach ribosomalem Leserasterwechsel, Gag/Pol translatiert werden können (314).

1.3.5.1 Die HIV-1 Spleißstellen

Für einen balancierten nukleären Export von intronlosen und intronhaltigen Transkripten spielen die intrinsische Instabilität der viralen Transkripte, die Regulation durch das virale Protein Rev und suboptimale Spleißereignisse eine Rolle. Das HIV-Genom verfügt, je nach Isolat, über 4 bis 5 Spleißdonoren und 8 bis 9 Spleißakzeptoren (Abb. 7A). Darüber hinaus sind einige kryptische und selten genutzte Spleißstellen beschrieben (70, 281). Bei ALV (Avian leucosis virus), einem einfachen Retrovirus, konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die zu einer Verbesserung des Spleißens führen, die Virusinfektiosität herabsetzen (173). Auch bei HIV wurde zunächst davon ausgegangen, dass ineffiziente Spleißstellen eine Voraussetzung für die regulierte Expression intronhaltiger und intronloser Transkripte sind (58). In nachfolgenden Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass die Ineffizienz der Spleißereignisse in ALV (108, 174), RSV (398) und HIV (330, 340) hauptsächlich auf ineffiziente 3'-Spleißstellen zurück geht, während die 5'-Spleißstellen teilweise effizient genutzt werden (88, 164, 247). Da es bisher keine verlässliche Möglichkeit gibt, die Effizienz von Spleißstellen anhand ihrer Sequenz vorherzusagen, wurden die HIV-Spleißstellen von O'Reilly und Mitarbeitern in heterologen β -Globin-Konstrukten mit den Spleißstellen des β -Globin-Introns 1 verglichen. Dabei wurde in einem RNase Protection Assay für die HIV-1 Spleißdonoren SD1 und SD4 eine mit dem β -Globin-Donor 1 vergleichbare Spleißeffizienz gemessen, während SD2 und SD3, sowie alle HIV Spleißakzeptoren ineffizienter genutzt wurden als die β -Globin-Spleißstellen (267).

Die Ineffizienz der HIV-Spleißakzeptoren wurde auf ihre suboptimalen, von Purinen durchsetzten Polypyrimidinsequenzen und auf suboptimale Verzweigungssequenzen (BPS) zurückgeführt (88, 157, 267, 340). So wurde in *in vitro* Spleißexperimenten für den SA7 ein Uridin, statt des normalerweise benötigten Adenins, als hauptsächlich genutztes Verzweigungsnukleotid identifiziert (UACUUUC) (88). Zwei weitere genutzte BPS verfügen zwar über ein Adenin als Verzweigungsnukleotid, weisen aber ebenfalls keine hohe Komplementarität zur U2 snRNA auf (360). Zusätzlich wurden direkt 5'-wärts des SA7 zwei weitere Spleißakzeptoren 7A und B beschrieben, die nur selten genutzt werden, aber evt. in Konkurrenz zur Erkennung des SA7 treten können (281). Eine ähnliche Situation entsteht durch die räumliche Nähe der Spleißakzeptoren 4c, a, b und 5. Mutationen, die zum Verlust des SA4b führen, bewirken eine erhöhte Nutzung des SA5. Daher wurde vermutet, dass

das ineffiziente Spleißen dieser Akzeptoren durch die konkurrierende Bindung von Spleißfaktoren an den sich überlagernden BPS und 3'-Spleißstellen herrührt (23, 353).

1.3.5.2 *Cis*-wirkende, spleißregulierende Elemente im HIV-1 Genom

Die Regulation der Spleißereignisse geht jedoch nicht nur auf die Effizienz der Spleißstellen zurück, sondern wird auch durch *cis*-wirkende regulatorische Sequenzen beeinflusst. Im HIV-1 Genom sind sowohl positiv als auch negativ wirkende Spleißregulations-Elemente beschrieben worden. Eines der am besten untersuchten Spleißereignisse ist das Spleißen des *tat*-Transkripts. Dafür werden im einfachsten Fall aus der prä-mRNA zwei Introns, von SD1 auf SA4 und von SD4 auf SA7, herausgespleißt. Das Spleißen des ersten *tat*-Introns wird durch ein ESS reguliert, das sich ca. 70 nt 3'-wärts des SA4 im Exon 4 befindet (Abb. 7A und B). Diese als ESS2 benannte Sequenz inhibiert das Spleißen auf SA4. Eine Mutation des ESS2 führt zu einer erhöhten Expression der auf SA4 gespleißten *tat*-mRNAs und zu verringerten Mengen an *rev*- und *env*-kodierenden mRNAs (8, 330). Die Zugabe von ESS-haltiger Kompetitor-RNA in einem *in vitro* Spleiß-Assay konnte den negativen Effekt der ESS2-Sequenz auf das Spleißen aufheben. Dies deutet auf eine Interaktion des ESS2 mit einem zellulären Faktor hin (9). Bei diesem Faktor handelt es sich wahrscheinlich um hnRNP A/B Proteine, da *in vitro* gezeigt wurde, dass in einem hnRNP A/B depletierten Kernextrakt das Spleißen auf SA4 aktiviert wird. Weiterhin konnte eine eingeführte hnRNP A1 Bindestelle das ESS2 funktionell ersetzen (49, 115). Ein zweites Element, ESSp, das *in vitro* hnRNP H bindet, wurde unmittelbar 3'-wärts des SA4 lokalisiert (156, 157). Das Spleißen des zweiten *tat*-Introns von SD4 auf SA7 wird durch das ESS3 ca. 70 nt 3'-wärts des SA7 reguliert. ESS3 weist eine Sequenzhomologie zu ESS2 auf (9, 341). In Zusammenarbeit mit einer suboptimalen 3'-Spleißstelle verhindert diese ESS-Sequenz die Spleißosom-Assemblierung vor der Bildung des A-Komplexes (331). Eine Besonderheit des ESS3 ist seine Nähe zu einer purinreichen Sequenz ESE3 (9, 341). ESE3 dient als Bindestelle für das SR-Protein ASF/SF2 und aktiviert das Spleißen auf SA7. Zusätzlich zu diesem zweigeteilten Regulationselement aus ESS3 und ESE3 wurde in der Intronsequenz 5'-wärts des SA7 ein ISS-Element gefunden. Dieses ist hnRNP A1-abhängig und überlappt mit einer der drei beschriebenen Verzweigungssequenzen des SA7, was den Eintritt des U2 snRNPs in den Spleißkomplex blockieren könnte (362).

Auch für das Spleißen anderer HIV-Transkripte sind regulierende Elemente von Bedeutung. Im nichtkodierenden Exon 3 wurde ebenfalls ein ESS-Element beschrieben. Dieses ESSV weist drei PyUAG-Motive und damit eine Sequenzhomologie zu ESS2 und ESS3 auf und inhibiert das Spleißen auf SA3. Mutationen im ESSV führen zu einem vermehrten Einschluss des nichtkodierenden Exons 3 in die viralen Transkripte und zu einer erhöhten

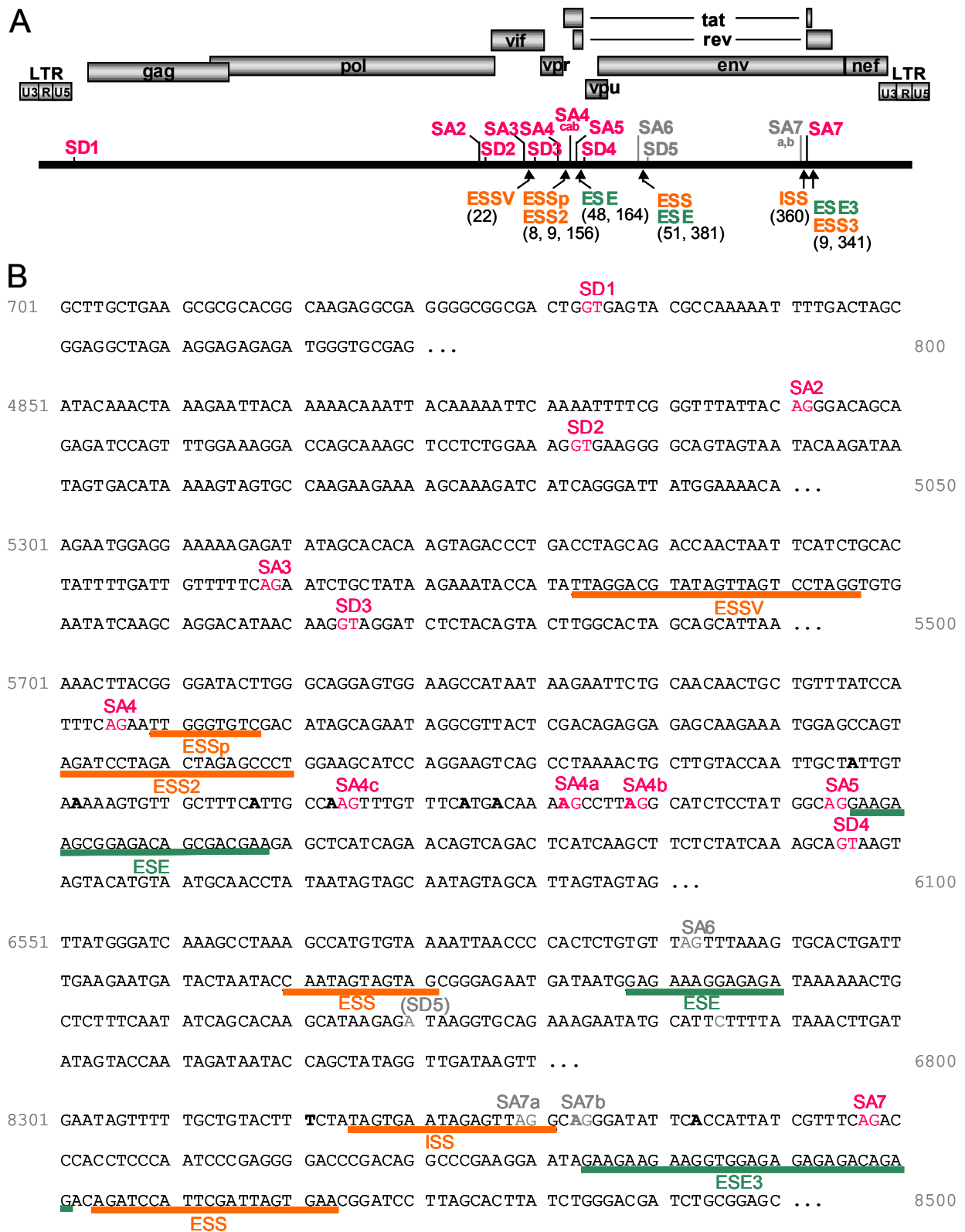


Abb. 7: Die HIV-1 Spleißstellen und cis-wirkende, spleißregulierende Elemente

A: Die Lokalisation der Spleißstellen (rot, SD: 5'-Spleißstelle; SA: 3'-Spleißstelle) und der spleißregulierenden Elemente (orange, ESS oder ISS: exonic/intronic splicing silencer; grün, ESE: exonic splicing enhancer) in der HIV-1 prä-mRNA. Die im HIV NL4-3 Isolat nicht genutzten Spleißstellen sind grau dargestellt. Eingeklammerte Zahlen verweisen auf die Literaturliste.

B: Spleißstellen und spleißregulierende Sequenzen im HIV-1 NL4-3 Isolat (Nukleotid-Nummerierung nach (259)). Unterstrichen sind die in A dargestellten ISS-, ESS- (orange) und ESE-Sequenzen (grün) sowie die Introngrenzen GT-AG der genutzten (rot) und ungenutzten (grau) Spleißstellen und die Verzweigungsnukleotide (fett) der bekannten BPS.

Vpr-Expression. Das ESSV wurde *in vitro* als Bindesequenz für hnRNP A1, A1^B, A2 und B1 identifiziert (22).

Ein weiteres zweiteiliges Element aus einem purinreichen ESE und einem ESS wurde im Exon 6 lokalisiert (381). Die Insertion des Exon 6 in die Transkripte ist nur in einigen HIV-1 Isolaten zu beobachten. Dabei entsteht eine mRNA, die für Tev, ein Protein aus Tat-, Env- und Rev-Sequenzen kodiert (16, 126, 304). Eine natürlich vorkommende Punktmutation im ESS führt zu einem verstärkten Einschluss des Exons 6 und damit zu einer Abnahme der tat-, rev-, vpu/env- und nef-Transkripte. Diese Veränderung in der Spleißbalance hat eine drastische Abnahme der Virusreplikation zur Folge (51, 381). In dem Isolat NL4-3, aus dem die subgenomischen HIV-Sequenzen in dieser Arbeit stammen, kann ein Einschluss des Exons 6 in die viralen Transkripte nicht nachgewiesen werden (281). Dies geht wahrscheinlich auf einen Polymorphismus zurück, durch den das GT des Spleißdonors 5 im NL4-3 zu AT mutierte. Die oben erwähnte Punktmutation im ESS führt hier zu einer verstärkten Virusreplikation (381).

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnten zwei weitere ESEs im nichtkodierenden Exon 2 und im Exon 5 lokalisiert werden. Der ESE in Exon 5 wirkt sowohl positiv auf die Erkennung des SD4 (164) als auch auf die Erkennung des SA5 und bindet *in vitro* die SR-Proteine ASF/SF2 und SRp40 (48).

1.4 Regulierte Expression gespleißter und intronhaltiger HIV-1 Transkripte durch Rev

Neben den vollständig gespleißten sind auch intronhaltige Transkripte für die Replikation von HIV-1 essenziell. Die regulierte Expression der viralen RNA-Klassen wird durch ein Zusammenspiel zwischen mRNA-Export, der Kernretention intronhaltiger mRNAs und der Überwindung dieses Kontrollpunktes durch Rev ermöglicht.

1.4.1 Der nukleocytoplasmatische mRNA-Export

Der Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Cytoplasma erfolgt durch Kernporen-Komplexe (NPCs), die wässrige Transportkanäle durch die Kernmembran bilden (269). Der Transport durch den NPC ist aktiv und richtungsabhängig und wird durch Transportsignale der zu transportierenden Substrate vermittelt. Diese Export- oder Import-Signale binden direkt oder mit Hilfe von Adapterproteinen an Transportrezeptoren, meist Mitglieder der Karyopherin/Importin- β Proteinfamilie, und bilden mit diesen einen Transportkomplex. Dieser Komplex wird durch rezeptorvermittelte Interaktionen durch den

NPC geschleust und erst im Zielkompartiment wieder aufgelöst. Rezeptor- und Adapterproteine werden danach in ihr ursprüngliches Kompartiment zurück transportiert (245). Eine wichtige Funktion in der Richtungsabhängigkeit von Kernimport oder -export, kommt der GTPase Ran zu. Während im Cytoplasma die GTPase-Aktivität, also die Hydrolyse von GTP zu GDP überwiegt, erfolgt im Kern der Austausch des gebundenen GDP gegen GTP. Dies führt zu hohen RanGTP-Konzentrationen im Kern und niedrigen im Cytoplasma (122, 123).

Experimente, in denen RNA-Substrate in *Xenopus laevis* Oocyten injiziert wurden, deuteten auf spezifische Exportfaktoren für verschiedene RNA-Klassen hin. Ein Überschuss injizierter tRNAs beispielsweise hemmte kompetitiv den Export zellulärer tRNAs, nicht aber den von mRNAs, rRNA oder U snRNAs (160). Auch durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnten gezielt die Transportwege einzelner RNA-Klassen gehemmt werden. So wird tRNA durch Exportin t (196, 200) und U snRNA durch CRM1 (100), beides Mitglieder der Importin- β Protein-Familie, exportiert. Über den Export von mRNAs war aus Beobachtungen an heterologen β -Globin/SV40-Konstrukten zunächst nur bekannt, dass gespleißte mRNAs effizienter transportiert werden als sequenzidentische RNAs, die von einer intronlosen cDNA transkribiert wurden (134, 140). Auch die Polyadenylierung (89) und die spezifische Cap-Struktur der RNAP II-Transkripte (142) tragen zum mRNA-Export bei. Diese Ergebnisse führten zu der Vorstellung, dass Transportfaktoren abhängig vom RNA-Prozessing an die RNA rekrutiert werden. Es stellte sich weiter heraus, dass der mRNA-Export unabhängig vom Ran/Importin-Zyklus erfolgen kann (67), und dass die gespleißte mRNA in einem distinkten mRNP-Komplex assembliert, der den Transport unterstützt (226). Einige Komponenten dieses Komplexes assemblieren spleißabhängig 20-24 Nukleotide 5'-wärts der neu generierten Exon/Exon-Grenze in Form des sogenannten „Exon junction complex“ (EJC) (208, 209, 396). Zu den Proteinkomponenten des EJC gehört das RNA-bindende Protein ALY/REF, das als Haupt-Exportfaktor für mRNAs identifiziert wurde (293, 401). ALY/REF interagiert mit dem Export-Rezeptor Tap/p15, einem zwischen Kern und Cytoplasma pendelnden, mit dem NPC assoziierenden Heterodimer (155, 320, 350). Die zu ALY/REF und Tap/p15 homologen Proteine der Hefe Yra1 und Mex67/Mtr2 wurden ebenfalls für den poly(A)⁺ RNA-Export als essenziell beschrieben (171). Ein weiteres Protein des EJC ist UAP 56 (sub2 in Hefe), ein Faktor, der im Zusammenhang mit der frühen Spleißosomassemblierung (178) und der Rekrutierung von ALY/REF und Tap/p15 an den EJC beschrieben wurde (225, 347). Weitere bisher identifizierte EJC-Komponenten sind SRm160, RNPS1, Y14, Magoh, Upf2 und Upf3, denen Funktionen im Spleißen, in der cytoplasmatischen Lokalisation der mRNA und im „nonsense mediated decay“ (NMD) RNA-Abbauweg zugeordnet werden konnten (212, 289).

1.4.2 Die Retention intronhaltiger RNAs im Kern

Unvollständig prozessierte, intronhaltige prä-mRNAs werden normalerweise nicht in das Cytoplasma exportiert, sondern im Kern zurückgehalten und degradiert. Dieser Kontrollmechanismus verhindert den Export fehlerhaft prozessierter mRNAs und damit die Translation fehlerhafter Proteine. Die Differenzierung zwischen diesen RNA-Populationen erfolgt durch eine, noch nicht in allen Einzelheiten verstandene Kopplung von Mechanismen der Transkription, der RNA-Prozessierung und -Stabilisierung sowie des RNA-Transports (240, 288).

Eine Definition von Exon und Intronsequenzen könnte bereits kotranskriptional durch Proteine der hnRNP-Familie und durch SR-Proteine erfolgen, die bereits im Kontext von ESE- und ESS-Elementen erwähnt wurden. HnRNP-Partikel assemblieren kotranskriptional und unabhängig von Spleißstellen auf jeder RNA. Sie werden offenbar bei der Bildung von Spleißosomen größtenteils ausgeschlossen (342). Diese hnRNP-Partikel enthalten hnRNPs, die zwischen Kern und Cytoplasma pendeln können, wie hnRNP A1, dessen Beteiligung am Export von prä-mRNA nachgewiesen werden konnte (277). Sie enthalten aber auch nukleäre hnRNPs, wie z. B. hnRNP C, dessen Retentionssignal über das Exportsignal dominiert (261). Daher wird angenommen, dass bestimmte hnRNP-Partikel im Kern zurückgehalten werden können, was sie zu geeigneten Kandidaten für die Erkennung und Retention von Intronsequenzen und unvollständig prozessierten RNAs macht. Spleißfaktoren, wie SR-Proteine, sind dagegen in ihrer Rekrutierung vom Spleißvorgang abhängig. Sie akkumulieren in den „nuclear speckles“ (338) und binden verstärkt an Exonsequenzen. Diese Charakteristika könnten auf eine Funktion in der Markierung der RNA für den Export hindeuten.

Auch die auf der RNA assemblierenden Spleißkomplexe können nach der „Spleißosomen-Retentions-Hypothese“ eine Retention der RNA im Kern bewirken. Legrain und Mitarbeiter konnten in der Hefe zeigen, dass bei Verhinderung der Spleißkomplexbildung an einem synthetischen Intron ungespleißte prä-mRNA in das Cytoplasma transportiert werden kann (211). In eukaryotischen Zellen sind außerdem die Übertragung einer m⁷Gppp-Gruppe (Cap) auf das 5'-Ende der RNA (142) und die Polyadenylierung des 3'-Endes (89, 148) Voraussetzungen für den nukleären mRNA-Export.

Auch für virale RNAs konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass Spleißstellen unter bestimmten Bedingungen mRNAs im Zellkern zurückhalten können (13, 359). Zusätzlich wurde eine andere Gruppe von regulatorischen Sequenzen beschrieben, die als INS (Instability)- oder CRS (*Cis* acting repressor sequence)-Elemente bezeichnet werden. Diese, in der *gag*-, *pol*-, *env*- und *vif*-Sequenz lokalisierten Elemente sind oft AU-reich, ohne

sichtbare Konsensussequenz und können sich negativ auf den nukleären Export und die Stabilität der viralen RNAs auswirken (69, 232, 312, 316). In Anwesenheit von Rev tragen sie zu einer verbesserten Expression der ungespleißten mRNAs bei (250). Dabei scheint im Fall des p17gag INS die Bindung von hnRNP A1 eine Rolle zu spielen (45, 50, 260).

1.4.3 Der Export intronhaltiger HIV-1 mRNAs durch Rev

Das Spleißen ist jedoch nicht der einzige Weg, der zum mRNA-Export führt. Eine kleine Anzahl von Metazoa- und die meisten Hefe-mRNAs besitzen keine Introns und werden trotzdem effizient in das Cytoplasma exportiert. Bei solchen RNAs wurden in einigen Fällen *cis*-wirkende Elemente identifiziert, die den RNA-Export vermitteln (154, 220). Ein Beispiel dafür ist ein 22 nt langes RNA-Element im *Histon 2a*-Gen der Maus. An diese Sequenz binden die SR-Proteine SRp20 und 9G8, die in diesem Fall als Adapterproteine für die Bindung an den zellulären Export-Rezeptor Tap wirken sollen (153). Auch beim *Herpes simplex virus 1* (HSV-1) wurde ein Export der intronlosen Transkripte über den Tap-Exportweg beschrieben (61). Retroviren müssen neben vollständig gespleißten auch intronhaltige RNAs in das Cytoplasma exportieren, um ihr vollständiges Genom zu exprimieren. Vergleichbar zum Export intronloser mRNAs haben sie daher Mechanismen entwickelt, um die Kernretention und die Abhängigkeit des RNA-Exports vom Spleißen zu umgehen. Einfache Retroviren wie z.B. das *Mason-Pfizer Monkey virus* (MPMV) (37) oder das *Rous Sarkom Virus* (RSV) (268) verfügen über konstitutive Transportelemente (CTE), die direkt mit dem Export-Rezeptor Tap interagieren können (135, 165). Komplexe Retroviren kodieren ein zusätzliches Adapterprotein, um den Export intronhaltiger RNAs zu ermöglichen. Bei HIV-1 handelt es sich dabei um das regulatorische Protein Rev.

1.4.3.1 Die Rev/RRE-Interaktion vermittelt den Export intronhaltiger HIV-1 mRNAs

Das 19 kDa schwere, RNA-bindende Phosphoprotein Rev (Regulator of expression of viral proteins) (68, 143, 179, 278) enthält 3 funktionale Domänen (Abb. 8A): N-terminal befindet sich eine argininreiche Domäne (AS 35-50), die als nukleäres bzw. nukleoläres Lokalisationssignal (NLS) dient (70, 233, 276) und die spezifische RNA-Bindung vermittelt (31, 180, 237, 358, 394). Diese wird von Sequenzen einer Multimerisierungsdomäne flankiert (231, 234, 369, 395). C-terminal befindet sich die Aktivierungsdomäne (AS 75-93), die ein leucinreiches, nukleäres Exportsignal (NES) beinhaltet (97, 238, 380). Die simultane Anwesenheit von Kernlokalisations- und Exportsignal erlaubt Rev zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln, wobei der Hauptlokalisationsort im Nukleolus liegt (151, 276).

Rev bindet an das RRE (Rev Responsive Element) (145, 239, 241, 297, 394), eine RNA-Sekundärstruktur (Abb. 8B), die im *tat/rev* Intron 2, im 5'-Bereich der gp41-kodierenden

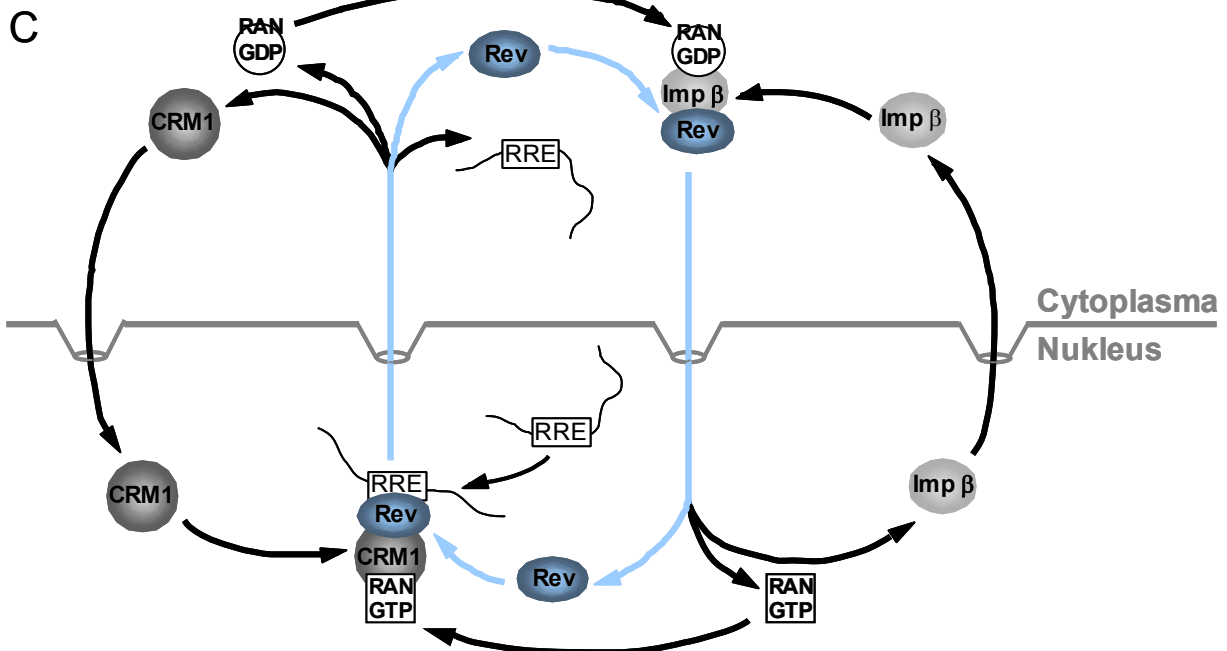
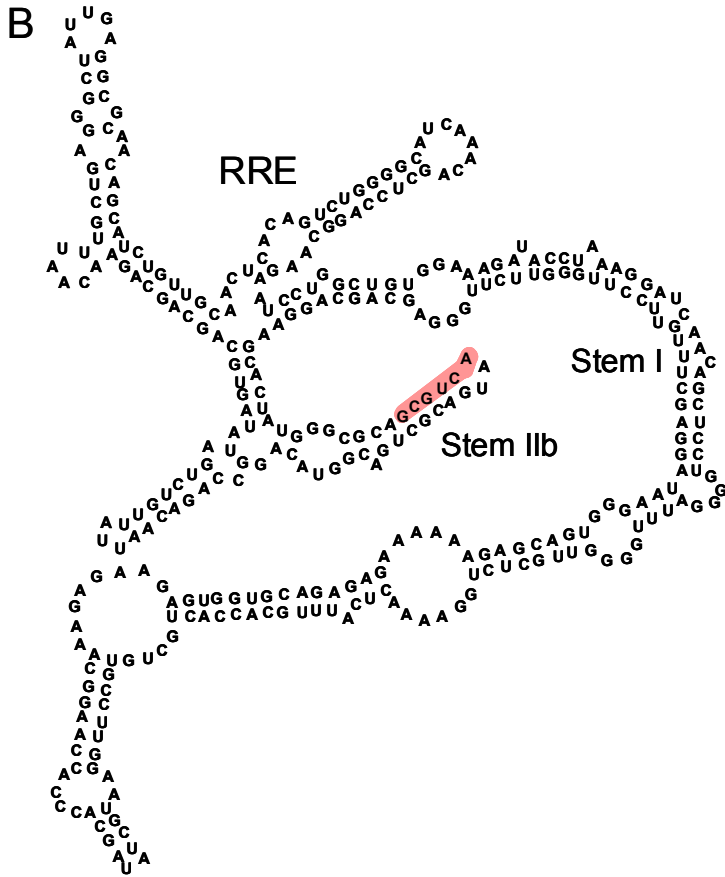
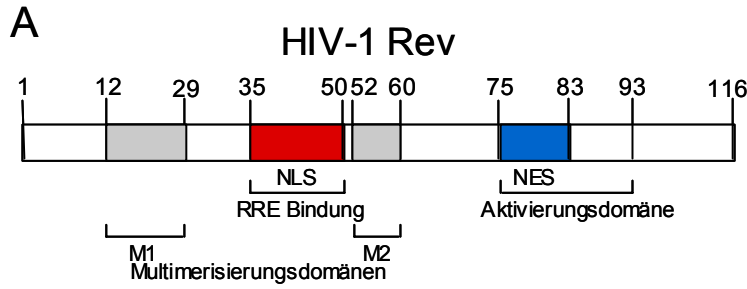


Abb. 8: Die Rev/RRE-Interaktion vermittelt den Export intronhaltiger, viraler mRNAs

A: Schematische Darstellung der Domänen des HIV-1 Rev Proteins (nach (179)). Rev enthält 3 funktionale Domänen: eine N-terminale, argininreiche Domäne (AS 35-50, rot), die als nukleäres bzw. nukleoläres Lokalisationssignal (NLS) dient und die spezifische RNA-Bindung vermittelt. Diese wird flankiert von Sequenzen der Multimerisierungsdomäne (M1 und M2, grau). C-terminal befindet sich die Aktivierungsdomäne, die ein leucinreiches, nukleäres Exportsignal (NES, AS 75-83, blau) enthält.

B: Die Sekundärstruktur des RRE (Rev responsive element, modifiziert von J. Krummheuer nach (241)). Nach der Bindung eines Rev-Monomers an die spezifische Bindestelle im Stem IIb (rot unterlegt) können weitere Rev-Proteine über den gesamten Stem I multimerisieren.

C: Rev exportiert RRE-haltige RNAs in das Cytoplasma (nach (151)). Durch die Bindung von Rev an das RRE wird das Rev-NLS maskiert. Das leucinreiche NES vermittelt den Export des Rev/RRE-Komplexes über den zellulären Exportfaktor CRM1 und RanGTP. Im Cytoplasma führt die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP zur Dissoziation des Transportkomplexes. Dadurch wird das NLS-Signal zugänglich und bildet mit dem Transportprotein Importin-β und RanGDP einen Transportkomplex. Dieser vermittelt den Reimport von Rev in den Kern.

Sequenz liegt. Nach der Bindung eines Rev-Monomers an eine spezifische Bindesequenz im Stem IIB können weitere Rev-Proteine über den gesamten Stem I multimerisieren (241). Durch die Rev/RRE-Bindung wird das Rev-NLS maskiert und das NES kann den mRNA-Export vermitteln. Leucinreiche NES, vergleichbar dem Rev-NES, wurden auch in weiteren viralen und zellulären Proteinen wie z. B. dem zellulären Protein Kinase A Inhibitor (PKI) gefunden (97, 117, 380). Die Sättigung des Exportwegs für leucinreiche NES hemmt spezifisch den Export dieser Proteinklasse sowie von U snRNAs und der 5S RNA (97). Daraus wurde geschlossen, dass diese Substrate einen gemeinsamen Export-Rezeptor benutzen. Diese Vermutung bestätigte sich in Experimenten mit dem Cytotoxin Leptomycin B (LMB). LMB inhibiert spezifisch das Protein CRM1 (chromosomal region maintenance) (2, 264), was zur Inhibition des Exports Rev-abhängiger HIV-RNAs, U snRNAs und 5S rRNAs führt (387). Eine Überexpression von humanem CRM1 in *Xenopus* Oozyten konnte die LMB-induzierte Hemmung umkehren und den Export der Rev-abhängigen RNAs steigern (100, 110, 339). Der Export des Rev/RRE wird durch die Assemblierung mit CRM1 und Ran-GTP vermittelt. An diesem Exportvorgang sind weiterhin die Nukleoporene Nup 214 und Nup 98 beteiligt (30, 101, 406, 406). Die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP im Cytoplasma führt zur Dissoziation von Ran und zum Zerfall des Transportkomplexes, wodurch das Rev-NLS wieder zugänglich wird. NLS vom Typ des Rev-NLS bestehen aus ein oder zwei Motiven, die die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und/oder Arginin enthalten. Das Rev-NLS bindet direkt an Importin- β (146, 372) und wird über den Importin- β /RanGTP-Zyklus in den Kern transportiert (121, 124, 284) (Abb. 8C).

1.4.3.2 Interagiert Rev mit dem Spleißprozess?

Neben seiner Funktion im RNA-Export wird eine Interaktion von Rev mit dem Spleißereignis diskutiert. Frühe Untersuchungen der Rev-Funktion zeigten, dass hohe Rev-Konzentrationen zu einer Abnahme der gespleißten Transkripte führen können (236). Dabei ist nicht klar, ob es sich um eine indirekte Spleißinhibition handelt, indem der Rev-vermittelte Export die im Kern verbleibende Menge an ungespleißter RNA reduziert, oder ob Rev den Vorgang des Spleißens direkt inhibieren kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluss von Rev auf die Assemblierung des Spleißosoms *in vitro* untersucht. Tatsächlich konnte von Kjems und Mitarbeitern gezeigt werden, dass Rev bzw. ein 17 AS langes Oligopeptid, das der Bindedomäne von Rev entsprach, den Eintritt des U4/U6.U5tri-snRNPs in das Spleißosom *in vitro* verhindern kann (181, 182). Zusätzlich wurde mit P32 ein Kofaktor für Rev beschrieben, der einen ternären Komplex mit Rev und dem RRE ausbildet und mit dem zellulären Spleißfaktor ASF/SF2 interagieren kann (361). Für das Maus-Homolog von P32, YL2, konnte ebenfalls eine Interaktion mit der RNA-Bindedomäne

von Rev nachgewiesen werden, die Rev eine Rolle bei der Spleißosomenausbildung ermöglichen könnte (227).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die RRE-flankierenden Spleißstellen für die Rev-Funktion nötig sind oder ob Rev den Export der ungespleißten RNAs direkt und unabhängig von den Spleißstellen vermitteln kann. Es zeigte sich, dass die Insertion eines RREs in ein β -Globin-Intron nicht ausreichte, um den Export ungespleißter Transkripte zu ermöglichen. Erst nach Mutation oder dem Austausch der β -Globin-Spleißstellen gegen die HIV-Spleißstellen SD4 und SA7 konnte ein Rev-vermittelter Export beobachtet werden (58). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass ineffiziente Spleißstellen eine Voraussetzung für die Rev-Funktion sein könnten. Dies stand jedoch im Gegensatz zu Experimenten von O'Reilly und Mitarbeitern, die den HIV-Spleißdonoren SD1 und SD4 experimentell eine vergleichbare Spleißeffizienz wie dem als effizient eingestuften β -Globin SD1 zuordneten. Experimente im eigenen Labor (321) und von Lu und Mitarbeitern (223) zeigten an subgenomischen HIV-1 Konstrukten, dass Mutationen im SD4, die die Komplementarität zur U1 snRNA herabsetzten, zu einem Verlust der Env-Expression führten. Diesen Daten standen jedoch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gegenüber, die bei einer Mutation der Spleißstellen keinen Effekt auf die Env-Expression nachweisen konnten (96, 263). Bei Mikroinjektionsexperimenten in *Xenopus* Oocyten konnten sogar als intronlos klassifizierte RNAs, nach Insertion eines RRE, Rev abhängig ins Cytoplasma transportiert werden (98). Die unterschiedlichen verwendeten Versuchssysteme erschwerten jedoch die Vergleichbarkeit und damit die Interpretation dieser Ergebnisse.

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Spleißstellen auf die Rev-abhängige *env*-Expression untersucht. Dabei war die Frage, ob die Anwesenheit funktioneller Spleißstellen eine Voraussetzung für die Rev-abhängige *env*-Expression ist und ob die Effizienz der Spleißstellen die Rev-Funktion beeinflussen kann. Die im *env*-Gen liegenden Spleißstellen Spleißdonor 4 und Spleißakzeptor 7 sollten zunächst durch Mutationen inaktiviert und die Wirkung dieser Mutationen auf die *env*-Expression von subgenomischen HIV-1 Konstrukten analysiert werden. Weiterhin sollte die Effizienz der Spleißstellen durch vergleichende Experimente ermittelt und variiert werden. Dabei wurde die Komplementarität des Spleißdonors zur U1 snRNA und, im Fall des Spleißakzeptors, die Komplementarität der Verzweigungssequenz zur U2 snRNA und der Pyrimidingehalt des Polypyrimidintrakts verändert. Da sich im ersten Teil der Arbeit zeigte, dass *cis*-wirkende Elemente in der Exonsequenz die Erkennung der Spleißstellen beeinflussen, sollte darüber hinaus die Wirkung der authentischen HIV-1 Exonsequenzen auf die Effizienz der im HIV NL4-3 Genom vorhandenen Spleißakzeptoren analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Serva und Roth verwendet. Die Zusammensetzung der Medien und Lösungen sind im jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder entstammen andernfalls den gängigen Laborhandbüchern (12, 305).

2.1.2 Restriktionsendonukleasen

Es wurden Enzyme der Firmen Roche, MBI Fermentas und New England Biolabs (NEB) verwendet. Die Anwendung erfolgte unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach den Protokollen der Hersteller.

2.1.3 *E.coli*-Stämme

Für die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α F'IQ (Invitrogen Life technologies) verwendet. Bei der Präparation rekombinanter Proteine wurde der Rev-Expressionsvektor (pET-HMK His synRevCCSS) in BL21(DE3) (NEB) und der SF2-Expressionsvektor (pSF2 Δ RS) in M15(pREP4) (Qiagen) transformiert.

2.1.4 Zellkultur

Die Expressionsstudien wurden größtenteils mit den humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa-T4⁺ durchgeführt. Diese exprimiert aufgrund einer stabil integrierten Genkopie konstitutiv den membranständigen CD4-Rezeptor (230). Bei der Transfektion der Zellen mit Env-Expressionsvektoren interagiert das exprimierte Env-Glykoprotein (gp120) auf der Zelloberfläche mit dem CD4-Rezeptor der Nachbarzellen. Dies führt zur Bildung von Zellfusionen (Syncytien). Die Größe der gebildeten Fusionen, sowie die Anzahl der Kerne pro Syncytium erlauben Rückschlüsse auf die exprimierte Env-Glykoproteinmenge.

Außerdem wurden COS-7 Zellen verwendet. Diese Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze wurde mit einem replikationsdefekten SV40 transformiert. Sie exprimiert stabil das große SV40 T-Antigen, was die Replikation von transfizierten Plasmiden mit SV40-Replikationsstartpunkt erlaubt. Dies wirkt einer Ausdünnung der transfizierten DNA während der Zellteilungen entgegen und führt so zu einer erhöhten Genexpression der transfizierten Plasmide (118).

2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für Klonierungen wurden von PD Dr. H. Schaal zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit einem automatischen DNA-Synthesizer (Modell 381 A, Applied Biosystems) unter Abspaltung der endständigen Tritylgruppe hergestellt, mit NH_4OH vom Träger abgekoppelt (3 x 30 min) und mindestens 15 h bei 55°C inkubiert, um die Schutzgruppen abzuspalten. Die Aufreinigung erfolgte über NAP25-Säulen (Pharmacia) und Elution mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Ultrospec II-4050, Pharmacia). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind bei den jeweiligen Plasmidbeschreibungen aufgeführt.

2.1.6 Rekombinante Plasmide

Sofern nicht anders erwähnt, enthalten die verwendeten Plasmide einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in *E. coli* unter relaxierter Kontrolle, das für β -Lactamase kodierende Ampicillinresistenzgen (*amp*) als prokaryotischen Selektionsmarker, das Simian Virus (SV40) t-Antigen Intron, den SV40early-Promotor und die SV40early Polyadenylierungsstelle. Alle verwendeten HIV-1 Sequenzen stammen aus dem Plasmid pNLA1 (348), einem cDNA-Derivat des molekularen Klons pNL4-3, der Sequenzen des New York 5 Isolats und des LAV Isolats enthält (1). Der Sequenzabschnitt *Bss*III-*Eco*RI, der die alternativen Leaderexons 2 und 3 enthält, stammt aus einer cDNA-Sequenz, die von RNA aus HIV NL4-3 infizierten H9-Zellen revers transkribiert wurde (348). Das verwendete Nummerierungssystem bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 (259).

2.1.6.1 Env-Expressionsvektoren

SV E/X pA (SpNLA1) enthält das *Eco*RI-*Xho*I Fragment aus dem Plasmid pNLA1, flankiert von einem SV40early-Promotor und einer SV40 Polyadenylierungsstelle aus dem Plasmid pSVT7. Die Sequenz-Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz HIV NL4-3 (259). Das HIV-Fragment entspricht der 3'-Hälfte des HIV-Genoms mit den Sequenzen für *tat*, *rev*, *vpu* und *env* und weist damit 5'-wärts des Spleißdonors 4 (SD4) keine weiteren HIV-1 Spleißdonoren auf. In **SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$** (SpNLA1 $\text{tat}^- \text{rev}^-$, vgl. Abb. 10A) wurden die Start-Codons für Tat und Rev durch Punktmutationen inaktiviert (164). Das Konstrukt exprimiert also ausschließlich Vpu und Env. Die für die Mutationsanalyse des SD4 eingeführten Punktmutationen liegen in den Positionen -3 bis +8 (das erste Nukleotid des Introns wird als Position +1 bezeichnet) der SD4-Sequenz. Die Nomenklatur dieser Konstrukte gibt jeweils die Position der Punktmutation und das an dieser Stelle eingefügte Nukleotid an.

SV E/X tat⁻rev⁻ 3U, -1G3U, 3U8U, -1G3U8U und -1G8U wurden von D. Schiller, K. Seidel und C. Leurs kloniert (214, 321). **SV E/X tat⁻rev⁻ SD4⁻, SD4⁻SA7⁻, SA7⁻, SA7opt** und **-1G3U SA7opt** wurden von C. Leurs kloniert (214). SD4⁻ bezeichnet mehrere Punktmutationen (1C5U6C7C), die die Komplementarität der SD4-Sequenz zur U1 snRNA auf das Tat-Exon1 Stop-Codon (+2 bis +4) reduzieren (Abb. 10B). SA7⁻ enthält mehrere stille Punktmutationen in der Verzweigungssequenz, im konservierten AG-Dinukleotid des SA7 sowie in den 5'-wärts liegenden kryptischen Spleißakzeptoren 7A und 7B (Abb. 23A), die zum Verlust der Spleißakzeptorfunktion führen. Die SA7opt-Mutante entstand in Zusammenarbeit mit Prof. J. Kjems (Universität Aarhus, Dänemark). Dafür wurden in die SA7-Sequenz stille Punktmutationen eingebracht, die die Env-Aminosäuresequenz bis auf eine Ausnahme (V5→A) erhalten und die Komplementarität der Verzweigungssequenz zur U2 snRNA sowie den Pyrimidingehalt des Polypyrimidintrakts erhöhen (Abb. 25A).

SV E/X tat⁻rev⁻ cs-2¹⁴, cs-3¹⁵, cs-4¹⁶, cs-3¹³, cs-4¹⁸ und **SV E/X tat⁻rev⁻ GTI, GTII, GTIII, GTIV, GTV** wurden in Zusammenarbeit mit M. Austrup und PD Dr. H. Schaal kloniert. Das *HindIII/KpnI*-Fragment von SV E/X tat⁻rev⁻ wurde durch ein *HindIII/KpnI* geschnittenes PCR-Produkt ersetzt, das im 5'-Primer die jeweilige Spleißdonormutation trägt. Der 3'-Primer war in allen Fällen #183. cs+1¹⁴ wurde unter der Bezeichnung 7C von C. Leurs kloniert (214).

#183: ATCCTGCAGGGCTTTAGGCTTTGATCCC

cs-2¹⁴; #1015: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGAGGTAACATGTACATGTAATGCA

cs-3¹⁵; #1014: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACAGGTATCATGTACATGTAATGCA

cs-4¹⁶; #1013: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAACCAGGTTTCATGTACATGTAATGCA

cs-3¹³; #1018: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACAGGTTTCATGTACATGTAATGCA

cs-4¹⁸; #1019: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAACCAGGTATCATGTACATGTAATGCA

GTI; #954: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGAGCTAAGTATTACATGTAATGCA

GTII; #955: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGAGCCAAGTATTACATGTAATGCA

GTIII; #1000: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCACTAAGTATTACATGTAATGCA

GTIV; #1001: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCACTAAGTAGTACATGTAATGCA

GTV; #1016: CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACAGCTAAGTATTACATGTAATGCA

In **SVsac-sma, SVrev, SV E/X tat⁻rev⁻ GAR⁻** wurden freundlicherweise von PD Dr. H. Schaal und Dipl. Biol. M. Freund zur Verfügung gestellt. Das *EcoRI/SacI*-Fragment (nt 5742-6004) von SV E/X tat⁻rev⁻ wurde gegen einen Linker bzw. gegen ein mit *EcoRI/SacI* nachgeschnittenes PCR-Produkt mit der verkürzten Leadersequenz ausgetauscht (164).

LTR 1.5 Konstrukte mit **3U**, **-1G3U** und **-1G8U Mutation** im SD4 wurden von Dr. H. Wodrich am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg unter den Namen pNLenv S1 (SD4), S2 (3U), S3 (-1G3U) und S4 (-1G8U) kloniert. Sie enthalten einen HIV-1 LTR gefolgt von einer HIV-1 Sequenz die dem Spleißereignis von SD1 auf SA5 entspricht.

LTR 1.2 (pNLA1) und **LTR 1.2 tat⁻rev⁻** (pNLA1 tat⁻rev⁻) Konstrukte mit **3U**, **-1G3U** und **-1G8U Mutation** im SD4 wurden kloniert, indem das jeweilige *EcoRI/BamHI*-Fragment (nt 5742-8465) aus SV E/X pA (SpNLA1), SV E/X 3U pA, SV E/X -1G3U pA, SV E/X -1G8U pA, SV E/X tat⁻rev⁻ (SpNLA1 tat⁻rev⁻), SV E/X tat⁻rev⁻ 3U, SV E/X tat⁻rev⁻ -1G3U oder SV E/X tat⁻rev⁻ -1G8U mit dem *EcoRI/BamHI* aufgeschnittenen Vektor pUHctatcrev ligiert wurde. Die Konstrukte enthalten einen HIV-LTR gefolgt von einer HIV-1 Sequenz, die dem Spleißereignis von SD1 auf SA2 entspricht.

SV 1.4E und **SV 1.4E tat⁻rev⁻**-Konstrukte mit **3U**, **-1G3U** und **-1G8U Mutation** im SD4 wurden kloniert, indem das *Sall/KpnI*-Fragment (nt 5785-6343) aus SV E/X pA (SpNLA1), SV E/X 3U pA, SV E/X -1G3U pA, SV E/X -1G8U pA, SV E/X tat⁻rev⁻ (SpNLA1 tat⁻rev⁻), SV E/X tat⁻rev⁻ 3U, SV E/X tat⁻rev⁻ -1G3U oder SV E/X tat⁻rev⁻ -1G8U in ein Vektorbackbone aus dem *KpnI/PstI*-Fragment (2562 nt) von SpNLA1 und dem *Sall/PstI*-Fragment (3724 nt) von SVtar++ccrev (21) ligiert wurde. Die so entstandenen Konstrukte wurden, aufgrund ihrer Leadersequenz aus SVtar++ccrev, zunächst als SV tar++ und SV tar++ tat⁻rev⁻ bezeichnet und später in SV 1.4E umbenannt, da die Leadersequenz einem von SD1 auf SA4 gespleißten HIV-Transkript entspricht.

SV lsdU5 GTV tat⁻rev⁻ 3U und **SV lsdU5 GTIII tat⁻rev⁻ 3U** entstanden in Kooperation mit M. Austrup und J. Krummheuer. Mit dem 5' Primer #1043 und den 3' Primern #1042 (GTV) oder #1072 (GTIII) wurde die lsdU5-Leadersequenz an pNLA1 amplifiziert, mit *AvrII* und *EcoRI* nachgeschnitten und in die *AvrII/EcoRI* aufgeschnittenen Konstrukte SV E/X tat⁻rev⁻ bzw. SV E/X tat⁻rev⁻ 3U inseriert. lsdU5 bezeichnet ursprünglich die „Leadersequenz downstream of U5“ bis 6 nt 5'-wärts des tat Startcodons (nt 638-5823) in einer 1.4 gespleißten *tat*-mRNA (213). Hier wurde jedoch nur der für die RNA-Stabilisierung relevante Teil bis zur 1.4 Spleißjunktion inseriert:

#1043: GGC CCT AGG CGC CCG AAC AGG GAC T

GTV; #1042: TCC GAA TTC AAT ACT TAG CTG TCA GTC GCC TCC CCT CGC C

GTIII; #1072: TCC GAA TTC AAT ACT TAG TGC TCA GTC GCC TCC CCT CGC C

2.1.6.2 Spleißkassetten mit einem Intron (pASV SDx/RRE/SAx pA)

Die 1-Intron Spleißkassetten-Konstrukte wurden nach dem dargestellten Klonierungsplan (Abb. 9) aus zwei Teilen zusammengesetzt: In pASVT7 IE pA und pASVT7 IRE pA wurden über *BstEII/XmaI* die Spleißakzeptorfragmente SA7opt, SA7-ESS, Pal4 und Pip7A und über *BstEII/BamHI* SA7+ESS inseriert. In den Vektor pASV invE/H tatHAtag wurde über *HindIII/AflIII* zunächst das Spleißdonorfragment 4C5U inseriert. In dieses Konstrukt pASV invE/H tatHAtag 4C5U, das eine *Scal*-Restriktionsschnittstelle im Spleißdonor enthält, wurden über *HindIII/AflIII* die Spleißdonorsequenzen 5U, 5U8U, -1G5U, -1G5U8U, 4C, -1G4C, -1G4C8U, 3U, 3U8U, -1G3U8U, SD4, SD4⁻ und -1G8U inseriert. Aus pASV invE/H tatHAtag SDx pA (x steht als Platzhalter für die unterschiedlichen inserierten Donorsequenzen) wurden das erste Exon und der Spleißdonor über *EcoRI/AflIII* in die Konstrukte pASVT7 IE SAx pA und pASVT7 IRE SAx pA kloniert, wodurch die Spleißkassette komplett vorliegt. Die verschiedenen **HIV-Spleißakzeptoren** mit und ohne authentische 3'-Sequenz, sowie die **SA5opt**-Mutationen, wurden über *BstEII/XmaI* in pASV SD4/RRE/SAx pA kloniert. Die SA5opt-Mutanten wurden im Rahmen eines Praktikums in Zusammenarbeit mit I. Meyer, V. Estrada und C. Bons kloniert. Die **SA5extΔS/H**-Mutante entstand durch Insertion eines *SacI/HindIII*-Linkers (#1331/#1330) in das *SacI/HindIII* aufgeschnittene Konstrukt pASV SD4/RRE/SA5ext. Zur Sequenzierung der Spleißkassetten-Konstrukte wurden die Primer #272, #855 und #197 verwendet.

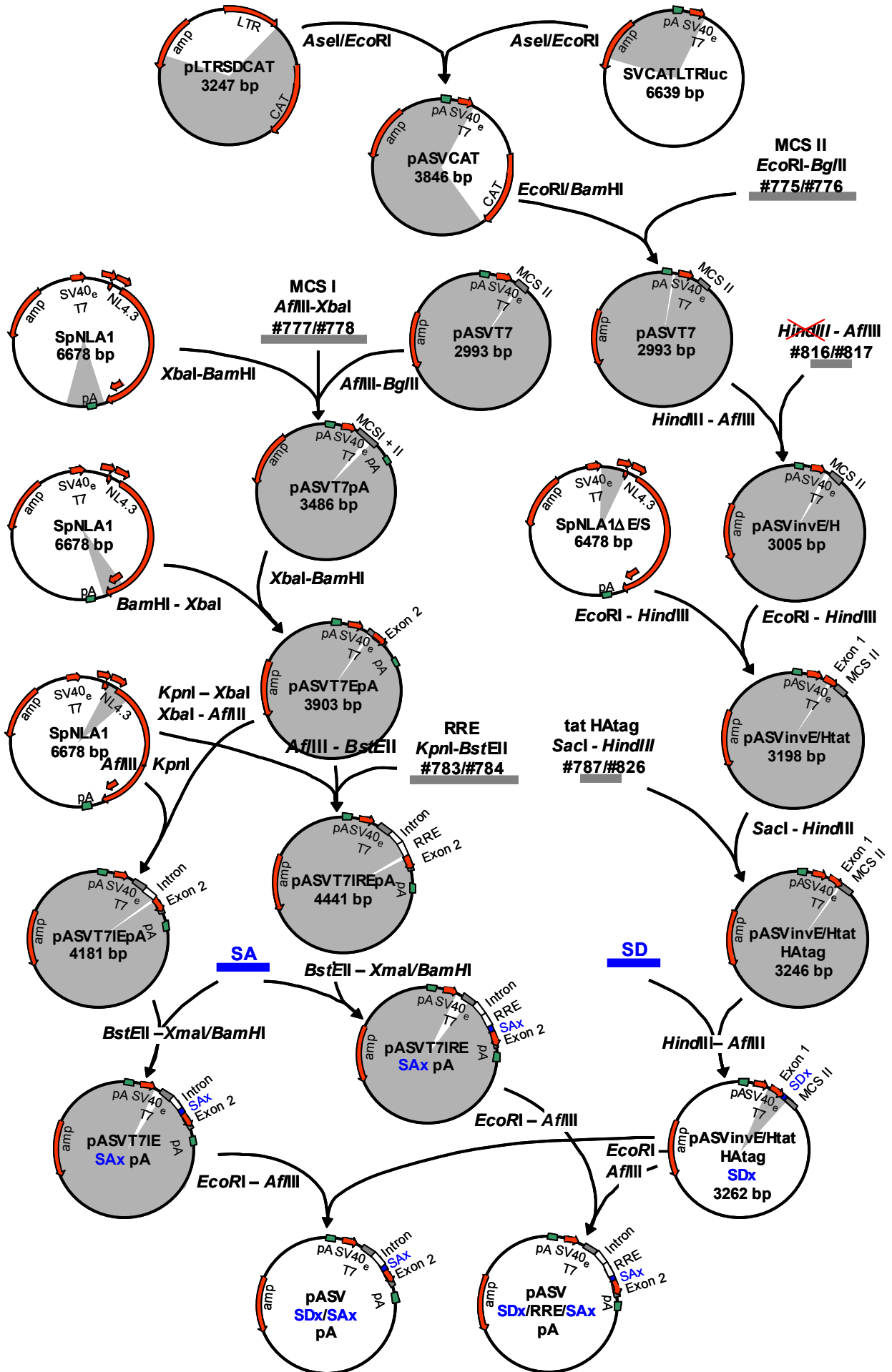
#197: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
 #272: GGG ATC CAG ACA ATT ATT GTC TGA TAT AGT GC
 #855: AAG TCT CTC AAG CGG TGG TAG

MCS II; Linker

#775: AAT TCT GAA CAC ATG TCC GGT TCT AGA CCT TAA GAT CTT CGA A
 #776: GAT CTT CGA AGA TCT TAA GGT CTA GAA CCG GAC ATG TGT TCA G

Abb. 9 Klonierungsschema für die 1-Intron Spleißkassetten-Konstrukte.

Die Größe (bp) und der Name der verwendeten Expressionsplasmide sind in den schematischen Plasmiddarstellungen angegeben. Die Plasmide wurden mit den an den Pfeilen angegebenen Restriktionsendonucleasen geschnitten und das jeweils grau unterlegte Fragment wurde für die Ligation verwendet. Zur besseren Orientierung wurden einige Sequenzelemente der Vektoren dargestellt: LTR: long terminal repeat; amp: Ampicillinresistenzgen; CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen; pA: Polyadenylierungssequenz; SV40e: SV40early-Promotor; T7: T7-Promotor; MCS: multicloning site; RRE: rev responsive element; tat-HAtag: 1Exon tat-Sequenz mit Haemagglutinin-Tag am 3'-Ende. Die Fragmente SA bzw. SD (Spleißakzeptor bzw. Spleißdonor, blau) stehen stellvertretend für die inserierten Spleißstellensequenzen, die im Text aufgeführt werden. Die Nomenklatur und die Größe der Spleißkassetten-Konstrukte richtet sich nach den jeweils inserierten Spleißstellen (siehe 2.1.6.2).



MCS I; PCR ohne Template

#777: CTG ACA TGT CCT GTG GTA GGA AGT AGG TTA CCG TTA CCC GGG TAA ACG GAT CCA ACG
#778: AGC TCT AGA CCG TTG GAT CCG TTT A

RRE; PCR an pNLA1

#784: AGC GGT ACC TGG TGC AGA GAG AAA
#783: ATC GGT AAC CAG GAG CTG TTG ATC C

tatHAtag; PCR an SpNLA1 Δ E/S

#826: AGG GAG CTC ATC AGA ACA GTC AGA CTC ATC AAG
#787: GAG AAG CTT AAG CGT AGT CTG GGA CGT CGT ATG GGT ATT GCT TTG ATA GAG ATG CTT
GAT GAG TCT GAC T

invE/H; PCR ohne Template

#816: AGC TGA ATT CAT CCG AAA GCT TGA CTA TA
#817: CAT GTA TAG TCA AGC TTT CGG ATG AAT TC

Spleißdonorfragmente: (*Hind*III/*Afl*III), PCR ohne Template mit 3'-primer #809

#809: GGT TGC ATT ACA TGT

4C5U; #421: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CAG TAC TTA GTA CAT GTA ATG CA
3U; #444: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CAG TTA GTA GTA CAT GTA ATG CA
3U8U; #812: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CAG TTA GTA TTA CAT GTA ATG CA
-1G3U; #445: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CGG TTA GTA GTA CAT GTA ATG CA
-1G3U8U; #760: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CGG TTA GTA TTA CAT GTA ATG CA
SD4; #824: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CAG TAA GTA GTA CAT GTA ATG CA
SD4⁻; #810: CAT CAA GCT TCT CTA TCA AAG CAC TAA TCC GTA CAT GTA ATG CAA CCT
-1G8U; #952: CAT CCT TAA GCT TCT CTA TCA AAG CGG TAA GTA TTA CAT GTA ATG CA

Spleißakzeptorfragmente: (*Bst*EII/*Xma*I)

Pal4 (Kaninchen β -Globin SA2); PCR an pBSAL4 (203)

#780: ACT GGT TAC CCT CTG CTA ACC ATG T
#779: ACA GGA TCC ATC CCC GGG TTT GCC AAA ATG ATG

SA7opt; PCR ohne Template

#796: TGA GGT TAC CGT TCT TTC TAT T
#797: GAT CCC GGG ATC CTC GGG ATT GGG AGG TGG GTC TGA AAA GAA AGA GGA GAA TAA
CCT TGA CGA ACA CGG TTA GCA ATA GAA AGA AC

SA7⁻; PCR an SV E/X tat⁻rev⁻SA7⁻

#985: GAT GGA TCC CGG GCT CGG GAT TGG GAG
#986: TGA GGT TAC CGT CTT AAG TAT A

SA7ext (+ESS); PCR an pNLA1 (*Bst*EII/*Bam*HI-Fragment in Spleißkassette inseriert)

#800: TGA GGT TAC CGT ACT TTC TAT AGT GAA T

#139: CCC AAG CTT TCT AGA CTC GAG CTA CAA AAT CCT TTC

SA7-ESS; PCR an pNLA1 mit 5'-primer #800

#825: ATC CCC GGG GTC TCT GTC TCT CTC

SA7; PCR an pNLA1 mit 5'-primer #800

#1065: ATC CCC GGG CTG AAA CGA TAA TGG TGA

SA2; PCR an pNL-gpt (wurde freundlicherweise von V. Bosch, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt)

#948: ACT GGT TAC CTA GCA ACA GAC ATA CA

#947: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTG TAA TAA ACC CGA A

SA3 ; PCR an pNLA1

#946: ACT GGT TAC CAC CCT GAA TTA GCA GA

#945: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTG AAA AAC AGT CAA A

SA4; PCR an pNLA1

#936: ACT GGT TAC CAC ATA TCT ATG AAA CT,

#939: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTG AAA TGG ATA AAC A

SA4cab; PCR an pNLA1

#940: ACT GGT TAC CTG TAC CAA TTG CTA TT,

#941: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTA AGG CTT TTG TCA T

SA5; PCR an pNLA1

#942: ACT GGT TAC CAA AAA GTG TTG CTT TC

#943: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTG CCA TAG GAG ATG C

SA5 AG⁻; PCR ohne Template

#1591: TGA GGT TAC CAA AAA GTG TTG CTT TCA TTG CCA CGT TTG TTT CAT GAC

#1483: ATC CCC GGG CTG CCA TAG GAG ATG CCG AAG GCG TTT GTC ATG AAA C

SA5 b1⁻b2⁺AG⁻; PCR ohne Template

#1586: TGA GGT TAC CAA AAA GTG TGG CGT CCG TTG CCA CGT TTG TTT ACT AAC

#1484: ATC CCC GGG CTG CCA TAG GAG ATG CCG AAG GCG TTT GTT AGT AAA C

SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺; PCR ohne Template mit 5'-Primer #1586

#1592: ATCCCCGGGCTGAAATAGGAGATGCCGAAGGCGTTTGTAGTAAAC

SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺⁺ (opt):: PCR ohne Template mit 5'-Primer #1586

#1587: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG AAG GCG AGG GCG TTT GTT AGT AAA C

SA5 b1⁻AG⁻py⁺⁺; PCR ohne Template

#1482: TGA GGT TAC CAA AAA GTG TGG CGT CCG TTG CCA CGT TTG TTT CAT GAC

#1389: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG AAG GCG AGG GCG TTT GTC ATG AAA C

SA5 AG⁻Py⁺⁺; PCR ohne Template

#1388: TGA GGT TAC CAA AAA GTG TTG CTT TCA TTG CCA CGT TTG TTT CAT GAC

#1590: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG AAG GCG AGG GCG TTT GTC ATG AAA C

SA5 Py⁺⁺; PCR an pNLA1 mit 5'-Primer #942

#942: ACT GGT TAC CAA AAA GTG TTG CTT TC

#1481: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG AAG GCT AGG GCT TTT GTC ATG AAA C

SA5 Py⁺; PCR an pNLA1 mit 5'-Primer #942

#1486: ATC CCC GGG CTG AAA TAG GAG ATG CCT AAG GCT TTT GTC ATG AAA C

SA5 Py⁺(64); PCR an pNLA1 mit 5'-Primer #942

#1537: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG ATG CCT AAG GCT TTT GTC ATG AAA C

SA5 Py⁺(68); PCR an pNLA1 mit 5'-Primer #942

#1538: ATC CCC GGG CTG AAA GAG GAG AAG CCT AAG GCT TTT GTC ATG AAA C

SA5 Py⁺(shift10); PCR an pNLA1 mit 5'-Primer #942

#1539: ATC CCC GGG CTG AAA AGG AGA TGT CCT AAG GCT TTT GTC ATG AAA C

SA2ext; PCR an pNL-gpt

#948: ACT GGT TAC CTA GCA AC GAC ATA CA

#1089: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTT TCC AGA GGA GCT T

SA3ext; PCR an pNLA1

#946: ACT GGT TAC CAC CCT GAA TTA GCA GA

#1091: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTT GTT ATG TCC TGC T

SA4ext; PCR an pNLA1

#936: ACT GGT TAC CAC ATA TCT ATG AAA CT

#1492: ACA GGA TCC ATC CCC GGG AGG GCT CTA GTC TAG G

SA4cab5; PCR an pNLA1

#940: ACT GGT TAC CTG TAC CAA TTG CTA TT

#943: ACA GGA TCC ATC CCC GGG CTG CCA TAG GAG ATG C

SA4cab5ext; PCR an pNLA1

#940: ACT GGT TAC CTG TAC CAA TTG CTA TT

#1088: ACA GGA TCC ATC CCC GGG TGC TTT GAT AGA GAA G

SA5ext; PCR an pNLA1

SA5ext GAR⁻; PCR an SV E/X tat⁻rev⁻GAR⁻

#942: ACT GGT TAC CAA AAA GTG TTG CTT TC

#1088: ACA GGA TCC ATC CCC GGG TGC TTT GAT AGA GAA G

SA5extΔS/H; Linker

#1331: CCCCAGGGGATG

#1330: GATCCATCCCCGGGGAGCT

2.1.6.3 Plasmide zur Kotransfektion

SVcrev und **SVctat** exprimieren die NL4-3 *rev*- bzw. *tat*-cDNA (AS 1-86)-Sequenz aus **pUHcrev** und **pUHctat** (195, 307).

SVcrevΔH/X entstand durch eine Deletion in der nichtkodierenden Region von *HincII* bis *XhoI* (nt 8649-8887) von **SVcrev**. Es wurde als Rev-Expressionsvektor in RNA-Analysen eingesetzt, da das Transkript nicht mit der *env*-spezifischen antisense-RNA-Sonde LTRcenvpA⁻ΔH/X hybridisiert. Das Plasmid wurde von J. Krummheuer kloniert (194).

Die **pEV Tat-Mutanten** wurden freundlicherweise von Dr. M.Ott (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. pEV204 bezeichnet den Ausgangsvektor (pcDNA3.1). pEV280 enthält die authentische *tat*-Sequenz (AS1-101), während in den anderen Konstrukten Mutationen gesetzt wurden, die einen Austausch von Lysin zu Arginin in unterschiedlichen Positionen des Tat Proteins verursachen (pEV502: K28 → A; pEV503: K29 → A; pEV504: K41 → A; pEV505: K50 → A; pEV506: K51 → A; pEV534: K50/K51 → AA; pEV535: K50/K51 → RR).

puCBU1 αSD4⁻ I und II entstanden durch Austausch des *BglII/XhoI*-Linkers aus puCBΔU1 (164) gegen *BglII/XhoI* geschnittene PCR-Fragmente mit den jeweiligen Mutationen in der zum Spleißdonor komplementären Sequenz der U1 snRNA.

αSD4⁻ I; PCR ohne Template

#1520: CGA AGA TCT CAG GAT TAG CTG GCA GGG GAG AT

#1131: ATC CTC GAG CCT CCA CTG TAG GAT TAA C

αSD4⁻ II; PCR ohne Template mit 3'-Primer #1131

#1521: CGA AGA TCT CCG GAT TAG TGC GCA GGG GAG AT

pGL3control (Promega) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in Protein-Präparationen verwendet. Es exprimiert das *Luciferase*-Gen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) unter der Kontrolle des SV40early-Promotors (5).

pXGH5 (322) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in RNA-Präparationen verwendet. Es exprimiert das menschliche Wachstumshormon (hGH) unter der Kontrolle des Maus-Metallothionein-1 Promotors (mMT1). Normalerweise wird das Gen nur in den Zellen des Hypophysen-Vorderlappens exprimiert.

pSVT7 (25) wurde bei Transfektionsexperimenten zur Protein-Analyse als Negativkontrolle und zum Ausgleich der DNA-Mengen verwendet.

pSP73 (Promega) wurde bei Transfektionsexperimenten zur RNA-Analyse als Negativkontrolle und zum Ausgleich der DNA-Mengen verwendet.

2.1.6.4 Plasmide zur *in vitro* Transkription

p73hGH wurde von Dr.C. Lenz kloniert. Es enthält das *BglII-XmaI*-Fragment aus dem Exon 5 des menschlichen Wachstumshormon (hGH) aus dem Plasmid pXGH5 (322) inseriert in pSP73 (Promega). Nach Linearisierung mit *BglII* und anschließender *in vitro* Transkription und Digoxigeninmarkierung mit T7-Polymerase entsteht eine 180 nt lange Antisense-RNA, die als *hGH*-spezifische Sonde genutzt wurde.

pUH3 Δ S/K wurde von Dr. C. Lenz durch Deletion des *SauI/KpnI*-Fragments aus pUH3 und anschließender Ligation mit *Xenopus laevis* Ei-Extrakt (307) kloniert. Die Linearisierung mit *SauI* und *in vitro* Transkription mit SP6-Polymerase und Digoxigeninlabeling generiert eine 170 nt lange Antisense-RNA komplementär zum ersten kodierenden tat-Exon von *SauI* bis *SauI* (nt 5785-5953).

LTRcenvpA $\bar{\Delta}$ H/X wurde von Dipl.Biol. J. Krummheuer kloniert (194). Nach Linearisierung mit *HincII* und *in vitro* Transkription mit SP6-Polymerase erhält man eine 237 nt lange Antisense-RNA, die als spezifische Sonde für den Bereich *HincII* bis *XhoI* (env, nt 8648-8887) der HIV-1 NL4-3 Sequenz eingesetzt wurde.

pT7CCII wurde von Dipl.Biol. J. Krummheuer kloniert (195) und enthält die Nukleotide 7576-8102 der humanen mitochondrialen Cytochrom C Oxidase II (Genbank Acc. No. 001807) die als *EcoRI/XhoI* Fragment in pSP73 inseriert wurden. Linearisiert mit *EcoRI* und *in vitro* transkribiert mit T7-Polymerase entsteht eine Antisense-RNA (526 nt), die zur Überprüfung von Kern-RNA auf Verunreinigung mit Cytoplasma-RNA verwendet wurde.

p β -actin intron wurde von Dipl. Biol. J. Krummheuer kloniert (195) und enthält die Nukleotide 1729-2050 des Intron C des humanen β -Aktin (Genbank Acc. No. E00829), die als *EcoRI/XhoI*-Fragment in pSP73 inseriert wurden. Linearisiert mit *EcoRI* und *in vitro* transkribiert mit T7-Polymerase entsteht eine Antisense-RNA (321 nt), die zur Überprüfung von Cytoplasma-RNA auf Verunreinigung mit Kern-RNA verwendet wurde.

Die **Spleißkassetten-Konstrukte (pASV SDx/RRE/SAy pA, 2.1.6.2)** wurden verwendet, um, nach *XhoI* Linearisierung, [³²P]-markierte, gecappte, mit T7-Polymerase transkribierte RNAs für den *in vitro* Spleiß-Assay (2.2.8) zu erhalten.

pASV Δ E/B SA5, SA5 ext Δ S/H, SA5ext, SA5ext GAR⁻ entstanden durch Deletion des *EcoRI/BstEII*-Fragments aus den Spleißkassetten (pASV SDx/RRE/SAx pA, 2.1.6.2) mit der jeweiligen Spleißakzeptorsequenz und Insertion eines *EcoRI/BstEII*-Linkers (#1453/#1454). Nach Linearisierung dieser Konstrukte mit *XmaI* und *in vitro* Transkription mit T7-Polymerase erhält man Transkripte, die, neben den Restriktionsschnittstellen, SA5-Sequenzen mit verschiedenen langen Exon 5-Anteil (nt 5911 – 5974, bzw. 6000 oder 6044) enthalten (vgl. Abb. 33A).

#1453: AAT TCA CAT GTG

#1454: GTT ACC ACA TGT G

2.1.6.5 Plasmide zur Protein-Expression

Die im *in vitro* Spleiß-Assay verwendeten rekombinanten Proteine mit Histidin-tag wurden von den Konstrukten pDS56-6H-SF2 (His-tag N-terminal) und pET-HMKHis syn Rev ccss (His-tag C-terminal) exprimiert. Für den EMSA wurde ein SF2-Protein mit deletierter RS-Domäne verwendet (pDS-H6F1-SF2 Δ RS). Die Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. J. Kjems (Universität Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Restriktionsanalysen und Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese wurden aus den Laborhandbüchern „Molecular Cloning“ (305) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (12) entnommen.

2.2.1 Klonierung rekombinanter Plasmide

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der für die Klonierungen benötigten DNA-Fragmente wurden in 100 µl Volumen mit 2,5 U Pwo-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 0,1 Volumen 10 x PCR-Puffer + MgSO₄ (Roche Molecular Biochemicals), je 330 µM Desoxynukleosidtriphosphat (Perkin Elmer), je 0,5 µM 3'- und 5'-Primer und 1 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Die PCR erfolgte in einem Robocycler Gradient 96 (Stratagene) (Denaturierung: 1 x 3 min 94°C; Amplifikation: 30 x 30 sec 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C; Extension: 1 x 10 min 72°C). Die PCR-Produkte wurden Phenol/Chloroform (24:1) extrahiert, in 2,5 Vol EtOH und 1/10 Vol 4 M LiCl präzipitiert und in 50 µl Tris-EDTA (TE) resuspendiert.

2.2.1.2 Restriktion und Aufreinigung von Plasmidfragmenten über Low melt Gelelektrophorese

PCR-Produkte oder Plasmid-DNA wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen nach den Angaben des Herstellers (Roche, MBI Fermentas und New England Biolabs) geschnitten. Dabei wurden, je nach Größe des benötigten DNA-Fragments, zwischen 1-3 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden auf ein 0,8 % Low melt Agarosegel (Biozym) mit TB1/10E als Laufpuffer aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter einer UV-Handlampe ($\lambda=320$ nm) wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten, 10 min bei 65°C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen und die Restriktionsenzyme zu inaktivieren, und direkt in die Ligation eingesetzt.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter *E.colis* mit Rubidium-Chlorid

E.colis DH5 α F'IQ™ (GIBCO BRL) wurden aus einem Glycerin-Stock auf LB-Kanamycinagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml LB-Medium (25 µg Kanamycin/ml) wurden mit einer Kolonie beimpft, 1 h bei 37°C inkubiert, in eine 200 ml Kultur überführt und bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 15 min mit 600 x g bei 4°C zentrifugiert und die Pellets in je 20 ml TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4 H₂O, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂·2 H₂O, 15% Glycerol, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, steril filtriert) resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 600 x g, 4°C

zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, pH 6,8 mit NaOH eingestellt, autoklaviert) resuspendiert, zu je 50 µl Aliquots in vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in einem Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.1.4 Transformation kompetenter *E.colis*

Für eine Transformation wurden ein Aliquot (50 µl) der kompetenten *E.colis* kurz aufgetaut, 15 min auf Eis gekühlt und, nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes, weitere 20 min auf Eis gehalten. Nach 1,5 minütigem Hitzeschock bei 42°C wurde die Reaktion kurz auf Eis abgekühlt, in 800 µl SOC aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (220rpm) inkubiert. 400 µl der Bakteriensuspension wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigem (100 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals) LB-Agar (Gibco BRL, Luria Broth Base) ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Bei Klonierungen mit mehreren Inserts wurden die Reste des Ligations- und Transformationsansatzes über Nacht bei Raumtemperatur für eine eventuelle Wiederholung der Transformation aufbewahrt.

2.2.1.5 Analytische Präparation von Plasmid-DNA

Einzelkolonien wurden in 5 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 1 ml der LB-Kultur nach einem modifizierten Protokoll für alkalische Lyse. Nach 1 minütiger Zentrifugation (15000 x g) wurde das Zell-Pellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 300 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) versetzt, 5 min bei 20°C inkubiert und mit 300 µl Puffer 3 (3 M KAc; pH 5,5) neutralisiert. Die Zelltrümmer und genomische DNA wurden 15 min bei 10.000 rpm pelletiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand nach Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol 30 min bei 11.000 x g gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 20-50 µl TE-Puffer (pH 8) aufgenommen. Die Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Bei Konstrukten, die PCR-Produkte als Insert enthielten, erfolgte zusätzlich eine Sequenzierung der betreffenden Regionen. Die Sequenzierungen wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.2.2 Präparative Plasmid-Isolierung über CsCl-Gradienten bzw. Anionen-Austauscher-Säulen

450 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium wurde mit einer *E.coli*-Einzelkolonie oder direkt aus einem Glycerinstock (300 µl LB-Kultur, 700 µl steriles Glycerin) angeimpft und ca. 19 h bei 220 rpm und 37°C inkubiert, 5 min bei 1800 x g zentrifugiert und das *E.coli* Sediment in 30 ml Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 ml Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) erfolgte die Lyse der Zellen für 5 min. Das Lysat wurde mit 30 ml Puffer 3 (3 M KAc; pH 5,5) neutralisiert, 20 min bei 11000 x g abzentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell, 595½, Ø 150 mm) filtriert. Nach Präzipitation in 0,6 Vol. Isopropanol und Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA in 4,3 ml TE mit 4,3 g CsCl und 350 µl EtBr (10 mg/ml) aufgenommen. Es folgte eine 16 h Zentrifugation bei 20°C und 320000 x g. Die untere der beiden Banden enthielt die Plasmid-DNA und wurde unter der UV-Handlampe (λ 320 nm) mit einer Kanüle (20G, 0,9 mm) abgezogen, das EtBr mit H₂O-gesättigtem Butanol ausgeschüttelt und das CsCl durch 4 h Dialyse gegen Low Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) entfernt. Nach LiCl/Ethanol-Präzipitation und einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die Plasmid-DNA in TE-Puffer (pH 7,5-8) gelöst, die Konzentration über die Messung der OD bei 260 und 280 nm bestimmt (Ultrospecll-4050II, Pharmacia) und auf ca. 1 µg/µl eingestellt. Die Ausbeute betrug je nach Plasmid zwischen 1000-5000 µg Plasmid-DNA. Konzentration und Qualität der Plasmid-Präparationen wurden mit anschließender EtBr-Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Durch die Umstellung des Transfektionsprotokolls von einem Elektroporationsprotokoll zur Anwendung eines Transfektionsreagenz (FugeneTM6, Roche) ergab sich im Verlauf der experimentellen Arbeit ein geringerer Verbrauch an Plasmid-DNA. Dies führte zu einer Umstellung der CsCl-Präparation auf Präparation über Anionen-Austauscher Säulen. Dafür wurden 150 ml *E.coli*-Kultur über alkalische Lyse nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen Plasmid Kits) präpariert.

2.2.3 Zellkultur

Die Expressionsstudien wurden in HeLa-T4⁺ Zellen transient, unter nichtreplikativen Bedingungen ausgeführt. Dabei handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Cervix-Karzinom-Zelllinie, die aufgrund einer stabil integrierten Genkopie konstitutiv den membranständigen CD4-Rezeptor exprimiert (230). Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium) supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Roche Molecular Biochemicals) und 100 µg/ml Geneticin (Invitrogen) in T175-

Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert. Die Ablösung subkonfluenten Zell-Monolayer zur Passagierung oder zur Transfektion erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS_{def} (phosphate buffered saline deficient in Ca²⁺ and Mg²⁺; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄·H₂O; 8,1 mM Na₂HPO₄·2H₂O; pH 7,4) durch Trypsinierung mit 2,5 ml ATV (0,025% (w/v) N-acetyliertes Trypsin; 0,05 % (w/v) EDTA in PBS_{def}) für 10 min bei 37°C. Die Zellen wurden bis maximal zur 15. Passage in Kultur gehalten.

2.2.4 Transfektion mittels Elektroporation bzw. nicht-liposomalem Transfektionsreagenz (Fugene™6)

Es handelt sich um ein transientes Transfektions-Protokoll, bei dem die transfizierte DNA nicht stabil in das Genom integriert und nicht repliziert wird. Eine Ausnahme bildet die Transfektion von COS-7 Zellen, die stabil das große SV40 T-Antigen exprimieren und dadurch die Replikation von transfizierten Plasmiden mit SV40-Replikationsstartpunkt erlauben. Die Transfektionsmethode wurde für Western und Northern Blot-Analysen verwendet.

Nach Trypsin-Behandlung wurde die Zahl lebender Zellen durch Trypan-Blau-Ausschluß-Färbung (0,5 % w/v Trypanblau) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation (306). Der Elektroporations-Ansatz enthielt die Plasmid-DNA (15-30 µg in TE-Puffer), 3×10^6 lebende Zellen in 200 µl Ablöse-Medium (Eagle's minimum essential medium, supplementiert mit 25 mM HEPES und 10 mM NaHCO₃) und Elektroporationsmedium (90% Ablösemedium, 10 % FKS) ad 350 µl. Die DNA-Menge in Kotransfektions-Experimenten wurde durch Zugabe von pSVT7-DNA konstant gehalten. Die Zellen wurden mit einem Puls von 550 V/cm und 960 µF (BioRad Gene Pulser mit Kapazitätserweiterung) behandelt. Die Zellen wurden 5 min nach der Transfektion in Kulturflaschen überführt und in DMEM, supplementiert mit 10 % FKS, und bei 7 % CO₂ inkubiert. Zur Analyse der RNA mittels Northern Blot wurden je 6-9 gleiche Transfektionsansätze in einer T80-Flasche (Nunc) gepoolt. Für Western Blot Analysen wurde je ein Transfektionsansatz in eine T25-Flasche (Nunc) überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Im Verlauf der Arbeit wurde das zunächst verwendete Protokoll der Elektroporation, wegen des geringeren Zeit- und Materialaufwands, durch ein Transfektionsprotokoll mit dem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz Fugene™6 (Roche) ersetzt, das zu vergleichbaren Ergebnissen führte (M.Bachmann, pers. Mitteilung). Die jeweils verwendete Methode ist im Abbildungstext der Experimente angegeben. Für Western Blot-Analysen wurden in einer

6well-Platte (Nunc) pro well 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen ausplattiert und 24 h kultiviert. Für die Transfektion wurden nach den Angaben des Herstellers 3 bis 6 µg DNA mit dem 1,5-fachen Volumen FuGENE™6 (Roche) ad 100 µl Dulbecco's modified Eagle's medium aufgefüllt und 5 min bei 20°C inkubiert, zur DNA pipettiert, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend direkt in die 6well-Platte pipettiert. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und nach 48 h wurden die Proteine präpariert. Für Northern Blot-Analysen wurden 3×10^6 Zellen in T80-Flaschen (Nunc) ausplattiert. Transfiziert wurden pro Flasche jeweils 9 Ansätze mit je 3 bis 6 µg DNA. Die Zellen wurden 30 h nach der Transfektion geerntet.

2.2.5 Proteinanalysen mittels Western Blot

2.2.5.1 Proteinpräparation aus HeLa-Zellen

HeLa-T4⁺ Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers in das Medium überführt, kurz abzentrifugiert (10 sec, 20.000 x g), mit 1 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 70 µl Aliquots zur Bestimmung der Proteinmenge (2.2.5.2) und der Transfektionseffizienz (2.2.5.3) abgenommen. Der Zellaufschluß dieser Aliquots erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in einem Methanol/Trockeneis-Bad und Auftauen bei 37°C für jeweils 1 min. Die festen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die restlichem 430 µl Zellsuspension wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Treatment-Buffer (2 % SDS; 65 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glycerol; 10% Dithiotreitol [DTT]) und 0,05 Volumen Gel-Ladepuffer (50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol) resuspendiert und 10 min bei 95°C denaturiert.

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode bestimmt. Sie beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm bei Bindung von Proteinen (34). Die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Probe in zwei Verdünnungen (1:20, 1:40) und in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 50 µl verdünnten Zellextrakt und 200 µl Bradford-Reagenz (Protein-Assay, Bio-Rad, 1:5 verdünnt). Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte in Mikrotiterplatten (Nunc) in einem ELISA-Reader (SLT Rainbow, SLT Labinstruments) gegen einen BSA (Rinderserum-albumin)-Standard von 0-20 µg Protein.

2.2.5.3 Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay

Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurden die für den Western Blot bestimmten Transfektionsansätze mit 0,5 µg pGL3-control (Promega, siehe 2.1.6.3) kotransfiziert. Das von diesem Vektor exprimierte Luciferase-Enzym des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) oxidiert das Substrat Luciferin in einer ATP- und Mg²⁺-abhängigen Reaktion zu Oxiluciferin. Dabei wird Biolumineszenz frei, die in einem Luminometer (EG&G Berthold, Microumat LB96P) in Form relativer Lichteinheiten (RLU, relative light unit) gemessen wurde. Der verwendete Luciferase-Assay (Luciferase-Assay-Reagenz, Promega) erfolgte als Doppelbestimmung mit 5 und 10 µl Zellextrakt in mit 10 µl Rinderserum-Albumin (BSA, 2 µg/µl) beschichteten Mikrotiterplatten (Nunc). Die Messung der Biolumineszenz erfolgte 2 sec nach der Substratzugabe über einen Zeitraum von 15 sec. Anhand der RLU-Werte erfolgte eine Normierung der Western Blot-Proben auf gleiche Transfektionseffizienzen.

2.2.5.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nachdem die Proben auf gleiche RLU-Werte normiert und die Proteinmengen mit mock-transfiziertem Zellextrakt (pSVT7) angeglichen wurden, erfolgte die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einer vertikalen Flachbett-Elektrophorese in diskontinuierlichen 0,1 % SDS/7 % Polyacrylamid-Gelen (Roth, Rotiphorese Gel 30) bei 65 V in ca. 14 h. Als Laufpuffer wurde 1 x SDS-Puffer (0,8 % SDS, 0,2 M Tris-Base, 1,9 M Glycin) und als Molekulargewichtsstandard der „prestained proteinmarker low range“ (BioRad) verwendet.

2.2.5.5 Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel erfolgte durch einen Elektroblot in Transferpuffer (200 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20% Methanol) für eine Stunde unter Durchflusskühlung bei 70 V auf eine PVDF-Membran (Millipore, Immobilon-P). Die Membran wurde über Nacht in Blockierlösung (PBS; 10% Tween-20; 10% BSA) inkubiert. Vor, zwischen und nach der 1-stündigen Antikörperinkubation wurde die Membran jeweils für 1 x 15 min und 2 x 5 min in Waschpuffer (PBS; 1% Tween-20; 1% BSA) gewaschen. Als Erstantikörper diente ein monoklonaler Maus-anti-gp120-Antikörper (#9305, DuPont, 1:500 verdünnt in Waschpuffer) und als Zweitantikörper wurden mit Meerrettich-Peroxidase (POD)-gekoppelte Schaf-anti-Maus-F(ab')₂-Fragmente (NA9310, Amersham; 1:1000 verdünnt in Waschpuffer) verwendet.

Alternativ zu diesem Protokoll wurde 15 min mit Milchpulver-Blockierung (10 % (w/v) Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween) inkubiert. Die Erstantikörper-Inkubation erfolgte für 1 h mit einem monoklonalen Maus-anti-gp120-Antikörper (87-133/026, Dade Behring; 1:5000

verdünnt in PBS mit 5 % Milchpulver, 0,1 % Tween). Nach 3-maligem Waschen für 10 min mit PBS folgte die Zweitantikörper-Inkubation (POD-gekoppelte Schaf-anti-Maus-F(ab')₂-Fragmente, NA9310, Amersham; 1:1000 verdünnt in PBS mit 10 % Milchpulver, 0,1 % Tween) und 5-maliges Waschen für je 10 min in PBS.

Die Detektion erfolgte über das ECL-System (Amersham bzw. Pierce Ultra) nach den Angaben der Hersteller und nachfolgende Film-Exposition (ECL-Film, Amersham) sowie Quantifizierung im Lumi-Imager F1 (Roche Molecular Biochemicals) mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software.

2.2.6 RNA-Analysen mittels Northern Blot

2.2.6.1 Präparation von Gesamt-RNA

30 h nach der Transfektion wurden die transfizierten HeLa-Zellen einer T75-Flasche mit einem Zellschaber in 10 ml PBS gekratzt und 5 min bei 4°C und 400 x g pelletiert. Die Pellets wurden in 5 ml RNA-clean (AGS, Heidelberg) unter Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) homogenisiert und die Zellsuspension zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 4°C, 8.500 x g). Die RNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt, pelletiert (4°C, 10.300 x g, 20 min), 2-mal mit je 2 ml 70% DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert.

Alternativ erfolgte die Gesamt-RNA-Isolierung nach einem modifizierten Protokoll nach Chomczynski (64). Die transfizierten HeLa-T4⁺ Zellen einer T75-Flasche wurden 30 h nach der Transfektion in 10 ml PBS gekratzt und 5 min bei 4°C, 400 x g pelletiert. Die Pellets wurden in 3 ml Solution D (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Acetat pH 7; 0,5 % N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Es folgte die Ansäuerung der Fraktionen mit 0,1 Volumen Na-Acetat (2 M; pH 4) und die Zugabe von 1 Volumen Phenol. Nach Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), gründlichem Mischen und 15 min Inkubation auf Eis, folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (20 min; 9200 x g; 4°C). Die wässrige RNA-haltige Phase wurde mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 4°C, 10.300 x g) wurde die RNA 2-mal mit je 2 ml 70 % DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DMDC-ddH₂O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch spektralphotometrische Absorptions-Messung bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.2.6.2 Präparation von Kern- und Cytoplasma-RNA mit hypotonischem Lysispuffer

Die getrennte Präparation von Kern- und Cytoplasma-RNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (194) nach Chomczynski (64). Es wurde ein Natriumdeoxycholat-haltiger, hypotonischer Lysispuffer verwendet, der neben der freien RNA auch die membrangebundene cytoplasmatischen RNA freisetzen soll (24, 373).

HeLa-T4⁺ Zellen einer T75-Flasche wurden 30 h nach der Transfektion mit 10 ml eiskaltem PBS sowie mit 10 ml hypotonischem Waschpuffer (1,5 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen und mit 3 ml kaltem, hypotonischen Lysispuffer (1% Na-Deoxycholat; 1% Triton-X-100; 1,5 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) für 10 min auf Eis lysiert (368). Der Lysispuffer mit der cytoplasmatischen RNA wurde aus der Zellkulturflasche abgezogen. Unlösliche zelluläre Bestandteile, sowie Verunreinigungen der cytoplasmatischen Fraktion durch Zellkerne wurden durch Zentrifugation (5 min, 500 x g; 0° C) sedimentiert und der Überstand mit gleichem Volumen heißer (80°C), doppelt konzentrierter Solution D (8 M Guanidinium-Isothiocyanat; 50 mM Na-Acetat pH 7; 1% N-Lauroylsarkosin; 0,2 M β-Mercaptoethanol) versetzt. Die in der Zellkulturflasche haftenden Kerne wurden mit einem Zellkratzer in 3 ml hypotonischen Waschpuffer geschabt, zentrifugiert (5 min; 500 x g; 0°C) und das Kern-Pellet in 600 µl 1 x Solution D (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Acetat pH 7; 0,5 % N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Es folgte die Ansäuerung der Fraktionen mit 0,1 Volumen Na-Acetat (2 M; pH 4) und die Zugabe von 1 Volumen Phenol. Nach Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), gründlichem Mischen und 15 min Inkubation auf Eis folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (20 min; 9200 x g; 4°C). Die wässrige RNA-haltige Phase wurde mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 4°C, 10.300 x g) wurde die cytoplasmatische RNA mit 70 % DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl DMDC-d₄H₂O gelöst, während die nukleäre RNA mit 100 µl 70 % DMDC-Ethanol gewaschen und in 12 µl DMDC-d₄H₂O resuspendiert wurde. Konzentration und Ausbeute wurden durch spektralphotometrische Absorbptions-Messungen bei 260 und 280 nm bestimmt.

Zur Qualitätskontrolle der Kern- und Cytoplasma-RNA-Fractionen wurden je 2 µg der in TE gelösten RNA auf einem 1 % Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer, pH 7,0 (20 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure; 8 mM NaAc; 1 mM EDTA) aufgetrennt, geblottet und mittels Digoxigenin-markierter Antisense-RNA gegen cytoplasmaspezifische mitochondriale Cytochrom C Oxidase Untereinheit II (pT7CCII) und gegen das kernspezifische humane β-Actin Intron C (pβ-actin intron) hybridisiert (siehe 2.2.6.4).

2.2.6.3 Isolierung polyadenylierter RNA

Aus 60-110 µg Gesamt- oder Cytoplasma-RNA wurde die polyadenylierte RNA (poly(A)⁺ RNA) durch Hybridisierung an 2 mg Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (Dyna) und nachfolgende magnetische Separation nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Bindung der RNA an die Beads erfolgte unter leichtem Schütteln in 200 µl Bindepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M LiCl; 1 mM EDTA). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA) wurde die poly(A)⁺-selektionierte RNA mit 20 µl Denaturierungs/Elutionspuffer (50 % (v/v) Formamid; 2,15 M Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer, pH 7,0; 22,5 % (v/v) DMDC-ddH₂O) bei 68°C für 2 min eluiert.

2.2.6.4 Northern Blot-Analyse

Die poly(A)⁺-selektionierte Gesamt- oder Cytoplasma-RNA sowie die in Elutionspuffer (50 % (v/v) Formamid; 2,15 M Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer, pH 7,0; 22,5 % (v/v) DMDC-ddH₂O) aufgenommene Kern-RNA wurde nach 15-minütiger Denaturierung bei 68°C und Zugabe von 1/10 Volumen Blaumarker in einem 1,2 % Formaldehyd-Agarose-Gel mit 1 x MOPS-Puffer pH 7 (20 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; 8 mM NaAc; 1 mM EDTA) als Laufpuffer bei 2-3 V/cm in ca. 14 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel zur Entfernung des Formaldehyds 15 min unter fließendem dH₂O gespült und 10 min in 20 x SSC (standard saline citrate: 3 M NaCl; 0,3 M tri-NaCitrat·2H₂O) äquilibriert. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Molecular Biochemicals) erfolgte durch 8-stündigen Kapillarblot mit 20 x SSC. Anschließend wurde die RNA durch UV-Quervernetzung mit 0,5 J/cm² (Biometra, Fluo-Link) auf der Membran immobilisiert. Die Membran wurde für mindestens 1 h bei 68°C in H-SDS Puffer (50 % (v/v) Formamid; 5 x SSC; 50 mM Na-Phosphat, pH 7; 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin; 7 % (w/v) SDS; 2 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche Molecular Biochemicals); 50 µg/ml Hefe-Gesamt-RNA) prähybridisiert und über Nacht mit Digoxigenin (DIG)-markierten antisense RNA-Sonden (je nach Größe des Blots 0,5-2 µl, siehe 2.2.6.5) hybridisiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Gelbeladung wurde eine Sonde komplementär zum Exon 5 des humanen Wachstumshormons (p73hGH) verwendet. Die HIV-spezifische RNA wurde durch Sonden komplementär zur 5'-Sequenz von *tat* (pUH3ΔS/K) bzw. zur 3'-Sequenz von *env* (LTRcenvAΔH/X) nachgewiesen. Hybridisierte DIG-Sonden wurden nach Kopplung eines anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugates (50 mU/ml; Roche Molecular Biochemicals) mittels Chemilumineszenz (250 µM CDP-Star; Roche Molecular Biochemicals) gemäß Herstellerangaben nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wurde durch Film-Exposition detektiert (Amersham, ECL-Film). Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Lumi-Imager F1 (Roche) und Normierung auf die Transfektionseffizienz (hGH-Signal) mit der zugehörigen Software LumiAnalyst™3.1.

2.2.6.5 *In vitro* Transkription zur Herstellung von DIG-gekoppelten RNA-Sonden

Die Plasmide für antisense RNA-Sonden wurden in einem 30 µl Ansatz mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert (siehe 2.1.6.4), mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, in 4 M LiCl/Ethanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 10 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert. Von dieser linearisierten Plasmid-DNA wurden Digoxigenin-markierte Sonden mit dem DIG RNA labeling Kit (Roche Molecular Biochemicals) gemäß Herstellerangaben transkribiert. Die 1-2-stündige *in vitro* Transkription erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit 20 U RNA-Polymerase (T7 oder SP6, Roche Molecular Biochemicals), 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (400 mM Tris pH 8, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin), 2 µl „10 x DIG-labeling-mix“ (10mM ATP, GTP, CTP, 6,5 mM UTP, 3,5mM DIG-11-UTP), 1 µl RNAsin (Promega; 20 U/µl) und 1 µg linearisierter Plasmid-DNA. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA (0,2 M) gestoppt und das Gesamtvolumen mit DMDC-ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Transkripte wurden mit 25 µl NH₄OAc (10 M) und 50 µl Isopropanol gefällt, mit 70 % DMDC-Ethanol gewaschen und in 50 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert.

2.2.7 Protein/RNA-Elektrophorese-Mobilitäts-Shift (EMSA)

2.2.7.1 Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem ASF/SF2- bzw. Rev-Protein mit Histidin-tag

Eine 5 ml LB-Kultur (10 g Tryptophan, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, 100µg/ml Ampicillin) wurde mit *E.coli* M15(pREP4), transformiert mit pDS56-6H-SF2 (His-tag N-terminal), bzw. mit BL 21 (DE3), transformiert mit pET-HMKHis syn Rev ccss (His-Tag C-terminal), angeimpft und 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde überführt in 0,5 l 2 x YT-Medium (16 g Tryptophan, 10 g Yeast extract, 5 g NaCl ad 1 l, 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) und ca. 3-4 h inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 1,0 - 1,2 erreicht war. Nach IPTG-Induktion (1 mM IPTG-Endkonzentration) wurde die Kultur weitere 30 min (SF2) bzw. 2 h (Rev ssc) bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, 15 min bei 7700 x g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 16 ml GuHCl (ph 8) resuspendiert. Nach 1 h langsamer Rotation bei Raumtemperatur wurde erneut 15 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 0,5 ml Nickel-Agarose (Ni-NTA Superflow(25),Qiagen), mindestens 1-mal mit SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 42 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5 mM DTT; 0,2 mM EDTA; 15 % Glycerol, 1 mM PMSF) bzw. Rev-Puffer (0,5 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen, versetzt. Zur Komplexbildung der Histidin-tags mit der Ni-Agarose wurde 45 min bei 20°C langsam rotiert. Die Probe wurde in eine Chromatographiesäule überführt und mit GuHCl-Puffer (100 mM Na-PO₄³⁻;

10 mM Tris; 6 M GuHCl; 20 mM Imidazol, optional in pH 8 und 6,5; pH eingestellt mit NaOH) gewaschen und eluiert. Nacheinander wurde mit 10 ml GuHCl (pH 8), 10 ml GuHCl (pH 6,5), 3 ml GuHCl (pH 6) gewaschen und das rekombinante Protein 2-mal mit 2 ml GuHCl (pH 5) eluiert und in 0,5 ml Fraktionen aufgenommen. Zur Kontrolle der einzelnen Fraktionen wurde je 1 µl Proteinfraktion (ad 20 µl d_2 H₂O + SDS Gelladepuffer) 3 min bei 95°C denaturiert und auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (max. 40 mA). Die Proteine wurden über Coomassie Blue Färbung und Entfärben des Gels (10 % HAc, 50 % EtOH) sichtbar gemacht. Danach folgte die Dialyse der proteinhaltigen Fraktionen auf 4°C für SF2 schrittweise in 3 h von 6 M GuHCl auf 2 M GuHCl und über Nacht gegen SF2-Puffer. Das rekombinante Rev wurde in 3 h gegen 1 M GuHCl und über Nacht gegen Rev-Puffer dialysiert. Zum Abschluss wurde jeweils 1-2 h mit frischem SF2- bzw. Rev-Puffer dialysiert. Die durchschnittliche Ausbeute betrug ca. 1 mg SF2 bzw. 4 mg Rev-Protein. Für die Lagerung bei -80°C wurde dem Rev-Protein 10 % Glycerol zugeben.

2.2.7.2 *In vitro* Transkription von [³²P]-markierten Transkripten

Die T7-*in vitro* Transkriptions-Konstrukte wurden 3'-wärts der zu untersuchenden Sequenz linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumen EtOH präzipitiert, mit 70 % EtOH gewaschen und in TE resuspendiert. 1 µg der linearisierten DNA wurde mit 10 U T7 RNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) im mitgelieferten Puffer mit 400 µM ATP; 400 µM CTP; 100 µM GTP; 40 mM UTP; 1 mM GpppG Cap-Analogon (Amersham Bioscience) und 20 µCi [α -³²P] UTP (37 MBq, 20 mCi/ml; 800 Ci/mmol, Amersham Bioscience, PB 20383) 60-120 min *in vitro* transkribiert. Die Transkripte wurden auf denaturierenden 6 % Polyacrylamid-Gelen (8 M Harnstoff; 75 mM Tris-Borat; pH 8,3; 1,5 mM EDTA; National Diagnostics) mit 15 W (300 V) aufgetrennt, ausgeschnitten, über Nacht in Elutionspuffer (0,3 M NaAcetat; 1 mM EDTA) bei 4°C eluiert, Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert.

2.2.7.3 EMSA

Die [³²P]-UTP markierten Transkripte (2.2.7.2) wurden präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl Renaturierungs-Puffer (140 mM KCl; 20 mM Tris-Cl pH 7,8) resuspendiert. Die Transkripte wurden 1 min auf 90°C erhitzt und danach innerhalb von 15 min auf 60°C und innerhalb weiterer 15 min auf 30°C abgekühlt. In 10 µl Reaktionsvolumen wurden jeweils ca. 1 µl der Transkripte (ca. 150 cps) mit 5 µl 2 x Bindepuffer (20 mM HEPES pH 7,9; 200 mM KCl; 4 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 20 % Glycerin; 100 ng/µl tRNA) mit 100-300 ng SF2ΔRS-Protein in SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,9, 42 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 15 % Glycerol,

1 mM PMSF) für 15 min auf Raumtemperatur bzw. zur Identifizierung von RNA-Sekundärstrukturen auf 4°C inkubiert. Die Protein-RNA-Komplexe wurden auf einem nativen 4 % TBE-Polyacrylamid-Gel bei 4°C und maximal 5 W/300 V aufgetrennt. Die Gele wurden vakuumgetrocknet und mittels Röntgen-Film (Hyperfilm-MP™, Amersham) ausgewertet.

2.2.8 *In vitro* Spleiß-Assay

[³²P]-markierte Transkripte wurden wie unter 2.2.7.2 beschrieben transkribiert und geleluert. 2-4 µl RNA (200-300 cps) wurden in einen 25 µl Ansatz mit 8 µl HeLa-Kernextrakt (Cell culture center, Belgien; hergestellt nach einem Protokoll von Dignam et al.(83)), 2 µl SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 42 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5 mM DTT; 0,2 mM EDTA; 15 % Glycerol) ohne oder mit 800 ng rekombinantem ASF/SF2-Protein und 2,5 µl 10 x Spleißpuffer (25 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 200 mM Creatinphosphat, 3,4 mM DTT, 4 U/µl RNasin (Promega)) eingesetzt. Für die Untersuchung der Rev-Funktion wurde der Reaktionsansatz vor Zugabe der *in vitro* Transkripte für 15 min mit 0 - 3 µg rekombinantem Rev-Protein (2.2.7.1) bzw. mit 0 - 400 ng Rev₃₄₋₅₀ Oligopeptid (wurde freundlicherweise von Prof. J. Kjems, Universität Aarhus, Dänemark, zur Verfügung gestellt) vorinkubiert. Die Spleißreaktionen wurden für 2 h bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 175 µl Spleißstop-Puffer (300 mM NaAc, pH 6; 100 mM NaCl; 20 mM Tris HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,5 % SDS; 0,03 µg/µl tRNA) wurde die RNA Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und in 10 µl RNA-Gelladepuffer (80 % Formamid, 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol) resuspendiert. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 95°C wurden die Proben auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamid-Gel (8 M Harnstoff; 75 mM Tris-Borat, pH 8,3; 1,5 mM EDTA) bei 15 W aufgetrennt. Die Gele wurde vakuumgetrocknet und mittels Röntgenfilm (Fuji Medical Xray Film) bzw. Phosphor Imaging Plate Scanner (Fujifilm) ausgewertet und mit der LumiAnalyst™3.1 Software (Roche) ausgewertet.

Alternativ wurde, für die Identifizierung der Lariatstrukturen, der Überstand in der letzten Chloroform-Extraktion 1:2 geteilt, die 2 Fraktionen präzipitiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. 1/3 der RNA wurde in 10 µl RNA-Gelladepuffer (80 % Formamid, 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol) aufgenommen, während die restlichen 2/3 in 20 µl Debranching-Puffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 10 % Glycerin, 8 mM EDTA) resuspendiert, mit 5 µl S100-Fraktion (Cell Culture Center, Belgien; nach Dignam et al (83)) versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert wurden. Die S100-Fraktion enthält eine Enzymaktivität, die die Lariate linearisiert (352). Nach Zugabe von 180 µl Spleißstop-Puffer (300 mM NaAc, pH 6; 100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,5 % SDS; 0,03 µg/µl tRNA) wurde die RNA Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert, 1 mal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 10 µl RNA-Gelladepuffer resuspendiert.

3 Ergebnisse

Einige Sequenzabschnitte der HIV-1 prä-mRNA können, abhängig vom betrachteten Gen, als Intron oder auch als Exon angesehen werden. Der 5'-Bereich der *env*-Sequenz, beispielsweise, liegt im Intron des *tat/rev*-Leserasters. Dieses Intron wird von dem Spleißdonor 4 (SD4) und dem Spleißakzeptor 7 (SA7) begrenzt (Abb. 2A, B). Um *env* zu exprimieren, muß das intronhaltige Transkript, vermittelt durch das virale Regulatorprotein Rev, in das Cytoplasma exportiert werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Rev-vermittelte *env*-Expression von der Anwesenheit bzw. der Effizienz der Spleißstellen beeinflusst wird.

3.1 Der Spleißdonor

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Mutationsanalyse des SD4 dargestellt. Ein Großteil der Daten zum Einfluss von Punktmutationen in der SD4-Sequenz und in der 5'-wärts vorgelagerten Exon 5-Sequenz auf die *env*-Expression (3.1.1), sowie die Differenzierung zwischen der Funktion der U1 snRNA im Spleißprozess und in der Transkriptstabilisierung (3.1.2), wurden bereits publiziert (107, 164). Die Ergebnisse werden hier im Gesamtzusammenhang dargestellt und durch Experimente zum Einfluss der SD4-Mutationen im Kontext des authentischen HIV-1 Promotors ergänzt (3.1.3).

3.1.1 Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA ermöglicht das Spleißen und die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte

3.1.1.1 Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA ermöglicht die *env*-Expression

Um die Rolle des Spleißdonors in der Rev-abhängigen *env*-Expression zu untersuchen, wurden Mutationen in die SD4-Sequenz des *env*-Expressionsvektors SV E/X *tat*⁻*rev*⁻ eingebracht. Dieser Vektor enthält das subgenomische *EcoRI/XhoI*-Fragment aus pNLA1, einem cDNA Derivat des HIV-1 Isolats NL4-3 (348). Dies entspricht der 3'-Hälfte des HIV-1 Genoms mit den kodierenden Sequenzen für *tat*, *rev*, *vpu* und *env* (Abb. 10A). Das effiziente *tat*-Translationsstartcodon (314) ist in diesem Expressionsvektor durch Mutationen inaktiviert (*tat*⁻), um eine Translationsinhibition der 3'-wärts liegenden Leserahmen auszuschließen. Da Mutationen im SD4 die Rev-Expression beeinflussen könnten, wurde auch das Rev-Startcodon mutiert (*rev*⁻). Gleiche Rev-Mengen wurden durch Kotransfektion eines Rev-Expressionsplasmids (SVcrev) zur Verfügung gestellt. SV E/X *tat*⁻*rev*⁻ kodiert daher nur Vpu und Env. Die virale Sequenz wird von einem

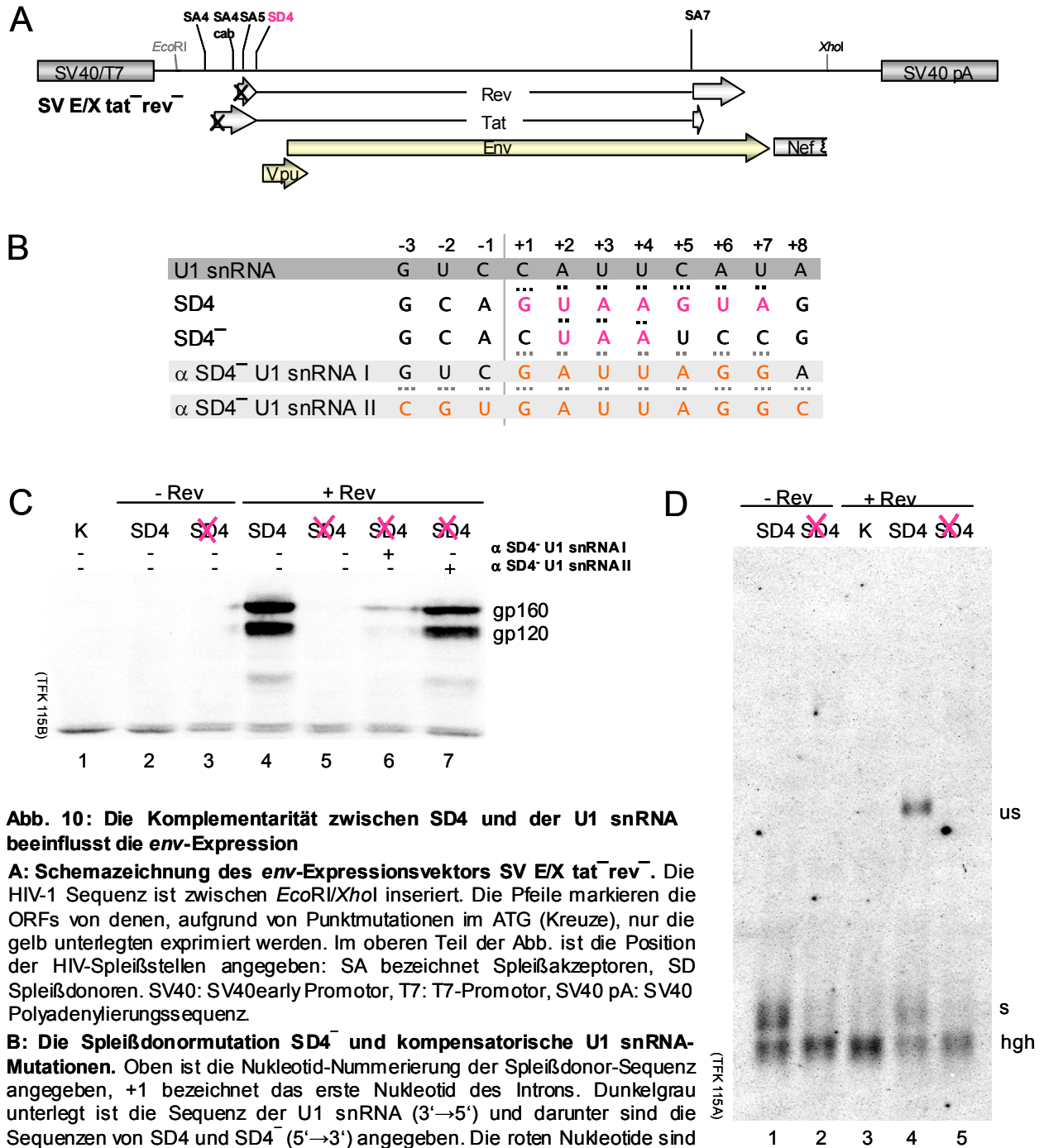


Abb. 10: Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA beeinflusst die env-Expression

A: Schemazeichnung des env-Expressionsvektors SV E/X tat⁻ rev⁻. Die HIV-1 Sequenz ist zwischen *EcoRI/XhoI* inseriert. Die Pfeile markieren die ORFs von denen, aufgrund von Punktmutationen im ATG (Kreuze), nur die gelb unterlegten exprimiert werden. Im oberen Teil der Abb. ist die Position der HIV-Spleißstellen angegeben: SA bezeichnet Spleißakzeptoren, SD Spleißdonoren. SV40: SV40early Promotor, T7: T7-Promotor, SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssequenz.

B: Die Spleißdonormutation SD4⁻ und kompensatorische U1 snRNA-Mutationen. Oben ist die Nukleotid-Nummerierung der Spleißdonor-Sequenz angegeben, +1 bezeichnet das erste Nukleotid des Introns. Dunkelgrau unterlegt ist die Sequenz der U1 snRNA (3'→5') und darunter sind die Sequenzen von SD4 und SD4⁻ (5'→3') angegeben. Die roten Nukleotide sind komplementär zur U1 snRNA, schwarze Punkte geben die Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken an. Darunter sind die Sequenzen der kompensatorischen U1 snRNAs aufgeführt. Die orangen Nukleotide sind komplementär zur SD4⁻-Mutation, graue Punkte geben die Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken zur SD4⁻-Sequenz an.

C: Env-Glykoprotein-Nachweis im Western Blot. 3 × 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻-Konstrukte, 1 µg SVcrev bzw. pSVT7, 1 µg puCBU1αSD4⁻ I oder II bzw. pSVT7 und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, mittels Luciferase-Assay auf die Transfektionseffizienz normiert, in einem 7 % PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Erst-Antikörper gegen gp120, einem POD-gekoppelten Zweit-Antikörper und anschließendem Biolumineszenznachweis wie unter 2.2.5 beschrieben. Spur 1: Negativkontrolle (pSVT7, pGL3); Spur 2, 4: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 3, 5-7: SV E/X tat⁻ rev⁻SD4⁻. Die Kotransfektion mit SVcrev und den kompensatorischen U1snRNA-Expressionsplasmiden sind über dem Blot angegeben.

D: p(A)⁺ RNA-Nachweis im Northern Blot. 3 × 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 9 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻-Konstrukte, 9 µg SVcrevΔH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 82 µg p(A)⁺ aufgereinigt, auf einem denaturierenden 1 % Agarosegel aufgetrennt und geblottet wie unter 2.2.6 beschrieben. Der Blot wurde gleichzeitig mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert, die zum 3'-Bereich von *env* (LTRcenvpA⁻) und zu *hgh* (p73hGH, zur Normierung der Transfektionseffizienz) komplementär waren. Die Kotransfektion mit SVcrev ist über den Spuren angegeben. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1, 4: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 2, 5: SV E/X tat⁻ rev⁻SD4⁻; Spur 3: Negativkontrolle (pSP73, SVcrev, pXGH5).

SV40early-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert. In früheren Arbeiten waren bereits erste Mutationen in die SD4-Umgebung eingefügt worden (214, 321). Dabei lag die Überlegung zugrunde, dass die komplementäre Bindung der U1 snRNA an der Exon/Intron-Grenze die Erkennung des Spleißdonors und damit die Assemblierung des Spleißosoms initiiert (3, 192). Die HIV-1 SD4-Sequenz ist in den Positionen +1 bis +7 komplementär zur U1 snRNA-Sequenz. Das erste Nukleotid des Introns wird dabei definitionsgemäß als +1 bezeichnet. In dem Konstrukt SV E/X tat⁻rev⁻SD4⁻ wurde diese Komplementarität durch Punktmutationen in den Positionen +1, +5, +6 und +7 herabgesetzt, um eine spleißdefekte Mutante zu erhalten (Abb. 10B).

Humane HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit den Konstrukten mit der authentischen (SD4) bzw. der mutierten Sequenz (SD4⁻) transient transfiziert. Anschließend wurde ein Zellextrakt hergestellt und die Proteine im Western Blot analysiert. Beide Konstrukte exprimierten in Abwesenheit von Rev erwartungsgemäß kein Env (Abb. 10C, Spur 2 und 3), da die Env-Expression Rev-abhängig ist. Nach Kotransfektion mit einem Rev-Expressionsplasmid (SVcrev), ließen sich von dem Konstrukt mit authentischer SD4-Sequenz das Env-Glykoprotein (gp160) und das Spaltprodukt gp120 nachweisen (Spur 4). Im Gegensatz dazu war mit der SD4⁻-Sequenz keine Glykoprotein-Expression nachweisbar (Spur 5). Dies stimmte mit den von Lu und Mitarbeitern publizierten Beobachtungen überein, die ebenfalls eine Abhängigkeit der Rev-vermittelten Env-Expression von der 5'-Spleißstelle beschrieben haben (223).

Falls der Verlust der Env-Expression durch die fehlende Bindungsmöglichkeit der U1 snRNA verursacht wurde, sollte es möglich sein, durch Kotransfektion mit einer zur SD4⁻-Sequenz komplementären U1 snRNA die Env-Expression wieder herzustellen. Dazu wurden in ein U1 snRNA Expressionsplasmid kompensatorische Mutationen zu den Spleißdonor-Positionen +1, +5, +6 und +7 (α SD4⁻ U1 snRNA I) bzw. -3 bis +1 und +5 bis +8 (α SD4⁻ U1 snRNA II) eingeführt (Abb. 10B). Tatsächlich war im Western Blot nach Kotransfektion mit SV E/X tat⁻rev⁻SD4⁻ und dem ersten U1 snRNA-Konstrukt (α SD4⁻ U1snRNA I) Env nachweisbar (Abb. 10C, Spur 6). Trotz vergleichbarer Bindungsmöglichkeiten, wie zwischen dem SD4 und der zellulären U1 snRNA, lies sich jedoch nur ein geringer Teil der Env-Expression wieder herstellen (vergleiche Spur 4 und 6). Erst nach Kotransfektion mit dem U1 snRNA-Konstrukt mit verlängerter Komplementärsequenz (α SD4⁻ U1 snRNA II), konnte die Menge der ursprünglichen Env-Expression (vergleiche Spur 4 und 7) annähernd erreicht werden. Die geringeren Env-Mengen beruhten wahrscheinlich auf der höheren Konzentration, der von mehreren Genloci exprimierten, zellulären U1 snRNA, gegenüber den von kotransfizierten Plasmiden transkribierten U1 snRNAs. Das normalerweise in kanonischen Spleißdonorsequenzen

vorhandene GT-Dinukleotid war für die Bindung der U1 snRNA in diesen Komplementationsexperimenten nicht notwendig.

Um zu untersuchen, ob die, durch die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA vermittelten Unterschiede in der Env-Glykoprotein-Menge bereits auf unterschiedliche Transkriptmengen zurückgingen, wurden RNA-Analysen durchgeführt. Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen wurde die Gesamt-RNA präpariert, poly(A)⁺ aufgereinigt und im Northern Blot analysiert (Abb. 10D). Dabei zeigte sich ohne Rev für das SD4-Konstrukt (Spur 1), nicht aber für das SD4⁻-Konstrukt (Spur 2) gespleißte RNA. Die SD4⁻-Mutation führte also zum Verlust der Spleißdonorfunktion. In beiden Fällen war keine ungespleißte RNA nachweisbar. In Anwesenheit von Rev zeigte sich für das SD4-Konstrukt die für HIV-1 charakteristische Verlagerung von gespleißter zu ungespleißter, *env*-kodierender RNA (vgl. Spur 1 mit 4). Ohne Spleißdonor (SD4⁻) war jedoch auch keine ungespleißte RNA detektierbar (Spur 5). Die Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA schien offenbar eine Auswirkung auf die RNA-Stabilität zu haben. Die fehlende Env-Expression im Western Blot ließ sich also auf den Verlust der mRNA zurückführen.

3.1.1.2 Die Positionen -1 bis -3 der Spleißdonorsequenz können zur Bindung der U1 snRNA beitragen

Bei dem Konstrukt SV E/X tat⁻rev⁻ hängt die Rev-abhängige *env*-Expression von der Komplementarität der SD4-Sequenz zur U1 snRNA ab. Welche Voraussetzungen muss nun die Spleißdonorsequenz mindestens erfüllen, um die Bindung der U1 snRNA und damit die *env*-Expression zu ermöglichen? Der SD4 weist in den Positionen +1 bis +7 eine fortlaufende Sequenz von sieben komplementären Basen auf. Werden für jede G-C Basenpaarung 3 und für jede A-T Basenpaarung 2 Wasserstoff-Brücken gezählt, so sind insgesamt 16 Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA möglich. Eine Mutation in der Position +7 führte nicht zu einer Reduktion der Env-Glykoprotein-Expression (214). Danach sind für die *env*-Expression 6 komplementäre Basen mit 14 möglichen Wasserstoff-Brücken zwischen SD4 und der U1 snRNA ausreichend. Die U1 snRNA verfügt nach Sekundärstrukturanalysen über ein elf Nukleotide langes, einzelsträngiges 5'-Ende (Abb. 11C). Es stellte sich die Frage, ob 14 Wasserstoff-Brücken, unabhängig von ihrer Position innerhalb dieser 11 Nukleotide, die Rev-vermittelte *env*-Expression erlauben. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die im SD4 ungenutzten Positionen der Exon 5-Sequenz (Position -1 bis -3) zur Bindung der U1 snRNA beitragen können. Dafür wurden Mutationen eingeführt, die die komplementäre Sequenz zur U1 snRNA schrittweise 5'-wärts bis zur Position -3 verschieben (Abb. 11A). Die Position -4, deren Pendant in der U1 snRNA in

einem Stem loop organisiert ist und daher keine Bindung zur SD4-Sequenz eingehen sollte (Abb. 11C), wurde zur Kontrolle ebenfalls mutiert. Bedingt durch die unterschiedliche Anzahl von 3 bzw. 2 Wasserstoff-Brücken zwischen G/C- und A/U-Basenpaarungen entstanden so Mutanten mit 14 bis 15 möglichen Wasserstoff-Brücken (Abb. 11A, ΣH). Die Nomenklatur dieser Konstrukte setzt sich aus der Kurzform „cs“ (continuous stretch), der Startposition der komplementären Sequenz und der Anzahl der möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen zur U1 snRNA zusammen.

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen und Präparation der Gesamt-RNA, wurde die poly(A)⁺ RNA isoliert und im Northern Blot analysiert (Abb. 11B). Für die Konstrukte cs +1¹⁴ und -2¹⁴ zeigten sich sowohl für die gespleißte (Spur 1 und 2) als auch für die ungespleißte RNA (Spur 7 und 8) deutliche Signale. Von dem Konstrukt -3¹⁵ war ebenfalls RNA nachweisbar (Spur 3 und 9), trotz einer zusätzlich möglichen Wasserstoffbrücke jedoch in geringerer Menge. Im Gegensatz dazu war von der Mutante cs -4¹⁶ keine *env*-mRNA mehr detektierbar (Spur 4 und 10). Dies bestätigte, dass die Position -4 nicht an der Bindung zur U1 snRNA teilnehmen konnte, da andernfalls nicht 13 sondern 16 Wasserstoff-Brücken zur Verfügung gestanden hätten. Die vorhandenen 13 Wasserstoff-Brücken waren für die *env*-Expression nicht ausreichend, was auch durch die Kontrolle -3¹³ (Spur 5 und 11) bestätigt wurde. Eine negative Wechselwirkung der komplementären Base in Pos. -4 mit der Sekundärstruktur der U1 snRNA konnte ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche komplementäre Base in Position +3 (cs -4¹⁸, Spur 6 und 12) führte, nach Normierung auf die Transfektionseffizienz (us %), zu einer mit cs -3¹⁵ (Spur 9) vergleichbaren Menge der *env*-mRNA.

Die drei terminalen Exon-Positionen -3 bis -1 der Spleißdonorsequenz konnten demnach, wenn auch unterschiedlich gut, zur Bindung der U1 snRNA beitragen. Sie waren in der Lage Fehlbasenpaarungen in den Positionen +4, +5 und +6 zu kompensieren. Die Inkompatibilität der Position -4 stand in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Sekundärstrukturanalyse von Branlant und Mitarbeitern (36). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mindestens 6 benachbarte Basen oder 14 Wasserstoff-Brücken notwendig waren, um die ungespleißte RNA zu stabilisieren und damit die *env*-Expression zu ermöglichen. Dieses Ergebnis bestätigte sich in weiteren Mutationsanalysen: Während eine Punktmutation in Position +7 des SD4 (cs+1¹⁴), die zu einer Reduktion von 16 auf 14 mögliche Wasserstoff-Brücken führte, toleriert wurde, konnte bei einer zusätzlichen Mutation in Position +6 (T → A), die nur noch 12 Wasserstoff-Brücken ermöglichte, keine Glykoprotein-Expression mehr beobachtet werden (164, 214).

3.1.1.3 Eine zentrale Fehlbasenpaarung zwischen SD4 und der U1 snRNA verhindert die *env*-Expression und kann durch zusätzliche Bindungen in den Positionen -1 und +8 ausgeglichen werden

Um zu untersuchen wie sich eine einzelne, zentrale Fehlbasenpaarung zwischen SD4 und der U1 snRNA auf die *env*-Expression auswirkt, wurden das Konstrukt SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ 3U und davon abgeleitete Mutationen verwendet. Die Nomenklatur dieser Konstrukte setzt sich aus der Position der Punktmutationen und den jeweils eingesetzten Nukleotiden zusammen (Abb. 12A). Die 3U-Sequenz weist also durch eine A \rightarrow T Mutation in Position +3 eine zentrale Fehlbasenpaarung zur U1 snRNA auf. Die Konstrukte 3U8U und -1G3U besitzen in den 5'- beziehungsweise 3'-wärts angrenzenden Positionen je eine, das Konstrukt -1G3U8U zwei zusätzliche komplementäre Basen zur U1 snRNA. Als Positivkontrollen wurden die Konstrukte SD4 und -1G8U mit einer fortlaufenden Sequenz komplementärer Basen mit 16 bzw. 21 möglichen Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA verwendet.

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten wurde die Gesamt-RNA präpariert und poly(A)⁺ aufgereinigt. Obwohl die 3U-Mutante insgesamt 14 Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA ausbilden konnte, was bei einer durchgängigen Bindesequenz ausreichend für die *env*-Expression war, zeigte der Northern Blot in Gegenwart von Rev kein Signal für die ungespleißte mRNA (Abb. 12B, Spur 2). Eine zentrale Fehlbasenpaarung reichte demnach aus, um das Spleißen und die Stabilisierung der RNA und damit die *env*-Expression zu inhibieren. Erst durch zusätzliche Wasserstoff-Brücken in den Positionen -1 oder -1 und +8 wurde eine *env*-Expression ermöglicht. Während das Konstrukt 3U8U (Spur 3), mit 5 möglichen H-Brücken 5'-wärts und 11 H-Brücken 3'-wärts (5 | 11), noch keine ungespleißte RNA zeigte, konnten mit -1G3U ((8 | 9), Spur 4) und -1G3U8U ((8 | 11), Spur 5) zunehmende Mengen an ungespleißter mRNA detektiert werden.

Neben der Position -1 konnte also auch die Position +8 zur U1 snRNA-Bindung beitragen und, bei geeigneter Anzahl und Verteilung der H-Brücken, die zentrale Fehlbasenpaarung kompensieren. Die Analyse der 3U-Mutanten zeigte außerdem, dass die Anzahl der Wasserstoff-Brücken zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA die Menge der gespleißten und der ungespleißten mRNA gleichermaßen modulieren konnte. Versuche mit vergleichbaren Konstruktfamilien, die eine Fehlbasenpaarung in den Positionen +4 oder +5 aufwiesen, bestätigten dieses Ergebnis. Es stellte sich heraus, dass 6 - 12 H-Brücken auf jeder Seite der Fehlbasenpaarung für die *env*-Expression nötig waren. Die genaue Anzahl ergab sich in Abhängigkeit von der jeweils anderen Seite (164, 214).

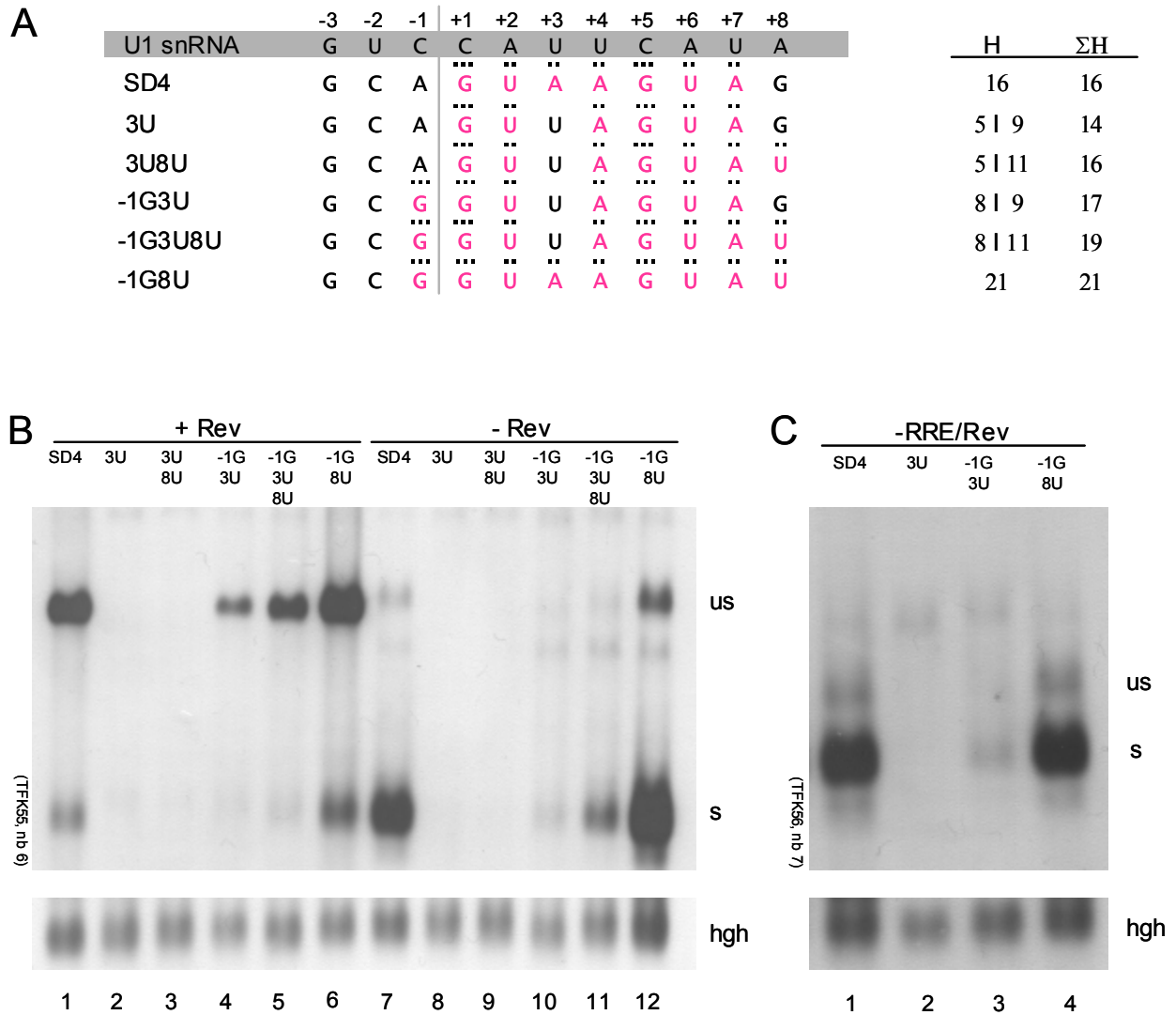


Abb. 12: Eine zentrale Fehlbasenpaarung zwischen SD4 und der U1 snRNA verhindert die *env*-Expression, kann aber durch zusätzliche Bindungen in den Positionen -1 und +8 ausgeglichen werden

A: 3U-Mutationen im Spleißdonor 4 (SD4). Oben ist die Nukleotid-Nummerierung der Spleißdonorsequenz angegeben, +1 bezeichnet das erste Nukleotid des Introns. Grau unterlegt ist die Sequenz der U1 snRNA (3'→5') und darunter sind die Sequenzen von SD4 und den 3U-Konstrukten (5'→3') angegeben. Die roten Nukleotide sind komplementär zur U1 snRNA, die schwarzen Punkte geben die Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken an. Unter H ist die Verteilung der möglichen Wasserstoffbrücken zu beiden Seiten der Fehlbasenpaarung (l) und unter ΣH die Summe aller möglichen Wasserstoffbrücken angegeben.

B: p(A)⁺ RNA-Nachweis der 3U-Konstrukte im Northern Blot. 3 x 10⁷ HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 µg der 3U-Konstrukte, 60 µg SVcrev bzw. pSP73 und 60 µg pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 85 µg p(A)⁺ aufgereinigt, auf einem denaturierenden 1% Agarosegel aufgetrennt und gebロットet. Der Blot wurde nacheinander mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert, die komplementär zu *tat*-Exon2 (pUH3ΔS/K) und zu *hgh* (p73hGH) waren. Die Kotretransfektion mit SVcrev, sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1, 7: SV E/X *tat*⁻rev⁻; Spur 2, 8: SV E/X *tat*⁻rev⁻ 3U; Spur 3, 9: SV E/X *tat*⁻rev⁻ 3U8U; Spur 4, 10: SV E/X *tat*⁻rev⁻ -1G3U; Spur 5, 11: SV E/X *tat*⁻rev⁻ -1G3U8U; Spur 6, 12: SV E/X *tat*⁻rev⁻ -1G8U.

C: p(A)⁺ RNA-Nachweis von 3U-Konstrukten ohne RRE im Northern Blot. 3 x 10⁷ HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 µg der 3U-Konstrukte (Spleißkassetten, siehe Abb. 13A), 60 µg SVcrev bzw. pSP73 und 60 µg pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 85 µg p(A)⁺ aufgereinigt, auf einem denaturierenden 1% Agarosegel aufgetrennt und gebロットet. Der Blot wurde nacheinander mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert, die komplementär zu *tat*-Exon2 (pUH3ΔS/K) und zu *hgh* (p73hGH) waren. Abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1: pASV SD4/SA7 pA; Spur 2: pASV 3U/SA7 pA; Spur 3: pASV -1G3U/SA7 pA; Spur 4: pASV -1G8U/SA7 pA.

Wie in den vorausgegangenen Experimenten zeigte sich auch hier, dass die von der Komplementarität zwischen SD4 und der U1 snRNA abhängige Modulation der RNA-Menge, in An- und Abwesenheit von Rev ein vergleichbares Bild ergab. Die Mengen von gespleißter und ungespleißter RNA schienen in konstanten Proportionen zueinander zu stehen. Rev spielte demnach bei der U1 snRNA-vermittelten Stabilisierung der Transkripte keine Rolle. Allerdings wurde in der Literatur vereinzelt ein Einfluss der RRE-Struktur auf die RNA-Stabilität diskutiert (40, 297). Um herauszufinden, ob das RRE bei der durch die U1 snRNA vermittelten RNA-Stabilisierung eine Rolle spielte, wurde in verkürzten, von der HIV-1 Sequenz abgeleiteten Konstrukten die RRE-Sequenz deletiert (pASV SD4/SAx pA; siehe Abb. 13A). Nach transienter Transfektion mit Konstrukten mit SD4, 3U, -1G3U und -1G8U-Sequenz zeigte die Analyse der p(A)⁺RNA im Northern Blot die bekannten Abstufungen in der Menge der gespleißten mRNA (vgl. Abb. 12C, Spur 1-4 mit 12B, Spur 7,8,10 und 12). Die durch die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zur U1 snRNA vermittelte Stabilisierung hing also weder von der Anwesenheit eines RRE noch von einer möglichen Rev/RRE-Interaktion ab und könnte demnach auch für zelluläre RNAs von Bedeutung sein.

3.1.1.4 Die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zur U1 snRNA beeinflusst die Spleißeffizienz *in vitro*

In den bisherigen Experimenten wirkten sich Mutationen des SD4 in gleichem Maße auf die Menge der ungespleißten sowie der gespleißten mRNA aus. Der Einfluss der SD4-Mutationen auf die RNA-Stabilität war also unabhängig vom Spleißvorgang, da sonst die ungespleißten Transkripte nicht betroffen sein sollten. Daraus ergab sich jedoch die Frage, ob die SD4-Mutationen wirklich zu einer Veränderung der Spleißeffizienz führen oder ob die Unterschiede in der Menge der gespleißten RNA auf die Änderungen in der Menge der ungespleißten RNA zurückgingen.

Um den Aspekt der Transkriptstabilisierung soweit wie möglich aus dem Versuchssystem auszuschließen und direkt zu prüfen, ob Mutationen wie 3U die Spleißeffizienz der 5'-Spleißstelle verändern können, wurde ein *in vitro* Spleiß-Assay etabliert. In diesem Assay wurden gleiche Transkriptmengen in einem Kernextrakt aus HeLa-Zellen (83) inkubiert und auf ihre Spleißeffizienz untersucht. Das *in vitro* Spleißen der HIV-1 Sequenzen erfolgte jedoch sehr ineffizient. Um die Effizienz soweit zu erhöhen, dass ein signifikantes Spleißereignis *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurden die Transkriptionseinheiten und dabei insbesondere die Intronsequenz verkürzt. Basierend auf der Sequenz des bisher verwendeten *env*-Expressionsvektors SV E/X tat⁻rev⁻, entstand dabei ein Kassetten-Konstrukt mit einem verkürzten ersten Exon und einer verkürzten Intronsequenz

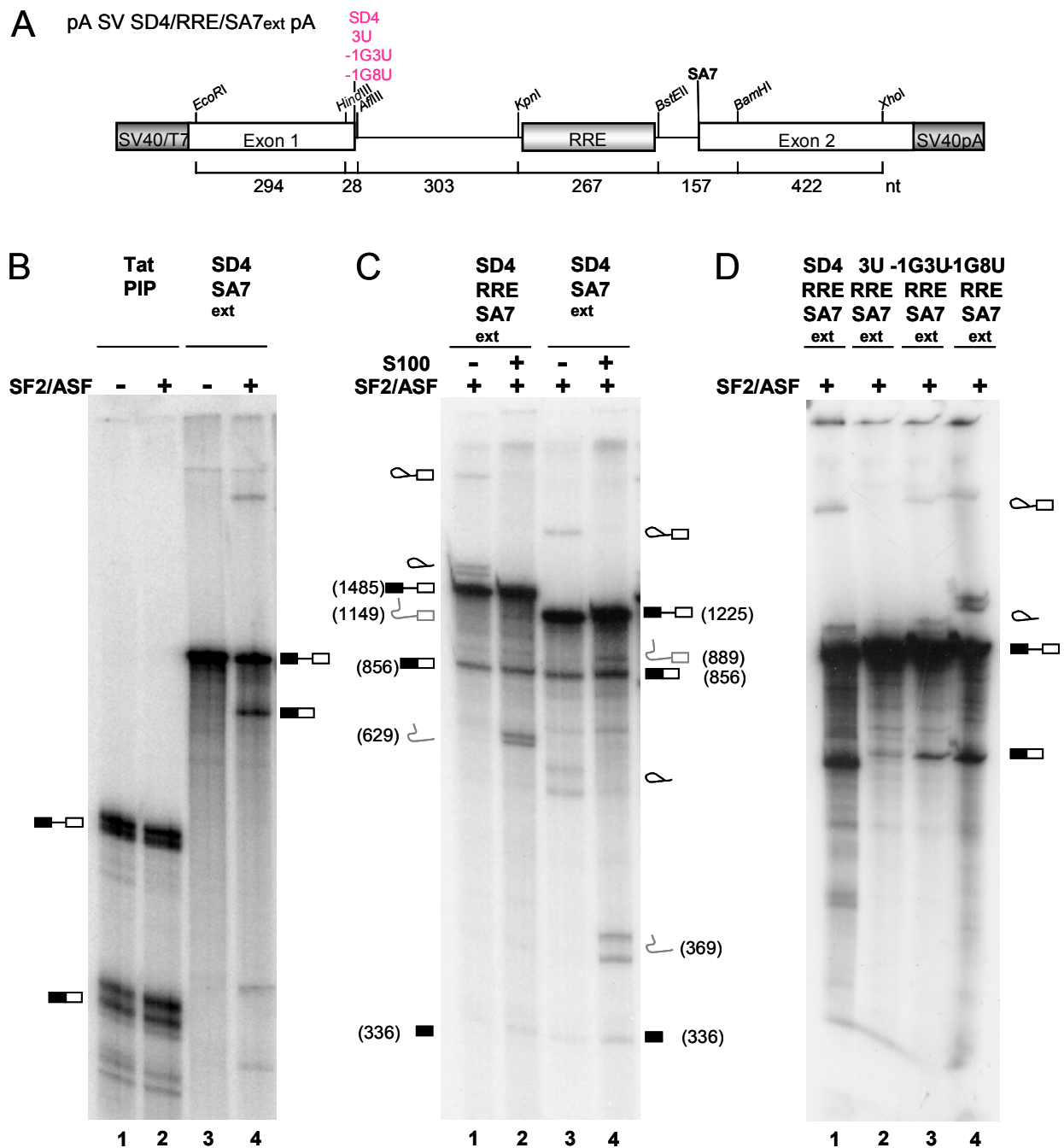


Abb. 13: Die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zur U1 snRNA beeinflusst die Spleißeffizienz *in vitro*

A: Schemazeichnung der Spleißkassetten-Konstrukte (pA SV SD4/RRE/SA7_{ext} pA, Klonierungsschema siehe 2.1.6.2). Über dem Konstrukt ist die Position der Restriktionsschnittstellen angegeben, die zum Austausch der einzelnen Fragmente genutzt werden können. Die Position der Spleißstellen ist markiert: SA bezeichnet den Spleißakzeptor (hier SA7), SD den Spleißdonor (hier SD4). SV40 : SV40early Promotor, T7: T7-Promotor, RRE: Rev Responsive Element, SV40 pA: SV40-Polyadenylierungssequenz. Unter dem Konstrukt sind die Längen der Restriktionsfragmente in Nukleotiden (nt) angegeben.

B-D: Spleißkassetten-Konstrukte im *in vitro* Spleiß-Assay. [³²P]-markierte *in vitro* T7-Transkripte der Spleißkassetten-Konstrukte wurden in HeLa-Kernextrakt nach einem modifizierten Protokoll nach Dignam (83, 164) in An- und Abwesenheit von rekombinantem SF2/ASF gespleißt (**B**). Das Kontrollplasmid TatPIP (enthält den HIV-1 SD4 und den SA1 aus dem Adenovirus major late Transkript und wurde freundlicherweise von Prof. Kjems zur Verfügung gestellt) spleißt bereits in Abwesenheit von SF2/ASF (T.Tange, pers. Mitteilung). Um auch die nichtlinearen Lariatstrukturen gemäß ihrer Länge aufzutrennen, wurden die Spleißansätze mit S100-Fraktion aus HeLa-Zellextrakt versetzt. S100 enthält eine Debranching-Aktivität (352). Die Längen der einzelnen Spleißprodukte sind angegeben (nt) (**C**). Die Spleißeffizienz der 3U-Mutanten (**D**) wurde in Anwesenheit von SF2/ASF verglichen. Die jeweils verwendeten Spleißkassetten-Konstrukte sind über den Spuren angegeben. Transkript: ■—□, Lariat Intermediat: ○—□, Spleißprodukt: ■—□, Lariat: ○—□, 5'Exon: ■.

(Abb. 13A, Klonierungsschema siehe 2.1.6.2). Die einzelnen Module Exon 1, Spleißdonor, Intronsequenz, RRE, Spleißakzeptor und Exon 2 sind von Restriktions-Schnittstellen begrenzt und beliebig austauschbar. Die Spleißkassetten-Konstrukte exprimierten, aufgrund der Deletion im Intron, kein Env-Glykoprotein mehr. Die RNA-Expression war jedoch vergleichbar zu den SV E/X tat⁻rev⁻ Konstrukten. Sowohl die Rev-vermittelte Verschiebung von gespleißter zu ungespleißter RNA, als auch die, durch die Spleißdonormutationen bedingten, unterschiedlichen RNA-Mengen waren zu beobachten (vgl. z.B. die Spleißkassetten-Konstrukte in Abb. 12C mit den entsprechenden SV E/X tat⁻rev⁻-Mutanten in 12B).

Im *in vitro* Spleiß-Assay ließen sich zunächst nur von einem heterologen Kontrollplasmid, das den HIV-1 SD4 und einen Adenovirus Spleißakzeptor enthielt (TatPip, Abb. 13B, Spur 1), nicht aber von der HIV-Spleißkassette (pA SV SD4/SA7/ESS pA, Spur 3) gespleißte Transkripte nachweisen. Erst nach Zugabe von rekombinantem, aufgereinigtem ASF/SF2 (siehe 2.2.7.1), einem SR-Protein, das an konstitutiven und alternativen Spleißereignissen beteiligt ist (129), konnte ein Spleißprodukt nachgewiesen werden (Spur 4). Die bei der Spleißreaktion als Nebenprodukte entstehenden Intron-Lariate, sowie Intermediate aus Intron und 3'-Exon wurden, bedingt durch ihre verzweigte Struktur, nicht ausschließlich anhand ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Um die einzelnen Banden zuordnen zu können, wurde den Spleißansätzen die S100 Fraktion aus HeLa-Zellen zugesetzt. Die S100-Fraktion enthält eine Enzymaktivität, die die Lariate an ihrem Verzweigungspunkt linearisiert (352). Die nun linearen RNA-Fragmente (graue Symbole) konnten anhand der Größenunterschiede identifiziert werden. Abgebildet sind Spleißkassetten mit (Abb. 13C, Spur 1 und 2) und ohne RRE (Spur 3 und 4). Nach diesen Versuchen wurden an der Position des SD4 repräsentativ die Mutationen 3U, -1G3U und -1G8U eingeführt. Die *in vitro* transkribierten RNAs wurden in HeLa-Kernextrakt in Anwesenheit von rekombinantem ASF/SF2 gespleißt (Abb. 13D). Die Menge der gebildeten Spleißprodukte korrelierte mit der Komplementarität zwischen der SD4-Sequenz und der U1 snRNA. Sowohl die RNA-Stabilität *in vivo* als auch die Spleißeffizienz *in vitro* waren abhängig von der Bindung der U1 snRNA an den SD4.

3.1.1.5 Ein neuer Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA-Bindestellen

Für die Vorhersage von funktionellen 5'-Spleißstellen werden in der Regel Algorithmen verwendet, die auf ein von Shapiro und Senapathy entwickeltes Verfahren zurückgehen (324). Dieses Verfahren beruht auf einer Bewertung der zu analysierenden Sequenz im Vergleich zur Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in den Positionen -2 bis +6 einer statistisch relevanten Anzahl von Spleißstellen. Die Heterogenität der Spleißstellen in

Metazoen führt jedoch nach wie vor zu Problemen bei der Vorhersage funktioneller Spleißdonorsequenzen. Die Anzahl der möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen dem SD4 und der U1 snRNA beeinflusste nicht nur die Stabilität der RNA *in vivo* sondern auch die Menge des gebildeten Spleißprodukts im *in vitro* Spleiß-Assay. Daraus entstand der Ansatz funktionelle Spleißdonorsequenzen direkt über die Anzahl und Anordnung der möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen zur U1 snRNA zu beschreiben. Basierend auf den Ergebnissen der Mutationsanalyse des SD4 wurde ein Algorithmus entwickelt, der ausgehend vom einem GT-Dinukleotid mögliche Wasserstoff-Brücken in den Positionen -3 bis +8 analysiert. Die in der SD4-Mutationsanalyse erhaltenen Ergebnisse zur nötigen Anzahl von Wasserstoff-Brücken in kontinuierlichen und diskontinuierlichen U1 snRNA-Bindesequenzen definierten zunächst die Schwellenwerte für funktionelle Spleißdonoren (164).

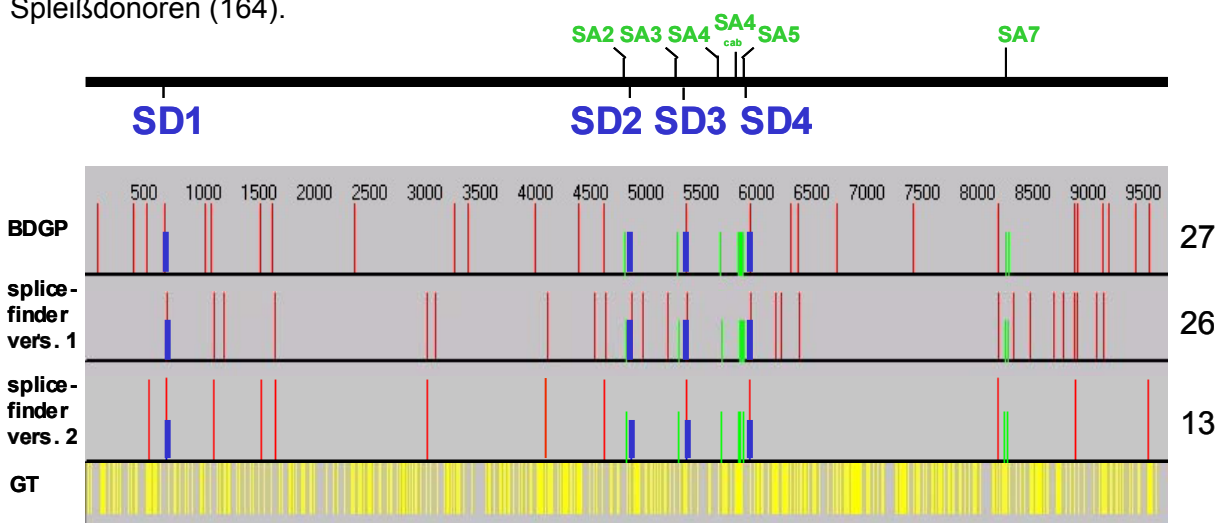


Abb. 14: Nachbarschaftsbeziehungen statt Konsensussequenz - ein neuer Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA-Bindestellen

Dargestellt ist eine Vorraussage von funktionellen Spleißdonoren anhand der Sequenz des HIV-1 Genoms. Zur besseren Orientierung sind die genutzten Spleißstellen im HIV-1 Genom im oberen Teil der Abb. schematisch dargestellt (SD: Spleißdonor, blau; SA: Spleißakzeptor, grün). Darunter ist das Ergebnis der Analyse des HIV-1 Genoms mit verschiedenen Algorithmen zu sehen. Mit einer Software zur Vorhersage von humanen Spleißdonorsequenzen des Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP; http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; nach (43); Sequenz 134.99.165.10.2629.0, score threshold 0.400, Thu, 01 Mar 2001 03:45:12 - 0800 (PST) Nomi Harris, nomi@bdgp.lbl.gov) wurden 27 potentielle Spleißdonoren (rot) lokalisiert. Von den genutzten HIV-1 Spleißdonoren (blau) wurde der SD2 nicht erkannt. Die erste Version des "Splicefinder" Algorithmus auf der Basis der SD4-Mutationsanalyse (164) sagte 26 potentielle Spleißdonoren, einschließlich des SD2 vorher. Eine weitere Einbeziehung der Nachbarschaftsbeziehungen der Nukleotide in der U1 snRNA-Bindesequenz, insbesondere die Unterscheidung von A/T- und G/T-Basenpaarungen und eine korrigierte Bewertung der Positionen -3 und +8 (107) führte in Version 2 bereits zu einer Reduktion auf 13 vorhergesagte, potentielle Spleißdonoren. Der SD2 wurde dabei nicht mehr als funktioneller Spleißdonor erkannt. Im unteren Teil der Abb. sind alle im HIV-1 Genom vorhandenen GT-Dinukleotide (gelb) angegeben. Die Darstellung der Analyse erfolgte mit BarPlot Genetics (S.Theiss, Result GmbH).

Um den Algorithmus zu überprüfen, wurde eine Analyse des HIV-1 Genoms durchgeführt. Zum Vergleich wurde ein Algorithmus zur Vorhersage von humanen Spleißdonoren verwendet, der auf eine Publikation von Brunak und Mitarbeitern zurück geht (43) (Berkeley Drosophila Genome Project, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Von diesem Algorithmus wurden 27 potentielle Spleißdonoren vorhergesagt, von denen jedoch nur drei

den tatsächlich genutzten HIV-1 Spleißdonoren entsprachen (Abb. 14, BDGP). Der SD2 wurde nicht als funktioneller Spleißdonor erkannt. Bereits die erste Version des am SD4 entwickelten „Splicefinder“ Algorithmus (Abb. 14B, splicefinder, version 1) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Es wurden 26 potentielle Spleißdonoren vorhergesagt, in denen jedoch alle vier tatsächlich genutzten HIV-1 Donoren enthalten waren. Die Weiterführung der experimentellen Arbeit führte zu einer Korrektur der Bewertung der endständigen Positionen -3 und +8. Dadurch reduzierte sich z. B. der Schwellenwert für eine fortlaufende komplementäre Sequenz von 14 auf 13 mögliche Wasserstoff-Brücken. Zusätzlich wurden G/U-Wobble-Basenpaarungen in endständigen und internen Positionen untersucht (107). Die Analyse des HIV-1 Genoms mit der zweiten Version des „splicefinder“ Algorithmus erreichte bereits eine Reduktion auf 13 vorhergesagte U1 snRNA-Bindestellen (Abb. 14, splicefinder, version 2). Durch den verringerten Schwellenwert wurde jedoch der SD2 nicht mehr als funktionell erkannt. Im Verlauf der Arbeit ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass die Erkennung des SD2 nur durch den 5'-gelegenen effizienten Spleißakzeptor ermöglicht wird (siehe 4.3.5). Die jeweils aktuelle Version des „splicefinder“ Algorithmus ist im Internet zugänglich (<http://www.splicefinder.net/>).

3.1.1.6 Die 5'-wärts des SD4 liegende Exon 5-Sequenz beeinflusst das Spleißen und die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte

Beim Vergleich verschiedener Vektoren mit unterschiedlich langen HIV-1 Sequenzen 5'-wärts des SD4 (Abb. 15A) fiel auf, dass zwei dieser Konstrukte signifikante Unterschiede in der Menge des exprimierten Env-Glykoproteins zeigten (ohne Abb., siehe (164)). Um herauszufinden, ob dies auf Unterschiede in den mRNA-Mengen zurück ging, wurden HeLa-T4⁺ Zellen mit den Konstrukten transfiziert und die p(A)⁺ RNA isoliert. Das Konstrukt SVrev enthält ein funktionelles Rev-ATG als erstes ATG nach dem Transkriptionsstart und kann daher Rev exprimieren. Die anderen Konstrukte, die entweder kein (SV sac-sma) oder ein mutiertes Rev-ATG (SV E/X tat⁻rev⁻) enthielten, wurden mit SVcrev kotransfiziert.

Die Northern Blot-Analyse zeigte einen deutlichen Unterschied sowohl in der Menge der gespleißten als auch in der Menge der ungespleißten, *env*-kodierenden mRNA (Abb. 15B): Da auf der Höhe der zum Teil sehr schwachen Signale für die gespleißte RNA in allen Spuren Kreuzhybridisierungen sichtbar waren, wurden die Signale der ungespleißten RNA zur Quantifizierung genutzt, wobei der Maximalwert gleich 100 % gesetzt wurde. Das Konstrukt mit der längsten Leadersequenz (SV E/X tat⁻rev⁻) und das um 222 Nukleotide verkürzte Konstrukt (SVrev) zeigten beide ein starkes Signal für das ungespleißte

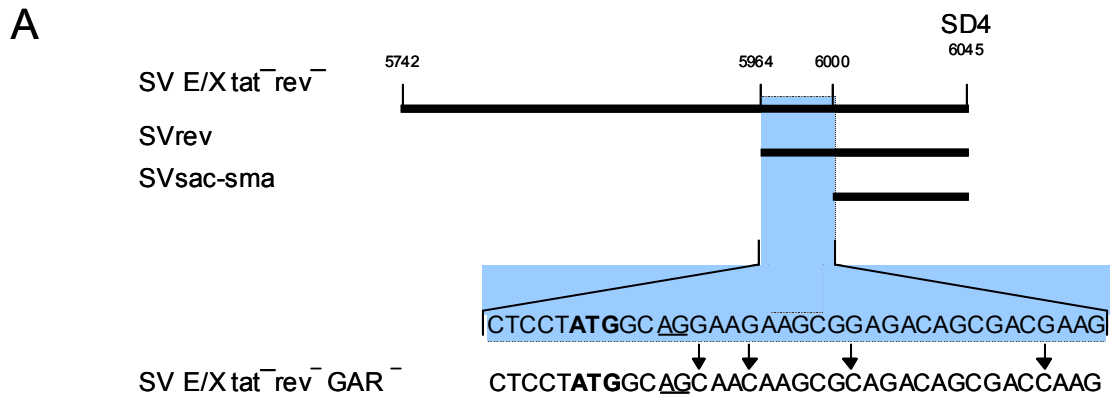
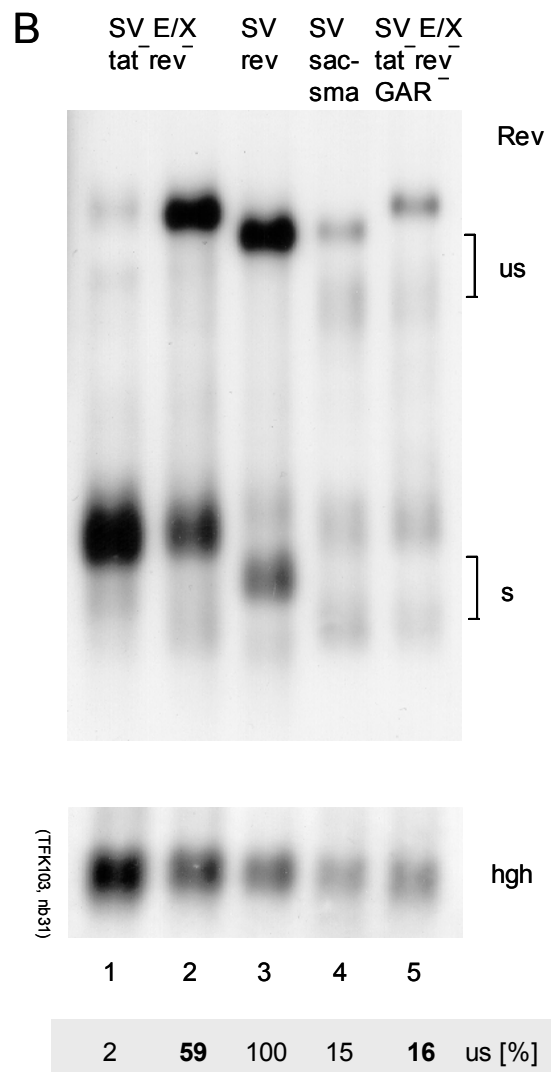


Abb. 15: Die 5'-wärts des SD4 liegende Exon 5-Sequenz beeinflusst das Spleißen und die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte

A: Schemazeichnung der Konstrukte mit unterschiedlich langen 5'-Sequenzen. Die Nukleotidpositionen der 5'-Enden der Konstrukte sind angegeben. Der für eine effiziente Env-Expression wichtige Teil der Leadersequenz zwischen nt 5964 und 6000 ist blau unterlegt, die Sequenz ist im unteren Teil aufgeführt. Die GAR^- -Punktmutationen von G zu C sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zur besseren Orientierung sind das Rev-ATG (fett) und der SA5 (nt 5974, unterstrichen) markiert.

B: p(A)⁺ RNA-Analyse der Konstrukte mit unterschiedlich langen 5'-Sequenzen im Northern Blot. 3×10^7 HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 μg der SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ -Konstrukte, 60 μg SVrev bzw. pSP73 und 60 μg pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 100 μg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und gebロットet. Der Blot wurde nacheinander mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert, die komplementär zum 3'-Bereich von *env* (LTR cenvpA^-) und zu *hgh* (p73hGH) waren. Die Detektion erfolgte durch Lumineszenz-Messung im Lumi-Imager F1 (Roche) und Auswertung mit der LumiAnalystTM 3.1 Software. Die Koftransfektion mit SVrev sowie die Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1, 2: SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$; Spur 3: SVrev; Spur 4: SVsac/sma; Spur 5: SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^- \text{GAR}^-$. Unter dem Blot sind die relativen Mengen der ungespleißten (us) RNA normiert auf das hgh-Signal angegeben. Der Maximalwert wurde gleich 100 % gesetzt.



Transkript (59 %, Spur 2 bzw. 100 %, Spur 3). Das dritte, um weitere 36 Nukleotide verkürzte Konstrukt (SV_{sac-sma}), zeigte dagegen, im Vergleich zu dem ebenfalls mit SV_{crev} kotransfizierten Ausgangskonstrukt (SV E/X tat⁻rev⁻), ein um den Faktor 4 reduziertes Signal der ungespleißten mRNA (15 %, Spur 4). Bei diesen 36 Nukleotiden handelte es sich um eine, zwischen dem Spleißakzeptor 5 und dem Spleißdonor 4 lokalisierte, purinreiche Sequenz (Abb. 15A, blau unterlegt). Diese Sequenz enthielt mehrere Wiederholungen eines GAR (R= Purin)-Motivs, das in ähnlicher Form als Bindemotiv für SR-Proteine beschrieben worden ist (91, 206, 392). Um herauszufinden, ob dieses GAR-Motiv eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Transkriptmengen war, wurden 4 der GAR-Sequenzen im Ausgangsplasmid SV E/X tat⁻rev⁻ zu CAR mutiert (SV E/X tat⁻rev⁻GAR⁻, Abb. 15A). Das Ziel war, die potentiellen SR-Bindestellen, unter Beibehaltung der Länge der Leadersequenz, zu inaktivieren. Das resultierende GAR⁻-Konstrukt (Spur 5, 16 %) verhielt sich vergleichbar zu dem Konstrukt mit deletierter GAR-Sequenz (SV_{sac-sma}, Spur 4, 15 %).

Der Unterschied in der mRNA-Menge war also unabhängig vom Abstand des SD4 vom Promotor oder von der Cap-Struktur. Neben der Komplementarität zwischen der SD4-Sequenz und der U1 snRNA waren *cis*-wirkende Sequenzen im Exon 5 5'-wärts des SD4 für die Stabilisierung der Transkripte und damit für eine effiziente Rev-abhängige *env*-Expression nötig (48, 164). Weitere Experimente bestätigten die Vermutung, dass die purinreiche Sequenz 5'-wärts des SD4 als Bindestelle für SR-Proteine diene (48) (siehe auch 3.2.3.3 - 3.2.3.5).

3.1.2 Spleißen und Stabilisierung der prä-mRNA sind differenzierbare Funktionen der U1 snRNA-Bindung

3.1.2.1 Die Position +1 der Spleißdonorsequenz ist für das Spleißen, aber nicht für die Stabilisierung der RNA essenziell

Die Mutationen in der SD4-Sequenz beeinflussten sowohl die Spleißeffizienz als auch die Stabilisierung der RNA. Es stellte sich die Frage, ob es *in vivo* möglich ist, diese beiden Funktionen der U1 snRNA voneinander zu trennen. Bei der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in humanen 5'-Spleißstellen (Abb. 4B) fiel auf, dass außer im definierten GT-Dinukleotid in allen Positionen Fehlbasenpaarungen auftreten können. Wenn die Stabilisierung der prä-mRNA jedoch nur auf der Bindung der U1 snRNA beruhen und keine funktionelle Spleißstelle voraussetzen würde, könnte ein Transkript mit mutiertem GU aber ausreichend komplementären Basen zur U1 snRNA spleißdefekt aber hinreichend stabilisiert sein. Aus dieser Überlegung heraus wurden die Konstrukte

A		-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8		
	U1- snRNA	G	U	C	C	A	U	U	C	A	U	A	H	ΣH
	SD4	G	C	A	G	U	A	A	G	U	A	G	16	16
	SD4 ⁻	G	C	A	C	U	A	A	U	C	C	G	6	6
	GT I	G	A	G	C	U	A	A	G	U	A	U	5 15	20
	GT II	G	A	G	C	C	A	A	G	U	A	U	5 13	18
	GT III	G	C	A	C	U	A	A	G	U	A	U	15	15
	GT IV	G	C	A	C	U	A	A	G	U	A	G	13	13
	GT V	C	A	G	C	U	A	A	G	U	A	U	8 15	23

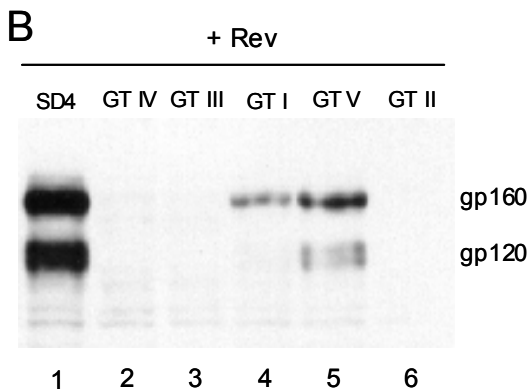
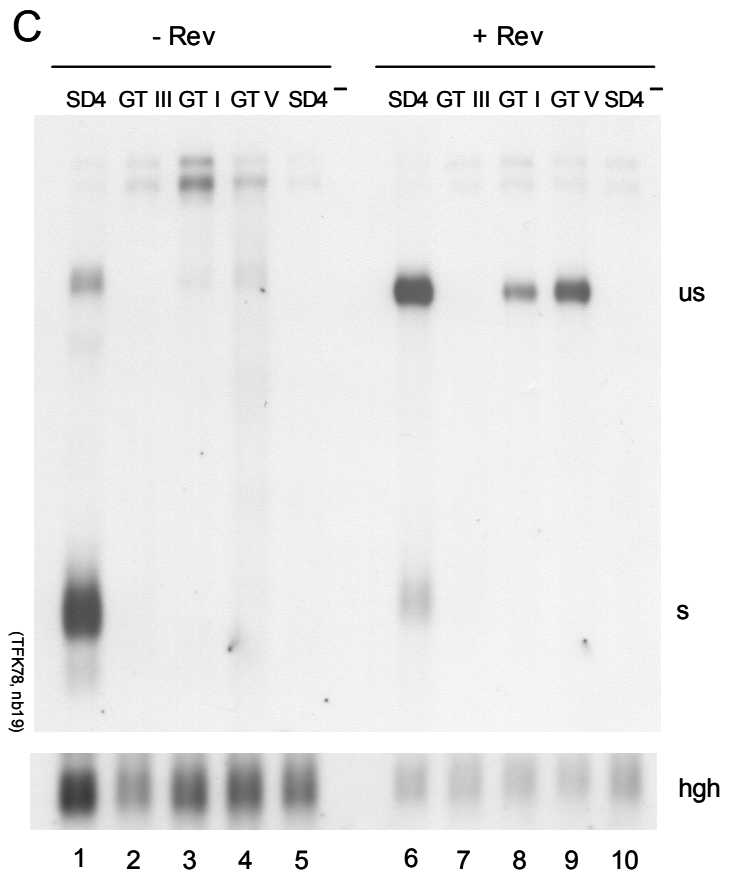


Abb. 16: Die Position +1 der Spleißdonorsequenz ist für das Spleißen aber nicht für die Stabilisierung der RNA essentiell

A: GT-Mutationen in der Position des Spleißdonors 4. Oben ist die Position der Nukleotide zur Exon/Intron-Grenze angegeben, wobei +1 das erste Nukleotid des Introns bezeichnet. Grau unterlegt ist die Sequenz der U1 snRNA (3'→5'), darunter sind die Sequenzen von SD4, SD4⁻ und den GT-Mutanten (5'→3') angegeben. Die roten Nukleotide sind komplementär zur U1 snRNA, die schwarzen Punkte geben die möglichen Wasserstoff-Brücken an. Unter H ist die Verteilung der möglichen Wasserstoff-Brücken zu beiden Seiten der Fehlbasenpaarung (I) und unter ΣH die Summe aller möglichen Wasserstoff-Brücken angegeben.

B: Env-Glykoprotein-Nachweis der GT-Mutanten im Western Blot. 3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der SV E/X tat⁻rev⁻-Konstrukte, 1 µg SVcrev bzw. pSVT7 und 0,5 µg pGL3-control kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, Luciferase-normiert, in einem 7 % PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp 120, einen POD-gekoppelten Zweitantikörper und anschließenden Biolumineszenznachweis. Spur 1: SV E/X tat⁻rev⁻; Spur 2: SV E/X tat⁻rev⁻GT IV; Spur 3: SV E/X tat⁻rev⁻GT III; Spur 4: SV E/X tat⁻rev⁻GT I; Spur 5: SV E/X tat⁻rev⁻GT V; Spur 6: SVE/X tat⁻rev⁻GT II.

C: p(A)⁺ RNA-Nachweis der GT-Mutanten im Northern Blot. 3 x 10⁷ HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 µg der SV E/X tat⁻rev⁻-Konstrukte, 60µg SVcrev bzw. pSP73 und 60 µg pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 110 µg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert, die komplementär zu *tat*-Exon 2 (pUH3ΔS/K) und zu *hgh* (p73hGH) waren. Die Kotransfektion von SVcrev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1, 6: SV E/X tat⁻rev⁻; Spur 2, 7: SV E/X tat⁻rev⁻GT III; Spur 3, 8: SV E/X tat⁻rev⁻GT I; Spur 4, 9: SVE/X tat⁻rev⁻GT V; Spur 5, 10: SVE/X tat⁻rev⁻SD4⁻.



SV E/X tat⁻rev⁻ GT I und GT II kloniert (Abb. 16A). GT I weist eine Fehlbasenpaarung in Position +1 auf, während in GT II zusätzlich auch die Position +2 mutiert wurde. Eine hohe Komplementarität zur U1 snRNA wurde in beiden Konstrukten durch entsprechende Mutationen der Positionen -1, -2 und +8 erhalten.

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Plasmiden wurde die *env*-Expression auf Protein- und RNA-Ebene analysiert. Während die GT II-Mutante kein Env-Glykoprotein exprimiert (Abb. 16B, Spur 6), konnte mit der GT I-Mutante Env (Abb. 16B, Spur 4) und folglich auch ungespleißte RNA (Abb. 16C, Spur 8) nachgewiesen werden. Gleichzeitig führte die Fehlbasenpaarung in Position +1 zu einem Spleißdefekt (Abb. 16C, Spur 3). Die Bindung der U1 snRNA an die prä-mRNA ermöglichte also, unabhängig von der Funktion des Spleißens, die Stabilisierung und den Rev-abhängigen Export der ungespleißten Transkripte.

Die weitere Mutationsanalyse zeigte, dass eine Komplementarität von 15 Wasserstoff-Brücken 3'-wärts der Mutation in Position +1 nicht ausreichte, um die RNA zu stabilisieren. (GT III, Abb. 16C, Spur 7). Wurden die in GT I vorhandenen 5 H-Brücken auf der 5'-Seite der Fehlbasenpaarung auf die maximal möglichen 8 erhöht (GTV, Abb. 16C, Spur 9), ließ sich die Menge der ungespleißten RNA steigern, erreichte aber nach wie vor nicht die mit der SD4-Sequenz nachgewiesene Menge (vgl. Abb. 16C, Spur 6 mit Spur 9). Bei einer Fehlbasenpaarung in Position +1 waren also mehr als die bisher definierten 13 Wasserstoff-Brücken nötig, um eine optimale Stabilisierung der RNA zu gewährleisten.

3.1.2.2 Eine U1 snRNA-Bindestelle im 5'-Leader stabilisiert ein Transkript ohne funktionellen Spleißdonor

Eine U1 snRNA-Bindestelle konnte, unabhängig von ihrer Funktion als Spleißstelle, als RNA-stabilisierendes Element wirken. Dies führte zu der Überlegung, ob ein normalerweise instabiles 3U-Transkript durch zusätzliche stabilisierende Elemente im 5'-Bereich der RNA stabilisiert werden könnte, ohne die Sequenz des defekten Spleißdonors zu verändern. In Kooperation mit M. Austrup wurden in das 3U-Konstrukt (SV E/X tat⁻rev⁻ 3U), 5'-wärts des mutierten Spleißdonors, die GTV-Sequenz, als zusätzliche U1 snRNA-Bindestelle und die IsdU5 (leadersequence downstream of U5)-Sequenz inseriert (Abb. 17A, SV IsdU5 GTV tat⁻rev⁻ 3U). IsdU5, eine 107 Nukleotide lange Sequenz 5'-wärts des HIV-Spleißdonors 1, ist in allen HIV-1 Transkripten vorhanden. Im Kontext einer 1.4 gespleißten HIV-1 cDNA wurde für IsdU5 bereits ein RNA-stabilisierender Effekt nachgewiesen (213). Als Positivkontrolle wurde das Ausgangskonstrukt mit authentischer SD4-Sequenz (SV E/X tat⁻rev⁻) und als Negativkontrolle das 3U-Konstrukt ohne zusätzliche Leadersequenz (SV E/X tat⁻rev⁻ 3U) verwendet.

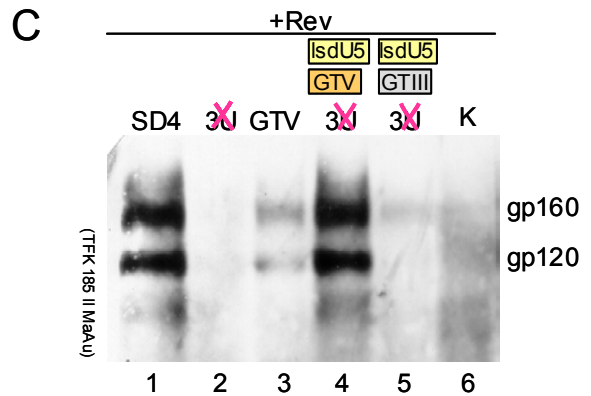
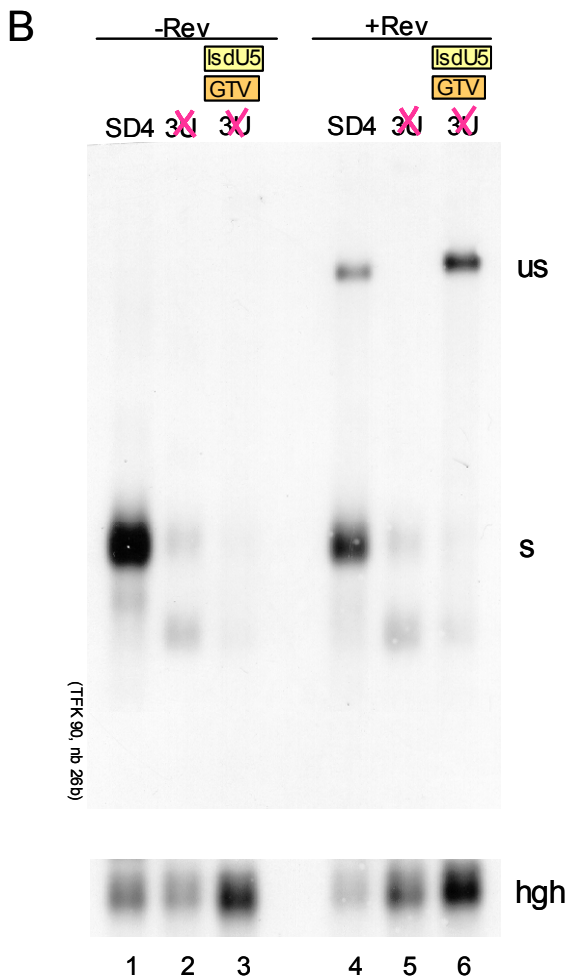
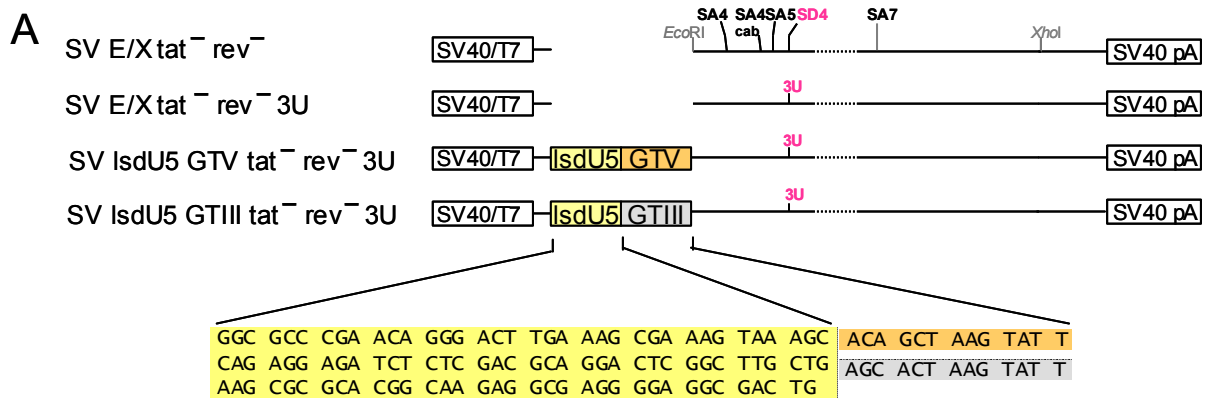


Abb. 17: Eine U1 snRNA-Bindestelle 5'-wärts des spleißdefekten SD4 ermöglicht die env-Expression

A: Schemazeichnung der SV E/X lsdU5 GT tat⁻ rev⁻-Konstrukte. Die HIV-1 Sequenz von *EcoRI* bis *XhoI* entspricht der Sequenz von SV E/X tat⁻ rev⁻. SV40: SV40early Promotor, T7: Transkriptionsstart T7-Polymerase, SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssequenz. Über den Konstrukten ist die Position der HIV-Spleißstellen angegeben: SA bezeichnet Spleißakzeptoren, SD Spleißdonoren und 3U eine Mutation des SD4 in Position +3 von A nach U. Im 5'-Leader befinden sich zusätzlich die lsdU5-Sequenz (gelb) und wahlweise die GTV U1 snRNA-Bindestelle (orange) oder als Negativkontrolle die GTIII-Sequenz (grau). Die inserierten Sequenzen sind im unteren Teil der Abbildung angegeben.

B: p(A)⁺ RNA-Nachweis im Northern Blot. 3 x 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 9 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻-Konstrukte, 9 µg SVcrevΔH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 82 µg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblotet. Der Blot wurde mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zum 3' Bereich von *env* (LTRcenvpA⁻) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert. Die Kofransfektion von SVcrev, sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1, 4: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 2, 5: SV E/X tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 3, 6: SV lsdU5 GTV tat⁻ rev⁻ 3U.

C: Env-Glykoprotein-Nachweis im Western Blot. 3 x 10⁵ HeLa- T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻-Konstrukte, 1 µg SVcrev bzw. pSVT7 und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, auf die Transfektionseffizienz normiert, in einem 7 % PAA-Gel aufgetrennt und geblotet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp 120, einen POD-gekoppelten Zweitantikörper und anschließenden Biolumineszenznachweis. Spur 1: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 2: SV E/X tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 3: SV E/X tat⁻ rev⁻ GTV; Spur 4: SV lsdU5 GTV tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 5: SV lsdU5 GTIII tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 6: Negativkontrolle (pSVT7, pGL3).

Die Analyse der poly(A)⁺ RNA im Northern Blot zeigte für das SD4-Konstrukt gespleißte RNA (Abb. 17B, Spur 1) und, nach Kotransfektion von SVcrev, auch ungespleißte Transkripte (Spur 4). Für die 3U-Konstrukte zeigte sich, in Abhängigkeit von der inserierten Leadersequenz, ein Signal für die ungespleißte mRNA (vgl. Spur 6 mit Spur 5). Die zusätzliche Leadersequenz aus GTV und IsdU5 zeigte demnach eine deutliche, stabilisierende Wirkung auf das ansonsten instabile 3U-Transkript. Dabei war die U1 snRNA-Bindestelle essenziell. Die GTIII-Sequenz, die mit 15 möglichen Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA keine RNA-Stabilisierung ermöglicht hatte (vgl. Abb. 16C, Spur 7), konnte die GTV-Sequenz nicht funktionell ersetzen (Abb. 17C, Spur 4). Es läßt sich allerdings vermuten, dass auch die IsdU5-Sequenz, vergleichbar zur Sequenz 5'-wärts des SD4 (vgl. 3.1.1.5 und 3.2.3.5), *cis*-wirkende Elemente enthielt, die zur Stabilisierung der Transkripte beitrugen. Dieser Frage wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen.

3.1.2.3 Die RNA-Stabilisierung durch die U1 snRNA-Bindestelle erfolgte auf der Ebene der prä-mRNA

Bisher wurden für die RNA-Analysen poly(A)⁺ aufgereinigte Gesamt-RNA-Präparationen verwendet, in denen nur ca. 5-10 % Kern-RNA enthalten sein sollte (35). Außerdem war unklar, inwieweit die Kern-RNA bereits polyadenyliert vorlag und durch die poly(A)⁺-Aufreinigung überhaupt erfasst werden konnte. Es blieb daher die Frage offen, ob die Transkripte der spleißdefekten Mutanten (SD4⁻ oder 3U) im Kern zurückgehalten wurden und dementsprechend in der Kern-RNA noch nachweisbar sein könnten oder ob die RNA-Stabilität bereits im Kern variiert. Um dies zu untersuchen, wurden die RNA-Fractionen aus Cytoplasma und Kern getrennt isoliert und analysiert.

HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit der 3U-Mutante (SV E/X tat⁻rev⁻ 3U), sowie als Positivkontrollen mit einem SD4-Konstrukt und mit dem 3U-Konstrukt mit zusätzlicher U1 snRNA-Bindestelle (SV IsdU5 GTV tat⁻rev⁻ 3U) transfiziert. Die Qualität der präparierten Kern- und Cytoplasma-RNA wurde auf einem Kontrollgel überprüft. Das Gel wurde geblottet und der Blot nacheinander mit RNA-Sonden gegen die im Cytoplasma vorhandene mitochondriale Cytochrom C Oxidase und gegen das im Kern vorhandene β-Actin Intron C detektiert (Abb. 18A). Diese Kontrollen zeigten eine gute Trennung beider RNA-Fractionen. Die Kern-RNA wies nur eine sehr geringe Verunreinigung mit der Cytoplasma-RNA (max. 5 % des Cytochrom C Oxidase-Signals im Cytoplasma) auf. Entsprechend konnten für das β-Actin-Intron spezifische Signale in der Kern- aber nicht in der Cytoplasma-Fraktion detektiert werden.

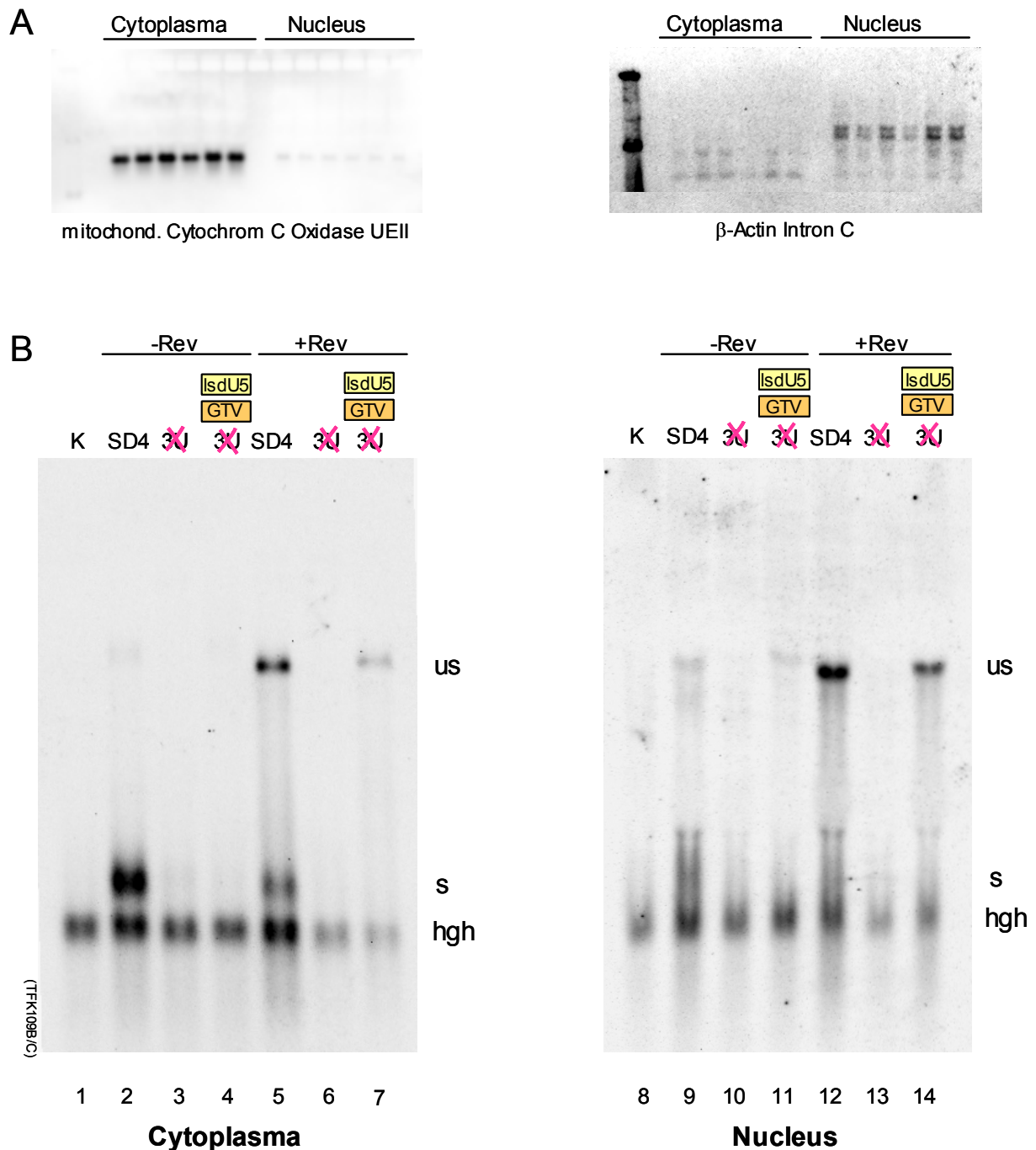


Abb. 18: Die RNA-Stabilisierung durch die U1 snRNA-Bindestelle erfolgt auf der Ebene der prä-mRNA

A: Kontrolle der Kern/Cytoplasma-Fraktionierung: Je 3 µg RNA wurde auf einem 1 % Agarosegel in MOPS-Puffer aufgetrennt und geblotet. Der Blot wurde mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden, die zur Untereinheit II der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase (pT7CCII) und zum β-Actin Intron C (β-actin intron) komplementär waren, hybridisiert.

B: Nachweis der Cytoplasma- und Kern-RNA im Northern Blot. 6 x 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 18 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻- Konstrukte, 18 µg SVcrevΔH/X bzw. pSP73 und 18 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurden die Kern- und Cytoplasma-RNA präpariert. Ca. ein Drittel (110 µg) der Cytoplasma-RNA wurden p(A)⁺ aufgereinigt und zusammen mit der gesamten (30 µg) Kern-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblotet. Der Blot wurde mit DIG-markierten antisense RNA-Sonden, die zum 3'-Bereich von *env* (LTRcenvpA⁻) und zu *hgh* (p73hGH) komplementär waren, hybridisiert. Die Kotretransfektion von SVcrev, sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1: Negativkontrolle (pSP73, SVcrevΔH/X, pXGH5), Spur 2, 5: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 3, 6: SV E/X tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 4, 7: SV lsdU5 GTV tat⁻ rev⁻ 3U. Die Reihenfolge, mit der die Kern-RNA (rechts) aufgetragen wurde, ist identisch.

Für den Northern Blot wurde ein Drittel der poly(A)⁺ aufgereinigten Cytoplasma-RNA und die gesamte Kern-Fraktion verwendet (Abb. 18B). Wie bereits vermutet, zeigte die Cytoplasma-Fraktion (Abb. 18B, links) ein der Gesamt-RNA-Präparation vergleichbares Bild (vgl. Abb. 17B): Gespleißte RNA war nur für das SD4-Konstrukt nachweisbar (Abb. 18B, Spur 2). Auffällig war, dass bereits ohne Rev eine geringe Menge an ungespleißter RNA nachweisbar war. Dieser „Leckstrom“ an ungespleißten Transkripten wurde auch in anderen Experimenten in der Cytoplasma-Fraktion gefunden (M. Hipp, persönliche Mitteilung). Bei Kotransfektion mit einem Rev-exprimierenden Plasmid verschoben sich die Mengenverhältnisse zugunsten der ungespleißten RNA (Spur 5). Von den 3U-Konstrukten war in Abhängigkeit von Rev und einer funktionellen U1 snRNA-Bindestelle im Leader ungespleißte RNA nachweisbar (Spur 7). Die Kern-Fraktion (Abb 18B, Spuren 8-14) enthielt, durch die fehlende poly(A)⁺ Aufreinigung, große Mengen rRNA, die zu einer schlechteren Probenauffrennung führten. Der Vergleich mit der Negativkontrolle (Spur 8) erlaubte dennoch die Identifizierung des Signals für die gespleißte RNA des SD4-Konstrukts (Spur 9). Für das SD4-Konstrukt (Spur 9) sowie für das 3U-Konstrukt mit U1 snRNA-Bindestelle (Spur 11) war außerdem ungespleißte RNA nachweisbar. Die Anwesenheit von Rev führte zu einer Zunahme der ungespleißten Transkripte bei beiden Konstrukten (Spur 12 und 14). Dies kann nicht nur auf der Rev-abhängigen Verschiebung von gespleißten zu ungespleißten Transkripten beruhen, da das 3U-Konstrukt mit U1 snRNA-Bindestelle keine gespleißten Transkripte exprimiert. Die Zunahme der ungespleißten RNA weist auf eine Stabilisierung durch die Bindung von Rev hin. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bereits beschrieben (235, 270). Für die 3U-Mutante waren, weder in An- noch in Abwesenheit von Rev, ungespleißte Transkripte nachweisbar (Spur 10 und 13). Der negative Effekt der 3U-Mutation auf die RNA-Stabilität war also, unabhängig von Rev, bereits auf der Ebene der prä-mRNA sichtbar. Die fehlende U1 snRNA-Bindestelle führte demnach nicht zu einer Retention der ungespleißten RNA im Kern sondern zu einem Verlust der prä-mRNA.

3.1.3 Die Tat/TAR-Interaktion ermöglicht die *env*-Expression von intrinsisch instabilen Transkripten ohne funktionellen Spleißdonor

3.1.3.1 Die Transaktivierung des HIV-1 LTRs durch Tat ermöglicht die *Env*-Expression einer spleißdefekten Mutante

Die Auswirkung von Mutationen in der SD4-Sequenz auf die *Env*-Expression wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. Dabei war auffällig, dass in Untersuchungen in denen ein Effekt der SD4-Mutation beobachtet wurde, Konstrukte mit CMV- bzw. SV40late-Promotor

verwendet wurden (58, 164, 223). In einem Konstrukt mit HIV-1 LTR wurde dagegen die Rev-abhängige Expression ungespleißter RNA als unabhängig von der SD4-Sequenz beschrieben (263). Die bisher beobachtete Stabilisierung der Transkripte durch die Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1snRNA könnte also eventuell durch den Promotor beeinflusst werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden SD4-Mutationen mit unterschiedlicher Komplementarität zur U1 snRNA (3U, -1G3U, und -1G8U, vgl. 3.1.1.3) in Konstrukte mit einem HIV-1 5'-LTR und authentischer HIV-1 Leadersequenz kloniert. Stellvertretend für die verschiedenen, *in vivo* alternativ gespleißten Leadersequenzen, wurden zwei Konstruktreihen hergestellt: Die erste Konstruktreihe entsprach in ihrer Sequenz dem am häufigsten vorkommenden Spleißereignis von SD1 auf SA5 (LTR 1.5, Abb. 19A), wie es in 27 % der 1,8 kb- und in 76 % aller 4 kb-RNAs zu finden ist (281). Das 5'-terminale Exon wird dabei, wie in den bisher verwendeten SV40-Konstrukten, durch den SD4 begrenzt. Bei der zweiten Konstruktreihe begrenzt der SD4 dagegen ein internes Exon (LTR 1.2 tat⁻rev⁻, Abb. 19A). Die 5'-Sequenz entspricht einem Spleißereignis von SD1 auf SA2, das in 16 % der 1,8 kb- und in 6 % der 4 kb-RNAs vorkommt (281).

HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit diesen Konstrukten transient transfiziert. Neben einem Rev-exprimierenden Plasmid (SVcrev) wurden die Zellen zusätzlich mit einem Tat-exprimierenden Plasmid (SVctat) kotransfiziert, um die Transkription vom LTR zu aktivieren. Bei der Proteinanalyse im Western Blot zeigten die LTR1.5-Konstrukte eine deutlich stärkere Env-Expression als die LTR1.2-Konstrukte (vgl. Abb. 19B, Spur 1 und 2). Eine Ursache für die unterschiedliche Expressionsstärke könnte z. B. in der geringen Komplementarität des SD2 (10 | 2) zur U1 snRNA liegen, was jedoch hier nicht weiter untersucht wurde. In beiden Konstruktreihen war eine Abhängigkeit der Env-Glykoprotein Menge von der Komplementarität des SD4 zur U1 snRNA nachweisbar (Spuren 4-7 und 8-11). Dabei war auffällig, dass im LTR1.5-Kontext kein Unterschied zwischen den Mutationen -1G3U und -1G8U zu sehen war. Dies könnte auf eine bereits maximale Expression des Konstrukts -1G3U, aufgrund des hohen Expressionsniveaus der LTR1.5-Konstrukte, zurückzuführen sein. Von den 3U-Mutanten war hier, im Gegensatz zum SV40-Konstrukt, eine geringe Menge Env nachweisbar (Spur 5 und 9). Es stellte sich die Frage, ob eine höhere Tat-Konzentration die Env-Expression der 3U-Mutante verstärken könnte. Dies bestätigte sich nach Kotransfektion mit zunehmenden Mengen SVctat: Während mit 0,001 µg SVctat keine Env-Expression nachweisbar war (Abb. 19C, Spur 1), zeigte sich mit 0,05 µg SVctat bereits ein deutliches Signal (Spur 3). Eine Erhöhung auf 0,5 µg SVctat bewirkte eine weitere Steigerung der Env-Menge (Spur 5). Mit 2 µg SVctat zeigte sich dagegen keine weitere Steigerung mehr (vgl. Spur 5 und 7). Nach wie vor war ein Unterschied in der Env-Glykoprotein-Menge zwischen -1G8U und 3U nachweisbar. Die

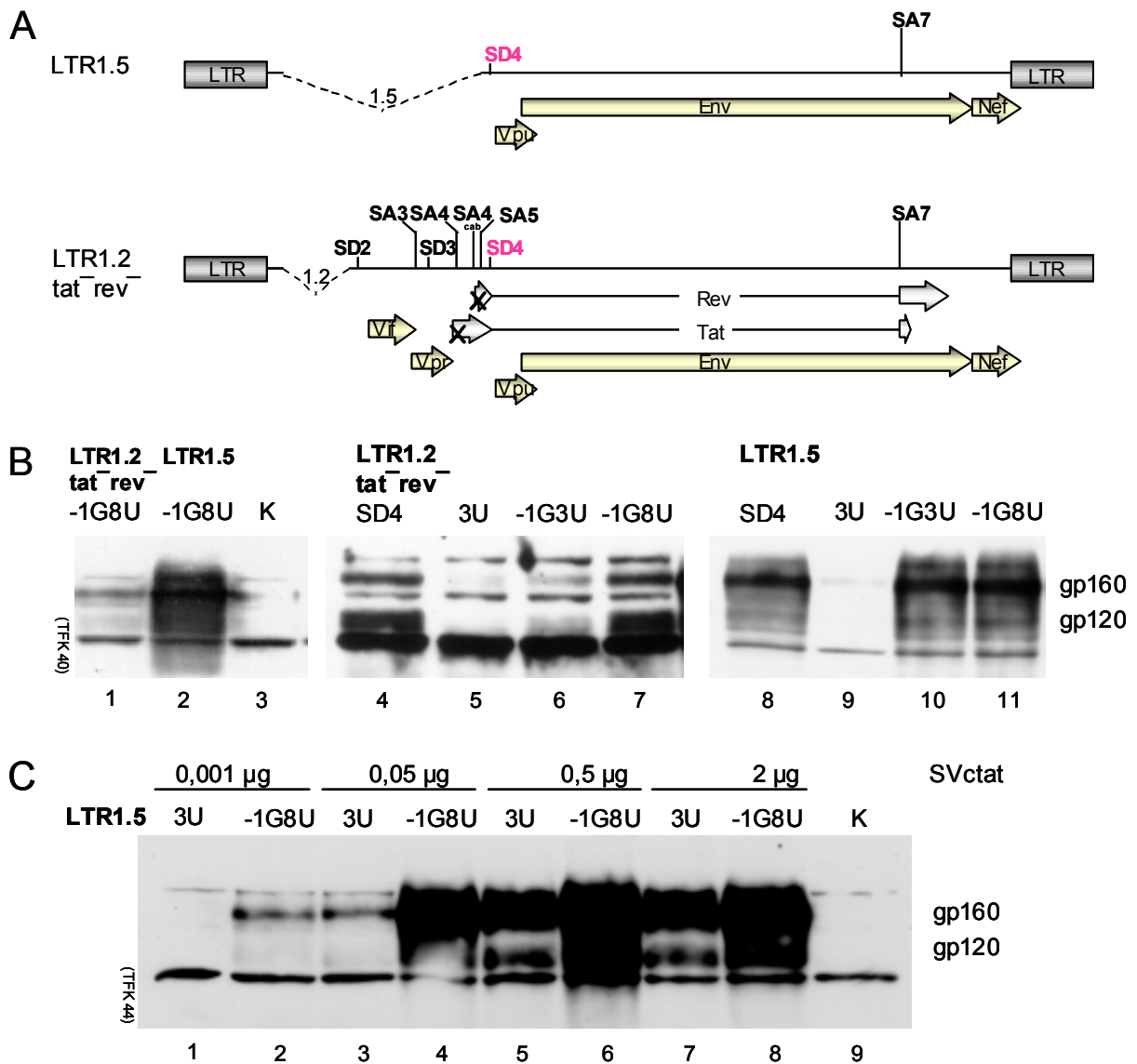


Abb. 19: Der LTR-Promotor und die authentische HIV-1 Leadersequenz ermöglichen die Env-Expression einer spleißdefekten Mutante

A: Schemazeichnung der LTR1.2 tat⁻ rev⁻- und LTR1.5-Konstrukte. Die kodierenden Sequenzen der Konstrukte entsprechen den authentischen, von SD1 auf SA2 (LTR 1.2) bzw. von SD1 auf SA5 (LTR 1.5) gespleißten HIV-1 Transkripten. Über den Konstrukten sind die Positionen der HIV-1 Spleißstellen angegeben. SA: Spleißakzeptor, SD: Spleißdonor, in den SD4 (rot) wurden die 3U-Mutationen eingebracht. Die Pfeile unter den Konstrukten zeigen die offenen Leserahmen, von denen, aufgrund von Punktmutationen im ATG (Kreuze), nur die gelb unterlegten exprimiert werden. LTR: Long terminal repeat.

B: Env-Glykoprotein-Nachweis der LTR1.2 tat⁻ rev⁻- und LTR1.5-Konstrukte im Western Blot. 3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der LTR-Konstrukte, 1 µg SVcrev bzw. pSVT7, 0,05 µg SVctat und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, Luciferase-normiert, in einem 7% PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp 120 (DuPont, #9305), einen POD-gekoppelten Zweitantikörper und anschließenden Biolumineszenznachweis. Spur 1: LTR 1.2 tat⁻ rev⁻ -1G8U, Spur 2: LTR 1.5 -1G8U, Spur 3: Negativkontrolle (pSVT7, pGL3), Spur 4: LTR 1.2 tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 5: LTR 1.2 tat⁻ rev⁻ -1G3U; Spur 7: LTR 1.2 tat⁻ rev⁻ -1G8U; Spur 8: LTR 1.5 tat⁻ rev⁻; Spur 9: LTR 1.5 tat⁻ rev⁻ 3U; Spur 10: LTR 1.5 tat⁻ rev⁻ -1G3U; Spur 11: LTR 1.5 tat⁻ rev⁻ -1G8U.

C: Env-Glykoprotein-Expression der LTR1.5-Konstrukte nach Kotransfektion mit steigenden Tat-Mengen. 3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der LTR1.5-Konstrukte, 1 µg SVcrev bzw. pSVT7, 0,001 – 2 µg SVctat und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter B beschrieben. Spur 1, 3, 5 und 7: LTR1.5 3U; Spur 2, 4, 6 und 8: LTR1.5; Spur 9: Negativkontrolle (pSVT7, pGL3).

Erhöhung des Expressionsniveaus führte jedoch dazu, dass in der Zellkultur nahezu alle Zellen Syncytien bildeten und daher mikroskopisch kein Unterschied mehr sichtbar war. Es schien daher möglich, dass bei einer weiteren Überexpression von Tat, evtl. auch in Verbindung eines bei solchen Konzentrationen möglichen cytotoxischen Effekts von Tat, die Expressionsunterschiede bei Spleißdonormutationen nicht mehr differenzierbar sind. Eine im Labor von Prof. Kräusslich (Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Abt. Virologie) durchgeführte Kotransfektion von HeLa-P4 Zellen mit 10 µg LTR1.5-Konstrukten, 5 µg CMVrev und 5 µg CMVtat bestätigte diese Vermutung (Dr. H. Wodrich, persönliche Mitteilung).

Die in den vorausgegangenen Experimenten beschriebene Steigerung der Env-Expression in Abhängigkeit von der Komplementarität zwischen SD4 und der U1snRNA war also auch mit einem LTR-Promotor (LTR1.5) und auch in Transkripten mit weiteren, 5'-wärts des SD4 lokalisierten Spleißdonoren (LTR1.2 tat⁻rev⁻) zu beobachten. Im Unterschied zu den Konstrukten mit SV40-Promotor, war jedoch mit dem induzierbaren HIV-1 Promotor kein vollständiger Verlust der mRNA die Folge. In Abhängigkeit von Tat konnte eine signifikante Env-Glykoprotein-Menge von einem Konstrukt mit spleißdefektem Donor nachgewiesen werden. Die Wahl des Promotors konnte also, abhängig von den Versuchsbedingungen (Tat-Überexpression), zu unterschiedlichen Bewertungen hinsichtlich der Notwendigkeit des Spleißdonors für die Rev-abhängige Env-Expression führen.

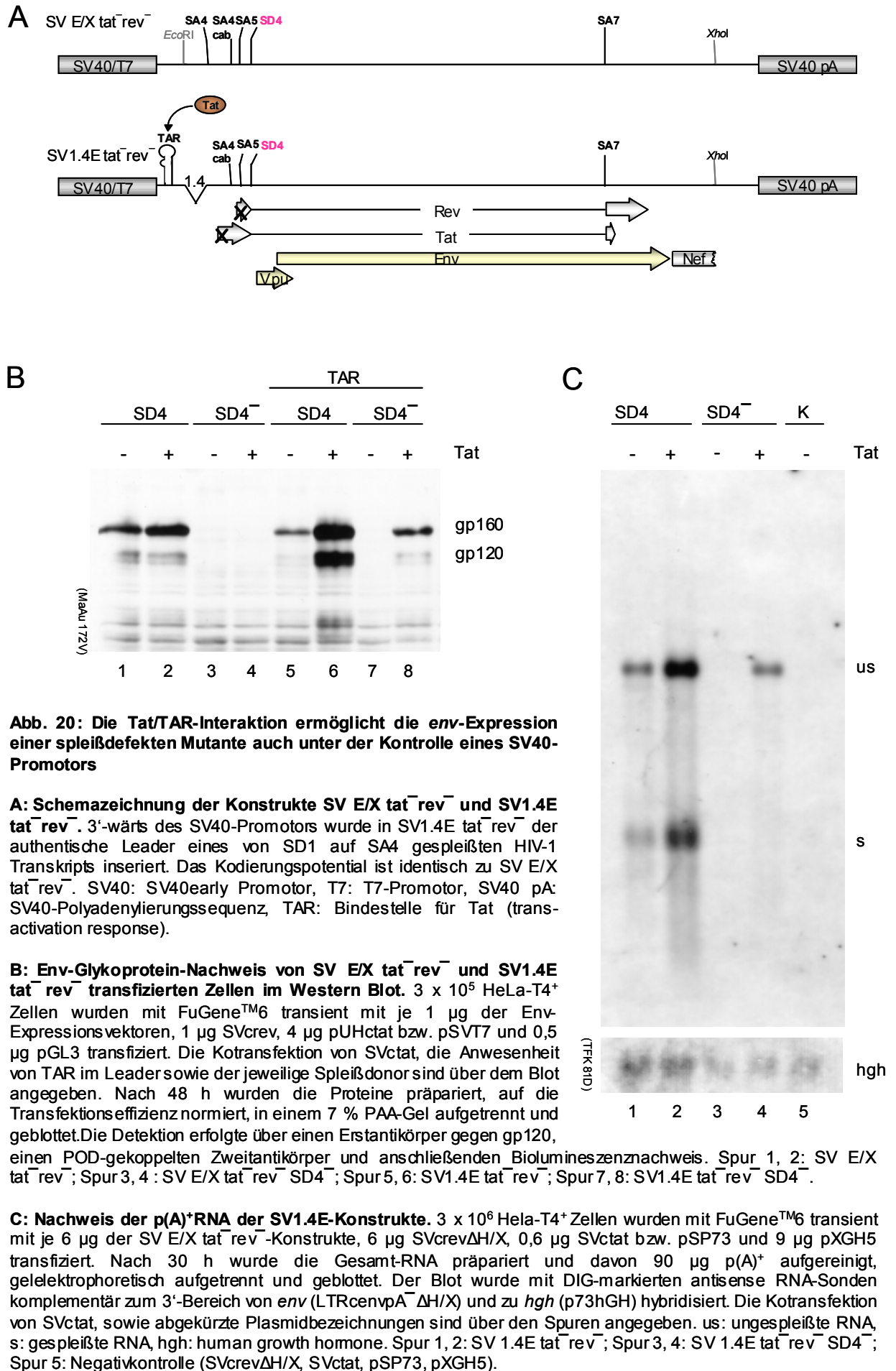
Um zu untersuchen, ob die Spleißdonormutationen im SD4 eine Auswirkung auf die Replikation infektiöser HIV-1 Viren zeigen, wurden die entsprechenden subgenomischen Fragmente in die provirale DNA zurück kloniert und in Infektionsexperimenten *in vivo* analysiert. Diese Experimente wurden, mangels eigenem S3-Labor, im Labor von Prof. Ben Berkhout (University of Amsterdam, Dep. of Human Retrovirology) von T. van Opijnen durchgeführt. In Analogie zur beobachteten Abnahme der Env-Expression in den subgenomischen HIV-1 Konstrukten führten die Mutationen im infektiösen Virus zu einer Abnahme der Replikation. Die 3U-Mutation bewirkte einen nahezu vollständigen Replikationsdefekt. Auch im infektiösen Virus war demnach die Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1 snRNA für die Env-Expression und damit für die Virus-Replikation von entscheidender Bedeutung.

3.1.3.2 Die Tat/TAR-Interaktion ermöglicht die *env*-Expression einer spleißdefekten Mutante auch unter der Kontrolle eines SV40early-Promotors

Die steigende Env-Glykoprotein-Menge der 3U-Mutante bei Transaktivierung des HIV-1 Promotors mit zunehmenden Tat Mengen (Abb. 19C), zeigte die wichtige Rolle der Tat/TAR-Interaktion bei der Expression der intrinsisch instabilen *env*-Transkripte. Es stellte sich die Frage, ob die *env*-Expression alleine durch die Tat/TAR-Interaktion ermöglicht wurde oder ob noch andere LTR-abhängige Mechanismen dabei eine Rolle spielten. Um dies zu untersuchen, wurde eine TAR-Sequenz mit einem SV40early-Promotor kombiniert. Das entstandene Konstrukt (SV1.4E $\text{tat}^- \text{rev}^-$) entsprach einem von SD1 auf SA4 gespleißten HIV-1 Transkript mit TAR-Sequenz. Sein Kodierungspotential war vergleichbar mit dem bisher verwendeten SV40-Konstrukt SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ (Abb. 20A).

Bei einem Vergleich der beiden Konstrukte im Western Blot war Env-Glykoprotein von SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ (Abb. 20B, Spur 1) jedoch nicht von der Mutante ohne Spleißdonor (SD4⁻, Spur 3) nachweisbar. Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß unabhängig von einer Kotransfektion mit einem Tat-exprimierenden Plasmid (Spur 2 und 4), da die Konstrukte keine TAR-Sequenz enthielten. Das Konstrukt mit TAR-Sequenz zeigte in Abwesenheit von Tat eine geringere und in Anwesenheit von Tat eine deutlich höhere Glykoprotein-Expression als das Ausgangskonstrukt SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ (vgl. Spur 5 und 6 mit 1). Die Tat/TAR-Interaktion konnte also auch eine Transaktivierung des SV40early-Promotors bewirken. Für das Konstrukt ohne Spleißdonor (SD4⁻) zeigte sich in Abwesenheit von Tat kein Env (Spur 7). In Anwesenheit von Tat war jedoch, wie in den Konstrukten mit HIV-1 Promotor, ein deutliches Glykoprotein-Signal nachweisbar (Spur 8). Die Analyse der poly(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA der SV1.4E-Konstrukte (Abb. 20C) korrelierte mit den Proteindaten. Von der Mutante ohne Spleißdonor war in Anwesenheit von Tat ungespleißte RNA nachweisbar (Spur 4).

Die Nachweisbarkeit von *env*-Transkripten ohne funktionellen Spleißdonor (SD4⁻) ließ sich also auf die Tat/TAR-Interaktion zurückführen. Der HIV-1 Promotor war dabei keine Voraussetzung, sondern konnte durch einen SV40early-Promotor ersetzt werden. Da aber auch der SV40-Promotor durch Tat transaktivierbar war, blieb offen, ob die Nachweisbarkeit von Env auf einer generellen Erhöhung des Expressionslevels durch Tat oder auf einem transkriptstabilisierenden Effekt der Tat/TAR-Bindung beruhte.



3.1.3.3 Die Effizienz der Env-Expression einer spleißdefekten Mutante geht mit dem Transaktivierungspotential von Tat einher

Um zu untersuchen, ob allein die Bindung von Tat an die TAR-Region ausreicht, um die Glykoprotein-Expression von einem Konstrukt ohne Spleißdonor zu ermöglichen oder ob dies mit der transkriptionsaktivierenden Wirkung von Tat einhergeht, wurden in Kooperation mit Dr. M. Ott (DKFZ, Heidelberg) eine Auswahl von Tat-Mutanten für Kotransfektionsexperimente eingesetzt. Sie enthielten Mutationen von Lysin zu Arginin in Positionen, deren Acetylierung teilweise zur Aktivierung von Tat beiträgt (vgl. 1.2). Eine Mutation des Lysin in Position 28 (K²⁸) zu Arginin (R) (Abb. 21A, pEV 502) inhibiert z.B. die p300-vermittelte Acetylierung, die für die spezifische Interaktion mit der Acetyltransferase pCAF nötig ist und der Bindung von Tat an p-TEFb und TAR vorausgehen soll. Diese Mutation verringert die synergistische Aktivierung des HIV-Promotors durch Tat. Eine Mutation des K⁵⁰ (pEV 505) verhindert eine Acetylierung, die normalerweise zur Auflösung der Tat/TAR-Bindung beiträgt und dadurch die Elongation der RNAP II erlaubt (271). Die weiteren Tat-Konstrukte (Abb. 21A) trugen Mutationen in der cysteinreichen Domäne in Position 29 (pEV 503), in der Core Domäne in Position 41 (pEV 504), in der basischen Domäne in Position 51 (pEV 506) bzw. Doppelmutationen in den Positionen 50/51 (pEV 534 und pEV 535). Das Konstrukt pEV 204 war der Ausgangsvektor (pcDNA3.1) ohne inserierte Tat-Sequenz und pEV 280 enthielt die *tat*-Sequenz ohne Mutationen. Das Transaktivierungspotential von 5 der 7 verwendeten Tat-Mutanten war bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. Ott in einer Expressionsstudie in Jurkat T-Zellen untersucht worden. Dabei wurde die Expression eines Reportergens (Luciferase) von einem Konstrukt mit LTR-Promotor gemessen. Die Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen sind zum Vergleich mit den folgenden Experimenten dargestellt (Abb. 21B).

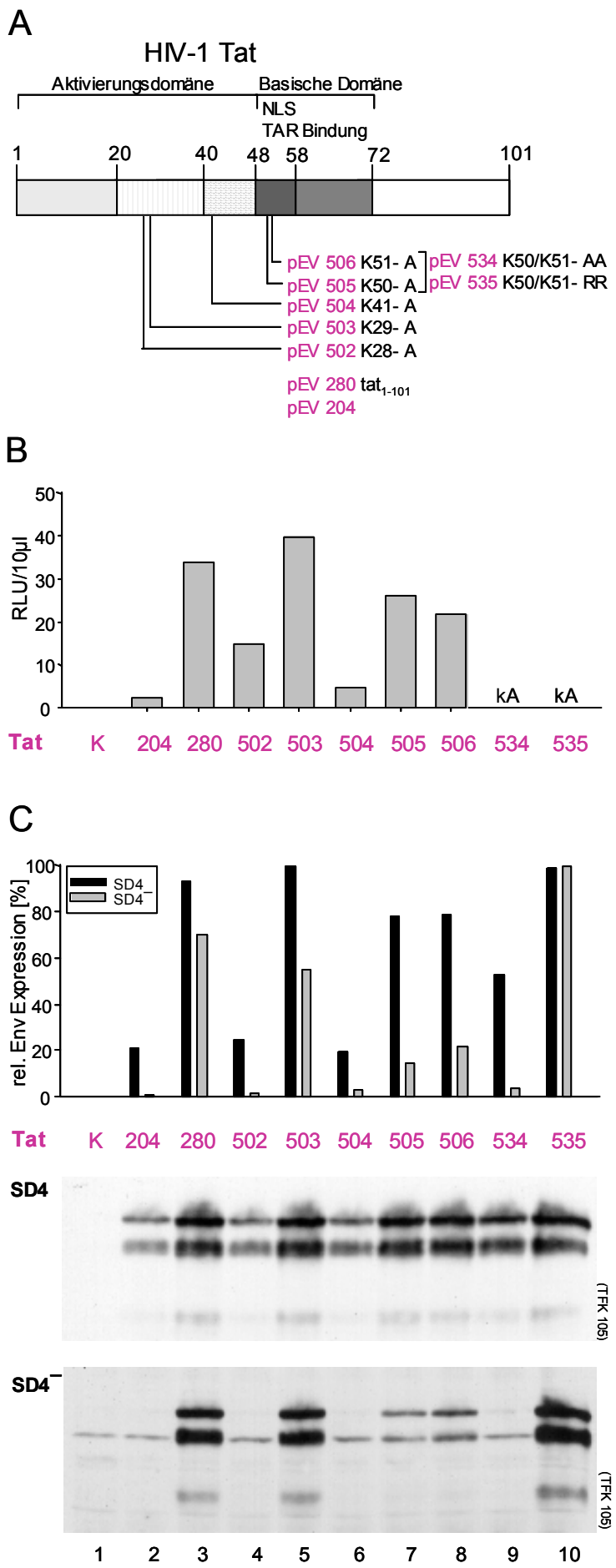
Nach Kotransfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit den Tat-Mutanten und den SV40/TAR-Konstrukten (SV1.4E *tat*⁻*rev*⁻) mit und ohne Spleißdonor zeigte sich bei der Proteinanalyse im Western Blot die bereits beschriebene, transkriptionsaktivierende Wirkung der Tat/TAR-Interaktion auf den SV40-Promotor (Abb. 21C, oberer Blot, vgl. Spur 2 und 3). Unter Berücksichtigung der höheren Basalexpression der SV/TAR-Konstrukte ohne Tat (vgl. 204 mit 280) gegenüber den von Ott und Mitarbeitern verwendeten LTR-Konstrukten, verhielt sich die Tat-Transaktivierung in dem Luciferase-Assay und im Western Blot ähnlich (vgl. Abb. 21B und C). Die Positivkontrolle (Spur 3, 93 %), sowie die Tat-Mutanten 503 und 535 (Spur 5 und 10, 100 bzw. 99 %) zeigten die höchste Env-Menge, gefolgt von einer verringerten Env-Menge mit 505, 506 und 534 (Spur 7, 8 und 9, 78, 79 bzw. 53 %). Die Tat-Mutanten 502 und 504 (Spur 4 und 6, 25 bzw. 20 %) verhielten sich wie das Konstrukt ohne *tat*-Sequenz (Spur 2, 21 %). Bei der Untersuchung des Konstrukts ohne Spleißdonor (SD4⁻) ergab sich ein ähnliches Bild (unterer Blot, Spur 2-10), allerdings auf einem

Abb. 21: Die Env-Expression von einem Konstrukt ohne Spleißdonor korreliert mit dem Transaktivierungspotential von Tat

A: Positionen der Punktmutationen im im HIV-1 Tat-Protein. Tat besteht aus einer Aktivierungsdomäne (1-48), die unterteilt wird in eine saure, prolinreiche Region (AS 1-20), eine cysteinreichen Region (AS 20-40) und die Core-Domäne (AS 40-48). Die folgende basische Domäne (AS 48-58) enthält ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und die TAR-Bindesequenz. Die C-terminale Domäne (AS 58-72) trägt zur Kernlokalisierung und zur TAR-Bindung bei. Die verwendeten Tat-Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von Dr. M.Ott (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. pEV 204 ist der Klonierungsvektor (pcDNA3.1) ohne inserierte Tat-Sequenz. pEV 280 kodiert für Tat₁₋₁₀₁. Die anderen Vektoren kodieren für Mutanten von Tat mit Aminosäure-Austausch in den angegebenen Positionen. pEV 506 enthält z.B. eine Punktmutation in Position 51 von Lysin nach Arginin.

B: Transaktivierungspotential der Tat-Mutanten. Die Messung der Transkriptions-Transaktivierung durch die pEV-Mutanten wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. M. Ott (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Jurkat-Zellen wurden im Doppelansatz mit den Tat-Konstrukten und einem Luciferase-Reportergen-Konstrukt mit LTR kotransfiziert und in einem Biolumineszenz-Assay (RLU, relative light units) gemessen.

C: Env-Glykoprotein-Nachweis von SV1.4E tat_{rev}-Konstrukten mit und ohne Spleißdonor nach Kotransfektion mit den Tat-Mutanten. 3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit 1 µg der Env-Expressionsvektoren, 1µg SVcrev, 0,1 µg der Tat-Vektoren bzw. pSVT7 und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, auf die Transfektionseffizienz normiert, in einem 7 % PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Erstantikörper gegen gp120, einen POD-gekoppelten Zweitantikörper und Biolumineszenznachweis im Lumi-Imager F1 (Roche). Die jeweils kotransfizierten Tat-Mutanten sind über den Spuren angegeben. Für die Quantifizierung wurden Western Blots aus 2 unabhängigen Transfektionsexperimenten mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software (Roche) ausgewertet. In jeder Auswertung wurde die maximale Env-Expression gleich 100 % gesetzt. Die Mittelwerte dieser relativen Env-Expression sind im oberen Teil der Abb. dargestellt.



insgesamt niedrigeren Expressionsniveau. Die Tat-Mutanten 280, 503 und 535 zeigten weiterhin die höchste Env-Glykoprotein-Menge (70, 55 und 100 %), während mit den Mutanten 505 und 506 nur eine geringe Env-Expression nachweisbar war (15 und 22 %). Die Mutante 534, die auf das Konstrukt mit Spleißdonor noch einen geringen aktivierenden Effekt ausgeübt hatte, zeigte bei dem Konstrukt ohne Spleißdonor keine Transaktivierung mehr. Dies geht jedoch wahrscheinlich auf ein Erreichen der Nachweisgrenze des Western Blots zurück.

Mit den hier verwendeten Tat-Mutanten konnte daher kein signifikanter Unterschied zwischen der Transaktivierung der Transkription im Luciferase-Assay und der Env-Expression der SD4- und SD4⁻-Konstrukte festgestellt werden. Die Korrelation der Env-Expression von SD4- und SD4⁻-Konstrukten deutete darauf hin, dass die Transkriptionsaktivierung und die Stabilisierung der SD4⁻-Transkripte durch die Tat/TAR-Interaktion auf dem gleichen Mechanismus beruhen könnten.

3.1.3.4 Die Transfektion von replikationskompetenten COS-7 Zellen führt zu einem erhöhten Expressionsniveau, erlaubt aber nicht die Env-Expression einer spleißdefekten Mutante

Die Tat-vermittelte Env-Expression eines Konstrukts ohne Spleißdonor war geringer als die eines Konstrukts mit Spleißdonor. Es war daher die Frage ob die Env-Expression des Konstrukts ohne Spleißdonor ohne Tat nur unterhalb der experimentellen Nachweisgrenze blieb oder ob Tat nötig war, um überhaupt Env-Transkripte zu generieren. Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Proteinexpression in transienten Transfektionen, unabhängig von einer Promotoraktivierung durch Tat, zu steigern. Eine solche Möglichkeit bietet die Transfektion von COS-7 Zellen. Es handelt sich dabei um eine Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze, die mit einem replikationsdefekten SV40 transformiert wurde. COS-7 Zellen exprimieren stabil das große SV40 T-Antigen und sind dadurch in der Lage, Plasmide, die den SV40-Replikationsstartpunkt tragen, zu replizieren. Dies erhöht die Plasmidkonzentration und wirkt einer Ausdünnung der transient transfizierten DNA während der Zellteilungen entgegen (118).

Gleiche Anzahlen von HeLa-T4⁺ und COS-7 Zellen wurden mit Konstrukten mit und ohne funktionellen Spleißdonor (SD4 und SD4⁻) transfiziert und auf ihre Env-Expression in An- und Abwesenheit von Tat untersucht. In HeLa- Zellen zeigte sich eine 3-fache Erhöhung der Env-Expression durch die Tat/TAR-Interaktion (vgl. Abb. 22, Spur 6 mit 7). Mit dem

Konstrukt ohne Spleißdonor war mit Tat eine signifikante Env-Expression sichtbar (Spur 9), die jedoch nur ein Zehntel der Env-Menge des Konstrukts mit Spleißdonor betrug (vgl. Spur 9 mit 7). In COS-7 Zellen zeigte sich ohne Tat bereits eine ca. 4-fach stärkere Env-Expression als in HeLa-Zellen (vgl. Spur 2 mit 6). Obwohl diese Expressions-Steigerung bei Transfektion von Cos-7 Zellen vergleichbar war mit der Steigerung durch Tat-Transaktivierung in HeLa Zellen, war in COS-7 Zellen ohne Tat keine entsprechende Env-Expression von dem Konstrukt ohne Spleißdonor nachweisbar (vgl. Spur 4 und 9). Auch in den COS-7 Zellen ermöglichte erst die Kotransfektion von Tat die Env-Expression von einem Konstrukt ohne Spleißdonor (Spur 5).

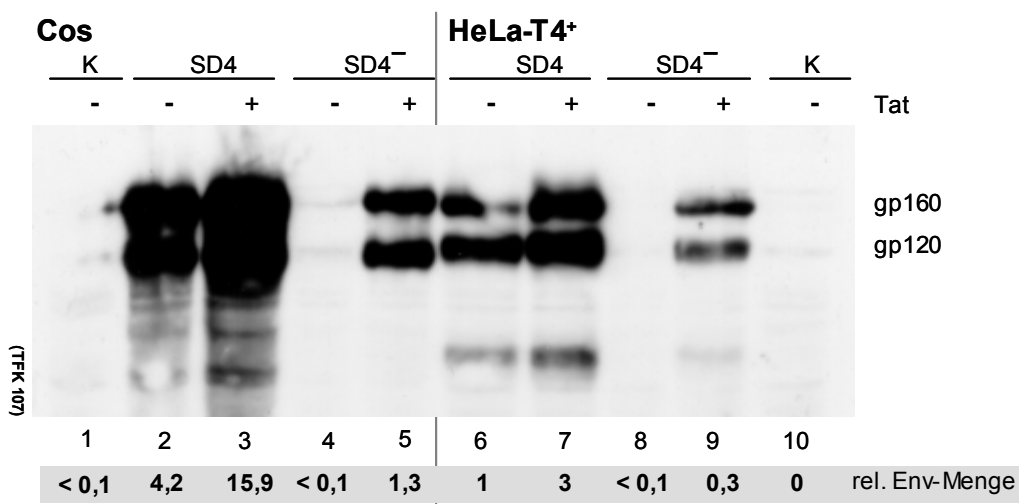


Abb. 22: Die Env-Expression einer Mutante ohne Spleißdonor beruht nicht allein auf einer quantitativen, sondern auf einer qualitativen Veränderung der Transkription durch Tat

3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ bzw. COS-7 Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 1 µg der SV1.4E-Expressionsvektoren, 1 µg SVcrev, 0,1µg pEV280 (Tat-Expressionsplasmid) bzw. pEV204 (Negativkontrolle) und 0,5 µg pGL3-control transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine präpariert, auf die Transfektionseffizienz (Luciferase) normiert, in einem 7 % PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp 120, einen POD-gekoppelten Zweitantikörper und anschließenden Biolumineszenznachweis im Lumi-Imager F1 (Roche). Die Expression von Tat sowie eine Kurzform der jeweiligen Env-Expressionsvektoren sind über dem Blot angegeben. Spur 1, 10: Negativkontrolle (K, untransfizierte Zellen); Spur 2, 3, 6, 7: SV1.4E tat⁻ rev⁻; Spur 4, 5, 8, 9: SV1.4E tat⁻ rev⁻ SD4⁻. Die Auswertung erfolgte durch Quantifizierung mit der LumiAnalystTM 3.1 Software. Die Quantifizierung zeigt die relative gp120-Expression bezogen auf Spur 6.

Eine erhöhte Plasmidmenge in COS-7 Zellen reichte demnach nicht aus, um die Env-Expression ohne Spleißdonor zu ermöglichen und die Präsenz von Tat zu ersetzen. Daraus ließ sich schließen, dass die Tat/TAR-Interaktion nicht nur zu einer höheren Proteinexpression führte, sondern die Stabilisierung der Transkripte ohne Spleißdonor

überhaupt erst ermöglichte. Dieses Ergebnis korrelierte mit der für Tat beschriebenen Funktion der Transkriptionselongations-Förderung: Während der HIV-1 Replikation erfolgt durch die Interaktion von Tat mit TAR eine Veränderung der Prozessivität der RNA-Polymerase II. Dies führt nicht nur zu einer quantitativen, sondern vor allem zu einer qualitativen Veränderung von hauptsächlich kurzen, abgebrochenen Transkripten hin zu Vollängentranskripten (siehe 1.2 und 4.2.2).

3.2 Der Spleißakzeptor

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, beeinflusste die Komplementarität zwischen der Spleißdonorsequenz und der U1 snRNA die Transkriptstabilität. Ein funktioneller Spleißdonor war jedoch keine Voraussetzung für die Funktion von Rev. Im folgenden Kapitel wird die Rolle des Spleißakzeptors für die Funktion von Rev analysiert. Ausgehend von der Sequenz des *tat/rev*-Introns wurde der HIV-1 SA7 durch eine Sequenz ohne Spleißakzeptor sowie durch einen effizienteren Spleißakzeptor ersetzt. Das Spleißverhalten dieser Konstrukte wurde in An- und Abwesenheit von Rev untersucht (3.2.1). Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgte eine vergleichende Charakterisierung der Effizienz der im HIV-1 NL4-3 Isolat vorhandenen Spleißakzeptoren. Die 3'-wärts liegenden Exonsequenzen wurden auf die Existenz bzw. den Einfluss von *cis*-wirkenden Elementen auf das Spleißen und auf die Rev-Funktion untersucht (3.2.2). Um herauszufinden, worauf die Unterschiede in der Spleißeffizienz der HIV-1 Spleißakzeptoren zurückzuführen waren, wurde am Beispiel des SA5 der Einfluss von BPS, Pyrimidingehalt und zusätzlichen AG-Dinukleotiden auf die Spleißeffizienz untersucht. Die 3'-wärts des SA5 liegenden GAR-Sequenzwiederholungen, die bereits im Zusammenhang mit SD4 untersucht wurden, zeigten eine spleißfördernde Wirkung auf den SA5 (3.2.3). Im Exon 5 konnte daraufhin ein bidirektionales ESE-Element charakterisiert werden (48). Ein Manuskript für die Publikation dieser Daten ist in Vorbereitung.

3.2.1 Die Effizienz des SA7 beeinflusst die Rev-abhängige Expression ungespleißter mRNA

3.2.1.1 Der SA7 ist nicht essenziell für die Rev-abhängige *env*-Expression

Bei der Untersuchung der Funktion des Spleißakzeptors in der Rev-vermittelten *env*-Expression stellte sich zunächst die Frage, ob die Spleißfunktion des SA7 eine Voraussetzung für den Rev-abhängigen Export ungespleißter Transkripte in das Cytoplasma darstellt. Um dies zu beantworten, sollte der SA7 in dem Konstrukt SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ (Abb. 23A) durch eine Sequenz ersetzt werden, die keinen funktionsfähigen Spleißakzeptor mehr enthält. Charakteristika des SA7 sind ein mit Purinen durchsetzter Polypyrimidintrakt und zwei kryptische, 5'-wärts liegende Spleißakzeptoren 7A und 7B (Abb. 23A) (281). Die Verzweigungssequenz UACUUUC weist als Verzweigungsnukleotid ein Uridin statt des normalerweise bevorzugten Adenins auf (88). Zusätzlich sollen zwei weitere Positionen (-26 und -16) *in vitro* als Verzweigungspunkte genutzt werden können (79). Da der SA7 in der kodierenden *env*-Sequenz lokalisiert ist, wurden stille Mutationen eingebracht, um die Aminosäuresequenz von Env zu erhalten. Die Mutante SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^- \text{SA7}^-$ (Abb. 23A) enthielt Punktmutationen in den AG-Dinukleotiden des SA7, 7A und 7B, die zum Verlust der Spleißakzeptorfunktion führen sollten. Zusätzlich wurden zwei Restriktionsschnittstellen (*Afl*III, *Hind*III) eingebracht.

Nach transients Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Plasmiden, bestätigte die Analyse der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA im Northern Blot (Abb. 23B) das SA7⁻-Konstrukt als spleißdefekte Mutante. Die SA7⁻-Mutation (Spur 3) führte in Abwesenheit von Rev zu einem Verlust der mRNA, wie es auch für die spleißdefekte Donorsequenz (SD4⁻, Spur 4) bereits beschrieben wurde. In Anwesenheit von Rev zeigte sich mit dem SA7-Konstrukt die für HIV-1 charakteristische Verschiebung zu ungespleißter mRNA (vergleiche Spur 1 mit 5). Ohne Spleißakzeptor (Spur 7) waren jedoch ebenfalls ungespleißte Transkripte nachweisbar (Spur 7). Im Gegensatz zur SD4⁻-Mutante (Spur 8) war die RNA ohne funktionellen Spleißakzeptor offenbar so stabil, dass sie als Bindestelle für Rev zur Verfügung stand. Rev konnte demnach seine Funktion unabhängig von einem funktionellen SA7 ausüben.

Die mit der SA7⁻-Mutante beschriebenen Ergebnisse standen in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass RNAs durch an sie gebundene Spleißfaktoren wie z. B. U1 snRNPs im Kern zurückgehalten und degradiert werden können (13, 211) (siehe auch 1.4.2). Der Export des normalerweise im Kern zurückgehaltenen Transkripts wurde erst durch Rev

A

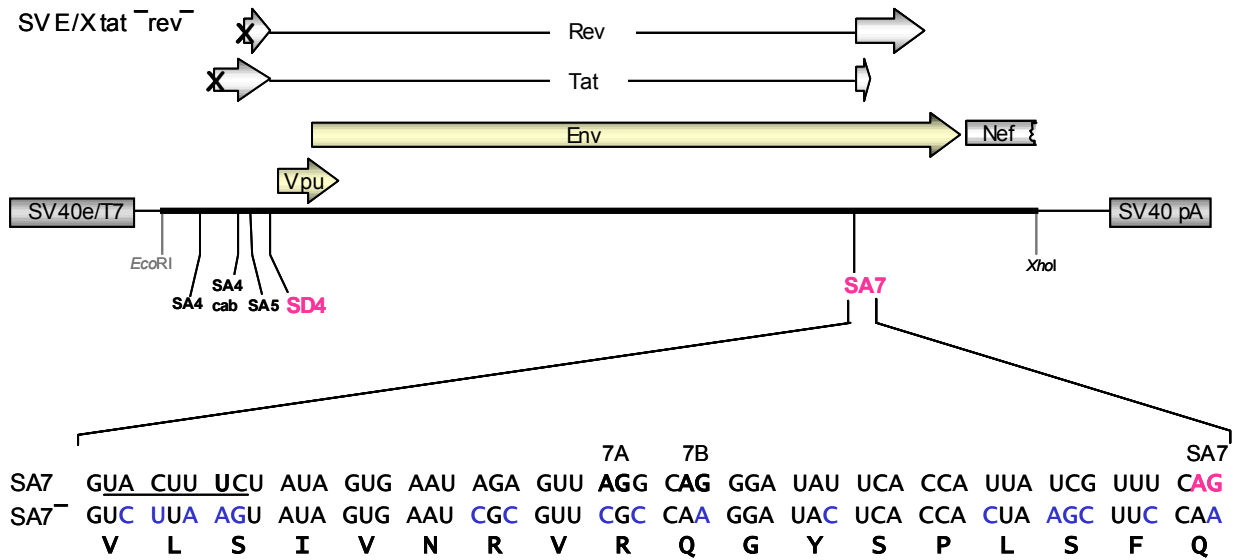
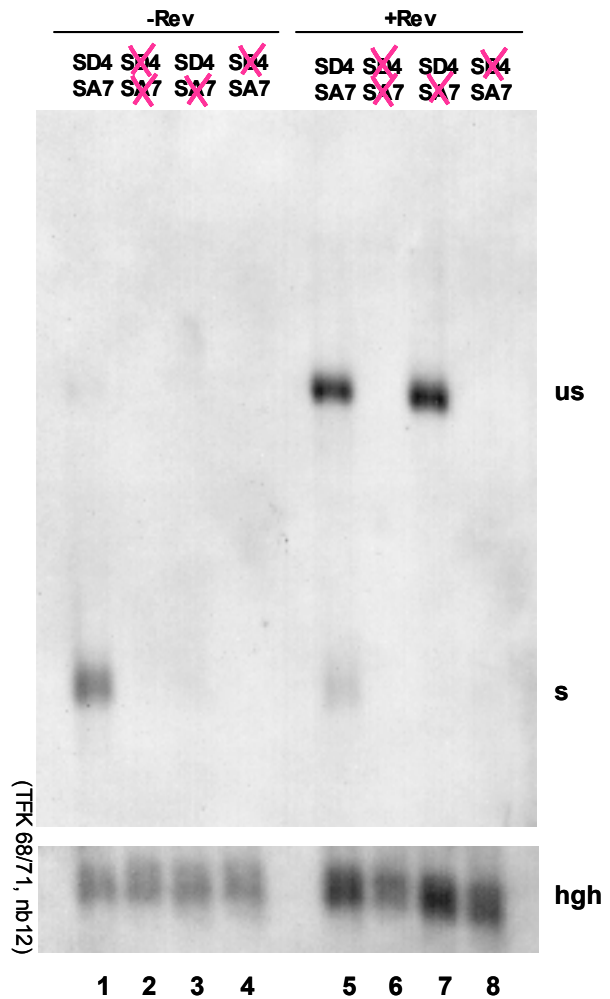


Abb. 23: Die Abwesenheit eines Spleißakzeptors führt nicht zum Verlust der Rev-abhängigen env-Expression

A: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des SA7 und der SA7⁻-Mutante in SV E/X tat⁻ rev⁻. Das Konstrukt SV E/X tat⁻ rev⁻ wurde in Abb. 5 genauer beschrieben. An der Position des SA7 wurden Punktmutationen eingeführt, um die Spleißfunktion zu unterbinden (SA7⁻). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von SA7 und der Mutante SA7⁻ sind im unteren Teil der Abb. angegeben: Die Verzweigungssequenz (unterstrichen), sowie das hauptsächlich genutzte AG-Dinukleotid (rot) und zwei kryptische SAs (7A und B (281) sind hervorgehoben. Die Punktmutationen in der SA7⁻-Sequenz (blau) wurden unter Erhaltung der Env-Aminosäuresequenz gesetzt.

B: Nachweis der p(A)⁺ RNA der SA7⁻- und SA7⁻-Konstrukte im Northern Blot. 3 x 10⁷ HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 µg der SV E/X tat⁻ rev⁻-Konstrukte, 60 µg SVcrev bzw. pSVT7 und 60 µg pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 70 µg poly(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zu *tat*-Exon 2 (pUH3ΔS/K) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Kotransfektion mit SVcrev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1, 5: SV E/X tat⁻ rev⁻; Spur 2, 6: SV E/X tat⁻ rev⁻ SD4⁻ SA7⁻; Spur 3, 7: SV E/X tat⁻ rev⁻ SA7⁻; Spur 4, 8: SV E/X tat⁻ rev⁻ SD4⁻.

B



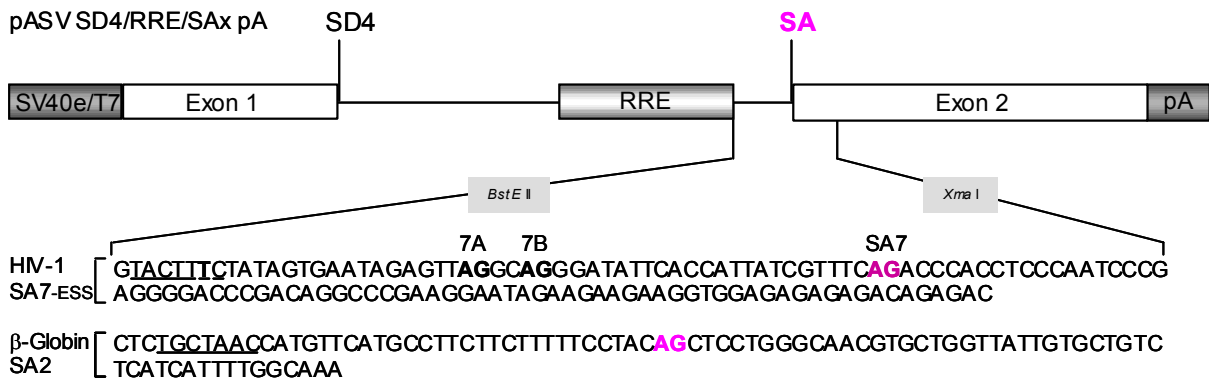
ermöglicht. Es sind jedoch auch in eukaryotischen Zellen einige Gene bekannt, die keine Introns besitzen und deren Transkripte demnach spleißunabhängig in das Cytoplasma exportiert werden (z.B. Histon 2a) (154). Dies führte zu der Frage, ob die gleichzeitige Abwesenheit von funktionellen Spleißdonor- und Spleißakzeptorsequenzen ausreicht, um die *env*-mRNA Rev-unabhängig zu exprimieren. Im Northern Blot war jedoch für dieses Konstrukt (SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^- \text{SD4}^- \text{SA7}^-$) weder gespleißte noch ungespleißte RNA detektierbar (Abb. 23B, Spur 2 und 6). Die *env*-mRNA konnte also durch den Verlust beider Spleißstellen nicht in ein Rev-unabhängig exportiertes, intronloses Transkript umgewandelt werden, sondern war nach wie vor von einer Stabilisierung durch die U1 snRNA abhängig.

3.2.1.2 Der Austausch des SA7 gegen einen β -Globin Spleißakzeptor inhibiert die Rev-abhängige Expression ungespleißter mRNA

Obwohl ein funktioneller Spleißakzeptor für die Rev-vermittelte *env*-Expression von ungespleißten Transkripten nicht nötig war (3.2.1.1), schien es dennoch eine Wechselwirkung zwischen dem HIV-1 Spleißakzeptor 7 und der Funktion von Rev zu geben. Es wurde beschrieben, dass die Insertion eines RREs in das Intron eines modifizierten β -Globin-Konstruktes nicht zu einer Rev-abhängigen Expression der ungespleißten mRNA führte. Eine Rev-Abhängigkeit konnte erst erreicht werden, nachdem der β -Globin Spleißakzeptor mutiert oder gegen den HIV-1 Spleißakzeptor 7 ausgetauscht worden war (58). Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis auch im Kontext der subgenomischen HIV-1 Konstrukte gültig ist, wurde in einem Spleißkassetten-Konstrukt der SA7 und die umgebenden Sequenzen gegen die Sequenz des β -Globin Spleißakzeptors 2 ausgetauscht (Abb. 24A).

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten war bei der Analyse der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA mit dem β -Globin SA2 ca. dreimal mehr gespleißte RNA nachweisbar als mit dem SA7 (Abb. 24B, vgl. Spur 1 und 2). Die Zunahme der mRNA Menge ließ auf eine verbesserte Spleißeffizienz schließen, da ein Zusammenhang zwischen effizientem Spleißen, dem RNA-Export sowie der Stabilisierung der mRNA nachgewiesen werden konnte (240, 288) (siehe auch 1.4.1). Der SA7 schien im Vergleich zum β -Globin SA2 ein ineffizienter Spleißakzeptor zu sein. Dieses Ergebnis korrelierte mit bereits publizierten Daten von O'Reilly und Mitarbeitern, die in einem heterologen β -Globin-Spleißsubstrat für den SA7 ca. 40 % Spleißaktivität im Vergleich zum β -Globin SA1 ermittelten (267). Nach Kotransfektion mit einem Rev-exprimierenden Plasmid stellte sich heraus, dass Rev bei dem Konstrukt mit β -Globin SA2 keine

A



B

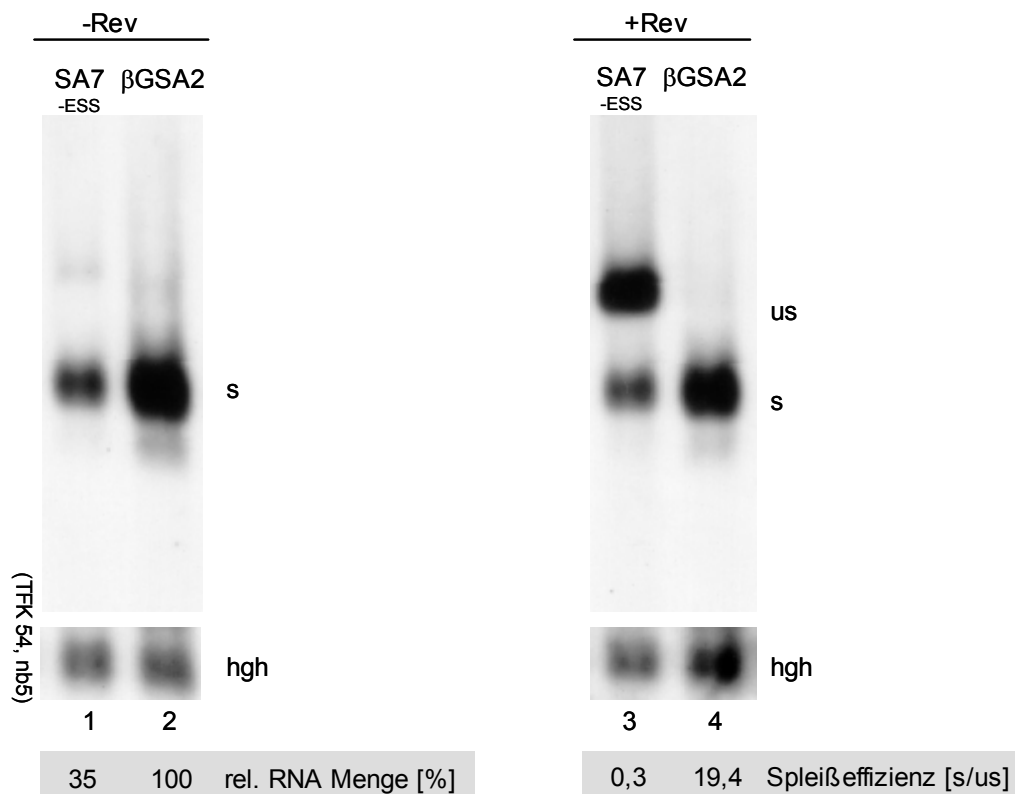


Abb. 24: Der Austausch des SA7 gegen einen β -Globin Spleißakzeptor führt zum Verlust des Rev-abhängigen Transports ungespleißter mRNA

A: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des SA7 und des β -Globin SA2 im Expressionsvektor pASV SD4/RRE/SAx pA. Die Spleißkassetten-Konstrukte wurden bereits beschrieben (Abb. 15). An der Position des SA7 wurde der β -Globin SA2 eingeführt. Die Nukleotidsequenzen der Spleißakzeptoren sind im unteren Teil der Abb. aufgeführt: Die Verzweigungssequenzen (unterstrichen) und die AG-Dinukleotide der Spleißakzeptoren (rot) sind angegeben.

B: Nachweis der p(A)⁺ RNA der Konstrukte mit HIV-1 SA7 und β -Globin SA2 im Northern Blot. 3×10^7 HeLa-T4⁺ Zellen wurden transient mit je 90 μ g der Spleißkassetten-Konstrukte, 60 μ g SVcrev bzw. pSP73 und 60 μ g pXGH5 elektroporiert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 85 μ g poly(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zu *tat*-Exon 2 (pUH3DS/K) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißte RNA, hgh: human growth hormone. Spur 1,3: pASV SD4/RRE/SA7/-ESS pA; Spur 2,4: pASV SD4/RRE/ β GSA2(Pal4) pA. Die Quantifizierung erfolgte mit der LumiAnalystTM 3.1 Software (Roche). Dargestellt ist die relative Menge der gespleißten RNA in Abwesenheit von Rev (links) und die Spleißeffizienz als Quotient aus gespleißter und ungespleißter RNA in Anwesenheit von Rev (rechts). Die gezeigten Spuren stammen alle aus der gleichen Transfektion und dem gleichen Northern Blot.

Verschiebung von gespleißter zu ungespleißter mRNA vermitteln konnte: Während das SA7-Konstrukt durch die Wirkung von Rev eine sehr geringe Spleißeffizienz ($s/us = 0,3$) aufwies (Abb. 24B, Spur 3), war mit dem β -Globin SA2 fast ausschließlich gespleißte RNA nachweisbar (Spur 4, $s/us = 19,4$).

Der von Chang und Sharp beschriebene, inhibierende Einfluss des β -Globin Spleißakzeptors auf die Rev-Funktion (58) war also auch in den hier verwendeten subgenomischen HIV-1 Konstrukten nachweisbar. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Effizienz des Spleißakzeptors ein entscheidendes Kriterium für die Rev-Regulation darstellen könnte.

3.2.1.3 Eine Verbesserung der Spleißeffizienz des SA7 konkurriert mit der Rev-abhängigen *env*-Expression

Um die Hypothese einer Inhibition der Rev-Funktion durch einen effizienten Spleißakzeptor zu überprüfen, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Kjems (Dept. of Molecular and Structural Biology, University of Aarhus, Denmark) und C. Leurs versucht, die Spleißeffizienz des SA7 in einem subgenomischen HIV-1 Konstrukt (SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$) zu verbessern. Dies sollte, soweit möglich, durch stille Punktmutationen erreicht werden, um die Aminosäure-Sequenz und damit die Funktionalität des Env-Glykoproteins zu erhalten. Obwohl die Verzweigungssequenz (BPS) in Säugern nicht hochkonserviert ist (Abb. 4B), konnte gezeigt werden, dass eine zur U2 snRNA komplementäre Sequenz (Abb. 5B.2) bevorzugt wird (405). Daher wurde die suboptimale Verzweigungsstelle des SA7 (UACUUUC) weiter abgeschwächt und wenige Nukleotide 3'-wärts eine BPS mit höherer Komplementarität zur U2 snRNA generiert (UGCUAAC, Abb. 25A). Ein Aminosäureaustausch von Valin nach Alanin wurde dabei toleriert. Durch weitere stille Mutationen wurden die beiden kryptischen Spleißakzeptoren 7A und 7B entfernt und der Pyrimidingehalt 5'-wärts des SA7 von 48 auf 77 % erhöht (Abb. 25B). Die SA7opt-Mutante kodierte, trotz des Aminosäureaustauschs, ein funktionelles Env-Glykoprotein, das in der Zellkultur Syncytienbildung induzieren konnte (214).

Die aus transfizierten HeLa-T4⁺ Zellen isolierte, p(A)⁺ aufgereinigte Gesamt-RNA von Konstrukten mit SA7- bzw. SA7opt-Sequenz wurde im Northern Blot verglichen. Drei unabhängige Experimente wurden quantifiziert, auf die Transfektionseffizienz normiert und die relativen Mengen der gespleißten und ungespleißten RNA dargestellt. Dabei wurde jeweils der Maximalwert in beiden RNA-Populationen gleich 100 % gesetzt (Abb. 25C). In Abwesenheit von Rev zeigte das SA7opt-Konstrukt im Vergleich zum authentischen SA7

A SA7 GUA CUU UCU AUA GUG AAU AGA GUU **AGG CAG** GGA UAU UCA CCA UUA UCG UUU **CAG**
 V L S I V N R V R Q G Y S P L S F Q
 SA7opt GUU CUU UCU AUU GCU AAC CGU GUU CGU CAA GGU UAU UCU CCU CUU UCU UUU **CAG**
 V L S I A N R V R Q G Y S P L S F Q

B

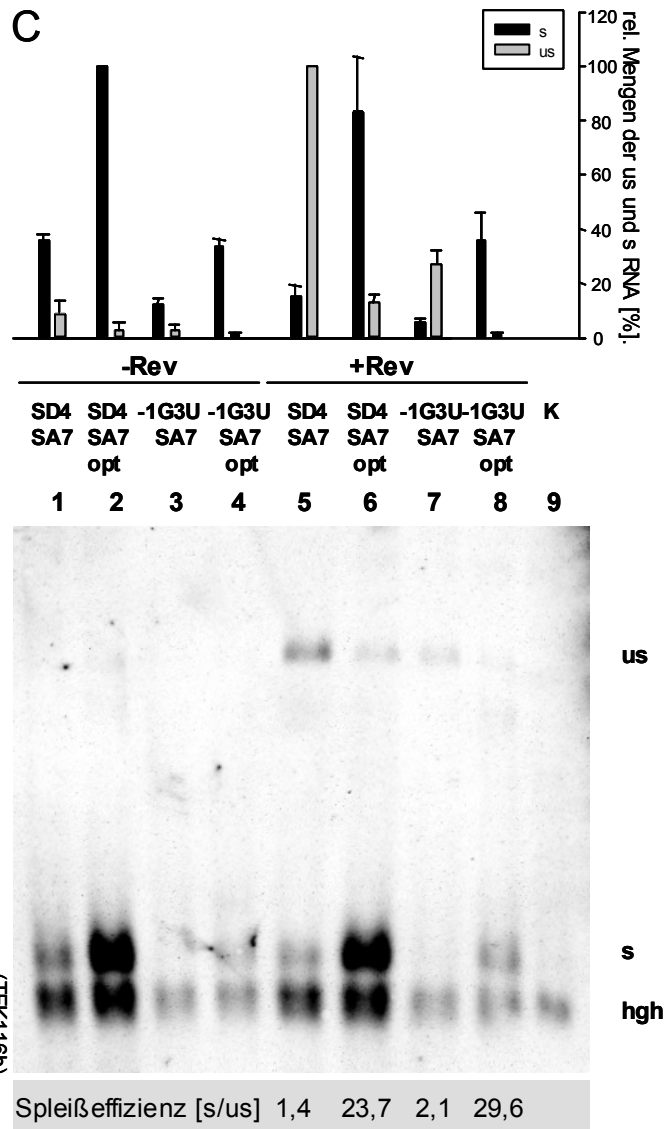
	Verzweigungs- sequenz (U2: ATGATG)	Abstand (nt) zwischen Verzweigungs- punkt und AG	Anzahl der Pyrimidine (Py) zwischen Verzweigungspunkt und AG		
			Py direkt vor AG	Py gesamt	%
SA7	TACTt t C	44	4	21	48
SA7opt	TGCTAAC	34	17	26	77

Abb. 25: Eine Verbesserung der Spleißeffizienz des SA7 inhibiert die Rev-abhängige env-Expression

A: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von SA7 und SA7opt. In der SA7-Sequenz sind die Verzweigungssequenz (unterstrichen), das hauptsächlich genutzte AG-Dinukleotid (rot) und zwei kryptische SAs (SA7A und B, (281), fett gedruckt) markiert. Die Punktmutationen in der SA7opt Sequenz (blau) führten zu einer Verschiebung der Verzweigungssequenz und wurden, mit Ausnahme eines Austausches von Valin nach Alanin, unter Erhaltung der Env-Aminosäuresequenz gesetzt.

B: Die SA7- und SA7opt-Sequenzen im Vergleich. In Spalte 2 sind komplementäre (Großbuchstaben) und nicht komplementäre (Kleinbuchstaben) Nukleotide zur Bindesequenz der U2 snRNA dargestellt. Der Verzweigungspunkt ist hervorgehoben. Die 3. Spalte gibt den Abstand (nt) zwischen dem Verzweigungspunkt und dem AG-Dinukleotid des Spleißakzeptors an. Spalte 4 beschreibt den Pyrimidingehalt dieser Sequenz: Bei SA7 sind z.B. 21 von 44 Nukleotiden zwischen Verzweigungspunkt und AG Pyrimidine. Dies entspricht 48 %. Direkt 5'-wärts des AG befinden sich 4 Pyrimidine, bevor der Polypyrimidintrakt durch ein Purin unterbrochen wird.

C: Nachweis der poly(A)⁺ RNA im Northern Blot. Es wurden jeweils 9 µg der SV E/X tat⁻rev⁻-Konstrukte, 9 µg SVcrevΔH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 mittels FuGeneTM6 transient in HeLa-T4⁺-Zellen transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 100 µg poly(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde mit Digoxigenin-markierten antisense RNA Sonden komplementär zum *env* 3'-Ende (LTRcenvpA⁺) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev, sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißtes Transkript, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1,5: SV E/X tat⁻rev⁻; Spur 2,6: SV E/X tat⁻rev⁻ SA7opt; Spur 3,7: SV E/X tat⁻rev⁻ -1G3U; Spur 4,8: SV E/X tat⁻rev⁻ -1G3U SA7opt; Spur 9: Kontrolle (SVcrevΔH/X, pSP73, pXGH5). Der Blot wurde quantifiziert (LumiAnalystTM 3.1 Software, Roche) um die Spleißeffizienz (s/us, grau unterlegt) in Anwesenheit von Rev zu bestimmen. Das Balkendiagramm über dem Blot gibt die Mittelwerte der relativen RNA-Mengen aus 3 unabhängigen Experimenten an. Dabei wurden die Maximalwerte der gespleißten (s, schwarz) und der ungespleißten (us, grau) RNA gleich 100 % gesetzt.



eine ca. 3-fache Zunahme der gespleißten mRNA-Menge (vgl. Spur 1 mit 2, 36 und 100 %). Der SA7opt wies damit eine dem β -Globin SA2 vergleichbare Spleißeffizienz auf (vgl. Abb. 24, Spur 1 und 2). Die gesetzten Mutationen erfüllten also die Anforderung, die Spleißeffizienz des SA7, unter weitestmöglicher Beibehaltung der Kodierungsinformation, zu verbessern. In Anwesenheit von Rev konnte mit dem SA7opt hauptsächlich gespleißte und nur sehr wenig ungespleißte RNA detektiert werden (Spur 6). Die verbesserte Spleißeffizienz des Akzeptors konkurrierte also auch hier, wie im Fall des β -Globin SA2, mit dem Rev-vermittelten Export der ungespleißten RNA.

Der SD4 ermöglichte in den untersuchten subgenomischen HIV-Konstrukten in erster Linie die Stabilisierung der RNA. Im *in vitro* Spleiß-Assay konnte aber gezeigt werden, dass Mutationen in der Spleißdonorsequenz auch die Spleißeffizienz verändern. Um zu untersuchen, ob auch die Effizienz des Spleißdonors mit der Rev-Funktion konkurriert, wurde, neben dem effizienten SD4, auch ein ineffizienterer Spleißdonor (-1G3U) mit dem SA7- bzw. mit dem SA7opt-Spleißakzeptor kombiniert. Im Northern Blot zeigten die Konstrukte mit SD4, wie aufgrund der besseren RNA-Stabilisierung erwartet, insgesamt ca. 3-fach höhere RNA-Mengen als die Konstrukte mit dem ineffizienten -1G3U-Spleißdonor (vgl. z.B. Spur 1 mit 3 und Spur 2 mit 4). Die Bestimmung der Spleißeffizienz (*s/us*) zeigte jedoch eine vergleichbare Reaktion auf Rev bei den Konstrukten mit ineffizientem (-1G3U) oder effizientem Spleißdonor (SD4) (vgl. Spur 7, *s/us* = 2,1 mit Spur 5, *s/us* = 1,4). Ein Austausch des ineffizienten SA7 gegen den effizienten SA7opt konkurrierte dagegen mit der Rev-Funktion und veränderte das Verhältnis von gespleißter zu ungespleißter RNA (vgl. Spur 7, *s/us* = 2,1 mit Spur 8, *s/us* = 29,6).

Sowohl die Komplementarität des Spleißdonors zur U1 snRNA, als auch die Effizienz des Spleißakzeptors zeigten in diesem Experiment einen Einfluss auf die Menge der gespleißten mRNA. Dieser Einfluss beruhte jedoch auf unterschiedlichen Effekten: Während die Komplementarität des Spleißdonors die zur Verfügung stehende prä-mRNA-Menge veränderte (siehe Kapitel 3.1), beeinflusste die Spleißeffizienz des Akzeptors die Reaktion auf Rev. Durch die verbesserte Spleißeffizienz des SA7opt war Rev nicht mehr in der Lage die ungespleißten Transkripte aus dem Kern zu exportieren. Die Effizienz des Spleißens konkurrierte offenbar direkt mit der Effizienz des Rev-vermittelten Exports der intronhaltigen RNA. Eine effiziente Rev-Funktion erforderte daher einen ineffizienten Spleißakzeptor.

3.2.1.4 Die Effizienzsteigerung des Spleißakzeptors führt *in vitro* zur ASF/SF2-unabhängigen Bildung von Lariat-Intermediaten

Für die beobachtete Konkurrenz zwischen dem Spleißen und der Rev-Funktion gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte die Erkennung eines ineffizienten Spleißakzeptors verzögert stattfinden, was einen Export der prä-mRNA durch Rev vor dem Beginn des Spleißvorgangs begünstigen würde. Es ist aber auch denkbar, dass Rev direkt den Spleißvorgang inhibiert. Einen Hinweis darauf lieferten *in vitro* Experimente von Kjems und Sharp, die eine Inhibition des U4/U6.U5tri snRNA-Eintritts in das Spleißosom durch Rev beschrieben (182). Für das Verständnis der Rev-Funktion wäre es daher interessant, die Spleißosomassemblierung an unterschiedlich effizienten Spleißakzeptor-Mutanten in An- und Abwesenheit von Rev zu untersuchen. Dafür müssten jedoch die *in vivo* beobachteten Unterschiede in der Spleißeffizienz und in der Reaktion auf Rev zunächst auf das *in vitro* System übertragbar sein.

Um diese Voraussetzung zu überprüfen, wurden Spleißkassetten-Konstrukte mit dem Spleißdonor 4 und den Spleißakzeptoren SA7, SA7opt und β -Globin SA2 (Abb. 26A) *in vitro* transkribiert und gespleißt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben (Abb. 26B) wurde die Spleißeffizienz der Konstrukte als Quotient aus der Menge der Lariat-Intermediate (il) und der ungespleißten Transkripte (us) berechnet (Abb. 26B, unten). Bereits ohne die Zugabe von rekombinantem ASF/SF2-Protein konnten mit den effizienten Spleißakzeptoren (β GSA2 und SA7opt) schwache Signale für das Lariat-Intermediat und für das freie 5'-Exon nachgewiesen werden (vgl. Spur 1 mit 3 und 5). Gespleißte Transkripte waren jedoch nicht sichtbar. Der erste Schritt der Spleißreaktion konnte also mit β GSA2 und SA7opt offenbar SF2-unabhängig erfolgen. Dies könnte auf eine bessere Erkennung dieser Spleißakzeptoren durch die an der Spleißosomassemblierung beteiligten Faktoren, wie z.B. SF1/mBBP und U2AF, oder auf die Anwesenheit von spleißinhibierenden Elementen in der authentischen 5'- und 3'-Sequenz des SA7 (9, 341, 360) zurück gehen. In Anwesenheit von ASF/SF2 war jedoch mit dem β -Globin SA2 und dem SA7opt im Vergleich zum SA7 nur eine sehr geringe Erhöhung der Spleißeffizienz (ca. 1,4-fach) zu beobachten (vgl. Spur 4 und 6 mit 2), während *in vivo* ein 3-facher Unterschied in der Menge der gespleißten mRNA nachweisbar war (siehe Abb. 24 und 25). Es könnte sein, dass mit dem effizienten Spleißen *in vivo* ein verbesserter Export der mRNA einherging, der maßgeblich zu diesem Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Experiment beitrug. Die zudem geringe Effizienz der Spleißreaktion an HIV-Sequenzen *in vitro* erschwerte eine Untersuchung verschieden effizienter Spleißakzeptoren zusätzlich.

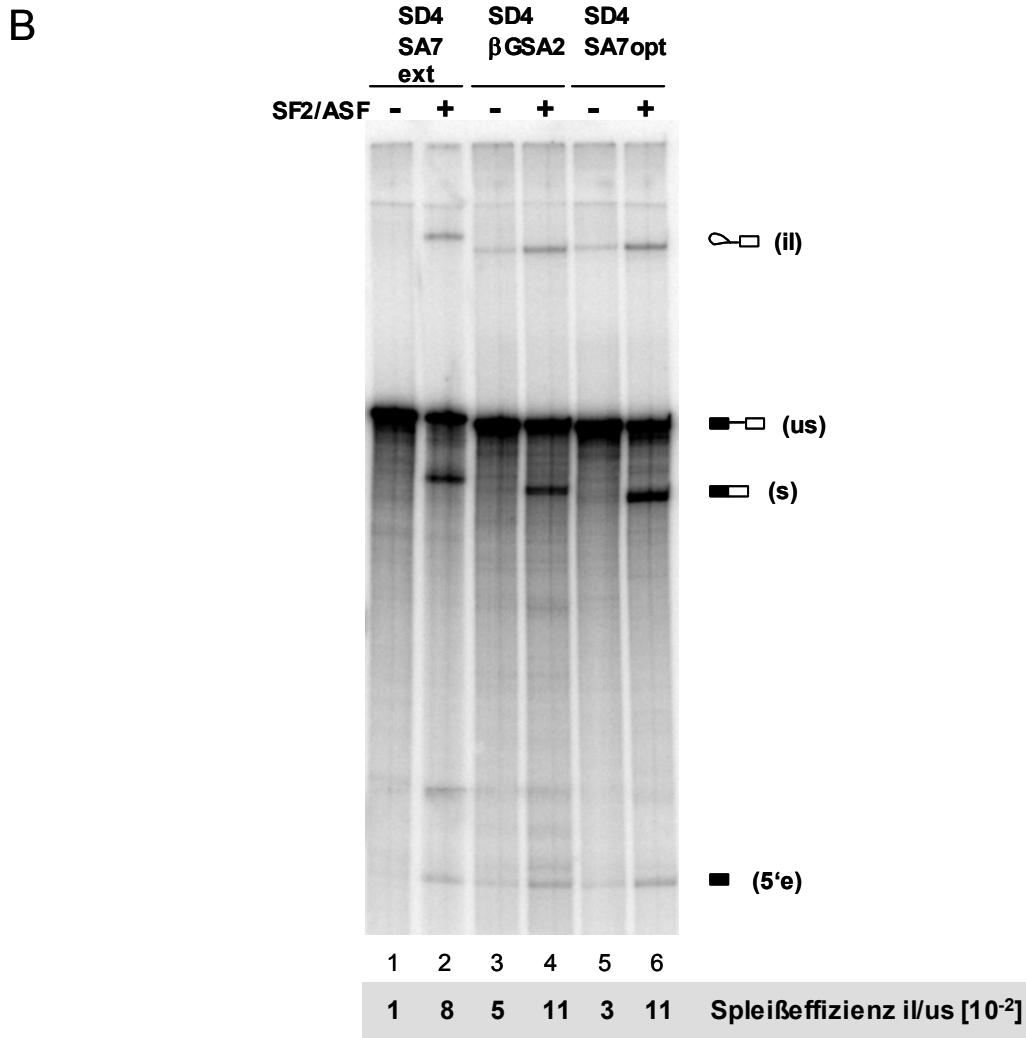
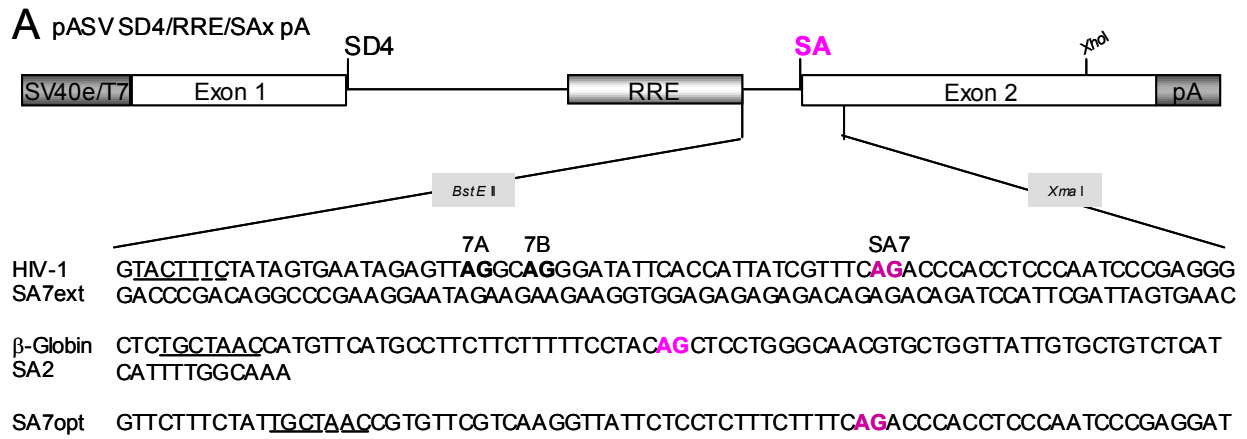


Abb. 26: Die Effizienzsteigerung des Spleißakzeptors führt *in vitro* zur ASF/SF2-unabhängigen Bildung von Lariat-Intermediaten

[³²P]-markierte, *Xho*I geschnittene *in vitro* Transkripte der Spleißkassetten-Konstrukte wurden geleliert, in HeLa-Kernextrakt nach einem modifizierten Protokoll nach Dignam (82, 163) gespleißt und auf einem 4 % Urea-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Signale wurden mit einem Phosphormager detektiert und mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Abgekürzte Plasmidbezeichnungen, sowie die Zugabe von rekombinantem SF2/ASF sind über den Spuren angegeben. Spur 1,2: pASV SD4/RRE/SA7ext pA; Spur 3, 4: pASV SD4/RRE/ β GSA2(Pal4) pA; Spur 5,6: pASV SD4/RRE/SA7opt pA. Unter dem Gel ist die Spleißeﬃzienz als Quotient aus der Menge der Lariat-Intermediate (il) und der ungespleißten Transkripte (us) berechnet. Transkript: ■—□, Lariat Intermediat: ◡□, ◡—□, Spleißprodukt: ■■□, Lariat: ◡, ◡, 5'Exon: ■

3.2.1.5 Rev zeigt *in vitro* keinen inhibierenden Einfluss auf das Spleißen von HIV-Konstrukten

Um zu beantworten, ob Rev das Spleißen der auf der HIV-1 Sequenz basierenden Spleißkassetten-Konstrukte *in vitro* inhibieren kann, wurde rekombinantes Rev-Protein aufgereinigt und zusammen mit einem Spleißkassetten-Konstrukt mit SA7 in den *in vitro* Spleiß-Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt ohne RRE-Sequenz verwendet.

Bei zugesetzten Mengen von 0 bis 3 µg des rekombinanten Rev-Proteins war in diesem experimentellen System keine spezifische Abnahme der Spleißeffizienz sichtbar (Abb. 27A). Bei Zugabe von 3 µg Rev (Spur 4) zeigte sich zwar eine Verringerung der Spleißeffizienz auf 85 % des Ausgangswertes, die jedoch auch bei dem Kontrolltranskript ohne RRE (Spur 5 bis 8) nachweisbar war. Das Experiment wurde daraufhin unter Zugabe von 0 bis 0,4 µg Rev³⁴⁻⁵⁰-Oligopeptid wiederholt, das freundlicherweise von Prof. Kjems (Universität Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Die Sequenz dieses Oligopeptids entspricht der minimalen RNA-Bindedomäne von Rev. In der Publikation von Kjems und Sharp konnte *in vitro* in Anwesenheit von Rev³⁴⁻⁵⁰ eine bis zu 30-fache Spleißinhibition an β-Globin- und Adenovirus-Intronsequenzen gemessen werden (181). Mit den HIV-Konstrukten war jedoch auch mit Rev³⁴⁻⁵⁰ keine spezifische Spleißinhibition nachweisbar. Eine Verringerung der Spleißeffizienz auf ca. 50 % des Ausgangswertes wurde sowohl mit als auch ohne RRE erreicht (Abb. 27B).

Da die HIV-1 Spleißkassetten-Konstrukte *in vitro* keine spezifische Hemmung durch die Zugabe von rekombinantem Rev bzw. des Oligopeptids zeigten und zudem die Unterschiede in der Spleißeffizienz verschiedener Spleißakzeptoren kaum nachweisbar waren (Abb. 26), wurden diese Fragestellung nicht weiter verfolgt. Die nachfolgenden Experimente zum Vergleich der HIV-1 Spleißakzeptoren wurden in Zellkulturexperimenten durchgeführt.

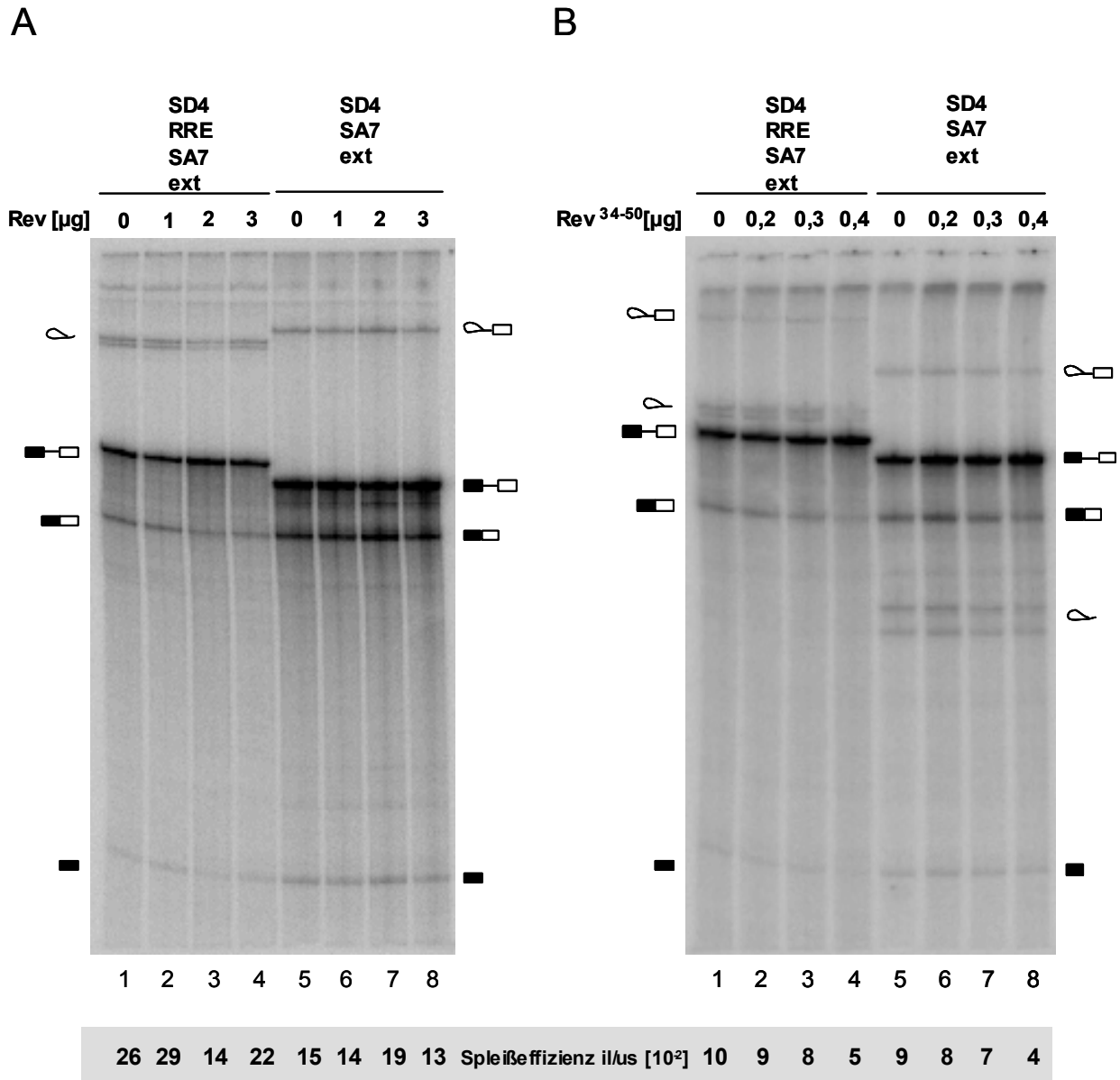


Abb. 27: Rev zeigt *in vitro* keinen inhibierenden Einfluss auf das Spleißen von HIV-1 Konstrukten

[^{32}P]-markierte, *Xho*I geschnittene *in vitro* Transkripte der Spleißkassetten-Konstrukte (pASV SD4/(RRE)/SA7ext pA) wurden geleluert, in HeLa-Kernextrakt in Anwesenheit von rekombinantem ASF/SF2 und steigenden Mengen rekombinantem Rev-Protein (links) bzw. eines Rev- Oligopeptids (rechts, Rev³⁴⁻⁵⁰ entspricht der Sequenz der RNA-Bindedomäne) gespleißt und auf einem 4 % Urea-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde mit einem PhosphorImager detektiert und mit der LumiAnalystTM 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Abgekürzte Plasmidbezeichnungen, sowie die Zugabe von rekombinantem Rev bzw. Rev-Oligopeptid sind über den Spuren angegeben. Unter dem Gel ist die Spleißeffizienz als Quotient aus der Menge der Lariat-Intermediate (il) und der ungespleißten Transkripte (us) berechnet. Für die Spuren 1-4 in A wurde abweichend davon auf die Menge der Lariate quantifiziert, da das Signal für die Lariat-Intermediate nicht eindeutig identifizierbar war.

3.2.2 Die HIV-1 Spleißakzeptoren – Ein Vergleich der Spleißeffizienz und der Rev-Reaktivität

In den untersuchten, subgenomischen HIV-1 Transkripten wurde die Spleißeffizienz *in vivo* hauptsächlich durch den Spleißakzeptor bestimmt (siehe Abb. 24 und 25). Die Spleißreaktion stand dabei in Konkurrenz zur Rev-Funktion. Ein effizienter Spleißakzeptor war in der Lage den Rev-vermittelten Export der ungespleißten RNA zu inhibieren. Für die virale Replikation ist jedoch die durch Rev induzierte Verlagerung von der Expression der frühen, gespleißten zu den späten, intronhaltigen Transkripten essenziell, um die Expression der Strukturproteine und Enzyme zu gewährleisten und genomische RNA für neue Viren zur Verfügung zu stellen. Neben dem bisher betrachteten Spleißereignis von SD4 auf SA7 sollten daher auch alle anderen Spleißereignisse durch Rev regulierbar sein. Unterschiede in der Effizienz der Spleißakzeptoren könnten zur Regulation des alternativen Spleißens bei HIV-1 beitragen. Erste Untersuchungen der HIV-1 Spleißakzeptoren in einem heterologen β -Globin-Konstrukt ergaben für die HIV-1 Akzeptoren Spleißeffizienzen zwischen 26 und 60 % des β -Globin SA1 (267). Dabei wurden jedoch weder der Einfluss der 3'-wärts liegenden Exonsequenzen auf die Spleißeffizienz der Akzeptoren berücksichtigt, noch der Einfluss von Rev auf das Spleißereignis untersucht. Die folgenden Experimente zur vergleichenden Charakterisierung der im HIV-1 NL4-3 Isolat vorhandenen Spleißakzeptoren sollten die Frage beantworten, ob sich die HIV-SAs in ihrer Spleißeffizienz und in ihrer Reaktion auf Rev unterscheiden. Ferner sollte zwischen dem Beitrag der Intron- und der Exon-Sequenzen zur Spleißeffizienz differenziert werden.

3.2.2.1 Die HIV-1 Spleißakzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und ihrer Reaktion auf Rev

Um den Beitrag der 5'-wärts des AG-Dinukleotids gelegenen Sequenzen der HIV-Spleißakzeptoren auf deren Spleißeffizienz und die Rev-Reaktivität zu untersuchen, wurden die Intronsequenzen der 3'-Spleißstellen SA2, SA3, SA4, SA4cab, SA5 und SA7, in ein Spleißkassetten-Konstrukt mit der 5'-Spleißstelle SD4 und einem RRE im Intron kloniert (pASV SD4/RRE/SAx pA). Die inserierten Akzeptorsequenzen enthielten jeweils die publizierten oder, aufgrund ihrer Komplementarität zur U2 snRNA, angenommenen Verzweigungssequenzen (blau hinterlegt), den Polypyrimidintrakt und das AG-Dinukleotid (rot) (Abb. 28A). Aufgrund der räumlichen Nähe und der damit einhergehenden Überlagerung der funktionalen Elemente wurden die Spleißakzeptoren 4cab als Einheit betrachtet. Dies steht in Übereinstimmung mit ihrer Funktion, da alle drei Spleißereignisse Transkripte mit Rev als erstem offenem Leserahmen generieren. Das SA7-Fragment enthält zwei weitere potentielle Akzeptoren, SA7A und 7B, deren Nutzung jedoch im NL4-3

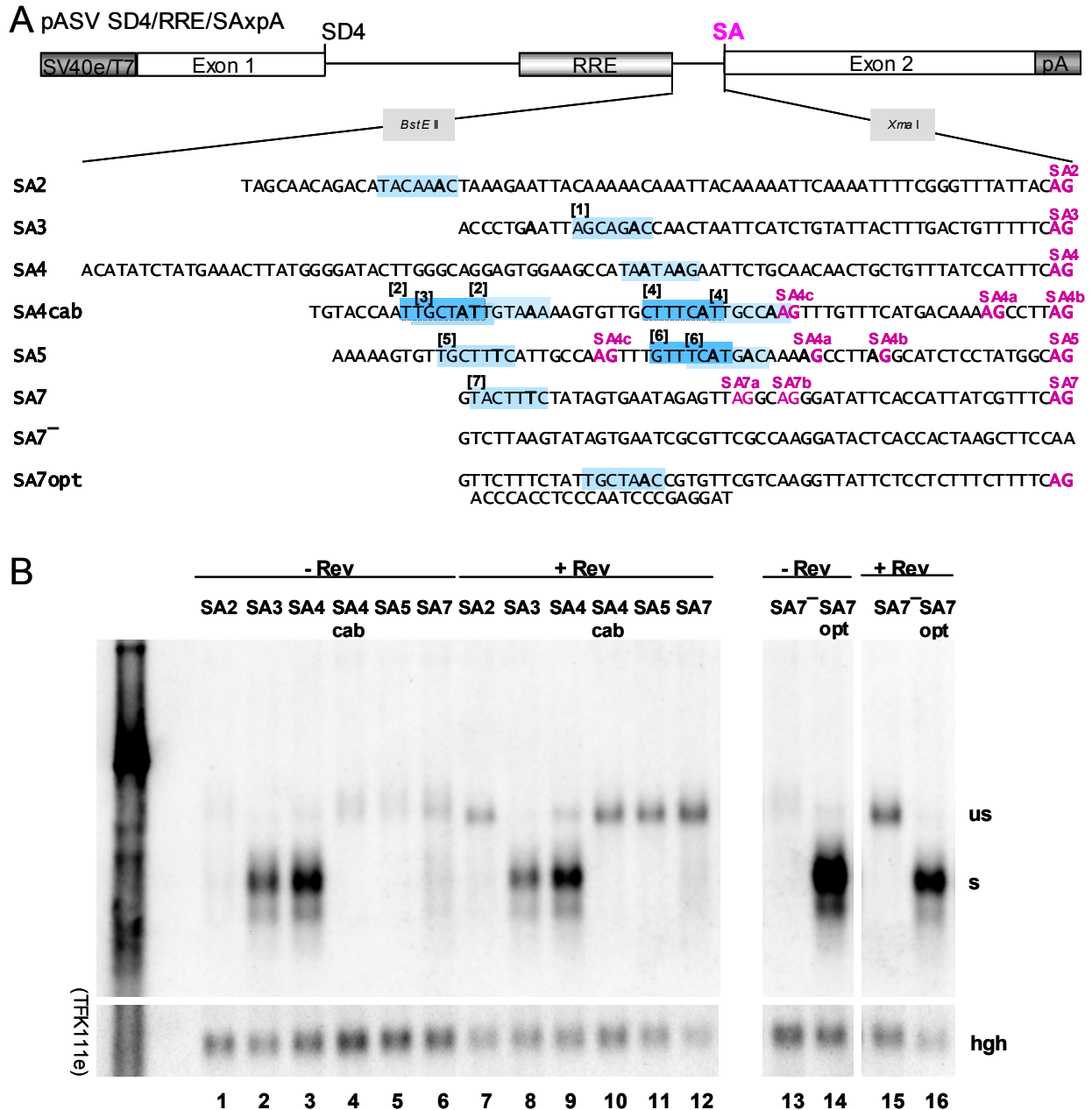


Abb. 28: Die HIV-1 Spleißakzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und in ihrer Reaktion auf Rev

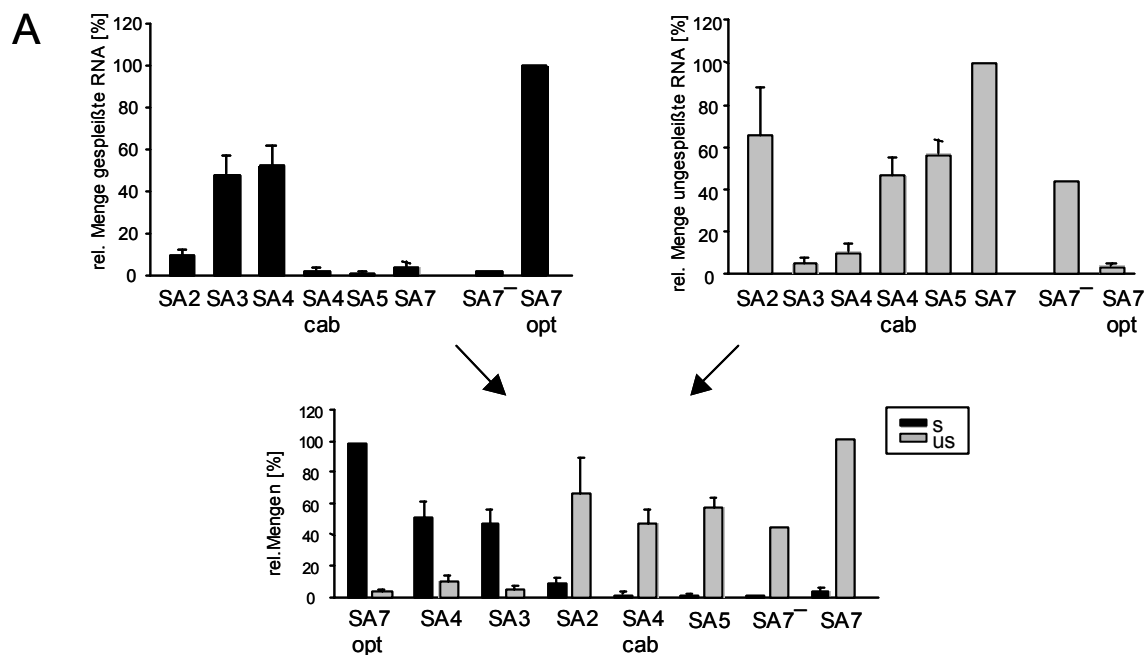
A: Die HIV-1 Spleißakzeptorsequenzen im Spleißkassetten-Konstrukt. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Spleißkassetten-Konstrukt (pASV SD4/RRE/SA_x pA) schematisch dargestellt (siehe auch Abb. 13). SD4 bezeichnet den HIV-1 Spleißdonor 4, SA_x steht für die verschiedenen, an dieser Stelle über *BstEII*/*XmaI* inserierten HIV-1 Spleißakzeptoren. Im unteren Teil der Abbildung sind die inserierten Sequenzen angegeben, die die jeweiligen Spleißakzeptoren (rot) und deren 5'-Sequenz mit den publizierten oder, aufgrund der Komplementarität zur U2 snRNA, angenommenen Verzweigungssequenzen (blau unterlegt) und die jeweiligen Verzweigungsnukleotide (fett) enthalten. [1]: BPS SA3, (80); [2]: BPS SA4c, (353); [3],[4]: BPS SA4ab, (88, 353); [5],[6]: BPS SA5, (88, 353); [7]: BPS SA7, (88).

B: Northern Blot der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA. 3 x 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mittels FuGeneTM6 transient mit je 9 µg der Spleißkassetten-Konstrukte, 9 µg SVcrevDH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 kotransfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 85 µg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zum *env* 3'-Ende (LTR_{cen}pA⁻) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1, 7: pASV SD4/RRE/SA2 pA; Spur 2, 8: pASV SD4/RRE/SA3 pA; Spur 3, 9: pASV SD4/RRE/SA4 pA; Spur 4, 10: pASV SD4/RRE/SA4cab pA; Spur 5, 11: pASV SD4/RRE/SA5 pA; Spur 6, 12: pASV SD4/RRE/SA7 pA; Spur 13, 15: pASV SD4/RRE/SA7⁻ pA; Spur 14, 16: pASV SD4/RRE/SA7opt pA. Die gezeigten Spuren stammen alle aus der gleichen Transfektion und dem gleichen Northern Blot.

Isolat, von dem die hier verwendeten Sequenzen abstammen, nicht nachgewiesen werden konnte (281). Der SA6, der im *tat/rev*-Intron lokalisiert ist, wurde hier nicht berücksichtigt. Durch die Nutzung dieses Akzeptors kann in einigen HIV-Isolaten das *tev*-Transkript entstehen, das sich aus *tat*-, *rev*- und *env*-Sequenzen zusammensetzt. Der SA6 ist jedoch im HIV-Isolat NL4-3 inaktiv (16, 281). Als Bezugsgrößen für einen effizienten Spleißakzeptor und eine Sequenz ohne funktionellen Spleißakzeptor wurden die Mutationen SA7opt (siehe 3.2.1.3) und SA7⁻ (siehe 3.2.1.1) verwendet.

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten und Präparation der poly(A)⁺ Fraktion aus der Gesamt-RNA wurde das Spleißverhalten in An- und Abwesenheit von Rev im Northern Blot untersucht (Abb. 28B). Für die Auswertung wurden 3 unabhängige Experimente quantifiziert und auf die Transfektionseffizienz normiert. Für die gespleißten Transkripte wurde die RNA-Menge des SA7opt-Konstrukts und für die ungespleißten Transkripte die des SA7-Konstrukts gleich 100 % gesetzt (Abb. 29A). Die HIV-Akzeptoren verhielten sich in diesem Experiment nicht gleich, sondern konnten in zwei Gruppen unterteilt werden: Die Konstrukte mit SA3 und SA4 zeigten eine deutliche Spleißaktivität (Abb. 29 A, links; 48 % und 52 %), während mit den anderen Spleißakzeptoren kein bzw. nur ein sehr geringes Signal für die gespleißten RNA sichtbar war (1-10 %). In Anwesenheit von Rev zeigte sich für die ungespleißte RNA ein umgekehrtes Bild (Abb. 29A, rechts). Bei den effizient gespleißten Konstrukten mit SA3 und SA4 konnten, vergleichbar zu dem Konstrukt mit SA7opt, nur sehr geringe Mengen ungespleißte RNA detektiert werden (5 %, 11 % bzw. 4 %). Bei den Konstrukten ohne (SA7⁻, 44 %) oder mit ineffizienten Spleißakzeptoren war dagegen deutlich mehr ungespleißten RNA nachweisbar (SA2, 66 %; SA4cab, 47 %; SA5, 57 %; SA7, 100 %).

Wie lassen sich diese Unterschiede erklären? Ein Vergleich der Spleißakzeptor-Sequenzen (Abb. 29B) zeigte, dass keine Verzweigungsstellen mit ausgeprägter Komplementarität zur U2 snRNA vorhanden waren. Für SA4cab und SA5 wurden mehrere funktionelle Verzweigungssequenzen beschrieben, von denen einige anstelle des üblichen Adenosins, ein Uridin als Verzweigungsnukleotid aufweisen (88). Zusätzlich sind die Polypyrimidinsequenzen nicht sehr ausgeprägt und von Purinen durchsetzt. Eine Erklärung für das unterschiedliche Spleißverhalten von SA3 und SA4, im Vergleich zu den anderen Akzeptoren, könnte der etwas höhere Pyrimidingehalt zwischen der Verzweigungssequenz und dem AG-Dinukleotid sein. Diese Möglichkeit wurde in nachfolgenden Experimenten am Beispiel des SA5 untersucht (siehe 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Die durch den Spleißakzeptor vermittelte Spleißeffizienz beeinflusste auch hier die Menge der Rev-abhängigen,



B

	Positionen -3 -2 -1 des SA	Verzweigungs Sequenz (U2: AUGAUG)	Abstand (nt) zwischen Verzweigungspunkt und AG	Anzahl der Pyrimidine (Py) zwischen Verzweigungspunkt und AG		
				Py direkt vor AG	Py gesamt	%
SA2	CAG	TACaAAC	53	1	22	42
SA3	CAG	aGCaGAC (80)	36	6	24	69
SA4	CAG	TAAaTAag	32	4	20	65
SA4 c	AAG	TTgctAT (353)	27	0	15	56
		TTgTAAa (353)	21		13	62
SA4 a	AAG	TGCTaT (88)	44	0	23	52
		CTtTcAT (353)	24		13	54
		TTgccAa (353)	18		9	50
SA4 b	TAG	siehe 4a	50	4	27	56
			30		17	57
			24		13	54
SA5	CAG	TGCTttc (88)	48	1	26	55
		TCaTGAC (353)	26	1	13	52
SA7	CAG	TACTttc (88)	45	4	21	48
SA7opt	CAG	TGCTAAC	35	17	26	77

Abb. 29: Die HIV-1 Spleißakzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und in ihrer Reaktion auf Rev

A: Relative Mengen der gespleißten und ungespleißten RNA der Spleißkassetten-Konstrukte mit verschiedenen HIV-1 Akzeptoren. p(A)⁺ RNA-Präparationen aus drei unabhängigen Transfektionen wurden im Northern Blot analysiert (repräsentativ ist Abb. 28B), mit dem Lumi-Imager F1 (Roche) detektiert und mit der LumiAnalystTM 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Dargestellt sind die *hgh*-normierten Mittelwerte mit Standardfehlern für die relativen Mengen gespleißter (links) und ungespleißter (rechts) RNA. Der Maximalwert wurde in beiden RNA-Populationen gleich 100 % gesetzt. Für den SA7⁻ war nur ein Messwert vorhanden, der zum Vergleich mit in die Abb. aufgenommen wurde. In der unteren Grafik wurden die Werte nach absteigender Menge an gespleißter und aufsteigender Menge an ungespleißter RNA sortiert, um den Zusammenhang zwischen Spleißen und Rev-Funktion zu verdeutlichen.

B: Die 5'-Umgebung der HIV-1 Spleißakzeptoren im Vergleich. In der ersten Spalte sind die Positionen -1 bis -3 der jeweiligen Spleißakzeptoren, in der zweiten Spalte die Verzweigungssequenzen aufgeführt. Die eingeklammerten Zahlen verweisen auf die Literaturliste. Das Verzweigungsnukleotid (fett), komplementäre (Großbuchstaben) und nicht komplementäre Basen (Kleinbuchstaben) zur U2 snRNA sind angegeben. Die restlichen vier Spalten beschreiben den Abstand zwischen Verzweigungssequenz und dem AG, den absoluten (Py gesamt) und den relativen (%) Pyrimidingehalt in dieser Sequenz sowie die Anzahl der Pyrimidine direkt 5'-wärts des AG-Dinukleotids (Py direkt vor AG).

ungespleißten Transkripte. Bei einem Vergleich der relativen Mengen der gespleißten und ungespleißten RNA zeigte sich ein gegenläufiger Effekt (Abb. 29A, unten), der das Modell der Konkurrenz zwischen dem Spleißereignis und dem Rev-vermittelten Export intronhaltiger RNAs bestätigte.

3.2.2.2 Die Spleißeffizienz und die Rev-Reaktivität der HIV-1 Spleißakzeptoren wird durch die nachfolgenden Exonsequenzen beeinflusst

Alternativ genutzte Spleißakzeptoren werden in der Regel durch *cis*-regulatorische Elemente wie ESE (exonic splicing enhancer)- und ESS (exonic splicing silencer)-Sequenzen (siehe 1.3.4) reguliert. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchung waren in HIV-1 Transkripten ein ESS-Element 3'-wärts des SA4 (8, 9, 330) und ein zweigeteiltes Element, bestehend aus einem ESE und einem ESS 3'-wärts des SA7 (9, 331, 341) beschrieben worden. Im folgenden Experiment wurde der Einfluss dieser bekannten ESE- und ESS-Sequenzen auf die Spleißeffizienz und auf die Rev-Reaktion, sowie die mögliche Präsenz von weiteren spleißregulierenden Sequenzen in den anderen Exons untersucht. Dazu wurden die in die Spleißkassette inserierten Akzeptorsequenzen um 16 bis 96 Nukleotide ihrer 3'-Sequenz verlängert (Abb. 30A). Die Verlängerung erfolgte dabei unter Einschluss

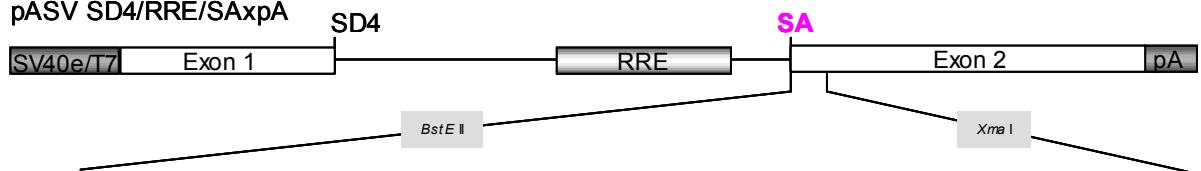
Abb. 30: Die Spleißeffizienz und die Rev-Reaktivität der HIV-1 Spleißakzeptoren wird durch die nachfolgenden Exonsequenzen beeinflusst

A: Die 3'-wärts verlängerten Spleißakzeptorsequenzen im Spleißkassetten-Konstrukt. Dargestellt ist ein Spleißkassetten-Konstrukt (pASV SD4/RRE/SA_x ext pA, siehe Abb. 15). Die zwischen *Bst*EII und *Xma*I inserierte Sequenz umfasst, zusätzlich zu den in Abb.28 angegebenen Intronsequenzen, die authentischen 3'-Sequenzen der HIV-1 SAs. Markiert sind Spleißakzeptoren (rot) und zum Zeitpunkt der Experimente bekannte Exon splicing enhancer (ESE, grün) und Exon splicing silencer (ESS, orange). Die eingeklammerten Zahlen verweisen auf die Literaturliste.

B: Northern Blot der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA. 3×10^6 HeLa-T4⁺ Zellen wurden mittels FuGeneTM6 transient mit je 9 µg der Spleißkassetten-Konstrukte, 9 µg SVcrevDH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 90 µg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zum *env* 3'-Ende (LTRcenvpA⁻) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1,8: pASV SD4/RRE/SA2ext pA; Spur 2,9: pASV SD4/RRE/SA3ext pA; Spur 3,10: pASV SD4/RRE/SA4ext pA; Spur 4,11: pASV SD4/RRE/SA4cabext pA; Spur 5, 12: pASV SD4/RRE/SA4cab5ext pA; Spur 6, 13: pASV SD4/RRE/SA5ext pA; Spur 7, 14: pASV SD4/RRE/SA7ext pA; Spur 15, 17: pASV SD4/RRE/SA7⁻ pA; Spur 16, 18: pASV SD4/RRE/SA7opt pA. Die gezeigten Spuren stammen alle aus der gleichen Transfektion und dem gleichen Northern Blot.

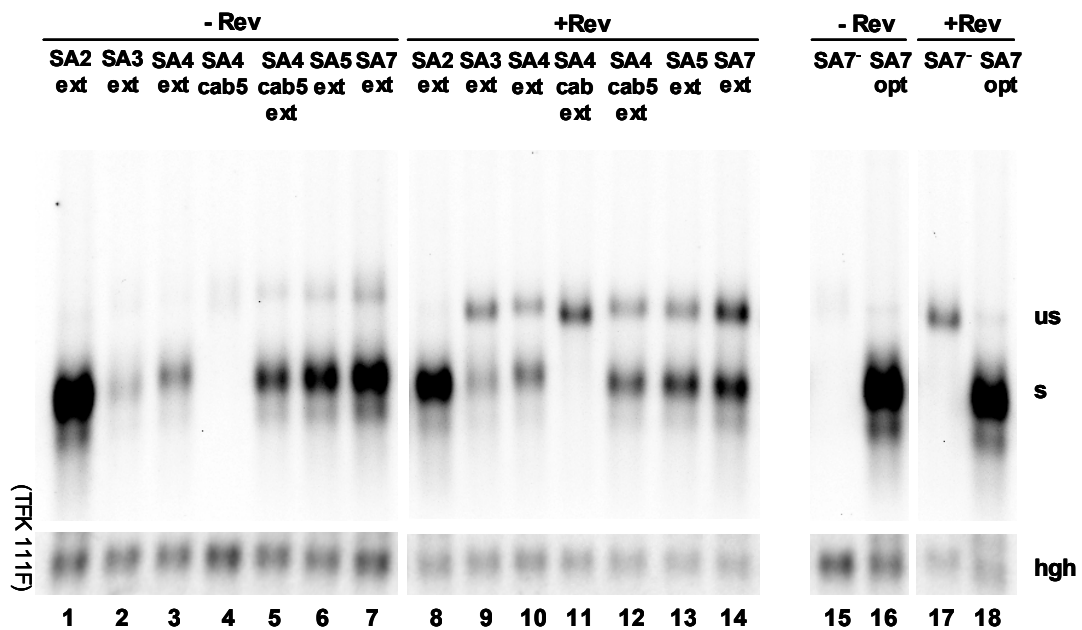
C: Gespleißte und ungespleißte RNA-Mengen der Spleißkassetten-Konstrukte mit verschiedenen HIV-1 Akzeptoren mit ihren 3'-Sequenzen. Gesamt-RNA-Präparationen aus drei unabhängigen Transfektionen wurden im Northern Blot analysiert (repräsentativ ist Abb. 30B), mit dem Lumi-Imager F1 (Roche) detektiert und mit der LumiAnalystTM 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Dargestellt sind die hgh-normierten Mittelwerte mit Standardfehlern für die relativen Mengen gespleißter (links) und ungespleißter (rechts) RNA. Vergleichbar zu Abb. 29A wurde für die gespleißte RNA das SA7opt-Konstrukt und für die ungespleißte RNA das SA7-Konstrukt gleich 100 % gesetzt.

A pASV SD4/RRE/SAxpA

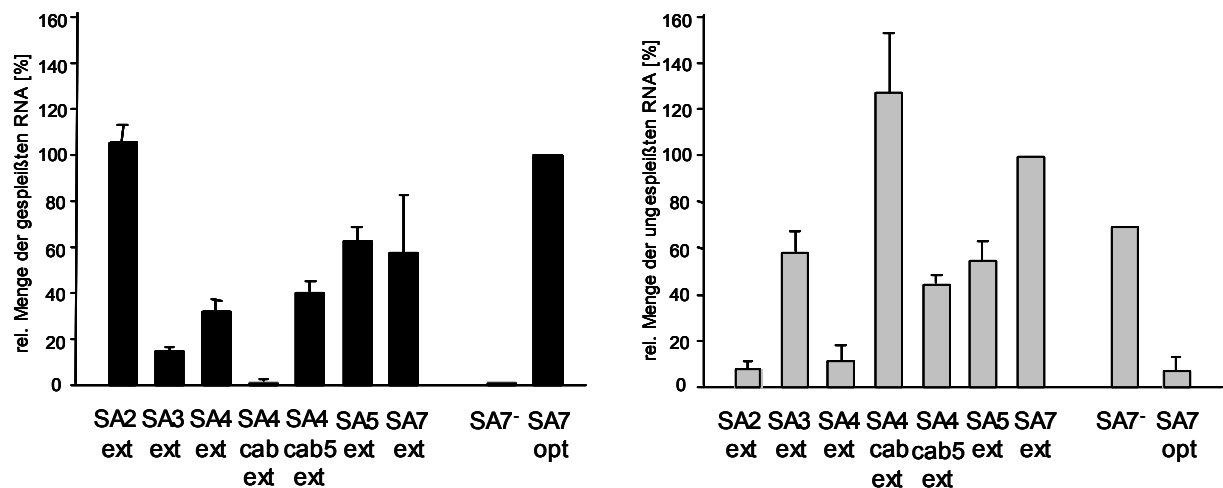


SA2ext SA2
 ACGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAG
SA3ext SA3
 AGACTCTGCTATAAGAAAGCCTTA **ESSv (22)** TAGGACACATAGTTAGCCCTAGGTGTGAAATCAAGCAGGACATAACAAG
SA4ext SA4 **ESSp (156)** AGAATGGGTGTCGACATAGCAGAATAGCGTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCT **ESS2 (9, 330)**
SA4cab5ext SA4b SA5
 AGCATCTCCTATGGCAG
SA4cab5ext SA4b SA5
 AGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA
SA5ext SA5
 AGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA
SA7ext SA7 **ESE (9, 331, 340)** **ESS3 (9, 331, 340)**
 AGCCACCTCCCAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATA GAAGAAGAAGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATT
 CGATTAGTGAAC
SA7- AAACCCACCTCCCAATCCCGAG
SA7opt ACGCCACCTCCCAATCCCGAGGAT

B



C



der bekannten ESS (orange)- und ESE-Elemente (grün) bzw. bis vor die nächste 5'-Spleißstelle (grau). Bei SA4cab war, wegen der räumlichen Nähe zu SA5, nur eine Verlängerung um 16 Nukleotide möglich. Daher wurde ein zusätzliches Konstrukt kloniert, das eine Verlängerung einschließlich des SA5 und der SA5 3'-Sequenz enthielt (SA4cab5ext).

Die Analyse der poly(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA zeigte im Northern Blot (Abb. 30B), dass alle Konstrukte in Anwesenheit ihrer authentischen 3'-Sequenzen, wenn auch in unterschiedlichem Maße, spleißaktiv waren. Eine Ausnahme stellte das SA4cabext-Konstrukt dar, das auch mit der 16 Nukleotide langen 3'-Sequenz spleißinaktiv blieb. Die Akzeptoren 4cab waren demnach für ihre Spleißfunktion auf die Sequenzen 3'-wärts des SA5 angewiesen und bilden so mit dem SA5 eine funktionelle Regulationseinheit. Die Wechselwirkungen zwischen SA4c,a,b und SA5 waren bereits Gegenstand anderer Untersuchungen (23, 353). Eine normierte Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (Abb. 30C, links) zeigte für die Spleißakzeptoren 3 und 4 die geringste Spleißeffizienz (15 % bzw. 32 %). Die Konstrukte mit SA5 und SA7 wurden ca. 2 bis 4-mal so effizient genutzt (63 % und 57 %) während der SA2 (106 %) in Anwesenheit seiner 3'-Sequenz eine dem SA7opt (100 %) vergleichbare Spleißaktivität zeigte. Auch hier verhielt sich die Menge der ungespleißten RNA (Abb. 30C, rechts) in Anwesenheit von Rev in den meisten Fällen in etwa umgekehrt proportional zur Spleißeffizienz. Die relativ große Menge ungespleißter RNA mit SA7ext und die relativ geringe Menge z. B. mit SA4 ext könnten ein Hinweis darauf sein, dass neben der Spleißeffizienz des Akzeptors auch andere sequenzspezifische Faktoren, wie RNA-stabilisierende oder -destabilisierende Elemente zur Modulation der RNA-Mengen beitragen.

Ein Vergleich der gespleißten RNA-Menge der Spleißakzeptor-Mutanten, in An- und Abwesenheit ihrer 3'-Sequenzen, mit SA7⁻ und SA7opt zeigte, dass in allen 3'-Sequenzen *cis*-wirkende Sequenzelemente vorhanden sein mussten (Abb. 31). Da sich die Menge der ungespleißten RNA in etwa umgekehrt proportional zur Menge der gespleißten RNA verhielt, dürfte es sich dabei hauptsächlich um spleißregulierende Elemente handeln. Die 3'-Sequenzen von SA3 und SA4 enthielten demnach ESS-Elemente, die in der Zwischenzeit als Bindestellen für hnRNP A/B bzw. hnRNP H charakterisiert werden konnten (9, 22, 156). Die 3'-Sequenzen der Akzeptoren 2, 4cab5 und 7 enthielten dagegen ESE-Elemente, die für ein effizientes Spleißen dieser Akzeptoren essenziell waren. Während in der 3'-Sequenz des SA7 bereits ein zweigeteiltes Element aus ESE und ESS beschrieben wurde (331, 341), war dies für die 3'-Sequenzen des SA2 und des SA5 nicht der Fall. Die 3'-Sequenz des SA2, konnte die Spleißeffizienz soweit verbessern, dass Rev mit dem

Spleißvorgang nicht mehr konkurrieren konnte. Diese 3'-Sequenz entspricht dem nicht kodierenden HIV-1 Exon 2, von dem in anderem Zusammenhang bereits eine positive Wirkung auf die RNA-Stabilität beschrieben wurde (195). Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) wurde in weiteren Experimenten untersucht (siehe 3.2.3.).

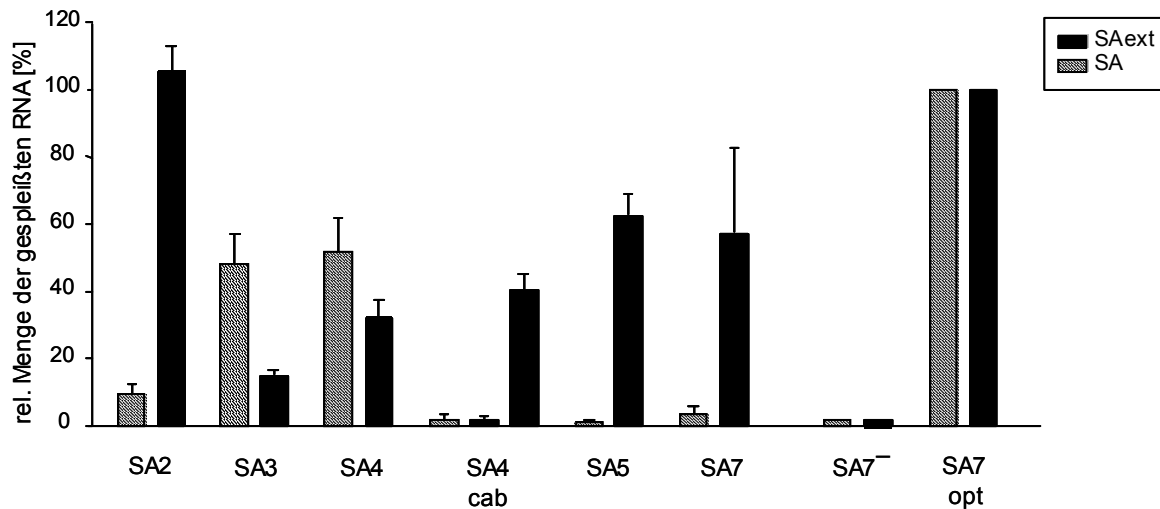


Abb. 31: Die Spleißeffizienz und die Rev-Reaktivität der HIV-1 Spleißakzeptoren wurden durch ihre 3'-wärts liegenden Exonsequenzen beeinflusst

Dargestellt sind die relativen, *hgh*-normierten Mengen der gespleißten RNA der HIV-1 Spleißakzeptoren mit (SAext, aus Abb.30C, links) und ohne authentische 3'-Sequenzen (aus Abb. 29A, links) im Vergleich zu den SA7⁻- und SA7opt-Konstrukten. Die Mengenunterschiede in An- oder Abwesenheit der 3'-Sequenz ließ vermuten, dass SA3 und 4 über ESS (exon splicing silencer)-Elemente und die restlichen SAs über ESE (exon splicing enhancer)-Elemente in der 3'-Sequenz reguliert werden.

3.2.3 Untersuchung der Spleißakzeptor-Effizienz am Beispiel des HIV-1 SA5

3.2.3.1 Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) enthält einen bidirektionales ESE

Das Spleißereignis am HIV-1 SA5 wurde erst durch die 3'-wärts angrenzende Exon 5-Sequenz ermöglicht (Abb. 31). Das Exon 5 enthält mehrere GAR (R=Purin)-Sequenzwiederholungen. Ein vergleichbares GAR-Motiv konnte bereits als Bindestelle für den Spleißfaktor ASF/SF2 identifiziert werden (91, 206, 392) und findet sich auch im ESE-Element 3'-wärts des SA7. Um zu untersuchen, ob diese GAR-Sequenzen auch der Grund für die spleißfördernde Wirkung der 3'-Sequenz auf den SA5 waren, wurden vier GAR-Sequenzen durch Punktmutationen zu CAR verändert (SA5ext GAR⁻, Abb. 32A). Da das Exon 5 gleichzeitig die 5'-Sequenz von SD4 ist, konnte bereits bei der Untersuchung des Spleißdonors gezeigt werden, dass die analoge Mutation der GAR-Sequenzwiederholungen eine Auswirkung auf die spleißdonor-vermittelte Stabilisierung der RNA hatte (Abb. 15). Dieser Effekt hing jedoch nicht ausschließlich von den GAR-Sequenzen ab. In weiterführenden Experimenten stellte sich heraus, dass die Sequenz von der *SacI*- bis zur *HindIII*-Schnittstelle ebenfalls zu der Stabilisierung beitragen konnte (48). Da das *SacI/HindIII*-Fragment in der SA5ext-Sequenz ebenfalls enthalten war, wurde überprüft, ob es in diesem Kontext auch einen Einfluß auf den SA5 ausüben kann. Dementsprechend wurde im Vergleich zu SA5ext ein Konstrukt kloniert, das die GAR-Sequenzen ohne das *SacI/HindIII*-Fragment enthielt (SA5 Δ S/H, Abb. 32A).

Der Vergleich der poly(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA dieser Konstrukte im Northern Blot (Abb. 32B) zeigte von den beiden SA5-Konstrukten mit unterschiedlich langer 3'-Sequenz vergleichbare Mengen gespleißten Transkripts (SA5 Δ S/H, Spur 2, 96 % und SA5ext, Spur 3, 100 %). In Anwesenheit von Rev war allerdings ein geringer Unterschied im Verhältnis der gespleißten zur ungespleißten RNA sichtbar: Bei konstanter Menge der ungespleißten RNA (37 und 35 %) war von dem kürzeren Konstrukt (SA5 Δ S/H, Spur 7) etwas weniger gespleißte RNA (42 %) nachweisbar als von dem Konstrukt mit längerer Exon 5-Sequenz (SA5ext, Spur 8, 66 %). Das *SacI/HindIII*-Fragment schien also einen, wenn auch sehr geringen Einfluss auf die Rev-Reaktivität des SA5-Konstrukts auszuüben. Die Punktmutationen in den GAR-Sequenzwiederholungen der Exon 5-Sequenz führten dagegen zu einem Verlust der Spleißaktivität (SA5extGAR⁻, Spur 4 und 9), vergleichbar mit einer vollständigen Deletion der Exon 5-Sequenz (SA5, Spur 1 und 6). Die eingeführten Mutationen waren also in der Lage den positiven Effekt der authentischen 3'-Sequenz auf das Spleißereignis zu inhibieren.

A

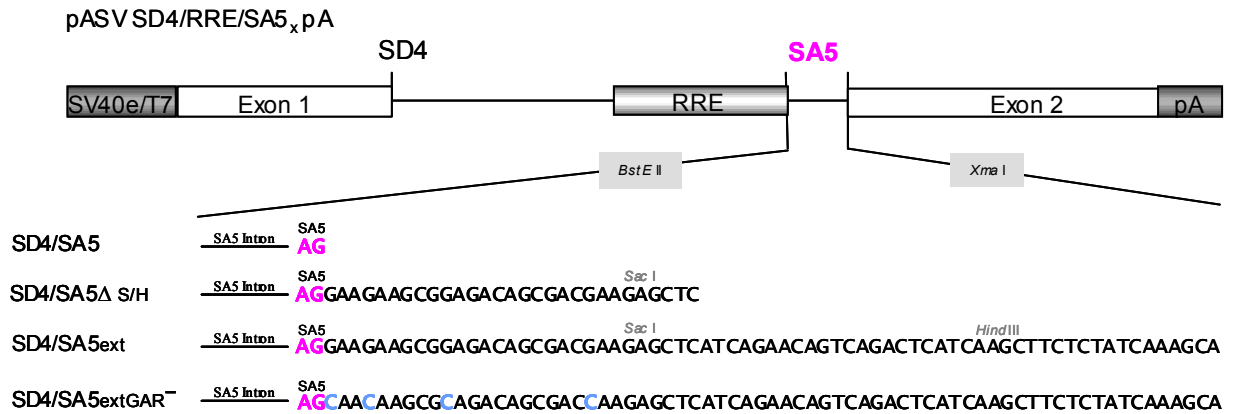
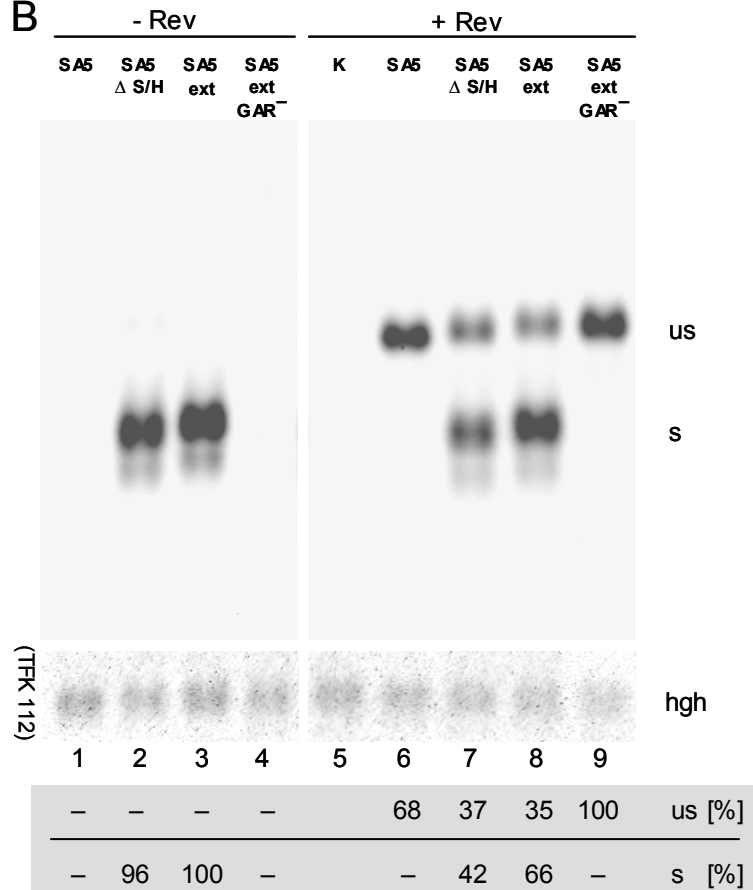


Abb. 32: Die 3'-Sequenz des HIV-1 SA5 (Exon 5) enthält einen bidirektionalen Spleiß-Enhancer

A: Schemazeichnung der Spleißkassetten-Konstrukte. Im oberen Teil der Abbildung ist das Spleißkassetten-Konstrukt pASV SD4/RRE/SA5 pA dargestellt (vgl. Abb. 15). SD4 bezeichnet den HIV-1 Spleißdonor 4, SA5_x steht stellvertretend für die über *BstE*II/*Xma*I inserierten SA5-Sequenzen, die im unteren Teil der Abbildung angegeben sind. Sie enthalten den Akzeptor SA5 (rot), seine Intronsequenz und keine (SA5) bzw. verschieden lange (SA5 Δ S/H, SA5ext) 3'-Sequenzen. Die Punktmutationen in SA5 GAR⁻ sind blau hervorgehoben.

B: Northern Blot der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA. 3 x 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mittels FuGeneTM6 transient mit je 13,5 μ g der Spleißkassetten-Konstrukte, 13,5 μ g SVcrev Δ H/X bzw. pSP73 und 9 μ g pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 98 μ g poly(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblotet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zum *env* 3'-Ende (LTRcenvA⁺) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind über den Spuren vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1,6: pASV SD4/RRE/SA5 pA; Spur 2,7: pASV SD4/RRE/SA5 Δ S/H pA; Spur 3,8: pASV SD4/RRE/SA5ext pA; Spur 4,9: pASV SD4/RRE/SA5ext GAR⁻ pA; Spur 5: Negativkontrolle (SVcrev Δ H/X, pSP73, pXGH5). Die relativen Mengen (%) der gespleißten und ungespleißten RNA wurden durch Detektion des Northern Blots im Lumi-Imager F1 (Roche) und Quantifizierung auf das hgh-Signal mit der LumiAnalystTM 3.1 Software (Roche) erhalten. Die Maximalwerte in beiden RNA-Populationen wurden gleich 100 % gesetzt.

B

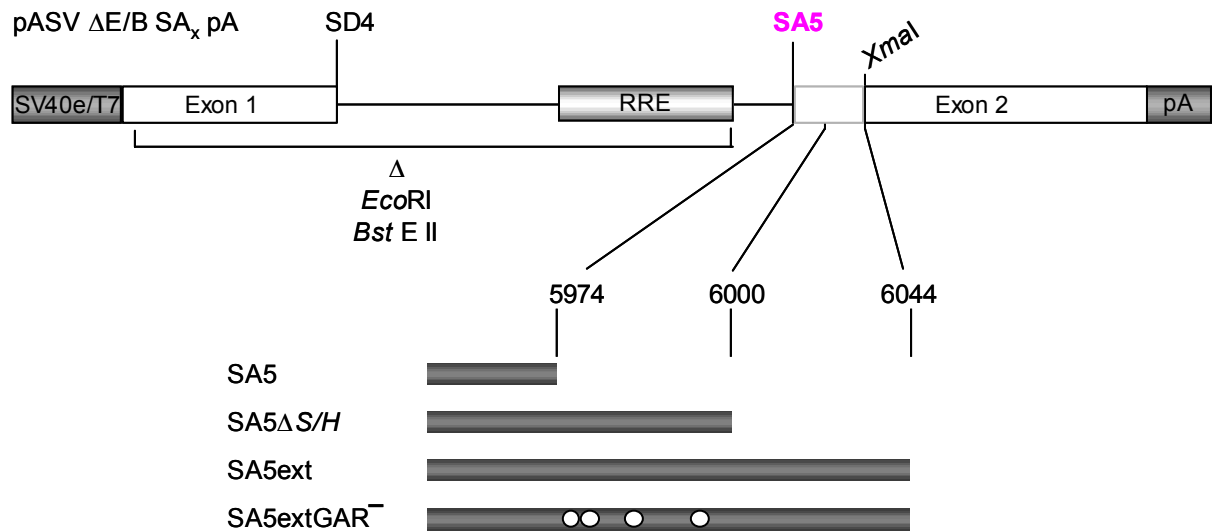


3.2.3.2 Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) bindet *in vitro* ASF/SF2

Aufgrund der Sequenzhomologie zu beschriebenen ASF/SF2-Bindestellen waren die im Exon 5 enthaltenen GAR-Sequenzwiederholungen zu CAR mutiert worden. Diese GAR⁻-Mutation führte zu einer schlechteren Nutzung der flankierenden Spleißstellen SD4 und SA5. Um eine spezifische Bindung des SR-Proteins ASF/SF2 an die Exon 5-Sequenz nachweisen zu können, wurde ein EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) mit rekombinantem ASF/SF2 durchgeführt.

Dafür wurden Konstrukte kloniert (pA SV ΔE/B SA5x, Abb. 33A), die die authentische SA5-Intronsequenz (vgl. Abb. 28A) und 3'-wärts des SA5 unterschiedlich lange Exon 5-Sequenzen (SA5ΔS/H und SA5ext) bzw. die Exon 5-Sequenz mit Punktmutationen in den GAR-Sequenzwiederholungen (SA5extGAR⁻) enthielten. [³²P]-markierte *in vitro* Transkripte dieser Konstrukte wurden mit 0 bis 0,3 μg rekombinantem ASF/SF2 inkubiert. Da SR-Proteine aufgrund der durch die RS-Domänen vermittelten Protein-Protein Interaktion unter den nativen Bedingungen des EMSA stark aggregieren, wurde für diesen Versuch ein rekombinantes ASF/SF2-Protein mit deletierter RS-Domäne aufgereinigt. Das Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Prof. J. Kjems (Universität Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden unter nativen Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei sich das Laufverhalten der radioaktiv markierten RNA in Abhängigkeit von der Menge des gebundenen Proteins verzögerte (Abb. 33B, links). Das Konstrukt ohne die Exon 5-Sequenz 3'-wärts des SA5 zeigte dabei keine Bindung des ASF/SF2-Proteins. Mit 0,3 μg ASF/SF2-Protein war lediglich eine unspezifische Aggregation von Proteinen und RNA in der Probenauftragstasche zu beobachten. In Anwesenheit von Exon 5-Sequenzen 3'-wärts des SA5 war in allen Fällen ein verzögertes Laufverhalten der RNA nachweisbar: Während das Konstrukt mit der kürzeren 3'-Sequenz (SA5ΔS/H) mehrere distinkte, Banden aufwies, war mit der vollständigen Exon 5-Sequenz (SA5ext) nur ein distinktes Shiftereignis identifizierbar. Auch die Mutante mit Punktmutationen in den GAR-Sequenzwiederholungen (SA5extGAR⁻) zeigte unerwarteterweise einen durch ASF/SF2-Zugabe ausgelösten Shift. Dieser schien jedoch mit dem für SA5ext beobachteten Shift nicht identisch zu sein. Die Verzögerung des Laufverhaltens war schwächer ausgeprägt und die Bande lief im Gel höher als die Bande bei SA5ext. Erschwert wurde die Auswertung dieses Experiments durch die bei allen Transkripten sichtbaren zusätzlichen Banden in Abwesenheit von ASF/SF2. Diese Banden, die bei SA5ΔS/H und SA5extGAR⁻ am stärksten ausgeprägt waren, schienen spezifische Sekundärstrukturen der jeweiligen Transkripte unter den nativen Bedingungen des Gelshifts darzustellen. Bei einer Durchführung des Experiments unter nicht nativen, für den Shift suboptimalen Bedingungen (4°C), waren diese zusätzlichen Sekundärstrukturen nicht mehr nachweisbar (Abb. 33B, rechts).

A



B

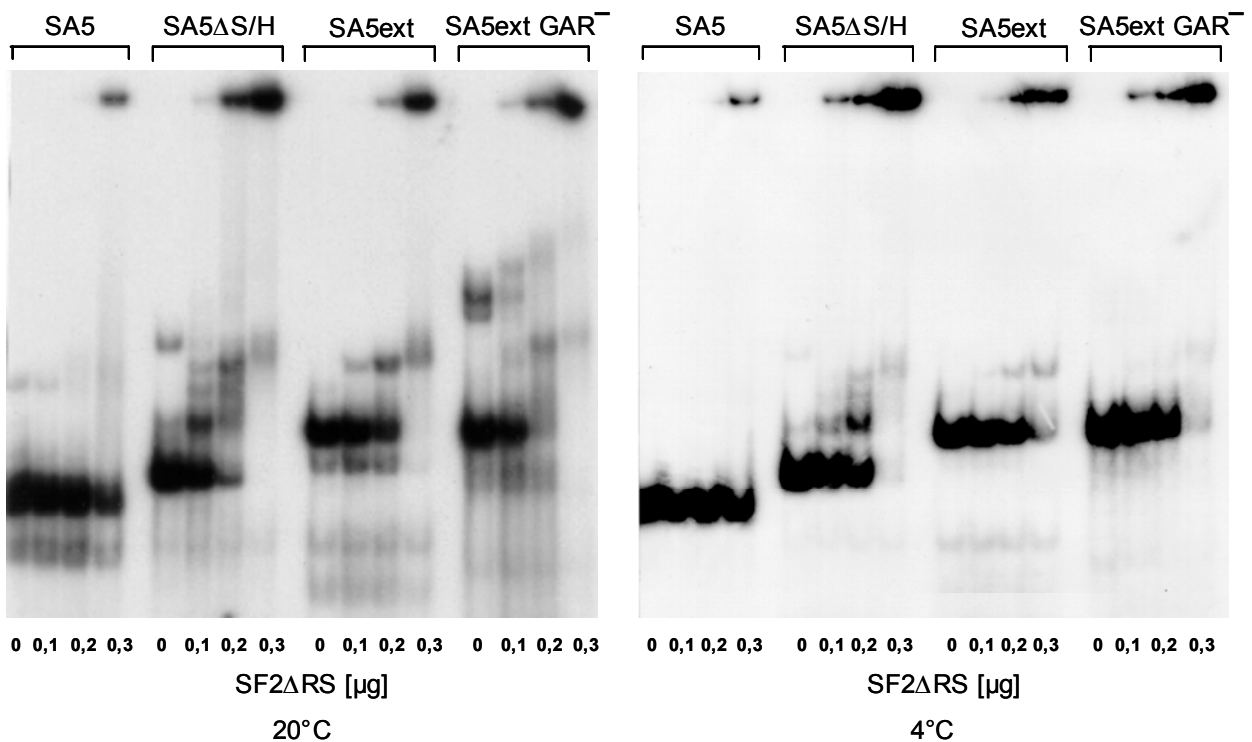


Abb. 33: Die 3'-Sequenz des SA5 (Exon 5) bindet *in vitro* den Spleißfaktor ASF/SF2

A: Schematische Darstellung der SA5-Konstrukte für den Protein/RNA-Shift. In den SA5 Spleißkassetten-Konstrukten (pASV SD4/RRE/SA_x pA) wurde die Sequenz des ersten Exons und der Intronsequenz bis vor die authentische SA5-Sequenz deletiert (von *EcoRI* bis *BstEII*). Die so entstandenen Konstrukte (pASV Δ E/B SA_x pA) enthielten die SA5-Intronsequenz (vgl. Abb.28) und die unterschiedlich langen 3'-Sequenzen. Die Punktmutationen in den GAR-Sequenzen sind als weiße Punkte dargestellt. Die Nukleotidnummerierung bezieht sich auf die Nummerierung der Ausgangssequenz pNLA1.

B: Elektrophorese-Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) der SA5-Transkripte. Die Plasmide wurden *XmaI* linearisiert und *in vitro* transkribiert. Die [³²P]-markierten T7-Transkripte wurden geleluiert, renaturiert und unter nativen Bedingungen (20°C, links) bzw. bei 4°C (rechts) mit rekombinantem ASF/SF2-Protein (0-0,3 μ g) inkubiert. Da SR-Proteine durch die Interaktion ihrer RS-Domänen *in vitro* zur Aggregatbildung neigen, wurde ein SF2-Konstrukt mit deletierter RS-Domäne verwendet, das freundlicherweise von Prof. Dr. J. Kjems (Universität Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Die RNA/Protein-Komplexe wurden auf einem nativen PAA-Gel aufgetrennt und zeigten abhängig von der ASF/SF2-Bindung ein unterschiedliches Laufverhalten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Exon 5-Sequenz mehrere ASF/SF2-Bindestellen enthielt, die durch die GAR⁻-Mutationen nicht vollständig inaktiviert worden waren.

3.2.3.3 ASF/SF2 und SRp40 tragen zur Funktion des Exon 5-ESE *in vitro* bei

Die Annahme, dass die Exon 5-Sequenz über mehrere ASF/SF2-Bindestellen verfügen könnte, die auch in der GAR⁻-Mutante teilweise erhalten blieben, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit durch eine Analyse der Exon 5-Sequenz mit einem Suchalgorithmus für SR-Protein Bindestellen unterstützt (<http://exon.cshl.edu/ESE/>). Dieser Algorithmus basiert auf funktionellen *in vitro* Spleißexperimenten, in denen nach dem SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)-Verfahren aus einer Oligonukleotidbank zufällige Sequenzen in ein ESE-abhängiges Spleißsubstrat kloniert wurden (53, 54). Potentielle SR-Bindemotive können über die Spleißfähigkeit der Transkripte in mehreren Zyklen selektiert, angereichert und letztendlich sequenziert werden. Von den im Exon 5 vorhergesagten vier ASF/SF2-Bindestellen blieben in der GAR⁻-Mutante zwei erhalten (Abb. 34A). Gleichzeitig führten die Punktmutationen auch zu einer Veränderung im Muster der ebenfalls vorhergesagten Bindestellen für die SR-Proteine SRp55 und SRp40.

Um herauszufinden, inwieweit eines oder mehrere dieser SR-Proteine auch funktionell für die spleißfördernde Wirkung der Exon 5-Sequenz auf den SA5 eine Rolle spielten, wurden *in vitro* Spleiß-Assays durchgeführt. Da sich die Spleißeffizienz der von HIV-1 abgeleiteten Sequenzen *in vitro* als sehr ineffizient herausgestellt hatte, wurde das 5'-Ende der Exon 5-Sequenz bis zur *SacI*-Restriktionsschnittstelle in ein ESE-abhängiges Spleißreporterkonstrukt kloniert, das sich vom *Drosophila melanogaster dsx*-Gen ableitet (131). Dieses Experiment wurde von Dr. M. Caputi (Johns Hopkins University, Baltimore) durchgeführt. Bei der Spleißreaktion in HeLa-Kernextrakt konnte der 5'-Teil der Exon 5-Sequenz (Abb. 34B, Spur 3) ein bereits charakterisiertes ESE aus dem ASLV (avian sarcoma leukosis virus, Spur 2) (131) funktionell ersetzen (vgl. mit Spur 1, Negativkontrolle ohne ESE). Bei Inkubation des Konstrukts mit dem Exon 5-ESE in SR-Protein defizientem S100-Extrakt konnte die Spleißfunktion bei Komplementation mit einer Gesamt-SR-Protein-Präparation (Spur 5), sowie bei Zugabe von rekombinantem ASF/SF2 (Spur 7) oder SRp40 (Spur 8) wieder hergestellt werden. Die Zugabe der rekombinanten SR-Proteine SC35, SRp55 oder SRp70 (Spur 6, 9 und 10) führte nicht zum Spleißen des Transkripts. Dieses Experiment bestätigte, dass die SA5-Sequenz mindestens ein ESE-Element enthält, für dessen Funktion die Bindung von ASF/SF2 und/oder SRp40 nötig sind.

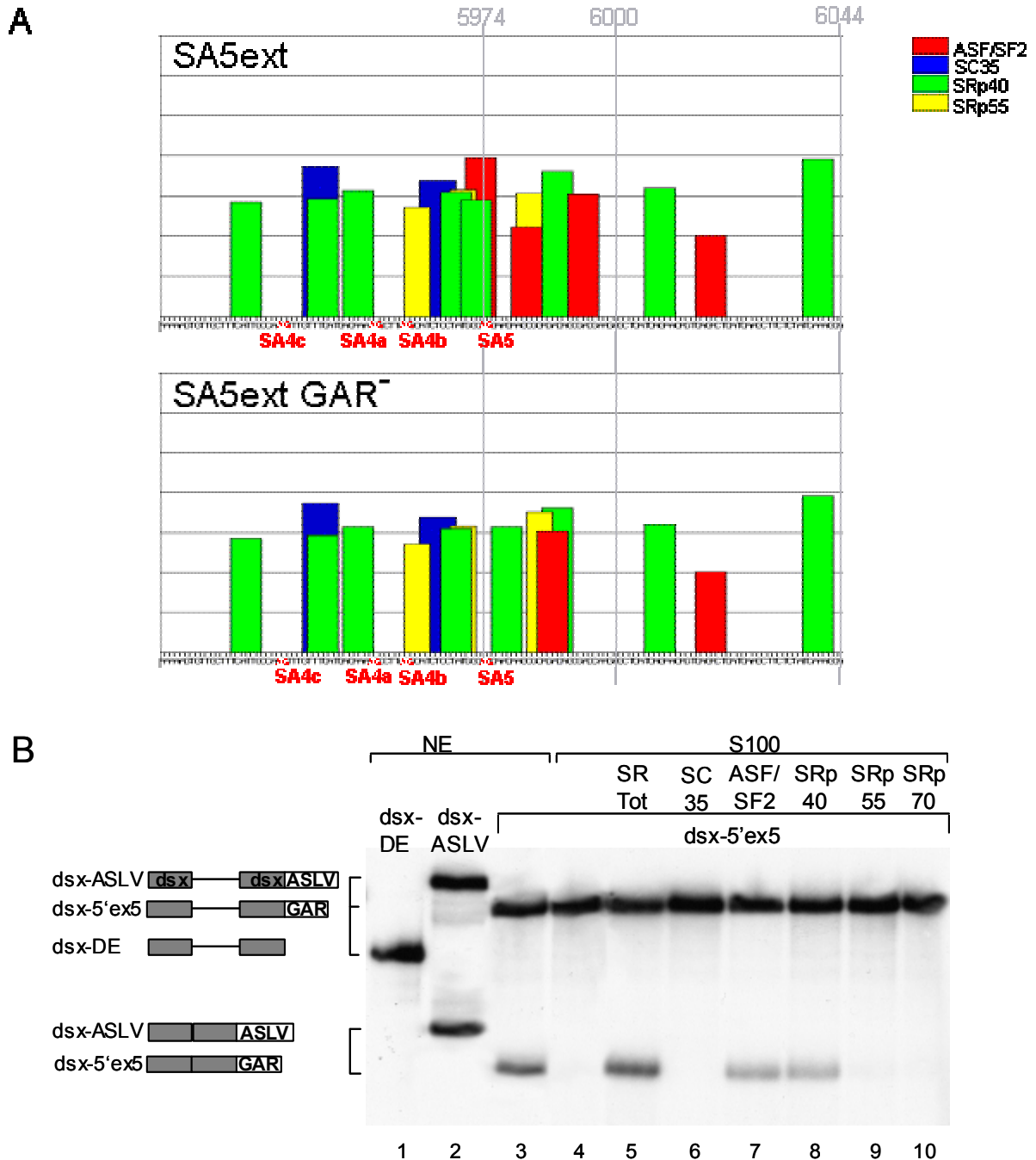


Abb. 34: ASF/SF2 und SRp40 tragen zur Funktion des Exon 5-ESE *in vitro* bei

A: Vorhergesagte SR-Protein-Bindestellen im Exon 5 und nach Mutation der GAR-Sequenzwiederholungen. Die in die Spleißkassetten-Konstrukte eingebrachten SA5-Sequenzen wurden mit einem Suchalgorithmus analysiert, der mögliche Bindestellen für die SR-Proteine ASF/SF2 (rot), SC35 (blau), SRp40 (grün) und SRp55 (gelb) vorhersagt (ESEfinder web interface 2.0, <http://exon.cshl.edu/ESE/>; 2003; (53)). Die Nukleotidangaben (grau) markieren das Ende der SA5-Sequenz für die in Abb. 33 verwendeten Konstrukte.

B: *In vitro* Spleiß-Assay zum Nachweis der Funktion von SR-Proteinen bei der durch die Exon 5-Sequenz vermittelten Spleißförderung. Dieses Experiment wurde von Dr. M. Caputi (Johns Hopkins University, Baltimore) durchgeführt. Die Exon 5-Sequenz wurde 3'-wärts eines *dsx*-Introns (*doublesex* aus *Drosophila melanogaster*) inseriert und konnte ein bereits publiziertes ESE-Element des ASLV (Avian sarcoma leukosis virus, Spur 2) im *in vitro* Spleiß-Assay in HeLa-Kernextrakt (NE) funktionell ersetzen. Weiterhin wurden Ansätze in S100 Extrakt (ohne SR-Proteine, Spur 4) mit einer Gesamt-SR-Proteinpräparation (SR Tot, Spur 5) oder einzelnen SR-Proteinen (Spur 6-10: SC35, ASF/SF2, SRp40, SRp55, SRp70) komplementiert. *dsx*-DE: *dsx*-Konstrukt ohne ESE, *dsx*-ASLV: *dsx*-Konstrukt mit einem ESE aus ASLV (Avian sarcoma leukosis virus) 3'-wärts des Spleißakzeptors; *dsx*-5'ex5: *dsx*-Konstrukt mit der 5'-Sequenz (bis nt 6000) des HIV-1 Exons 5.

3.2.3.4 Der geringe Polypyrimidingehalt ist der entscheidende, aber nicht der einzige Grund für die geringe Spleißeffizienz des SA5 in Abwesenheit des ESE

Ohne die spleißfördernde Wirkung des ESE in der Exon 5-Sequenz war am SA5 kein Spleißereignis nachweisbar (Abb. 28B). Im Gegensatz dazu zeigten Spleißakzeptoren wie SA3 und SA4 nur in Abwesenheit ihrer 3'-Sequenz ein effizientes Spleißereignis. Die Intronsequenzen schaffen dabei die Voraussetzung für diese unterschiedliche Regulation. Da bei der Erkennung eines Spleißakzeptors sowohl die Verzweigungssequenz, der Polypyrimidintrakt und auch das AG-Dinukleotid eine Rolle spielen, ist es bisher schwierig anhand eines Sequenzvergleichs eine zuverlässige Vorhersage der Spleißeffizienz zu treffen. Zum Verständnis der Regulation des alternativen Spleißens in HIV-1 Transkripten stellte sich daher die Frage, was die Intronsequenzen dieser Akzeptoren voneinander unterscheidet. Daher wurde am Beispiel des HIV-SA5 der Beitrag der verschiedenen Elemente in der Intronsequenz des Spleißakzeptors zur Spleißeffizienz untersucht.

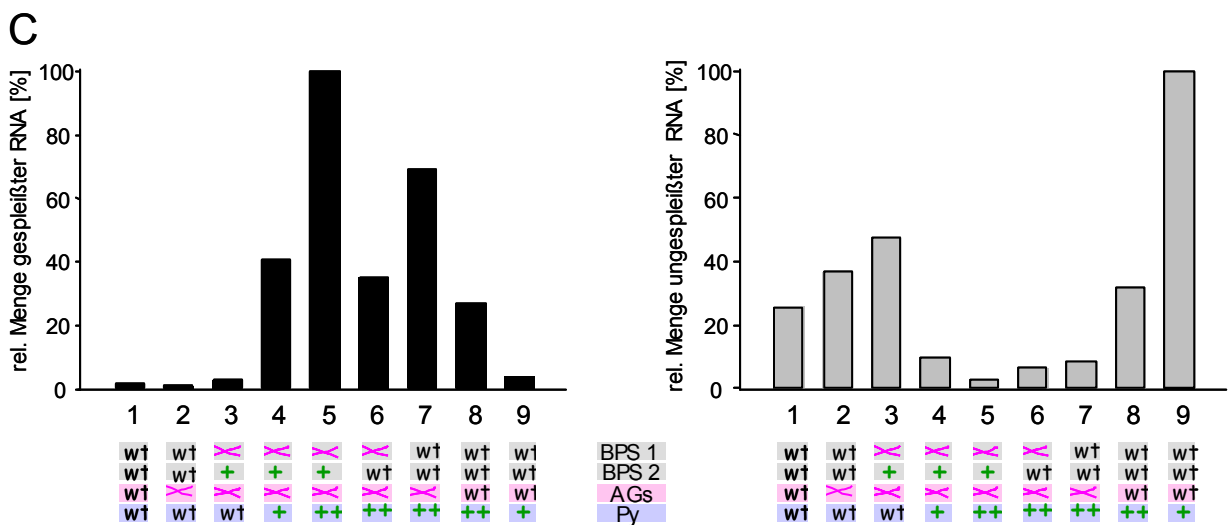
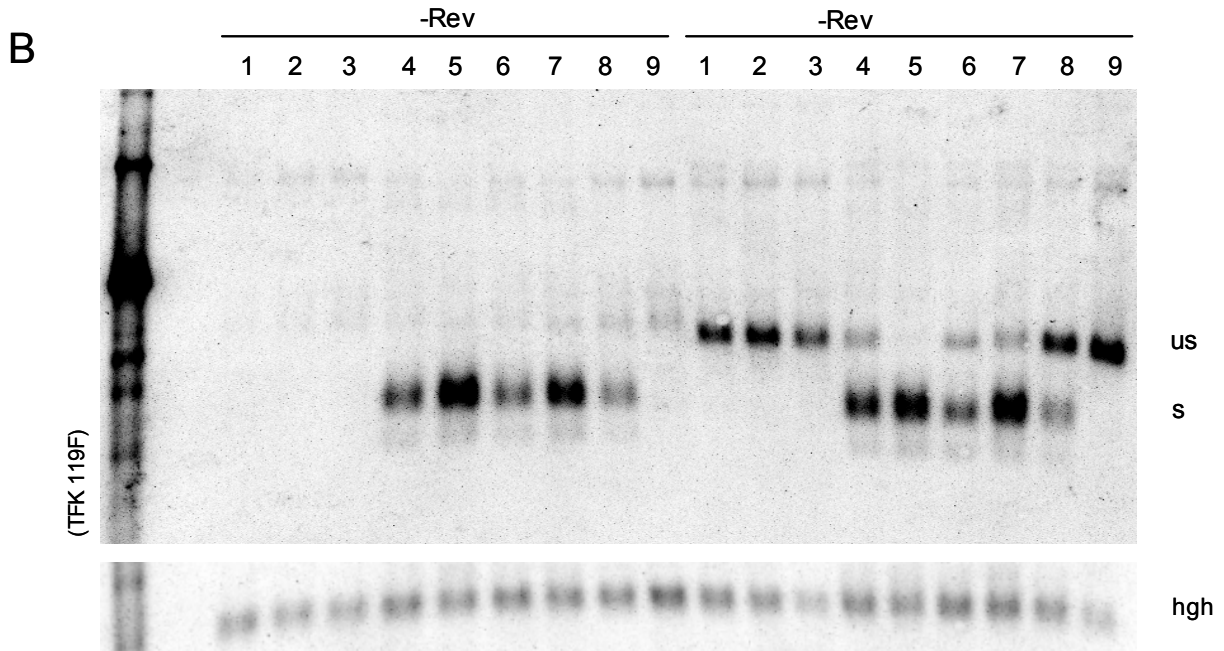
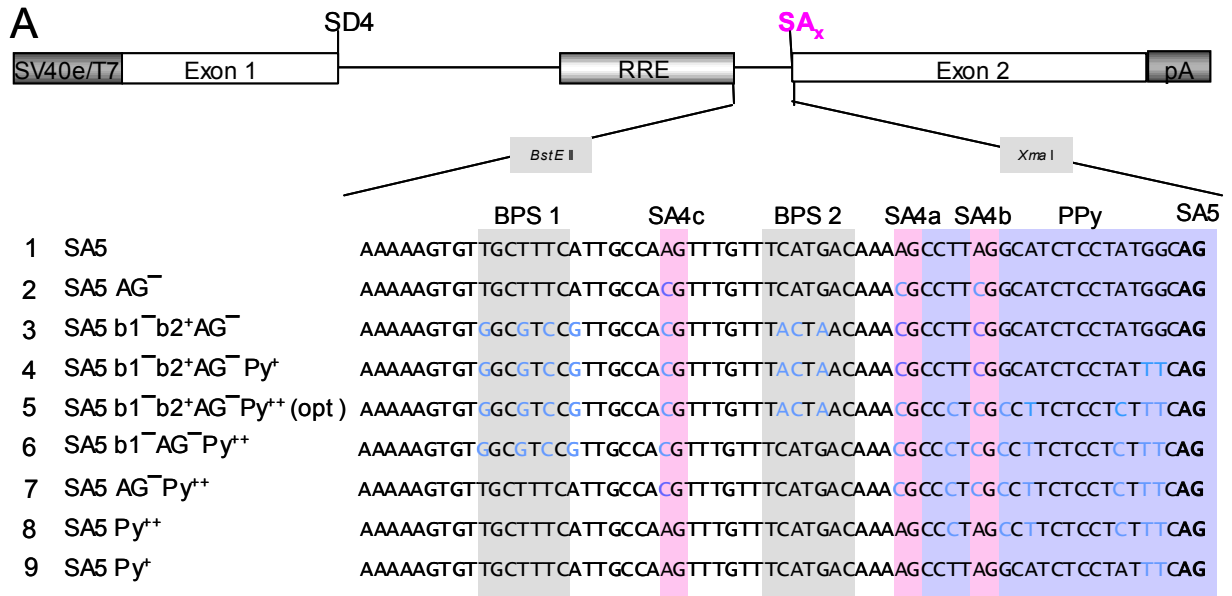
Die Intronsequenz des SA5 zeigt mehrere Charakteristika, die möglicherweise für die geringe Spleißeffizienz relevant sein könnten (Abb. 35A, SA5): So befinden sich im Bereich des Polypyrimidintrakts von SA5 die AG-Dinukleotide der Spleißakzeptoren 4cab, die durch gegenseitige Behinderung der proteinbindenden Sequenzen die Spleißeffizienz

Abb. 35: Der schwache Polypyrimidin-Trakt ist der entscheidende aber nicht der einzige Grund für die geringe Spleißeffizienz des HIV-1 SA5

A: Nukleotidsequenzen der Konstrukte mit Mutationen in der 5'-Sequenz des SA5. Angegeben ist die in die Spleißkassetten (pASV SD4/RRE/SA_x pA) zwischen *Bst*EII und *Xma*I inserierte Sequenz. Markiert sind die beiden publizierten Verzweigungssequenzen (grau, BPS 1: (88), BPS 2: (353), die AG-Dinukleotide der SAs 4c, a, b (rosa), der Pyrimidintrakt (lila), der SA5 (fett) und die eingefügten Mutationen (blau). Im Vergleich zum SA5 gibt die Nomenklatur der Konstrukte an, ob die eingefügten Mutationen die zusätzlichen AG-Sequenzen 4cab bzw. die BPS1 inaktivieren (AG⁻, b1⁻) oder die BPS 2 in ihrer Komplementarität zu U2 snRNA verbessern (b2⁺) bzw. den Pyrimidingehalt des Pyrimidintrakts erhöhen (Py⁺, Py⁺⁺).

B: Northern Blot der p(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA. HeLa-T4⁺ Zellen wurden mittels FuGeneTM6 transient mit je 9 µg der Spleißkassetten-Konstrukte, 9 µg SVcrevΔH/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 90 µg p(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde nacheinander mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden komplementär zum *env* 3'-Ende (LTRcenvpA⁻) und zu *hgh* (p73hGH) hybridisiert und über einen anti-Digoxigenin-AP Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Rev sowie abgekürzte Plasmidbezeichnungen sind rechts neben dem Blot vermerkt. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1,10: pASV SD4/RRE/SA5 pA; Spur 2,11: pASV SD4/RRE/SA5 AG⁻ pA; Spur 3, 12: pASV SD4/RRE/SA5 b1⁻b2⁺AG⁻ pA; Spur 4, 13: pASV SD4/RRE/SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺ pA; Spur 5, 14: pASV SD4/RRE/SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺⁺ pA; Spur 6, 15: pASV SD4/RRE/SA5 b1⁻AG⁻Py⁺⁺ pA; Spur 7, 16: pASV SD4/RRE/SA5 AG⁻Py⁺⁺ pA; Spur 8, 17: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺⁺ pA; Spur 9, 18: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺ pA.

C: Relative Mengen gespleißter und ungespleißter RNA. Dargestellt sind die relativen, hgh-normierten Mengen der gespleißten RNA (ohne Rev) und der ungespleißten RNA (mit Rev) aus B nach Auswertung mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software (Roche). Der Maximalwert in beiden RNA-Populationen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Nummerierung der Spuren entspricht der des Northern Blots. Darunter sind die Mutationen schematisch dargestellt: Pluszeichen bedeuten eine Verbesserung, Kreuze eine Inaktivierung bezogen auf die Ausgangssequenz des SA5 (wt).



abschwächen könnten. Weiter sind in der Literatur zwei funktionelle Verzweigungsnukleotide (Position -51 und -29 zur Intron/Exon-Grenze) beschrieben worden (88, 353), die sich gegenseitig behindern könnten. Beide BPS sind nicht vollständig komplementär zur U2 snRNA und das Verzweigungsnukleotid der 5'-gelegenen BPS ist ein Uridin statt des bevorzugten Adenins. Das erste Nukleotid 5'-wärts des SA5 AG-Dinukleotids ist der Konsensussequenz entsprechend ein C, dem jedoch zwei Purine vorausgehen. Der Gesamt-Pyrimidingehalt zwischen den Verzweigungssequenzen und dem AG-Dinukleotid liegt bei 55 bzw. 52 %. Dieser Pyrimidingehalt war deutlich geringer als der von experimentell als effizient eingestuften Spleißakzeptoren. So weisen zum Vergleich der SA7opt einen Pyrimidingehalt von 77 % und der β -Globin SA2 von 85 % auf.

Anhand dieser Merkmale wurde versucht, die Spleißeffizienz des SA5 schrittweise zu erhöhen (Abb. 35A): Zuerst wurden die AG-Sequenzen der Spleißakzeptoren 4cab mutiert (SA5 AG⁻). In den folgenden Konstrukten wurde zusätzlich die BPS optimiert, indem die dem SA5-AG am nächsten gelegene BPS in ihrer Komplementarität zur U2 snRNA verbessert wurde, während die zweite BPS in ihrer Komplementarität weiter herabgesetzt wurde (SA5 b1⁻b2⁺AG⁻). Im nächsten Schritt wurde der Pyrimidingehalt des Polypyrimidintrakts in zwei Stufen von 52 % (SA5) auf 60 % (SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺) bzw. 72 % (SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺⁺) erhöht. Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten wurde die Gesamt-poly(A)⁺ RNA im Northern Blot analysiert (Abb. 35B) und die relativen, hgh-normierten Mengen der gespleißten RNA ohne Rev und der ungespleißten RNA in Anwesenheit von Rev berechnet. Der Maximalwert wurde in beiden RNA-Populationen gleich 100 % gesetzt (Abb. 35C). Weder die Mutation der zusätzlichen AGs (Abb. 35C, Nr. 2, 1 %) noch die Optimierung der Verzweigungssequenz (Nr. 3, 3 %) führten dabei zum Nachweis von gespleißten Transkripten. Erst bei zusätzlicher Erhöhung des Pyrimidingehalts zeigte sich eine deutliche Spleißaktivität (Nr. 4, 41 % und Nr. 5, 100 %). Der Pyrimidingehalt war demnach für die Effizienz der Spleißreaktion von entscheidender Bedeutung. In dem spleißaktiven Konstrukt mit 80 % Pyrimidingehalt (SA5opt, Nr. 5) war nun auch ein Effekt der AG- und BPS-Mutationen nachweisbar. Bei der schrittweisen Entfernung dieser Punktmutationen zugunsten der authentischen SA5-Sequenz (Nr. 6-9) führte die Rückmutation der optimierten BPS zu einer Reduktion der gespleißten Transkripte um 65 % (vgl. Nr. 5 mit 6, 100 % und 35 %). Wurden dagegen beide Verzweigungssequenzen zur authentischen SA5-Sequenz mutiert, fiel die Abnahme der Spleißeffizienz deutlich geringer aus (vgl. Nr. 5 mit 7, 100 bzw. 69 %). Demnach schienen zwei BPS mit niedriger Komplementarität zur U2 snRNA zwar ineffizienter als eine optimierte BPS aber effizienter als nur eine suboptimale BPS zu sein. Die Wiedereinführung der AG-Dinukleotide führte zu einer weiteren Abnahme der gespleißten RNA (Nr. 8, 27 %)

wobei jedoch offen bleibt, ob dies auf einem inhibierenden Effekt der AG-Dinukleotide oder auf einer mit der Mutation verbundenen Abnahme des Pyrimidingehalts beruht.

Nach einer Kotransfektion der HeLa-T4⁺ Zellen mit SVcrev (Abb. 35B, rechts) zeigte sich für die gespleißten Transkripte ein vergleichbares Bild. Das Konstrukt mit der höchsten Spleißeffizienz (SA5 b1⁻b2⁺AG⁻Py⁺⁺, Spur 5) zeigte fast kein Signal für die ungespleißte RNA. Konstrukte mit mittlerer Spleißeffizienz (Spur 4, 6, 7 und 8) konnten durch Rev reguliert werden und wiesen sowohl gespleißte als auch ungespleißter mRNA auf, während die Konstrukte die kein Spleißereignis erlaubten (Spur 1, 2, 3 und 9) erhöhte Mengen ungespleißte mRNA zeigten. Das Prinzip der Gegenläufigkeit der Mengen gespleißter und ungespleißter RNA wurde dadurch bestätigt.

3.2.3.5 Die Anzahl und die Position der Pyrimidine im Polypyrimidintrakt können die Spleißeffizienz entscheidend beeinflussen

Der Pyrimidingehalt 5'-wärts des Spleißakzeptors hatte sich als wichtige Voraussetzung für die Spleißaktivität des SA5 herausgestellt. Daraus ergab sich die Frage, wie hoch der Pyrimidingehalt sein muss, um ein effizientes Spleißereignis zu ermöglichen. Tragen dabei alle eingefügten Pyrimidine additiv zum Spleißen bei oder muss ein bestimmter Schwellenwert erreicht werden? Zusätzlich sollte geprüft werden, ob die Pyrimidine in unmittelbarer Nähe des AG-Dinukleotids einen besonderen Stellenwert für die Erkennung der Spleißstelle haben könnten.

Die in die SA5-Sequenz eingefügten Punktmutationen zur Erhöhung des Pyrimidingehalts von 52 % (SA5) auf 72 % (SA5 Py⁺⁺) führten zu einer 14-fachen Steigerung der Spleißeffizienz (Abb. 35C links, vgl. Nr. 1 mit Nr. 8, 2 % und 27 %). Ausgehend von dieser Sequenz SA5 Py⁺⁺ wurde nun jeweils die am weitesten 5'-wärts liegende Punktmutation zum Purin der authentischen SA5-Sequenz revertiert (Abb. 36A). Dies entsprach einer schrittweisen Senkung des Pyrimidingehalts von 72 % auf 68 % (SA5 Py⁺⁽⁶⁸⁾), 64 % (SA5 Py⁺⁽⁶⁴⁾) und 60 % (SA5 Py⁺). Um den Positionseffekt der Nukleotide in unmittelbarer Nähe zum AG zu untersuchen, wurde zum Vergleich mit SA5 Py⁺ ein weiteres Konstrukt mit ebenfalls 60 % Pyrimidingehalt kloniert, in dem das erste Purin 5'-wärts des AGs auf eine weiter 5'-wärts liegende Position verschoben wurde (SA5 Py^{+(shift10)}). Dadurch entstand, bei gleichem Pyrimidingehalt, eine durchgehende Sequenz von zehn Pyrimidinen direkt 5'-wärts des AG, gegenüber nur vieren im Konstrukt SA5 Py⁺ (siehe Abb. 36A, B).

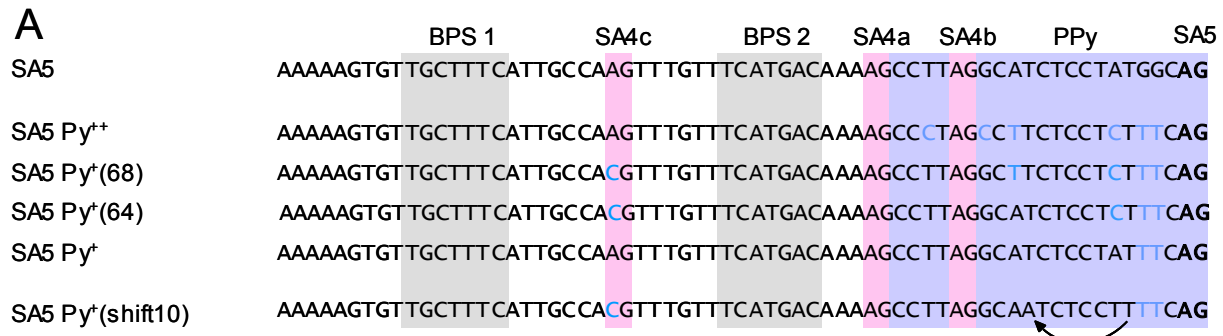


Abb. 36: Die Anzahl und die Position der Pyrimidine des Polypyrimidintrakts können die Spleißeffizienz entscheidend beeinflussen

A: Sequenz der SA5-Mutanten mit unterschiedlichem Pyrimidingehalt des Polypyrimidintrakts. Die von SA5 abgeleiteten Akzeptorsequenzen wurden zwischen *Bsf*II und *Xma*I in das Spleißkassetten-Konstrukt inseriert. Für eine genaue Beschreibung siehe Abb. 35A. Die Zahlen in Klammern geben den Pyrimidingehalt zwischen BPS und AG-Dinukleotid an. Der Pfeil zeigt eine Verschiebung des ersten Purins (A) vor dem AG-Dinukleotid auf eine weiter 5'-wärts gelegene Position. Dabei entsteht eine 10 nt lange Pyrimidinsequenz.

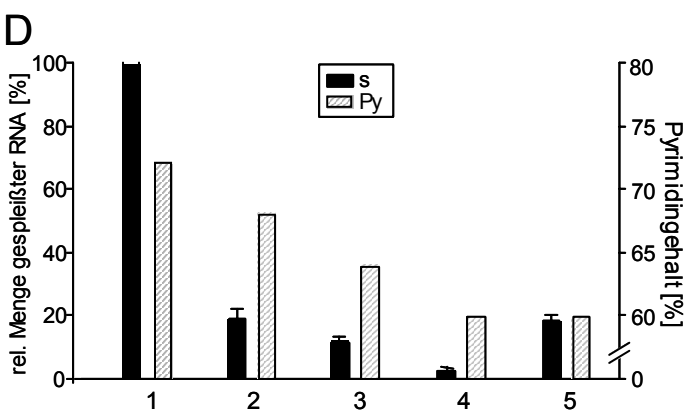
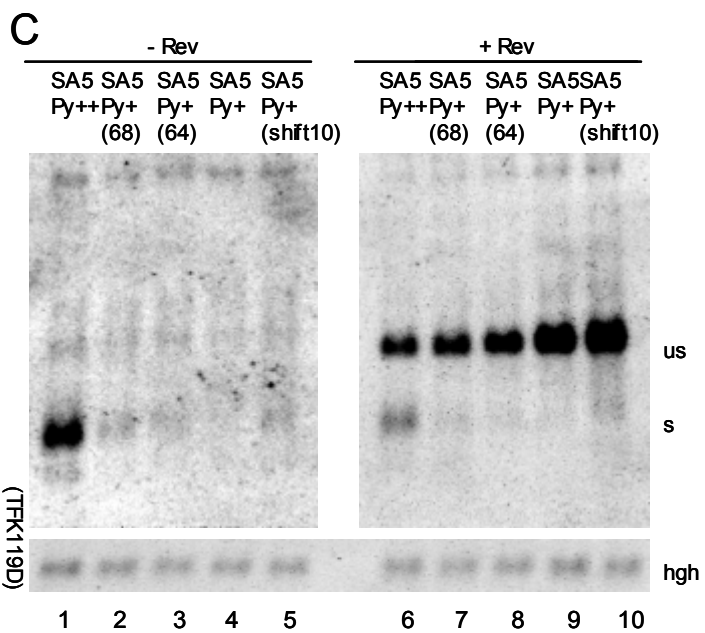
B: Der Pyrimidingehalt der SA5-Mutanten. Die Tabelle gibt den absoluten (Py gesamt) und den relativen (%) Pyrimidingehalt zwischen der Verzweigungsstelle (BPS2) und dem SA5 AG-Dinukleotid, sowie die Anzahl der Pyrimidine direkt 5'-wärts des AG (Py direkt vor AG) an.

C: Northern Blot der poly(A)⁺ aufgereinigten Gesamt-RNA. 3 x 10⁶ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mittels FuGene™6 transient mit je 9 µg der Spleißkassetten-Konstrukte, 9 µg SVcre Δ H/X bzw. pSP73 und 9 µg pXGH5 transfiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA präpariert und davon 90 µg poly(A)⁺ aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Hybridisierung erfolgte wie in Abb. 35B. us: ungespleißte RNA, s: gespleißtes Transkript, hgh: human growth hormone. Spur 1,6: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺⁺ pA; Spur 2,7: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺⁽⁶⁸⁾ pA; Spur 3,8: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺⁽⁶⁴⁾ pA; Spur 4,9: pASV SD4/RRE/SA5 Py⁺ pA; Spur 5, 10: pASV SD4/RRE/SA5 Py^{+(shift10)} pA.

D: Relative gespleißte RNA-Mengen der SA5-Konstrukte mit unterschiedlichem Pyrimidingehalt. Gesamt-RNA-Präparationen aus vier unabhängigen Transfektionen wurden im Northern Blot analysiert (repräsentativ ist Abb. C), mit dem Lumi-Imager F1 (Roche) detektiert und mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern für die relativen, hgh-normierten Mengen gespleißter RNA (schwarz). Der Maximalwert wurde gleich 100 % gesetzt. s: gespleißte RNA [%], Py: Pyrimidingehalt zwischen der BPS und dem SA5 (gestreifte Balken).

B

	Anzahl der Pyrimidine zwischen BPS 2 und AG		
	Py direkt vor AG	Py gesamt	%
Py ⁺⁺	14	18	72
Py ⁺⁽⁶⁸⁾	13	17	68
Py ⁺⁽⁶⁴⁾	11	16	64
Py ⁺	4	15	60
Py ^{+(shift10)}	10	15	60
SA5	1	13	52



Die RNA-Analyse dieser Konstrukte (Abb. 36C) zeigte nach Normierung auf das *hgh*-Signal (Abb. 36D) bereits bei der Reduktion von 72 % auf 68 % Pyrimidingehalt eine deutliche Abnahme der Spleißeffizienz um den Faktor 5 (Abb. 36D, vgl. Nr. 1 (SA5 py⁺⁺, 100 %) mit Nr. 2 (SA5 py⁺⁽⁶⁸⁾, 19 %)). Mit der weiteren Abnahme des Pyrimidingehalts war eine Abnahme der Restspleißaktivität um einen Faktor 1,6 (vgl. Nr. 2 mit 3 (SA5 py⁺⁽⁶⁴⁾, 12 %)) bzw. um den Faktor 4 nachzuweisen (vgl. Nr. 3 mit 4 (SA5 py⁺, 3 %)). Die Verschiebung eines Pyrimidins unter Erhaltung des Pyrimidingehalts von 60 % führte zu einer Erhöhung der Spleißeffizienz auf das Niveau der Konstrukte mit 64-68 % Pyrimidingehalt (Nr. 5 [SA5 py^{+(shift 10)}]: 18 %).

Für die SA5-Sequenz konnte also erst ab einem Schwellenwert von über 70 % Pyrimidingehalt zwischen der Verzweigungsstelle und dem AG-Dinukleotid ein effizientes Spleißereignis nachgewiesen werden, das jedoch immer noch eine Regulation durch Rev ermöglichte (Spur 6). Die Pyrimidine zwischen BPS und AG trugen dabei nicht rein additiv zum Spleißeffizienz bei, sondern in Abhängigkeit von ihrer Position zum AG. Aufgrund der räumlichen Nähe der einzelnen Elemente in der Spleißakzeptorsequenz lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Mutationen im Polypyrimidintrakt z.B. auch die Bindung anderer Spleißfaktoren wie z. B. SF3a und 3b, deren Bindung 5'- und 3'-wärts der BPS für die Anlagerung der U2 snRNA wichtig ist, verändern könnten. Um dies auszuschließen, könnten die am SA5 gewonnenen Ergebnisse im Kontext anderer Spleißstellen überprüft werden.

4 Diskussion

Das virale Protein Rev ermöglicht den Export unvollständig gespleißter, *gag/pol*- und *env*-kodierender Transkripte in das Cytoplasma. Widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur (58, 96, 223, 263) führten zu der Frage, ob die HIV-1 Spleißstellen für die Funktion von Rev nötig sind oder ob Rev den Export der intronhaltigen mRNA direkt und unabhängig von den Spleißstellen vermittelt. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Mutationsanalyse der im *env*-Gen lokalisierten Spleißstellen SD4 und SA7 durchgeführt. Zusätzlich wurde in vergleichenden Experimenten die Effizienz des SD4 sowie der HIV NL4-3 Spleißakzeptoren ermittelt. Die Protein- und RNA-Expression der Vektoren mit mutierten Spleißstellen wurde in transienten Transfektionsexperimenten in HeLa-T4⁺ Zellen und in *in vitro* Spleißexperimenten untersucht. Die Spleißstellenmutationen zeigten dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die Rev-Funktion, auf die Stabilität und auf das Spleißen der mRNAs.

4.1 Die Bedeutung der Spleißstellen für die Rev-Funktion

4.1.1 Die Rev-Funktion ist unabhängig von einem funktionellen Spleißdonor

Die Ergebnisse einiger vorausgegangener Studien sprachen für eine Beteiligung der 5'-Spleißstelle SD4 an der Rev-abhängigen Genexpression (58, 223, 351). So konnten Lu und Mitarbeiter in Transfektionsexperimenten mit subgenomischen HIV-1 Konstrukten zeigen, dass eine Mutation in Position +5 des SD4 zum Verlust der Rev-abhängigen *env*-Expression führt. Erst durch Kotransfektion mit einer U1 snRNA mit kompensatorischer Mutation konnte die *env*-Expression wieder hergestellt werden (223). Im Gegensatz dazu war in einer Untersuchung von Nasioulas und Mitarbeitern selbst nach Deletion des Spleißdonors eine Rev-abhängige *env*-Expression nachweisbar. Daraus wurde geschlossen, dass Rev den Export intronhaltiger Transkripte direkt und ohne Beteiligung der Spleißstellen vermittelt (263). Die Unterschiede in den Versuchsansätzen und in den gesetzten Mutationen erschwerten jedoch die Vergleichbarkeit und damit auch die Interpretation dieser Experimente.

In dieser Arbeit wurden zunächst subgenomische HIV-1 Konstrukte unter der Kontrolle eines SV40early-Promotors untersucht. Mutationen im SD4 führten dabei, mit abnehmender Komplementarität der SD4-Sequenz zur U1 snRNA, zu einer Abnahme der *env*-Expression. Von einem Konstrukt ohne funktionellen Spleißdonor (3U bzw. SD4⁻) konnte kein Env-Glykoprotein mehr nachgewiesen werden, während eine Kotransfektion mit kompensatorischen U1 snRNA-Expressionsvektoren die Glykoprotein-Expression wieder herstellen konnte (Abb. 10C, (164)). Diese Ergebnisse standen in Übereinstimmung mit denen von Lu und Mitarbeitern (223) und schienen auf eine Rev-Funktion in Abhängigkeit

von der U1 snRNA-Bindung an die Spleißdonorsequenz hinzuweisen. Eine Analyse der mRNA zeigte jedoch, dass das Hybridisierungspotential zwischen dem SD4 und der U1 snRNA die *env*-Expression bereits auf der RNA-Ebene beeinflusste. Dabei war parallel zur Abnahme der gespleißten mRNA auch eine Abnahme der ungespleißten, *env*-kodierenden mRNA zu beobachten. Ohne funktionellen Spleißdonor (3U bzw. SD4⁻) war im Northern Blot keine RNA nachweisbar. Dieser Verlust der RNA war unabhängig von der Anwesenheit von Rev oder der RRE-Sequenz (Abb. 12B, C) und ließ sich bis auf die Ebene der nukleären prä-mRNA zurückverfolgen (Abb. 18B). Die RNA-Duplexbildung zwischen SD4 und der U1 snRNA war demnach in diesen subgenomischen HIV-1 Konstrukte eine Voraussetzung für die Stabilität der prä-mRNA (siehe auch 4.2.2). Abhängig von den Mutationen im Spleißdonor standen unterschiedliche RNA-Mengen für den Rev-vermittelten Export zur Verfügung. Die verwendeten Konstrukte waren daher nicht geeignet, um den Einfluss der Spleißdonormutation auf die Rev-Funktion zu bestimmen.

Die gegensätzlichen Aussagen zum Einfluss von Spleißdonormutationen auf die Rev-Funktion in der Literatur könnten auf Unterschieden in der Transkriptstabilität beruhen. In den Arbeiten von Lu und Mitarbeitern (223) und Nasiolas und Mitarbeitern (263) wurden jedoch vergleichbare, subgenomische HIV-1 Sequenzen verwendet. Als Erklärungsmöglichkeit blieb die Verwendung verschiedener Promotoren. Während Lu und Mitarbeiter einen SV40late-Promotor verwendet hatten, standen die Konstrukte von Nasiolas und Mitarbeitern unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors. In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig auch der Einfluss des Promotors auf die Rev-abhängige *env*-Expression untersucht. Die Analyse der bereits im SV40-Konstrukt verwendeten Spleißdonormutationen (3U, -1G3U, -1G8U) unter der Kontrolle des HIV-1-Promotors zeigte zunächst ebenfalls eine Abhängigkeit der *Env*-Expression von der Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1 snRNA. Im Unterschied zu den SV40-Konstrukten ermöglichte jedoch die Transaktivierung des HIV-1 Promotors durch das virale Regulationsprotein Tat die *env*-Expression auch von einem Konstrukt ohne funktionellen Spleißdonor (Abb. 19C). In weiteren Versuchen wurde eine TAR-Sequenz 3'-wärts des SV40early-Promotors inseriert. Auch hier ermöglichte Tat, neben einer ca. 3-fachen Transaktivierung des Promotors, die *env*-Expression ohne funktionellen Spleißdonor (Abb. 20). Dieses Ergebnis zeigte, dass sich die unterschiedliche Bewertung des Spleißdonors in der Literatur auf die Transaktivierung des Promotors durch Tat zurückführen ließ. Die Anwesenheit eines funktionellen Spleißdonors stellte also keine notwendige Voraussetzung für den Rev-vermittelten Export ungespleißter RNA in das Cytoplasma dar.

4.1.2 Die Rev-Funktion konkurriert mit der Effizienz des Spleißakzeptors

Um die Rolle des Spleißakzeptors in der Rev-abhängigen *env*-Expression zu untersuchen, wurde eine Mutationsanalyse der Sequenz des SA7 durchgeführt. Punktmutationen im Polypyrimidintrakt und im AG-Dinukleotid führten zu einem Verlust der Spleißfunktion (SA7⁻). Von diesen Konstrukten war jedoch, im Unterschied zu den Konstrukten ohne Spleißdonor, in Anwesenheit von Rev ungespleißte *env*-mRNA nachweisbar (Abb. 23B). Ein funktioneller Spleißakzeptor war daher keine Voraussetzung für den Export intronhaltiger Transkripte durch Rev. Dieses Ergebnis stand in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Nasiolulas und Mitarbeitern, die nach einer Deletion des SA7 eine Rev-abhängige Expression ungespleißter RNA beschrieben (263).

Obwohl ein funktioneller Spleißakzeptor keine Voraussetzung für die Rev-Funktion ist, lässt sich die Rev/RRE-Interaktion nicht auf beliebige Intronsequenzen übertragen. Chang und Sharp konnten zeigen, dass die Insertion eines RRE in das Intron eines heterologen β -Globin-Konstrukts nicht zu einem Rev-abhängigen Export ungespleißter β -Globin RNA führte. Erst nach Austausch der β -Globin Spleißstellen gegen die HIV-1 Spleißstellen SD4 und SA7 wurde ein Rev-abhängiger Export beobachtet (58). Sie folgerten daraus, dass ineffiziente Spleißstellen eine Voraussetzung für die Rev-abhängige Expression intronhaltiger RNAs sein könnten. Beim SD4 handelt es sich jedoch um einen effizienten Spleißdonor (164, 267). Die SA7-Sequenz weist dagegen Merkmale auf, die auf eine geringe Spleißeffizienz hindeuten (siehe auch 4.3.4). Beim Austausch des β -Globin SA1 in einem heterologen β -Globin-Konstrukt zeigte der SA7 nur ca. 40 % Spleißeffizienz (267). Demnach könnte die Rev-Funktion von der Ineffizienz des Spleißakzeptors abhängen. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit an subgenomischen HIV-1 Sequenzen bestätigt werden. Sowohl ein Austausch des SA7 gegen den als effizient eingestuft β -Globin SA2, als auch eine Verbesserung der Spleißeffizienz des SA7 selber, führten zum Funktionsverlust von Rev, d.h. zum Verlust der ungespleißten RNA (Abb. 24B und 25B). Weitere, vergleichende Experimente mit den HIV NL4-3 Spleißakzeptoren in einem 1-Intron Spleißkassetten-Konstrukt zeigten, dass der Rev-vermittelte nukleäre Export in Konkurrenz zur Effizienz des Spleißakzeptors stand (Abb. 29A, 35C). Je mehr gespleißte RNA vorhanden war, desto weniger ungespleißte RNA war in Abhängigkeit von Rev nachweisbar. Dies stand im Gegensatz zu Mutationen im Spleißdonor, bei denen der Grad der Komplementarität zwischen SD4 und U1 snRNA sowohl mit der Menge der gespleißten als auch der ungespleißten mRNA korrelierte. In den untersuchten subgenomischen HIV-Transkripten erhöhte sich damit die Menge der Rev-abhängigen, intronhaltigen Transkripte mit zunehmender Komplementarität des Spleißdonors zur U1 snRNA, während sie sich mit zunehmender Effizienz des Spleißakzeptors verringerte (Abb. 37).

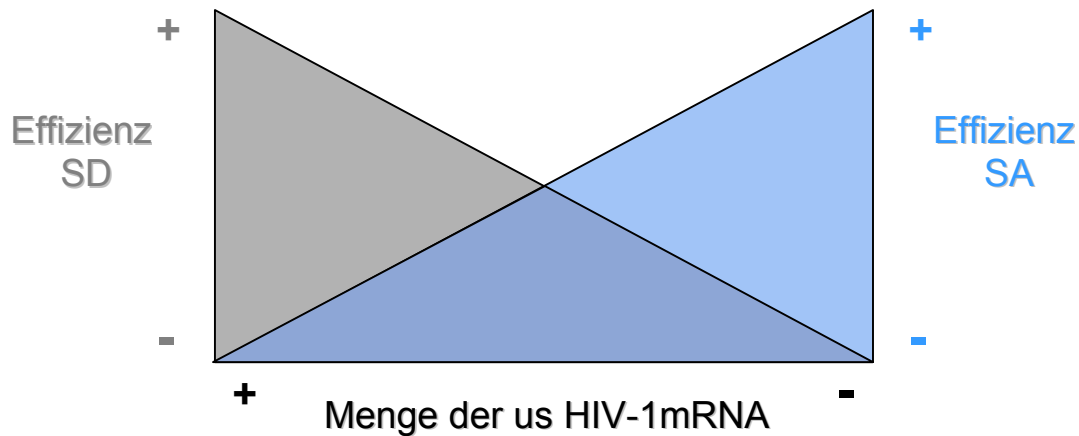


Abb. 37: Die Rev-Funktion konkurriert mit der Effizienz des Spleißakzeptors

Das Modell zeigt den Einfluss der HIV-1 Spleißstellen SD4 und SA7 auf die Menge der Rev-abhängigen, ungespleißten RNA in den untersuchten subgenomischen HIV-1 Konstrukten. Die Menge der durch Rev exportierbaren, ungespleißten mRNAs erhöht sich mit zunehmender Komplementarität des Spleißdonors zur U1 snRNA durch die damit verbundene RNA-Stabilisierung. Eine zunehmende Effizienz des Spleißakzeptors steht jedoch in Konkurrenz zur Rev-Funktion und verringert die Menge an ungespleißten Transkripten.

Die Konkurrenz zwischen dem Spleißereignis und der Rev-Funktion könnte direkt, durch eine aktive Inhibition der Spleißosomenassemblierung, oder indirekt durch den Rev-vermittelten RNA-Exportmechanismus erklärt werden. Beide Möglichkeiten setzen voraus, dass die Rev-Bindung an das RRE im gleichen Zeitintervall wie das Spleißen stattfindet. Während der molekulare Mechanismus des RNA-Exports durch Rev weitestgehend bekannt ist, gibt es für eine direkte Interaktion von Rev mit dem Spleißosom bisher nur *in vitro* Daten. In einem *in vitro* Spleißsystem mit heterologen β -Globin- und Adenovirustranskripten konnte, durch die Zugabe von Rev bzw. eines Oligopeptids mit der Sequenz der Rev RNA-Bindedomäne, eine Inhibition des U4/U6.U5tri-snRNP-Eintritts in das Spleißosom gezeigt werden (181, 182). In der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch diese Beobachtung für HIV-1 Spleißsubstrate nicht verifizieren. Eine Erklärung dafür könnte in der geringen Spleißeffizienz der HIV-1 Sequenzen liegen. Ein Spleißereignis war nur nach Zugabe von rekombinantem ASF/SF2 nachweisbar. Es wurde jedoch beschrieben, dass hohe ASF/SF2-Konzentrationen die Rev-Funktion *in vivo* inhibieren können (227).

4.2 Die Bedeutung der Spleißstellen für die RNA-Stabilität

4.2.1 Die Kernretention von Transkripten ohne Spleißakzeptor kann durch Rev aufgehoben werden

Für viele eukaryotische Gene ist das Spleißen eine Voraussetzung für die effiziente Genexpression. Entsprechend führt die Insertion eines Introns in den 5'-Bereich subgenomischer oder rekombinanter Expressionsvektoren oft zu einer Expressionssteigerung (134, 140, 202, 273). Die Effizienz der Genexpression scheint dabei mit der Effizienz des Spleißens einher zu gehen (185). Transkripte ohne Introns zeigen, gegenüber sequenzidentischen, intronhaltigen Transkripten, eine reduzierte RNA-Stabilität und einen ineffizienteren RNA-Export (33, 44, 226, 303). Eine Erklärung für diese Kopplung zwischen dem Spleißen und dem RNA-Transport ist die spleißabhängige Assemblierung von Proteinkomponenten des nukleocytoplasmatischen mRNA-Exports im Exon Junction Komplex (EJC) (208). Im Gegensatz dazu werden unvollständig gespleißte oder intronhaltige prä-mRNAs größtenteils im Kern zurückgehalten und degradiert (89, 142, 211). Dadurch wird die Translation fehlerhafter Proteine aufgrund von fehlerhaft prozessierten mRNAs vermieden. Die Kernretention intronhaltiger Transkripte ist eine Voraussetzung für die Rev-Abhängigkeit der HIV-1 Replikation. Rev umgeht in der späten Infektionsphase die Kernretention, indem es intronhaltige Transkripte auf einem spleißunabhängigen, für 5S und snRNAs spezifischen Transportweg in das Cytoplasma exportiert (235). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Mutationsanalyse des Spleißakzeptors standen in Übereinstimmung mit dem Modell der Kopplung zwischen Spleißen, mRNA-Stabilität und -Export: Transkripte ohne funktionellen Spleißakzeptor waren nur in Anwesenheit von Rev nachweisbar, während sie in Abwesenheit von Rev degradiert wurden (Abb. 38, [3]). In Transkripten mit funktionellem Spleißdonor standen das Spleißen und die Rev-Funktion in Konkurrenz zueinander (4.1.2). Ein weniger effizienter Spleißakzeptor, wie z. B. SA7, ermöglichte sowohl das Spleißen als auch den Rev-abhängigen Export intronhaltiger mRNAs. Die Verbesserung der Spleißeffizienz des Akzeptors führte zu erhöhten Mengen gespleißter mRNA und zu einer Abnahme der intronhaltigen mRNAs (Abb. 38, [2]).

4.2.2 Die Inaktivierung des Spleißdonors führte zur Degradation der prä-mRNA

Die Auswirkung von Mutationen im Spleißdonor waren, im Gegensatz zu den Spleißakzeptor-Mutationen, nicht mit dem Modell der Kernretention zu erklären. Mutationen in der SD4-Sequenz führten, mit abnehmender Komplementarität zur U1 snRNA, zu einer Abnahme der gespleißten und ungespleißten Transkripte (siehe auch 4.1.1). Die Anwesenheit von Rev reichte nicht aus, um Transkripte ohne funktionellen Spleißdonor zu

exprimieren, da diese bereits auf der Ebene der prä-mRNA degradiert wurden. Zwar konnte auch für andere bekannte RNA-Instabilitätselemente eine nukleäre RNA-Destabilisierung gezeigt werden (217, 399), die aber in keinem bisher beobachteten Fall zum vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit der prä-mRNA führte. Dies konnte, unter anderem in unserem Labor, am Beispiel der AU-reichen Sequenzen des nichtcodierenden Leaderexons 3 (195) und des *gag*-Instabilitätselements (INS) (316) beobachtet werden. Von den in der *gag*-, *pol*-, *vif*- und *env*-Sequenz lokalisierten HIV-1 Instabilitätselementen wird sogar angenommen, dass sie zur Rev-Abhängigkeit der viralen RNAs beitragen (128, 250, 263, 312, 316). Dies führte zu der Vermutung, dass es sich bei der U1 snRNA-abhängigen RNA-Stabilisierung bereits um ein kotranskriptionelles Ereignis handeln könnte, das der Rev-Funktion vorausgeht (Abb. 38, [1]). Dafür spricht ebenfalls, dass die Tat/TAR-Interaktion die Spleißdonor-vermittelte RNA-Stabilisierung ersetzen konnte. Die Transaktivierung des Promotors durch Tat führte zu einer Steigerung der Env-Expression von Konstrukten mit funktionellem Spleißdonor. Gleichzeitig konnte Rev-abhängig Env-Glykoprotein auch von Mutanten ohne funktionellen Spleißdonor nachgewiesen werden (Abb. 19, 20). Dies schien spezifisch auf der Wirkungsweise von Tat zu beruhen, da eine vergleichbare Steigerung der Gen-Expression durch Plasmid-Replikation in COS-7 Zellen keine Env-Expression der Mutante ohne Spleißdonor erlaubte (Abb. 22). Die Wirkung von Tat auf die Transkription, beruht auf einer Steigerung der Prozessivität der RNA-Polymerase II-Komplexe. Durch die Interaktion von Tat mit zellulären Faktoren wie p-TEFb und TFIIH kommt es zur Hyperphosphorylierung der CTD, die entscheidend für die Überwindung des „promotor proximal pausing“ und für die Überführung der RNAP II in einen aktiven Elongationskomplex ist (32). Zusätzlich wurde in einigen Arbeiten ein Einfluss von Tat auf die Transkriptionsinitiation (242) und auf das Capping beschrieben (63). Wenn die Tat/TAR-Interaktion die Rev-abhängige Expression der spleißdonorlosen Transkripte ermöglicht, wäre es denkbar, dass die Bindung der U1 snRNA nicht nur für das Spleißen, sondern auch für die Transkription oder das Capping von Bedeutung ist. Tatsächlich ergaben sich in *in vitro* Experimenten zahlreiche Hinweise auf eine Interaktion zwischen der RNA-Transkription und dem Spleißen. So konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Introns die Dichte transkriptionsaktiver RNAP II-Komplexe in Hefe und höheren Eukaryoten erhöhen kann (111). Die Rekrutierung von U snRNPs in die Nähe der RNA-Polymerase II fördert die Transkription und das Spleißen. Dabei wurde eine Assoziation zwischen U snRNPs und einem zellulären Kofaktor von Tat, Tat-SF1 beschrieben, der durch Interaktion mit p-TEFb den positiven Effekt auf die Transkription vermitteln könnte (99). Auch in Präparationen des Transkriptionsinitiationsfaktors TFIIH konnten stöchiometrische Mengen von U1 snRNA gefunden werden. Dieser Komplex war in der Transkriptionsinitiation und -elongation wirksamer als TFIIH alleine. Eine promotornahe 5'-Spleißstelle führte dabei zu erhöhter Transkriptionsinitiation (201). Für eine Rolle des

U1 snRNPs in der Koordination von Transkription und Spleißen spricht weiterhin, dass kleine Oligoribonukleotide, die eine 11 nt lange, eukaryotische Spleißdonorsequenz enthielten, die Ausbildung eines Transkriptionsinitiationskomplexes an einem CMV-Promotor stören konnten (370). Diese Befunde und die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen deuten darauf hin, dass eine fehlende U1 snRNA-Bindung für intrinsisch instabile Transkripte am Beginn eines bisher nicht charakterisierten RNA-Abbauwegs stehen könnte. Dieser Mechanismus könnte, neben dem RNA-Abbau durch vorzeitige Stop-Codons (Nonsense mediated decay, NMD) oder fehlende Stop-Codons (nonstop decay) (374), die Qualität und Translatierbarkeit von mRNAs sichern.

4.2.3 Spleißen und Stabilisierung sind trennbare Funktionen der U1 snRNA

Durch die Ausweitung der Mutationsanalyse auf die Position +1 des Spleißdonors konnte erstmalig gezeigt werden, dass es sich bei der Spleißfunktion und der Transkriptstabilisierung um zwei voneinander trennbare Funktionen der U1 snRNA handelte. Das GT-Dinukleotid ist in den meisten funktionellen Spleißstellen vorhanden und stellt dementsprechend ein Definitionskriterium für die sogenannten kanonischen Spleißstellen (U2-Introns) dar. Bei Mutationen im GT-Dinukleotid des Spleißdonors blieb in seltenen Fällen die Spleißfunktion erhalten (137), meist kommt es jedoch dadurch zu einem Verlust der Spleißfunktion bzw. zur Nutzung kryptischer Spleißdonoren (263). Dies könnte daran liegen, dass das GU auch zur Bindesequenz von Proteinen gehört, die zur Erkennung des Spleißdonors beitragen. So konnte z. B. für U1C in Abwesenheit der U1 snRNA *in vitro* eine spezifische Bindung an die ersten vier Nukleotide des Introns GUAU gezeigt werden (5428). Durch eine Mutation der Position +1 von G → C, in Kombination mit einer ausreichenden Komplementarität zur U1 snRNA in den Positionen -3 bis +8, wurde eine U1 snRNA-Bindestelle konstruiert, die trotz fehlender Spleißfunktion eine Stabilisierung der RNA erlaubte. In Anwesenheit von Rev war von diesem Konstrukt Env nachweisbar (Abb. 16) Weiterhin war es möglich, ein Transkript ohne funktionellen Spleißdonor, das normalerweise kotranskriptional degradiert wurde, durch eine solche U1 snRNA-Bindestelle am 5'-Ende des Transkripts zu stabilisieren (Abb. 17). Diese Transkripte verhielten sich also vergleichbar zu Transkripten ohne funktionellen Spleißakzeptor und konnten in Abhängigkeit von Rev nachgewiesen werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass U1 snRNA-Bindestellen auch im 5'-Bereich anderer viraler und zellulärer Transkripte als RNA stabilisierende Elemente dienen können. Im Fall von authentischen HIV-1 Transkripten würde dem Hauptspleißdonor SD1 eine vergleichbare Rolle zukommen wie dem SD4 in den untersuchten, subgenomischen Konstrukten. Untersuchungen zur Rev-Abhängigkeit der HIV-1 Gag-Expression in subgenomischen HIV-Konstrukten bestätigten diese Vermutung. Die Deletion des SD1 führte dabei zum Verlust

der Nachweisbarkeit der gag-prä-mRNA (128). An HIV-Minigenen, die die TAR-Region und den SD1 unter Kontrolle eines CMV-Promotors enthielten, konnte außerdem gezeigt werden, dass ein zunehmender Abstand des SD1 zum Promotor den RNA steady state level reduzierte (111). Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine Mutation des SD 1 auch die Nutzung der normalerweise inaktiven Polyadenylierungssequenz im 5'-LTR beeinflussen könnte (11).

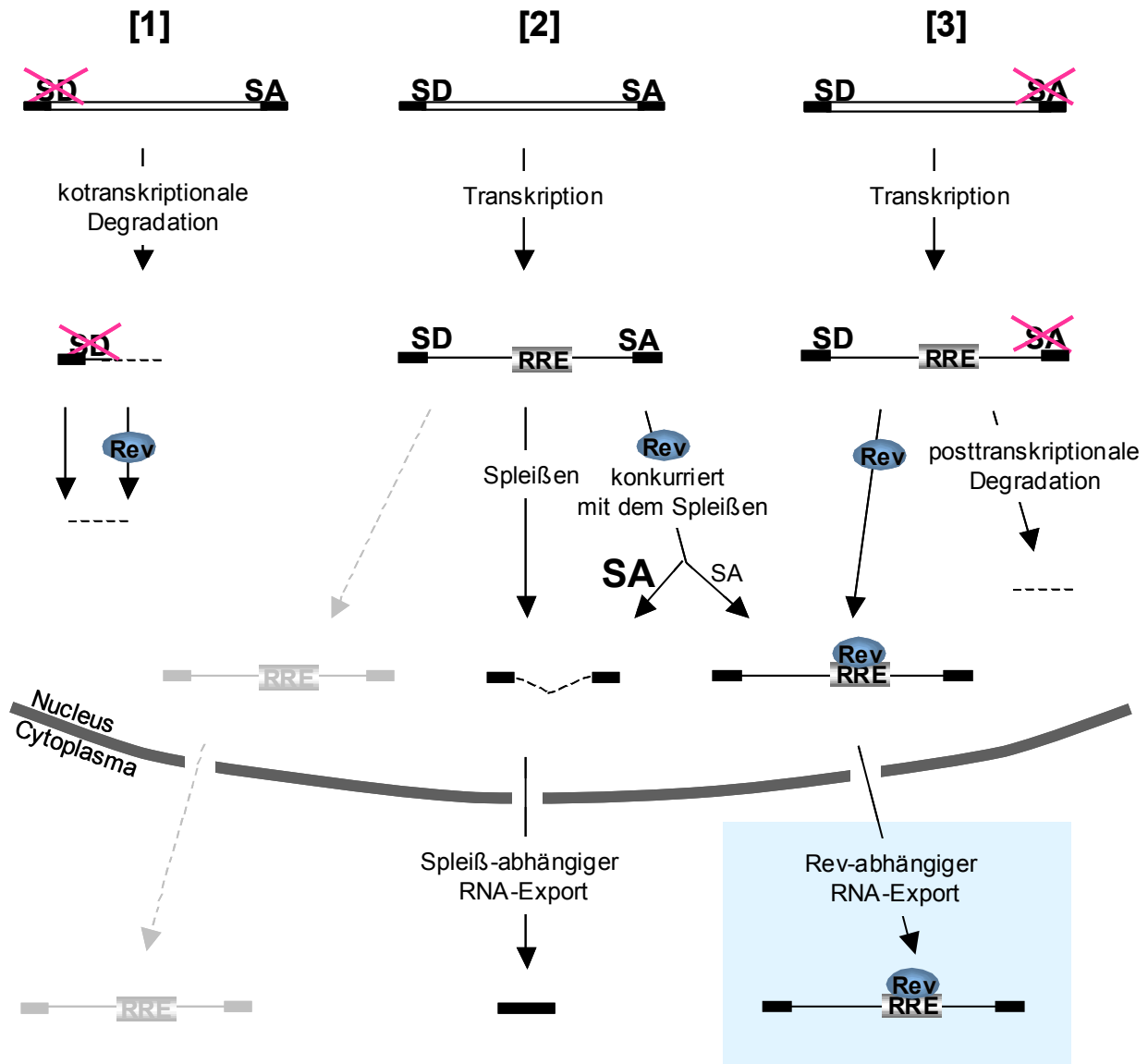


Abb. 38: Die Bedeutung der Spleißstellen für die RNA-Stabilität

Das Modell stellt den Einfluss der Spleißstellen auf die Rev-Funktion, das Spleißereignis und die RNA-Stabilität dar. Ein nicht funktioneller Spleißdonor am 5'-Ende des Transkripts führt zur kotranskriptionalen Degradation der mRNA [1]. Auch in Anwesenheit von Rev kann keine ungespleißte RNA aus dem Kern exportiert werden. Ein nicht funktioneller Spleißakzeptor verhindert das Spleißereignis [3]. Spleißfaktoren können nicht von der RNA entfernt und die Transportproteine des Exon Junction Complex nicht an die RNA rekrutiert werden. Das Transkript wird nach der Spleißosomenretentionshypothese im Kern zurückgehalten und degradiert. Rev umgeht diese Kernretention, indem es an das RRE bindet und die ungespleißte RNA aus dem Kern exportiert. Bei einem Transkript mit funktionellem Spleißdonor und funktionellem Spleißakzeptor [2] wird die RNA abhängig vom Spleißereignis exportiert. Oft ist jedoch ein geringer Leckstrom ungespleißter RNA (grau) zu beobachten. In Anwesenheit von Rev konkurriert das Spleißereignis mit dem Rev-vermittelten Export der intronhaltigen RNA. Die Menge der Rev-abhängig exportierten, ungespleißten mRNA ergibt sich nach den in Abb. 37 dargestellten Faktoren der Spleißdonor-vermittelten RNA-Stabilisierung und der Spleißakzeptor-vermittelten Effizienz des Spleißereignisses. Die Übergänge zwischen diesen drei Fällen sind fließend.

4.3 Experimentelle Bestimmung der Spleißeffizienz von HIV-1 Spleißstellen

4.3.1 Die Ergebnisse der SD4-Mutationsanalyse können zur Beschreibung von funktionellen Spleißdonorsequenzen verwendet werden

In Metazoen wird die korrekte Beschreibung von funktionellen Spleißstellen durch die Heterogenität der Spleißstellensequenzen erschwert. Für den Spleißdonor wird dies bei der Betrachtung der statistischen Häufigkeitsverteilung der Nukleotide der Exon/Intron-Grenze besonders deutlich (Abb. 39, oben). Neben den Nukleotiden GT in den Positionen +1 und +2 des Introns, die per Definition in allen kanonischen Spleißstellen enthalten sind, ist nur ein Purin (R) in Position +3 annähernd 100 % konserviert. In den Positionen -1, +4 und +5 finden sich in ca. 70-80 % der Spleißstellen, die in der Konsensussequenz angegebenen Nukleotide. Die weiter 5'- und 3'-wärts liegenden Positionen scheinen bereits deutlich weniger (-2 und +6) oder keinen (-3, +7, +8) Informationsgehalt zur Erkennung der Spleißstelle beizutragen. Die Konsensussequenz für kanonische Spleißdonoren AG/GURAGU (/ bezeichnet die Exon/Intron-Grenze) ist also nur gering konserviert und eignet sich daher nur sehr begrenzt zur Beschreibung von 5'-Spleißstellen. Eine Verbesserung brachte das Verfahren von Shapiro und Senapathy, auf dem die meisten heute verwendeten Algorithmen basieren. Sie verglichen nicht mehr ausschließlich mit der Konsensussequenz, sondern bezogen die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in den Positionen -2 bis +6 eines möglichen Spleißdonors in ihre Bewertung einer 5'-Spleißstelle mit ein (323). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Mutationsanalyse des HIV-1 SD4 gezeigt werden, dass die Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1 snRNA die Stabilität der prä-mRNA beeinflusste. Unter der Annahme, dass die Spleißdonor-vermittelte RNA-Stabilisierung kotranskriptional erfolgt, wurden gleiche Transkriptmengen in einen *in vitro* Spleiß-Assay eingesetzt, um den Einfluss der Spleißdonor-Mutationen auf das Spleißen zu untersuchen. Dabei zeigte sich ebenfalls eine Korrelation zwischen der Komplementarität zur U1 snRNA und der Spleißeffizienz. Die Aufsummierung von möglichen Wasserstoff-Brücken bot daher einen alternativen und direkten Ansatz zur Beschreibung von 5'-Spleißstellen. Aus dieser Überlegung heraus wurden die Ergebnisse der SD4-Mutationsanalyse als experimentelle Grundlage für die Formulierung eines Algorithmus zur Ermittlung von funktionellen Spleißdonoren verwendet. In der Position des SD4 waren 14 mögliche Wasserstoff-Brücken-Bindungen ausreichend, um gespleißte RNA nachzuweisen und definierten damit zunächst den Schwellenwert für eine kontinuierliche U1 snRNA-Bindesequenz. Eine Erhöhung der Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1 snRNA von 16 auf 21 Wasserstoff-Brücken-Bindungen (-1G8U-Mutante) brachte keine wesentliche Verbesserung der Spleißeffizienz im *in vitro* Spleiß-Assay (Abb. 13) und in der Env-Expression *in vivo* (164). Durch 5'- und 3'-wärts verschobene komplementäre

Sequenzen zur U1 snRNA konnte gezeigt werden, dass die U1 snRNA-Bindesequenz über die ursprünglich angenommenen Positionen -2 bis +6 der 5'-Spleißstelle hinausgeht. Während die Positionen -3, +7 und +8 zur RNA-Duplexbildung beitragen konnten, war dies bei Position -4 nicht möglich. Dies wird durch Strukturanalyse-Daten der U1 snRNA gestützt, in denen die entsprechende Position der U1 snRNA nicht einzelsträngig, sondern in einer Stem loop-Struktur vorliegt (36). Die potentiell duplexbildende Sequenz umfasst also alle 11 Nukleotide des einzelsträngigen 5'-Endes der U1 snRNA und dementsprechend die Positionen -3 bis +8 der Spleißdonorsequenz. Eine Nutzung der äußeren Positionen wurde inzwischen auch für eine mutierte U1 snRNA-Bindungssequenz im Rous Sarkom Virus (147) und für die Position -3 in einer humanen Ferrochelatase-mRNA (377) beschrieben. Weiterhin können durch die Aufsummierung möglicher Wasserstoff-Brücken-Bindungen Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Positionen berücksichtigt werden. Dies wird nötig, wenn z. B. auf beiden Seiten einer Fehlbasenpaarung zwischen der U1 snRNA und der Spleißdonorsequenz 6-12 mögliche Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA vorhanden sein müssen. Die genaue Anzahl auf jeder Seite hängt dabei von der Komplementarität auf der jeweils anderen Seite der Fehlbasenpaarung ab (164). In der weiteren Analyse durch Dipl. Biol. M. Freund ging zusätzlich eine Korrektur der Bewertung des 5'- und 3'-terminalen Nukleotids sowie eine Analyse von G-U „wobble“-Basenpaarungen in verschiedenen Positionen und von Doppel-Fehlbasenpaarungen in die Berechnung mit ein. Die Signifikanz des Algorithmus für eukaryotische Sequenzen wurde in einer Analyse der Spleißdonorsequenzen des *ATM*-Gens überprüft (107).

4.3.2 Die Nutzung der Positionen -3, +7 und +8 in der U1 snRNA-Bindung trägt zur geringen Konservierung der Spleißdonorsequenz bei

Nach korrigierter Bewertung der endständigen Sequenzen würde eine Nutzung aller 11 möglichen Positionen des Spleißdonors die Ausbildung von 24 Wasserstoff-Brücken zur U1 snRNA erlauben. Für das Spleißen und die Stabilisierung der subgenomischen HIV-1 *env*-Transkripte waren jedoch nur 13 Wasserstoff-Brücken nötig. Im Extremfall konnten daher zwei funktionelle Spleißdonoren über nur 3 gemeinsame Basen in den hochkonservierten Positionen +1 bis +3 verfügen (Abb. 11). Diese Redundanz in der Länge der möglichen Bindesequenz dürfte mit zu der schwachen Konservierung der Exon/Intron-Grenze in Metazoen beitragen. Um dies zu verdeutlichen, wurde ein Datensatz von 9862 annotierten Spleißdonoren der humanen Chromosomen 20 und 22 mit dem „splicefinder“ Algorithmus analysiert. Nach den am SD4 experimentell festgelegten Schwellenwerten benötigten ca. 6 % der Spleißdonoren die äußeren Positionen -3, +7 oder +8 für eine ausreichende Komplementarität zur U1 snRNA. Für 419 Spleißdonorsequenzen, die auf die

Position -3 angewiesen waren, und für 169, die von den Positionen +7 oder +8 abhängen, wurde die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide bestimmt (Abb. 39). Der Vergleich der Piktogramme in diesen beiden Fällen zeigt eine deutliche Ausdehnung des konservierten Sequenzbereichs 5'- bzw. 3'-wärts des GT-Dinukleotids. Die Konsensussequenz setzt sich danach aus unterschiedlichen Populationen von Bindestellen zusammen, da die Position der U1 snRNA-Bindestelle an der Exon/Intron-Grenze, im Gegensatz zum Spleißereignis, nicht positionsgenau ist. Dadurch verliert die Konsensussequenz an Informationsgehalt. Dies gilt generell für die Ableitung von Konsensussequenzen von Motiven mit einer redundanten Anzahl von Nukleotiden.

4.3.3 Die Erkennung von Spleißdonoren im HIV-1 Genom

Mit dem „splicefinder“ Algorithmus (splicefinder Vers. 2, Abb. 14) ließen sich im HIV-1 Genom 13 potentielle 5'-Spleißstellen identifizieren. Im Vergleich dazu wurde mit einem Algorithmus auf der Basis der Häufigkeitsverteilung der Nukleotide 27 Spleißdonoren gefunden (Berkeley Drosophila Genome Project, (43), http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Der SD1 mit einem Wasserstoff-Brückenmuster von 2 | 18 | (| bezeichnet eine Fehlbasenpaarung), der SD3 (| 12 | 3 | | |) und der SD4 (| | | 16 |) wurden von beiden Algorithmen als funktionell erkannt, während der SD2 (| 10 | 2 | | | |) in beiden Fällen nicht erkannt wurde. Der „splicefinder“ Algorithmus reduzierte damit die Anzahl der falsch positiven Donoren um 50 % ohne an Informationsgehalt zu verlieren. Die Anzahl der gezählten Wasserstoff-Brücken für die HIV-Spleißdonoren zeigte eine Korrelation mit Daten von O'Reilly und Mitarbeitern. Sie konnten, im Vergleich zu einem als effizient eingestuften β -Globin Spleißdonor, für den SD1 und den SD4 eine vergleichbare Menge an gespleißter RNA nachweisen (95 % bzw. 83%), während der SD3 und der SD2 deutlich schlechter erkannt wurden (45 % bzw. 38 %) (267). Dass der SD2, obwohl er *in vivo* genutzt wird, von beiden Algorithmen nicht als funktionell eingestuft wurde, zeigt, dass er offenbar einen niedrigeren Schwellenwert an Wasserstoff-Brücken benötigt als der SD4. Auch für den SD4 konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur die Anzahl von möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen, sondern auch spleißregulierende Elemente in der 5'-Sequenz zur Erkennung der Spleißstellen beitragen. Eine Untersuchung dieser Elemente in Exon 5 zeigte, dass es sich dabei um purinreiche Sequenzen mit mehreren Wiederholungen eines GAR-Motivs handelte. Dieses Motiv wurde als Bindestelle für den Spleißfaktor ASF/SF2 (356) beschrieben. ASF/SF2 kann über die SR-Domäne mit U1-70K, einer Komponente des U1 snRNP, interagieren und so die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle unterstützen (184). Dementsprechend konnte die Exon 5-Sequenz *in vitro* als Bindestelle für die Spleißfaktoren ASF/SF2 und SRp40

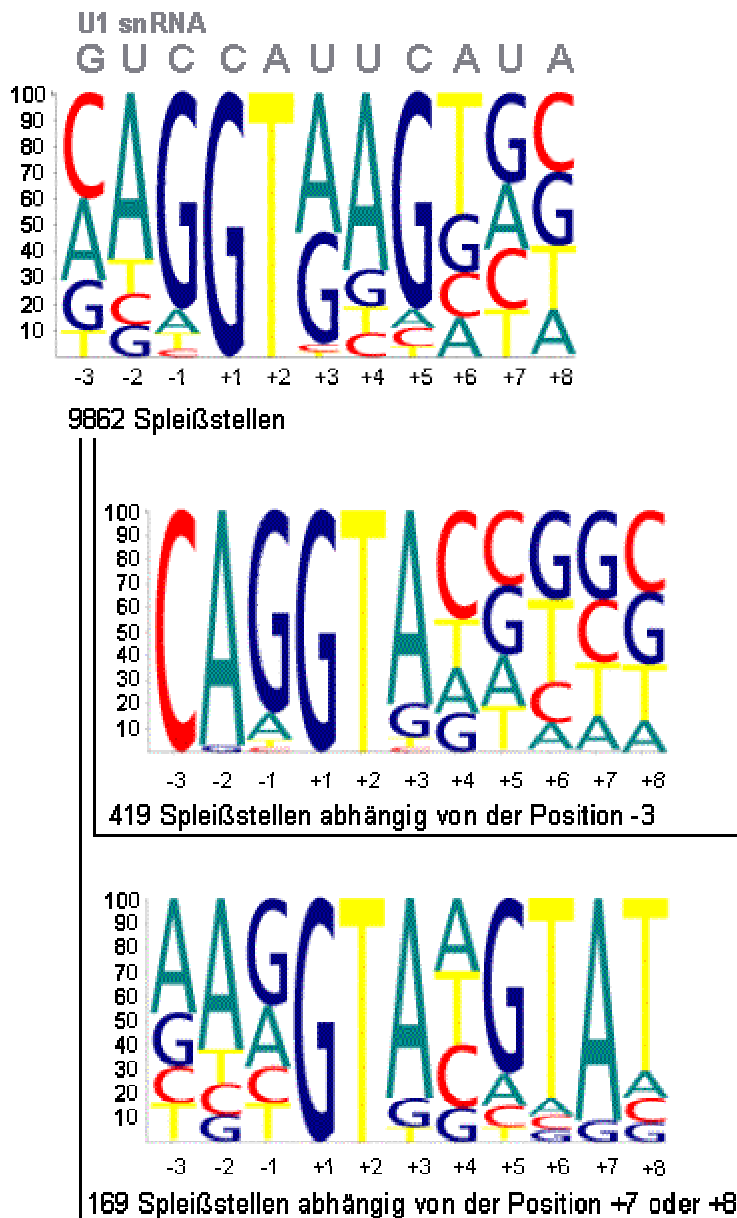


Abb. 39: Die Redundanz in der Anzahl der Nukleotide, die zur U1 snRNA-Bindung beitragen können, ist ein Grund für die geringe Konservierung der Spleißdonorsequenz in Metazoen

Im oberen Teil der Abb. ist die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide der Exon/Intron-Grenze aus 9862 annotierten Spleißdonorsequenzen der humanen Chromosomen 20 und 22 dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Winlogo-Software (T.Preuss, thpr.net). Aus diesen 9862 Spleißdonorsequenzen wurden mit Hilfe des „splicefinder“-Algorithmus (Version 2) Teilmengen selektiert. Es wurden 419 Spleißdonoren gefunden, für die ein C in Position -3 essentiell für die Bildung einer ausreichenden Anzahl von Wasserstoff-Brücken sein sollte. Ein A in Position +7 oder ein T in Position +8 benötigten 169 Spleißdonoren. Die Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in diesen Teilmengen zeigt eine erhöhte Konservierung der Nukleotide 3'- bzw. 5'-wärts der Exon/Intron-Grenze. Durch die Redundanz in der Anzahl der Nukleotide, die an der U1 snRNA-Bindung teilnehmen können, setzt sich die Häufigkeitsverteilung in der Gesamtmenge von 9862 Spleißstellen aus unterschiedlichen Populationen von U1 snRNA-Bindestellen zusammen.

identifiziert werden (Abb. 34), die die Erkennung der angrenzenden Spleißstellen SA5 und SD4 unterstützt (48). Ein Schwellenwert an Wasserstoff-Brücken, den ein funktioneller Spleißdonor erreichen muss, hängt also auch von Proteinbindestellen in den umgebenden Sequenzen ab. Eine Vorhersage von funktionellen Spleißdonorsequenzen sollte daher, wenn möglich, nicht auf einen Sequenzvergleich der Exon/Intron-Grenze beschränkt bleiben, sondern den Kontext unterschiedlicher SR-Bindestellen miteinbeziehen.

4.3.4 Die HIV-1 Akzeptoren unterscheiden sich in ihrer Spleißeffizienz und ihrer Regulation durch Rev

Der Spleißakzeptor zeigte in den untersuchten subgenomischen HIV-1 Konstrukten *in vivo* einen entscheidenden Einfluss auf die Spleißeffizienz und die damit konkurrierende Rev-Funktion. Für eine erfolgreiche Virusreplikation müssen beide Reaktionen möglich sein: Einerseits müssen die HIV-1 Akzeptoren effizient genug sein, um das Spleißen zur 1,8 kb RNA-Klasse zu erlauben. Andererseits müssen sie jedoch so ineffizient sein, dass sie den Rev-vermittelten Export der intronhaltigen 4 und 9 kb mRNAs zulassen. Die HIV-1 Akzeptoren besitzen alle von Purinen durchbrochene Polypyrimidinsequenzen, und es wurden experimentell Verzweigungssequenzen (BPS) ermittelt, die 1 bis 4 Fehlbasenpaarungen zur U2 snRNA enthielten (80, 88, 340, 353). Bei SA4a, SA5 und SA7 wurden, unter anderem, BPS mit einem U statt einem A als Verzweigungsnukleotid beschrieben. Unter diesen Bedingungen sollte der erste Transveresterungsschritt verlangsamt ablaufen (88, 283, 333). Ein erster experimenteller Vergleich der HIV-1 Spleißakzeptoren wurde von O'Reilly und Mitarbeitern durchgeführt. In einem heterologen β -Globin-Konstrukt ermittelten sie, im Vergleich zu dem als effizient definierten β -Globin SA1, für die HIV-1 Akzeptoren Spleißeffizienzen zwischen 26 und 60 % (Abb. 40A, O'Reilly et al.). Dabei blieb jedoch die Existenz *cis*-regulierender Sequenzen in den 3'-angrenzenden Exonsequenzen weitgehend unberücksichtigt. Das führte dazu, dass *cis*-wirkende Elemente im 3'-Exon nur im Fall des SA7 (9, 331, 360) vollständig mit in die β -Globin-Konstrukte inseriert wurden. Inzwischen sind jedoch auch im nichtkodierenden Exon 3 (22), im Exon 4 (8, 9, 157, 330) und im Exon 5 (48, 164) *cis*-wirkende, spleißregulierende Sequenzen beschrieben worden. Um die Effizienz der Akzeptorsequenzen selbst und den Einfluss der 3'-Sequenzen zu untersuchen, wurden die HIV-1 Spleißakzeptoren mit und ohne ihre 3'-Sequenz in Spleißkassetten-Konstrukte kloniert. Bei der RNA-Analyse dieser Konstrukte im Northern Blot stellten sich deutliche Unterschiede in der Effizienz der Akzeptoren heraus, die eine Einteilung in zwei Gruppen erlaubten. In Abwesenheit der 3'-Sequenzen war in der ersten Gruppe, mit den Akzeptoren SA2, SA4cab, SA5 und SA7, nahezu kein Spleißereignis nachweisbar. Die zweite Gruppe, bestehend SA3 und SA4, zeigte im Vergleich zu einem effizienten, nicht durch Rev regulierbaren Spleißakzeptor (SA7opt) Spleißeffizienzen von etwa 50 % (Abb. 40A, -3'-Seq.). Ein möglicher Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen schien der Polypyrimidingehalt zu sein. Dieser war bei SA3 und SA4 mit 65 und 69 % relativ hoch, während er in den anderen Akzeptoren zwischen 40 und 57 % lag. Eine Ausnahme von dieser Regel stellte dabei der SA4c mit einem Pyrimidingehalt von 62 % dar. Daraufhin wurde am Beispiel des SA5 das Zusammenspiel der BPS, der konkurrierenden AG-Dinukleotide der Spleißakzeptoren 4c, a, b (23, 281, 353) und des Polypyrimidingehalts bei der Erkennung des SA5 untersucht. Im

Vergleich zur Ausgangssequenz konnten die Erhöhung der Komplementarität der BPS zur U2 snRNA und die Inaktivierung der zusätzlichen AGs additiv zu einer verbesserten Nutzung des SA5 beitragen. Dies war allerdings erst in Konstrukten mit 60 % Pyrimidingehalt (SA5 b1⁻b2⁺AG⁻py⁺, Abb. 35) nachweisbar. Ein Pyrimidingehalt von 72 % (SA5py⁺⁺) ermöglichte dagegen eine verbesserte Erkennung des SA5 ohne zusätzliche Mutationen in der BPS und in den konkurrierenden AG-Dinukleotiden (Abb. 35 und 36). Die Unterschiede im Pyrimidingehalt könnten demnach der entscheidende Grund für die unterschiedlichen Spleißeffizienzen der HIV-1 Akzeptoren in Abwesenheit ihrer 3'-Sequenzen sein.

In Anwesenheit der 3'-wärts angrenzenden Exonsequenzen (Abb. 40A, +3'-Seq.) war für die erste Gruppe der Spleißakzeptoren eine erhöhte Spleißeffizienz nachweisbar (SA2:106 %, SA4cab5: 41 %, SA7: 57 %). Der SA2 zeigte sogar eine vergleichbare Effizienz zum SA7opt (100 %). Die zweite Gruppe (SA3, SA4) zeigte dagegen eine Verringerung der Spleißeffizienz (15 bzw. 32 %). Die Menge der ungespleißten RNA verhielt sich dabei, übereinstimmend mit dem Konkurrenz-Modell zwischen Spleißen und Rev-Funktion, umgekehrt proportional zur Menge der gespleißten RNA (vgl 4.1.2). Die Wirkung der unterschiedlichen 3'-Sequenzen auf die RNA-Mengen kann daher nicht allein auf Unterschieden in der Stabilität dieser Sequenzen beruhen, sondern lässt auf spleißregulierende Elemente schließen. Während bei den Spleißakzeptoren der ersten Gruppe (SA2, SA4cab5, SA7) ESE-Elemente in der 3'-Sequenz ein effizientes Spleißereignis erst ermöglichten, wurde in der zweiten Gruppe (SA3, SA4) die Spleißeffizienz durch ESS-Elemente reduziert. Ein Grund für diese restriktive Kontrolle des SA3 und des SA4 könnte die Cytotoxizität der von ihren mRNAs translatierbaren Proteine Tat und Vpr sein (60, 258, 393). Wie bei der Erkennung der 5'-Spleißstelle, wurde also auch die Spleißeffizienz der 3'-Spleißstellen über *cis*-wirkende Elemente bestimmt. Von ihrer Intronsequenz her ineffiziente Akzeptoren wurden durch ESEs in der 3'-Sequenz effizient erkannt, während von ihrer Intronsequenz her funktionelle Akzeptoren durch die Regulation von ESS-Elementen nur noch wenig gespleißte mRNA zeigten. In den Spleißkassetten-Konstrukten war damit, neben dem Pyrimidingehalt, in erster Linie die Nutzung der *cis*-wirkenden spleißregulierenden Elemente für die Effizienz einer 3'-Spleißstelle entscheidend.

4.3.5 Exondefinition im HIV-1

Sowohl die HIV-1 Spleißdonoren als auch die Akzeptoren zeigten in den vergleichenden Experimenten in 1-Intron-Spleißkassetten-Konstrukten Unterschiede in der Spleißeffizienz (schematisch dargestellt in Abb. 40B). Daraus ergab sich die Frage, ob diese Messungen

mit der Erkennung der Spleißstellen im HIV-1 Genom korrelieren. Purcell und Martin ermittelten in einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse relative Mengen für die alternativ gespleißten mRNAs der 1,8 und 4 kb Klasse. Für *nef*-, *rev*-, *tat*- und *vpr*-Transkripte der 1,8 kb Klasse wiesen sie ein Verhältnis von 56:34:9:1 nach. Die *env*-, *tat*-, *vpr*- und *vif*-Transkripte der 4 kb Klasse lagen im Verhältnis von 92:5:2:1 vor (281). Anhand dieser Daten wurde die relative Häufigkeit ermittelt, mit der die Spleißstellen in der 1,8 und 4 kb RNA-Klasse genutzt wurden (Abb. 40A, 1,8 kB und 4 kB). Daraus ließ sich die relative Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Exon in die Transkripte integriert wurde, ableiten (schematisch dargestellt in Abb. 40C). Exon 1 und 7 wurden in allen 1,8 kb mRNAs erkannt. Die nichtkodierenden Exons 2 und 3 sind in 16 bzw. 25 % der Transkripte zu finden. Am häufigsten wurde das Exon 5 (51%) eingeschlossen. Alternativ dazu wurden die Exons 4a (16 %), 4b (14 %) und 4 (9 %) oder an letzter Stelle 4c (4 %) und 3A (1 %) genutzt. Im Unterschied dazu wurden in der Klasse der 4 kb RNAs der SD4 und der SA7 nicht genutzt. Durch verstärktes Spleißen auf den SA5, der nach dem SA7 der nächste Spleißakzeptor vor der Polyadenylierungssequenz ist, wurde nun das Exon 5E als häufigstes Exon (82 %) in die Transkripte eingeschlossen. Die relative Häufigkeit, mit der die anderen Spleißstellen erkannt wurden, nahm im Vergleich zu den 1,8 kb RNAs zwar ab, die Verhältnisse zueinander verändern sich aber kaum. Die Häufigkeit, mit der die Exons 2 und 3 sowie die alternativ zu 5E genutzten Exons in die 4 kb Transkripte eingeschlossen wurden, ähnelten den Verhältnissen in der 1,8 kb Klasse.

Bei einem Vergleich der Häufigkeit, mit der die Exons im HIV-1 Genom erkannt wurden (Abb. 40C), mit den ermittelten Spleißeffizienzen (Abb. 40A, gelb unterlegt) fällt eine Korrelation zunächst nur mit der Effizienz der Spleißdonoren auf. Die Effizienzen der Spleißakzeptoren stimmen nicht in allen Fällen mit deren Nutzung überein. Der SA2, der in Anwesenheit seiner 3'-Sequenz der effizienteste Spleißakzeptor war, wurde z.B. nur in 16 % der 1,8 kb RNAs genutzt. Der SA3, als ineffizientester Spleißakzeptor, wurde dagegen in 26 % der 1,8 kb Transkripte erkannt. Eine Erklärung dafür könnte die paarweise Erkennung von Spleißstellen in internen Exons sein. Dies kann sowohl durch Interaktion der Spleißstellen über das Exon als auch durch Überbrückung des Introns erfolgen (291, 295, 345, 357). Die hohe Effizienz des SA2 könnte demnach nötig sein, um den ineffizienten SD2 zu kompensieren und die Erkennung des Exons 2 zu verbessern oder überhaupt erst zu ermöglichen. Tatsächlich konnten weiterführende Experimente in unserem Labor zeigen, dass in einem 2-Intron-Konstrukt die Effizienz des Spleißakzeptors an der Position des SA2 die Erkennung des Exons 2 beeinflusst (K. Neveling, persönliche Mitteilung). Dies läßt auf eine Interaktion des SA2 und des SD2 über das Exon hinweg schließen. Auch für das Exon 3 wurde beschrieben, dass sowohl eine Verbesserung der Komplementarität des SD3 zur U1 snRNA, als auch eine Mutation im SA3 inhibierenden Element ESSV,

A	Nutzung der Spleißstellen im HIV-1 Genom [%] (281)		Vergleich der Spleißeffizienz [%]					
	1,8 kB	4 kB	O'Reilly et al. (267)		Kammler et al. (164) Freund et al. (107)			
SD1	100	100	95	[31*99]	2 18			
SD2	16	5	38	[24*163]	10 2			
SD3	25	7	45	[46*294]	12 3			
SD4	100	0	83	[56*359]	16			
					- 3'-Seq.	+ 3'-Seq.		
SA2 (A1)	16	6	26	[263*29]	10	[71*0]	106	[71*50]
SA3 (A2)	26	9	60	[266*18]	48	[52*0]	15	[52*74]
SA4 (A3)	9	5	55	[142*15]	52	[85*0]	32	[85*84]
SA4c	4	1			}	2	[41*0]	
a	16	7						
b	14	6						
SA5	51	82			1	[63*0]		
SA4cab5 Σ	85	96	48	[150*42]			41	[41*70]
SA7	100	0	41	[236*101]	4	[52*0]	57	[52*96]

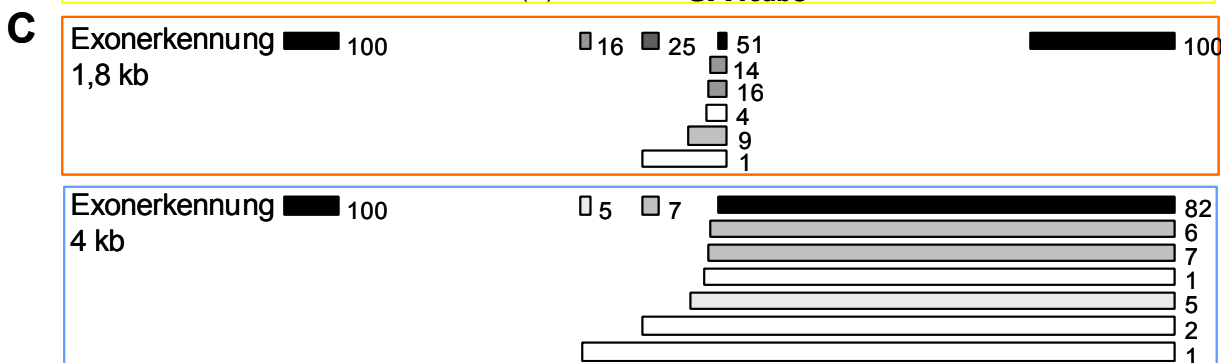
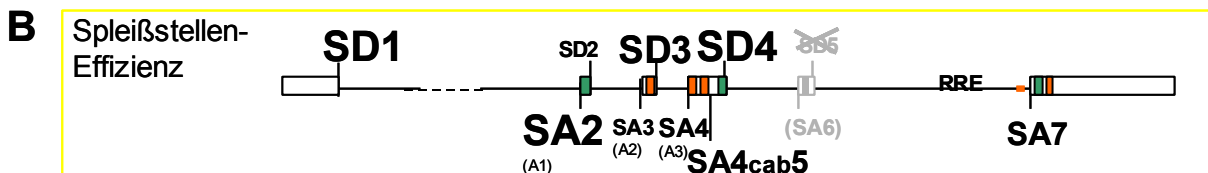


Abb. 40: Alternatives Spleißen von HIV-1 Transkripten

A: Die Nutzung der HIV-1 Spleißstellen im HIV-1 Genom und in 1-Intron-Konstrukten. In einer RT-PCR-Analyse von pNL4-3 infizierten PBMCs wurden die relativen Mengen der alternativ gespleißten HIV-1 mRNAs bestimmt (281). Aus diesen Daten wurde die relative Häufigkeit berechnet, mit der die HIV-1 Spleißstellen in den 1,8 kb (orange) und 4 kb (blau) mRNAs genutzt werden. Die Häufigkeiten der Akzeptoren 4c, a, b, 5 wurden addiert (Σ), um sie mit den experimentell ermittelten Spleißstellen-Effizienzen zu vergleichen, die im rechten Teil der Tabelle zusammengefasst wurden: O'Reilly et al. (267) verglichen die HIV-1 Spleißstellen mit den Spleißstellen im β-Globin Intron 1. Dabei wurden jedoch spleißregulierende ESE- und ESS-Elemente teilweise nicht berücksichtigt. Die möglichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen zur U1 snRNA wurden mit dem „splicefinder“ Algorithmus (Version 2) berechnet (107, 164). Die HIV-1 Spleißakzeptoren wurden ohne (-3'-Seq) und mit (+3'-Seq.) 3'-Sequenzen mit einem optimierten Spleißakzeptor (SA7opt) verglichen. Die Länge der jeweils inserierten HIV-1 Sequenzen 5'- und 3'-wärts des GT-Dinukleotids (*) ist in Klammern [grau] angegeben.

B: Schematische Darstellung der Effizienz der HIV-1 Spleißstellen. Die Effizienz der Spleißdonoren und der Spleißakzeptoren mit 3'-Sequenz (aus A, gelb unterlegt) wird durch die Schriftgröße repräsentiert. Das Exon 6 (grau) wird in HIVNL4-3 nicht genutzt. Der SD5 weist eine Punktmutation in Position +1 auf, die die Erkennung des Exons verhindern könnte. ESE (grün)- und ESS- bzw. ISS (orange)-Elemente sind eingezeichnet.

C: Die Exonererkennung im HIV-1 Genom. Die relative Häufigkeit, mit der die Exons in den HIV-1 Transkripten vertreten sind, ergibt sich aus der relativen Häufigkeit, mit der die Spleißstellen genutzt werden (A, 1,8 kb, orange; 4 kb, blau hinterlegt). Dunkle Exons werden häufig erkannt, helle dagegen selten. Die Zahlen geben die relativen Häufigkeiten in [%] an mit der die Exons in den beiden Transkript-Klassen vertreten sind.

zu einer effizienteren Erkennung des Exons führten (22). Ein weiteres Indiz für die Erkennung von Spleißstellen über die Exonsequenz ist das in Exon 5 beschriebene bidirektionale ESE, das zur Erkennung beider exonflankierender Spleißstellen, SA5 und SD4, beitrug (48).

Ein anderer Grund für mögliche Abweichungen zwischen den Ergebnissen der Spleißeffizienz-Messung und der Nutzung der Spleißstellen im HIV-Genom könnte die Verwendung verschiedener Zellen und HIV-1 Isolate sein. So wurden für die Effizienzbestimmung in dieser Arbeit HeLa-T4⁺ Zellen, eine Cervixkarzinom-Zelllinie mit stabil exprimiertem CD4-Rezeptor verwendet, während Purcell und Martin (281) pNL4-3 infizierten PBMCs (peripheral blood lymphocytes) analysierten. *Cis*-wirkende, spleißregulierende Elemente trugen bei allen Spleißstellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, entscheidend zur Spleißeffizienz bei. Unterschiede in der Expression von ESE- und ESS-bindenden SR- und hnRNP-Proteinen in den verschiedenen Zelltypen könnten daher das Spleißmuster verändern. So wurden in CD4-positiven Lymphocyten und Makrophagen, den hauptsächlich durch HIV-1 infizierten Zellen, für zelluläre Gene vereinzelt Entwicklungs- und zelltypspezifische Abweichungen alternativer Spleißereignisse beschrieben (302, 349). Auch Unterschiede in den viralen Spleißereignissen wurden bereits beobachtet. Der Einschluss von Exon 5 in die Transkripte der 1,8 kb Klasse variierte z. B. zwischen 20 % in HIV-1 BAL infizierten Makrophagen gegenüber 60 % in HTLV IIIB infizierten H9-Zellen (292). Auch die in HIV-Isolaten auftretende Polymorphismen können bei solchen Unterschieden im Spleißmuster eine Rolle spielen. Ein gut untersuchtes Beispiel dafür ist das Exon 6. Dieses Exon ist in den Transkripten des HIV NL4-3 Isolats, wahrscheinlich aufgrund einer Mutation in Position +1 des SD5, nicht nachweisbar (281). Im Isolat HXB2 wurde dagegen eine Nutzung des SA6 beschrieben (313) und in einem Klon des verwandten HIV-1pm213 Isolats erfolgt durch eine Punktmutation im ESS 3'-wärts des SA6 sogar ein vermehrter Einschluss des Exons 6. Dies führt zu einer Abnahme der *tat*-, *ref*-, *env*- *vpu*- und *nef*-Transkripte und damit zu einer stark eingeschränkten Virus-Replikation (51, 381).

4.4 Perspektiven

Vorrangiges Ziel zukünftiger Experimente stellt sicherlich zunächst eine weitere Beschreibung der Effizienz von Spleißakzeptor-Sequenzen dar. Dabei wäre z. B. die Position -3 von Interesse, in der Mutationen vielfach zu Spleißdefekten und „Exon skipping“ führen. Bisher wurden Interaktionen der Position -3 mit der Position +3 des Spleißdonors und der U6 snRNA beschrieben (73). Auch die ersten Nukleotide des Exons (Positionen +1 und +2) könnten zur Erkennung des Spleißakzeptors beitragen. Sie wurden, zusammen mit dem AG-Dinukleotid, als Bindestelle von U2AF35 charakterisiert (248, 389, 407) und könnten besonders für die Erkennung von Spleißstellen mit geringem Polypyrimidingehalt und ineffizienter Bindung von U2AF65 von Bedeutung sein. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Effizienz von Spleißdonoren als auch von Spleißakzeptoren durch ESE- und ESS-Elemente entscheidend beeinflusst wird. Dabei wurden z. B. die im Exon 2 enthaltenen Elemente in der Literatur noch nicht beschrieben. Es wäre daher von besonderem Interesse diese Elemente und die daran bindenden Proteine zu charakterisieren. Auch im Bezug auf die Voraussage funktioneller Spleißstellen ist das Zusammenwirken von spleißmodulierenden Elementen mit der Effizienz der Spleißstellen selber von großer Bedeutung. Es ist z. B. davon auszugehen, dass der Schwellenwert an Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen Spleißdonor und der U1 snRNA von der Art und Anzahl der SR- und hnRNP-Bindestellen in der umgebenden Sequenz abhängt (48, 107).

Für den Replikationszyklus von HIV-1 sind die Regulation der alternativen Spleißprozesse und der Export ungespleißter mRNA durch Rev essenziell. Eine genaue Kenntnis der molekularen Zusammenhänge, die z.B. zum Ein- oder Ausschluss von *gag/pol*- oder *env*-Sequenzen führen, könnten daher genutzt werden, um in diese Regulationsmechanismen einzugreifen. So wäre es z. B. in Zukunft denkbar, über mutierte U1 snRNAs (102) oder über Oligonukleotid-gekoppelte SR-Domänen (52) sequenzspezifisch in die Spleißregulation einzugreifen und damit die Virusreplikation zu inhibieren.

5 Zusammenfassung

Bei der Replikation von HIV-1 müssen neben gespleißten auch intronhaltige HIV-1 Transkripte, wie z. B. die *env*-mRNA, in das Cytoplasma exportiert werden. Dies wird durch die Bindung von Rev an die RNA-Sekundärstruktur RRE ermöglicht. Dabei war unklar, ob Rev den RNA-Export direkt oder in Abhängigkeit von den RRE-flankierenden Spleißstellen SD4 und SA7 vermittelt. Um die Funktion der Spleißstellen in der Rev-abhängigen Env-Expression zu untersuchen, wurde zunächst eine Mutationsanalyse des SD4 und des SA7 durchgeführt. In transienten Transfektionsexperimenten mit subgenomischen HIV-1 Konstrukten stellte sich heraus, dass die Komplementarität zwischen dem SD4 und der U1 snRNA mit der Stabilität der Transkripte korrelierte. Dabei reichten 13 mögliche, aufeinanderfolgende Wasserstoff-Brücken für die Expression gespleißter und ungespleißter RNA aus. Punktmutationen in der SD4-Sequenz konnten durch kompensatorische Mutationen in den Positionen -3 bis +8 oder durch komplementäre Nukleotide in einer U1 snRNA ausgeglichen werden. Transkripte ohne Spleißdonor waren bereits auf der Ebene der prä-mRNA nicht mehr nachweisbar. Eine Transaktivierung des Promotors durch Tat konnte diese U1 snRNA-vermittelte RNA-Stabilisierung teilweise ersetzen und erlaubte den Export intronhaltiger *env*-mRNA ohne Spleißdonor. Ein funktioneller SD4 war daher *in vivo* zwar eine Voraussetzung für die Stabilisierung subgenomischer HIV-1 Transkripte, nicht aber für die Funktion von Rev. Die RNA-Stabilisierung und das Spleißen ließen sich als getrennte Funktionen der U1 snRNA darstellen. So führte eine Punktmutation in Position +1 des SD4 zu einem Verlust der Spleißfunktion, erlaubte aber eine Stabilisierung der Transkripte. In einem *in vitro* Spleiß-Assay konnte dagegen, durch den Einsatz gleicher Transkriptmengen, eine Korrelation zwischen der Komplementarität zur U1 snRNA und der Spleißeffizienz gezeigt werden. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse dienten daraufhin als Grundlage für einen Algorithmus zur Beschreibung von Spleißdonoren.

Ebenso wie der Spleißdonor war auch ein funktioneller Spleißakzeptor keine Voraussetzung für die Env-Expression, sondern stand sogar in Konkurrenz dazu. Eine Verbesserung der Spleißeffizienz führte zu einer Abnahme intronhaltiger, Rev-abhängiger Transkripte. Bei einem Vergleich der HIV-1 Spleißakzeptoren zeigten sich Unterschiede in der Spleißeffizienz und in der Regulation durch Rev. Die effizienteren Akzeptoren SA3 und SA4 wurden durch ESS-Elemente im 3'-Exon inhibiert, während die Akzeptoren SA2, SA7 und SA4cab/SA5 erst durch ESE-Elemente aktiviert wurden. Am Beispiel eines purinreichen ESE im Exon 5 konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz zur Erkennung beider flankierenden Spleißstellen SA5 und SD4 beiträgt und Bindestellen für die Spleißfaktoren ASF/SF2 und SRp40 enthält. Eine Effizienzbestimmung von Spleißstellen ist daher nur unter Berücksichtigung der umliegenden Protein-Bindestellen möglich.

Literaturverzeichnis

1. **Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.
2. **Adachi, Y. and M. Yanagida.** 1989. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115- kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J. Cell Biol.* **108**:1195-1207.
3. **Aebi, M., H. Hornig, and C. Weissmann.** 1987. 5' cleavage site in eukaryotic pre-mRNA splicing is determined by the overall 5' splice region, not by the conserved 5' GU. *Cell* **50**:237-246.
4. **Al Harthi, L. and K. A. Roebuck.** 1998. Human immunodeficiency virus type-1 transcription: role of the 5'- untranslated leader region (review). *Int. J. Mol. Med.* **1**:875-881.
5. **Alam, J. and J. L. Cook.** 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* **188**:245-254.
6. **Alonso, A., D. Derse, and B. M. Peterlin.** 1992. Human chromosome 12 is required for optimal interactions between Tat and TAR of human immunodeficiency virus type 1 in rodent cells. *J. Virol.* **66**:4617-4621.
7. **Alonso, A. and B. M. Peterlin.** 1994. Effects of human chromosome 12 on interactions between Tat and TAR of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:6505-6513.
8. **Amendt, B. A., D. Hesslein, L. J. Chang, and C. M. Stoltzfus.** 1994. Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **14**:3960-3970.
9. **Amendt, B. A., Z. H. Si, and C. M. Stoltzfus.** 1995. Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 and tat-rev exon 3: evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol. Cell Biol.* **15**:4606-4615.
10. **Arenas, J. E. and J. N. Abelson.** 1997. Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:11798-11802.
11. **Ashe, M. P., A. Furger, and N. J. Proudfoot.** 2000. Stem-loop 1 of the U1 snRNP plays a critical role in the suppression of HIV-1 polyadenylation. *RNA.* **6**:170-177.
12. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, and eds.** 1991. *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
13. **Barksdale, S. K. and C. C. Baker.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and the Rev- responsive element counteract the effect of an inhibitory 5' splice site in a 3' untranslated region. *Mol. Cell Biol.* **15**:2962-2971.
14. **Barre Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler Blin, F. Vezinet Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
15. **Benkirane, M., R. F. Chun, H. Xiao, V. V. Ogryzko, B. H. Howard, Y. Nakatani, and K. T. Jeang.** 1998. Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* **273**:24898-24905.

16. **Benko, D. M., S. Schwartz, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1990. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, *tev*, shares sequences with *tat*, *env*, and *rev* proteins. *J. Virol.* **64**:2505-2518.
17. **Bennett, M., S. Michaud, J. Kingston, and R. Reed.** 1992. Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev.* **6**:1986-2000.
18. **Bennett, M., S. Pinol Roma, D. Staknis, G. Dreyfuss, and R. Reed.** 1992. Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro. *Mol. Cell Biol.* **12**:3165-3175.
19. **Berget, S. M.** 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* **270**:2411-2414.
20. **Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang.** 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**:273-282.
21. **Bilicic, D.** 1994. Untersuchung zur Expression des *rev*-Gens des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) in Abhängigkeit des Leaders. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
22. **Bilodeau, P. S., J. K. Domsic, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2001. RNA Splicing at Human Immunodeficiency Virus Type 1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element. *J. Virol.* **75**:8487-8497.
23. **Bilodeau, P. S., J. K. Domsic, and C. M. Stoltzfus.** 1999. Splicing regulatory elements within *tat* exon 2 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are characteristic of group M but not group O HIV-1 strains. *J. Virol.* **73**:9764-9772.
24. **Birckbichler, P. J. and I. F. Pryme.** 1973. Fractionation of membrane-bound polysomes, free polysomes, and nuclei from tissue-cultured cells. *Eur. J. Biochem.* **33**:368-373.
25. **Bird, P., M. J. Gething, and J. Sambrook.** 1987. Translocation in yeast and mammalian cells: not all signal sequences are functionally equivalent. *J. Cell Biol.* **105**:2905-2914.
26. **Black, D. L., B. Chabot, and J. A. Steitz.** 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. *Cell* **42**:737-750.
27. **Blanchette, M. and B. Chabot.** 1999. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* **18**:1939-1952.
28. **Blencowe, B. J.** 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* **25**:106-110.
29. **Blencowe, B. J., J. A. Bowman, S. McCracken, and E. Rosonina.** 1999. SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem. Cell Biol.* **77**:277-291.
30. **Bogerd, H. P., A. Echarri, T. M. Ross, and B. R. Cullen.** 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J. Virol.* **72**:8627-8635.
31. **Bohnlein, E., J. Berger, and J. Hauber.** 1991. Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J. Virol.* **65**:7051-7055.
32. **Bourgeois, C. F., Y. K. Kim, M. J. Churcher, M. J. West, and J. Karn.** 2002. Spt5 Cooperates with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat by Preventing Premature RNA Release at Terminator Sequences. *Mol. Cell Biol.* **22**:1079-1093.

33. **Bousquet-Antonelli, C., C. Presutti, and D. Tollervey.** 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**:765-775.
34. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
35. **Brandhorst, B. P. and E. H. McConkey.** 1974. Stability of Nuclear RNA in Mammalian Cells. *J. Mol. Biol.* **85**:451-463.
36. **Branlant, C., A. Krol, J. P. Ebel, H. Gallinaro, E. Lazar, and M. Jacob.** 1981. The conformation of chicken, rat and human U1A RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* **9**:841-858.
37. **Bray, M., S. Prasad, J. W. Dubay, E. Hunter, K. T. Jeang, D. Rekosh, and M. L. Hammariskjold.** 1994. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:1256-1260.
38. **Bres, V., H. Tagami, J. M. Peloponese, E. Loret, K. T. Jeang, Y. Nakatani, S. Emiliani, M. Benkirane, and R. E. Kiernan.** 2002. Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J.* **21**:6811-6819.
39. **Brett, D., H. Pospisil, J. Valcarcel, J. Reich, and P. Bork.** 2002. Alternative splicing and genome complexity. *Nat. Genet.* **30**:29-30.
40. **Brighty, D. W. and M. Rosenberg.** 1994. A cis-acting repressive sequence that overlaps the Rev- responsive element of human immunodeficiency virus type 1 regulates nuclear retention of env mRNAs independently of known splice signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:8314-8318.
41. **Brody, E. and J. Abelson.** 1985. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**:963-967.
42. **Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1989. 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.* **86**:2525-2529.
43. **Brunak, S., J. Engelbrecht, and S. Knudsen.** 1991. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* **220**:49-65.
44. **Buchman, A. R. and P. Berg.** 1988. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol. Cell Biol.* **8**:4395-4405.
45. **Burd, C. G. and G. Dreyfuss.** 1994. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **13**:1197-1204.
46. **Burge, C. B., R. A. Padgett, and P. A. Sharp.** 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol. Cell* **2**:773-785.
47. **Burge, C. B., T. Tuschl, and P. A. Sharp.** 1999. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes, p. 525-560. In R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
48. **Caputi, M., M. Freund, S. Kammler, C. Asang, and H. Schaal.** 2003. A bidirectional SF2/ASF, SRp40 dependent splicing enhancer regulates HIV-1 rev, env, vpu and nef gene expression. *J Virol* **submitted**.
49. **Caputi, M., A. Mayeda, A. R. Krainer, and A. M. Zahler.** 1999. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **18**:4060-4067.

50. **Caputi, M. and A. M. Zahler.** 2001. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *J. Biol. Chem.* **276**:43850-43859.
51. **Caputi, M. and A. M. Zahler.** 2002. SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *EMBO J.* **21**:845-855.
52. **Cartegni, L. and A. R. Krainer.** 2003. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat. Struct. Biol.* **10**:120-125.
53. **Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer.** 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* **31**:3568-3571.
54. **Cartegni, L., Zhu, Z., Zhang, M. Q., and Krainer, A. R.** ESEfinder web interface (1.2), <http://exon.cshl.edu/ESE/>. 2003.
55. **Caspary, F., A. Shevchenko, M. Wilm, and B. Seraphin.** 1999. Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *EMBO J.* **18**:3463-3474.
56. **Cavaloc, Y., C. F. Bourgeois, L. Kister, and J. Stevenin.** 1999. The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *RNA.* **5**:468-483.
57. **Chandler, S. D., A. Mayeda, J. M. Yeakley, A. R. Krainer, and X. D. Fu.** 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:3596-3601.
58. **Chang, D. D. and P. A. Sharp.** 1989. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**:789-795.
59. **Chen, C. D., R. Kobayashi, and D. M. Helfman.** 1999. Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev.* **13**:593-606.
60. **Chen, D., M. Wang, S. Zhou, and Q. Zhou.** 2002. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J* **21**:6801-6810.
61. **Chen, I. H., K. S. Sciabica, and R. M. Sandri-Goldin.** 2002. ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J. Virol.* **76**:12877-12889.
62. **Chen, J. Y., L. Stands, J. P. Staley, R. R. Jackups, Jr., L. J. Latus, and T. H. Chang.** 2001. Specific alterations of U1-C protein or U1 small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD box splicing factor. *Mol. Cell* **7**:227-232.
63. **Chiu, Y. L., E. Coronel, C. K. Ho, S. Shuman, and T. M. Rana.** 2001. HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J. Biol. Chem.* **276**:12959-12966.
64. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
65. **Chun, R. F. and K. T. Jeang.** 1996. Requirements for RNA polymerase II carboxyl-terminal domain for activated transcription of human retroviruses human T-cell lymphotropic virus I and HIV-1. *J. Biol. Chem.* **271**:27888-27894.
66. **Chung, S., M. R. McLean, and B. C. Rymond.** 1999. Yeast ortholog of the *Drosophila* crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition. *RNA.* **5**:1042-1054.

67. **Clouse, K. N., M. J. Luo, Z. Zhou, and R. Reed.** 2001. A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat. Cell Biol.* **3**:97-99.
68. **Cochrane, A., R. Kramer, S. Ruben, J. Levine, and C. A. Rosen.** 1989. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**:264-266.
69. **Cochrane, A. W., K. S. Jones, S. Beidas, P. J. Dillon, A. M. Skalka, and C. A. Rosen.** 1991. Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J. Virol.* **65**:5305-5313.
70. **Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen.** 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J. Virol.* **64**:881-885.
71. **Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al.** 1986. What to call the AIDS virus? [letter]. *Nature* **321**:10.
72. **Col, E., C. Caron, D. Seigneurin-Berny, J. Gracia, A. Favier, and S. Khochbin.** 2001. The histone acetyltransferase, *hGCN5*, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J. Biol. Chem.* **276**:28179-28184.
73. **Collins, C. A. and C. Guthrie.** 2001. Genetic interactions between the 5' and 3' splice site consensus sequences and U6 snRNA during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **7**:1845-1854.
74. **Colwill, K., L. L. Feng, J. M. Yeakley, G. D. Gish, J. F. Caceres, T. Pawson, and X. D. Fu.** 1996. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.* **271**:24569-24575.
75. **Cooke, C., H. Hans, and J. C. Alwine.** 1999. Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol. Cell Biol.* **19**:4971-4979.
76. **Craigie, R.** 2001. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J. Biol. Chem.* **276**:23213-23216.
77. **Crispino, J. D., B. J. Blencowe, and P. A. Sharp.** 1994. Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* **265**:1866-1869.
78. **Cullen, B. R.** 2001. Journey to the center of the cell. *Cell* **105**:697-700.
79. **Damgaard, C. K.** 2001. Macromolecular interactions regulating genomic splicing, dimerisation and packaging in HIV-1; Ph.D. thesis.
80. **Damier, L., L. Domenjoud, and C. Branlant.** 1997. The D1-A2 and D2-A2 pairs of splice sites from human immunodeficiency virus type 1 are highly efficient in vitro, in spite of an unusual branch site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**:182-187.
81. **de La, C. J., D. Kressler, and P. Linder.** 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* **24**:192-198.
82. **Derse, D., M. Carvalho, R. Carroll, and B. M. Peterlin.** 1991. A minimal lentivirus Tat. *J. Virol.* **65**:7012-7015.
83. **Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic. Acids. Res.* **11**:1475-1489.

84. **Domsic, J. K., Y. Wang, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 hnRNP A/B-Dependent Exonic Splicing Silencer ESSV Antagonizes Binding of U2AF65 to Viral Polypyrimidine Tracts. *Mol. Cell Biol.* **23**:8762-8772.
85. **Dorr, A., V. Kiermer, A. Pedal, H. R. Rackwitz, P. Henklein, U. Schubert, M. M. Zhou, E. Verdin, and M. Ott.** 2002. Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *EMBO J.* **21**:2715-2723.
86. **Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C. G. Burd.** 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:289-321.
87. **Du, H. and M. Rosbash.** 2002. The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. *Nature* **419**:86-90.
88. **Dyhr-Mikkelsen, H. and J. Kjems.** 1995. Inefficient spliceosome assembly and abnormal branch site selection in splicing of an HIV-1 transcript in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**:24060-24066.
89. **Eckner, R., W. Ellmeier, and M. L. Birnstiel.** 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *EMBO J.* **10**:3513-3522.
90. **Eldridge, A. G., Y. Li, P. A. Sharp, and B. J. Blencowe.** 1999. The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:6125-6130.
91. **Elrick, L. L., M. B. Humphrey, T. A. Cooper, and S. M. Berget.** 1998. A short sequence within two purine-rich enhancers determines 5' splice site specificity. *Mol. Cell Biol.* **18**:343-352.
92. **Emerman, M. and M. H. Malim.** 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**:1880-1884.
93. **Farrer, T., A. B. Roller, W. J. Kent, and A. M. Zahler.** 2002. Analysis of the role of *Caenorhabditis elegans* GC-AG introns in regulated splicing. *Nucleic Acids Res.* **30**:3360-3367.
94. **Feinberg, M. B., D. Baltimore, and A. D. Frankel.** 1991. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:4045-4049.
95. **Felber, B. K., C. M. Drysdale, and G. N. Pavlakis.** 1990. Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J. Virol.* **64**:3734-3741.
96. **Felber, B. K., M. Hadzopoulou Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G. N. Pavlakis.** 1989. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1495-1499.
97. **Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj, and R. Luhrmann.** 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**:475-483.
98. **Fischer, U., S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Luhrmann, and G. Rautmann.** 1994. Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J.* **13**:4105-4112.
99. **Fong, Y. W. and Q. Zhou.** 2001. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* **414**:929-933.
100. **Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]. *Cell* **90**:1051-1060.

101. **Fornerod, M., D. J. van, B. S. van, A. Reynolds, D. Davis, K. G. Murti, J. Fransen, and G. Grosveld.** 1997. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**:807-816.
102. **Fortes, P., Y. Cuevas, F. Guan, P. Liu, S. Pentlicky, S. P. Jung, M. L. Martinez-Chantar, J. Prieto, D. Rowe, and S. I. Gunderson.** 2003. Inhibiting expression of specific genes in mammalian cells with 5' end-mutated U1 small nuclear RNAs targeted to terminal exons of pre-mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:8264-8269.
103. **Fouchier, R. A. and M. H. Malim.** 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv. Virus Res.* **52**:275-299.
104. **Frankel, A. D.** 1992. Activation of HIV transcription by Tat. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**:293-298.
105. **Frankel, A. D. and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:1-25:1-25.
106. **Freed, E. O. and M. A. Martin.** 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J. Biol. Chem.* **270**:23883-23886.
107. **Freund, M., C. Asang, S. Kammler, C. Konermann, J. Krummheuer, M. Hipp, I. Meyer, W. Gierling, S. Theiss, T. Preuss, D. Schindler, J. Kjems, H. Schaal, and H.** 2003. A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucl. Acids. Res.* **31**.
108. **Fu, X. D., R. A. Katz, A. M. Skalka, and T. Maniatis.** 1991. The role of branchpoint and 3'-exon sequences in the control of balanced splicing of avian retrovirus RNA. *Genes Dev.* **5**:211-220.
109. **Fu, X. D. and T. Maniatis.** 1992. The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:1725-1729.
110. **Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida.** 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**:308-311.
111. **Furger, A., J. M. O'Sullivan, A. Binnie, B. A. Lee, and N. J. Proudfoot.** 2002. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* **16**:2792-2799.
112. **Furtado, M. R., R. Balachandran, P. Gupta, and S. M. Wolinsky.** 1991. Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* **185**:258-270.
113. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
114. **Garber, M. E., T. P. Mayall, E. M. Suess, J. Meisenhelder, N. E. Thompson, and K. A. Jones.** 2000. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol. Cell Biol.* **20**:6958-6969.
115. **Gatto-Konczak, F., M. Olive, M. C. Gesnel, and R. Breathnach.** 1999. hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol. Cell Biol.* **19**:251-260.
116. **Ge, H. and J. L. Manley.** 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* **62**:25-34.
117. **Gerace, L.** 1995. Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell* **82**:341-344.

118. **Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-182.
119. **Golovkin, M. and A. S. Reddy.** 1999. An SC35-like protein and a novel serine/arginine-rich protein interact with Arabidopsis U1-70K protein. *J. Biol. Chem.* **274**:36428-36438.
120. **Gonda, M. A., F. Wong Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden.** 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**:173-177.
121. **Gorlich, D., S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann, and S. Prehn.** 1995. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**:383-392.
122. **Gorlich, D. and U. Kutay.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:607-60:607-660.
123. **Gorlich, D., M. J. Seewald, and K. Ribbeck.** 2003. Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation. *EMBO J.* **22**:1088-1100.
124. **Gorlich, D., F. Vogel, A. D. Mills, E. Hartmann, and R. A. Laskey.** 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**:246-248.
125. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1431.
126. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine.** 1992. The role of the *tnv* protein and *tnv* RNA splicing signals in replication of HIV-1 IIB isolates. *Virology* **189**:618-628.
127. **Gozani, O., R. Feld, and R. Reed.** 1996. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev.* **10**:233-243.
128. **Graf, M., A. Bojak, L. Deml, K. Bieler, H. Wolf, and R. Wagner.** 2000. Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression [In Process Citation]. *J. Virol.* **74**:10822-10826.
129. **Graveley, B. R.** 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* **6**:1197-1211.
130. **Graveley, B. R.** 2002. Sex, AGility, and the regulation of alternative splicing. *Cell* **109**:409-412.
131. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 1998. A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre- mRNA splicing enhancers. *EMBO J.* **17**:6747-6756.
132. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 1999. SR proteins are 'locators' of the RNA splicing machinery. *Curr. Biol.* **9**:R6-R7.
133. **Gross, T., K. Richert, C. Mierke, M. Lutzberger, and N. F. Kaufer.** 1998. Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **26**:505-511.
134. **Gruss, P., C. J. Lai, R. Dhar, and G. Khoury.** 1979. Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4317-4321.

135. **Gruter, P., C. Tabernero, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber, and E. Izaurralde.** 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell* **1**:649-659.
136. **Gui, J. F., H. Tronchere, S. D. Chandler, and X. D. Fu.** 1994. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:10824-10828.
137. **Guimaraes, C. P., M. Lemos, I. Menezes, T. Coelho, C. Sa-Miranda, and J. E. Azevedo.** 2001. Characterisation of two mutations in the ABCD1 gene leading to low levels of normal ALDP. *Hum. Genet.* **109**:616-622.
138. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
139. **Hall, S. L. and R. A. Padgett.** 1996. Requirement of U12 snRNA for *in vivo* splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns. *Science* **271**:1716-1718.
140. **Hamer, D. H. and P. Leder.** 1979. Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**:1299-1302.
141. **Hamm, J. and A. I. Lamond.** 1998. Spliceosome assembly: the unwinding role of DEAD-box proteins. *Curr. Biol.* **8**:R532-R534.
142. **Hamm, J. and I. W. Mattaj.** 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* **63**:109-118.
143. **Hauber, J., M. Bouvier, M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1988. Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **62**:4801-4804.
144. **Hauber, J., M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**:1181-1187.
145. **Heaphy, S., C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, and M. A. Skinner.** 1990. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**:685-693.
146. **Henderson, B. R. and P. Percipalle.** 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J. Mol. Biol.* **274**:693-707.
147. **Hibbert, C. S., R. R. Gontarek, and K. L. Beemon.** 1999. The role of overlapping U1 and U11 5' splice site sequences in a negative regulator of splicing. *RNA.* **5**:333-343.
148. **Hilleren, P., T. McCarthy, M. Rosbash, R. Parker, and T. H. Jensen.** 2001. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**:538-542.
149. **Hoffman, B. E. and J. T. Lis.** Pre-mRNA splicing by the essential *Drosophila* protein B52: tissue and target specificity. *Mol. Cell Biol.* 2000. Jan. ;20. (1.):181. -6. **20**:181-186.
150. **Hong, W., M. Bennett, Y. Xiao, K. R. Feld, C. Wang, and R. Reed.** 1997. Association of U2 snRNP with the spliceosomal complex E. *Nucleic Acids Res.* **25**:354-361.
151. **Hope, T. J.** 1999. The ins and outs of HIV Rev. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**:186-191.
152. **Hottiger, M. O. and G. J. Nabel.** 2000. Viral replication and the coactivators p300 and CBP. *Trends Microbiol.* **8**:560-565.

153. **Huang, Y., R. Gattoni, J. Stevenin, and J. A. Steitz.** 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell* **11**:837-843.
154. **Huang, Y. and J. A. Steitz.** 2001. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol. Cell* **7**:899-905.
155. **Hurt, E., K. Strasser, A. Segref, S. Bailer, N. Schlaich, C. Presutti, D. Tollervey, and R. Jansen.** 2000. Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts. *J. Biol. Chem.* **275**:8361-8368.
156. **Jacquet, S., A. Mereau, P. S. Bilodeau, L. Damier, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *J. Biol. Chem.*
157. **Jacquet, S., D. Ropers, P. S. Bilodeau, L. Damier, A. Mougin, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **29**:464-478.
158. **Jamison, S. F., Z. Pasman, J. Wang, C. Will, R. Luhrmann, J. L. Manley, and M. A. Garcia-Blanco.** 1995. U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic Acids Res.* **23**:3260-3267.
159. **Jankowsky, E., C. H. Gross, S. Shuman, and A. M. Pyle.** 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DEXH/D RNA helicase. *Science* **291**:121-125.
160. **Jarmolowski, A., W. C. Boelens, E. Izaurralde, and I. W. Mattaj.** 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* **124**:627-635.
161. **Jeang, K. T., H. Xiao, and E. A. Rich.** 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J. Biol. Chem.* **274**:28837-28840.
162. **Jenuwein, T. and C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074-1080.
163. **Jones, K. A. and B. M. Peterlin.** 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:717-743.
164. **Kammler, S., C. Leurs, M. Freund, J. Krummheuer, K. Seidel, T. O. Tange, M. K. Lund, J. Kjems, A. Scheid, and H. Schaal.** 2001. The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA. *RNA.* **7**:421-434.
165. **Kang, Y. and B. R. Cullen.** 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* **13**:1126-1139.
166. **Kanopka, A., O. Muhlemann, and G. Akusjarvi.** 1996. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**:535-538.
167. **Kanopka, A., O. Muhlemann, S. Petersen-Mahrt, C. Estmer, C. Ohrmalm, and G. Akusjarvi.** 1998. Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* **393**:185-187.
168. **Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin.** 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**:489-493.
169. **Karn, J.** 1999. Tackling Tat. *J. Mol. Biol.* **293**:235-254.
170. **Kashima, T. and J. L. Manley.** 2003. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*

171. **Katahira, J., K. Strasser, A. Podtelejnikov, M. Mann, J. U. Jung, and E. Hurt.** 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* **18**:2593-2609.
172. **Kato, H., H. Sumimoto, P. Pognonec, C. H. Chen, C. A. Rosen, and R. G. Roeder.** 1992. HIV-1 Tat acts as a processivity factor in vitro in conjunction with cellular elongation factors. *Genes Dev.* **6**:655-666.
173. **Katz, R. A., M. Kotler, and A. M. Skalka.** 1988. cis-acting intron mutations that affect the efficiency of avian retroviral RNA splicing: implication for mechanisms of control. *J. Virol.* **62**:2686-2695.
174. **Katz, R. A. and A. M. Skalka.** 1990. Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. *Mol. Cell Biol.* **10**:696-704.
175. **Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane, and L. C. Van.** 1999. HIV-1 Tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* **18**:6106-6118.
176. **Kim, J. B., Y. Yamaguchi, T. Wada, H. Handa, and P. A. Sharp.** 1999. Tat-SF1 Protein Associates with RAP30 and Human SPT5 Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**:5960-5968.
177. **Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore.** 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**:3708-3713.
178. **Kistler, A. L. and C. Guthrie.** 2001. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes Dev.* **15**:42-49.
179. **Kjems, J. and P. Askjaer.** 2000. Rev protein and its cellular partners. *Adv. Pharmacol.* **48**:251-298.
180. **Kjems, J., B. J. Calnan, A. D. Frankel, and P. A. Sharp.** 1992. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J.* **11**:1119-1129.
181. **Kjems, J., A. D. Frankel, and P. A. Sharp.** 1991. Specific regulation of mRNA splicing in vitro by a peptide from HIV-1 Rev. *Cell* **67**:169-178.
182. **Kjems, J. and P. A. Sharp.** 1993. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J. Virol.* **67**:4769-4776.
183. **Kobor, M. S. and J. Greenblatt.** 2002. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**:261-275.
184. **Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Luhrmann, M. A. Garcia-Blanco, and J. L. Manley.** 1994. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**:119-124.
185. **Korb, M., Y. Ke, and L. F. Johnson.** 1993. Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. *Nucleic. Acids. Res.* **21**:5901-5908.
186. **Kouzarides, T.** 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **19**:1176-1179.
187. **Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak.** 1990. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.* **4**:1158-1171.
188. **Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak.** 1990. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* **62**:35-42.

189. **Krainer, A. R., A. Mayeda, D. Kozak, and G. Binns.** 1991. Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell* **66**:383-394.
190. **Kramer, A.** 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:367-409:367-409.
191. **Kramer, A., P. Gruter, K. Groning, and B. Kastner.** 1999. Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP. *J. Cell Biol.* **145**:1355-1368.
192. **Kramer, A., W. Keller, B. Appel, and R. Luhrmann.** 1984. The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **38**:299-307.
193. **Krecic, A. M. and M. S. Swanson.** 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:363-371.
194. **Krummheuer, J.** 1997. Untersuchungen zum Expressionsmuster alternativ gespleiter HIV-1 mRNAs. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
195. **Krummheuer, J., C. Lenz, S. Kammler, A. Scheid, and H. Schaal.** 2001. Influence of the Small Leader Exons 2 and 3 on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Virology* **285**:276-289.
196. **Kuersten, S., G. J. Arts, T. C. Walther, L. Englmeier, and I. W. Mattaj.** 2002. Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol. Cell Biol.* **22**:5708-5720.
197. **Kuhn, A. N., Z. Li, and D. A. Brow.** 1999. Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol. Cell* **3**:65-75.
198. **Kuhn, A. N., E. M. Reichl, and D. A. Brow.** 2002. Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:9145-9149.
199. **Kuppuswamy, M., T. Subramanian, A. Srinivasan, and G. Chinnadurai.** 1989. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic. Acids. Res.* **17**:3551-3561.
200. **Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 1998. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1**:359-369.
201. **Kwek, K. Y., S. Murphy, A. Furger, B. Thomas, W. O'Gorman, H. Kimura, N. J. Proudfoot, and A. Akoulitchev.** 2002. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat. Struct. Biol.* **9**:800-805.
202. **Lacy-Hulbert, A., R. Thomas, X. P. Li, C. E. Lilley, R. S. Coffin, and J. Roes.** 2001. Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes. *Gene Ther.* **8**:649-653.
203. **Lamond, A. I., M. M. Konarska, and P. A. Sharp.** 1987. A mutational analysis of spliceosome assembly: evidence for splice site collaboration during spliceosome formation. *Genes Dev.* **1**:532-543.
204. **Human Genome Sequencing Consortium: Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren..., .** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921.
205. **Laspia, M. F., A. P. Rice, and M. B. Mathews.** 1989. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**:283-292.

206. **Lavigne, A., H. La Branche, A. R. Kornblihtt, and B. Chabot.** 1993. A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.* **7**:2405-2417.
207. **Lazar, G., T. Schaal, T. Maniatis, and H. M. Goodman.** 1995. Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian splicing factor SF2/ASF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:7672-7676.
208. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **19**:6860-6869.
209. **Le Hir, H., M. J. Moore, and L. E. Maquat.** 2000. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* **14**:1098-1108.
210. **Lee, B., B. J. Doranz, M. Z. Ratajczak, and R. W. Doms.** 1998. An intricate Web: chemokine receptors, HIV-1 and hematopoiesis. *Stem. Cells* **16**:79-88.
211. **Legrain, P. and M. Rosbash.** 1989. Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**:573-583.
212. **Lejeune, F., Y. Ishigaki, X. Li, and L. E. Maquat.** 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* **21**:3536-3545.
213. **Lenz, C., A. Scheid, and H. Schaal.** 1997. Exon 1 leader sequences downstream of U5 are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* **71**:2757-2764.
214. **Leurs, C.** 1998. Der Einfluß der Sequenz des HIV-1 Spleißdonors 4 auf die Rev-abhängige env-Expression. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
215. **Levine, A. and R. Durbin.** 2001. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* **29**:4006-4013.
216. **Lewis, J. D., E. Izaurralde, A. Jarmolowski, C. McGuigan, and I. W. Mattaj.** 1996. A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev.* **10**:1683-1698.
217. **Leys, E. J., G. F. Crouse, and R. E. Kellems.** 1984. Dihydrofolate reductase gene expression in cultured mouse cells is regulated by transcript stabilization in the nucleus. *J. Cell Biol.* **99**:180-187.
218. **Liang, C. and M. A. Wainberg.** 2002. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev.* **4**:41-49.
219. **Liu, H. X., M. Zhang, and A. R. Krainer.** 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* **12**:1998-2012.
220. **Liu, X. and J. E. Mertz.** 1995. HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron- dependent gene expression. *Genes Dev.* **9**:1766-1780.
221. **Lopato, S., R. Gattoni, G. Fabini, J. Stevenin, and A. Barta.** 1999. A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: examination of RNA binding and splicing activities. *Plant Mol. Biol.* **39**:761-773.
222. **Lopato, S., M. Kalyna, S. Dorner, R. Kobayashi, A. R. Krainer, and A. Barta.** 1999. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev.* **13**:987-1001.

223. **Lu, X. B., J. Heimer, D. Rekosh, and M. L. Hammariskjold.** 1990. U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev-regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:7598-7602.
224. **Lund, M. and J. Kjems.** 2002. Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. *RNA.* **8**:166-179.
225. **Luo, M. L., Z. Zhou, K. Magni, C. Christoforides, J. Rappsilber, M. Mann, and R. Reed.** 2001. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* **413**:644-647.
226. **Luo, M. and R. Reed.** 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:14937-14942.
227. **Luo, Y., H. Yu, and B. M. Peterlin.** 1994. Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J. Virol.* **68**:3850-3856.
228. **Lutzelberger, M., T. Gross, and N. F. Kaufer.** 1999. *Srp2*, an SR protein family member of fission yeast: *in vivo* characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res.* **27**:2618-2626.
229. **Lynch, K. W. and T. Maniatis.** 1996. Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev.* **10**:2089-2101.
230. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
231. **Madore, S. J., L. S. Tiley, M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1994. Sequence requirements for Rev multimerization *in vivo*. *Virology* **202**:186-194.
232. **Maldarelli, F., M. A. Martin, and K. Strebel.** 1991. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J. Virol.* **65**:5732-5743.
233. **Malim, M. H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-- derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**:205-214.
234. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**:241-248.
235. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* **13**:6180-6189.
236. **Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen.** 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**:181-183.
237. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
238. **Malim, M. H., D. F. McCarn, L. S. Tiley, and B. R. Cullen.** 1991. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J. Virol.* **65**:4248-4254.
239. **Malim, M. H., L. S. Tiley, D. F. McCarn, J. R. Rusche, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**:675-683.

240. **Maniatis, T. and R. Reed.** 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**:499-506.
241. **Mann, D. A., I. Mikaelian, R. W. Zimmel, S. M. Green, A. D. Lowe, T. Kimura, M. Singh, P. J. Butler, M. J. Gait, and J. Karn.** 1994. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J. Mol. Biol.* **241**:193-207.
242. **Marcello, A., M. Zoppe, and M. Giacca.** 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB. Life* **51**:175-181.
243. **Marciniak, R. A. and P. A. Sharp.** 1991. HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J.* **10**:4189-4196.
244. **Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-1438.
245. **Mattaj, I. W. and L. Englmeier.** 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:265-306.
246. **Mayeda, A., G. R. Sreaton, S. D. Chandler, X. D. Fu, and A. R. Krainer.** 1999. Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol. Cell Biol.* **19**:1853-1863.
247. **McNally, M. T. and K. Beemon.** 1992. Intronic sequences and 3' splice sites control Rous sarcoma virus RNA splicing. *J. Virol.* **66**:6-11.
248. **Merendino, L., S. Guth, D. Bilbao, C. Martinez, and J. Valcarcel.** 1999. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. *Nature* **402**:838-841.
249. **Michaud, S. and R. Reed.** 1991. An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev.* **5**:2534-2546.
250. **Mikaelian, I., M. Krieg, M. J. Gait, and J. Karn.** 1996. Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J. Mol. Biol.* **257**:246-264.
251. **Misteli, T.** 1999. RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr. Biol.* **9**:R198-R200.
252. **Misteli, T., J. F. Caceres, J. Q. Clement, A. R. Krainer, M. F. Wilkinson, and D. L. Spector.** 1998. Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J. Cell Biol.* **143**:297-307.
253. **Modrow, S. and D. Falke.** 1997. *Molekulare Virologie.* Spektrum Verlag.
254. **Moore, M. J., C. C. Query, and P. A. Sharp.** 1993. Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome, p. 303-357. In R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.), *The RNA World.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
255. **Mount, S. M., I. Pettersson, M. Hinterberger, A. Karmas, and J. A. Steitz.** 1983. The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell* **33**:509-518.
256. **Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky, and D. J. Capon.** 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**:450-458.

257. **Murray, H. L. and K. A. Jarrell.** 1999. Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell* **96**:599-602.
258. **Muthumani, K., A. Y. Choo, D. S. Hwang, M. A. Chattergoon, N. N. Dayes, D. Zhang, M. D. Lee, U. Duvvuri, and D. B. Weiner.** 2003. Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:583-592.
259. **Myers, G., B. Korber, B. H. Hahn, K. T. Jeang, J. W. Mellors, F. E. McCutchan, L. E. Henderson, and G. N. Pavlakis.** 1995. *Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences.* Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
260. **Najera, I., M. Krieg, and J. Karn.** 1999. Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J. Mol. Biol.* **285**:1951-1964.
261. **Nakielnny, S. and G. Dreyfuss.** 1996. The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J. Cell Biol.* **134**:1365-1373.
262. **Nasim, M. T., T. K. Chernova, H. M. Chowdhury, B. G. Yue, and I. C. Eperon.** 2003. HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. *Hum. Mol. Genet.* **12**:1337-1348.
263. **Nasioulas, G., A. S. Zolotukhin, C. Tabernero, L. Solomin, C. P. Cunningham, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1994. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J. Virol.* **68**:2986-2993.
264. **Nishi, K., M. Yoshida, D. Fujiwara, M. Nishikawa, S. Horinouchi, and T. Beppu.** 1994. Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**:6320-6324.
265. **O'Brien, T., S. Hardin, A. Greenleaf, and J. T. Lis.** 1994. Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* **370**:75-77.
266. **O'Day, C. L., G. Dalbadie-McFarland, and J. Abelson.** 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* Prp5 protein has RNA-dependent ATPase activity with specificity for U2 small nuclear RNA. *J. Biol. Chem.* **271**:33261-33267.
267. **O'Reilly, M. M., M. T. McNally, and K. L. Beemon.** 1995. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**:373-385.
268. **Ogert, R. A., L. H. Lee, and K. L. Beemon.** 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *J. Virol.* **70**:3834-3843.
269. **Ohno, M., M. Fornerod, and I. W. Mattaj.** 1998. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**:327-336.
270. **Otero, G. C., M. E. Harris, J. E. Donello, and T. J. Hope.** 1998. Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J. Virol.* **72**:7593-7597.
271. **Ott, M., M. Schnolzer, J. Garnica, W. Fischle, S. Emiliani, H. R. Rackwitz, and E. Verdin.** 1999. Acetylation of the HIV-1 tat protein by p300 is important for its transcriptional activity [In Process Citation]. *Curr. Biol.* **9**:1489-1492.
272. **Palangat, M., T. I. Meier, R. G. Keene, and R. Landick.** 1998. Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol. Cell* **1**:1033-1042.

273. **Palmiter, R. D., E. P. Sandgren, M. R. Avarbock, D. D. Allen, and R. L. Brinster.** 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:478-482.
274. **Pavlikis, G. N., S. Schwartz, D. M. Benko, C. M. Drysdale, L. Solomin, R. Robinson, J. Harrison, M. Campbell, and B. K. Felber.** 1991. Genome Organization and Regulation of HIV-1 Expression, p. 175-192. In W. A. Haseltine and F. Wong-Staal (eds.), *Genetic Structure and Regulation of HIV*. Raven Press, New York.
275. **Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill, and N. J. Deacon.** 2000. SURVEY AND SUMMARY A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucl. Acids. Res.* **28**:663-668.
276. **Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2**:256-263.
277. **Pinol Roma, S. and G. Dreyfuss.** 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**:730-732.
278. **Pollard, V. W. and M. H. Malim.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532:491-532.
279. **Price, D. H.** 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **20**:2629-2634.
280. **Puig, O., A. Gottschalk, P. Fabrizio, and B. Seraphin.** 1999. Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.* **13**:569-580.
281. **Purcell, D. F. and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-6378.
282. **Query, C. C., M. J. Moore, and P. A. Sharp.** 1994. Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev.* **8**:587-597.
283. **Query, C. C., S. A. Strobel, and P. A. Sharp.** 1996. Three recognition events at the branch-site adenine. *EMBO J.* **15**:1392-1402.
284. **Radu, A., G. Blobel, and M. S. Moore.** 1995. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:1769-1773.
285. **Rana, T. M. and K. T. Jeang.** 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**:175-185.
286. **Reed, R.** 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**:215-220.
287. **Reed, R.** 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:340-345.
288. **Reed, R. and K. Magni.** 2001. A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat. Cell Biol.* **3**:E201-E204.
289. **Reichert, V. L., H. Le Hir, M. S. Jurica, and M. J. Moore.** 2002. 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev.* **16**:2778-2791.

290. **Reines, D., R. C. Conaway, and J. W. Conaway.** 1999. Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:342-346.
291. **Robberson, B. L., G. J. Cote, and S. M. Berget.** 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell Biol.* **10**:84-94.
292. **Robert Guroff, M., M. Popovic, S. Gartner, P. Markham, R. C. Gallo, and M. S. Reitz.** 1990. Structure and expression of *tat*-, *rev*-, and *nef*-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* **64**:3391-3398.
293. **Rodrigues, J. P., M. Rode, D. Gatfield, B. J. Blencowe, M. Carmo-Fonseca, and E. Izaurralde.** 2001. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:1030-1035.
294. **Rogers, J. and R. Wall.** 1980. A mechanism for RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**:1877-1879.
295. **Romfo, C. M., C. J. Alvarez, W. J. van Heeckeren, C. J. Webb, and J. A. Wise.** 2000. Evidence for splice site pairing via intron definition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **20**:7955-7970.
296. **Roscigno, R. F. and M. A. Garcia-Blanco.** 1995. SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA.* **1**:692-706.
297. **Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:2071-2075.
298. **Roth, M. B., A. M. Zahler, and J. A. Stolk.** 1991. A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* **115**:587-596.
299. **Roy, S., U. Delling, C. H. Chen, C. A. Rosen, and N. Sonenberg.** 1990. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* **4**:1365-1373.
300. **Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus *tat* protein. *J. Virol.* **63**:1-8.
301. **Ruby, S. W., T. H. Chang, and J. Abelson.** 1993. Four yeast spliceosomal proteins (PRP5, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-mRNA. *Genes Dev.* **7**:1909-1925.
302. **Russell, S. M., R. L. Sparrow, I. F. McKenzie, and D. F. Purcell.** 1992. Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. *Eur. J Immunol.* **22**:1513-1518.
303. **Ryu, W. S. and J. E. Mertz.** 1989. Simian virus 40 late transcripts lacking excisable intervening sequences are defective in both stability in the nucleus and transport to the cytoplasm. *J. Virol.* **63**:4386-4394.
304. **Salfeld, J., H. G. Gottlinger, R. A. Sia, R. E. Park, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. A tripartite HIV-1 *tat-env-rev* fusion protein. *EMBO J.* **9**:965-970.
305. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
306. **Schaal, H., M. Klein, P. Gehrman, O. Adams, and A. Scheid.** 1995. Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J. Virol.* **69**:3308-3314.

307. **Schaal, H., P. Pfeiffer, M. Klein, P. Gehrman, and A. Scheid.** 1993. Use of DNA end joining activity of a *Xenopus laevis* egg extract for construction of deletions and expression vectors for HIV-1 Tat and Rev proteins. *Gene* **124**:275-280.
308. **Schaal, T. D. and T. Maniatis.** 1999. Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* **19**:261-273.
309. **Schaal, T. D. and T. Maniatis.** 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell Biol.* **19**:1705-1719.
310. **Schmucker, D., J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao, M. Muda, J. E. Dixon, and S. L. Zipursky.** 2000. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**:671-684.
311. **Schutt, C. and R. Nothiger.** 2000. Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* **127**:667-677.
312. **Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J. Virol.* **66**:7176-7182.
313. **Schwartz, S., B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:2519-2529.
314. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**:5448-5456.
315. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**:677-686.
316. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol.* **66**:150-159.
317. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **12**:207-219.
318. **Schwer, B.** 2001. A new twist on RNA helicases: DExH/D box proteins as RNAPases. *Nat. Struct. Biol.* **8**:113-116.
319. **Schwer, B. and C. H. Gross.** 1998. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**:2086-2094.
320. **Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt.** 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* **16**:3256-3271.
321. **Seidel, K.** 1997. Der Einfluß von HIV-1 Splicesites auf die Rev-vermittelte env Expression. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
322. **Selden, R. F., K. B. Howie, M. E. Rowe, H. M. Goodman, and D. D. Moore.** 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell Biol.* **6**:3173-3179.
323. **Senapathy, P., M. B. Shapiro, and N. L. Harris.** 1990. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol.* **183**:252-278.

324. **Shapiro, M. B. and P. Senapathy.** 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* **15**:7155-7174.
325. **Shatkin, A. J. and J. L. Manley.** 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* **7**:838-842.
326. **Sheldon, M., R. Ratnasabapathy, and N. Hernandez.** 1993. Characterization of the inducer of short transcripts, a human immunodeficiency virus type 1 transcriptional element that activates the synthesis of short RNAs. *Mol. Cell Biol.* **13**:1251-1263.
327. **Shilatifard, A., R. C. Conaway, and J. W. Conaway.** 2003. The RNA Polymerase II Elongation Complex. *Annu. Rev. Biochem.*
328. **Shin, C. and J. L. Manley.** 2002. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* **111**:407-417.
329. **Shyu, A. B. and M. F. Wilkinson.** 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* **102**:135-138.
330. **Si, Z. H., B. A. Amendt, and C. M. Stoltzfus.** 1997. Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon. *Nucleic. Acids. Res.* **25**:861-867.
331. **Si, Z. H., D. Rauch, and C. M. Stoltzfus.** 1998. The exon splicing silencer in human immunodeficiency virus type 1 Tat exon 3 is bipartite and acts early in spliceosome assembly. *Mol. Cell Biol.* **18**:5404-5413.
332. **Smith, C. A., S. Crotty, Y. Harada, and A. D. Frankel.** 1998. Altering the Context of an RNA Bulge Switches the Binding Specificities of Two Viral Tat Proteins. *Biochemistry* **37**:10808-10814.
333. **Smith, C. W., T. T. Chu, and B. Nadal Ginard.** 1993. Scanning and competition between AGs are involved in 3' splice site selection in mammalian introns. *Mol. Cell Biol.* **13**:4939-4952.
334. **Smith, C. W. and J. Valcarcel.** 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**:381-388.
335. **Sodroski, J., R. Patarca, C. Rosen, F. Wong Staal, and W. Haseltine.** 1985. Location of the trans-activating region on the genome of human T- cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**:74-77.
336. **Sodroski, J., C. Rosen, F. Wong Staal, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, S. Arya, R. C. Gallo, and W. A. Haseltine.** 1985. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* **227**:171-173.
337. **Soltaninassab, S. R., J. G. McAfee, L. Shahied-Milam, and W. M. LeSturgeon.** 1998. Oligonucleotide binding specificities of the hnRNP C protein tetramer. *Nucleic Acids Res.* **26**:3410-3417.
338. **Spector, D. L.** 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:265-315.
339. **Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie, and K. Weis.** 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041-1050.
340. **Staffa, A. and A. Cochrane.** 1994. The tat/rev intron of human immunodeficiency virus type 1 is inefficiently spliced because of suboptimal signals in the 3' splice site. *J. Virol.* **68**:3071-3079.

341. **Staffa, A. and A. Cochrane.** 1995. Identification of positive and negative splicing regulatory elements within the terminal tat-rev exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **15**:4597-4605.
342. **Staknis, D. and R. Reed.** 1994. 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.* **14**:7670-7682.
343. **Staley, J. P. and C. Guthrie.** 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**:315-326.
344. **Staley, J. P. and C. Guthrie.** 1999. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol. Cell* **3**:55-64.
345. **Sterner, D. A., T. Carlo, and S. M. Berget.** 1996. Architectural limits on split genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:15081-15085.
346. **Sterner, D. E. and S. L. Berger.** 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:435-+.
347. **Strasser, K. and E. Hurt.** 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* **413**:648-652.
348. **Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-730.
349. **Streuli, M. and H. Saito.** 1989. Regulation of tissue-specific alternative splicing: exon-specific cis-elements govern the splicing of leukocyte common antigen pre-mRNA. *EMBO J* **8**:787-796.
350. **Stutz, F., A. Bachi, T. Doerks, I. C. Braun, B. Seraphin, M. Wilm, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2000. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA*. **6**:638-650.
351. **Stutz, F. and M. Rosbash.** 1994. A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *EMBO J.* **13**:4096-4104.
352. **Sutton, R. E. and J. C. Boothroyd.** 1986. Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* **47**:527-535.
353. **Swanson, A. K. and C. M. Stoltzfus.** 1998. Overlapping cis sites used for splicing of HIV-1 env/nef and rev mRNAs. *J. Biol. Chem.* **273**:34551-34557.
354. **Tacke, R., Y. Chen, and J. L. Manley.** 1997. Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:1148-1153.
355. **Tacke, R. and J. L. Manley.** 1995. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J.* **14**:3540-3551.
356. **Tacke, R. and J. L. Manley.** 1999. Determinants of SR protein specificity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:358-362.
357. **Talerico, M. and S. M. Berget.** 1994. Intron definition in splicing of small *Drosophila* introns. *Mol. Cell Biol.* **14**:3434-3445.
358. **Tan, R., L. Chen, J. A. Buettner, D. Hudson, and A. D. Frankel.** 1993. RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* **73**:1031-1040.

359. **Tan, W., M. Schalling, C. Zhao, M. Luukkonen, M. Nilsson, E. M. Fenyo, G. N. Pavlakis, and S. Schwartz.** 1996. Inhibitory activity of the equine infectious anemia virus major 5' splice site in the absence of Rev. *J. Virol.* **70**:3645-3658.
360. **Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, and J. Kjems.** 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J.* **20**:5748-5758.
361. **Tange, T. O., T. H. Jensen, and J. Kjems.** 1996. In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J. Biol. Chem.* **271**:10066-10072.
362. **Tange, T. O. and J. Kjems.** 2001. SF2/ASF binds to a splicing enhancer in the third HIV-1 tat exon and stimulates U2AF binding independently of the RS domain. *J. Mol. Biol.* **312**:649-662.
363. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1994. SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. *Genes Dev.* **8**:2704-2717.
364. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1995. Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:2504-2508.
365. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1996. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* **84**:801-811.
366. **Taube, R., K. Fujinaga, J. Wimmer, M. Barboric, and B. M. Peterlin.** 1999. Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology* **264**:245-253.
367. **Teigelkamp, S., E. Whittaker, and J. D. Beggs.** 1995. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.* **23**:320-326.
368. **Thomas, G., M. Siegmann, P. D. Bowman, and J. Gordon.** 1977. The isolation and analysis of polysomes and ribosomal RNA from cells growing in monolayer culture. *Exp. Cell Res.* **108**:253-258.
369. **Thomas, S. L., M. Oft, H. Jaksche, G. Casari, P. Heger, M. Dobrovnik, D. Bevec, and J. Hauber.** 1998. Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J. Virol.* **72**:2935-2944.
370. **Tian, H.** 2001. RNA ligands generated against complex nuclear targets indicate a role for U1 snRNP in co-ordinating transcription and RNA splicing. *FEBS Lett.* **509**:282-286.
371. **Tian, M. and T. Maniatis.** 1994. A splicing enhancer exhibits both constitutive and regulated activities. *Genes Dev.* **8**:1703-1712.
372. **Truant, R. and B. R. Cullen.** 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell Biol.* **19**:1210-1217.
373. **Vedeler, A., I. F. Pryme, and J. E. Hesketh.** 1991. The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krebs II ascites and 3T3 cells. *Mol. Cell Biochem.* **100**:183-193.
374. **Wagner, E. and J. Lykke-Andersen.** 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* **115**:3033-3038.
375. **Wagner, E. J. and M. A. Garcia-Blanco.** 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol. Cell Biol.* **21**:3281-3288.

376. **Wang, J., S. H. Xiao, and J. L. Manley.** 1998. Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev.* **12**:2222-2233.
377. **Wang, X., M. Poh-Fitzpatrick, D. Carriero, L. Ostasiewicz, T. Chen, S. Taketani, and S. Piomelli.** 1993. A novel mutation in erythropoietic protoporphyria: an aberrant ferrochelatase mRNA caused by exon skipping during RNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* **1181**:198-200.
378. **Weeks, K. M., C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Steitz, and D. M. Crothers.** 1990. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* **249**:1281-1285.
379. **Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones.** 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-462.
380. **Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor.** 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**:463-473.
381. **Wentz, M. P., B. E. Moore, M. W. Cloyd, S. M. Berget, and L. A. Donehower.** 1997. A naturally arising mutation of a potential silencer of exon splicing in human immunodeficiency virus type 1 induces dominant aberrant splicing and arrests virus production. *J. Virol.* **71**:8542-8551.
382. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 1997. Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:320-328.
383. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 2001. Molecular biology. RNP remodeling with DExH/D boxes. *Science* **291**:1916-1917.
384. **Will, C. L., C. Schneider, A. M. MacMillan, N. F. Katopodis, G. Neubauer, M. Wilm, R. Luhrmann, and C. C. Query.** 2001. A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J.* **20**:4536-4546.
385. **Will, C. L., C. Schneider, R. Reed, and R. Luhrmann.** 1999. Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes. *Science* **284**:2003-2005.
386. **Wise, J. A.** 1993. Guides to the heart of the spliceosome [comment]. *Science* **262**:1978-1979.
387. **Wolff, B., J. J. Sanglier, and Y. Wang.** 1997. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo- cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**:139-147.
388. **Wu, J. Y. and T. Maniatis.** 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**:1061-1070.
389. **Wu, S., C. M. Romfo, T. W. Nilsen, and M. R. Green.** 1999. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**:832-835.
390. **Xiao, H., C. Neuveut, M. Benkirane, and K. T. Jeang.** 1998. Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**:384-389.
391. **Xiao, S. H. and J. L. Manley.** 1998. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**:6359-6367.
392. **Xu, R., J. Teng, and T. A. Cooper.** 1993. The cardiac troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element. *Mol. Cell Biol.* **13**:3660-3674.
393. **Yang, Y., I. Tikhonov, T. J. Ruckwardt, M. Djavani, J. C. Zapata, C. D. Pauza, and M. S. Salvato.** 2003. Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected

- CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *J Virol* **77**:6700-6708.
394. **Zapp, M. L. and M. R. Green.** 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-716.
395. **Zapp, M. L., T. J. Hope, T. G. Parslow, and M. R. Green.** 1991. 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.* **88**:7734-7738.
396. **Zenklusen, D. and F. Stutz.** 2001. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* **498**:150-156.
397. **Zhang, D. and M. Rosbash.** 1999. Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex. *Genes Dev.* **13**:581-592.
398. **Zhang, L. and C. M. Stoltzfus.** 1995. A suboptimal src 3' splice site is necessary for efficient replication of Rous sarcoma virus. *Virology* **206**:1099-1107.
399. **Zheng, X., K. Kelley, H. Elnakat, W. Yan, T. Dorn, and M. Ratnam.** 2003. mRNA Instability in the Nucleus Due to a Novel Open Reading Frame Element Is a Major Determinant of the Narrow Tissue Specificity of Folate Receptor {alpha}. *Mol. Cell. Biol.* **23**:2202.
400. **Zhou, M., M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price, and J. N. Brady.** 2000. Tat modifies the activity of CDK9 To phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription [In Process Citation]. *Mol. Cell Biol.* **20**:5077-5086.
401. **Zhou, Z., M. J. Luo, K. Straesser, J. Katahira, E. Hurt, and R. Reed.** 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**:401-405.
402. **Zhu, J., A. Mayeda, and A. R. Krainer.** 2001. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol. Cell* **8**:1351-1361.
403. **Zhu, Y., Pe, J. Peng, Y. Ramanathan, N. Marshall, T. Marshall, B. Amendt, M. B. Mathews, and D. H. Price.** 1997. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* **11**:2622-2632.
404. **Zhuang, Y. and A. M. Weiner.** 1986. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**:827-835.
405. **Zhuang, Y. A., A. M. Goldstein, and A. M. Weiner.** 1989. UACUAAC is the preferred branch site for mammalian mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:2752-2756.
406. **Zolotukhin, A. S. and B. K. Felber.** 1999. Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J. Virol.* **73**:120-127.
407. **Zorio, D. A. and T. Blumenthal.** 1999. Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **402**:835-838.

Publikationen

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert oder auf Tagungen vorgestellt.

Originalpublikationen:

Kammler S., Leurs C., Freund M., Krummheuer J., Seidel K., Tange T.O., Lund M.K., Kjems J., Scheid A., Schaal H. The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA RNA, 2001 Mar;7(3):421-34.

Krummheuer J., Lenz C., Kammler S., Scheid A., Schaal H. Influence of the small leader exons 2 and 3 on Human immunodeficiency virus type 1 gene expression Virology. 2001 Aug 1;286(2):276-89

Freund M., Asang C., Kammler S., Konermann C., Krummheuer J., Hipp M., Meyer I., Gierling W., Theiss S., Preuss T., Schindler D., Kjems J., Schaal H. A novel approach to describe a U1 snRNA binding site; Nucleic Acids Res. 2003 Dec 1;31(23):6963-75.

Caputi M., Freund M., Kammler S., Asang C., Schaal H. A bidirectional SR protein-dependent exonic splicing enhancer regulates Rev-mediated HIV-1 env gene expression J.Virology, submitted

Poster:

Kammler S., Leurs C., Seidel K., Krummheuer J., Schaal H., Scheid A. The sequence complementarity of the HIV-1 5' splice site SD4 and of U1 snRNA determines the steady-state level of an instable env pre-mRNA; Eucaryotic mRNA processing, Cold Spring Harbor, New York, 25-29/08/1999

Freund M., Kammler S., Hipp M., Krummheuer J., Meyer I., Kjems J., Gierling W., Schaal H. Redefining a consensus for the 5' splice site. Eucaryotic mRNA processing, Cold Spring Harbor, New York, 22-26/08/2001

Freund M., Kammler S., Hipp M., Meyer I., Krummheuer J., Schaal H. Splice site-dependent Rev-mediated HIV-1 env gene expression Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08-11/04/2002

Krummheuer J., Kammler S., Asang C., Schaal H. An upstream open reading frame enhances downstream translation of HIV-1 rev and env Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08-11/04/2002

Kammler S., Stosik M., Freund M., Meyer I., Kjems J., Schaal H. Intrinsic differences in 5' and 3' splice site requirements for HIV-1 Rev response Retroviruses, Cold Spring Harbor, New York, 21-26/05/2002

Schaal H., Freund M., Kammler S., Asang C., Caputi M. A bidirectional SR protein-dependent exonic splicing enhancer regulates Rev-mediated HIV-1 env gene expression 8th Annual Meeting of the RNA Society, Vienna, Austria, 01-06/06/2003

LebenslaufDüsseldorf, 09.12.2003

Susanne Kammler

Dienstanschrift: Institut für Virologie,
Universitäts-Klinikum Düsseldorf
Universitätsstr.1
40225 Düsseldorf

Tel.:(0049)-211 81 14546
e-mail:kammler.s@web.de

Privatanschrift: Kronprinzenstr. 132
40217 Düsseldorf

Persönliche Daten:

Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 29.05.1971
Geburtsort: Duisburg

Ausbildung:**10/1990-10/1997: Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Vordiplom am 16/04/93
Diplom am 05/09/1997

Diplomthema: Untersuchungen zum Einfluss der frühen HIV-1 Proteine Rev und Nef auf die *env*-Genexpression;
ausgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie;
AG Prof. Dr. A. Scheid.

10/1997-2003 Promotionsstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Promotionsthema: Der Einfluss von Spleißstellen auf die Rev- abhängige HIV-1 *env*-Genexpression;
ausgeführt am Institut für Virologie des Universitäts-Klinikums Düsseldorf;
AG (Prof. Dr. A. Scheid, †), PD Dr. H. Schaal

Berufliche Tätigkeiten:

10/1997-2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf im Rahmen der Promotionsarbeit

06-12/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf, PD Dr. H. Hahnenberg

Sonstiges:

06-07/1998 Kurzzeit-Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds
für ein Labor-Praktikum am Institut für Strukturelle und Molekulare Biologie,
Prof. Dr. J. Kjems, Universität Aarhus, Dänemark

04/2001-04/2002 Promotions-Stipendium der Graduiertenförderung NRW