

Der Einfluss unterschiedlicher Leadersequenzen
auf die HIV-1 Genexpression

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Jörg Krummheuer

aus Solingen

Düsseldorf

2004

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: 22.07.2004

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf ausgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle

zuallererst Herrn PD Dr. Heiner Schaal für das interessante Thema, für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine vielfältigen Anregungen und für die Extraportion Motivation und Optimismus.

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

PD. Dr. Ortwin Adams, Corinna Asang, Martina Austrup, Volker Budinger, Marcel Freund, Marianne Hipp, Carolin Konermann, Dr. Cathrin Krempe, Imke Meyer, Kornelia Neveling, Magdalena Stosik und Maria Thieme für die konstruktive Zusammenarbeit und für die kollegiale Hilfe.

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologie für die angenehme Atmosphäre im Labor.

Prof. Dr. Jorgen Kjems und Dr. Torben Heick Jensen, für lehrreiche Tage an der Universität Aarhus und für ihre Gastfreundschaft.

Susanne Kammler für ihre Geduld und ihre fachlichen Ratschläge.

und meinen Eltern für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Einheiten.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Replikationszyklus von HIV-1	1
1.2 HIV-1 Proteine.....	2
1.3 Regulation der Genexpression bei HIV-1	9
1.3.1 RNA-Stabilität.....	9
1.3.1.1 Capping und Polyadenylierung	9
1.3.1.2 Zytoplasmatischer RNA-Abbau	10
1.3.1.3 Nukleärer RNA-Abbau.....	12
1.3.1.4 Erkennung fehlerhafter oder fremder RNA.....	13
1.3.1.4.1 Durch frühe Stoppkodons vermittelter RNA-Abbau	14
1.3.1.4.2 Durch fehlende Stoppkodons vermittelter RNA-Abbau	14
1.3.1.4.3 Abbau durch Erkennung von dsRNA-Abschnitten	15
1.3.1.5 Regulation der RNA-Stabilität über AU-reiche Elemente	16
1.3.1.6 ARE-bindende Proteine.....	16
1.3.1.7 Cis-wirkende RNA-Sequenzen in HIV-1 RNAs	18
1.3.1.8 Leadersequenzen subgenomischer HIV-1 RNAs	19
1.3.2 Translationale Regulation.....	20
1.3.2.1 „Leaky scanning“ von HIV-1 Transkripten.....	21
1.3.2.2 5'-wärts gelegene offene Leserahmen (uORFs)	23
1.3.2.3 uORFs in nicht linearen Translationsmechanismen	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Oligonukleotide.....	27
2.2 Rekombinante Plasmide.....	29
2.2.1 Plasmide der LTR1.4E Familie.....	29
2.2.2 Plasmide zur RRE-Analyse.....	30
2.2.3 Plasmide mit Exon 2- und Exon 3-Sequenz im Intron	31
2.2.4 Plasmide mit INS, INS ^{GC} und Exon 3 ^{GC} -Sequenz im Intron.....	31
2.2.5 Plasmide für die <i>in vitro</i> Transkription.....	31
2.2.6 Plasmide der uORF-Längen-Serie	33
2.2.7 Plasmide der intercistronischen Abstandsserie	34

2.2.8	Plasmide der AUG-Stärkenanalyse.....	34
2.2.9	Plasmide zur Untersuchung der uORF-AUG-Erkennung	34
2.2.10	Plasmide der 1.5-Serie.....	35
2.2.11	Plasmide der 1.3ΔSD3-Serie.....	35
2.2.12	Plasmide der 1.4-Serie.....	36
2.2.13	Reporterplasmide für die Tat- und Rev-Messung	37
2.2.14	Plasmide zur Kotransfektion.....	37
2.3	Rekombinante DNA-Techniken.....	37
2.3.1	Restriktionsendonukleolytische Fragmentierung	38
2.3.2	Klonierungs-PCR	38
2.3.3	Ligation	38
2.3.4	Nahtlose Ligation.....	39
2.3.5	Kompetente <i>E. coli</i>	39
2.3.6	Transformation.....	40
2.4	Analytische und präparative Plasmid-Isolierung	40
2.5	Zellkultur	41
2.5.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	41
2.5.2	Transfektion von HeLa-Zellen mittels Elektroporation.....	41
2.5.3	Transfektion von HeLa-Zellen mittels Fugene™ 6	42
2.6	β-Galaktosidase Färbung.....	42
2.7	Normierung der Transfektions-Effizienz	42
2.8	Dualer Luziferaseassay.....	43
2.9	Protein-Bestimmung nach Bradford.....	44
2.10	Na-Dodecylsulfat-Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.11	Reversible Zink-Imidazol-Färbung von SDS Polyacrylamidgelen.....	44
2.12	Western Blot.....	45
2.13	CAT-ELISA	45
2.14	Isolierung von Gesamt-RNA	46
2.15	Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA mit hypotonischem Lysispuffer mit Natriumdeoxycholat und Triton-X-100	46
2.16	Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA mit NP-40 Lysispuffer	47
2.17	Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA über Dounce Präparation nach Dignam	47
2.18	Isolierung polyadenylierter RNA.....	48

2.19	Evaluierung der Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA im Slotblot	48
2.20	Northern Blot-Analyse	48
2.21	Prokaryontische <i>in vitro</i> Transkription	49
2.22	Renaturierung der Transkripte	50
2.23	nukleärer <i>in vitro</i> Degradationsassay	51
2.24	Rev/RRE-Shift	51
2.25	Eukaryontische <i>in vitro</i> Transkription	51
2.26	Analyse der Cappingeffizienz	52
2.27	UV-Quervernetzungsanalysen (UV-crosslink)	52
2.28	Protein-Affinitätspräzipitation (Pull-down)	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Die nicht kodierenden HIV-1 Leaderexons 2 und 3	55
3.1.1	Analyse der Leaderexon-vermittelten Genexpression <i>in vivo</i>	56
3.1.1.1	Die Leaderexon-vermittelte Variation der RNA-Menge ist unabhängig von den 3'-wärts gelegenen Sequenzen	57
3.1.1.2	Die expressionsfördernde Wirkung des Exons 2 ist positionsabhängig	59
3.1.1.3	Beeinflussung der Expression nach Positionierung der kleinen nicht kodierenden Exons in einem Intron	60
3.1.2	Beeinflussung der Expression durch RRE-Sequenzen	63
3.1.2.1	Die Rev-Bindung erfolgt in Abhängigkeit von Stamm 2b, die Multimerisierung benötigt Stamm1	64
3.1.2.2	Unterschiedliche theoretische RRE-Strukturen beeinflussen die Expression von CAT-Konstrukten	66
3.1.3	Beeinflussung der CAT-Reportergen-Expression durch die Gegenwart eines Introns in Anwesenheit des RREs	69
3.1.4	Beeinflussung der CAT-Reportergen-Expression durch die Gegenwart der Leaderexonsequenzen als Intron in Anwesenheit des RREs	70
3.1.5	Der AU-Gehalt der RNA beeinflusst die RNA-Menge	76
3.1.6	Analyse der Leadersequenz-vermittelten RNA-Mengenunterschiede <i>in vitro</i>	82
3.1.6.1	Transkription der nicht kodierenden Exons in HeLa-Kernextrakt	82
3.1.6.2	Analyse der Capping-Effizienz in Abhängigkeit von den Leaderexonsequenzen	83
3.1.6.3	Ein <i>in vitro</i> Degradationsassay zur Bestimmung der nukleären RNA-Stabilität	85

3.1.6.3.1	Eine <i>in vitro</i> Untersuchung des RNA-Abbaus abhängig von Magnesium-Konzentration und unterschiedlichen zellulären Fraktionen.....	85
3.1.6.3.2	Analyse der Leaderexonsequenzen <i>in vitro</i> im nukleären Degradationsassay ..	87
3.1.6.3.3	Analyse des destabilisierenden Elementes INS1 im nukleären Degradationsassay.....	90
3.1.6.4	Analyse der Interaktion von Proteinen des Kernextrakts mit den Leadersequenzen	92
3.1.6.4.1	Nachweis der Protein-RNA-Interaktion im Kernextrakt über UV-Quervernetzung.....	93
3.1.6.4.2	Nachweis der Protein/RNA-Interaktion im Kernextrakt über Affinitätspräzipitation.....	94
3.1.6.4.3	Nachweis der AUF1-RNA Interaktion mittels Western Blot	97
3.1.6.4.4	Nachweis der HuR/RNA-Interaktion mittels Western Blot.....	97
3.2	Ein kurzer offener Leserahmen im Leader kann die Expression 3'-wärts liegender Leserahmen stimulieren.....	99
3.2.1	Die uORF vermittelte Expressionssteigerung 3'-wärts positionierter Leserahmen ist Promotor-unabhängig.....	101
3.2.2	Verschiedene Eigenschaften des uORFs modulieren die Wirkung auf 3'-wärts liegende Leserahmen	101
3.2.2.1	Die Länge des uORFs beeinflusst die Translation 3'-wärts liegender Leserahmen	103
3.2.2.2	Eine Verlängerung des intercistronischen Abstands reduziert die Rev-Expression .	104
3.2.2.3	Analyse der uORF-AUG-umgebenden Sequenzen.....	106
3.2.2.3.1	Unterschiede in der uORF-Translationsinitiationseffizienz beeinflussen die Translation 3'-wärts liegender Leserahmen.....	108
3.2.3	uORFs verändern das Expressionsprofil authentischer HIV-1 Transkripte	111
3.2.3.1	Der Minimal-uORF 5'-wärts des <i>vpu</i> -AUGs begünstigt die effiziente Env-Expression von <i>vpu-env</i> -Transkripten.....	111
3.2.3.2	Eine Mutation des <i>vpr</i> -AUGs generiert uORFs, welche die Transkription 3'-wärts gelegener Leserahmen stimulieren.....	113
3.2.3.3	Ein uORF von 24 Kodons im HIV-Exon 1 stimuliert die Rev- und Env-Expression.	116
4	Diskussion.....	119
4.1	Der HIV-1-Leader moduliert die Menge der mRNA.....	119
4.1.1	Der HIV-1-Leader moduliert die nukleäre RNA-Menge	120
4.1.2	Der HIV-1-Leader moduliert die nukleäre RNA-Menge vor dem Spleißen.....	121
4.1.3	Einfluss der RRE-Strukturen auf mRNA-Menge und Rev-Funktion.....	122

4.1.4	Mögliche zeitliche Eingrenzung der Wirkung der kleinen nichtkodierenden Exons durch die Rev/RRE-Interaktion	126
4.1.5	RNA-Degradation <i>in vitro</i>	128
4.1.5.1	Cap-Abhängigkeit.....	129
4.1.6	Exon 3 und INS können zu den Typ III ARE gezählt werden.....	130
4.1.7	Interaktion der ARE mit spezifischen Proteinkomponenten.....	132
4.1.8	Modell.....	134
4.1.9	Perspektive	135
4.2	Einfluss der Leadersequenzen auf die Translation	136
4.2.1	Einfluss der uORF-Länge auf die Rev-Expression	137
4.2.2	Einfluss des intercistronischen Abstands auf die Rev-Expression	140
4.2.3	Einfluss der uORF Translationsinitiationsstelle auf die Rev-Expression	141
4.2.4	Analyse des Einflusses möglicher uORFs auf die HIV-1-Expression	142
4.2.4.1	Der <i>vpr</i> -ORF stimuliert die Translation 3'-wärts liegender ORFs nicht.....	142
4.2.4.2	Ein Minimal-uORF in der 5'-Umgebung des <i>vpu</i> AUGs fördert die <i>env</i> -Expression	143
4.2.4.3	Ein RNA-Editing im 5'-Leader kann die Inhibition der Translation von Rev durch das effiziente <i>tat</i> -AUG umgehen.....	144
4.2.5	Modell zum Einfluss eines uORFs auf die Translation 3'-wärts gelegener Leserahmen in einer polycistronischen HIV-1 mRNA.....	144
4.2.6	Perspektive	145
5	Zusammenfassung	147
	Literaturverzeichnis	149
	Publikationen.....	175
	Lebenslauf.....	177

Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom (aquired immunodeficiency syndrome)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Rinder Serum Albumin (Bovine Serum Albumine)
c	komplementär (complementary)
ca	zirka
cpm	Zählungen pro minute (counts per minute)
CRS	cis-wirkende repressive Sequenz
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
ddH ₂ O	deionisiertes, doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMDC	Dimethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
<i>e.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
eEF	eukaryontischer Elongationsfaktor
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
Env	Hüllprotein (envelope)
ER	endoplasmatisches Retikulum
eRF	eukaryontischer Terminationsfaktor
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
Gag	gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HEPES	(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
hGH	humanes Wachstumshormon (human growth hormone)
HIV-1	Humanes-Immundefizienz-Virus Typ1
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
IFN	Interferon
INS	inhibitorische Sequenz
IL	Interleukin
IR	inhibitorische Region
Konz.	Konzentration
lacZ	Gen der β -Galaktosidase
LB-Medium	Luria Bertani Medium

Abkürzungen und Einheiten

LTR	Lange endständige Sequenzwiederholungen (long terminal repeats)
Luc	Luziferase
MA	Matrix
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
MOPS	4-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MW	Molekulargewicht
NC	Nukleocapsid
Nef	negative factor
norm.	normiert
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PKR	(ds)RNA aktivierte Proteinkinase
POD	Peroxidase
Pol	Gen der viralen Enzyme (polymerase)
poly(A)	polyadenyl-
R	Repeat
Rev	Regulator of virion protein expression
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen (rounds per minute)
RRE	Rev responsive element
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natrium Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SIV	Affen-Immundefizienz-Virus (simian immunodeficiency virus)
sj	Spleißnahtstelle (splice junction)
s.o.	siehe oben
SP6	Promotor des SP6 Phagen
SSC	Standard Saline Citrate Puffer
s.u.	siehe unten
SV40	Simian Virus 40
t	Zeit (Time)
T3	Promotor des T3 Phagen
T7	Promotor des T7 phagen
Tab.	Tabelle
TAR Region	Transactivation responsive region
Tat	Transactivator of transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TE	Tris-EDTA Puffer
TH	T-Helfer Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure (transfer ribonucleic acid)
U3	unique 3'-Ende
U5	unique 5'-Ende
uORF	kleiner 5'-wärts gelegener Leserahmen (upstream open reading frame)

UTP	Uridine -5'-Triphosphate
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
Vpr	Virion protein R
Vpu	Virion protein U
w	Gewicht (weight)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel

Einheiten:

b	Base	m	Meter, milli
bp	Basenpaare	min	Minute
c	zenti	μ	mikro
°C	Grad Celsius	n	nano
ci	Curie	n x g	n-fache Erdbeschleunigung
cpm	counts per minute	nt	Nukleotid
Da	Dalton	OD	optische Dichte
F	Farad	p	piko
g	Gramm	pH	Konz. der H ⁺ Ionen (potentia hydrogenii)
h	Stunde	RLU	relative Lichteinheiten (relative light units)
J	Joule	S	Svedberg
k	Kilo	sek	Sekunde
kb	Kilobasen	U	Unit
l	Liter	V	Volt
M	Molar	W	Watt
mol	Molekulargewicht (U)		

Buchstabenkode der Basen:

A	Adenin	C:	Cytosin
G:	Guanosin	T:	Thymin
U:	Uracil		
R:	Purin (A/G)	Y:	Pyrimidin (C/T)
K:	Keto (G/T)	M:	Amino (A/C)
S:	strong bounds (G/C)	W:	weak bounds (A/T)

1 Einleitung

1.1 Replikationszyklus von HIV-1

Zu Beginn der 80er Jahre wurde in den USA erstmalig das Krankheitsbild des erworbenen Immunschwäche Syndroms (AIDS) beschrieben [113]. Als ätiologisches Agens wurde ein Retrovirus identifiziert, das später Humanes Immundefizienz Virus (HIV) genannt wurde [57]. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Erkrankung laut Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu einer Pandemie mit rund 40 Millionen Infizierten geworden. Allein im Jahr 2003 fielen ihr 3 Millionen Menschen zum Opfer (<http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2003/en/>) [311].

Das Humane Immundefizienz Virus vom Typ 1 (HIV-1) ist ein komplexes Retrovirus und gehört zur Familie der Lentiviren (Abb. 1A) [48;57;112;119]. Das Virus gelangt über die Interaktion des viralen Hüllproteins Env mit dem zellulären Rezeptor CD4 [63] und einem CCR5- bzw. CXCR4-Chemokin-Rezeptor [6;17;73;86] in die Zelle (für eine Übersicht siehe: [184;310]) (Abb. 1B). Nach der reversen Transkription der viralen (+)Strang RNA durch das virale, Capsid-assoziierte Enzym Reverse Transkriptase (RT) gelangt die so entstandene doppelsträngige (ds) DNA in den Zellkern [40;62;94]. Dort wird sie durch die Virus-kodierte und Virion-assoziierte Integrase (IN) stabil in das Genom der Wirtszelle integriert [36;61]. An seinem 5'- und 3'-Ende wird das provirale Genom von langen direkten Sequenzwiederholungen (Long Terminal Repeats, LTR) begrenzt, die während der reversen Transkription aus den endständigen Sequenzwiederholungen R (Repeat) sowie der U5- (unique 5'-end) und der U3- (unique 3'-end) Sequenz entstehen. Im proviralen Genom werden Bereiche des 5'-LTRs als transaktivierbarer Promotor und Bereiche des 3'-LTRs als Polyadenylierungssignal genutzt [10;160;241]. Die inserierte provirale HIV-1 Sequenz hat eine Größe von ca. 9,8 kb. Von ihr wird eine polycistronische prä-mRNA transkribiert, die 15 Proteine kodiert. Die Expression der HIV-1 Proteine von zum Teil überlappenden oder in Intronsequenzen liegenden Leserahmen erfordert eine Regulation auf postranskriptionaler Ebene durch alternatives und unvollständiges Spleißen (Abb. 2). Diese zeitlich abgestimmte, differenzielle Spleißregulation führt zur Bildung von mehr als 30 verschiedenen HIV-1 mRNAs. In der frühen Infektionsphase werden zunächst vollständig gespleißte RNAs der sogenannten 1,8 kb-Klasse prozessiert, die für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und für Nef kodieren [97]. Im Rahmen der späten

Phase der Infektion kommt es durch die Regulation des Rev-Proteins zum Export von RNAs der 4 kb-Klasse bzw. von ungespleißten RNAs in das Zytoplasma. Von der 4 kb-Klasse werden die akzessorischen Proteine Vpu, Vif und Vpr und das Strukturprotein Env kodiert. Von der 9 kb RNA wird das Gag-Vorläuferprotein und nach ribosomaler Leserasterverschiebung die viralen Enzyme als Gag-Pol-Vorläuferprotein translatiert [246;270]. Die ungespleißte RNA dient außerdem als Genom und wird in neue Virionen verpackt. Nachfolgend werden diejenigen HIV-Proteine näher beschrieben, die im Verlauf dieser Arbeit von Relevanz sind.

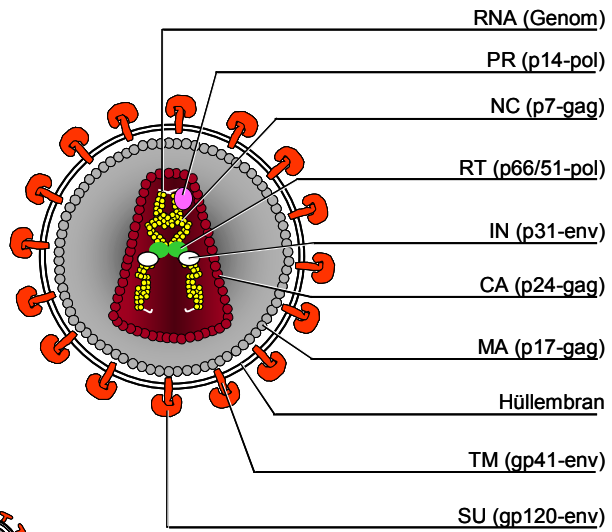
1.2 HIV-1 Proteine

Env (envelope): Das *envelope*-Gen kodiert das Hüllprotein des Virus. Die Translation des *env*-Leserahmens erfolgt hauptsächlich von einer polycistronischen RNA, in der der *vpu*-Leserahmen 5'-wärts des *env*-Leserahmens liegt. Das Vorläufer-Glykoprotein gp160 wird im trans-Golgi-Apparat der Wirtszelle durch eine zelluläre Protease zu gp120 und gp41 gespalten [121;285]. Dabei ist das extrazelluläre Oberflächenprotein (SU) gp120 nicht kovalent mit dem Transmembranprotein (TM) gp41 assoziiert. Die HIV-1 Hüllproteine liegen insgesamt als Trimere vor. Die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor [63;201]

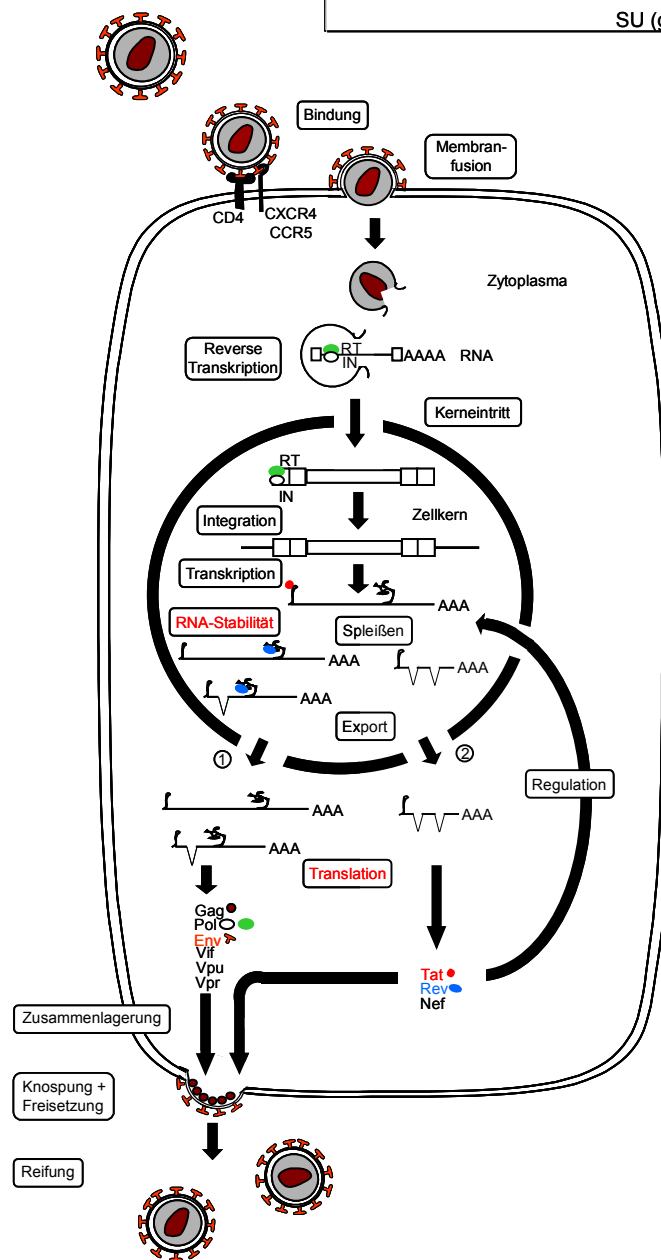
Abb. 1: Schematische Darstellung eines HIV-1 Virions (A) und des HIV-1 Replikationszyklus (B). (A) Im Inneren des aus dem Capsidprotein (CA, braun) gebildeten konischen Capsids liegen zwei Kopien der HIV-1 (+)RNA (weiß) mit den an sie gebundenen Nucleocapsidproteinen (NC, gelb) sowie den viralen Enzymen Integrase (IN, weiß), Reverse Transkriptase (RT, grün) und Protease (PR, rosa). Umgeben ist das Capsid von einer Hüllmembran. Unterhalb der Hüllmembran liegt das virale Matrixprotein (MA, grau). In die Membran eingelagert findet sich das virale Glykoprotein gp41 (TM, orange), das mit dem viralen Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU, orange) assoziiert vorliegt.

(B). Die Bindung von HIV-1 an die Wirtszelle und die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran erfolgt über die Interaktion der viralen Glykoproteine gp120 und gp41 mit dem CD4-Rezeptor und einem Chemokin-Korezeptor (CXCR4, CCR5). Die virale (+)RNA wird von der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, in Form eines Präintegrations-Komplexes in den Zellkern importiert und von der viralen Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert. Tat (rot) 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 Zytoplasma exportiert (1), die für die Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Rev (blau) wird in den Kern importiert und ermöglicht in der späten Infektionsphase den Export von intronhaltigen mRNAs in das Zytoplasma (2). Nach Translation der intronhaltigen mRNAs, die für die Strukturproteine Gag, Pol, Env sowie die akzessorischen Proteine 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.

A



B



und die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 [6;51;73;77;78] ermöglicht die Anheftung an die Wirtszelle und die durch gp41 ausgelöste Membranfusion. Die Erkennung der unterschiedlichen Chemokin-Rezeptoren ist für den Zelltropismus von HIV-1 für Makrophagen und T_H-Zellen verantwortlich. Die Expression von gp120/gp41 führt in permissiven Zellen durch Membranfusion zur Ausbildung von Syncytien [192].

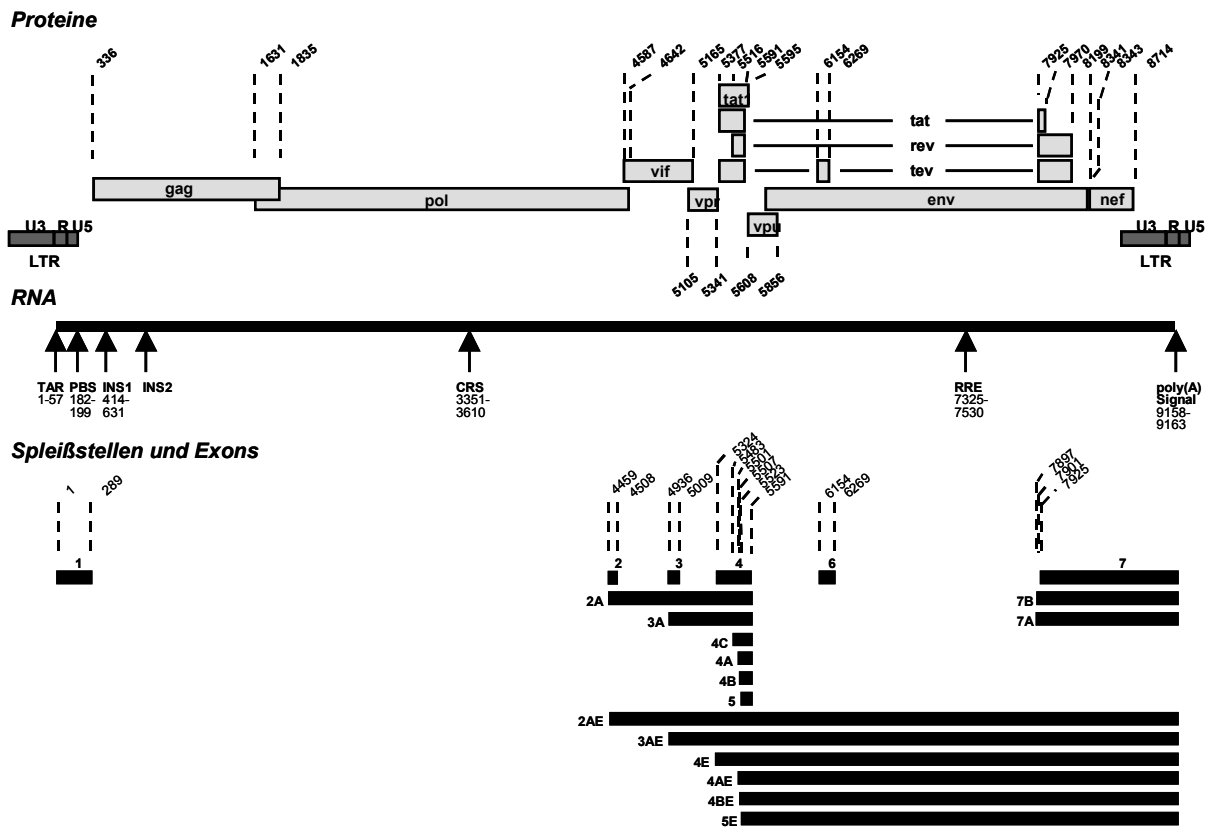


Abb. 2: Organisation des HIV-1 Genoms. Die Abbildung zeigt im oberen Teil die Leserahmen der HIV-1 Proteine (hellgraue Balken) flankiert von den beiden LTRs (dunkelgraue Rechtecke) mit den Regionen U3, R und U5. Auf Ebene der RNA bezeichnet TAR (Trans activation response) die Bindesequenz für Tat, PBS die Primer-Bindungsstelle, INS inhibitorische Sequenz Elemente, CRS *cis*-wirkende repressive Sequenzen, RRE (Rev responsive element) die Bindestelle für Rev und pA die Polyadenylierungsstelle. Darunter sind die durch alternatives Spleißen gebildeten Exons der verschiedenen HIV-1 Transkripte dargestellt. Die Nukleotidzahlen geben die Positionen der Exons bezogen auf den Transkriptionsstart (+1) an. Der Transkriptionsstart entspricht nt 455 der genomischen Nummerierung (verändert nach [224]).

Die basale HIV-Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II (RNAP II) verläuft sehr ineffizient [283] und liefert zu einem Großteil kurze, vorzeitig terminierte Transkripte [153]. Dabei wird die Initiation durch ein DNA-Element 3'-wärts des Transkriptionsstarts, den „inducer of short transcripts“ (IST) aktiviert [277]. Die RNAP II trifft jedoch nach der Synthese der ersten 62 Nukleotide auf eine Pausierungsstelle [231]. Um Vollängentranskripte zu erhalten, muss die RNAP II vom Initiations- in den Elongationskomplex übergehen. Dies wird durch die Bindung des viralen Proteins Tat an die TAR-Region vermittelt [15;282]. Die TAR-Region bildet eine Haarnadelschleife mit einem zusätzlichen ungepaarten Bereich innerhalb des Stamms (Abb. 3B) und wird im Rahmen der Transkriptionsinitiation am 5'-Ende aller HIV-1 Transkripte gebildet. Die Transkriptionstransaktivierung beginnt mit der Acetylierung von Tat, wodurch die Interaktion von Tat mit der TAR-Region und dem positiven Transkriptions-Elongationsfaktors-b (P-TEFb) — einem Heterodimer aus CDK9 und Cyklin T1 — ermöglicht wird. P-TEFb phosphoryliert dann die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II und den Transkriptions-Elongations-Faktor SPT5 [25;130;328]. Anschließend wird Tat erneut acetyliert, löst sich dadurch von der TAR-Region und bindet an den Elongationskomplex der RNA-Polymerase II [31]. Aufgrund dieser Wechselwirkungen ermöglicht Tat die effiziente Elongation der Transkription und je nach Zelltyp eine 10- bis 300-fache Erhöhung der viralen Genexpression [8;96;283]. Dies macht Tat zu einem essenziellen Protein für die HIV-1 Replikation [85;155;319] (Für einen Überblick über die Transaktivierung durch Tat siehe [25;154]).

Rev (Regulator of virion protein expression): Das Rev-Protein wird wie Tat von zwei Exons kodiert [281] und in der frühen Infektionsphase translatiert. Rev ist ebenfalls für die Virusreplikation essenziell [260;290]. Das Phosphoprotein hat ein apparentes Molekulargewicht von 19 kDa [54;124] und besitzt drei funktionelle Domänen (Abb. 4A). N-terminal befindet sich eine Region, die als Kern- und Nukleolus-Lokalisationssignal (NLS) dient und die Bindung an eine RNA-Sekundärstruktur innerhalb des *tat/rev*-Introns — das sogenannte Rev responsive element (RRE) — ermöglicht [56;136;206;255;324]. Flankiert wird diese Domäne von zwei Sequenzabschnitten, die für die Multimerisierung von Rev benötigt werden [204;325]. Im C-terminalen Bereich des Rev-Proteins befindet sich die leucinreiche Domäne des Kern-Exportsignals [89;213]. Durch die Bindung an das RRE ermöglicht Rev den Export ungespleißter, RRE-haltiger RNA in das Zytoplasma.

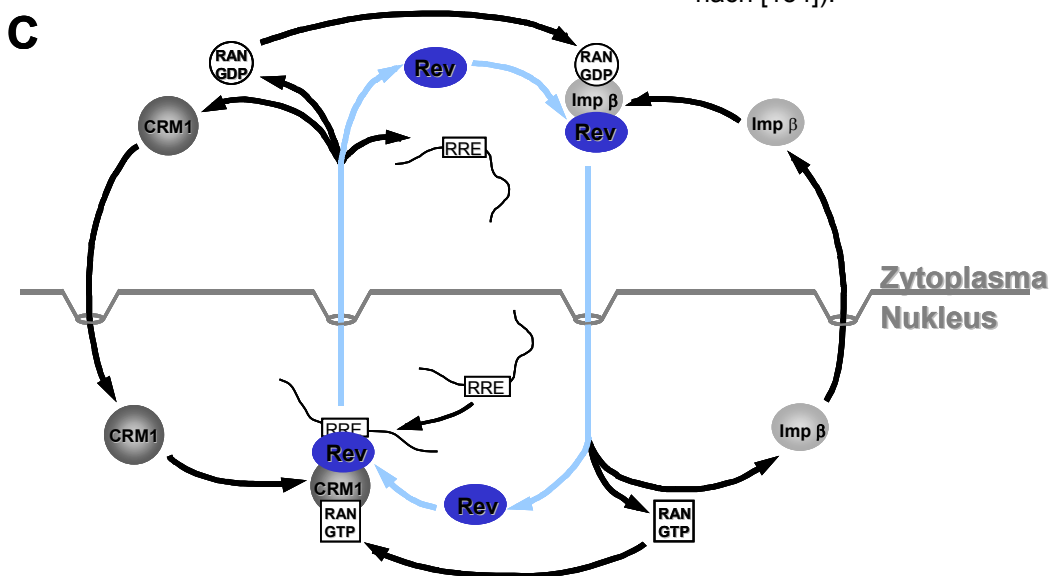
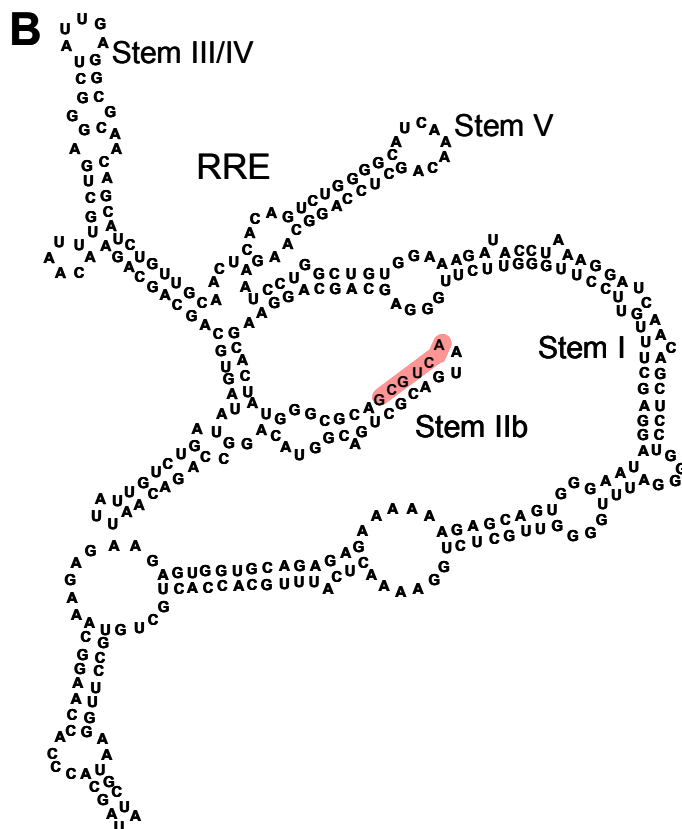
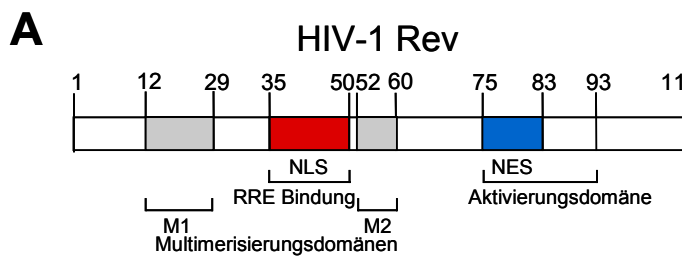


Abb. 4: Die Bindung von Rev and das Rev-Responsive Element ermöglicht den Export intronhaltiger HIV-1 mRNAs. (A) Schematische Darstellung der Rev-Proteinstruktur (nach [158]). Das Rev-Protein enthält drei funktionelle Domänen: N-terminal besitzt Rev eine argininreiche Domäne (AS 35-50, rot). Sie dient als nukleäres bzw nukleoläres Lokalisationssignal (NLS) und ermöglicht die spezifische RNA-Bindung. Flankiert wird sie von den Multimerisierungsdomänen (M1 und M2, grau). C-terminal befindet sich die Aktivierungsdomäne mit einem leucinreichen, nukleären Exportsignal (NES, AS 75-83, blau). **(B)** Die Sekundärstruktur des „Rev responsive element“ (RRE, modifiziert nach [208]). Nach der initialen Bindung eines Rev Monomers an die hochaffine Bindestelle im Stem IIb (rote Markierung), multimerisieren weitere Rev-Proteine entlang des gesamten Stem I. **(C)** Rev exportiert RRE-haltige RNAs in das Zytoplasma (nach [136]). Die Bindung von Rev an das RRE maskiert das Rev-NLS. Das leucinreiche NES kann dagegen erkannt werden und ermöglicht den Export des Rev/RRE-Komplexes über die Bindung des zellulären Exportfaktors CRM1 und RanGTP. Im Zytoplasma wird RanGTP zu Ran GDP gespalten, was zur Dissoziation des Transport-Komplexes führt. Das NLS-Signal wird wieder zugänglich. Rev bildet mit dem Transportprotein Importin-β und RanGDP einen Komplex, der für den Reimport in den Kern sorgt (verändert nach [154]).

Die erste hochaffine Bindung erfolgt über die Stamm-2b-Sequenz des RREs (Abb. 4B) [127], danach multimerisiert Rev entlang des Stamm-1 des RREs [204;293]. Der Export selbst erfolgt über Interaktion des Rev/RRE-Komplexes mit CRM1, einem Protein der Exportinfamilie, das im allgemeinen für den Export von U snRNAs und 5S rRNAs genutzt wird [89]. CRM1 bindet die GTPase Ran mit ihrem Substrat GTP [93]. Der Export in das Zytoplasma erfolgt über Interaktion mit Nukleoporinen [329]. Nach GTP-Hydrolyse und Auflösung des Transportkomplexes [82;253] gelangt Rev über die Bindung von Importin- β in Abhängigkeit von Ran/GDP zurück in den Kern (Abb. 4C) (Für einen Überblick siehe [136;158]).

Vpu (Virion protein U): Vpu ist ein integrales Membran-Phosphoprotein und wird von polycistronischen Transkripten der 4 kb-Klasse translatiert, die auch den *env*-Leserahmen enthalten. Es erleichtert die Ablösung der Viruspartikel von der Wirtszelle durch Interaktion mit zellulären Kofaktoren [114] und bewirkt die Degradation von CD4-Rezeptoren über den Ubiquitin/Proteasom-Weg [209]. Die intrazelluläre Halbwertszeit der CD4-Rezeptoren wird durch Vpu von 6 Stunden auf 12 Minuten reduziert [314]. Vpu führt so zu einer Verringerung ER-gebundener Komplexe von gp160 und CD4, verbessert damit die gp160-Prozessierung und wirkt einer HIV-Superinfektionen bereits infizierter Zellen entgegen [315].

Vpr (Virion protein R): Vpr ist ein konserviertes 14 kDa großes Protein das zwischen Kern und Zytoplasma pendelt [234;278]. Vpr erhöht zum Einen die Virusreplikation in ruhenden Zellen indem es die Aufnahme des Präintegrations-Komplexes in den Zellkern erleichtert [128]. Zum Anderen bewirkt Vpr eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase [150;254]. Dies führt zu einer stärkeren viralen Replikation, da die HIV-Transkription in der G2-Phase erhöht ist [111]. Der Zellzyklus-Stopp wird unter anderem durch eine Umverteilung der Zellzyklus-Kontroll-Kinasen Wee1 und cdc25 in Kern und Zytoplasma ermöglicht [67]. Das Substrat der beiden Kinasen ist p34^{cdc2}. Vpr verhindert die Dephosphorylierung des p34^{cdc2}:CyclinB Kinase-Komplexes [202]. Darüber hinaus führt Vpr durch die Bindung an den Adenin-Nukleotid-Translokator der Mitochondrien-Membran zu einer Depolarisation dieser Membran. Dies bewirkt eine Translokation von Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) und Zytocrom-C ins Zytoplasma und leitet die

Apoptose ein [146;256]. Außerdem wurde eine Caspase-abhängige Vpr-vermittelte Apoptose beobachtet [222;286] (Für einen Überblick siehe [39]).

1.3 Regulation der Genexpression bei HIV-1

Die Regulation der Genexpression findet bei HIV-1 auf transkriptionaler, posttranskriptionaler sowie translationaler Ebene statt. Gut untersucht sind die bereits erwähnte Regulation der Transkription durch Tat und zelluläre Transkriptionsfaktoren sowie die Regulation auf posttranskriptionaler Ebene durch alternatives Spleißen und den Export intronhaltiger RNAs durch Rev. Die vorliegende Arbeit behandelt zwei weitere Regulationsmöglichkeiten der viralen Genexpression. Im ersten Teil wurde die posttranskriptionale Regulation der Genexpression durch Variation der RNA-Stabilität untersucht (siehe 1.3.1). Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Modifikation des Translationspotentials polycistronischer RNAs durch zusätzliche 5'-wärts liegende, kurze Leserahmen (siehe 1.3.2).

1.3.1 RNA-Stabilität

Die Regulation der Genexpression hat die Variation der Proteinmenge zum Ziel. Die Regulation kann auf RNA-Ebene z.B. durch eine Variation der Transkriptionsrate oder der RNA-Stabilität erreicht werden. Die RNA-Stabilität kann zum Einen über die Menge und Auswahl der zur Verfügung stehenden trans-wirkenden, RNA-bindenden, stabilitätsmodulierenden Faktoren, zum Anderen über die RNA-Sequenz selbst beeinflusst werden. Nachfolgend werden die für alle eukaryontischen RNAs zutreffenden RNA-stabilisierenden Modifikationen wie Capping und Polyadenylierung, sowie der RNA-Abbau in Kern und Zytoplasma erläutert. Weiterhin wird auf Veränderungen der RNA-Stabilität durch unterschiedliche Sequenzelemente wie Stoppkodons, AU-reiche Elemente oder CRS-Elemente, wie sie in der HIV-1 Sequenz gefunden wurden, eingegangen.

1.3.1.1 Capping und Polyadenylierung

Das Capping der RNA ist ein frühes RNA-stabilisierendes Ereignis. Das Cappen der HIV-RNA erfolgt kotranskriptional und wird durch die Interaktion von SPT5 und Tat mit dem Capping-Enzym Mce1 stimuliert [50;309]. Mce1 besitzt eine RNA-5'-Triphosphataseaktivität und eine Guanyltransferaseaktivität und bindet an die CTD der

RNAP II. Zuerst katalysiert Mce1 die Hydrolyse des γ -Phosphat des endständigen Nukleotids, gefolgt von der GTP-abhängigen 5'-5'-Bindung eines GMPs. In einem letzten Schritt bindet eine Methyltransferase und methyliert die N7-Position des am 5'-Ende gebundenen GMPs. Der Prozess des Capping ist essenziell. Mutationen, die die drei Enzymaktivitäten des Capping-Komplexes inaktivieren, sind letal. Während die Guanyltransferase/RNA-Triphosphatase im Verlauf der Elongation abdissoziiert, bleibt die Methyltransferase während des gesamten Elongationsprozess an die Polymerase gebunden. An die Cap-Struktur bindet im Kern der „Cap-Binding“-Komplex (CBC), der sich aus den Proteinen CBP20 und CBP80 zusammensetzt. Die Cap-Struktur zusammen mit den an sie gebundenen Proteinen schützt die RNA vor vorzeitigem Abbau durch Nukleasen und stimuliert das Spleißen und die Polyadenylierung (Für eine Übersicht siehe [207;245;275]).

Die Polyadenylierung schützt dagegen das 3'-Ende der RNA vor Degradation durch 3'-Exonukleasen. Nach der Erkennung des Polyadenylierungssignals AAUAAA am 3'-Ende der RNA erfolgt ein endonukleolytisches Schneiden der RNA 3'-wärts des Polyadenylierungssignals. Diese Prozessierung der RNA wird durch die CTD der RNAP II stimuliert. Die aktive Endonuklease selbst konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden. Nach dem Schnitt folgt das Anhängen eines poly(A)-Schwanzes durch die poly(A)-Polymerase (PAP). PAP wird durch Phosphorylierung sowohl abhängig vom Zellzyklus als auch vom Spleißen reguliert. [59;214;275].

Die Modifikationen des 5'- und des 3'-Endes tragen durch Interaktion zwischen Cap-bindenden und poly(A)-bindenden Proteinen zur Stabilisierung der RNA bei. Dabei bindet die Cap-Struktur eIF4F, einen Komplex aus eIF4E, eIF4G und eIF4A: In Hefe rekrutiert eIF4G dabei über eIF3 die ribosomale 40 S Untereinheit (UE) und interagiert zeitgleich über das poly(A)-bindende Protein (Pab1p bzw. PABP) mit dem 3'-Ende der RNA. Bei Säugern bindet PABP statt an eIF4G zunächst das PABP-interagierende Protein-1 PAIP-1. Dieses wiederum bindet über eIF4A das 5'-Ende des Transkripts. Dadurch liegen die Transkripte im Zytoplasma zirkularisiert vor (Für eine Übersicht siehe [102]).

1.3.1.2 Zytoplasmatischer RNA-Abbau

Beim RNA-Abbau müssen in der Regel zunächst die Modifikationen am 5'- und 3'-Ende entfernt werden. Der Hauptabbauweg zytoplasmatischer RNA basiert auf einer

Deadenylierungsreaktion gefolgt von einem Decapping und abschließendem exonukleolytischen Abbau der RNA (Abb. 5). Das poly(A)-bindende Protein (PABP) schützt einerseits den poly(A)-Schwanz vor Abbau [16], stimuliert aber gleichzeitig den Abbau freiliegender Adenylate der poly(A)-Sequenz [259]. Die Deadenylierung erfolgt mit zunehmendem Alter der RNA [276], wobei der Prozess des RNA-Umsatzes und die Translation aneinander gekoppelt sein können [145]. So konnte sowohl ein Einfluss der Initiation als auch der Elongation auf die RNA-Stabilität beobachtet werden [14;268]. Eine mögliche direkte Kopplung der Deadenylierung an die Translation kann durch die Interaktion des Translations-Terminationsfaktors eRF3 mit PABP zustande kommen [137]. Als verantwortliche Enzyme der zytoplasmatischen RNA Deadenylierung sind bei Hefe die PABP abhängigen poly(A)-Nukleasen Pan2 und Pan3 identifiziert worden [22;35]. Aus Säugerzellen konnte ebenfalls ein deadenylierendes Enzym, die poly(A)-Ribonuklease (PARN), isoliert werden [161]. PARN lässt sich durch die Gegenwart von eIF4E oder Cap-Analoga hemmen und seine Interaktion mit der Cap-Struktur stimuliert die Deadenylierung und den RNA-Abbau [69;106]. Im zweiten Schritt der RNA-Degradation kommt es in Gegenwart von Pab1p zu einem Decapping der deadenylierten RNAs [68]. Dabei bildet sich ein ringförmiger Komplex von acht unterschiedlichen Lsm-Proteinen (Lsm1p-Lsm8p) [126;291], die zusammen mit dem Lsm1p-bindenden Faktor Mrt1p das Decapping stimulieren [23;291]. Dieser zweite Schritt der Abspaltung der Cap-Struktur wird durch das Decapping-Enzym Dcp1 zusammen mit Dcp2 und DcpS katalysiert [79;178;297]. Der dritte Schritt, der Abbau des RNA-Rumpfs, erfolgt in der Hefe primär über die zytoplasmatische 5'-3'-Exonuklease Xrn1p. Homologe der Lsm-Proteine wie auch von Dcp1 und 2 und der 5'-3'-Exonuklease Xrn1p konnten auch in Säugerzellen identifiziert werden [2;13;107;307].

Abgesehen von diesem 5'-3'-Abbaumechanismus konnte ein weiterer, ATP-abhängiger 3'-5'-Abbauweg in der Hefe und in Säugern nachgewiesen werden. Verantwortlich für den 3'-5'-Abbau ist das Exosom, ein Multiproteinkomplex aus mindestens 10 Proteinen. Diese essenziellen Proteine wurden anhand ihres Phänotyps als „superkiller“ (Ski-) bzw. anhand ihrer Funktion als rRNA-prozessierende (Rrp-) Proteine charakterisiert [144]. Fast alle Proteine des Exosoms besitzen wahrscheinlich eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und entsprechen den Proteinen des Polymyositis-Scleroderma Komplex 75 und 100 (PM/Scl-75 PM/Scl-100), woher sie ihre Bezeichnung bei Säugern bezogen haben [7]. Bei Säugern

konnte eine Abhängigkeit des RNA-Abbaus im Exosom vom Decapping nachgewiesen werden [306]. Im Gegensatz zur Hefe verläuft der Hauptabbauweg für RNA bei Säugern, über den 3'-5'-Exonukleaseweg des Exosoms und nicht über die 5'-3'-Exonuklease wie bei der Hefe [7].

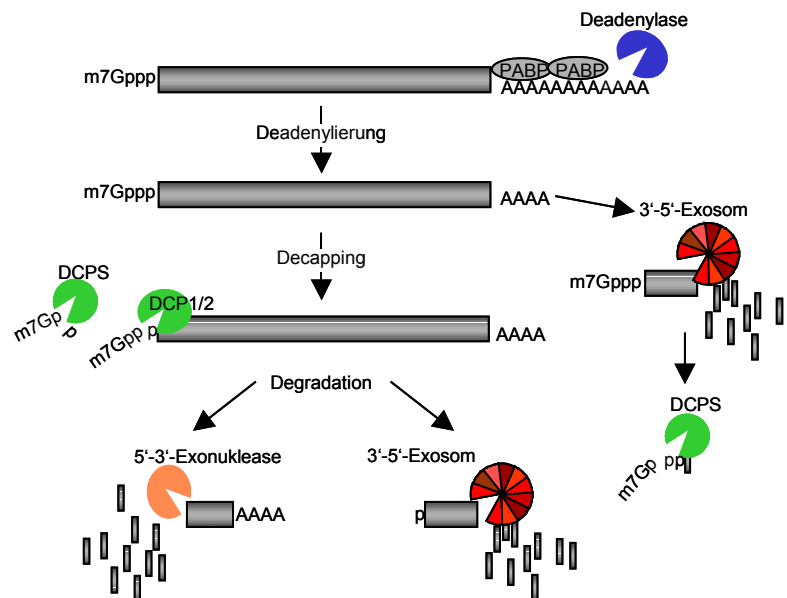


Abb. 5: Deadenylierungsabhängiger RNA-Abbau. Nach der Prozessierung ist die mRNA durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und einen 3'-poly(A)-Schwanz vor dem Abbau geschützt. Der erste Schritt im Rahmen der RNA-Degradation ist die Kürzung des poly(A)-Schwanzes durch das Enzym Deadenylase (blau, pan2p und pan3p in der Hefe bzw. PARN bei Säugern). Nachdem nur noch ein Oligo-Adenylatrest am 3'-Ende vorhanden ist, kommt es zur Bindung des Decapping-Enzyms (grün, Dcp1p, Dcp2p und DcpS) und zur Abspaltung des m7GMP der Cap-Struktur. Der verbliebene RNA-Körper wird durch die 5'-3'-Exonukleasen (orange, Xrn1p oder Rat1p) oder durch den ATP-abhängigen Multienzymkomplex des Exosoms (rot) in 3'-5' Richtung abgebaut.

1.3.1.3 Nukleärer RNA-Abbau

Die RNA wird nicht nur im Zytoplasma, sondern auch bereits im Kern degradiert. Bereits das Trimmen und Spleißen der RNA im Kern ist ein Prozess, der bis zu 95 % der initial transkribierten RNA dem Abbau zuführt. Für den Abbau von Intronsequenzen wurde gezeigt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, das „debranchen“, d.h. das Auflösen der Lariatstruktur ist [42;53]. Experimentell bestimmte Halbwertzeiten von Introns lagen im Bereich von Minuten [53].

Die Hauptaktivität der Kerndegradation von RNA in Hefen liegt in einem exosomalen 3'-5'-Abbau. Dieser Weg scheint für die Degradation unvollständig prozessierter RNAs verantwortlich zu sein und mit dem Spleißapparat zu konkurrieren [26]. Des Weiteren werden falsch adenylierte Transkripte im Kern über Exosomen abgebaut [132].

Sowohl für den 5'-3'- als auch für 3'-5'-Exonukleaseweg wurden einige Faktoren gefunden, die nur im Zytoplasma bzw. nur im Kern zu finden sind. So ist im nukleären Exosom mit Mrt4p statt Ski2p eine andere Helikase als in zytoplasmatischen Exosomen zu finden. Rrp6p ist ebenfalls ein nukleärer Faktor des Exosoms und spielt eine Rolle bei der Kopplung von RNA-Prozessierung und Abbau der Transkripte [7;33;191]. Als weitere Exonukleaseaktivität wurde im Kern statt der 5'-3'-Exonuklease Xrn1p das funktionelle Homolog Rat1p nachgewiesen. Die zuvor genannten Komponenten sind Teil des nukleären Degradationssystems, welches außerdem auf den nukleären Cap bindenden Komplex und das mit Rat1p interagierende Protein RAI1 angewiesen ist [64] (Für einen Überblick zur RNA-Degradation siehe [216;218;299]).

1.3.1.4 Erkennung fehlerhafter oder fremder RNA

Im Verlauf der letzten Jahre sind einige durch Stimulus- oder Prozessierungsereignisse vermittelte RNA-Abbaumechanismen charakterisiert worden, die fehlerhafte oder fremde RNA erkennen und degradieren können. Dabei sind, neben den Mechanismen des „Nonsense mediated decay“ und des „nonstop decay“, die Mechanismen der dsRNA-Erkennung über RNAi- oder den IFN γ /PKR-Weg zu nennen. Darüber hinaus werden bestimmte RNAs aufgrund ihrer Sequenzcharakteristika abgebaut oder vor Abbau bewahrt. Die hierzu am besten untersuchten Sequenzen sind die sogenannten AU-reichen Elemente, die zu einer Destabilisierung der RNA führen.

1.3.1.4.1 Durch frühe Stoppkodons vermittelter RNA-Abbau

Einige Abbauwege dienen dem Abbau fehlerhafter RNA. Besitzt ein Transkript beispielsweise ein vorzeitiges, „nonsense“ Stoppkodon 5'-wärts des normalen Stoppkodons, kann dies zum Abbau der RNA führen, wenn sich ein Intron mindestens 55 nt 3'-wärts des „nonsense“-Kodons befindet [225]. Dieser mRNA-Abbau wird als NMD (Nonsense Mediated Decay) bezeichnet. Das Spleißen eines Introns führt zur Bindung eines Multiproteinkomplex 20-24 nt 5'-wärts der Spleißnahtstelle der RNA. Dieser „Exon Junction Complex“ (EJC) wird gemäß der gängigen Vorstellung durch das initiale Translationsereignis an der RNA entfernt [47]. Da Antikörper gegen das nukleäre CBP80 den EJC koimmunopräzipitieren, Antikörper gegen das zytoplasmatische Cap-bindende Protein eIF4E jedoch nicht [142], wird vermutet, dass diese erste Translation durch die nukleären Cap-bindenden Proteine CBP20 und CBP80 vermittelt wird. Ob diese erste Translationsrunde noch im Kern selbst oder während der Passage der mRNA durch die Kernpore geschieht, ist zur Zeit noch unklar [140;313]. Liegt ein EJC 3'-wärts des Stoppkodons, bleibt dieser nach der ersten Translationsrunde gebunden und markiert so die RNA für die Degradation. Die Termination der Translation ermöglicht die Bindung des humanen „upstream Frameshift Proteins“ 1 (hUpf1) an die RNA [318]. Dabei interagiert in Hefe Upf1p mit ski7p [288] und mit dem EJC, was die Degradation der RNA einleitet [198]. Beim NMD konnte ein RNA-Abbau sowohl in 3'-5'- als auch in 5'-3'-Richtung nachgewiesen werden [185;217].

1.3.1.4.2 Durch fehlende Stoppkodons vermittelter RNA-Abbau

Der Abbau von RNAs, die kein Stoppkodon besitzen — auch Nonstop decay (NSD) genannt — basiert in Hefe auf dem zytoplasmatischen, exosomalen 3'-5'-Abbau des Transkriptes [98]. Der Abbau der RNA ist an den Faktor ski7p gekoppelt, dessen Verwandtschaft zu den Translationsfaktoren eEF1A und eRF3 eine RNA-Degradation über eine Bindung von ski7p an die A-Stelle des Ribosoms nahe legt [298] (Für einen Überblick über die RNA-Abbauwege des NSD/NMD siehe [304]).

1.3.1.4.3 Abbau durch Erkennung von dsRNA-Abschnitten

Eine weitere Art des RNA-Abbaus basiert auf der Erkennung zellfremder, doppelsträngiger RNA. Hier müssen zwei Abbauewege über RNA-Interferenz und über IFN- γ unterschieden werden, wobei der zweite Weg bisher nur in Säugern gefunden wurde.

1.3.1.4.3.1 RNA-Abbau durch RNA-Interferenz

Der RNA-Abbau über RNA-Interferenz (RNAi) ist bei allen Eukaryonten zu finden und führt zu einer post-transkriptionalen Abschwächung der Genexpression auf Ebene der RNA. Dabei bindet die RNase DICER an die doppelsträngige RNA und schneidet diese in ca. 22 bp kurze Fragmente. Diese kurzen RNA-Fragmente wirken inhibierend auf die posttranskriptionale Genexpression und werden deshalb kurze, interferierende RNAs (short interfering RNA, siRNA) genannt. Die siRNA wird in einen RNA induzierten „silencing complex“ (RISC) aufgenommen. Dieser Komplex wird ATP-abhängig in eine aktive endonukleolytische Form überführt, die eine RNA mit Komplementarität zur siRNA innerhalb dieser komplementären Sequenz schneidet [123].

1.3.1.4.3.2 IFN γ -abhängiger Abbau von dsRNA

In Gegenwart von dsRNA-Stücken mit einer Länge von mehr als 25 bp, kann es bei Säugern zu einem RNA-Abbau kommen, dessen aktive Enzyme als Reaktion auf einen Interferon gamma- (IFN γ)-Stimulus exprimiert wurden. Die dsRNA führt über das IFN γ -induzierbare System der dsRNA-abhängigen 2'-5'-Oligoadenylatsynthasen zu einem RNA-Abbau-Mechanismus. Charakteristisch für diesen Weg ist die Bildung von 2'-5'-Oligoadenylaten, die wiederum eine Dimerisierung und Aktivierung der RNase L und damit zur RNA-Degradation und ebenfalls zur Apoptose führen.

Zu dieser sogenannten IFN γ -Antwort gehört außerdem auch die Aktivierung der dsRNA-abhängige-Proteinkinase (PKR). Die Erkennung von dsRNA durch die PKR führt zu einer Dimerisierung und Autophosphorylierung der PKR. Die so aktivierte PKR kann nun weitere Effektoren wie eIF2 α phosphorylieren, was unter Anderem zum Stopp der Translationsinitiation führt. Über mehrere Zwischenreaktionen kommt es auch zur NF- κ B vermittelten Transkription z.B. von Apoptose-induzierenden Genen. [12;110;189;242].

1.3.1.5 Regulation der RNA-Stabilität über AU-reiche Elemente

Neben den im Rahmen der RNA-Überwachung stattfindenden Degradationsprozessen und den Mechanismen der Fremd-RNA-Erkennung, kann auch die Sequenz der RNA selbst die Stabilität beeinflussen. In den Transkripten verschiedener Proto-Onkogene, Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden sogenannte AU-reiche Elemente (ARE) als ursächliche, *cis*-wirkende Elemente für eine verkürzte mRNA-Halbwertszeit identifiziert [279]. Diese Elemente, die meist in 3'-untranslatierten Regionen (UTR) aber auch im translatierten Bereich und nur selten im 5'-UTR zu finden sind, werden in drei verschiedene Typen unterteilt. Diese Unterteilung erfolgt sequenzabhängig und nach experimentellen Kriterien in Typ I (c-fos-Typ), Typ II (GM-CSF Typ) und Typ III (c-jun Typ) ARE [320]. In Typ I und Typ II ARE ist als kleinstes gemeinsames Charakteristikum die Sequenz AUUUA zu finden. Diese Elemente reagieren, im Gegensatz zum Typ III, sensitiv auf Actinomycin-D Behandlung [44]. Als Typ III ARE werden Motiv-unabhängige, AU-reiche Elemente mit hohem Uracilgehalt bezeichnet. Experimentell können die drei Typen von ARE in ihrem Abbauverhalten unterschieden werden. Die Elemente vom Typ I und Typ III zeigen eine mit der Deadenylierung einhergehende Degradation. Bei den ARE des Typs II dagegen erfolgt die Degradation der RNA in einem zeitlich getrennten Schritt nach der Deadenylierung [45;320]. Neuere Arbeiten zeigen, dass die ARE auch das Decapping beeinflussen können [107] und über eine Interaktion mit Exosomen den 3'-5'-Abbau ermöglichen [43;221].

1.3.1.6 ARE-bindende Proteine

AU-reiche Sequenzelemente werden von einer Reihe von Proteinen erkannt. Für drei dieser ARE-bindende Proteine (AUBP) AUF1 (hnRNP D), HuR und Tristetraprolin (TTP) konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie die Stabilität ARE-enthaltender Transkripte modulieren.

AUF1 (hnRNP D) gehört zu der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs). Diese Proteinfamilie besteht aus mindestens 20 Vertretern, hnRNP A bis U genannt, die kooperativ an die naszierende RNA binden. AUF1 wurde ursprünglich in einem *in vitro* Assay für zytoplasmatischen RNA-Abbau entdeckt [32;70]. In verschiedenen nachfolgenden Untersuchungen wurde eine Beteiligung von AUF1 an der

RNA-Degradation beobachtet [180;196;236]. AUF1 bildet durch alternatives Spleißen vier Isoformen mit einer Größe von 37, 40, 42 und 45 kDa [72], die alle an ARE-Elemente binden und den zytoplasmatischen RNA-Abbau stimulieren können [180;196;326]. Zur Wirkung der verschiedenen Isoformen gibt es widersprüchliche Befunde. Einerseits führte die Überexpression insbesondere der p37- und der p42-Form von AUF1 zu erhöhtem Abbau ARE-enthaltender mRNA, in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zelle [196], andere Gruppen beobachteten p37 und p40 vermittelten RNA-Abbau [262] oder erhöhte RNA-Stabilität nach Reduktion von p40 [248]. Die Präsenz der verschiedenen Exons beeinflusst die Ubiquitinierung der unterschiedlichen AUF1-Isoformen [182]. Der Wirkungsmechanismus von AUF1 ist zur Zeit noch unklar. Die AUF1-Bindung an die RNA wurde zum Einen mit Exosomen-Bindung [221] und zum Anderen mit dem Ubiquitin-Proteasomen-Netzwerk des Proteinabbaus in Zusammenhang gebracht [181]. Die Bindung von AUF1 an das ARE wird durch den Phosphorylierungszustand des Proteins beeinflusst [316]. Nach Hitzeschockinduktion oder Störung des Ubiquitin/Proteasom-Abbauwegs wandert das Protein aus dem Zytoplasma in den Kern und ein ARE-vermittelter Abbau von mRNAs im Zytoplasma kann nicht mehr beobachtet werden [180;196;326]. Interessanterweise kann AUF1 in einigen Fällen auch zur RNA-Stabilisierung beitragen. So wurde AUF1 als Bestandteil eines RNP-Komplexes identifiziert, der die α -Globin-RNA stabilisiert [156]. Darüber hinaus verhindert AUF1 den Abbau von RNAs, die die purinreiche Region aus dem kodierenden Bereich des c-fos enthalten [321].

HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Protein aus der „embryonic lethal abnormal vision“ (ELAV)-Familie [199], der noch drei weitere, neural exprimierte Proteine angehören. Diese HuB, HuC und HuD genannten Proteine wurden zuerst als humane Autoimmun-Antigene des HU-Syndroms der paraneoplastischen Neuropathie charakterisiert, deren Expression beispielsweise durch Lernvorgänge stimuliert werden kann [247]. HuR ist ein primär nukleäres Protein von 36 kDa mit 3 RRM-Domänen (RNA recognition motive) [199], das jedoch auch im Zytoplasma gefunden wurde [83]. Während eine Domäne die poly(A)-Sequenz des 3'-Endes der RNA erkennt, binden die beiden anderen an AU-reiche Elemente [200]. Es wird vermutet, dass HuR im Kern an die ARE-enthaltende RNA bindet, diese RNA dann über Interaktion seiner nukleo-zytoplasmatischen „shuttle“ („Hur nuclear shuttle“, HNS) Domäne mit Transportin 2 in das Zytoplasma eskortiert und

gleichzeitig vor vorzeitigem Abbau schützt [84;91;104;238]. Die ARE/RNA-Bindung von HuR wird durch Hitzeschock behindert [105] und führt zur Nutzung eines zweiten nukleozytoplasmatischen Exportwegs. Der Hitzeschock bewirkt einen Export von HuR in das Zytoplasma, über die Interaktion von HuR mit pp32 und APRIL, die wiederum an den Exportfaktor CRM1 binden können. Wahrscheinlich bewirkt HuR über diesen zweiten CRM1-vermittelten Weg den Export von Hitzeshock-Transkripten wie hsp70 [103] (für einen Überblick über die RNA-Stabilisierung durch HuR siehe [30]).

Tristetraprolin (TTP) spielt als drittes Protein beim ARE-vermittelten RNA-Abbau eine Rolle. Bei TTP handelt es sich um ein kleines CCCH-Tandem-Zinkfingerprotein, das direkt an ARE des Typ II bindet [41]. Die RNA-Bindung von TTP über die Zinkfinger motive führt zu einer Deadenylierung und Destabilisierung der Transkripte und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des TTP-vermittelten RNA-Abbaus [179]. Experimente mit knockout-Mäusen zeigten, dass TTP beispielsweise die GM-SCF-RNA und die TNF α -RNA durch Bindung an ARE des Typs II am 3'-Ende der Transkripte destabilisiert (für einen Überblick über die RNA-Destabilisierung durch TTP siehe [21]).

1.3.1.7 Cis-wirkende RNA-Sequenzen in HIV-1 RNAs

Ebenso wie die Stabilität der zellulären RNA wird auch die Expression von HIV-1-RNAs durch Sequenzelemente modifiziert. Diese als Instabilitätselemente (INS), inhibitorische Regionen (IR), oder *cis*-wirkende Repressor-Sequenzen (CRS) bezeichneten Sequenzelemente reduzieren einerseits die RNA-Expression, begünstigen andererseits aber gerade den Export ungespleißter RNA durch Rev. Zwei INS-Elemente, die zu einer Rev-Abhängigkeit der Gag-Expression führen, wurden im Bereich der *gag*-kodierenden Region nachgewiesen [269]. Weitere INS-Elemente wurden in der *pol*- [267] und in der *env*-kodierenden Sequenz gefunden [228]. Für das INS1-Element, innerhalb der p17-*gag*-Sequenz, wurde nachgewiesen, dass es zu einer geringen RNA-Halbwertszeit sowie einer geringen RNA-Menge im Kern führt [272]. Durch 28 stille Mutationen des p17-INS1-Elements (siehe 3.1.5, Abb. 18), die den AU-Gehalt in vier Regionen reduzierten, konnte eine Stabilisierung der RNA erreicht werden [269]. Im Einklang mit der Beobachtung, dass die RNA-Instabilität eine Voraussetzung für den Rev-vermittelten RNA-Export ist, konnten mehrere Arbeitsgruppen Rev-unabhängige Gag- und Env-Expressionsvektoren

herstellen, indem sie die Kodons optimierten und dabei den GC-Gehalt der RNA erhöhten [71;163;267]. Für das INS1-Element aus dem p17 konnte die Bindung von PABP1 und für eine Minimal-Sequenz aus dem INS1-Elements die Bindung von hnRNP A1 nachgewiesen werden [4;226;272].

Die *cis*-wirkenden Repressor-Sequenzen (CRS) innerhalb der *env*-Sequenz wurden von Rosen und Mitarbeitern beschrieben. Eine Deletion dieser Sequenzen führt zu erhöhter Genexpression und reduzierter Rev-vermittelter Expressionsteigerung [255]. Außerdem konnte von ihnen auch ein expressionsinhibierendes CRS-Element innerhalb der Struktur des RREs lokalisiert werden [255]. Dies wurde jedoch in den Experimenten anderer Arbeitsgruppen nicht bestätigt, die in unterschiedlichen experimentellen Systemen jeweils andere Sequenzen im und um das RRE als CRS-Element definierten [34;138;255;284] (siehe auch 4.1.3).

Die Funktionen der verschiedenen instabilisierenden Elemente sind vielgestaltig: Im Gegensatz zu den oben beschriebenen INS-Elementen führen manche der gefundenen IR/CRS-Elemente im *gag*- und *pol*- oder *env*- Bereich zu einer RNA-Ansammlung im Kern [203]. In einigen Fällen wurde auch für spleißmodulierende Sequenzen oder für die Spleißstellen selbst eine direkte Funktion als CRS-Element in Betracht gezogen [9;122]. Dies zeigt, dass die Benutzung der Begriffe Instabilitätselement, oder *cis*-wirkendes repressives Element rein phänomenologisch ist und verschiedenste Funktionen umfasst, die letztlich zu dem Phänotyp einer geringeren Genexpression führen.

1.3.1.8 Leadersequenzen subgenomischer HIV-1 RNAs

Beim Spleißen der HIV-1 mRNA führt die wahlweise Nutzung der Spleißdonoren (SD) 2 (nt 4962) und 3 (nt 5463) sowie der Spleißakzeptoren (SA) 2 (nt 4913) und 3 (nt 5390) zu vier unterschiedlichen, nicht kodierenden Leadersequenzen der mRNAs (vgl. Abb. 2 verändert nach Myers [223]). Die daraus resultierenden Exons haben eine Größe von 50 nt (Exon 2) bzw. 74 nt (Exon 3) und werden sowohl in Transkripten der 1,8 kb als auch der 4 kb Klasse gefunden [99;220;246;270]. Vergleichbare nicht kodierende Exons, die in den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA eingefügt werden, konnten auch bei anderen komplexen Retroviren wie SIV_{mac} und Visna Virus nachgewiesen werden [60;65].

Der Einbau der zusätzlichen Exons 2 und 3 in den 5'-untranslatierten Bereich erfolgt mit großer Häufigkeit bei den mRNAs, die durch das Spleißen auf die Spleißakzeptoren 4 oder 5 für *tat*, *rev* oder *nef* (1,8 kb) beziehungsweise *vpu*, *env* und *nef* (4 kb) kodieren. Eine RT-PCR Analyse ergab, dass 53 % der RNAs der 1,8 kb Klasse die den SA4 nutzen nicht kodierende Exons enthielten. Dies traf ebenfalls auf 20 % der auf SA4c/a/b gespleißten und auf 42 % der auf SA5 gespleißten Transkripte zu. Innerhalb der 4 kb Klasse enthielten bei Spleißereignissen auf den SA4 15 % und bei Spleißereignissen auf den SA4c/a/b und SA5 11 % der RNAs die nicht kodierende Exons [246]. Die Konservierung der Spleißstellen der Leaderexons und die Häufigkeit, mit der die Leaderexons in den Transkripten regulatorischer Gene der frühen Infektionsphase auftreten, lässt eine regulatorische Funktion dieser nicht kodierenden Sequenzen als wahrscheinlich erscheinen. Über ihre Funktion existieren jedoch widersprüchliche Befunde. So konnten Schwartz *et al.* keine relevanten Unterschiede der Expression von RNAs mit alternativ gespleißten Leaderbereichen beobachten [270] während Muesing und Mitarbeiter eine höhere Expressivität von RNAs mit nicht kodierenden Exons beschrieben [220]. Anhand vorangegangener Experimente in unserem Labor wurde ein modulierender Einfluss der HIV-1 Leaderexons auf die nukleäre RNA-Stabilität postuliert [175;186]. Dieser Effekt wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert.

1.3.2 Translationale Regulation

Neben der Ebene der Stabilität und des Exports der Transkripte kann auch auf der Ebene der Translation eine Regulation der Genexpression und damit die Bereitstellung der für die Virusreplikation nötigen Mengen unterschiedlicher Proteine erfolgen. Die Translation beginnt mit der Bindung der Translations-Initiationsfaktoren eIF-3 und eIF-4C an die 40S Untereinheit des Ribosoms. Mit der Bindung des ternären Komplex aus Methionyl-tRNA_i, eIF-2 und GTP bildet sich der 43S Präinitiationskomplex. Dieser 43S Komplex wird über den Cap-bindenden Faktor eIF4E zusammen mit eIF4G bzw. A an das 5'-Ende der RNA rekrutiert und beginnt unter ATP-Verbrauch die RNA auf das Vorhandensein einer Translationsinitiationsstelle zu scannen (Abb. 6A). Wird diese gefunden, erkennt der Initiationsfaktor eIF5 die Kodon-Methionyl-tRNA_i-Bindung und spaltet das GTP. Es kommt zur Ablösung von eIF-2 und GDP und auch die übrigen Initiationsfaktoren zeigen eine reduzierte Affinität zum RNP-Komplex und lösen sich. EIF-5 katalysiert außerdem die

Bindung der 60 S ribosomalen Untereinheit, was zu einem funktionellen Ribosom führt und die Translations-Elongation ermöglicht ([131], Kapitel II). Die Erkennung der Initiationsstelle hängt von deren Homologie zu der Konsensussequenz GCCGCCRCCAUGGMU (R: A, G ; M: A, C) ab [118;168] (siehe auch 3.2.2.3)

1.3.2.1 „Leaky scanning“ von HIV-1 Transkripten

Das alternative Spleißen der HIV-1 prä-mRNA führt zu mehr als 30 verschiedenen bi- oder polycistronischen mRNAs. Je nach Spleißereignis gelangen dabei die unterschiedlichen Leserahmen an die 5'-Position des Transkripts [246]. Die Translation verschiedener HIV-1 mRNAs wurde sowohl *in vitro* [99;270] als auch *in vivo* [233;270;271;273] untersucht. Sie erfolgt im allgemeinen Cap-abhängig. Es ist also anzunehmen, dass die primären, 5'-wärts liegenden Leserahmen einer Translationsregulation unterliegen, die vergleichbar ist mit der monocistronischer, zellulärer mRNAs. Im Rahmen der Untersuchungen des Expressionspotentials verschiedener HIV-1 Transkripte wurde ein inhibierender Effekt des *tat*-Startkodons auf die 3'-wärts gelegenen Leserahmen beobachtet. Dies wird so interpretiert, dass die *tat*-Initiationsstelle aufgrund ihrer Homologie zur Konsensussequenz [169] kein durchlässiges Scannen erlaubt. Die nachfolgenden *rev*-, *vpu*- und *env*- Leserahmen können daher nur von mRNAs ohne *tat*-Startkodon translatiert werden [270].

Kommt es aufgrund eines AUGs in einem suboptimalen Kontext zu einem Überlesen dieser ersten Initiationsstelle, kann es zu einem Translationsbeginn an nachfolgenden AUGs kommen. Dieser Vorgang wird als durchlässiges scannen („leaky scanning“) bezeichnet und erlaubt bei Transkripten mit mehreren Leserahmen (ORFs) die Translation 3'-wärts liegender ORFs in Abhängigkeit von der Initiationseffizienz am 5'-wärts liegenden ORF (Abb. 6B) [164;164]. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Translation des HIV-1 *env*-Leserahmens, da die *env*-kodierende RNA immer auch den *vpu*-Leserahmen 5'-wärts des *env*-Leserahmens besitzt. Die *env*-Translation muss also über dieses *vpu*-Startkodon hinweg stattfinden [99;233;273]. Ebenso wie das *vpu*-Startkodon erlaubt auch das schwache *rev*-Startkodon die Translation weiter 3'-wärts gelegener Leserahmen durch ein durchlässiges Scannen [273].

Abb. 6: Übersicht über eukaryontische Translationsmechanismen.

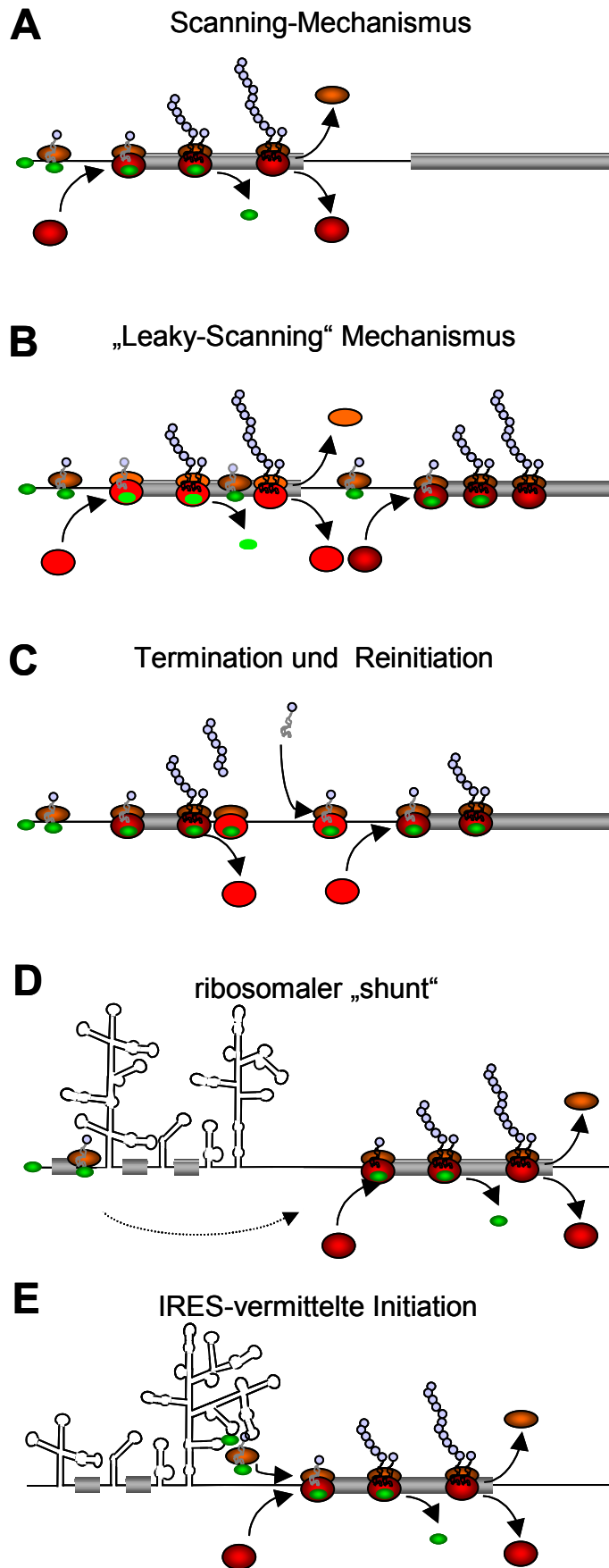
(A) Scanning-Mechanismus: Die Translationsinitiation beginnt an der Cap-Struktur der RNA, an der die Initiationsfaktoren den 43S-Komplex (40S-Untereinheit (UE): orange, initiator tRNA: grau, Initiationsfaktoren: grün) rekrutieren. Der 43S-Komplex scannt die RNA unter ATP-Verbrauch, bis er auf ein Startkodon trifft. Es kommt zur Bindung der 60S-UE (rot) und durch Translation des Leserahmens (grau) unter Nutzung weiterer beladener tRNAs (schwarz) zur Peptidsynthese (blau). Die Initiationsfaktoren lösen sich ab. Am Stoppkodon kommt es zum Ablösen des Ribosoms.

(B) „Leaky-Scanning“ Mechanismus: Nicht alle 43S Komplexe erkennen das 5'-wärts gelegene AUG, wenn es sich in einer suboptimalen Umgebung befindet, sodass die Translation an einem weiter 3'-wärts gelegenen Initiationskodon beginnen kann.

(C) Termination und Reinitiation: Nach Translation kurzer Leserahmen löst sich das Ribosom oder die 40S-UE nicht notwendigerweise von der RNA, sondern kann diese weiterscannen. Eine Erklärung für diesen Mechanismus könnten noch gebundene Initiationsfaktoren sein, die das Ribosom in einem scanning-kompetenten Zustand halten.

(D) Ribosomaler „shunt“: Der Mechanismus basiert auf einer Cap-abhängigen Initiation des Scannens, wobei größere Sekundärstrukturen vom 43S-Komplex umgangen werden und die Translation 3'-wärts dieser Bereiche initiiert wird.

(E) IRES vermittelte Initiation: Durch eine 300-500 nt. lange RNA Sekundärstruktur wird der 43S-Komplex zusammen mit weiteren Initiationsfaktoren unabhängig von der Cap-Struktur der RNA und von dem Cap-bindenden Initiationsfaktor eIF4E an die RNA rekrutiert. Die Translation kann unmittelbar am IRES oder nach Scannen der 43S-UE weiter 3'-wärts beginnen (Abb. verändert nach [131]).



1.3.2.2 5'-wärts gelegene offene Leserahmen (uORFs)

Bei Untersuchung des Translationspotentials von verschiedenen *tat*-mRNAs konnte durch die Insertion früher Stoppkodons im *tat*-Leserahmen die von der *tat*-AUG Erkennung unterbundene Rev-Expression wiederhergestellt werden. Dabei fiel die Rev-Expression um so stärker aus, je kürzer der verbleibende vom *tat*-AUG ausgehende kurze Leserahmen war [197]. Diese Beobachtung lässt sich durch eine Translation über den Terminations-Reinitiations-Mechanismus erklären (Abb. 6C). Ist der 5'-wärts liegende Leserahmen relativ kurz und liegt sein Terminationskodon noch vor dem Startkodon des folgenden Leserahmens, kann so eine Translation beider Leserahmen erfolgen [165;172;195;235]. Die Translation terminiert dabei am Stoppkodon des 5'-wärts gelegenen Leserahmens (upstream open reading frame, uORF). Das Ribosom dissoziiert jedoch nicht in jedem Fall von der RNA, sondern kann diese unter geeigneten Bedingungen weiter scannen und an dem 3'-wärts liegenden AUG die Translation erneut initiieren. Dabei ist noch unklar, ob nur die 40S-Untereinheit (UE) oder das vollständige Ribosom am weiteren Scannen der RNA beteiligt ist. Beim Terminations-Reinitiationsmechanismus spielen zwei Kriterien eine wesentliche Rolle. Zum Einen die Länge des uORFs und zum Anderen der Abstand des 3'-wärts liegenden Leserahmens zum Terminationskodon des uORFs. Analysen der Translation in Abhängigkeit von der uORF-Länge zeigten, dass ein uORF von 19-30 Kodons eine Translation des 3'-wärts liegenden Leserahmens erlaubt, während längere uORFs die Reinitiation inhibieren [100;139;197]. Als mögliche Erklärung wurde postuliert, dass die Initiationsfaktoren im Verlauf der Translation abdissoziieren und damit die Fähigkeit der Ribosomen zum Scannen und zur Reinitiation verloren geht (Abb. 6C) [100;170;197]. Voraussetzung für eine Reinitiation der Translation ist außerdem die erneute Bindung des ternären Komplexes aus eIF2E, GTP und Met-tRNA_i an die 40S-Untereinheit [134]. Diese erneute Bindung ist bei einem zu kurzen Abstand zwischen den Leserahmen nicht gewährleistet. Erst ein intercistronischer Abstand von 50 bis 80 nt erlaubt eine effiziente Erkennung des 3'-wärts positionierten AUGs [170].

UORFs wurden in 11 bis 42 % der Vertebraten-mRNAs gefunden ([212] sowie Referenzen darin). Viele dieser Transkripte stammen von Onkogenen oder Genen der Wachstumskontrolle und Differenzierung, die einer besonders strikten Expressionskontrolle unterworfen sind [168;171]. Die Effekte 5'-wärts liegender

Leserahmen auf die Translation weiter 3'-wärts liegender Leserahmen reichen dabei von einer Förderung der Translation, wie z.B. bei der Translation der 48 kDa Variante des Transkriptionsfaktors FLI-1 [263], bis zur Translationsinhibition, wie sie bei der Translationsregulation des Transkriptionsfaktors CCAAT/Enhancer-binding-Protein (C/EBP) beobachtet wurde [194]. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel für die Komplexität der Translationsregulation durch uORFs ist der Transkriptionsfaktor GCN4 der Hefe. Im 5'-Bereich vor dem GCN4-Leserahmen befinden sich vier verschiedene uORFs, die die GCN4-Expression regulieren [134]. Im Allgemeinen translatieren die Ribosomen den uORF1 und reinitiiieren am uORF4. Durch die Translation des uORF4 kommt es zu einer Inhibition der Initiation am folgenden GCN4-Leserahmen. Unter Hungerbedingungen ist die Konzentration ternärer Komplexe von eIF2E, GTP und Met-tRNA_i reduziert. Dadurch könnten die Ribosomen beim Erreichen des uORF4 noch nicht reinitiationskompetent sein. Eine erneute Translationsinitiation kann erst wieder am GCN4-AUG erfolgen. In Einklang mit diesem Modell führt eine Verlängerung des intercistronischen Abstands zwischen uORF1 und 4 zu einer verstärkten Inhibition der GCN4-Expression [1].

In einigen Fällen spielt das vom uORF translatierte Peptid eine entscheidende Rolle in der Translationsregulation. So erfolgt die Regulation der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Translation (AdometDC, ein Enzym der Polyaminsynthese) beispielsweise durch das vom uORF translatierte Peptid. In Gegenwart von Polyamin interagiert dieses mit dem Peptid und das Ribosom wird am uORF arretiert [257].

Auch in viralen Transkripten können uORFs die Expression auf verschiedene Weise beeinflussen. So befinden sich in der *gag*-RNA des Rous Sarkom Virus 3 uORFs, die die *gag*-Translation modulieren können. Der erste uORF verstärkt die *gag*-Translation während der dritte diese inhibiert [76]. Da virale Transkripte aufgrund der kompakten Genom-Organisation oft polycistronisch organisiert sind, können uORFs hier auch über mehrere kodierende Leserahmen hinweg wirken. Im humanen Hepatitis-B-Virus ermöglicht zum Beispiel eine Kombination von durchlässigem Scannen und Translation eines internen uORFs das Überlesen mehrerer AUGs und dadurch die Translation des 3'-wärts liegenden P ORFs [95;193].

1.3.2.3 uORFs in nicht linearen Translationsmechanismen

Außer den beschriebenen Regulationsmechanismen, die bereits zu einer nicht linearen Erkennung von AUGs z.B. beim GCN4 führen können, sind einige Fälle bekannt, in denen der lineare Scanning-Mechanismus umgangen wird. Dabei können uORFs einen Beitrag zur nicht linearen Erkennung von Initiationsstellen liefern. So können sie z.B. die Translation von 3'-ORFs im Rahmen eines sogenannten ribosomalen „Shunts“ ermöglichen (Abb. 6D). Beim Cauliflower Mosaik Virus wurde gezeigt, dass ein Sekundärstruktur-reicher 5'-UTR mit verschiedenen internen Leserahmen die Translation eines 3'-wärts gelegenen Leserahmen nicht stört, da er von den Ribosomen umgangen wird [101]. Dabei stellte sich heraus, dass diese nicht lineare Erkennung des 3'-wärts liegenden Initiationskodons, ein Sonderfall des Terminations-Reinitiations-Mechanismus, abhängig von der Cap-Struktur und von der Translation und Termination an einem uORF am 5'-Ende des Transkriptes ist [258]. In anderen Fällen wurden auch uORF-unabhängige, ribosomale „shunt“-Ereignisse beschrieben, wobei die genauen Mechanismen noch nicht entschlüsselt wurden [183;252;323].

Weiterhin können uORFs auch zur Rekrutierung von Ribosomen an interne ribosomale Erkennungsstellen (IRES) beitragen. Diese Cap-unabhängigen Translations-Initiationsstellen sind durch RNA-Sekundärstrukturen charakterisiert, die den 43S-Komplex sowie weitere nötige Initiationsfaktoren in die räumliche Nähe einer Translationsinitiationsstelle bringen [240] (Abb. 6E). Für einen uORF im Leaderbereich des Arg/Lys-Transporters *cat-1* konnte z.B. gezeigt werden, dass seine Translation zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des Leaders und damit zur Bildung eines IRES-Elements führt [322].

Auch die Translation von HIV verläuft offenbar nicht zwingend über eine Cap-abhängige Translation. Neuere Arbeiten beschreiben zwei interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) im 5'-Bereich der HIV-1 mRNA [29;38]. Darüber hinaus reduziert die Spaltung des Translationsinitiations-Faktors eIF4G durch die virale Protease die Cap-abhängige Translation [229;239]. Die Gegenwart eines IRES ermöglicht trotz eines Vpr-induzierten Halts in der G2-Phase des Zellzyklus und der damit verbundenen Inhibition der Cap-abhängigen Translation eine effektive Translation der HIV-RNA [28].

Über einen Einfluss von uORFs auf die HIV-Translation ist bisher nur wenig bekannt [197]. Ausgehend von Konstrukten zur funktionellen Analyse der Wirkung von uORFs auf die Expression einer polycistronischen HIV-1 mRNA und den erforderlichen Bedingungen für eine Translationsstimulation 3'-wärts liegender Gene, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und unter welchen Bedingungen eine Regulation der HIV-1 mRNA-Translation durch uORFs stattfinden kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der 5'-nicht kodierende Bereich der mRNA kann die Genexpression posttranskriptional beeinflussen. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von alternativ gespleißten, nicht kodierenden Leaderexons und 5'-wärts gelegenen Leserahmen auf die HIV-1 Genexpression.

Die Konservierung der Spleißstellen sowie das häufige Auftreten der nicht kodierenden Leaderexons 2 und 3 in den RNAs der frühen Infektionsphase lässt vermuten, dass diese Exons eine Funktion in der Regulation der HIV-1 Replikation ausüben. Um diese Funktion zu untersuchen, sollten die RNA-Mengen von authentischen und heterologen cDNA-Konstrukten in Abhängigkeit von der Leadersequenz bestimmt werden. Um einzugrenzen, wann die Wirkung der Leadersequenz stattfindet, sollten die Sequenzen der HIV-1 Exons 2 und 3 in einem Intron platziert werden und die prä-mRNA-Menge vor bzw. nach dem Spleißen sowie in Abhängigkeit von der Rev/RRE-Interaktion untersucht werden. Darüber hinaus galt es, den Einfluss der Leaderexons auf die Transkription, auf das Capping sowie die nukleäre RNA-Stabilität zu untersuchen. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob die Leaderexon-vermittelten Unterschiede der prä-mRNA-Menge mit veränderten RNA-Protein-Interaktionen einhergehen.

Im zweiten Teils der Dissertation war die Auswirkung eines uORFs 5'-wärts des *tat*- und des *rev*-Startkodons auf das Translationspotential einer polycistronischen HIV-1 mRNA Ziel der Untersuchung. Dazu galt es die uORF Länge, die Translationsinitiationsstärke am uORF AUG und den intercistronischen Abstand von uORF und ORF zu variieren. Unter Berücksichtigung der zuvor erhaltenen Ergebnisse, sollten zusätzlich verschiedene HIV-1 Transkripte untersucht werden, in denen uORFs einen Effekt auf die Translation ausüben könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit einem automatischen DNA-Synthesizer (Modell 381A; Applied Biosystems) unter Abspaltung der endständigen Tritylgruppe synthetisiert, mit NH_4OH (3×30 min) vom Träger abgekoppelt und über Nacht bei 55°C inkubiert, um die Schutzgruppen abzuspalten. Die Oligonukleotide wurden über NAP25-Säulen (Pharmacia) gereinigt, mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA) eluiert und die Konzentration photometrisch bei 260 nm (Ultrospec II-4050II; Pharmacia) bestimmt. [264] Folgende Oligonukleotide wurden verwendet (die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen):

212: 5'-TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAAGACTGCTGACATCGAGCTTTC
T,

214: 5'-ATCGAATTCAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG,

223: 5'-TAGGAGCTCCCTGGATGCTTCCAGGGCTC,

377: 5'-CTGAAGCGCGCCACGGCAAGAGGCGAGGGGAGGCGACTG,

384: 5'-CAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGAT,

643: 5'-GGTTGCTTCTTCCACACAGG,

742: 5'-GAGCTCTAGAGGACAGCAGAGATCC

743: 5'-CCAGCTGCAGCGCTTCCAGAGGAGC,

744: 5'-GAGCTCTAGAATCTGCTATAAGAAAT

745: 5'-CCAGCTGCAGCGCTTGTTATGTCCTGC,

783: 5'-ATCGGTAACCAGGAGCTGTTGATCC,

784: 5'-AGCGGTACCTGGTGCAGAGAGAAA,

788: 5'-GGCCTCGAGCTGTTTTAAGCCTAATGTG,

789: 5'-GATGAATTCATATATCTTAATGGCACATGC,

822: 5'-TCTAGAATTCTCTCTTCTGCCGTT,

823: 5'-AGCGCTCGAGGGACAGCCAGGCCA,

827: 5'-GCGCCGAATTCGTCGACGGTAC,

828: 5'-CGTCGACGAATTCG

829: 5'-CTAGGTAATCAGTGGCGATG,

830: 5'-AATTCATCGCCACTGATTAC,

860: 5'-CTGCTCGAGAGCT,

861: 5'-CTCGAGCAG,

866: 5'-AACAAGCGCTGATCTCTACAATACTTGG,

873: 5'-GTGGCCCTTGGTCTTCTGGGGCTGAATTCATCGCCCCTCTGTCAGTTTCGT,
874: 5'-GTGGCCCTTGGTCTTCTGGGGCTTGTCCGGCGCCCCTCTGTCAGTTTCGT,
907: 5'-CATAAGCTTGGTTACCTCCACAGCCAGGAAGCACTATATC,
908: 5'-GATCCCGGGTACCGGGAGCAGCAGG ,
909: 5'-AATTCTGCAACAGCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGTG,
910: 5'-CATAAGCTTGGTTACCTCCACAGCCAGG,
911: 5'-TCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAAACAGCAGCTGTTGCAG,
918: 5'-CTATGTCGACAAGGAGCTGCAGATCGATGAATTCGATACTTACCAGTCGCCTCCCCTC,
922: 5'-GAGCGAATTCACTCTGCTATAAGAAAGGCCT,
923: 5'-GAGCGAATTCGGACAGCAGAGATCC,
925: 5'-GCGATGAATTCTTATCCATTTTCAGAAT,
927: 5'-GCGATGAATTCTTGGGTGTCGACATAG,
931: 5'-CTATGTCGACACCCAATTCTGAAACGATAATGGTGAATATCCCTGCCTAACTCTATTAC
TATA,
932: 5'-ATCCTGCAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGA,
933: 5'-GATCCCGGGTACCTAGCACCCACCAA,
934: 5'-CGTAAGCTTGGTTACCTAGCATTCCAAGG,
958: 5'-GCGATGAATTCTTATACAGCTGCAACTTGGCCAAATTCTCAGAATTTACATCGCGAGCA
ACA ACTGCTGTTTATCCATTTTCAGAAT,
964: 5'-TTGCAGAATTCGGCGCCCCTCTGTCAGTTTC,
998: 5'-ATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACTTGTAATGCAACCTATA,
999: 5'-ATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAAGAAATGTAATGCAACCTATA,
1011: 5'-CTAGAAGACACAGCCAGGAAGCACTATATC,
1012: 5'-ATCGAAGACCTGGCTGTGGA,
1039: 5'-GGCCCTGCAGAATAGTTTTTGCTGT,
1041: 5'-GCGCGTCGACATGTAATTCTGAAAAGAAAGAGGAGA,
1055: 5'-CGCGAATTCACTCCGCCATCCGCAAGGCCCTGCTGGGCCACATCGTGAGCCC,
1056: 5'-GGCCTGCAGCGCTTGTGTGGCCCGCCTGGTACTCGCACCTCGGGCTCACGATG ,
1213: 5'-TCCGAAGACGGGCGCCATTGCTAGAGAT,
1214: 5'-GCAGAATTCCTTATTATGGCTTCCACTCCTGCTCAAGTATCCCCATA,
1215: 5'-CTCGAAGACTGGCGCCCGAACAGGGA,
1216: 5'-GTAGTCGACATAGCAGAATAGGCCTAGAGCCCTGGAA,
1217: 5'-TCTAGGATCTACTGGCTCCATTTCTTGAAGCAGTTTATAGGCTGAC,
1218: 5'-TCTAGGATCTACTGGCTCCATTTCTTGAAGCAGTTTATAGGCTGAC,
1219: 5'-TCTAGGATCTACTGGCTCCATTTCTTGTGTAATGAAACAAAC,
1271: 5'-AGCAGTCGTCTCGTGGCCAAGAAATGGCTTCGAAAGTTTATGAT,
1272: 5'-TAGCCCGGGCTACTATTATTGTTTATTTTIGAGA,
1275: 5'-CGCGAATTCATTACATGCCTAGGTCCACACTGACTAAA,
1276: 5'-CGCGAATTCATTTCTTGCCTAGGTCCACACTGACTAAA,

1451: 5'-GCGCTACTGGCTCAATATGTGGCACAACATG,
 1452: 5'-GCAAAGCTAGCCTAGGGTGGCGATGACTTCGAAAGTTTA,
 1455: 5'-GCAAAGCTAGCCTAGGCAAGAAATGACTTCGAAAGTTTA,
 1456: 5'-GCAAAGCTAGCCTAGGCATGTAATGACTTCGAAAGTTTA,
 1565: 5'-AATTCATTAAGC,
 1566: 5'-CTAGGCTTTAATG,
 1567: 5'-AATTCATTACAAGC,
 1568: 5'-CTAGGCTTGTAATG,
 1569: 5'-CGAAGTCATTACAAGCCTAGG,
 1570: 5'-CTAGCCTAGGCTTTAATGACTT,
 1571: 5'-CGAAGTCATTAAGCCTAGG,
 1572: 5'-CTAGCCTAGGCTTGTAATGACTT,
 1622: 5'-ATCGAATCCCGGGTGGAGAGCGTC,
 1623: 5'-ATCCTGCAGTTAGTAATTTGGCTGA.

2.2 Rekombinante Plasmide

Alle Plasmide enthalten, sofern nicht anders erklärt, einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in *E.coli* unter relaxierter Kontrolle und den prokaryontischen Selektionsmarker amp (Ampicillinresistenzgen). Die Nukleotidnummerierung entspricht, wenn nicht anders vermerkt, der Vorläufersequenz HIV NL4-3 der HIV Datenbank von Myers *et al.* [223].

2.2.1 Plasmide der LTR1.4E Familie

Die Konstrukte enthalten einen LTR und die authentische von Spleißdonor 1 auf Spleißakzeptor 4 gespleißte Leadersequenz einer HIV-1 *tat*-mRNA. Die Transkripte können zusätzlich die Sequenz der nicht kodierenden Exons 2 bzw. 3 oder beide Exonsequenzen enthalten (**LTR1.4E**, **LTR1.2.4E**, **LTR1.3.4E**, und **LTR1.2.3.4E**). Die Sequenzen der nicht kodierenden Exons 2 und 3 sind in diesen Konstrukten nicht von Spleißstellen flankiert und können daher nicht herausgespleißt werden. Konstrukte der LTR1.4E⁺-Reihe unterscheiden sich von der zuvor beschriebenen Reihe durch eine Mutation des Startkodons des *tat*-Leserahmens (**LTR1.4E⁺**, **LTR1.2.4E⁺**, **LTR1.3.4E⁺**, **LTR1.2.3.4E⁺**). Die Konstrukte der LTR1.4⁺tatCAT-Serie unterscheiden sich von den zuvor genannten Konstrukten durch den Austausch der *tat*-Sequenz 3'-wärts des *tat*-Startkodons durch den Leserahmens des Reportergens

Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) (**LTR1.4tatCAT**, **LTR1.2.4tatCAT**, **LTR1.3.4tatCAT**, **LTR1.2.3.4tatCAT**) [176;187]. Diese CAT-Konstrukte wurden von C. Lenz bereitgestellt [186].

Die Konstrukte mit den nicht kodierenden Exon 3'-wärts des CAT Gens wurden ausgehend vom Konstrukt **LTR 1.4tatCAT MCS pA** kloniert. Das Konstrukt LTR 1.4tatCAT MCS pA unterscheidet sich vom Ausgangskonstrukt LTR1.4tatCAT durch die Gegenwart mehrerer Restriktionsschnittstellen 3'-wärts des CAT-ORF bei gleichzeitigem Verlust mehrerer Restriktionsschnittstellen 3'-wärts des SV40 poly(A)-Signals. Die Klonierung erfolgte aus dem Vektor LTR SD1CATenvpAΔuORF [232] *BclI*-*AfIII* und dem *AfIII*-*Van91I* Insert aus LTR 1.4 tatCAT sowie dem *Van91I*-*BclI* Fragment aus pSVT7CATΔEΔSp [186].

Um die nichtkodierenden Exons 3'-wärts des CAT-Gens zu inserieren und die Konstrukte der **LTR 1.4tatCAT X pA**-Serie (X steht für die unterschiedlichen nicht kodierenden Exons) zu erhalten, wurden die Exonsequenzen über PCRs mit den Primern #742 und #743 (Exon 2) bzw. #744 und #745 (Exon 3) und #742 und #745 (Exon2/3) amplifiziert und über *XbaI*-*PstI* in den Vektor LTR 1.4tatCAT MCS pA kloniert.

2.2.2 Plasmide zur RRE-Analyse

Die Plasmide der **LTR 1.4tatCAT RREX pA**-Serie (X steht für die unterschiedlichen Längenbezeichnungen der inserierten RRE-Sequenzen) wurden wie folgt kloniert: In das Konstrukt LTR 1.4tatCAT MCS pA wurde das PCR-Produkt der Primer #908/#907 (mit pNLA1env0 als Template) über *HindIII*-*XmaI* kloniert. In diesen ersten *BstEII*-*KpnI* geschnittenen Vektor LTR 1.4tatCAT RRE094 pA wurden die unterschiedlich langen RRE-Sequenzen kloniert, die durch PCRs mit den Primern #783/#784 (RRE234), #908/#910 (RRE184), #933/#934 (RRE351), jeweils an pNLA1 für die RREX-Serie bzw. an pNLA1env0 für die RRE0X-Serie amplifiziert wurden. Das RRE261 wurde mit Hilfe der Primer #933/#1011 und #934/1012 amplifiziert und über *KpnI*-*BbsI*-*BstEII* über nahtlose Ligation kloniert (siehe 2.3.4).

2.2.3 Plasmide mit Exon 2- und Exon 3-Sequenz im Intron

Das Plasmid **LTRSD SA_{tat}CAT MCS pA** wurde über die Insertion des PCR-Produktes der zyklischen Auffüllreaktion mit den Oligonukleotiden #918/#377 in die *Bss*HII-*Sal*I des Vektors LTR 1.4_{tat}CAT MCS pA und nachfolgender Insertion des PCR-Produkts der Primer #931/#932 in die *Pst*I-*Sal*I Schnittstellen des resultierenden Vektors kloniert. Die nicht kodierenden Exon 2 und 3 wurden mit den PCR Primern #923/#743 und #922/#745 an pNLA1 amplifiziert und in die *Eco*RI-*Pst*I Schnittstellen des Introns von LTRSD SA_{tat}CAT MCS pA inseriert, um die Konstrukte der **LTRSD X SA_{tat}CAT MCS pA**-Serie zu erhalten (X steht als Platzhalter für die im Intron inserierten Sequenzen). Die Plasmide der **LTRSD X SA_{tat}CAT RRE pA**-Serie wurden über Austausch der Multicloningsite-Sequenz erhalten. Dabei wurde das *Nco*I-*Mun*I-Fragment, das die RRE351-Sequenz beinhaltet, aus dem LTR1.4 _{tat}CAT RRE351 pA Konstrukt (siehe 2.2.2) in die gleichermaßen geschnittenen Vektoren der LTRSD X SA_{tat}CAT MCS pA-Serie kloniert.

Die Konstrukte der **LTRSD X SA_{opt}tatCAT RRE pA**-Serie wurden über Klonierung der *Pst*I-*Sal*I geschnittenen PCR mit den Primern #1039/#1041 an SV _{tat}⁺ _{rev}⁺ SA7_{opt} in den *Sal*I-*Pst*I geöffneten Vektor LTRSD X SA_{tat}CAT RRE pA konstruiert.

2.2.4 Plasmide mit INS, INS^{GC} und Exon 3^{GC}-Sequenz im Intron

Die PCR-Produkte mit den Primern #1623/#1622 an pKS17 RRE p17-INS1 und an pCMV1234pAINS1 [269] wurden über *Eco*RI-*Pst*I in das Konstrukt LTRSD SA_{tat}CAT RRE pA kloniert, um die beiden Expressionsplasmide **LTRSD INS SA_{tat}CAT RRE pA** und **LTRSD INS^{GC} SA_{tat}CAT RRE pA** zu erhalten. Für die Herstellung des Konstruktes **LTRSD EX 3^{GC} SA_{tat}CAT RRE pA** wurden die Oligonukleotide #1055/#1056 ohne Template amplifiziert und über *Eco*RI-*Pst*I-Restriktion in den Vektor LTRSD EX 3 SA_{tat}CAT RRE pA kloniert.

2.2.5 Plasmide für die *in vitro* Transkription

Die Plasmide der **T71.X.4**-Serie (X steht als Platzhalter für die Sequenzen der nicht kodierenden Exons 2 und 3) wurden freundlicherweise von C. Lenz zur Verfügung gestellt. Ihre Klonierung wurde bereits beschrieben [176;187]. Die Sequenz beinhaltet einen T7-

Promotor, gefolgt von den unterschiedlichen Sequenzen des alternativ gespleißten HIV-1 Leaders sowie der CAT-Sequenz und einem Oligo-Adenylat-Abschnitt 3'-wärts des CAT-ORFs. Zur Analyse des Einfluss der Leadersequenz auf die *in vitro* RNA-Stabilität wurden die Plasmide mit *SalI* 5'-wärts des CAT-ORFs linearisiert. Die Transkription lieferte die HIV-1 Leadersequenzen mit 298 nt (T71.4), 348 nt (T71.2.4), 372 nt (T71.3.4) und 422 nt (T71.2.3.4) Länge.

Die Plasmide **pSVT7Exon2**, **pSVT7Exon3**, **pSVT7Exon2/3**, **pSVT7Exon3^{GC}**, **pSVT7INS**, **pSVT7INS^{GC}** wurden über *EcoRI-PstI* Restriktion, Isolation der entsprechenden Intronfragmente der Plasmide der LTRSD X SA_tatCAT RRE pA-Serie und der Ligation dieser Fragmente in den *EcoRI-PstI* geöffneten Vektor SVcrev kloniert.

Die Plasmide **pSVT7 RRE94**, **pSVT7 RRE094**, **pSVT7 RRE351** und **pSVT7 RRE0351** wurden durch *MunI-XmaI* Restriktion des Vektors pSVT7CATdE [186] und Insertion des RRE-enhaltenden *XmaI-MunI* Fragments aus den Vektoren der LTR1.4_tatCAT RREX pA-Serie kloniert.

Das Plasmid **73LTR *SalI-BgIII***; zur Detektion des 5'-Bereichs der HIV-1 Transkripte im Rahmen der Capping-Analysen; wurde über Ligation des 190 nt *BgIII-SalI* Fragmentes der HIV-1 Leader-Sequenz aus LTR636CATpA [330] in den *SalI-BgIII* geöffneten Vektor pSP73LTRCATΔEΔSp [186] kloniert.

Das Plasmid zur Herstellung der hGH-Sonde (**73hGH**), sowie das Plasmid zur Herstellung der CAT Sonde (**pGemCAT**) wurden von C. Lenz zur Verfügung gestellt [186]. Das Plasmid 73hGH enthält das *BgIII-XmaI*-Fragment aus dem Exon 5 des menschlichen Wachstumshormon-Gens, dass in pSP73 inseriert wurde. Die Linearisierung erfolgte mit *BgIII*, die Transkription mit T7-Polymerase ergibt ein antisense-Transkript von 180 nt Länge.

Das Plasmid **pGEMCAT** enthält das *PvuII-NcoI*-Fragment des CAT Gens mit 401 nt Länge innerhalb des Vektors pGEM-5Zf(+). Nach der Linearisierung mit *BspEI* wurde die erforderliche 77 nt lange antisense-Sonde mittel T7-Polymerase synthetisiert.

Das Plasmid zu Herstellung der β-Aktin Intron-Sonde (**pβ-actin intron**) wurde wie folgt kloniert: Mit den Primern #822/#823 wurden die Nukleotide 1729-2050 des Intron c des

humanen β -Aktin Gens (Genbank Acc. No. E00829) amplifiziert und nach Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pSP73 kloniert. Zur Klonierung des humanen Cytochrom C Oxidase Untereinheit II (CCOXII) Sonden-Vektors **pT7CCII** wurden die Nukleotide 7576-8102 der CCOXII-Sequenz (Genbank Acc. No. 001807) mit den Primern #788/#789 amplifiziert und nach *EcoRI-XhoI* Restriktion in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pSP73 kloniert.

Das Plasmid zur Herstellung der *env*-Sonde **LTR cenvpA(-)** wurde bereits beschrieben [175]. Die Linearisierung erfolgt mit *HincII* die Transkription mit SP6-Polymerase führt zu einem antisense-Transkript mit 237 nt Länge, das der *env*-Sequenz zwischen *HincII* und *XhoI* des *env*-Gens entspricht (nt 8648-8887).

2.2.6 Plasmide der uORF-Längen-Serie

Das Konstrukt bzw. **LTR-E/X-pA uORF (LTRuORF17)** wurde durch Insertion des *EcoRV-NarI*-Fragments der LTR-Sequenz und des *EcoRI-XhoI*-Fragments aus pNLA1 in die mit multiplen Schnittstellen versehene Klonierungsstelle von pSP72 kloniert und wurde bereits als LTR-E/X-pA beschrieben [265]. Das Konstrukt **LTR-E/X-pA Δ uORF** resultierte aus der Insertion eines Adapters aus den Oligonukleotiden #827/#828 in den *KasI-KpnI* geöffneten Vektor LTR1.4E Δ KSD1 [175] und anschließender Ligation des *BspEI-EcoRI* Fragments aus diesem Zwischenklon in den ebenso geschnittenen Vektor LTRuORF17. Die Insertion des PCR-Produkts der Primer #927/#643 an LTRuORF17 in den *EcoRI-KpnI* geschnittenen Vektor lieferte das Konstrukt **LTRuORF7** mit verkürztem uORF. **LTRuORF12** und **LTRuORF32** wurden durch Insertion der PCR-Produkte mit den Primern 925/643 bzw. #958/#643 kloniert. Um eine Variation der Translation aufgrund einer Veränderung in der Effizienz der Kodon-Nutzung zu verhindern, wurden zur Verlängerung des uORF auf 32 Aminosäuren Kodons der uORF17 Sequenz verwendet. Die entsprechenden Konstrukte der **SVuORF X ctatcrev**-Serie wurden durch Insertion der *EcoRI-SacI* Fragmente der LTRuORF-Serie und dem *SacI-XhoI* Fragment aus SVcrev in den *EcoRI-XhoI* geschnittenen Vektor SV-E/X-pA uORF (SpNLA1 ELP) kloniert, welcher durch Insertion des Linkers #829/#830 in den *EcoRI-BlnI* geschnittenen Vektor SV-E/X-pA Δ uORF (entspricht SV E/X [152]) entstand. Die Konstrukte der **LTRuORF X ctatcrev**-Serie wurden durch Klonierung der *EcoRI-CelIII* Fragmente der

entsprechenden SVuORF X ctatcrev Konstrukte in den *EcoRI-CeIII* geschnittenen Vektor LTRuORF17 erhalten (Das X steht als Platzhalter für die Kodonlängen der verschiedenen uORFs).

2.2.7 Plasmide der intercistronischen Abstandsserie

Um die Insertion von PCR-Produkten zwischen *Sall* und *XhoII*, also zwischen uORF und dem *tat*-Startkodon, in SVuORF17ctatcrev zu ermöglichen, wurde die zusätzliche *Sall* Schnittstelle in der 3'-Multicloningsequenz durch Ligation des *EcoRI-Sall* Fragmentes mit dem *XhoI-EcoRI* geöffneten Vektor deletiert. Dem neuen Vektor SVuORF17ctatcrev ΔSX wurden Fragmente von 62, 88, und 121 bp aus PCRs an SV-E/X-pA ΔuORF mit dem 5'-Primer #1216 und den 3'-Primern #1217, #1218, #1219 inseriert. Diese Fragmente beinhalten Sequenzen 5'-wärts des *rev*-Startkodons innerhalb des *tat*-ORF von nt 5851 bis nt 5970, 5937 oder nt 5911. Die so entstandenen Konstrukte der Serie wurden LTR uORF17 icdX ctatcrev und SV uORF17 icdX ctatcrev benannt (Das X steht als Platzhalter für die unterschiedlichen intercistronischen Abstände).

2.2.8 Plasmide der AUG-Stärkenanalyse

Die Plasmide pRL^{5'tat}, pRL^{5'uORF} und pRL^{5'vpu} wurden mit den 5'-Primern #1452/#1455 bzw. #1456 sowie #1451 als 3'-Primer und pRLSV40 (Promega) als Matrize kloniert. Das PCR-Produkt wurde *AflIII-NheI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pRLSV40 eingefügt. Die Plasmide pRLuORF^{5'vpu-5U} und pRL^{5'vpu-3U-5U} wurden mittels Insertion eines Adapters kloniert. In den *SfuI-NheI* geschnittenen Vektor pRL^{5'vpu} wurden die hybridisierten Oligonukleotide #1572/#1569 (-5U) und #1570/#1571(-3U-5U) kloniert.

2.2.9 Plasmide zur Untersuchung der uORF-AUG-Erkennung

Für das Konstrukt LTRuORF^{tat}ctatcrev wurde eine PCR mit den Primern #212/#1276 an LTRuORF17 durchgeführt. Das *EcoRI-Kpn2I* geschnittene PCR-Produkt wurde in den gleichermaßen geschnittenen Vektor LTR uORF17ctatcrev ligiert. Für die Klonierung von LTRuORF^{vpu}ctatcrev wurde das PCR-Produkt der Primer #212/#1275 an LTRuORF17 verwendet. Die Konstrukte der entsprechenden SVuORF^Xctatcrev-Serie (X steht für die *vpu*- oder *tat*-AUG-Umgebung) wurden über Insertion des *BlnI-CeIII* Fragments der LTR-

Konstrukte in den ebenso geschnittenen Vektor SV E/X kloniert [152]. Die Konstrukte **LTRuORF^{vpu-5U}ctatcrev** und **LTRuORF^{vpu-3U-5U}ctatcrev** wurden durch Insertion der Oligonukleotide #1566/#1565 (vpu-3U-5U) und #1568/#1567 (vpu-5U) in den *EcoRI-BlnI* geöffneten Vektor LTRuORF^{vpu}ctatcrev kloniert. Für die Konstrukte **SVuORF^{vpu-5U}ctatcrev** und **SVuORF^{vpu-3U-5U}ctatcrev** wurden die gleichen Oligonukleotide in den *EcoRI-BlnI* geöffneten Vektor SVuORF^{vpu}ctatcrev inseriert.

2.2.10 Plasmide der 1.5-Serie

Das Plasmid **SV1.5E vpu uORF** wurde durch Ligation des 83 nt *BssHII-HindIII*-Fragments von pNLA1 1.5 und des 321 nt *HindIII-KpnI*-Fragments von SV E/X in den *BssHII-KpnI* geöffneten Vektor SV1.4E tat⁻rev⁻SD4⁻ erhalten. Zum Erhalt des Plasmids **SV1.5E vpu uORF^{tat}** wurde das PCR-Produkt der Oligonukleotide #999/#643 an pNLA1 *HindIII-KpnI* Fragment geschnitten, bei der Klonierung von **SV1.5E vpu ΔuORF** wurde das PCR-Produkt #998/#643 an pNLA1 ebenso geschnitten und mit dem *BssHII-HindIII*-Fragment von pNLA1 1.5 und dem *BssHII-KpnI* geöffneten Vektor SV1.4E tat⁻rev⁻SD4⁻ ligiert.

2.2.11 Plasmide der 1.3ΔSD3-Serie

Das Plasmid **pNLA1 1.3ΔSD3** wurde aus pNLA1 [287] kloniert, einem cDNA Abkömmling von pNL4-3, dem das *gag*- und der größte Teil des *pol*-Gens fehlt [3]. Der Vektor pNLA1 wurde mit *BssHII-EcoRI* (nt 712 –1575), das PCR-Produkt der Primer #866/#223 an pNLA1 mit *EcoRI* und *Eco47III* und das PCR-Produkt der Oligonukleotide #214/#745 an LTR134envpA mit *BssHII* und *Eco47III* geschnitten und zum Plasmid pNLA1 1.3ΔSD3 ligiert. Die so eingebrachte *Eco47III* Schnittstelle ersetzt den Spleißdonor 3. Das vpr⁻-Plasmid **pNLA1 1.3ΔSD3Δvpr** entstand durch die Insertion des PCR-Produkts der Primer #214/#874 an pNLA1 1.3ΔSD3 in den *BbsI-BssHII* (nt 712-1413) geschnittenen Ausgangsvektor pNLA1.

pNLA1 1.3ΔSD3uORF entstand durch Insertion des *BssHII-EcoRI* geschnittenen PCR-Produkts der Primer #214/#873 an pNLA1 1.3ΔSD3 in den *BssHII-EcoRI* geöffneten Vektor pNLA1(nt 712–1575). Das entsprechende Plasmid **pNLA1 1.3ΔSD3ΔuORF** wurde nach Schnitt des Plasmids pNLA1 1.3ΔSD3uORF mit *EcoRI* und *Eco47III* und Ligation

des PCR-Produkts der Primer #866/#964 an pNLA1 1.3 Δ SD3uORF erhalten, was zu einer Mutation des uORF-ATG zu CCG führte. **pNLA1 1.3 Δ SD3vpr78** entstand durch Ligation des pNLA1 1.3 Δ SD3 *EcoRI-SalI*-Fragments (nt 1575-1617) mit einem Adapter aus den hybridisierten Oligonukleotiden #909/#911. Das so eingefügte zusätzliche T an Position 1602 führte zu einer Leserasterverschiebung und in Position 1623 zu einem Stoppkodon. Zur Klonierung von **pNLA1 1.3 Δ SD3vpr53** wurde pNLA1 1.3 Δ SD3vpr⁻ *EcoRI-BssHII* geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen PCR-Produkt der Primer #384/#1214 an pNLA1 1.3 Δ SD3 ligiert. Die entsprechenden Konstrukte der **pNLA1 1.3 Δ SD3ctatcrev**-Reihe wurden durch Austausch des *EcoRI-XhoI* Fragments der pNLA1 1.3 Δ SD3-Serie durch das *EcoRI-XhoI* Fragment von pUHctatcrev, einem pNLA1-Derivat, das dem Spleißereignis von SD4 nach SA7 entspricht, erhalten. Die Klonierung von **pNLA1 1.3 Δ SD3vpr78ctatcrev** erfolgte aufgrund der Lage der Mutation über Insertion des *SalI-CeIII* Fragments von pUHctatcrev in den *SalI-CeIII* geschnittenen Vektor pNLA1 1.3 Δ SD3vpr78. Die Konstrukte der **SV1.3 Δ SD3ctatcrev Δ PS**-Reihe wurden durch Insertion des *BssHII-SacI* Fragments der pNLA1 1.3 Δ SD3-Serie in SV1.4 ctatcrev (kloniert von D. Bilicic: unter dem Namen Svtr⁺⁺ccrev [18]) und Austausch des *PvuII-SacI*-Fragments der TAR-Region (nt 436 bis 491) durch einen Adapter aus den Oligonukleotiden #860/#861 erhalten. Die Transkription dieser Konstrukte ist daher nicht mehr durch Tat induzierbar.

2.2.12 Plasmide der 1.4-Serie

Das Konstrukt **LTR1.4EuORF24e** wurde über zwei PCRs mittels nahtloser Ligation (siehe 2.3.4) kloniert: Das PCR-Produkt der Primer #212/#1213 an LTR1.4envpA wurde *AfIII-BbsI* und das PCR-Produkt mit den Primern #1215/#643 *BbsI* geschnitten. Beide Fragmente wurden in den *AfIII-BbsI* geöffneten Vektor LTR-E/X-pA Δ uORF17 inseriert. Die Konstrukte **SV1.4uORF24ectatcrev** und **SV1.4ctatcrev** wurden durch Insertion des 391 nt *HindIII-Bsu36I* Fragments aus LTR1.4E bzw. LTR1.4E uORF24e — was den uORF und den 5'-Bereich des *tat*-ORFs umfasst — in den gleichermaßen geöffneten Vektor SV1.3 Δ SD3uORFctatcrev kloniert. Das Konstrukt **SV1.4uORF24ectatcrev Δ PS** und das Konstrukt **SV1.4ctatcrev Δ PS** zur Bestimmung der Tat-Expression wurden dann durch Insertion eines *PvuII-SacI* Adapters aus den Oligonukleotiden #860/#861 erhalten.

Die Konstrukte **LTR1.4uORF24ctatcrev** und **LTR1.4ctatcrev** zur Bestimmung der Rev-Expression wurden aus dem *Bss*HIII-*Ce*III geöffneten Vektor LTR1.4E uORF24e bzw. LTR1.4E durch Insertion des *Bss*HIII-*Ce*III Fragments aus dem Plasmid pNLA1 1.3ΔSD3 ctatcrev kloniert.

2.2.13 Reporterplasmide für die Tat- und Rev-Messung

Das Rev-Reporter Plasmid **SV \bar{r}^{-} envRL** wurde wie folgt kloniert: Der Vektor SV \bar{r}^{-} envCAT [266] wurde *Xma*I-*Bbs*I geschnitten und das *Esp*3I-*Xma*I geschnittene PCR-Produkts der Primer #1271/#1272 an pRLSV40 (Promega) inseriert, sodass das CAT-Gen durch das Luziferasegen aus *Renilla reniformis* ersetzt wurde.

Für das Tat-Reporterplasmid **LTR 636 RL** wurde ein von einer *Bgl*III und einer *Xma*I Schnittstelle flankiertes 636 nt LTR-Element [330] in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pRL0 (Promega) kloniert.

2.2.14 Plasmide zur Kotransfektion

LTRcvpr wurde über eine nicht homologe Religation des *Mun*I-*Kpn*I geöffneten Vektors pNLA1 1.3ΔSD3 mit *Xenopus*-Ei-Extrakt kloniert [265].

Das Plasmid **SVcrev** besitzt einen eukaryontischen SV40 early Promotor und den offenen Leserahmen der *rev*-cDNA Sequenz und ermöglicht die Expression von Rev, Das Konstrukt **SVcrevΔH/X** unterscheidet sich von dem zuvor genannten Konstrukt durch die Deletion der Nukleotidsequenz zwischen der *Hinc*II und der *Xho*I Schnittstelle 3'-wärts des Rev-Leserahmens [175].

Das Plasmid **SVctat** besitzt den Leserahmen der *tat*-cDNA Sequenz hinter einem SV40early Promotor.

2.3 Rekombinante DNA-Techniken

Molekularbiologische Standardmethoden wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning“ [261], „Current Protocols in Molecular Biology“ [11] sowie „Analysis of RNA-Protein Complexes in vitro“ [159] entnommen bzw. adaptiert. Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Serva, Sigma und Roth bezogen.

2.3.1 Restriktionsendonukleolytische Fragmentierung

Die restriktionsendonukleolytische Fragmentierung erfolgte mit Enzymen der Firmen MBI, NEB oder Roche Molecular Biochemicals gemäß Herstellerangaben. Bei der präparativen Fragmentierung wurden die DNA-Fragmente zur Isolierung auf 0,8 % lowmelt-Agarose (Biozym) Gelen in TB^{1/10} E Puffer (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA) aufgetrennt und unter der UV-Handlampe UVKL-6U 6W mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Fragmente wurden für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und in der Ligation eingesetzt.

2.3.2 Klonierungs-PCR

Die Amplifikation von DNA Fragmenten für die Klonierung erfolgte in einem 100 µl Ansatz mit 2,5 U PWO-Polymerase (Roche). Es wurden 10 µl 10 × Puffer (+MgSO₄, Roche) je 330 µM dNTP, je 0,5 µM Primer und 1 ng Template-DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Robocycler Gradient 96 (Stratagene) mit einer initialen Denaturierung (94°C, 3 min) und 30 Zyklen (94°C, 30 sek; 54°C, 60 sek; 72°C, 60 sek). Abschließend erfolgte eine zusätzliche Elongations-Phase (72°C, 10min) und Kühlung der Amplifikate auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden Phenol/Chloroform extrahiert mit ^{1/10} Volumen LiCl (4 M) sowie 2,5 Volumen EtOH (eiskalt) versetzt, gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen und für die folgendenden restriktionsendonukleolytischen Fragmentierungen in TE resuspendiert.

2.3.3 Ligation

Die Ligation wurde mit T4-Ligase (NEB) durchgeführt. Maximal 5 µl von der bei 65°C verflüssigten „lowmelt“ Agarose mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurde in einem 20 µl Ligationsansatz gemäß den Herstellerangaben für 60 min auf 37°C inkubiert und 5 µl zur Transformation eingesetzt. Die verbleibenden 15 µl wurden über Nacht bei RT inkubiert und gegebenenfalls erneut zur Transformation verwendet.

2.3.4 Nahtlose Ligation

Zur Klonierung von Punktmutationen in Abwesenheit adäquater Restriktionsschnittstellen wurden zwei-Insert-Klonierungen über zwei PCR-Reaktionen vorgenommen (Abb. 7). Einer der inneren Primer trug dabei die zu setzenden Mutationen sowie an seinem 5'-Ende eine Erkennungsstelle für ein TypII's Restriktionsenzym wie beispielsweise *BbsI* oder *Esp3I*. Der zweite, innere Primer trug ebenfalls eine Erkennungsstelle für ein TypII's Restriktionsenzym. Ein Restriktionsdau beider PCR-Produkte mit diesem TypII's Enzym entfernt die Erkennungssequenz und führt gleichzeitig zu kompatiblen, ligierbaren Überhängen innerhalb der Ursprungssequenz. So kann eine Mutation ohne Naht bzw. Restriktionsstelle in die zu mutierende DNA-Sequenz eingefügt werden [230].

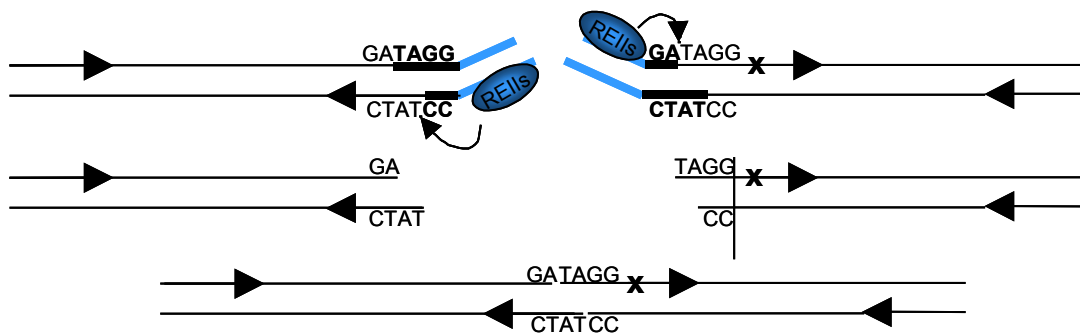


Abb. 7: Schematische Darstellung der nahtlosen Ligation. Um an einem bestimmten Punkt (X) eine Mutation einzufügen, obwohl in deren unmittelbarer Nähe keine Restriktionsschnittstelle vorhanden ist und zudem keine neue Schnittstelle eingefügt werden soll, werden die entsprechenden inneren Primer für eine zwei-Insert-PCR-Klonierung über nahtlose Ligation designiert. Dabei wird am 5'-Ende der Primer eine Erkennungsstelle für ein Typ II's-Restriktionsenzym integriert. Das hier bindende Enzym schneidet sequenzunabhängig in definiertem Abstand weiter 3'-wärts in der authentischen Template-Sequenz (Schwarz dargestellt). Die PCR-Produkte besitzen nach der Restriktion komplementäre, überhängende Enden innerhalb der Template-Sequenzen einschließlich der eingefügten Mutation (X). Die zu inserierenden Fragmente können so ohne Restriktionsschnittstelle nahtlos ligiert werden. Die Restriktion und Ligation an den äußeren Primern erfolgt parallel konventionell.

2.3.5 Kompetente *E. coli*

E. coli DH5 α F'IQTM (Invitrogen Live Technologies) wurden aus einem Glycerinstock auf Luria-Bertani-Kanamycin-Agar ausgestrichen (LB-Agar, 25 μ g Kanamycin /ml) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in eine 2 ml Vorkultur (LB, Kanamycin 25 μ g/ml) überführt. Nach 1h bei 37°C. wurde die Vorkultur in eine 200 ml Kultur überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Suspension wurde in 4

Falconröhrchen (50 ml) überführt und bei 4°C für 15 min mit 600 × g zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 20 ml eiskaltem TFBI (30 mM KOAc; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % Glycerin, eingestellt auf pH 5,8 mit Essigsäure, sterilfiltriert) resuspendiert, 90 min auf Eis gehalten und erneut 5 min mit 600 × g bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in jeweils 4 ml eiskaltem TFBII (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15 % Glycerin; eingestellt auf pH 6,8 mit NaOH; autoklaviert) vorsichtig resuspendiert. Die Suspensionen wurden gepoolt, in Aliquots zu 50 µl in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und im Methanol/Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.6 Transformation

50 µl kompetente *E. colis* wurden kurz angetaut, wenn nötig resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatz für 20 min auf Eis gehalten. Die Transformation erfolgte durch 90 sek Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C und nachfolgende Kühlung im Eisbad. Die Bakterien wurden in 800 µl SOC (2 % Bacto-Trypton (w/v); 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v); 0,05 % NaCl (w/v); 10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose) aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. 400 µl der Kultur wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigem (100 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals) LB-Agar (Invitrogen Live Technologies) ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

2.4 Analytische und präparative Plasmid-Isolierung

Zur analytischen Plasmid-Isolierung wurden mit Einzel-Kolonien angeimpfte Übernacht-Kulturen in 3 ml LB-Medium (Invitrogen Life Technologies), supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml; Roche Molecular Biochemicals,) abzentrifugiert (10 sek; 15.000 × g) und die Plasmid-DNA nach dem "QIAscreen Mini preparation"-Protokoll (QIAGEN) ohne Säulenelution isoliert. Positive Klone wurden über Restriktions-Analyse und Agarose-Gelelektrophorese in 1 × TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) identifiziert. Die präparative Plasmid-Isolierung erfolgte über das „Qiagen Maxi preparation“ Protokoll. Nach Isopropanol-Präzipitation und einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA in TE-Puffer gelöst, die Konzentration photometrisch bestimmt (Ultraspec II-4050II; Pharmacia) und auf 1 µg/µl TE eingestellt.

2.5 Zellkultur

Alle Expressionsstudien wurden mit HeLa-T4⁺-Zellen durchgeführt [201], einer humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie, die aufgrund einer stabil integrierten Gen-Kopie den membranständigen Rezeptor CD4 konstitutiv exprimiert. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplementiert mit 10 % fötalem Kälber-Serum (FKS; Roche Molecular Biochemicals) und 100 µg/ml Geneticin (Invitrogen Live Technologies) in T175-Kulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert. Die Ablösung subkonfluenten Zell-Rasen zur Passagierung oder Elektroporation (s.u.) erfolgte durch Behandlung mit 0,025 % (w/v) N-acetyliertem Trypsin; 0,05 % (w/v) EDTA in PBS_{def} (phosphate buffered saline deficient in Ca²⁺, Mg²⁺; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄·2H₂O; pH 7,4) für 10 min bei 37°C. Die Zellen wurden maximal bis zur 15. Passage in Kultur gehalten.

2.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Nach Trypsin-Behandlung wurde die Zahl lebender Zellen durch Trypan-Blau-Ausschluss in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl der gemischten Zellsuspension mit 20 µl der Trypanblau-Lösung (0,5 % Trypanblau in ddH₂O) vermischt. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein und ermöglicht so die Zählung der Farbstoff-freien, lebenden Zellen. Es wurden 4 Großquadrate (GQ) gezählt und gemittelt. Die Zellzahl pro GQ entsprach der Zellzahl × 10⁴/ml und muss noch um den Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

2.5.2 Transfektion von HeLa-Zellen mittels Elektroporation

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation [264]. Dabei wurden 10 µg des zu untersuchenden Plasmids und 5 µg des Reportersplasmids pGL3-Control oder 10 µg anderer Reporterplasmide eingesetzt. Bei Kotransfektion weiterer Plasmide wurden zusätzlich ebenfalls 10 µg dieses Plasmids eingesetzt, lediglich bei Kotransfektion des Tat-Expressionsvektors SVctat wurde nur 1 µg verwendet. Neben der Plasmid-DNA (1 µg/µl; TE) enthielt der Elektroporations-Ansatz 3 × 10⁶ lebende Zellen in 350 µl Ablöse-Medium (Eagle's minimum essential medium, supplementiert mit 25 mM HEPES und 10 mM NaHCO₃). Die DNA-Menge in Kotransfektions-Experimenten

wurde durch Zugabe von pSVT7 als „mock“-DNA konstant gehalten. Die Zellen wurden mit einem Puls von 550 V/cm und 960 μ F (BioRad Gene Pulser mit capacitance extender) behandelt. Die Zellen wurden 6 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 gleiche Transfektionsansätze vereinigt. Wenn die Zellen 48 h nach der Transfektion geerntet wurden, wurde das Medium 24 h nach Transfektion gewechselt.

2.5.3 Transfektion von HeLa-Zellen mittels Fugene™ 6

Die Transfektion mittels Fugene™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) erfolgte mit einem Zehntel der DNA-Menge, die für Elektroporations-Transfektionen verwendet wurde. Im Vergleich zur der zu transfizierenden DNA-Menge wurde DMEM Medium mit der 1,5-fachen Menge Fugene™ 6 (v/w) auf 100 μ l aufgefüllt und für 5 min inkubiert. Die Mischung wurde dann zu der vorgelegten DNA pipettiert, für weitere 15 min inkubiert und zu den Zellen gegeben. Für Protein-Analysen wurden 3×10^5 Zellen mit maximal 7 μ g DNA transfiziert, für Northern Blot-Analysen wurden 3×10^6 Zellen mit der entsprechend angepassten DNA Menge transfiziert.

2.6 β -Galaktosidase Färbung

HeLa-T4 pBKLTR lac Indikatorzellen wurden 48 h nach Transfektion eines Tat-Expressionsplasmids mit 50 % Azeton, 50 % Ethanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und bei 37°C für 90 Minuten mit 3 ml X-Gal Färbelösung (5 mM K-Ferricyanat; 5 mM K-Ferrocyanat; 2 mM MgCl₂; 1 mg X-Gal/ml PBS) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt. Die Blaufärbung zeigte die Expression von Tat an, da das stabil integrierte β -Galaktosidase-Gen durch den Tat-induzierbaren HIV-1 Promotor kontrolliert wird.

2.7 Normierung der Transfektions-Effizienz

HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit 0,5 μ g des Reporter-Plasmids pGL3-Control (Promega) transfiziert. Dieser Vektor enthält das Luziferasegen von *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des SV40 early Promotors. Die im Zuge der Luziferase-katalysierten ATP und

Mg²⁺ abhängigen Oxidation von Luziferin zu Oxiluziferin freierwerdende Biolumineszenz wurde in einem Luminometer in Form relativer Licht-Einheiten (RLU, relative light unit) gemessen. Der Luziferaseassay wurde als Doppelbestimmung mit 5 µl und 10 µl Zell-Extrakt in mit Rinder-Serumalbumin (BSA 2 µg/µl) beschichteten 96-Wellplatten durchgeführt. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte 2 sek nach Substrat-Zugabe (Luziferaseassay-Reagenz; Promega) im MicroLumat LB96P Luminometer (EG&G Berthold) über einen Zeitraum von 15 sek.

2.8 Dualer Luziferaseassay

HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit 0,5 µg des Reporter-Plasmids pGL3-Control (Luziferase aus *Photinus pyralis*, Promega) und 1 µg des Rev-Reporterplasmids SVt⁻r⁻envRL oder des Tat-Reporterplasmids LTR636RL sowie den jeweils zu untersuchenden Tat- und Rev-Expressionsplasmiden transfiziert. Die Tat- und Rev-Reporterplasmide enthalten das Luziferasegen der Weichkoralle *Renilla reniformis* (siehe 2.2.13). 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen gemäß Herstellerangaben durch 10 min Inkubation mit passivem Lysispuffer (Promega) lysiert. Der Zellextrakt wurde kurz über Zentrifugation geklärt (10 sek; 20.000 × g) und der Überstand mit 5 und 10 µl zur Bestimmung der Dualen Luziferase-Aktivität im MicroLumat LB96P (EG&G Berthold) eingesetzt. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurden zunächst 100 µl des *Photinus pyralis* Luciferase Assay Reagent zugegeben und die Lumineszenz der vom pGL3-Reporter exprimierten Luziferase bestimmt (siehe auch 2.7). In einem zweiten Schritt erfolgte über die Zugabe von 100 µl Stop&Glow Lösung (Promega) ein Wegfangen von ATP und/oder Mg²⁺ und damit eine Unterdrückung der Photinus-Lumineszenz. Dies ermöglicht die nachfolgende Messung der Renilla-Luziferase-Expression durch die Oxidation von Coelenterazin und die daraus resultierende Biolumineszenz. Die Messungen erfolgten jeweils mit 2 sek Verzögerung nach der Injektion für eine Dauer von 10 sek.

2.9 Protein-Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 durch Bindung von Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschiebt [27]. Der Testansatz enthielt 50 µl verdünnten Zell-Extrakt und 200 µl Bradford-Reagenz (Proteinassay; Bio-Rad; 1:5 verdünnt). Die Messung der Extinktion bei 595 nm erfolgte in Mikrotiterplatten mit einem BSA-Standard von 0-20 µg Protein/Vertiefung im ELISA-Reader (SLT Rainbow; SLT Labinstruments). Die Messungen wurden in zwei Verdünnungen und als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.10 Na-Dodecylsulfat-Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Western Blot-Untersuchung der gp160/gp120-Expressionsraten der Konstrukte der Leader-Reihe sowie der Leader-Reihe ohne *tat*-ATG-Umgebung wurden 3×10^5 Zellen mit 1-5 µg des zu untersuchenden Konstruktes sowie 0,5 µg pGL3-Control transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in das Medium überführt und nach zweimaligem Waschen mit PBS in 500 µl PBS resuspendiert. 70 µl dienten der Bestimmung der Protein- und Luziferasemenge (siehe 2.7 und 2.9). Der Aufschluss dieser Aliquots erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (Methanol/Trockeneis) und Auftauen (37°C) für jeweils 1 min. Die restlichen in 430 µl PBS verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation (kurz-Zentrifugation: 10 sek bis 14000 rpm) sedimentiert und mit 200 µl SDS-Treatmentpuffer (2 % SDS; 65 mM Tris HCL; pH 6,8; 10 % Glycerol; 10 % Dithiotreitol [DTT]) und 0,05 Volumenteilen Gelladepuffer (5 % Glycerin, 0,25 % Bromphenol-Blau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt. Nach Denaturierung (10 min; 94°C), wurden Aliquots gleicher RLU Menge (siehe 2.7) entnommen und mit Zellextrakt von „mock“-transfizierten Zellen (pSVT7) auf gleichen Proteingehalt aufgefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen.

2.11 Reversible Zink-Imidazol-Färbung von SDS Polyacrylamidgelen

Das SDS Polyacrylamidgel wurde kurz in ddH₂O gewaschen und dann für 5 Minuten in einer Natriumcarbonatlösung (1 %) inkubiert. Danach wurde das Gel 15 Minuten in einer Imidazol-SDS Lösung (0,2 M Imidazol; 0,1 % SDS) inkubiert und 10 Sekunden mit

Wasser gespült. Es folgte eine Inkubation mit einer Zinksulfat Lösung (ZnSO_4 0,2 M) bis die Banden deutlich zu sehen waren (30 sek bis 5 min) und zweimaliges Spülen des Gels für 10 Sekunden in ddH₂O. Anschließend wurde das Gel erneut zweimal für 5 Minuten in ddH₂O gespült. Die Lagerung der gefärbten Gele erfolgte in Natriumkarbonat (Na_2CO_3 , 1 %), die Entfärbung vor dem Blotzen durch Inkubation mit 100 mM EDTA [87;88].

2.12 Western Blot

Nach Elektrobplot (1 h; 70 V; in 200 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20 % Methanol) auf PVDF Membran (Immobilon P; Millipore) wurde die Membran in Blockierlösung (PBS; 10 % BSA; 10 % Tween 20) über Nacht blockiert und mit Waschpuffer (PBS; 1 % BSA; 1 % Tween) gewaschen (1 × 15 min, 2 × 5 min). Die Antikörperinkubation erfolgte in Waschpuffer für jeweils 1 h.

Alternativ wurde mit Milchpulverlösung (10 % (w/v) Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween) 15 Minuten blockiert. Die Erstantikörper-Inkubation erfolgte in Milchpulverlösung (5 % Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween) für eine Stunde. Nach 3-maligem Waschen für 10 Minuten mit PBS folgte die Zweitantikörper-Inkubation in Milchpulverlösung (10 % Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween) und 5-maliges Waschen in PBS für je 10 min.

Die anschließende Detektion der Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugierten Zweitantikörper erfolgte über das ECL-System (Amersham) und Film-Expositionen (ECL-Film Amersham) gemäß den Herstellerangaben. Die Dokumentation und Quantifizierung erfolgte im Lumi-Imager-F1 (Roche) mit der LumiAnalyst 3.1 Software.

2.13 CAT-ELISA

Die quantitative Bestimmung exprimierter CAT-Mengen erfolgte mittels CAT-ELISA (Roche Molecular Biochemicals). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 1 × Reporter-Lysispuffer (Promega) aufgeschlossen. Nach Entnahme von Aliquots zur Protein- und Luziferase-Bestimmung (siehe 2.7 und 2.9), wurden die Zell-Extrakte in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20°C gelagert. Die CAT-Menge wurde in Dreifachbestimmungen in einem Sandwich-ELISA nach Angaben des Herstellers durch Absorptions-Messung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Substrat-Zugabe im ELISA Reader (SLT Rainbow; SLT Labinstrumente) bestimmt. Die ermittelten CAT-Mengen

wurden mit Hilfe der Luziferase- und Protein-Bestimmung auf gleiche Transfektions-Effizienz standardisiert. Die CAT-Menge wurde hierzu durch den RLU-Faktor dividiert. Der RLU-Faktor 1 entsprach jeweils dem niedrigsten im Luziferaseassay gemessenen RLU-Wert pro μg Protein der Transfektionen einer Versuchsserie.

2.14 Isolierung von Gesamt-RNA

HeLa-T4⁺-Zellen wurden 30 h nach Transfektion mit einem Zell-Schaber in das Medium abgelöst, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 7 ml RNAClean/10⁷ Zellen (AGS) homogenisiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumenteilen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 15 minütiger Zentrifugation bei $9.200 \times g$ extrahiert. Die RNA enthaltende obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei $9.200 \times g$ und zweimaligem Waschen mit je 1 ml 75 % Ethanol wurde die RNA getrocknet und in DMDC-H₂O resuspendiert. Konzentration und Ausbeute der RNA wurden durch spektralphotometrische Absorptions-Messung bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.15 Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA mit hypotonischem Lysispuffer mit Natriumdeoxycholat und Triton-X-100

Dieses Protokoll ermöglicht es neben der freien zytoplasmatischen RNA auch membrangebundene, zytoplasmatische RNA zu isolieren [20;301]. HeLa-T4⁺-Zellen wurden 30 h nach Transfektion mit eiskaltem PBS sowie mit hypotonischem Waschpuffer (1,5 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM Tris HCl; pH 7,4) gewaschen und mit 3 ml eiskaltem, hypotonischem 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 Minuten auf Eis lysiert [292]. Unlösliche zelluläre Bestandteile sowie Verunreinigungen der zytoplasmatischen Fraktion durch Zellkerne wurden durch 5 minütige Zentrifugation ($500 \times g$; 0°C) sedimentiert und der Überstand wurde mit 1 Volumenteil 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 [52]. Die in der Zellkulturflasche haftenden Zellkerne wurden in 3 ml hypotonischem Waschpuffer geschabt, zentrifugiert (5 min; $500 \times g$; 0°C) und in 600 μl Solution D (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Acetat, pH7; 0,5 % N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Es folgte die Ansäuerung der

Fraktionen mit 0,1 Volumenteilen Na-Acetat (2 M, pH 4). Nach Zugabe von 1 Volumenteil Phenol und 0,1 Volumenteilen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1), gründlichem Mischen und Inkubation auf Eis (15 Minuten), folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (20 Minuten; $9200 \times g$; 4°C) [52]. Die wässrige Phase wurde mit 1 Volumenteil Isopropanol versetzt und die RNA über Nacht bei 4°C gefällt. Die zytoplasmatische RNA wurde mit 1 ml 70 % DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in $50 \mu\text{l}$ DMDC- H_2O gelöst, während die nukleäre RNA mit $100 \mu\text{l}$ 70 % DMDC-Ethanol gewaschen und in $12 \mu\text{l}$ DMDC- H_2O resuspendiert wurde. Konzentration und Ausbeute wurden durch spektralphotometrische Absorbionsmessungen bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.16 Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA mit NP-40 Lysispuffer

Die Trennung erfolgte wie beschrieben [117] mit folgenden Änderungen: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2 ml Nonidet P-40 (NP40) Lysispuffer (50 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 ; 0,5 % NP40) 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die in der Flasche verbleibenden Zellkerne wurden erneut mit 1 ml NP40-Lysispuffer gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit einem Volumenteil doppelt konzentrierter Solution D versetzt (siehe 2.15). Die Zellkerne wurden 3 mal mit je 1 ml HKCl-Puffer (10 mM Tris pH 7,9; 1 mM DTT; 140 mM KCl; 5 mM MgCl_2) gewaschen und danach mit $600 \mu\text{l}$ 1x Solution D versetzt. Die Kern und die Zytoplasma-Fraktion wurden weiter gemäß dem Protokoll von Chomczynski (siehe 2.15) behandelt.

2.17 Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA über Dounce Präparation nach Dignam

Die Zellen wurden ins Medium gekratzt, für 10 min bei 4°C und $2000 \times g$ pelletiert, in PBS (4°C) resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen wurden 10 Minuten in dem 5-fachen Pelletvolumen Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT) inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, im 2-fachen Pelletvolumen Puffer A aufgenommen und mit 10 Hüben des B-Pistills des Dounce Homogenisators lysiert [74]. Die Lysis wurde mikroskopisch bestätigt. Der Zellextrakt wurde erneut bei $2000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytoplasmafraktion mit einem Volumenteil doppelkonzentrierter Solution D versetzt

(siehe 2.15). Die pelletierte Kernfraktion wurde 20 min bei $14000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 600 μ l 1x Solution D versetzt. Die Kern und die Zytoplasma-Fraktion wurden weiter gemäß dem Protokoll von Chomczynski (siehe 2.15) weiter behandelt.

2.18 Isolierung polyadenylierter RNA

Die Isolierung polyadenylierter RNA [poly(A)⁺ RNA] erfolgte durch magnetische Separation mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dyna). Abweichend vom Standard-Protokoll des Herstellers wurden für 20 μ g zytoplasmatische RNA 1,5 mg Dynabeads Oligo (dT)₂₅ eingesetzt. Das Binden der poly(A)⁺ RNA an die Festphase erfolgte unter leichtem Schütteln in einem Volumen von 200 μ l. Die poly(A)⁺ RNA wurde mit 20 μ l Gel-Ladepuffer (50 % (v/v) Formamid; 2,15 M Formaldehyd; 1 \times MOPS-Puffer pH 7,0 [20 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; 8 mM NaAc; 1 mM EDTA]; 22,5 % (v/v) DMDC-H₂O) durch Inkubation bei 68°C eluiert.

2.19 Evaluierung der Trennung nukleärer und zytoplasmatischer RNA im Slotblot

Je 2 μ g der gemäß der verschiedenen Protokolle (2.15-2.17) isolierten zytoplasmatischen und nukleären RNA wurden mit Hilfe einer Slotblotapparatur (Minifold II SRC 072/0, Schleicher&Schüll) auf positiv geladenen Nylon Mebran (Roche Molecular Biochemicals) übertragen und durch UV-Quervernetzung (0,5 J/cm²) fixiert. Die Membranen wurden dann mit Digoxigenin markierten antisense-Sonden gegen Zytochrom C Oxidase Untereinheit 2 (CCOXII) als Zytoplasma-Marker und gegen eine β -Aktin Intronsequenz als Kern-Marker gemäß dem Herstellerprotokoll (Roche) bei 68°C inkubiert (siehe 2.20).

2.20 Northern Blot-Analyse

Gleiche Mengen nukleärer RNA wurden in Gel-Ladepuffer auf gleiche RNA-Konzentration gebracht. Die durch 15minütige Inkubation in Gel-Ladepuffer bei 68°C denaturierte poly(A)⁺ RNA aus ca. 20-50 μ g zytoplasmatischer RNA sowie ca. 3-10 μ g nukleärer RNA wurden in einem 1 % Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel unter fließendem Wasser gespült und 10 min in 20 \times SSC (*standard saline citrate*; 3 M NaCl; 0,3 M *tri*-NaCitrat \cdot 2H₂O) inkubiert. Die RNA wurde durch Kapillar-Transfer mit 20 \times SSC auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche

Molecular Biochemicals) geblottet und durch UV-Quervernetzung mit $0,3 \text{ J/cm}^2$ immobilisiert (Fluo-Link; Biometra). Die mindestens 1-stündige Prähybridisierung und die sich anschließende Hybridisierung über Nacht wurden in H-SDS-Puffer (50 % (v/v) Formamid; $5 \times \text{SSC}$; 50 mM Na-Phosphat; 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin; 7 % (w/v) SDS; 2 % (w/v) Blocking Reagenz [Roche Molecular Biochemicals]; 50 $\mu\text{g/ml}$ Hefe-RNA) bei 68°C durchgeführt. Die Membran wurde mit Digoxigenin-(DIG-)-markierten RNA-Sonden hybridisiert, die *in vitro* mit Phagen-RNA-Polymerasen (T7 bzw. SP6 Polymerase, siehe 2.2.5) hergestellt wurden (DIG RNA Labeling Kit; Roche Molecular Biochemicals). Der Nachweis von hGH-mRNA, die vom kotransfizierten Plasmid pXGH5 [274] transkribiert wurde, diente der Normierung der Transfektions-Effizienz und der Kontrolle der Gel-Beladung. Hybridisierte DIG-Sonden wurden mit einem Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (50 mU/ml; Roche Molecular Biochemicals) und Chemilumineszenzsubstrat (250 μM CDP-Star; Roche Molecular Biochemicals) gemäß den Herstellerangaben nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe einer CSC-Videokamera (Cybertech) und der Raytest Software TINA 2.09 oder mittels eines Lumi-Imager F-1 (Roche) und der zugehörigen LumiAnalyst 3.1 Software (Roche) quantifiziert. Zusätzlich wurden Film-Expositionen durchgeführt (ECL-Film, Amersham). Die durch Quantifizierung erhaltenen Daten der HIV-1 mRNA-Signale wurden, soweit möglich, auf gleiche hGH-Signale normiert.

2.21 Prokaryontische *in vitro* Transkription

Die T7 *in vitro* Transkriptionskonstrukte wurden linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumenteilen 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); 400 μM ATP, CTP, GTP (jeweils); 40 μM UTP und 20 μCi [^{32}P]UTP (800 Ci/mmol, Amersham Bioscience) 60-120 min *in vitro* transkribiert. Für das Cappen der Transkripte wurden nur 100 μM GTP und 1 mM GpppG cap-Analogon (Amersham Bioscience) eingesetzt. Die Transkripte wurden auf denaturierenden 6 % Harnstoff-Polyacrylamid Gelen mit 15 W (300 V) aufgetrennt (National Diagnostics), ausgeschnitten und über Nacht in Elutionspuffer (0,3 M Na-Acetat; 1 mM EDTA) bei 4°C eluiert. Die Transkripte wurden Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Alternativ

wurde der T7-Megashortskript Ansatz von Ambion gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Digoxigenin markierte Sonden zur Detektion im Northern Blot wurden mittels des DIG RNA „labeling“ Mix (Roche Molecular Biochemicals) gemäß Herstellerangaben hergestellt. Zirka 1 µg DNA wurde linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und mit 70 % EtOH gewaschen und in $\text{DMDC H}_2\text{O}$ aufgenommen. Die Transkription erfolgte mit dem 10-fach DIG „labeling“ Mix (10 mM ATP, GTP, CTP; 6,5 mM UTP; 3,5 mM DIG-11-UTP) und 10-fach Transkriptionspuffer (400 mM Tris pH 8; 60 mM MgCl_2 ; 100 mM DTT; 20 mM Spermidin) unter Zugabe von 1 µl Rnasin (Promega; 20U/µl) und 2 µl Phagen Polymerase (T7/SP6, 20 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1-2 h. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA (0,2 M) gestoppt und das Gesamtvolumen mit $\text{DMDC H}_2\text{O}$ auf 50 µl aufgefüllt. Die Transkripte wurden mit 25 µl NH_4OAc (10M) und 50 µl Isopropanol gefällt, mit DMDC 70 % EtOH gewaschen und in 20 µl $\text{DMDC H}_2\text{O}$ resuspendiert.

Die **biotinylierten Transkripte** für die AffinitätsPräzipitations-Analysen wurden mittels des Ambion *in vitro* Transkriptionskit Megaskript gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die zusätzliche Biotinylierung erfolgte durch Reduktion der UTP Konzentration von 7,5 mM auf 5,625 mM und Zugabe von Biotin 16 UTP (0,5 mM; Sigma). Die Transkription erfolgte 2-8 h bei 37°C. Die Transkripte wurden im denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt (6 %; 16 W; 1 h), über UV-Absorbition (shadowing) mit einer Handlampe (254 nm, Handlampe UVKL-6U 6W) ausgeschnitten, in Elutionspuffer (0,3 M Na-Acetat, 1 mM EDTA) aufgenommen, mit Phenol versetzt und über Nacht eluiert. Nach Phenol/Chloroform Extraktion wurde die RNA präzipitiert, gewaschen und in ddH_2O resuspendiert.

2.22 Renaturierung der Transkripte

Zur Renaturierung wurden die mit 70 % EtOH gewaschenen, präzipitierten Transkripte in 20 µl Renaturierungs Puffer (140 mM KCl; 20 mM Tris-Cl pH 7,8) resuspendiert. Die Transkripte wurden 1 min auf 90°C und 15 min auf 60°C erhitzt, dann innerhalb von 15 min auf 30°C abgekühlt. Die MgCl_2 Konzentration der RNA Lösungen wurde auf 2,5 mM eingestellt und die Transkripte für weitere 15 min bei 30°C inkubiert.

2.23 nukleärer *in vitro* Degradationsassay

Die renaturierten Transkripte wurden auf Eis gehalten [159]. Gleiche Tscherenkow Aktivitäten der zu vergleichenden Transkripte wurden vereinigt und in einem HeLa Zellkern Extrakt [74] der Degradation unterworfen. Die Degradation fand bei 30°C in Gegenwart von 0,4 mM NTPs, 75 mM Kreatinphosphat, 1,5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, und 44 % (v/v) Kernextrakt statt. Während der Degradation entnommene Aliquots wurden mit 8-fachem Volumen Stopplösung (0,3 M Tris-HCl; pH 7,4; 0,3 M Na-Acetat; 0,5 % SDS; 2 mM EDTA; 3 µg/ml tRNA) versetzt, Phenol/Choroform extrahiert, präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert. Gleiche Tscherenkow Aktivitäten der Aliquots wurden auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Residual-RNA wurde mittels eines Phosphorimaging Plate Scanner (FUJIFILM BAS-1500) und der Raytest-Software TINA 2.09 quantifiziert.

2.24 Rev/RRE-Shift

[$\alpha^{32}\text{P}$] markierte *in vitro* Transkripte verschiedener RRE-Strukturen wurden mit 2 µl 10x Renaurierungspuffer (100 mM KCl; 100 mM HEPES, pH 7,6) in einem 20 µl Ansatz für 90 sek bei 95°C und für 20 min bei 37°C inkubiert und danach auf Eis gehalten. 1 µl (500 –1500 cpm) der RRE-RNA wurden mit 0-200 ng Rev (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Kjems) unter Protein-Bindebedingungen (10 mM HEPES, pH 7,9; 100 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 10 % Glycerin; 0,05 µg/µl tRNA) 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Komplexe wurden auf einem 4 % TBE Polyacrylamidgel bei maximal 5 W/300 V und 4°C aufgetrennt.

2.25 Eukaryontische *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription in Hela Kernextrakt wurde gemäß dem Herstellerprotokoll (Promega) durchgeführt. Die Transkription erfolgte mit 5 µl Hela „nuclear-transcription“ Puffer (20 mM HEPES KOH, pH 7,9; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 20 % Glycerin); 6 µl Hela Kernextrakt in Puffer D; 1,5 µl MgCl₂ (50 mM); 1µl NTP Mix (0,4 mM UTP; 10 mM ATP; CTP; GTP); 1µl [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP (20 mCi/ml) und 100-400 ng linearisierter DNA. Die Transkription erfolgte in einem 25µl Ansatz für 60 min bei 30°C und wurde mit 175 µl Stopplösung (0,3 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,3 M Na-Acetat; 0,5 % SDS;

2 mM EDTA; 3 µg/ml tRNA) gestoppt und nach Phenol/Chloroform Extraktion, Präzipitation und Resuspension auf einem denaturierenden 6 % Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

2.26 Analyse der Cappingeffizienz

Die Analyse der Cappingeffizienz erfolgte mit 10 µg zytoplasmatischer oder nukleärer RNA, die in 100 µl rekombinantem GST-eIF4E in Cap-binde-Puffer [17 mM HEPES, pH 7,9; 83 mM NaCl; 0,08 mM EDTA; 0,8mM DTT; 17 % Glycerin; 0,08 % NP40; 1,1 % Polyvinylalkohol, 200 µg/ml Poly (U) und 17 µg/ml (dG:dC)] aufgenommen 2 Minuten auf 95°C erhitzt und mit 6 mM DTT versetzt wurde. Nach Zugabe von 30 µg GST-eIF4E wurde die Probe 1 h im Rotierer bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 25 µl der Gluthation-Sepharose und eine weitere Inkubation bei 4°C im Rotierer. Die im Überstand enthaltene RNA entsprach der Fraktion ungecappter RNA und wurde verwahrt, während die gecappte, an die Beads gebundene RNA mehrmals mit Waschpuffer (20 mM HEPES,pH 7,9; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 20 % Glycerin; 0,1 % NP40) gewaschen wurde. Die RNA wurde mit 0,5 ml Elutionspuffer (0,3 M Na-Acetat, pH 4,5; 1 % SDS. 1 µg Glycogen eluiert, danach wurde die RNA Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert [210]. Die RNA-Fraktionen wurden dann in einem „RNase Protection Assay“ mit T7-Transkripten, die vom *Bg/II* linearisierten Plasmid *73LTRSalI Bg/II* transkribiert wurden, untersucht, die Fragmentgrößen lagen für die Sonde bei 230 nt und bei Hybridisierung bei 165 nt.

2.27 UV-Quervernetzungsanalysen (UV-crosslink)

Gleiche Tscherenkow Aktivitäten zu vergleichender, [α -32P] markierter *in vitro* Transkripte (10^5 - 10^6 cpm) wurden jeweils in einem 25 µl Ansatz für 20 min bei 30°C unter Spleißbedingungen (1 mM ATP; 5 mM Kreatinphosphat; 2,5 mM MgCl₂; 2,5 U RNasin; 0,3 mM DTT; 0,5 µg/µl tRNA; 30 % (v/v) Kernextrakt) inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis 20 min mit UV-Licht bestrahlt (5 cm Abstand, 254 nm, Handlampe UVKL-6U 6W), anschließend mit 0,1 µg/µl Rnase A bei 37°C für 20 Minuten inkubiert und mit SDS-Treatmentpuffer (2 % SDS; 65 mM Tris HCl, pH 6,8; 10 % Glycerol; 10 % DTT) versetzt. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im denaturierenden Gel und der Nachweis RNA-bindender Proteine über Autoradiographie.

2.28 Protein-Affinitätspräzipitation (Pull-down)

12,5 μl der Streptavidin-Sepharose-Lösung (Ultralink Pierce) wurden mit 10 Volumenteilen Puffer D [74] 2-mal gewaschen und abzentrifugiert (2 min, $500 \times g$). Die Sepharose wurde dann mit 30 μl Kernextrakt unter Rotation inkubiert (30 min; 4°C), wodurch unspezifisch bindende Proteine aus dem Kernextrakt entfernt wurden. Gleichzeitig wurden 15 μl der Streptavidin-Sepharose-Lösung 2-mal mit 10 Volumenteilen NET-2 (50 mM Tris/HCl, pH 7,9; 0,05 % NP-40 (v/v); 0,5 mM DTT) gewaschen und anschließend 60 min bei 4°C in 10 Volumenteilen Blockierungs-Lösung (NET-2; 0,5 mg/ml tRNA; 0,2 mg/ml BSA) unter Rotation blockiert. Je 50 pmol der biotinylierten Transkripte wurden unter Spleißbedingungen (1 mM ATP; 5 mM Kreatinphosphat; 2,5 mM MgCl_2 ; 2,5 U RNasin; 0,3 mM DTT; 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ tRNA; 30 % (v/v) vorgeklärter Kernextrakt) in 100 μl Ansätzen für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde mit 200 μl Succrose KCl Lösung (20 % Succrose; 450 mM KCl) versetzt. Es folgte die Zugabe der in 20 μl Blockierungs-Lösung resuspendierten, blockierten Streptavidin-Sepharose und eine weitere Inkubation unter Rotation für 1 h bei 4°C . Die gebundenen Komplexe wurden in 2 h 4-mal in 1 ml Waschpuffer (180 mM KCl; 20 mM HEPES KOH, pH 7,6; 1 mM MgCl_2 ; 0,5 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 0,05 % NP-40) gewaschen und in 20 μl SDS-Treatmentpuffer (2 % SDS; 65 mM Tris HCl, pH 6,8; 10 % Glycerol; 10 % DTT) aufgenommen.

3 Ergebnisse

Die HIV-1 Expression wird auf der transkriptionalen und posttranskriptionalen Ebene aber auch auf der translationalen sowie der posttranslationalen Ebene reguliert. In vorangegangenen Untersuchungen wurden im HIV-1 Genom verschiedene RNA-Sequenzen, sogenannte INS- oder CRS-Elemente, identifiziert, die die mRNA-Menge oder die Translokation der RNA in das Zytoplasma und damit die Virusreplikation beeinflussen. Diese Sequenzen können dabei ihren Effekt allein oder auch im Zusammenspiel mit dem Rev-vermittelten Export intronhaltiger Transkripte ausüben [228;255;267;269]. Im Folgenden wurden verschiedene HIV-1-Leadersequenzen, die die nicht kodierenden Exons 2 und 3 (3.1) bzw. 5'-wärts liegende, kleine offene Leserahmen (3.2) enthielten, auf ihre Fähigkeit zur posttranskriptionalen Regulation der HIV-Genexpression untersucht.

3.1 Die nicht kodierenden HIV-1 Leaderexons 2 und 3

Beim alternativen Spleißen der HIV-1 Transkripte können unterschiedliche, nicht translatierte Leadersequenzen (5'-UTR) entstehen, die sich durch den Einschluss der 50 bzw. 74 nt kurzen, nicht kodierenden Exons 2 bzw. 3 unterscheiden (Abb. 2). Da es sich um nicht kodierende und dennoch konservierte Exons handelt, stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Leadersequenzen die HIV-1 Genexpression variieren können. Erste Hinweise darauf ergaben sich aus früheren Arbeiten mit Konstrukten mit

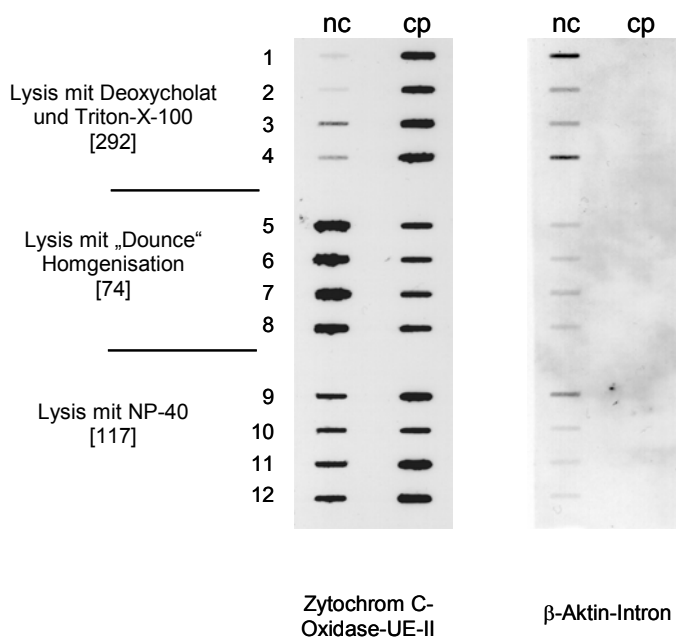


Abb. 8: Vergleich von drei Trennungsmethoden zur Präparation zytoplasmatischer und nukleärer RNA. Je vier Präparationen wurden mittels Na-Deoxycholat und Triton-X-100 (Tasche 1-4), „Dounce“ Homogenisation (Tasche 5-8) oder NP-40 Lysispuffer (Tasche 9-12) in Kern- (nc) und Zytoplasma- (cp) RNA fraktioniert. Die isolierte RNA wurde in TE aufgenommen und gleiche Mengen auf die Membran aufgetragen. Je eine Membran wurde mit der Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit-II Sonde (Zytoplasma-spezifisch) bzw. mit der β-Aktin Intron Sonde (Kern-spezifisch) inkubiert, um die Trennung zytoplasmatischer bzw. nukleärer RNA nachzuweisen.

unterschiedlichenr HIV-1 Leadersequenzen [175;186]. Vorausgegangene Experimente in unserem Labor zeigten in Gegenwart von Exon 2 eine Erhöhung und in Gegenwart von Exon 3 eine Erniedrigung der HIV-1 Env-Glykoproteinexpression. Die Anwesenheit beider nicht kodierender Exons führte zu einer intermediären Expression, vergleichbar zu der ohne zusätzliche nicht kodierende Exons. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in einem heterologen Kontext beobachtet. Die molekularen Ursachen für die resultierenden unterschiedlichen Proteinmengen werden im ersten Teil der Arbeit auf ein frühes, nukleäres, post-transkriptionales Ereignis eingegrenzt. Die in den kommenden Abschnitten wiederholt verwendeten Begriffe Exon 2 bzw. Exon 3 beziehen sich auf die HIV-1 Nomenklatur und nicht auf die Position der Exons in den hier untersuchten prä-mRNAs.

3.1.1 Analyse der Leaderexon-vermittelten Genexpression *in vivo*

Bei RNA-Mengen-Analysen nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit Konstrukten, die unterschiedliche nicht kodierende Exons im 5'-UTR enthielten, zeigten sich höhere Gesamt-RNA-Mengen in Gegenwart des Exons 2 und niedrigere in Gegenwart des Exons 3. Da wir mittels Actinomycin D Untersuchungen zeigen konnten, dass es für die zytoplasmatischen RNA-Stabilitäten keine Exon-abhängigen Unterschiede in der RNA-Halbwertszeit gab [186], stellte sich die Frage, ob die RNA-Mengenunterschiede bereits in der Kern-RNA-Fraktion zu beobachten sind. Um aus HeLa-Zellen möglichst reine Fraktionen nukleärer und zytoplasmatischer RNA zu gewinnen, wurden zunächst unterschiedliche Lysisprotokolle auf die Qualität der Fraktionierung hin überprüft: Dazu wurden gleiche Mengen der RNA-Fraktionen mittels Slotblot auf eine negativ geladene Nylon-Membran aufgetragen, UV-quervernetzt und mit Dig-markierten antisense RNA-Sonden hybridisiert. Die Reinheit der nukleären RNA wurde über die Detektion intronhaltiger β -Aktin prä-mRNA, die Reinheit der zytoplasmatischen RNA über die Detektion mitochondrialer mRNA der Zytochrom-C-Oxidase-Untereinheit II nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Fraktionierung mittels eines hypotonischen Lysispuffers mit Triton-X-100 und Natrium-Deoxycholat als Detergens nach Thomas *et al* [292], zur geringsten Kontamination der Kernfraktion mit Zytoplasma führte (Abb. 8 links, Taschen 1-4). Ebenso führte die Trennung mittels diesen Protokolls bei Auftragung gleicher RNA-Mengen zu den höchsten spezifischen Signalintensitäten für die nukleäre RNA (Abb. 8 rechts). Im Vergleich zur Lysis Dounce Homogenisation (Taschen 5-8) [74],

oder mit NP40-Lysispuffer (Taschen 9-12) [117], lieferte das Protokoll von Thomas *et al.* [292] also die vergleichsweise beste Trennung von zytoplasmatischer und nukleärer RNA und wurde deshalb im Folgenden für die RNA-Fraktionierung verwendet.

3.1.1.1 Die Leaderexon-vermittelte Variation der RNA-Menge ist unabhängig von den 3'-wärts gelegenen Sequenzen

Um zu untersuchen, ob die jeweiligen Leadersequenzen die zytoplasmatische oder nukleäre mRNA-Menge beeinflussen, wurden Konstrukte verwendet, die 5'-wärts des *tat*-Leserahmens kein (LTR1.4E_{tat}⁻), ein (LTR1.2.4E_{tat}⁻, LTR1.3.4E_{tat}⁻) oder beide (LTR1.2.3.4E_{tat}⁻) nicht kodierende Exons 2 und 3 als nicht spleißbare cDNA-Sequenz enthielten (Abb. 9A oben). Das *tat*-Startkodon wurde in diesen Konstrukten durch Punktmutation inaktiviert, um eine Translationsinhibition des weiter 3'-wärts liegenden *env*-Leserahmens durch das effizient erkannte *tat*-AUG zu umgehen. Das ebenfalls 5'-wärts des *env*-ORFs positionierte *rev*-AUG wird nur ineffizient erkannt und erlaubt die Translation des *env*-ORFs durch „leaky-scanning“ (vgl. 3.2). Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit diesen Konstrukten, zusammen mit einem Tat-Expressionsplasmid zur Stimulation des Tat-abhängigen HIV-1 Promotors im 5'-LTR, wurde die poly(A)⁺-aufgereinigte Kern-RNA und die zytoplasmatische RNA im Northern Blot analysiert. In Gegenwart des Exons 2 ergab die Analyse der nukleären *env*-mRNA-Menge eine Erhöhung um 41 % (Abb. 9B nc, vgl. 1.4 mit 1.2.4) und in Gegenwart des Exons 3 eine Reduktion um 46 % (Abb. 9B nc, vgl. 1.4 mit 1.3.4). Die Gegenwart beider Exons führte zu einer Reduktion der mRNA-Menge um 29 % (Abb. 9B nc, vgl. 1.4 mit 1.2.3.4). In Bezug auf die zytoplasmatische RNA zeigten sich noch deutlichere Mengenunterschiede. Exon 2 führte zu einer um 143 % erhöhten (Abb. 9B cp, vgl. 1.4 mit 1.2.4) und Exon 3 zu einer um 71 % reduzierten RNA-Menge (Abb. 9B cp, vgl. 1.4 mit 1.3.4). In Gegenwart beider Exons war eine Reduktion um 20 % zu beobachten (Abb. 9B cp, vgl. 1.4 mit 1.2.3.4). Es konnte also gezeigt werden, dass sich die zuvor beobachtete unterschiedliche Env-Proteinexpression [175] bereits in den nukleären RNA-Mengen widerspiegelte.

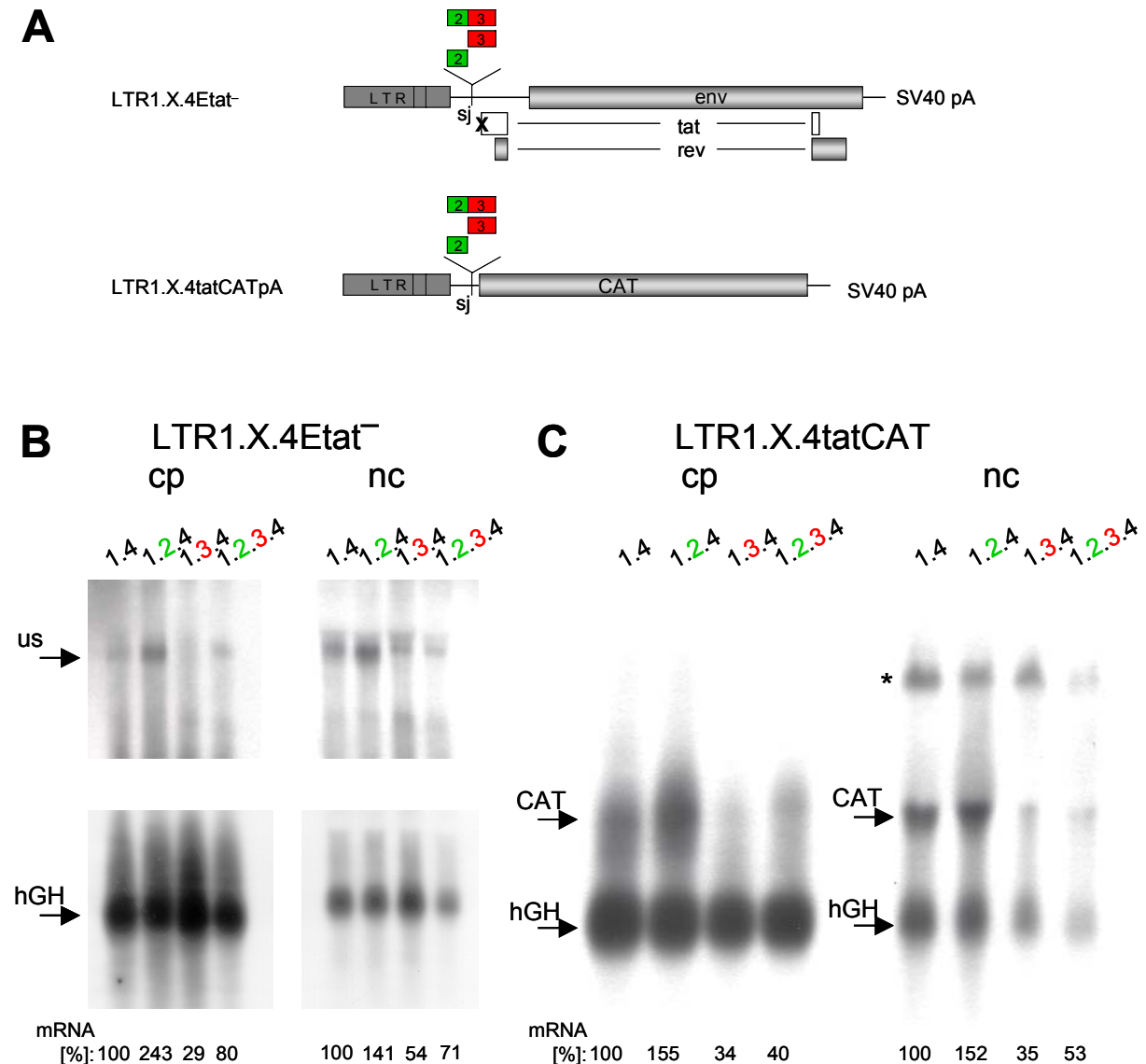


Abb. 9: Der Einfluss der Leaderexons auf die Transkriptmenge ist auf Ebene der prä-mRNA zu beobachten und ist unabhängig von den 3'-wärts liegenden Sequenzen. (A) Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Dargestellt sind die offenen Leserahmen (hellgrau) sowie die Sequenz der nicht kodierenden Exons 2 (grün) und 3 (rot), die einzeln oder zusammen in die Spleißnahtstelle von HIV-1 Exon 1 und Exon 4 (sj) der Konstrukte eingefügt wurden. Weiterhin dargestellt ist die LTR-Region, die diesen Konstrukten als Promotor dient (dunkelgrau). Durch eine Punktmutation im Startkodon (X) wurde der tat-Leserahmen inaktiviert (weißes Rechteck). **(B,C)** Northern Blot-Analyse der zytoplasmatischen (cp) und nukleären (nc) RNA nach Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit Konstrukten der LTR1.X.4Estat⁻-Serie **(B)** und der LTR1.X.4.tatCAT-Serie **(C)** (das X steht als Platzhalter für die inserierten nichtkodierenden Exons). In Spur 1.4 ist die mRNA des Konstrukts ohne zusätzliche nicht kodierende Exons (B: LTR1.4Estat⁻; C: LTR1.4tatCAT), in Spur 1.2.4 des Konstrukts mit Exon 2 Sequenz im Leader (B: LTR1.2.4Estat⁻; C: LTR1.2.4tatCAT) in Spur 1.3.4 des Konstrukts mit Exon 3 Sequenz im Leader (B: LTR1.3.4Estat⁻; C: LTR1.3.4tatCAT) und in Spur 1.2.3.4 des Konstrukts mit Exon 2 und Exon 3 Sequenz im Leader (B: LTR1.2.3.4Estat⁻; C: LTR1.2.3.4tatCAT) aufgetragen. Die Pfeile markieren die Laufhöhen der ungespleißten *env*-Transkripte (us) und der CAT-Transkripte (CAT) sowie des Transkripts des humanen Wachstumshormons (hGH) zur Kontrolle der Transkriptionseffizienz. Der Stern (*) markiert eine zusätzliche Bande, die möglicherweise auf Kreuzhybridisierung oder auf Verdrängung der CAT-RNA durch ribosomale RNA basiert. Die Prozentangaben für die normierten RNA-Mengen wurden für das Konstrukt ohne zusätzliche nicht-kodierende-Exons gleich 100 % gesetzt.

Um zu prüfen, ob die Exon-abhängigen, unterschiedlichen nukleären RNA-Mengen unabhängig von den 3'-wärts liegenden HIV-Sequenzen waren, wurde der Einfluss der Leaderexons auf die Menge nukleärer und zytoplasmatischer RNA auch mit einer heterologen, nicht Rev-abhängigen Sequenz analysiert. Hierzu wurden Konstrukte verwendet, in denen die 3'-wärts liegende HIV-1 Sequenz gegen den Leserahmen des Reportergens Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) ausgetauscht wurde (Abb. 9A unten). Die Quantifizierung der nukleären RNA-Menge ergab in Gegenwart des Exon 2 eine Erhöhung um 52 % (Abb. 9C nc, vgl. Spur 1 mit Spur 2) und in Gegenwart des Exon 3 eine Reduktion um 65 % (Abb. 9C nc, vgl. Spur 1 mit Spur 3). Die mRNA-Menge in Gegenwart beider Exons war mit 53 % intermediär (Abb. 9C nc, vgl. Spur 1 mit Spur 4). Vergleichbare Daten wurden auch für die zytoplasmatischen mRNA-Mengen beobachtet (Abb. 9C cp). Diese RNA-Untersuchungen zeigten, dass die Leaderexons die Menge nukleärer RNA unabhängig von den weiter 3'-wärts liegenden Sequenzen beeinflussen.

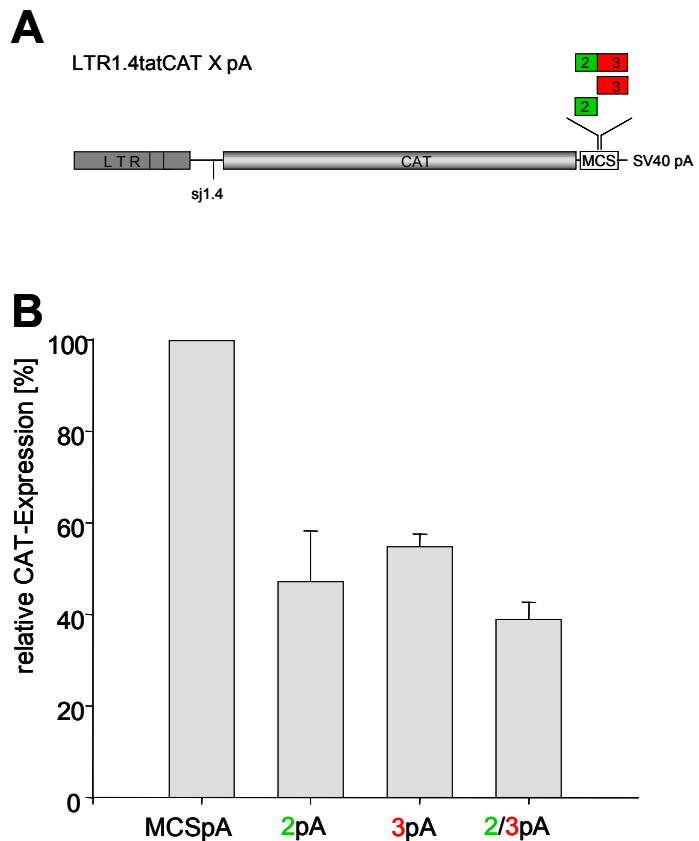
3.1.1.2 Die expressionsfördernde Wirkung des Exons 2 ist positionsabhängig

Um zu untersuchen, ob die expressionsfördernde bzw. -inhibierende Wirkung der Sequenzen der nicht kodierenden Leaderexons 2 und 3 positionsabhängig ist, wurden diese Sequenzen 3'-wärts des CAT-Leserahmens positioniert (Abb. 10A). Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit diesen Konstrukten wurden die Proteinmengen im CAT-ELISA bestimmt (Abb. 10B).

Im Vergleich zum Ausgangskonstrukt ohne zusätzliches HIV-1 Leaderexonsequenz (Abb. 10B, MCSpA) war bei allen drei Konstrukten eine um ca. die Hälfte reduzierte CAT-Expression (Abb. 10B, 2pA 48 %, 3pA 55 % und 23pA 39 %) messbar. Ein Exon-spezifischer Einfluss war somit nicht mehr zu beobachten. Die expressionserhöhende Wirkung des Leaderexons 2 ist demnach abhängig von seiner Positionierung im 5'-untranslatierten Bereich. Eine expressionsreduzierende Wirkung des Exons 3 über die offenbar unspezifische Halbierung der CAT-Expression hinaus war ebenfalls nicht nachweisbar.

Abb. 10: Der stabilisierende Einfluss des Leaderexons 2 auf die Transkriptmenge ist positionsabhängig.

(A) Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Dargestellt sind die offenen Leserahmen (grau), sowie die Sequenz der nicht kodierenden Exons 2 (grün) und 3 (rot) die alternativ oder gemeinsam 3'-wärts der CAT-Sequenz der Konstrukte in eine multiple Klonierungsstelle (MCS, weiß) eingefügt wurden. Die LTR-Region (dunkelgrau) dient als Promotor. **(B)** CAT-Expressionsanalyse nach Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit Konstrukten mit MCS (LTR1.4tatCAT MCS pA, MCSpA) mit Exon 2 (LTR1.4tatCAT 2 pA, 2pA), Exon 3 (LTR1.4tatCAT 3 pA, 3pA) und Exon 2 und 3 (LTR1.4tatCAT 2/3 pA, 2/3pA). Die CAT-Expression wurde mittels eines CAT-ELISAs bestimmt und auf die Luziferase-Expression als Maß der Transfektionseffizienz normiert. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler bezogen auf die RNA-Menge des Konstruktes LTR1.4tatCAT MCS pA (MCSpA).



3.1.1.3 Beeinflussung der Expression nach Positionierung der kleinen nicht kodierenden Exons in einem Intron

Wie in 3.1.1.1 gezeigt war die Wirkung der Leaderexonsequenzen bereits auf nukleärer Ebene der Kern RNA nachweisbar. Um untersuchen zu können, ob die Beeinflussung der nukleären RNA-Menge durch die nicht kodierenden Exons 2 und 3 zeitlich vor oder nach dem Spleißen erfolgte, wurden Exon 2, Exon 3 und Exon 2/3 in ein Intron kloniert. Dazu wurde zunächst ein Minimal-Intron in die Spleißnahtstelle 1.4 des zuvor verwendeten Vektors LTR1.4tatCAT MCS pA eingefügt, in das die Sequenzen der nicht kodierenden Exons 2 und 3 inseriert wurden. Die so erhaltene Konstruktsreihe wurde LTRSD X SAtatCAT MCS pA genannt (Abb. 11A).

Die relative CAT-Proteinexpression dieser Konstrukte zeigte für das Konstrukt mit Minimal-Intron (Abb. 11B, E/P: 105 %) keine relevante Änderung der CAT-Expression im Vergleich zum Referenzkonstrukt ohne Intron (LTR1.4tatCAT MCS pA: 100 %, ohne Abb.). In Gegenwart der Sequenz des Exons 2 im Intron wurde eine Erhöhung (Ex 2:

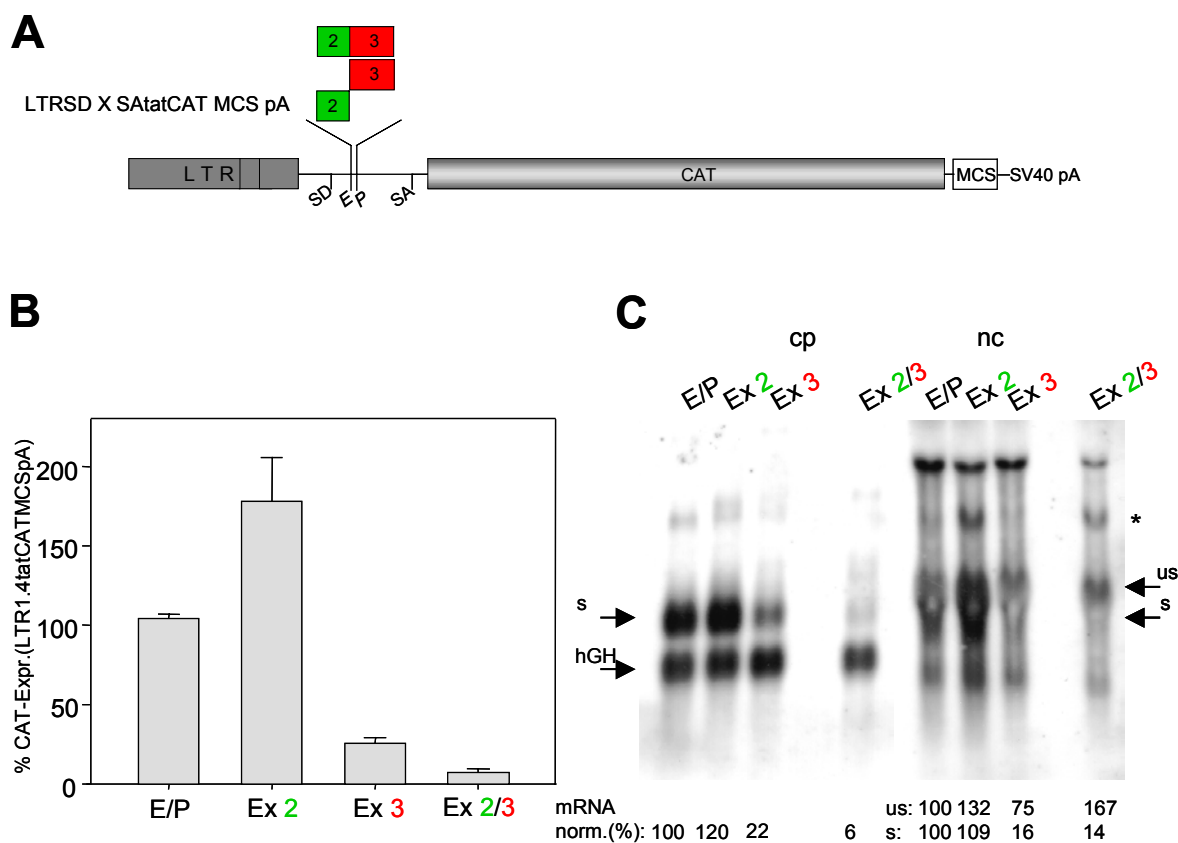


Abb. 11: Einfluss der Leaderexonsequenzen auf die CAT-Protein- und RNA-Expression bei Positionierung im Intron. (A) Aufbau der Konstruktsreihe LTRSD X SATatCAT MCS pA. Dargestellt ist der offene Leserahmen des Reportergens (CAT) (grau) sowie die nicht kodierenden Exons 2 (grün) und 3 (rot) die einzeln oder zusammen zwischen dem Spleißdonor (SD) und dem Spleißakzeptor (SA) in die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (E) und *PstI* (P) eingefügt worden waren. Die LTR-Sequenz dient als Promotor (dunkelgrau). Die Abbildungen zeigen die Proteinexpression **(B)** und die RNA-Expression **(C)** des Konstrukts LTRSD SATatCAT MCS pA mit Minimal-Intron (E/P), des Konstrukts LTRSD Ex 2 SATatCAT MCS pA (Ex 2), des Konstrukts LTRSD Ex 3 SATatCAT MCS pA (Ex 3) und des Konstrukts LTRSD Ex 2/3 SATatCAT MCS pA (Ex 2/3). **(B)** CAT-Expression der LTRSD X SATatCAT MCS pA-Serie. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit FuGene™ 6 mit den zu untersuchenden Konstrukten sowie dem Expressionsplasmid SVctat und dem Reporterkonstrukt pGL3-Control transfiziert und nach 48 h geerntet. Die CAT-Protein-Menge wurde mittels eines CAT-ELISA bestimmt und auf die Luziferase-Expression als Maß der Transfektionseffizienz normiert. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler. Die relativen Werte beziehen sich auf das Referenzkonstrukt LTR1.4tatCAT MCS pA, dessen Expression auf 100 % (ohne Abb.) gesetzt wurde. **(C)** Northern Blot-Analyse der zytoplasmatischen (cp) und nukleären (nc) RNA nach Transfektion der Konstrukte der LTRSD X SATatCAT MCS pA-Serie. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit 10 µg der Konstrukte zusammen mit 10 µg des hGH-Expressionsplasmids mit FuGene™ 6 transfiziert und nach 30 Stunden geerntet: Die zytoplasmatische RNA wurde poly(A)⁺ aufgereinigt, gleiche Mengen RNA wurden auf einem 1 % denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Die Pfeile markieren die Lauffhöhen der gespleißten (s) und der ungespleißten (us) Transkripte sowie der hGH-Transkripte (hGH, pXGH5) für die Bestimmung der Transfektionseffizienz. Zusätzlich waren weitere, unterschiedlich starke Banden nachzuweisen (*). Die Prozentangaben der normierten RNA-Mengen wurden für das Konstrukt ohne zusätzliche Intronsequenz auf 100 % gesetzt.

179 %) und in Gegenwart der Sequenz des Exons 3 eine Reduktion der Expression (Ex 3: 26 %) beobachtet. Dies entsprach den zuvor gemachten Beobachtungen mit Konstrukten ohne herauspleißbare Leaderexons (siehe 3.1.1.1, Abb. 9). Bei der Analyse der zytoplasmatischen RNA zeigten sich im Northern Blot mit der CAT-Menge korrelierende Mengen von gespleißter RNA (Abb. 11C, cp, Ex 2: 120 %, Ex 3: 22 %). Daraus ließ sich schließen, dass die Sequenzen der nichtkodierenden Exons 2 und 3 die RNA-Menge bereits im Kern und vor dem Spleißen beeinflussen. Interessanterweise konnte in Gegenwart der Sequenz beider nicht kodierender Exons im Intron eine weitere Reduktion der CAT-Expression und der zytoplasmatischen mRNA-Menge beobachtet werden (vgl. Abb. 11B: Ex 2/3: 8 % und Abb. 11C, cp: 6 %). Dies stand im Gegensatz zu der nivellierenden Wirkung der Sequenz beider Exons im nicht herauspleißbaren Kontext (siehe 3.1.1.1, Abb. 9). Um zu prüfen, ob dieser Unterschied auf die Spleißreaktion zurückzuführen war, wurde die Kern-RNA untersucht. In der Kernfraktion konnte sowohl gespleißte als auch ungespleißte RNA nachgewiesen werden. Das Exon 2 führte als Teil der Intronsequenz zu einer Erhöhung der ungespleißten (Abb. 11C, nc, Ex 2: 132 %) und der gespleißten RNA (Ex 2: 109 %). Die Sequenz des Exons 3 führte im Intron zu einer Reduktion der ungespleißten (Ex 3: 75 %) und der gespleißten RNA (Ex 3: 16 %). Damit konnte hier bereits auf Ebene der prä-mRNA die Exonsequenz-abhängige Veränderung der RNA-Menge nachgewiesen werden. Die Gegenwart beider Exonsequenzen im Intron bewirkte dagegen eine starke Erhöhung der ungespleißten RNA (Ex 2/3: 167 %), wogegen kaum gespleißte RNA nachweisbar war (Ex 2/3: 14 %). Dies wies auf eine Spleißinhibition in Gegenwart beider Exonsequenzen hin, die zu einer Akkumulation ungespleißter RNA im Kern führte. Dies ließ sich auch an Hand der Ratio ungespleißter nukleärer zu gespleißter nukleärer RNA-Menge darstellen (Tabelle 1). Bei der Ermittlung der Quotienten fiel auf, dass eine Spleißinhibition, wenn auch deutlich schwächer, bereits in Gegenwart der Sequenz des Exons 3 zu beobachten war. Anhand der RNA-Menge und -Verteilung konnte also gezeigt werden, dass neben der Wirkung der Sequenzen der nicht kodierenden Exons auf die prä-mRNA-Menge vor dem Spleißen, zusätzlich eine Spleißinhibition in Gegenwart des Exons 3 bzw. beider Exonsequenzen stattfand.

(Abb. 11C) Nicht kodierende Exons	—	2	3	2/3
nc prä-mRNA (us)	100	132	75	167
nc mRNA (s)	100	109	16	14
us/s	1	1	5	12

Tabelle 1. Anhand der ungespleißten (us), nukleären prä-mRNA-Menge (nc prä-mRNA) und der gespleißten (s), nukleären mRNA-Menge (nc mRNA) (aus Abb. 11C) wurde deren Spleißratio ermittelt (us/s). Bei einer Spleißinhibition sollte dieser Wert über 1 liegen.

3.1.2 Beeinflussung der Expression durch RRE-Sequenzen

Um die Wirkung der Exonssequenzen zeitlich noch genauer eingrenzen zu können, wurden die Exon 2- und Exon 3-haltigen CAT-Konstrukte mit einem RRE ausgestattet. Da durch die Rev/RRE-Wechselwirkung die ungespleißte RNA unter Umgehung des Spleißens in das Zytoplasma transportiert wird, sollte hierdurch eine weitere zeitliche Eingrenzung möglich sein. Um die Rev/RRE-Interaktion an vollständig transkribierten Transkripten also spät kotranskriptional bzw. früh posttranskriptional zu ermöglichen, sollte die RRE-Sequenz möglichst am 3'-Ende des Transkriptes inseriert werden. Allerdings wurden in den Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen unterschiedlich lange RRE-Sekundärstrukturen beschrieben. Während Malim und Mitarbeiter 1989 gezeigt haben, dass ein Restriktionsfragment von 234 nt als RRE funktionell ausreichend ist [205] und Solomin und Mitarbeiter die funktionelle Struktur auf 204 nt eingrenzten [284], postulierten Mann und Mitarbeiter anhand von Nuklease-Experimenten das Vorliegen einer komplexeren RRE-Struktur von 351 nt mit einem längeren Stamm 1 [208]. Da

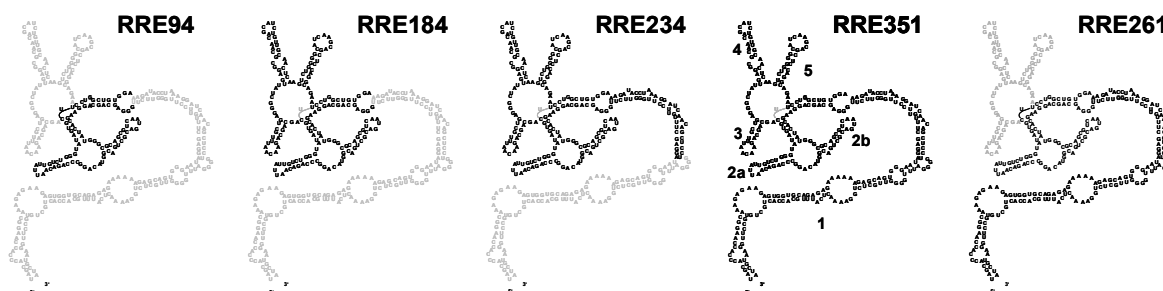


Abb. 12: Sequenz und vorausgesagte Sekundärstruktur verschiedener analysierter RREs. Die schwarz hervorgehobenen RRE-Sequenzen wurden an Stelle der multiplen Klonierungsstelle (MCS) 3'-wärts des Reportergens CAT inseriert. Die grau dargestellten Bereiche entsprechen den Deletionen innerhalb des RREs. Die Konstrukte wurden als LTR1.4tatCAT RREX pA-Konstrukte benannt, wobei X stellvertretend für die Länge des inserierten RREs steht. Die zusätzliche Nummerierung am Beispiel der RRE351-Struktur zeigt die Benennung der einzelnen Stammstrukturen an. Dargestellte Sekundärstruktur nach [205]

andererseits innerhalb des RREs ein negativ wirkendes CRS-Element (siehe 1.3.1.7) lokalisiert wurde, über dessen Position es widersprüchliche Befunde gibt [34;255], sollte zunächst versucht werden, die Transportfunktion des RREs von seiner CRS-Funktion zu trennen. Ausgehend von der von Mann *et. al* bestimmten 351 nt langen Sequenz, die das RRE formt (Abb. 12, RRE351), wurden 2 Arten von Deletionen gesetzt, die zu unterschiedlichen RRE-Teilstrukturen führen sollten, ohne die Sequenz und Sekundärstruktur der hochaffinen Rev-Bindestelle im Stamm 2B zu verändern. Die eine Klasse enthielt RRE-Strukturen mit Unterschieden in der Länge des Stamms 1 (Abb. 12: RRE184, RRE234, RRE351), die andere Klasse zeichnete sich durch das Fehlen der Stamm3/4/5-Sequenz aus (Abb. 12: RRE94, RRE261).

3.1.2.1 Die Rev-Bindung erfolgt in Abhängigkeit von Stamm 2b, die Multimerisierung benötigt Stamm1

Um zu überprüfen, ob auch eine minimale RRE-Struktur mit Deletionen der Stammstrukturen 1, 3, 4 und 5 als Rev-Bindestelle wirken kann, wurde die Bindung von Rev an die RNA im EMSA (electrophoretic mobility shift assay) bestimmt. Dafür wurden unter Anderem Konstrukte kloniert, die das RRE94 und zum Vergleich das RRE351 3'-wärts eines T7-Promotors enthielten (Abb. 13A). Als Kontrolle wurden vergleichbare Konstrukte mit einer Mutation in der hochaffinen Rev-Bindestelle im Stamm 2b (RRE0) verwendet [264]. $\alpha^{32}\text{P}$ -markierte *in vitro* Transkripte dieser Konstrukte wurden mit steigenden Rev-Mengen *in vitro* inkubiert und unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Ab einer Konzentration von 100 ng Rev war ein verzögertes Laufverhalten der minimalen RRE-Struktur zu beobachten (Abb. 13B), während in Gegenwart der Mutation der Rev-Bindestelle im Konstrukt pSVT7 RRE094 keine vergleichbar intensive Bande im Gel zu beobachten war (Abb. 13B). Mit der RRE0 Mutation war allerdings schon in Abwesenheit von Rev eine zusätzliche Bande (*) zu beobachten, die auf die Bildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen hindeutet.

Die Transkripte der Konstrukte pSVT7 RRE351 und RRE0351 wurden ebenfalls im EMSA auf Rev-Bindung untersucht (Abb. 13C). An die größere Struktur RRE351 band Rev bereits ab einer Konzentration von 50 ng und führte bei höheren Rev-Konzentrationen zu einer weiteren Verzögerung des Laufverhaltens der RNA. Dies deutet auf eine

multimere Bindung von Rev an die RRE-Struktur hin. Ein vergleichbares Bild konnte für die RRE0351-Struktur nicht beobachtet werden. Lediglich bei 100-200 ng Rev war eine unspezifische Aggregation von Protein/RNA-Komplexen in der Geltasche sichtbar. Die RRE0-Mutation führte auch hier unabhängig von der Größe der RRE-Struktur erwartungsgemäß weder zu einer hochaffinen Rev-Bindung noch zur Multimerisierung (Abb. 13C). Da der EMSA eine Rev-Bindung in Abhängigkeit von der hochaffinen Rev-Bindestelle des Stamms 2b bereits in Gegenwart der kürzesten RRE94-Struktur zeigte, war davon auszugehen, dass aufgrund des Vorhandenseins der hochaffinen Rev-Bindestelle jedes Transkript mit den verschiedenen RRE-Deletionen Rev binden sollte. Eine konzentrationsabhängige multimere Rev-Bindung an der RNA war jedoch nur in Abhängigkeit vom Stamm 1 zu erwarten.

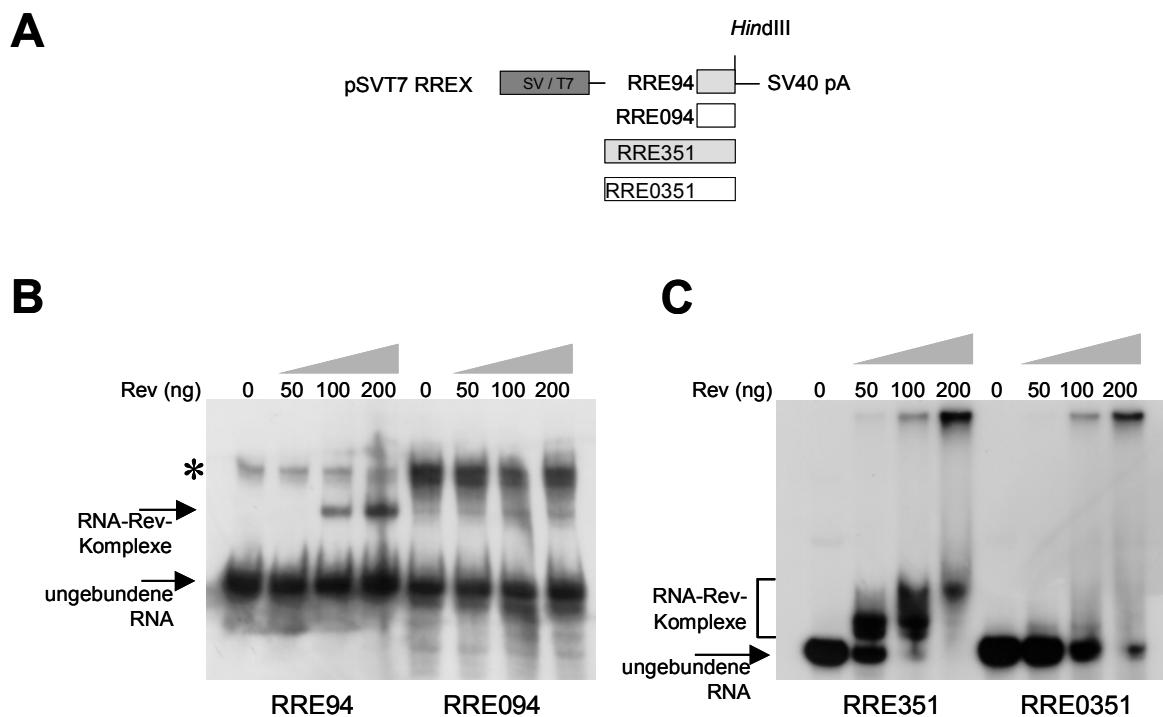


Abb. 13: Analyse der Rev-Bindung in Abhängigkeit von der RRE-Struktur und der Anwesenheit der hochaffinen Bindestelle im Stamm 2b. (A) Aufbau der Konstrukte pSVT7 RREX. Sie enthalten einen T7-Promotor (dunkelgrau) und die unterschiedlichen RRE Strukturen (hellgrau), wahlweise die RRE351- oder die RRE94-Sequenz mit (RRE0) oder ohne Mutation in der hochaffinen Rev-Bindestelle. Die Konstrukte wurden mit *HindIII* linearisiert und mit T7-Polymerase, wie unter Material und Methoden beschrieben, transkribiert. Gleiche Mengen [α - 32 P] markierter, renaturierter *in vitro* Transkripte mit dem RRE94 bzw. RRE094 (**B**) und dem RRE351 bzw. RRE0351 (**C**) wurden mit 0, 50, 100 und 200 ng rekombinantem Rev Protein (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. J. Kjems, Aarhus) inkubiert und auf einem nativen Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Da die RRE-Sequenzen unter nativen Bedingungen verschiedene Sekundärstrukturen ausbilden können, fand der Versuchsablauf bei 4°C statt. Die Protein-RNA Komplexe sind durch ihr verzögertes Laufverhalten nachweisbar. Das Konstrukt RRE094 zeigt eine zusätzliche Bande (*), die auf eine veränderte Sekundärstruktur schließen ließ.

3.1.2.2 Unterschiedliche theoretische RRE-Strukturen beeinflussen die Expression von CAT-Konstrukten

Um eine Wirkung des RREs als CRS-Element ausschließen zu können, wurden fünf verschiedene RRE-Teilstrukturen (Abb. 12) auf eine ihre potenzielle Wirkung die CAT-Menge zu reduzieren untersucht. Da für das RRE eine Wirksamkeit sowohl im Intron wie im Exon nachgewiesen worden war [205;264], wurden die RRE-Teilstrukturen 3'-wärts des CAT-Gens in das Konstrukt LTR1.4tatCAT MCS pA kloniert (Abb. 14A). Die Konstrukte wurden in transienten Transfektionsexperimenten in HeLa-Zellen auf ihre Protein- und mRNA-Expressionsmengen analysiert (Abb. 14B, C). Alle Konstrukte enthielten innerhalb ihrer RRE-Struktur den Stamm 2b, der die hochaffine Rev-Bindungstelle enthält [127]. Als Referenz diente ein Konstrukt ohne ein RRE 3'-wärts des CAT-Gens, dessen Expression gleich 100 % gesetzt wurde (LTR1.4tatCAT MCS pA, ohne Abb.). Die Konstrukte zeigten deutliche Protein-Mengenunterschiede in Abhängigkeit von den unterschiedlichen RRE-Sequenzen (Abb. 14B). Während das Konstrukt mit der kleinsten RRE-Struktur (RRE94) eine 2,3-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Referenzkonstrukt zeigte (Abb. 14B, RRE94), reduzierte sich die Expression in Gegenwart der Stammstrukturen 3, 4, 5 auf unter 47 % (Abb. 14B, RRE184). Bei einer zusätzlichen Verlängerung des Stamms 1 war eine weitere Abnahme auf 24 % nachweisbar (Abb. 14B, RRE234). Mit einer weiteren Verlängerung zum kompletten Stamm 1 war jedoch sowohl in An- (RRE351) als auch in Abwesenheit (RRE261) von Stamm 3, 4 und 5 keine Veränderung der CAT-Expression zu beobachten (101 bzw. 103 %). Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede in der CAT-Expression auch auf der Ebene der RNA-Menge zu beobachten sind, wurde die Expression dieser Konstrukte im Northern Blot untersucht. Dazu wurden HeLa-T4⁺-Zellen mit den Konstrukten der LTR1.4tatCAT RREX pA-Serie mit unterschiedlichen RREs transfiziert und die nukleäre und zytoplasmatische mRNA-Menge bestimmt. Die zytoplasmatische CAT-RNA zeigte eine mit den zuvor beobachteten CAT-Proteinmengen qualitativ vergleichbare RNA-Mengenverteilung in Abhängigkeit von den RRE-Strukturen (Abb. 14C). Die nukleäre RNA-Menge lieferte ein vergleichbares Bild, allerdings wurde hier aufgrund des zu geringen hGH-Signals auf eine Quantifizierung verzichtet (ohne Abb.). Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die RRE-Strukturen,

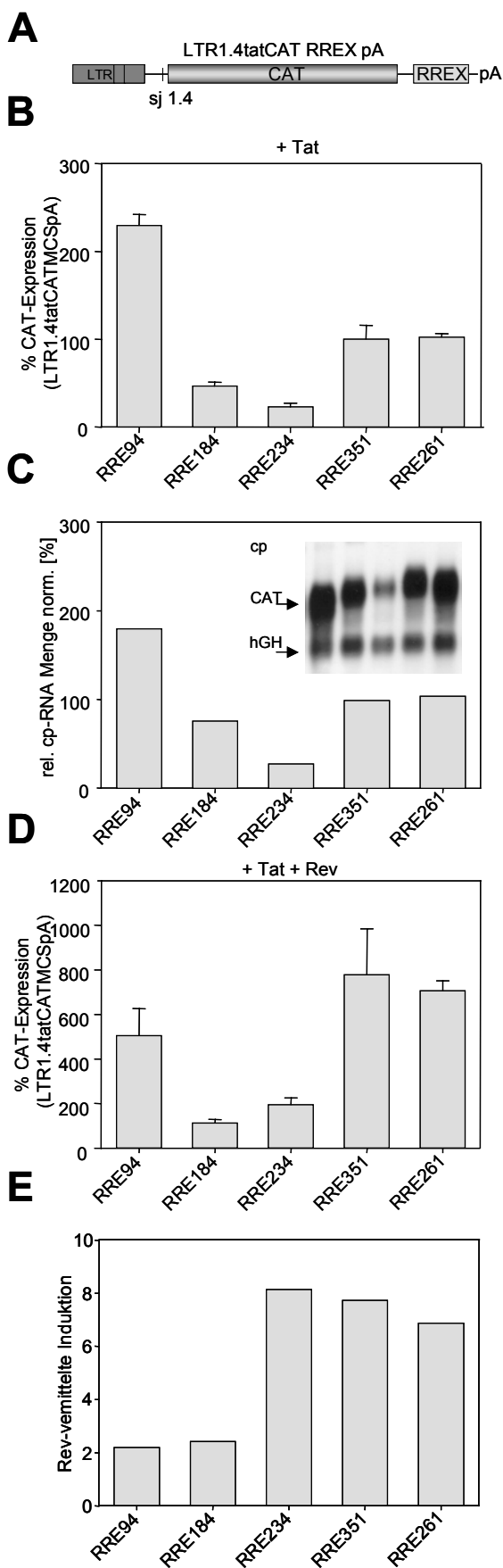


Abb. 14: Expressionsanalyse der CAT-Konstrukte mit unterschiedlichen RRE-Strukturen. (A) Aufbau der Konstrukte. Dargestellt ist der offene Leserahmen des CAT-Gens (grau), sowie die verschiedenen RRE-Sequenzen die 3'-wärts der CAT-Sequenz eingefügt wurden (RREX, hellgrau). Die LTR-Region im 5'-Bereich (dunkelgrau) dient als Promotor. (B) Proteinexpressionsanalyse. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit Konstrukten mit unterschiedlichen RRE-Strukturen (LTR1.4tatCAT RREX pA), sowie mit dem Tat-Expressionsplasmid SVctat und dem Reporter-Expressionsplasmid pGL3-Control kotransfiziert. Die CAT- Proteinexpressionsdaten der Konstrukte wurden über die Luciferase-Expression auf die Transfektionseffizienz normiert. Die relative Expression bezieht sich auf ein Referenzkonstrukt ohne zusätzliche RRE-Sequenzen 3'-wärts des CAT-Reportergens (LTR1.4tatCATMCSpA, ohne Abb.). Dargestellt sind die normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen \pm Standardfehler. (C) Northern Blot-Analyse der Zytoplasma (cp) RNA. Transfiziert wurden HeLa-T4⁺-Zellen mit Konstrukten mit unterschiedlichen RRE-Strukturen (LTR1.4tatCAT RREX pA), sowie mit dem Tat-Expressionsplasmid SVctat und dem Reporter-Expressionsplasmid pXGH5. Die Zellen wurden nach 30 Stunden geerntet und die nukleäre und zytoplasmatische RNA-Fraktion isoliert. Die zytoplasmatische RNA wurde poly(A)⁺ aufgereinigt und beide Fraktionen im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der CAT- und hGH-Transkripte erfolgte mittels DIG-markierter Antisense-Transkripte im LumiImager (Roche). Die Quantifizierung der zytoplasmatischen RNA-Mengen erfolgte mittels der LumiAnalyst 3.1-Software. Die relative hGH-normierte RNA-Menge der zytoplasmatischen RNA ist grafisch dargestellt. Die mRNA-Menge des Konstruktes RRE351 wurde auf 100 % gesetzt, da dieses in (B) eine vergleichbare Expression, wie das Referenzkonstrukt ohne zusätzliches RRE zeigte. (D) Untersuchung der CAT- Expression in Gegenwart von Rev. Das Experiment und seine Auswertung erfolgte wie in (A) beschrieben, wobei hier eine zusätzliche Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmids SVcrev erfolgte. (E) Darstellung der Rev-vermittelten Induktion der Expression. Die Daten der Rev-Reaktivität wurden als Quotient aus den Daten von Abb.14B und Abb. 14D ermittelt.

auch in Abwesenheit von Rev, unmittelbaren Einfluss auf die Transkription oder die nukleäre Stabilität der Transkripte nehmen können. Die Anwesenheit von Stamm 3, 4 und 5 und des inneren Abschnitts von Stamm 1 führte zu einer Abnahme der Transkriptmenge, was durch die Gegenwart des kompletten Stamms 1 wiederum kompensiert wurde. Das RRE kann gemäß dieser Untersuchungen damit nicht aufgrund seiner Sequenz, sondern vielmehr aufgrund seiner Sekundärstruktur als CRS-Element angesehen werden. Abhängig von der vorliegenden Teilstruktur führte es zu einer Verringerung oder auch zu einer Erhöhung der Transkriptmenge.

Um zu prüfen, ob die RRE-Teilstrukturen den Rev-vermittelten Export gewährleisten können, wurden die Expressionsexperimente in Gegenwart von Rev wiederholt (Abb. 14D). Hierbei zeigte sich, dass bei einer minimalen RRE-Struktur von 94 nt eine 5-fach höhere Expression an CAT-Protein (RRE94) im Vergleich zum Referenzkonstrukt ohne RRE (LTR1.4tatCATMCSpA, 100 %, ohne Abb.) beobachtet werden konnte. Das Konstrukt mit den zusätzlich vorhandenen Stammstrukturen 3, 4, 5 (RRE184) führte zu einer dem Referenzkonstrukt vergleichbaren CAT-Proteinexpression, während die Expression des Konstrukts mit verlängertem Stamm 1 (RRE234) doppelt so hoch lag. Bei weiterer Verlängerung des Stamms 1 zeigte sich in Anwesenheit der Stammstrukturen 3, 4, 5 (RRE351), ebenso wie in deren Abwesenheit (RRE261), eine mehr als 6-fach höhere CAT-Expression im Vergleich zum Referenzkonstrukt.

Aus dem Verhältnis der CAT-Proteinexpression in Gegenwart von Tat (Abb. 14B) und in Gegenwart von Tat und Rev (Abb. 14D) ließ sich die Rev-Induzierbarkeit abhängig von den vorhergesagten RRE-Sekundärstrukturen ermitteln (Abb. 14E). Für die Konstrukte mit verkürztem Stamm 1 (RRE94, RRE184) konnte eine Verdoppelung der CAT-Expression durch Rev nachgewiesen werden. Die Konstrukte mit einer längeren Stamm 1-Struktur zeigten dagegen eine Erhöhung der CAT-Expression um das 7- bis 8-fache (RRE234, RRE351, RRE261). Aus dem Vergleich der RRE-Strukturen lässt sich schließen, dass die Rev-Reaktivität also nicht von den Stammstrukturen 3, 4, 5, sondern alleine von einer bestimmten Länge des Stamms 1 abhängig war. Das Konstrukt RRE234 mit einer leichten Verkürzung des Stamms 1 zeigte dabei eine vergleichbare Rev-Reaktivität wie das Konstrukt RRE351 mit der vollständigen Stamm 1-Struktur oder wie das Konstrukt RRE261 mit einer Deletion der Stamm 3/4/5-Struktur bei gleichzeitig vollständigem

Stamm 1. Bedingt durch seine Funktion als CRS-Element exprimiert RRE234 jedoch auf einem deutlich niedrigeren Expressionsniveau (vgl. Abb. 14D). Im Vergleich zu der *in vitro* Untersuchung der Rev-Bindung (Abb. 13) zeigten diese Untersuchungen, dass für die funktionelle Wirkung von Rev die initiale Rev-Bindung an den Stamm 2B notwendig aber nicht ausreichend ist, da erst eine Verlängerung des Stamms 1 zu einer effizienten Rev-vermittelten Expressionssteigerung führt. Nur die RRE-Strukturen RRE261 und RRE351 wiesen eine effiziente Rev-Reaktivität ohne zusätzliche Sequenz-vermittelte Reduktion der CAT-Expression auf. Aufgrund der Abwesenheit eines CRS-Effektes bei gleichzeitiger Funktionalität des RREs im Rahmen der Rev-abhängigen Expression wurde für die weitergehenden Analysen daher das RRE351 verwendet. Da das RRE351 die vollständige subgenomische Sequenz darstellt, unterstreicht dieses Ergebnis die vorangegangene Beobachtung, dass der CRS-Effekt offensichtlich struktur- und weniger sequenzabhängig ist.

3.1.3 Beeinflussung der CAT-Reportergen-Expression durch die Gegenwart eines Introns in Anwesenheit des RREs

Durch die Rev/RRE-Wechselwirkung wird die ungespleißte RNA unter Umgehung des Spleißens in das Zytoplasma transportiert. Daher sollte durch die Rev/RRE-Interaktion eine weitere zeitliche Eingrenzung der Beeinflussung der prä-mRNA-Menge durch die Leadersequenzen möglich sein. Für diese Untersuchung sollte die RRE351-Sequenz in die Konstrukte mit den Sequenzen der nichtkodierenden Exons im Intron kloniert werden. Da die RRE-Strukturen bisher nur in Konstrukten ohne Intron analysiert worden waren, sollte zunächst sichergestellt werden, dass die RRE351-Struktur auch in Konstrukten mit zusätzlichem Intron im Leader nicht als CRS-Element wirkt und so zur Expressionsinhibition führt. Dazu wurde in das Konstrukt mit Minimal-Intron und Multicloningsite 3'-wärts des CAT-Gens das RRE351 inseriert und das Expressionsverhalten dieser beiden Konstrukte miteinander verglichen (Abb. 15A: LTRSD SAtatCAT X pA). Dabei trat in Anwesenheit des RREs sogar eine um ca. 50 % höhere CAT-Expression auf (vgl. Abb. 15B E/P R, 153 % mit E/P, 105 %). Diese RRE-abhängige Erhöhung der CAT-Expression war in Konstrukten ohne Intron (Abb. 15A: LTR1.4tatCAT X pA) nicht zu beobachten (vgl. Abb. 15B, MCS: 100 % mit RRE351: 101 %) und beruhte also offenbar auf dem Zusammenspiel des Introns mit der RRE-

Struktur. Da das RRE hier keinen negativen Effekt auf die Expression zeigte, sondern im Gegenteil zu einer erhöhten CAT-Expression führte, wurde dieser Effekt nicht weiter verfolgt und das Konstrukt für die weiteren Experimente verwendet.

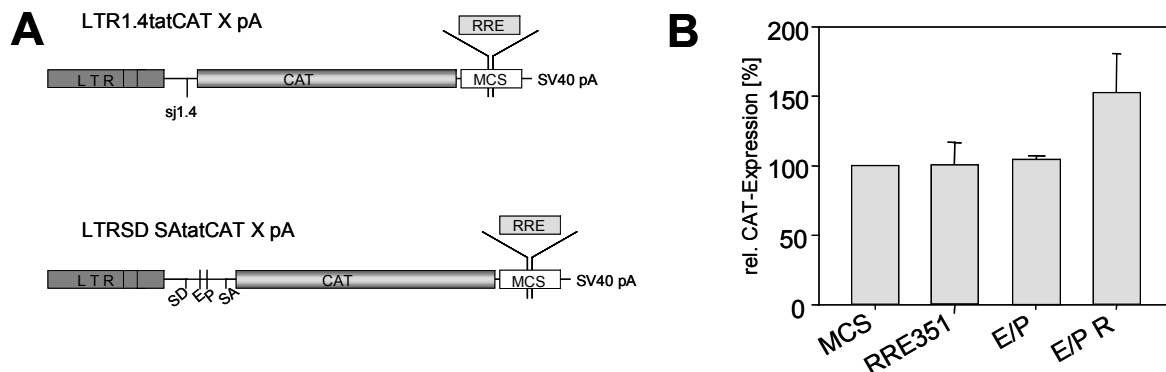


Abb. 15: Einfluss des RREs auf die CAT-Expression von Konstrukten mit und ohne Minimal-Intron. (A) Schematischer Aufbau der Konstrukte. Dargestellt ist der offene Leserahmen des Reportergens CAT (grau) sowie die Spleißnaht zwischen Exon 1 und Exon 4 (sj1.4) bzw. das von einem Spleißdonor (SD) und einem Spleißakzeptor (SA) flankierte Minimal-Intron mit einer *EcoRI* (E) und einer *PstI* (P) Restriktionschnittstelle. In 2 weiteren Konstrukten wurde die RRE351-Sequenz 3'-wärts des CAT Gens (hellgrau) in die Multicloningsite (MCS, weiß) eingefügt. (B) Dargestellt ist die relative CAT-Expression der Konstrukte LTR 1.4tatCATMCS pA (MCS), LTR1.4tatCAT RRE351pA (RRE351), LTRSD SAtatCAT MCS pA (E/P) und LTRSD SAtatCAT RRE pA (E/P R). Die Expression von LTR1.4tatCAT MCS pA wurde gleich 100 % gesetzt.

3.1.4 Beeinflussung der CAT-Reportergen-Expression durch die Gegenwart der Leaderexonsequenzen als Intron in Anwesenheit des RREs

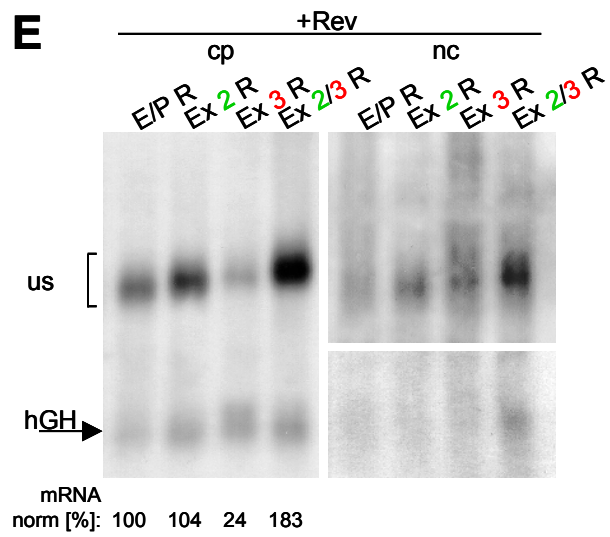
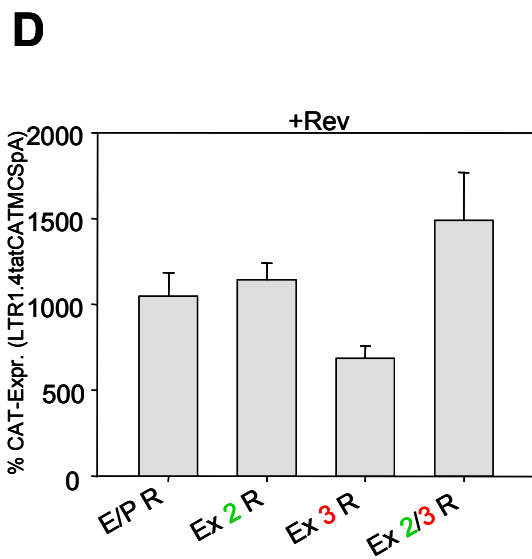
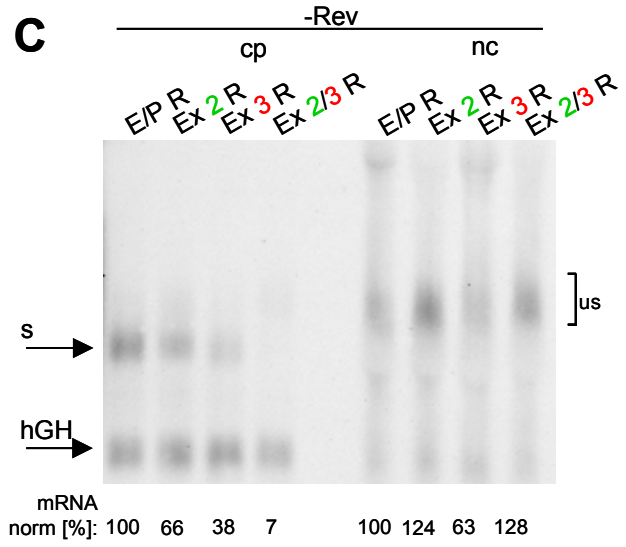
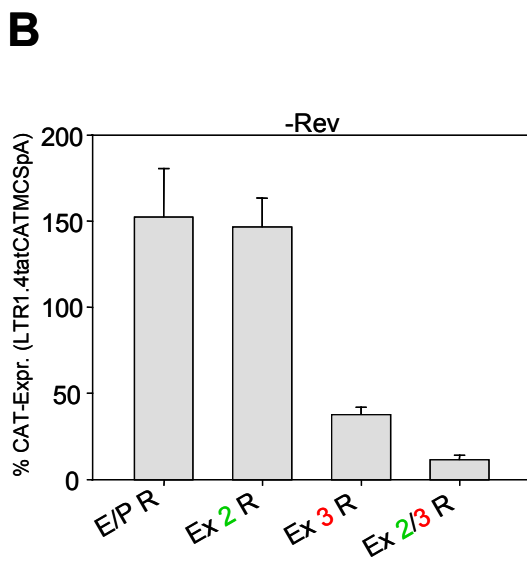
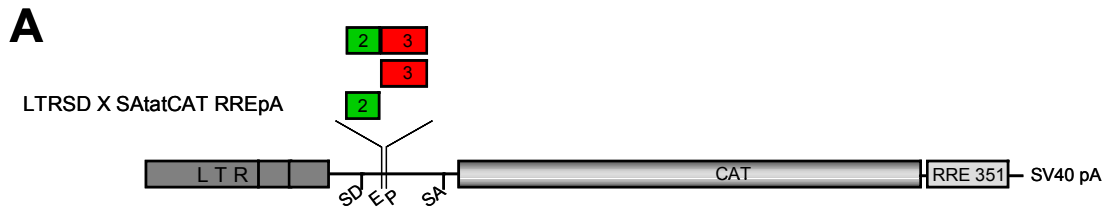
Um zu untersuchen, ob die Gegenwart des RRE351 die Expression der CAT-Reportergenkonstrukte mit den Leaderexonsequenzen im Intron beeinflusst, wurden die Leaderexonsequenzen in das Konstrukt mit Minimal-Intron und RRE 3'-wärts des CAT-Gens kloniert. Die so entstandene Konstrukt-Serie (LTRSD X SA tat CAT RRE pA, Abb. 16A) wurde im CAT-ELISA analysiert und bezogen auf das Referenzkonstrukt ohne Intron und ohne RRE (LTR1.4tatCAT MCS pA, 100 %, ohne Abbildung) dargestellt (Abb. 16B). Im Vergleich mit dem Konstrukt mit Minimal-Intron (E/P R, 153 %) zeigte sich auch hier eine Expressionsreduktion durch die Exon 3 Sequenz (Ex 3 R, 38 %) und eine weitere Reduktion durch die Exon 2/3 Sequenz (Ex 2/3 R, 12 %). Diese Reduktion entsprach qualitativ den zuvor gemachten Beobachtungen mit den entsprechenden Konstrukten ohne RRE (zusammengefasst in Tabelle 2). Bei diesen drei Konstrukten war jedoch, bedingt durch den expressionsfördernden Effekt des RREs in Kombination mit

einem Intron (vgl. Abb. 15), eine Erhöhung der CAT-Expression um ca. 50 % im Vergleich zu den Konstrukten ohne RRE messbar (Tab. 2, untere Spalte). Da die expressionsinhibierende Wirkung von Exon 3 und Exon 2/3, sowohl in den Konstrukten mit als auch ohne RRE auftraten, waren diese Effekte nicht auf das RRE zurückzuführen. Für Exon 2 traf dies jedoch nicht zu. Mit der Exon 2 Sequenz im Intron war in Gegenwart des RRE nicht die soeben beschriebene Expressionserhöhung zu beobachten, das Konstrukt mit Exon 2 zeigte hier stattdessen eine vergleichbare CAT-Expression wie das Konstrukt mit Minimal-Intron (vgl. Tab. 2, E/P und 2 mit und ohne RRE). Die expressionsfördernden Effekte des RREs und der Exon 2 Sequenz konnten demnach entweder nicht additiv wirken, da sich die CAT-Expression bereits in der Sättigung befand, oder das RRE verhinderte die spezifische Wirkung des Exons 2. Dies könnte zum Beispiel durch die Assemblierung unterschiedlicher Ribonukleoproteinkomplexe in An- und Abwesenheit des RREs bedingt sein.

Nicht kodierende Exons	— (E/P)	2	3	2/3
CAT (%) –RRE	105	179	26	8
CAT (%) +RRE	153	147	38	12
Erhöhung % (CAT-RRE)	46	-18	46	50

Tabelle 2: Vergleich der CAT-Proteinmengen von Konstrukten mit den nicht kodierenden Leaderexonsequenzen im Intron in Gegenwart (aus Abb. 16B) und in Abwesenheit eines RREs (aus Abb. 11B). Die Expression des Konstrukts LTR1.4tatCAT MCS pA wurde als 100 % festgesetzt.

Um zu untersuchen, ob die durch die nicht kodierenden Exons verursachten Unterschiede noch auf Ebene der RNA zu beobachten waren, wurde die Kern- und Zytoplasma-RNA der Konstrukte mit RRE und den unterschiedlichen Exonsequenzen untersucht (Abb. 16C). Während die Menge der gespleißten, zytoplasmatischen RNA die Ergebnisse des CAT-ELISAs unterstützte (vgl. Abb. 16B und 16C, cp), zeigte die prä-mRNA im Kern (Abb. 16C, nc) eine Erhöhung der RNA-Menge durch Exon 2 und Exon 2/3 und eine Reduktion der RNA-Mengen durch Exon 3. Im Kern war also in Anwesenheit des



RREs nicht nur der negative Effekt von Exon 3 sondern auch der positive Effekt von Exon 2 nachweisbar. Dies entsprach den Ergebnissen mit der Konstruktsreihe ohne RRE (LTR SD X SA tatCAT MCS pA, zusammengestellt in Tab. 3).

Der Vergleich der prä-mRNA-Mengen in Gegenwart und Abwesenheit des RREs sowie der Konstrukte mit den Leaderexonsequenzen im nicht spleißbaren Kontext zeigte außerdem, dass die Positionierung der nicht kodierenden Exons im Intron zu geringeren Unterschieden der jeweiligen prä-mRNA-Menge führte (Tab. 3). Möglicherweise basiert dies auf einem, durch die Positionierung im Intron, reduzierten Zeitraum, in dem die Exonsequenzen die prä-mRNA-Mengen beeinflussen können. Die hohen Werte in Gegenwart beider Exons im Intron deuten außerdem auf eine zusätzliche, vermutlich durch die Spleißinhibition bedingte, Akkumulation von prä-mRNA im Kern hin.

Dass die expressionsfördernde Wirkung des Exon 2 zwar auf Ebene der prä-mRNA nicht aber bei der zytoplasmatischen, gespleißten mRNA und bei der CAT-Expression nachweisbar war, ließ entweder auf eine Transportinhibition durch die Kombination aus der Sequenz des Exons 2- und des RREs oder auf eine Inhibition des Spleißens schließen, wie sie auch schon für die Exon 2/3 Sequenz beschrieben wurde (siehe 3.1.1.3).

Abb. 16: Der Einfluss von Rev auf die CAT-Expression der Konstrukte mit Leaderexonsequenzen im Intron. (A) Schematischer Aufbau der Konstrukte. Dargestellt ist der offene Leserahmen des Reportergens CAT (grau) sowie die nicht kodierenden Exons 2 (grün) und 3 (rot), die einzeln oder gemeinsam zwischen dem Spleißdonor (SD) und dem Spleißakzeptor (SA) der Konstrukte eingefügt wurden. Weiterhin wurde die RRE351-Sequenz 3'-wärts des CAT Gens eingefügt (hellgrau). Dies führte zu den Konstrukten der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie. Dabei entspricht E/P R dem Konstrukt LTRSD SAtatCAT RRE pA, Ex 2 R dem Konstrukt LTRSD Ex 2 SAtatCAT RRE pA, Ex 3 R dem Konstrukt LTRSD Ex 3 SAtatCAT RRE pA und Ex 2/3 R dem Konstrukt LTRSD Ex 2/3 SAtatCAT RRE pA. (B) CAT-Protein-Expression in Abhängigkeit der Exonsequenzen im Intron der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie in Abwesenheit von Rev. Die relativen Werte beziehen sich auf das Referenzkonstrukt LTR1.4tatCAT MCS pA (ohne Abb.), dessen Expression auf 100 % gesetzt wurde. (C) Northern Blot-Analyse der zytoplasmatischen (cp) und nukleären (nc) RNA nach Transfektion der Konstrukte der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie in Abwesenheit von Rev. Die mRNA-Mengen wurden auf die Transfektionseffizienz normiert, die relative Menge auf das Konstrukt ohne zusätzliche Sequenzen im Intron bezogen und die unterhalb des Blots angegeben. (D) CAT-Protein-Expression in Abhängigkeit der Exonsequenzen im Intron der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie bei Kotransfektion mit dem Rev-Expressionsplasmid SVcrev. (E) Northern Blot-Analyse der zytoplasmatischen (cp) und nukleären (nc) RNA nach Transfektion der Konstrukte der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie bei Kotransfektion mit SVcrev. Transfektion, Ernte und Analyse erfolgten wie unter Abb. 11 beschrieben.

Tabelle 3: Vergleich der prozentualen prä-mRNA-Mengen in nichtsplicingbarem Kontext (LTR1.X.4tatCAT), mit den prä-mRNA-Mengen im splicingbaren Kontext in Konstrukten ohne (LTRSD X SAatCAT MCS pA) und mit einem RRE (LTRSD X SA tatCAT RRE pA).

Nicht kodierende Exons	— (E/P)	2	3	2/3
LTR1.X.4 tatCAT	100	152	35	53
LTRSD X SAatCATMCS pA	100	132	75	167
LTRSD X SAatCAT RRE pA	100	124	63	128

Um zu untersuchen, ob die Beeinflussung der mRNA-Mengen durch die nicht kodierenden Exons vor oder nach dem Zeitpunkt der Rev/RRE-Interaktion stattfindet, wurde die Expression der RRE-enthaltenden Konstrukte mit den Sequenzen der nicht kodierenden Exons im Intron nach Kotransfektion des Rev-exprimierenden Plasmids SVcrev im CAT-ELISA (Abb. 16D) und im Northern Blot (Abb. 16E) untersucht. Als Referenz wurde im CAT-ELISA auch hier das Konstrukt LTR1.4tatCAT MCS pA (100%, ohne Abb.) verwendet, so dass die Experimente ohne und mit Rev (Abb. 16B und D) miteinander vergleichbar waren. Die Gegenwart von Rev führte, wie bereits in früheren Experimenten beobachtet (siehe 3.1.2.2, Abb. 14), insgesamt zu einer ca. 10-fach höheren CAT-Expression als in Abwesenheit von Rev (vgl. 16B mit D). Die Expression des Konstrukts mit Exon 2/3 stieg dabei Rev-abhängig stark an (Ex2/3 R, 1491 %). Dies korreliert mit der für dieses Konstrukt gezeigten Spleißinhibition (siehe 3.1.1.3), die durch Rev umgangen werden kann.

Durch die Gegenwart der Sequenz des Exons 2 war dagegen auch mit Rev keine signifikante zusätzliche Erhöhung der CAT-Expression nachweisbar (vgl. Abb. 16D, E/P R, 1050 % mit Ex2 R, 1144 %), allerdings war hier im Zytoplasma im Vergleich zum Konstrukt mit Minimal-Intron mehr ungespleißte RNA detektierbar, als in Abwesenheit von Rev (vgl. E/P R mit Ex 2 R in Abb. 16C und E, cp). Die Spleißinhibition durch die Kombination der Sequenz des Exons 2 mit dem RRE konnte also nicht der einzige Grund für die geringe Expression des Exon 2 Konstrukts sein. Eine Aussage zur nukleären RNA konnte hier nicht getroffen werden, da aufgrund der geringen Signalintensitäten der hGH mRNA keine Quantifizierung möglich war. Da sich bei der Inhibition durch Exon 2 im Intron in Kombination mit dem RRE offenbar verschiedene Effekte überlagerten, die in diesem Versuchssystem nicht differenzierbar waren und diese Effekte in den authentischen

HIV-1 Transkripten mit der Exon 2 Sequenz im 5'-UTR nicht in dieser Form auftraten (vgl. 3.1.1.1), wurden diese Effekte hier nicht weiter untersucht. Eine klare Aussage war dagegen für Exon 3 möglich, dessen inhibierende Wirkung sowohl im CAT-ELISA (Abb. 16D, 689 %) als auch in der Zytoplasma-RNA (Abb. 16E, 24 %) nachweisbar war. Da bereits gezeigt wurde, dass Exon 3 kernspezifisch eine inhibierende Wirkung auf die prä-mRNA-Menge hatte (siehe 3.1.1.3), ließ sich daraus schließen, dass die Exon 3 Sequenz zeitlich bereits vor der Rev/RRE-Interaktion wirken konnte.

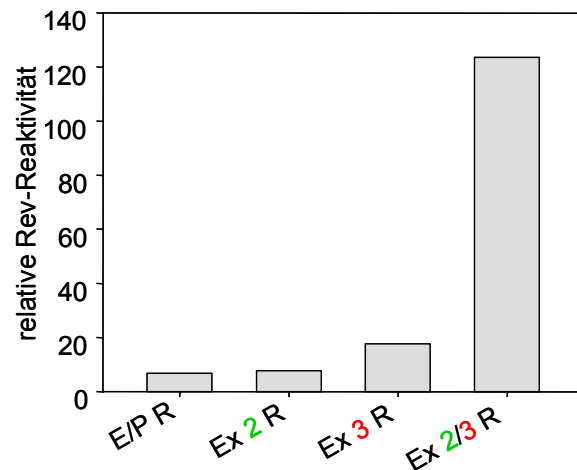
Die Spleiß- und Export-inhibierende Wirkung der Exons 2/3 Sequenz im Intron ließ sich durch Rev umgehen. Dies zeigte, dass die expressionsinhibierende Wirkung auf die normale mRNA-Prozessierung beschränkt war, während der Rev-vermittelte und CRM1-induzierte Export unter Umgehung des Spleißens die Expression dieses Konstruktes wieder ermöglichte. Die hohen Mengen Exon 2/3 enthaltender Transkripte in Kern und Zytoplasma deuten daraufhin, dass die RNA-Akkumulation unabhängig von der Rev/RRE-Interaktion stattfand.

Anhand des Vergleichs der CAT-Proteinexpression in An- und Abwesenheit von Rev ließ sich die Rev-Induzierbarkeit in Abhängigkeit von den verschiedenen im Intron inserierten Exons ermitteln (Abb. 17). Der Vergleich zeigte eine Rev-vermittelte Expressionssteigerung um den Faktor 7 bzw. 8 mit Minimal-Intron oder in Gegenwart des Exons 2 im Intron, sowie eine 18-fache Rev-induzierte Expressionssteigerung in Gegenwart des Exons 3 und eine 124-fache Rev-vermittelte Steigerung in Gegenwart beider Exons im Intron, wobei Letztere allerdings auf der zuvor erwähnten deutlichen Spleißinhibition basierte, die durch die Rev/RRE-Interaktion umgangen wurde. Das prä-mRNA-Mengen-reduzierende Exon 3 zeigte also eine höhere Rev-Induzierbarkeit, als das Referenzkonstrukt mit Minimal-Intron. Dabei verringerte sich durch die Zugabe von Rev der Unterschied zwischen dem Konstrukt mit der Sequenz des Exons 3 und dem Referenzkonstrukt. Dies könnte darauf deuten, dass die mRNA-reduzierende Wirkung von Exon 3 zwar bereits vor dem Zeitpunkt der Rev/RRE-Wechselwirkung begonnen hat, diese Wirkung aber nur partiell war und in Abwesenheit von Rev entweder über einen längeren Zeitraum oder aber effektiver stattfand.

Die Gegenwart von Sequenzelementen wie Exon 3 führt aufgrund der Reduktion der prä-mRNA nur zu einer sehr ineffizienten Expression in Abwesenheit von Rev. In Gegenwart

von Rev ist ihre Wirkung reduziert oder aufgehoben. Dies führt zu niedrigen Leveln gespleißter RNAs und einer Rev-vermittelten Erhöhung der Expression nach dem Umschalten von der frühen Phase der mehrfach gespleißten Transkripte zur späten Phase der partiell- bzw. ungespleißten Transkripte.

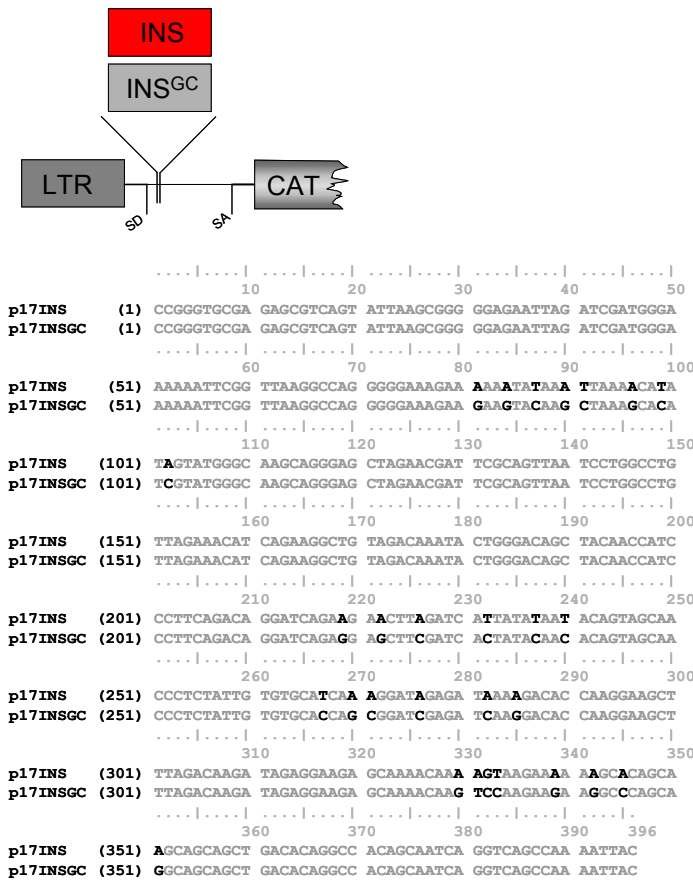
Abb. 17: Rev-vermittelte Induktion der CAT-Reporter-gen-Expression in Abhängigkeit von den Exonsequenzen 2 und 3 im Intron. Die Rev-vermittelte Steigerung der CAT-Expression wurde als Quotient der Expression in Gegenwart und in Abwesenheit von Rev ermittelt (vgl. Abb. 16B und D).



3.1.5 Der AU-Gehalt der RNA beeinflusst die RNA-Menge

Mit Exon 3 konnte sowohl eine Reduktion der RNA-Menge als auch eine erhöhte Rev-Reaktivität beobachtet werden. Beide Kriterien wurden auch im Zusammenhang mit INS- oder CRS-Elementen beschrieben, die im *gag*-[267;272] und *pol*- [55], *vif*- [250] oder *env*-[34;228;255] Bereich identifiziert worden waren. Für das INS1-Element aus dem p17-Bereich des *gag*-Gens wurde ebenso wie hier für Exon 3 eine verringerte RNA-Menge im Kern beschrieben [272]. Dieses 396 nt lange Instabilitätselement zeichnet sich durch einen hohen AU-Gehalt (58 %) aus (Abb. 18A, INS). Für INS1 wurde nachgewiesen, dass 28 stille, den GC-Gehalt erhöhende Mutationen (Abb. 18A, INS^{GC}) zu einer Stabilisierung der RNA führten [269]. Auch eine Senkung des AU-Gehalts in Bereichen des *gag/pol*-Gens im Rahmen einer Optimierung der Translations-Effizienz durch Austausch unterschiedlicher Kodons führte zu einer Erhöhung der RNA-Menge und einer Reduktion der Rev-Reaktivität [71;163]. Der AU-Gehalt der Sequenz des Exons 3 entsprach mit 58 % dem AU-Gehalt des INS1 (Abb. 18B, Ex 3). Daher wurde überprüft, ob der AU-Gehalt des Exons 3 zu der RNA-Reduktion und der erhöhten Rev-Reaktivität beiträgt. Dazu wurden in das CAT-Konstrukt mit Exon 3 als Teil der Intronsequenz (LTRSD Ex 3 SATatCAT RRE pA) Punktmutationen eingebracht, die den AU-Gehalt von 58 % auf 32 % reduzierten (Abb. 18B, Ex 3^{GC}).

A



B

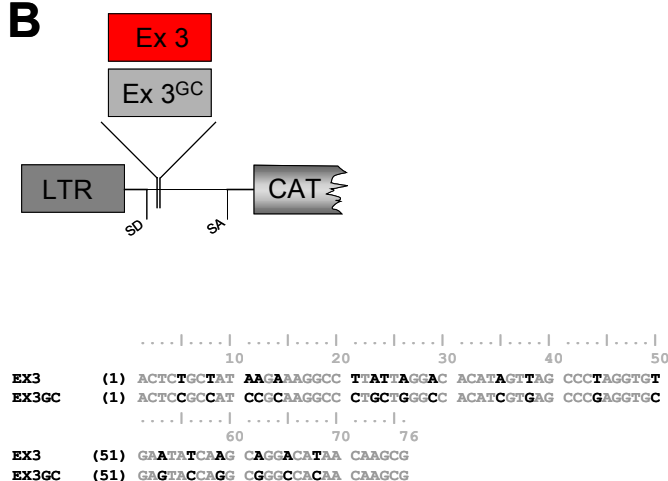


Abb. 18: Variation des GC-Gehalts des INS1 Elements und des Exon 3 im Intron. Die Konstrukte beinhalten den long terminal repeat (LTR) mit der HIV-1-Promotorsequenz, 3'-wärts davon liegen ein Spleißdonor (SD) sowie ein Spleißakzeptor (SA). Die oberhalb dargestellten Boxen repräsentieren die in das Intron eingefügten Sequenzen INS und INS^{GC} (A) bzw. Exon3 und Exon3^{GC} (B).

Die Exonsequenzen führen im gespleißten Zustand zu einer RNA, die dem Spleißprodukt von SD1 auf SA4 in HIV-1 entspricht. Das Reporter-gen CAT ersetzt dabei das tat-Gen aus HIV-1. Weiter 3'-wärts der Reportersequenz befindet sich zusätzlich ein RRE. Unter der Schemazeichnung sind die INS1- bzw. Exon 3-Sequenzen aufgeführt. Die Konstrukte mit der HIV-1-Sequenz wurden LTRSD INS SAatCAT RRE pA (INS) und LTRSD Ex 3 SAatCAT RRE pA (Ex 3) genannt. Die Nukleotide, die durch die Mutation zur Erhöhung des GC-Gehalts ausgetauscht wurden, sind innerhalb der dargestellten Sequenz dunkel hervorgehoben. Die durch die Mutationen erhaltenen Konstrukte wurden LTRSD INS^{GC} SAatCAT RRE pA (INS^{GC}) und LTRSD Ex 3^{GC} SAatCAT RRE pA (Ex 3^{GC}) benannt.

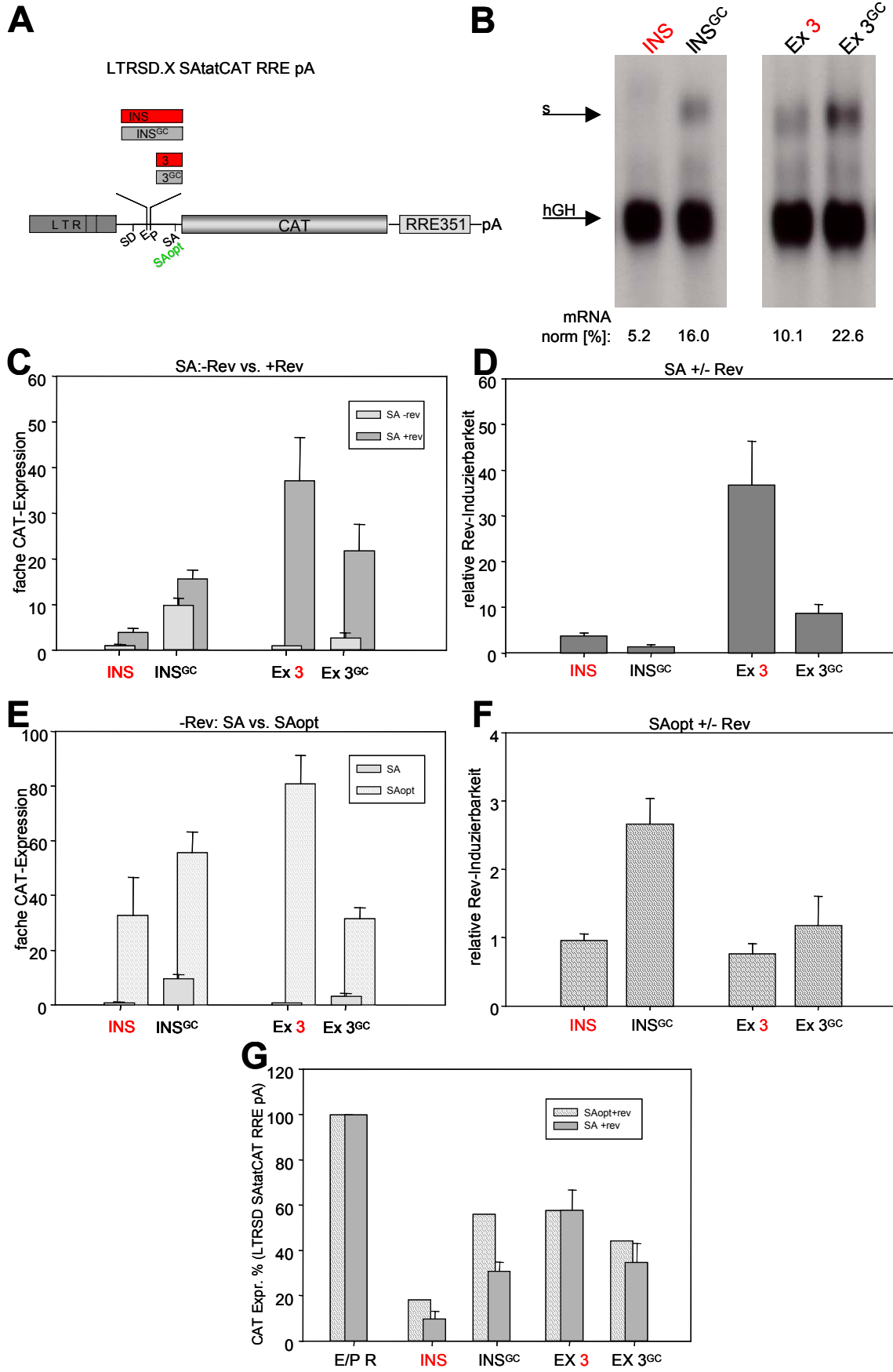
Die Analyse der CAT-Proteinmenge im ELISA zeigte eine erhöhte CAT-Expression für Konstrukte mit den mutierten GC-reichen Sequenzen (ohne Abb.: INS 25 %, INS^{GC} 192 %, Ex 3 19 %, Ex 3^{GC} 48%, Referenzkonstrukt LTR1.4tatCAT MCS pA 100 %). Legt man die in Gegenwart des Exons 3 gemessene CAT-Menge als Referenz auf 1 fest, so ergibt sich eine 2-fache Expressionssteigerung für Exon 3^{GC} und eine mehr als 7-fache Steigerung zwischen INS und INS^{GC} (Abb. 19C, helle Balken). Diese Steigerung der Expression in Gegenwart der mutierten Sequenzen war auch im Northern Blot nachweisbar (Abb. 19B). In Gegenwart der mutierten viralen Sequenzen im Intron (INS^{GC}, Ex 3^{GC}) wurden 3-fach bzw. 2-fach höhere mRNA-Mengen im Vergleich zu den Ausgangssequenzen (INS, Ex 3) beobachtet. Die Differenz der CAT-Protein- und der mRNA-Mengen deuteten beide, aufgrund der Positionierung der Sequenzen im Intron, auf eine Wirkung auf Ebene der prä-mRNA hin. Die Erhöhung des GC-Gehalts führte in beiden Fällen — bedingt durch die Wirkung auf Ebene der prä-mRNA — zu erhöhten mRNA- und CAT-Protein-Mengen.

Da in anderen Untersuchungen für die Instabilitätselemente neben der Reduktion der Expression eine hohe Rev-Reaktivität nachgewiesen worden war, wurde die CAT-Expression der Konstrukte mit hohem und niedrigem AU-Gehalt im INS1-Element bzw. im Exon 3 auch in Anwesenheit von Rev untersucht (Abb. 19C). Die Gegenwart von Rev führte zu einer höheren Expression aller Konstrukte (Abb. 19C, dunkle Balken), wobei die CAT-Expression in Gegenwart des Exons 3 mit einer 37-fachen Steigerung am höchsten war. Zur Bestimmung der Rev-Induzierbarkeit wurde der Quotient der CAT-Expression in Gegenwart und Abwesenheit von Rev ermittelt (Abb. 19D). Die Ex 3 bzw. Ex 3^{GC}-Sequenzen zeigten eine 36,8-fachen bzw. 8,9-fache, die INS bzw. INS^{GC}-Elemente eine 3,9-fache bzw. 1,5-fache Rev-vermittelte Expressionssteigerung der CAT-Menge. Damit war die Rev-vermittelte Expressionssteigerung der AU-reichen Sequenzen 4,1-fach (Abb. 19D: Ex 3 zu Ex 3^{GC}) bzw. 2,6-fach (Abb. 19D: INS zu INS^{GC}) höher, als die der korrespondierenden GC-reichen Mutationen. Die Exon 3 Sequenz zeigte damit ebenso wie die INS-Sequenz die Charakteristika eines AU-reichen Instabilitätselements. Damit korrelierte die Rev-Induzierbarkeit, die für Exon 3 am höchsten war, nicht mit der RNA-Destabilisierung, die für das INS-Element am höchsten war. Die Rev-Reaktivität kann also nicht wie bisher angenommen alleine auf der RNA-Stabilität beruhen.

Die kürzeren Ex 3/Ex 3^{GC}-Sequenzen zeigten insgesamt eine 4- bis 5-fach höhere Rev-Induzierbarkeit, als die längeren INS/INS^{GC}-Elemente. Diese insgesamt geringere Stimulation der CAT-Expression durch Rev in Gegenwart der INS-Elemente könnte zum Teil auf die durch die Rev-vermittelte Spleißinhibition verlängerte Leadersequenz mit darin befindlichen zusätzlichen Startkodons (nt 45 und nt 105 der INS-Sequenz) zurückzuführen sein, da diese Startkodons die Expression des Reportergens inhibieren könnten.

Da ein effizienteres Spleißen die Verweildauer der AU-reichen Sequenzen innerhalb der prä-mRNA im Kern reduziert, sollte eine Erhöhung der Spleißeffizienz den Einfluss der Sequenzelemente auf die mRNA-Menge reduzieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Effizienz des Spleißakzeptors erhöht. Dazu wurde dessen Sequenz so verändert, dass eine Verzweigungsstelle mit verbesserter Komplementarität zur U2 snRNA und kürzerem Abstand zum AG der Exon/Intron Grenze sowie ein Polypyrimidintrakt mit erhöhtem Pyrimidingehalt entstand (SAopt) [151]. Die Optimierung des Spleißakzeptors stimulierte die CAT-Expression (Abb. 19E, gestreifte Balken), und führte zu einem Expressionsmuster, das, bis auf eine zusätzliche Steigerung der Expression der INS/INS^{GC}-Konstrukte, qualitativ dem zuvor in Gegenwart von Rev beobachten entsprach (vgl. mit Abb. 19C, dunkle Balken). Damit stützt diese Beobachtung die Hypothese einer reduzierten nukleären Wirkungszeit der INS- bzw. Exon 3 Sequenzen in Gegenwart eines optimierten Spleißakzeptors oder durch die Rev/RRE-Wechselwirkung.

Da gezeigt wurde, dass der Rev-vermittelte RNA Export und die Spleißreaktion zueinander in Konkurrenz stehen [151], sollte die zusätzliche Gegenwart von Rev keinen Einfluss auf die Expressionsrate von Konstrukten mit optimiertem Spleißakzeptor haben. Tatsächlich zeigte die CAT-Expression der Konstrukte mit optimiertem Spleißakzeptor in Gegenwart von Rev keine relevante Rev-Induzierbarkeit. Die Rev-Reaktivität der Konstrukte lag bei einem Quotienten um 1 (Abb. 19F: INS 0,96; INS^{GC} 2,68; Ex 3 0,77; Ex 3^{GC} 1,18), zeigte also keine additive Steigerung der Expression in Gegenwart von Rev. Die fehlende Wirkung der Rev/RRE-Interaktion unterstützt die Annahme, dass das Spleißereignis und der Rev-vermittelte Export auf den gleichen prä-mRNA Pool zugreifen.



Zur Bestätigung der Wirkung der AU-reichen Sequenzen und deren Mutationen auf Ebene der prä-mRNA wurde die relative CAT-Proteinexpression der Konstrukte, die diese Sequenzen enthielten mit der Expression des Referenzkonstrukts mit minimaler Intronsequenz verglichen. Dabei zeigten die Konstrukte mit INS1 Element oder Exon 3 sowie die Mutationen dieser Konstrukte zu höherem GC-Gehalt unabhängig von der Qualität des Spleißakzeptors auch in Gegenwart von Rev eine reduzierte CAT-Expression im Vergleich zum Konstrukt ohne zusätzliche Exonsequenzen (Abb. 19G). Dies deutet daraufhin, dass die Sequenzelemente zumindest partiell bereits vor der Wirkung von Rev ihren Einfluss ausgeübt haben. Durch die hier gemachten Experimente wurde gezeigt, dass die Rev-vermittelte Expressionssteigerung an zwei Phänomene gekoppelt ist. Zum Einen korreliert eine durch die HIV-1 Sequenz hervorgerufene, geringere, nukleäre mRNA-

Abb. 19: CAT-Reporter-Expressionsanalyse in Abhängigkeit instabilisierender Sequenzen im Intron (A) Schematischer Aufbau der Konstrukte. Dargestellt ist der offene Leserahmen des Reportergens CAT (grau) sowie das nicht kodierende Exon 3 und das INS-1 Element (rot), und die jeweiligen GC-Mutationen (grau), die zwischen dem Spleißdonor (SD) und dem Spleißakzeptor (SA) des Konstrukts eingefügt wurden. Weiterhin wurde die RRE351-Sequenz 3'-wärts des CAT Gens eingefügt (hellgrau). Dies führte zu den Konstrukten der LTRSD X SAtatCAT RRE pA-Serie. Dabei entspricht E/P R dem Konstrukt LTRSD SAtatCAT RRE pA, Ex 3 dem Konstrukt LTRSD Ex 3 SAtatCAT RRE pA, Ex 3^{GC} dem Konstrukt LTRSD Ex 3^{GC} SAtatCAT RRE pA, INS dem Konstrukt LTRSD INS SAtatCAT RRE pA und INS^{GC} dem Konstrukt LTRSD INS^{GC} SAtatCAT RRE pA. **(B)** Northernblot-Analyse des Einfluss von Leadersequenzen im Intron auf die mRNA-Menge. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit den zu untersuchenden Konstrukten sowie dem Reporterplasmid pXGH5 und dem Tat-Expressionsplasmid SVctat mittels FuGene™ 6 transfiziert. Gleiche Mengen der Gesamt-RNA wurden poly(A)-selektiert und im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit den Sonden gegen CAT und hGH (von den Konstrukten pGEMCAT und p73hGH). Zu sehen ist die gespleißte RNA (s) sowie die Wachstumshormon kodierende RNA (hGH). Die Banden-Intensitäten wurden mit Hilfe eines Lumi-Imager F1 und LumiAnalyst Software 3.1 (Roche) ermittelt und auf die hGH-Expression normiert. **(C, E)** Protein-Expressionsanalyse mittels CAT-ELISA. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit den Konstrukten LTRSD INS SAtatCAT RRE pA, LTRSD INS^{GC} SAtatCAT RRE pA, LTRSD Ex 3 SAtatCAT RRE pA und LTRSD Ex 3^{GC} SAtatCAT RRE pA (vgl. Abb. 11), dem Luziferase Expressionsvektors pGL3-Control und SVctat transfiziert. Die CAT-Expression wurde im CAT-ELISA ermittelt und auf die Luziferase-Expression normiert. Die relative CAT-Expression bezieht sich auf das Konstrukt LTRSD Ex 3 SAtatCAT RRE pA. Dargestellt sind die auf die Transfektionseffizienz normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler. **(D, F)** Rev-vermittelte Induktion der CAT-Reporter-Expression in Abhängigkeit instabilisierender Sequenzen im Intron in Gegenwart eines mäßig effizienten Spleißakzeptors **(D)**, sowie nach Optimierung des Spleißakzeptors **(F)**. Die Steigerung der CAT-Expression wurde als Quotient der Expression bei Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmids SVcrev und der Expression in Abwesenheit von Rev ermittelt. **(G)** Die relative CAT-Expression in Gegenwart von Rev und Tat in Abhängigkeit der im Intron inserierten Sequenzen Ins und Ex 3 sowie ihrer GC-reicheren Mutationen INS^{GC} und Ex 3^{GC} bezogen auf das Referenzkonstrukt mit Minimalintron LTRSDSAtatCATRREpA (E/P R). Die Grafiken zeigen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten ± Standardfehler.

Menge mit der Rev-Induzierbarkeit. Dies konnte beispielsweise in Gegenwart von Exon 3 oder INS1 beobachtet werden. Die durch diese Sequenzen hervorgerufene, geringe, basale Expression wird in Gegenwart von Rev deutlicher erhöht, als die der Referenzkonstrukte höheren GC-Gehalts (Abb. 19D). Als zweite Voraussetzung für die Rev-vermittelte Expressionssteigerung erwies sich in den hier gemachten Experimenten eine suboptimale Spleißeffizienz, die zu einer reduzierten Expression führte (Abb. 19E). Auf Basis dieser durch den Spleißakzeptor reduzierten Expression kann die Gegenwart von Rev (Abb. 19C), ebenso wie die Optimierung des Spleißakzeptors, zu einer effizienten Expression führen (Abb. 19E). Ist die Expression bereits durch die Gegenwart eines optimierten Spleißakzeptors erhöht, kann Rev nicht mehr zu einer Stimulation der Expression führen (Abb. 19F). Die Spleißeffizienz konnte auch durch die Intronsequenz selbst reduziert werden, wie im Fall der Exons 2/3 als Teil des Introns, die zu einer RNA-Akkumulation im Kern führten (siehe 3.1.1.3, Abb. 11). Die Reduktion der Spleißeffizienz führte in beiden Fällen zu einer reduzierten mRNA-Menge im Zytoplasma, wobei durch die zusätzliche Gegenwart von Rev die Inhibition bzw. Reduktion des Exports überwunden werden konnte.

3.1.6 Analyse der Leadersequenz-vermittelten RNA-Mengenunterschiede *in vitro*

3.1.6.1 Transkription der nicht kodierenden Exons in HeLa-Kernextrakt

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Exon 2 und Exon 3 bereits im Kern ko- oder postranskriptional, zum Teil bereits vor der Rev/RRE-Interaktion, zu Unterschieden in der RNA-Menge führten. Vorstellbar wäre dabei ein sequenzspezifischer Einfluss auf die Transkription oder auf das Cappen der RNA. Ebenfalls möglich wäre, dass die Leaderexons Bindestellen für Proteine enthalten, die die RNA-Stabilität verändern können. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden die Sequenzelemente nachfolgend in *in vitro* Experimenten näher untersucht. Zunächst wurden für die Plasmide der LTR1.X.4tatCATpA-Serie *in vitro* die Transkriptionsraten bestimmt. Dazu wurden die Plasmide mit *SalI*-linearisiert und zusammen mit einem *MscI*-linearisierten Plasmid pSVT7CAT als interner Kontrolle in Kernextrakt (HeLa-scribe, Promega) inkubiert und die jeweils transkribierten RNA-Mengen verglichen (Abb. 20). Die auf das Referenz-Transkript und die jeweilige Transkriptlänge normierten, relativen RNA-Mengen zeigten keine Unterschiede, die als

Erklärung für die zuvor beobachteten unterschiedlichen prä-mRNA-Mengen (vgl. 3.1.1.1) dienen könnten (LTR124tatCAT 114 %, LTR134tatCAT 104 %, LTR1234tatCAT 103 %).

Damit scheiden Unterschiede in den Transkriptionsraten als Ursache für die unterschiedlichen Leaderexon-vermittelten nukleären RNA-Mengen aus. Dies steht in Einklang mit bereits früher in unserem Labor durchgeführten nukleären „run-on“-Experimenten, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptionsraten zeigen konnten [186]. Beide Ergebnisse weisen damit auf eine posttranskriptionale, nukleäre Beeinflussung der RNA-Stabilität hin.

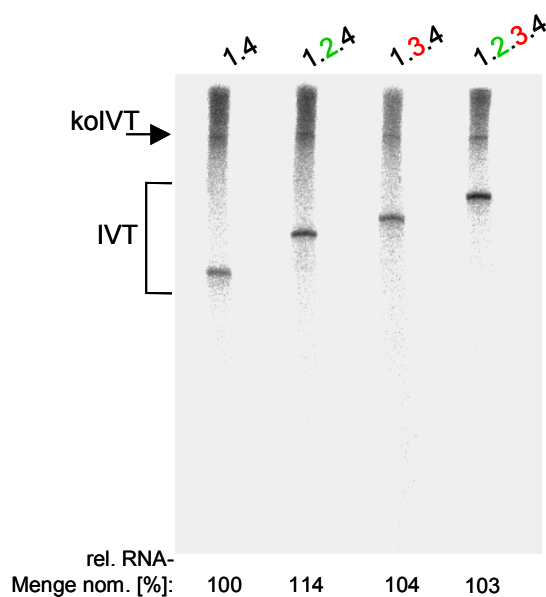


Abb. 20: *In vitro*-Transkription der Konstrukte der LTR1.X.4.tatCAT-Serie.

Die zu analysierenden Konstrukte der LTR1.X.4.tatCAT-Serie ohne zusätzliches Exon (1.4), mit Exon 2 (1.2.4), mit Exon 3 (1.3.4) und mit beiden Exons (1.2.3.4) wurden *Sall* linearisiert und mit dem *MscI* linearisierten Konstrukt SV1.4tatCAT als Kontrolle zusammen mit NTPs, [α - 32 P] UTP und HeLa-Kernextrakt 60 min bei 30°C inkubiert. Die entstandenen *in vitro*-Transkripte (IVT) und das Transkript des Kontrollplasmids (kolVT) wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt, resuspendiert und im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Phospho-Imager.

3.1.6.2 Analyse der Capping-Effizienz in Abhängigkeit von den Leaderexonsequenzen

Um zu analysieren, ob möglicherweise ein unterschiedlich effizientes Cappen als Ursache für die beobachteten Exon-spezifischen RNA-Mengen in Frage käme, wurde die Capping-Effizienz in Zusammenarbeit mit Dr. Diego Zorio (University of Colorado, Health Science Center) untersucht. Dazu wurden HeLa-T4⁺-Zellen mit den Konstrukten LTR1.2.4tatCAT und LTR1.3.4tatCAT und einem Tat-Expressionsvektor kotransfiziert und nach 30 h die zytoplasmatische- und nukleäre-RNA isoliert. Mit Hilfe eines Cap-bindenden Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase und Initiationsfaktor 4E (GST-eIF4E) - wurden die gecappten Transkripte über ihre Bindung an Glutathion-Sepharose fraktioniert

und die Fraktionen der gecappten (c) und der ungecappten (u) RNA in einem „RNase protection-assay“ analysiert (Abb. 21A). Dieser Versuch erfolgte in 3-fach Bestimmung. Die Quantifizierung der Ratio von gecappten zu ungecappten Exon 2- bzw. Exon 3-haltigen Transkripten (c/u) ergab keine relevanten, Exon-abhängigen Unterschiede (Abb. 21B). Im Vergleich zur Capping Effizienz des GAPDH-Transkriptes, dessen Expression als interne Kontrolle als 1 festgelegt wurde, ergab sich eine Ratio gecappter zu ungecappter nukleärer RNA von $0,55 \pm 0,10$ (Exon 2) und $0,63 \pm 0,20$ (Exon 3) sowie von jeweils $0,62 \pm 0,09$ für die beiden zytoplasmatischen Proben. Die Signalintensität des jeweils dritten Versuchs war vermutlich aufgrund einer erhöhten Transfektionseffizienz erhöht, was jedoch die Ratio nur unwesentlich veränderte. Die unterschiedlichen Exon-abhängigen nukleären RNA-Mengen konnten somit auch nicht auf eine unterschiedliche Capping-Effizienz zurückgeführt werden. Unabhängig von der Gegenwart der Exons 2 oder 3 zeigte das Experiment im Vergleich zum Kontrolltranskript GAPDH eine reduzierte Ratio, die auf eine reduzierte Cappingeffizienz der HIV-1 Transkripte bzw. erhöhtes Decapping oder auf eine Stabilisierung ungecappter HIV-1 Transkripte hindeutet.

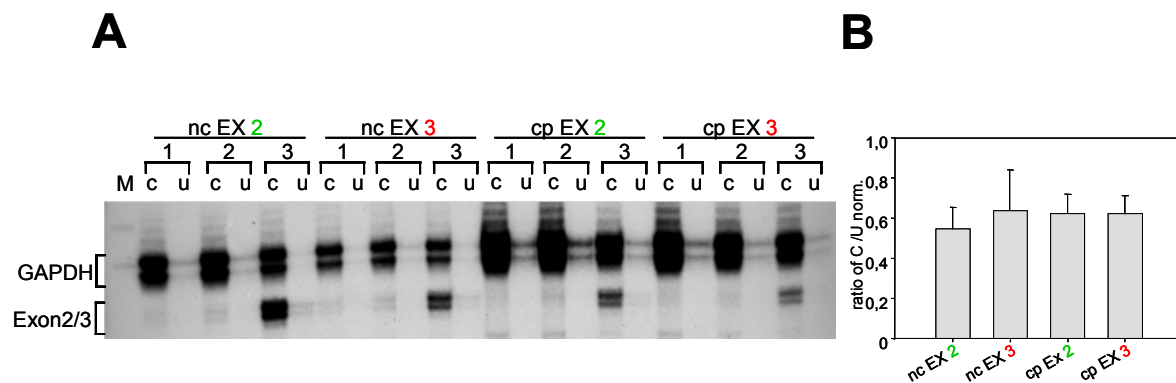


Abb. 21: Analyse der Cappingeffizienz. (A) 3 Ansätze nukleärer (nc) und zytoplasmatischer (cp) RNA aus mit LTR1.3.4 tatCAT und LTR1.2.4 tatCAT transfizierten Zellen wurden 1h bei 4°C mit GST-eIF4E inkubiert, welches die Cap-Struktur bindet und danach 1h mit GST-bindender Gluthationsepharose inkubiert. Dadurch erfolgte eine Fraktionierung der gecappten (c) und ungecappten (u) RNA. Es folgte ein RNase Protection Assay der so isolierten RNA Fraktionen mit radioaktiven Sonden gegen die HIV-1 Transkripte (LTR spezifische Sonde: Exon2/3) und Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interne Kontrolle. Die Quantifizierung der dreifach-Ansätze erfolgte mittels eines Phosphoimagers. Die in (B) gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert des Quotienten gecappter zu ungecappter RNA bezogen auf die Referenz GAPDH \pm Standardfehler, die Untersuchung erfolgte in Kooperation mit Dr. D. Zorio (Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado Health Sciences Center, USA).

3.1.6.3 Ein *in vitro* Degradationsassay zur Bestimmung der nukleären RNA-Stabilität

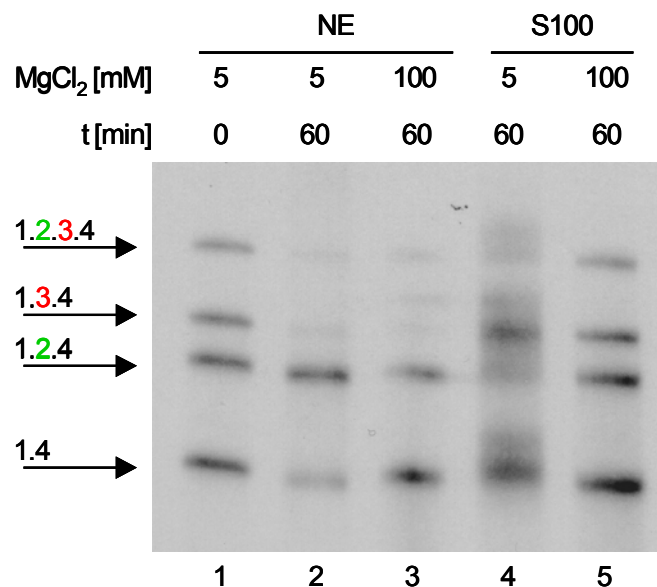
Da weder die Transkriptionsraten noch die Capping-Effizienz für die unterschiedlichen, Leaderexon-abhängigen nukleären RNA-Mengen verantwortlich waren, machte dies eine direkte, Sequenz-vermittelte Veränderung der nukleären RNA-Stabilität zur wahrscheinlichsten Ursache. Während *in vitro* Assays zur Bestimmung der Sequenz-vermittelter Stabilität zytoplasmatischer RNA bereits etabliert worden waren [92], war für die Stabilitätsanalyse nukleärer RNA bisher noch kein Versuchssystem beschrieben worden. Eine Rekonstituierung der nukleären RNA-Stabilität bzw. der RNA-Abbauwege *in vitro* könnte in diesem Zusammenhang den zugrundeliegenden Mechanismus einer Untersuchung zugänglich machen und eine Isolierung der relevanten Proteine über ihr Bindeverhalten oder ihre Funktion ermöglichen.

3.1.6.3.1 Eine *in vitro* Untersuchung des RNA-Abbaus abhängig von Magnesium-Konzentration und unterschiedlichen zellulären Fraktionen

Im Folgenden wurde ein Degradationsassay entwickelt, der die RNA-Stabilitäten im Kern widerspiegeln sollte. Die Arbeitshypothese war dabei, dass die *in vivo* beobachteten, unterschiedlichen RNA-Mengen mit Exon 2 und 3 sowie INS und INS^{GC} im Kern auf unterschiedlichen, nukleären mRNA-Stabilitäten basieren. Dafür wurden Plasmide der T71.X.4-Serie *SalI* linearisiert, und in Gegenwart von [α -³²P] UTP *in vitro* transkribiert und renaturiert. Das X steht für die alternativen, nicht kodierenden Exons 2 und 3. Die so entstandenen Transkripte entsprachen also den Spleißereignissen 1.4 , 1.2.4, 1.3.4 und 1.2.3.4. Gleiche Tscherenkow-Aktivitäten dieser vier *in vitro* Transkripte wurden vereinigt und in Anlehnung an *in vitro* Spleiß- und zytoplasmatische RNA-Degradationsprotokolle unter Zugabe von NTPs, Kreatinphosphat, DTT und MgCl₂ in HeLa Kern- bzw. S100-Extrakt inkubiert. Der zytoplasmatische S100-Extrakt diente dabei als Kontrolle für die Spezifität der Degradation als nukleäres Ereignis. Nach einer Stunde wurde die RNA aus dem Kernextrakt bzw. dem S100-Extrakt Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Gleiche Aktivitäten der RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die relativen Mengenverhältnisse der Transkripte bestimmt. Als weitere Kontrolle wurde die Mg²⁺-Konzentration variiert. Da gezeigt worden ist, dass höhere Mg²⁺-Konzentrationen zur

Ausbildung alternativer RNA-Sekundärstrukturen und zur Erhöhung der RNA-Stabilität führen können [215], wurde der RNA-Abbau sowohl unter physiologisch niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen (5 mM $MgCl_2$), als auch unter höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (100 mM $MgCl_2$) untersucht (Abb. 22). Nach einer einstündigen Inkubation in HeLa-Kernextrakt bei physiologisch niedriger Mg^{2+} -Konzentration zeigte sich abhängig von den Leaderexon-Sequenzen eine unterschiedlich starke Abnahme der Transkriptmengen (vgl. Abb. 22, Spur 1 und 2). Eine starke Transkriptabnahme war in Gegenwart der Sequenz des Exons 3 bzw. beider Exons zu beobachten, während die Sequenz des Exons 2 zu der im Vergleich höchsten Menge verbleibender RNA führte. Die verbliebene Menge an Transkripten zeigte demnach ähnliche Unterschiede, wie sie zuvor *in vivo* in der Kern-RNA-Fraktion beobachtet wurden (vgl. Abb. 22, Spur 2 mit Abb. 9B, C nc). In der Kontrolle mit unphysiologisch hoher Mg^{2+} -Konzentration wurde eine erhöhte RNA-Menge ohne zusätzliche Intronsequenzen beobachtet, was auf eine Stabilisierung der RNA des Referenzkonstrukts, vergleichbar der Wirkung von Exon 2 hindeutet (Abb. 22, Spur 3). In der zweiten Kontrolle zeigten sich nach Inkubation mit S100-Extrakt bei einer Konzentration von 5 mM Mg^{2+} reproduzierbar nur diffuse Banden (Abb. 22, Spur 4). Bemerkenswert war, dass hier die Anwesenheit von Exon 2 und Exon 2/3 zu weniger RNA als in Gegenwart von Exon 3 oder bei Fehlen zusätzlicher Exons führte. In S100-Extrakt

Abb. 22: RNA *in vitro* Degradation in Abhängigkeit von unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen und Zellfraktionen. Gleiche Aktivitäten der vier mit [α - 32 P]UTP markierten *in vitro* Transkripte mit unterschiedlichen nicht kodierenden Exons (1.4, 1.2.4, 1.3.4, 1.2.3.4) wurden gepoolt und mit Kernextrakt (Spur 1, 2 und 3) oder zytoplasmatischem S100-Extrakt (Spur 4 und 5) versetzt. Abgesehen von der Referenz, die das Mengenverhältnis mit 5 mM $MgCl_2$ zum Zeitpunkt $t=0$ darstellt (Spur 1), wurden ungecappte Transkripte jeweils 1 h mit Kernextrakt, NTPs, Kreatinphosphat, DTT und 5 mM $MgCl_2$ (Spur 2 und 4) oder 100 mM $MgCl_2$ (Spur 3 und 5) inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, gefällt und resuspendiert. RNA-Mengen gleicher Tscherenkow-Aktivitäten wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt.



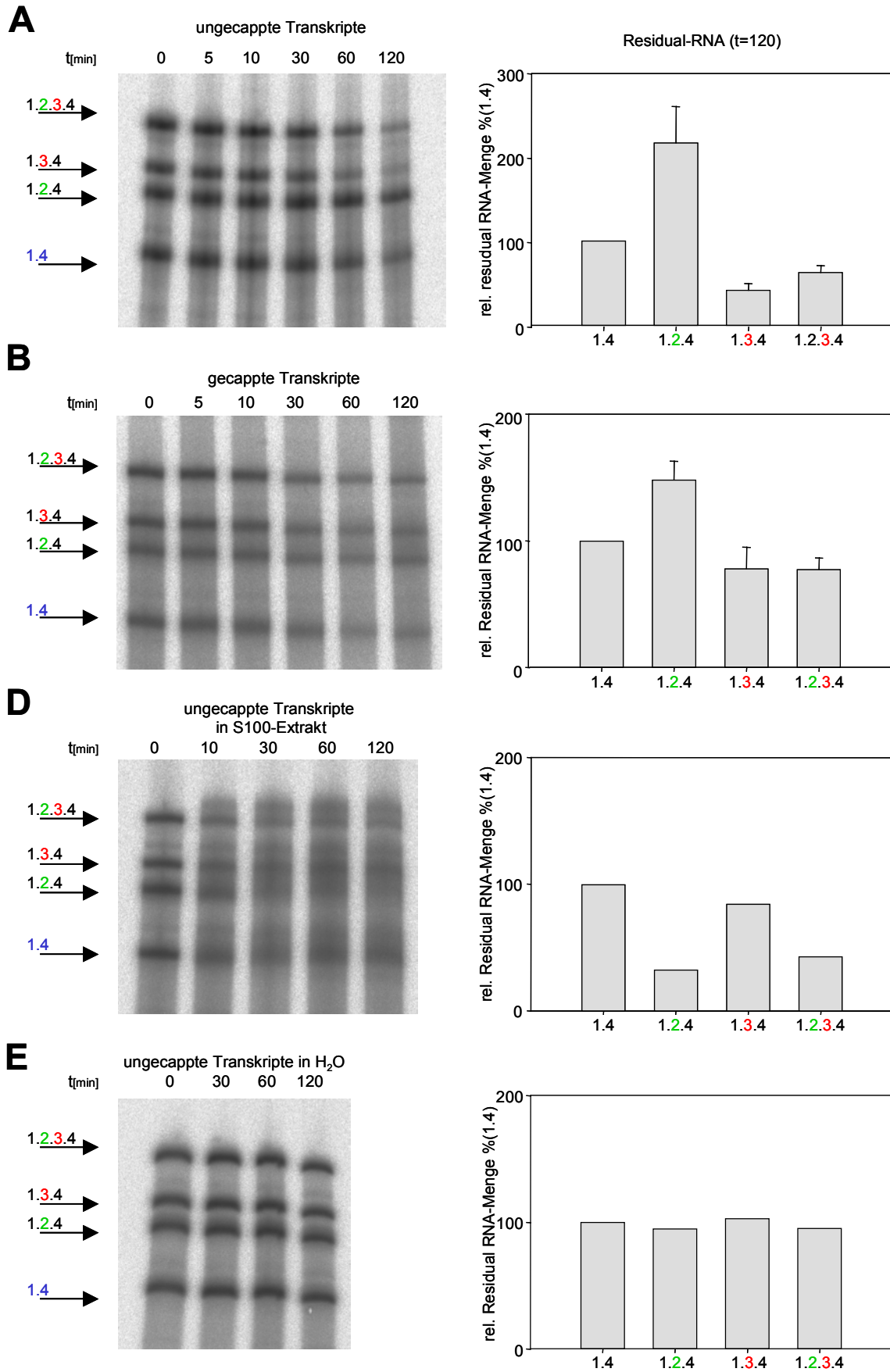
zeigten die Transkripte also ein komplementäres Degradationsverhalten zur nukleären Degradation (vgl. Abb. 22, Spur 2 und 4). Bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 100 mM waren bei nur geringer Degradation distinkte Banden aller Transkripte nachweisbar (Abb. 22, Spur 5).

Die für die Sequenzen der nicht kodierenden Exons charakteristischen RNA-Mengen konnten also in dem vorgestellten Assay in HeLa-Kernextrakt unter physiologisch-niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen reproduziert werden. Die Anwesenheit der Leaderexons kann demnach die Stabilität der Transkripte im Kern beeinflussen. Diese Kernspezifität korreliert mit den *in vivo* Befunden, wonach die Exonsequenzen auf Ebene der prä-mRNA wirkten (siehe 3.1.1.1). Der entwickelte Degradationsassay war demnach für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus geeignet.

3.1.6.3.2 Analyse der Leaderexonsequenzen *in vitro* im nukleären Degradationsassay

Da der nukleäre Degradationsassay zu residual-RNA-Mengen führte, die die zuvor beobachteten nukleären RNA-Mengen erklären könnten, wurde untersucht, wie die Sequenzen der nicht kodierenden Exons 2 bzw. 3 die Degradationskinetik beeinflussen und in wie weit das Cappen der Transkripte die sequenzspezifische Degradationsrate verändern kann.

In der Negativ-Kontrolle (Abb. 23 E) wurde die Degradationskinetik der Transkripte in Wasser statt Kernextrakt analysiert. Dabei waren keine Exon-spezifischen Unterschiede in der Degradation nachweisbar. Bei Inkubation in Kernextrakt (Abb. 23 A) zeigte sich nach 2 Stunden, bezogen auf das Transkript ohne zusätzliche nicht kodierende Leaderexonsequenz (1.4), eine Abnahme der RNA-Menge auf ca. die Hälfte in Gegenwart von Exon 3 (42 %) oder beider Exons (63 %) und eine relative Zunahme der RNA-Stabilität in Gegenwart des Exon 2 (210 %). Die Gegenwart beider Exons führte *in vitro* also nur zu einer partiellen Erhöhung der RNA-Menge, der destabilisierende Effekt des Exons 3 überwog in diesem Fall. Die *in vitro* gecappten Transkripte führten im nukleären Degradationsassay zu tendenziell vergleichbaren aber insgesamt geringeren Stabilitätsunterschieden als bei ungecappten Transkripten (Abb. 23 B, Exon 2: 150 %, Exon 3: 78 %, Exon 2/3: 82 % bezogen auf die 1.4-RNA-Menge). Auch im zeitlichen



C

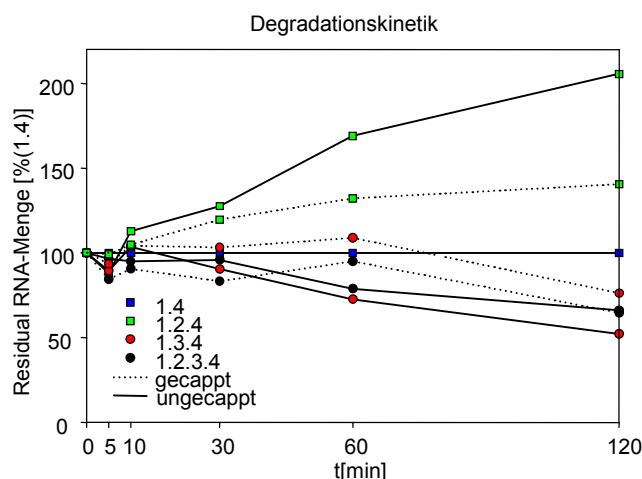


Abb. 23: Kern-Degradationsassay von *in vitro* Transkripten der Leaderexon-Serie.

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ markierte Transkripte der Plasmide pT71.4 (1.4), pT71.2.4 (1.2.4), pT71.3.4 (1.3.4) und pT71.2.3.4 (1.2.3.4) wurden mit Kernextrakt inkubiert. Nach 0, 5, 10, 30, 60 und 120 min Inkubation wurden Aliquots entnommen und in einer denaturierenden Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines FujiFilm BAS-1500 ^{32}P -Phospho imager und der Raytest Software Tina 2.09.

Die Menge der Residual-RNA nach 120 min wurde auf die entsprechende RNA-Menge des Referenzkonstruktes pT71.4 des gleichen Zeitpunktes normiert und für den Zeitpunkt $t=0$ als 100 % gesetzt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Die relative Änderung der RNA-Menge wurde sowohl für ungecappte (A) als auch für gecappte (B) Transkripte in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. (C) Quantifizierung der Degradationskinetik mittels der LumiAnalyst 3.1 Software (Roche) aus 3 verschiedenen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte, als Referenz diente jeweils die verbliebene Menge gecappter und ungecappter RNA des Konstrukts 1.4, die als 100 % festgesetzt wurde (nur mit solider Linie dargestellt). (D) Degradation der Konstrukte in Gegenwart von S100-Extrakt statt Kernextrakt. Die Aliquots wurden nach 0, 10, 30, 60, 120 min entnommen. (E) Kontrollexperiment mit Inkubation der ungecappten Transkripte in ddH_2O statt Kernextrakt bei dem Aliquots nach 0, 30, 60 und 120 min genommen wurden.

Verlauf der Degradation zeigten sich sequenzspezifische Unterschiede. Während für die ungecappten Transkripte eine Stabilisierung durch Exon 2 bereits nach 10 Minuten einsetzte, war eine deutliche Destabilisierung durch Exon 3 erst nach 30 Minuten mit gecappten Transkripten sogar erst nach 60 Minuten zu beobachten (Abb. 23C). Die Cap-Struktur stabilisiert damit die prä-mRNA, kann aber die sequenzabhängigen Stabilitätsunterschiede nicht nivellieren. Damit basiert die hier beobachtete RNA-Degradation auf einem durch die Cap-Struktur reduzierbaren Abbau, was beispielsweise über eine nukleäre 5'-3'-Exonukleaseaktivität erklärt werden könnte, die ein vorheriges Entfernen der Cap-Struktur benötigt.

Um den bereits beobachteten Unterschied des Degradationsverhaltens der verschiedenen RNAs in Kernextrakt und zytoplasmatischem S100-Extrakt (vgl. Abb. 22) quantitativ zu erfassen, wurden die Abbauraten der Transkripte auch mit zytoplasmatischem S100-Extrakt bestimmt (Abb. 23D). Hier reduzierte die Gegenwart des Exons 2 die RNA-Menge

auf ein Drittel (1.2.4, 33%) bzw. um mehr als die Hälfte (1.2.3.4, 43 %), während in Gegenwart des Exons 3 (1.3.4, 85 %) die RNA-Menge nur um rund ein Fünftel reduziert war. Im S100-Extrakt hatte also das Exon 2 einen degradierenden Effekt, während das Exon 3 keine Wirkung auf die RNA-Stabilität ausübte. Das unterschiedliche Degradationsverhalten in Kernextrakt und S100-Extrakt (vgl. Abb. 23A und D) zeigte, dass sich nukleäre und zytoplasmatische RNA-Degradation deutlich unterscheiden und dass das für die Sequenzen der Exons 2 und 3 charakteristische Abbauverhalten auf spezifischen, nur im Kernextrakt vorhandenen Faktoren basieren musste.

3.1.6.3.3 Analyse des destabilisierenden Elementes INS1 im nukleären Degradationsassay

Um zu untersuchen, ob der *in vitro* Degradationsassay von allgemeiner Bedeutung ist und auch die RNA-Stabilitäten anderer kernspezifisch wirkender Sequenzen widerspiegeln kann, wurde der Einfluss des INS1-Elements mittels des nukleären Degradationsassays analysiert. Dieses Element wurde verwendet, da sowohl von Schwartz *et al.* [269] als auch in der vorliegenden Arbeit (siehe 3.1.5, Abb. 19B) gezeigt worden war, dass auch das INS1-Element auf Ebene der prä-mRNA wirkt und zu einer reduzierten RNA-Menge im Kern führt. Als Kontrolle wurde die Mutation der INS-Sequenz mit höherem GC-Gehalt [269] ebenfalls im nukleären Degradationsassays untersucht. Dazu wurden *in vitro* Transkripte von INS und INS^{GC} in Gegenwart von NTPs, Kreatinphosphat, DTT, MgCl₂ mit HeLa-Kernextrakt inkubiert, Phenol/Chloroform aufgereinigt, präzipitiert und gleiche Tscherenkow-Aktivitäten der verbliebenen RNA im denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 24). Als Referenz diente wiederum das *in vitro* Transkript des Konstruktes pT71.4 ohne zusätzliche Leadersequenzen. Auch bei diesem Experiment wurden gecappte und ungecappte Transkripte verwendet, um eine Abhängigkeit des Degradationsverhaltens vom Cappen der RNA zu analysieren (Abb. 24A, B). Die Degradationskinetik zeigte für die INS-Sequenz eine starke Abnahme der RNA-Menge, die bereits nach 60 Minuten zum fast vollständigen Verlust der RNA führte. Durch die Gegenwart einer Cap-Struktur fiel die Degradation deutlich geringer aus (Abb. 24C, t=60 INS: 2,1 %; INS gecappt: 55,8 %). Es war jedoch keine zeitliche Verzögerung des Degradationsstarts nachweisbar, wie sie bei Exon 3 (Abb. 23) auffällig war. Für das Transkript INS^{GC} wurde wie *in vivo* (siehe 3.1.5)

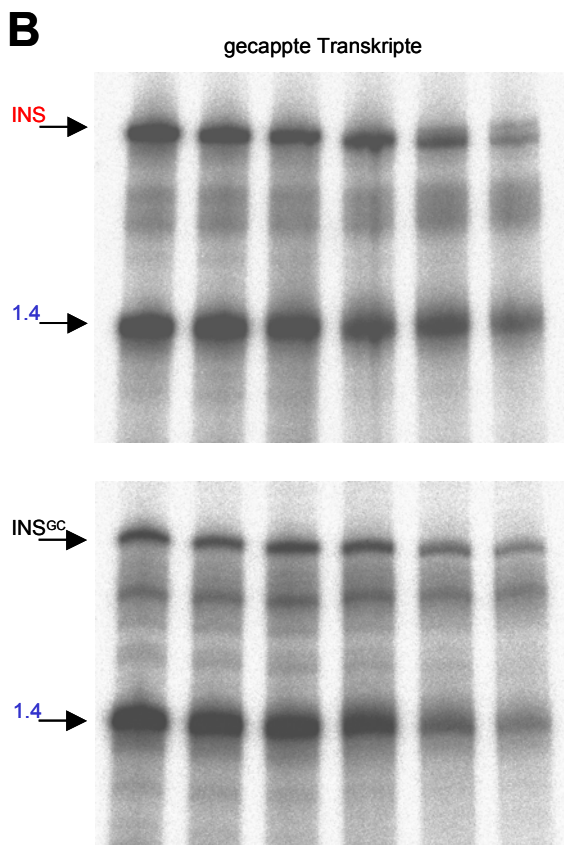
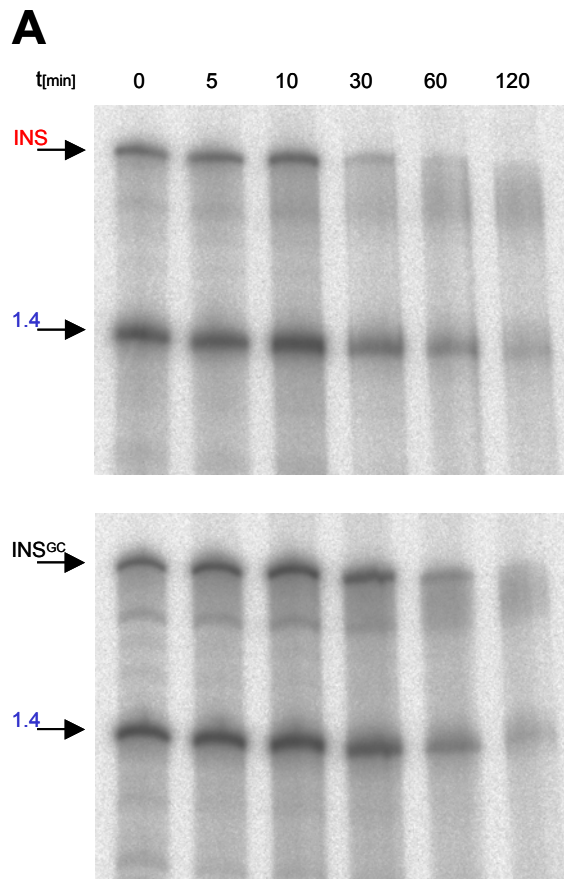
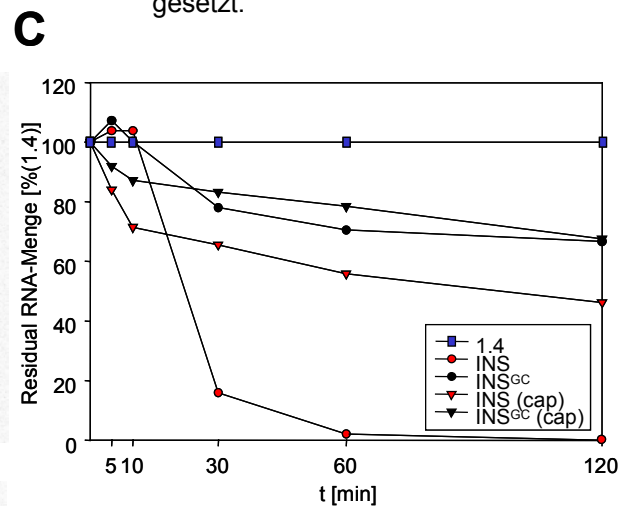


Abb. 24: Nukleärer Degradationsassay mit *in vitro* Transkripten der INS- und der INS^{GC}-Sequenz.

Gleiche Tscherenkow-Aktivitäten der [α -³²P]UTP- markierten Transkripte der linearisierten Plasmide pSVT7INS (INS) oder pSVT7INS^{GC} (INS^{GC}) und des Referenz-Plasmids pT71.4 (1.4) wurden vereinigt, mit Kernextrakt für 0 bis 120 Minuten inkubiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurden gleiche Aktivitäten im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Bandenintensitäten wurden im Phosphoimager FujiFilm BAS-1500 und unter Nutzung der Lumianalyst Software 3.1 (Roche) ermittelt. Die relative Abnahme der RNA wurde sowohl für (A) ungecappte als auch für (B) gecappte Transkripte ermittelt. (C) Grafische Darstellung der über Quantifizierung ermittelten relativen Residual-RNA-Mengen in Abhängigkeit von der Zeit. Die RNA-Menge wurde auf die entsprechende RNA-Menge des Referenzkonstruktes pT71.4 des gleichen Zeitpunktes normiert und für den Zeitpunkt t=0 gleich 100 % gesetzt.



Residual-RNA (t=60)	1.4	INS	INS ^{GC}
Ungecappt (A)	100	2.10	70.49
Gecappt (B)	100	55.84	78.48

nur eine geringe Abnahme der RNA-Menge im Degradationsassay beobachtet, wobei die Cap-Struktur keinen Unterschied mehr ausmachte (Abb. 24C, $t=60$ INS^{GC}: 70 %; INS^{GC} gecappt: 78 %). Das Cappen stabilisiert also die instabile INS-RNA stärker als die stabilere INS^{GC}-RNA.

Die Degradation in Kernextrakt konnte also die *in vivo* beobachteten RNA-Stabilitätsunterschiede zwischen Instabilitätselement INS und dessen GC-reicher Mutation *in vitro* rekonstituieren und führte insbesondere bei ungecappten Transkripten zu einer raschen, sequenzabhängigen Degradation. Die Cap-Abhängigkeit der INS-vermittelten RNA-Instabilität könnte beispielsweise durch einen 5'-3'-exonukleolytischen Abbau, oder die Rekrutierung stabilisierender Faktoren über die Cap-Struktur erklärt werden. Da der *in vitro* Kern-Degradationsassay auch die RNA-Instabilität des INS1 *in vitro* reproduzieren konnte, ist anzunehmen, dass der Assay generell nukleäre RNA-Stabilitätsunterschiede, die auf posttranskriptionalen, transportunabhängigen Mechanismen beruhen, detektierbar macht.

3.1.6.4 Analyse der Interaktion von Proteinen des Kernextrakts mit den Leadersequenzen

Der nukleäre *in vitro* Degradationsassay zeigte eine Rekonstituierung der *in vivo* beobachteten, unterschiedlichen RNA-Stabilitäten der Konstrukte mit Exon 2 und Exon 3 sowie der INS-Konstrukte. Diese Unterschiede in der RNA-Stabilität wurden demnach durch sequenzabhängige Interaktionen von Komponenten des Kernextrakts mit der RNA verursacht. Um die Bindung von Kernproteinen an die RNA zu analysieren wurden UV-„crosslink“ bzw. Quervernetzungs- und „Pull-down“ bzw. Affinitätspräzipitations-Experimente durchgeführt. Diese Experimente erlaubten zum Einen eine erste Analyse der an der RNA-Degradation beteiligten Proteine im Immunoblot. Zum Anderen sollten sie als Grundlage zur Isolierung und Sequenzierung weiterer möglicherweise unbekannter RNA-bindender Proteine dienen.

3.1.6.4.1 Nachweis der Protein-RNA-Interaktion im Kernextrakt über UV-Quervernetzung

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen lag eine sequenzspezifische Bindung nukleärer Proteine an die Leaderexonsequenzen nahe, die die Stabilisierung oder Degradation der RNA vermitteln. Zum Nachweis differenzieller Proteinbindemuster wurden radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte mit Kernextrakt inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels UV-Strahlung kovalent an die RNA gebunden. Nach einem RNase-Abbau wurden die Ansätze in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die an diese Sequenzen bindenden Proteine konnten aufgrund der verbliebenen kovalent gebundenen RNA-Reste mittels Röntgenfilm-Exposition detektiert werden (Abb. 25A und B). Dabei zeigten sich gemeinsame Banden (Abb. 25A, Pfeile bei ca. 70, 54 und 42 kDa) aber auch ein sequenzspezifisches Muster von gebundenen Proteinen unterschiedlicher

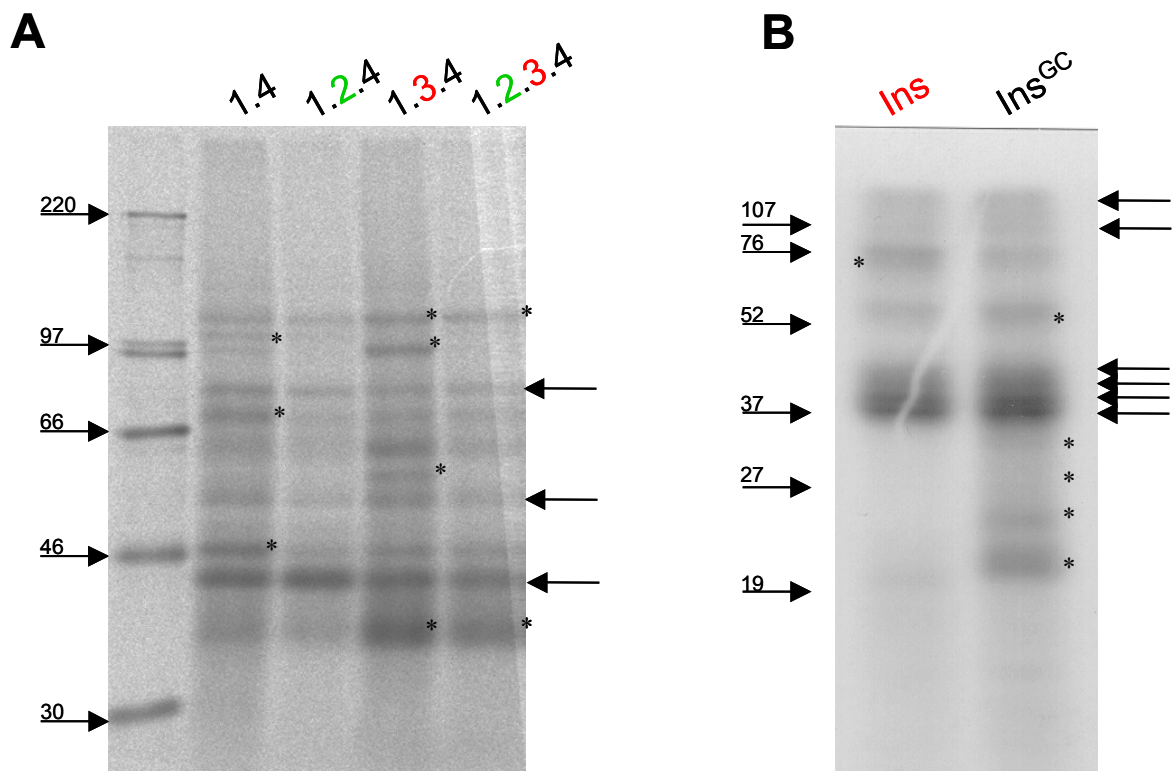


Abb. 25: Analyse des Protein-Bindungsmusters der Sequenzen Exon 2, Exon 3 und Exon 2/3 (A) und der Sequenzen INS1 und INS1GC(B). [α - 32 P]UTP markierte Transkripte der Plasmide pT71.4 (1.4), pT71.2.4 (1.2.4), pT71.3.4 (1.3.4) und pT71.2.3.4 (1.2.3.4) sowie pSVT7INS (INS) und pSVT7INS^{GC} (INS^{GC}) wurden unter Spleißbedingungen inkubiert und anschließend für 20 Minuten auf Eis mittels UV-Bestrahlung kovalent mit den an ihnen gebundenen Proteinen verbunden. Nach einem RNase-Abbau wurden die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und das Muster, der durch RNA-Bindung markierten Proteine, über Röntgenfilmexposition ermittelt. Pfeile markieren unspezifische Banden, Sterne spezifische bzw. präferenzielle Banden.

Größe (*). So waren deutliche Banden von ca. 48 kDa, 70 kDa und 100 kDa für das Transkript ohne zusätzliche Leaderexons nachweisbar. Nach Insertion der Leaderexons waren diese nicht oder nur schwächer zu beobachten. Für Exon 2 waren keine spezifischen Banden sichtbar. Banden von ca. 97 und 56 kDa waren in Gegenwart des Exons 3 zu beobachten. Banden von ca. 38 kDa und ca. 110 kDa zeigten sich in Gegenwart von Exon 3 und Exon 2/3, wobei die Bande von 38 kDa eine besonders hohe Signalintensität aufwies. Diese Bande bei ca. 38 kDa könnte möglicherweise von hnRNPA1 stammen, einem 32-37 kDa Phosphoprotein, dessen Bindung im Rahmen der Spleißregulation an Exon 3 bereits beschrieben wurde [19]. Außerdem laufen in diesem Größenbereich neben vielen spleißregulatorischen SR-Proteinen auch die Proteine AUF1 (hnRNP D) und HuR, die durch Bindung an AU-reiche Elemente die RNA-Stabilität beeinflussen können [70;199].

Auch beim Vergleich der INS- und INS^{GC}-Transkripte zeigten sich neben Banden von ca. 100-120 kDa auch Banden zwischen 38-45 kDa (Abb. 25B, Pfeile). Diese Signale traten hier allerdings für beide Transkripte auf. Außerdem waren Banden bei ca. 76 kDa für das INS-Transkript und bei ca. 52 und < 30 kDa für das INS^{GC}-Transkript zu detektieren (Abb. 25B, *). Die unterschiedlichen Proteinbindungsmuster weisen darauf hin, dass die sequenzspezifische Bindung von Kern-Proteinen als Ursache für die *in vivo* beobachteten sequenzabhängigen nukleären RNA-Mengenunterschiede und die *in vitro* beobachteten sequenzabhängigen Unterschiede der RNA-Degradation in Frage kommt. Allerdings können bei UV-Quervernetzungs-Untersuchungen nicht nur spezifisch bindende Proteine, sondern auch Proteine in räumlicher Nähe zur RNA gebunden werden. Um dies von den spezifischen Bindungen zu trennen, wurde das Proteinbindungsmuster zusätzlich mittels Affinitätspräzipitation untersucht.

3.1.6.4.2 Nachweis der Protein/RNA-Interaktion im Kernextrakt über Affinitätspräzipitation

Da die im UV-„Crosslink“ nachgewiesenen, bindenden Proteine einer Charakterisierung nicht direkt zugänglich waren, wurde die Proteinbindung an die verschiedenen alternativen HIV-1 Leadersequenzen sowie an mutierte Leadersequenzen mittels eines „Pull-down“-Experiments untersucht. Dazu wurden die INS-Sequenz und Exon 3 zusammen mit den entsprechenden, den GC-Gehalt erhöhenden, Mutationen und die authentischen HIV-1

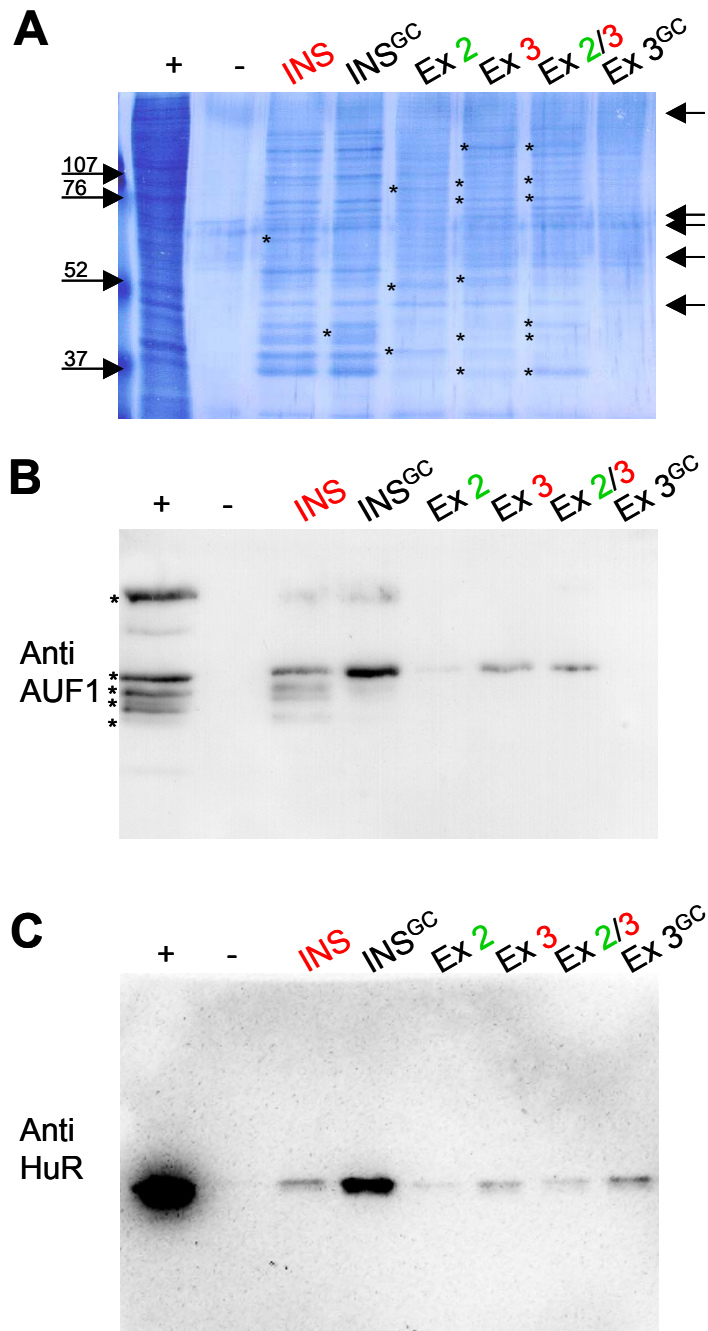
Leaderexonsequenzen analysiert. Die Biotin-markierten *in vitro* Transkripte wurden in Kernextrakt inkubiert und zusammen mit den an sie gebundenen Proteinen mittels Streptavidin-gekoppelter Sepharose isoliert. Die gebundenen Proteine wurden nach stringenten Waschschritten mit Gelladepuffer eluiert - und im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Mittels einer reversiblen Zink-Färbung wurde das Proteinbindungsmuster detektiert (Abb. 26A). Als Positivkontrolle diente Kernextrakt (+), als Negativkontrolle eine Inkubation von Streptavidinbeads ohne *in vitro* Transkripte im Kernextrakt (-).

Ebenso wie bei der zuvor gezeigten UV-Quervernetzung, war auch hier ein sequenzabhängiges Bindungsmuster (Abb. 26A, *) neben wenigen unspezifischen Banden, die auch in der Negativkontrolle auftraten (Abb. 26A, 55 und 70 kDa Pfeile) und einer großen Anzahl gemeinsamer Banden, zu beobachten. So waren spezifische Banden für das INS-Element bei ca. 65 kDa und für die INS^{GC}-Mutation bei ca. 43 kDa zu sehen. Der Vergleich von Exon 2 und 3 Sequenzen zeigte Proteinbindungen an Exon 2 von Proteinen mit ca 80 kDa, 52 kDa und 40 kDa. Für das Exon 3 wurde die spezifische Bindung eines Proteins mit 54 kDa, für die Exons 2/3 die Bindung eines Proteins mit 44 kDa beobachtet. Darüber hinaus banden Proteine mit 150, 100, 76, 42 und 37 kDa bevorzugt sowohl an das Exon 3, als auch an die Exons 2/3. An Exon 2/3 zeigte sich zusätzlich die Bindung eines Proteins mit ca 46 kDa. Als besonders prominente Bande war sowohl in den UV-Quervernetzungen als auch über Affinitätspräzipitation eine ca. 37-38 kDa Bande bei Gegenwart von Exon 3 bzw. Gegenwart von Exon 2/3 zu beobachten. Eine weitere Bande, die in beiden Versuchen auf das gleiche Protein zurückzuführen sein könnte, ist die 54 bzw. 56 kDa Bande in Gegenwart von Exon 3. Die ansonsten geringe Übereinstimmung zwischen UV-„crosslink“ und „Pull-down“ könnte auf zusätzlichen, insbesondere bei UV-Quervernetzungsanalysen oft unspezifisch gebundenen Proteinen basieren. Die insgesamt höheren Signalintensitäten der an die INS- bzw. INS^{GC}-Sequenz-bindenden Proteine sind wahrscheinlich auf die größere Länge der Transkripte zurückzuführen.

Die durch die Affinitätspräzipitation isolierten Protein-Mengen waren in der 1-D Auftrennung und in der Menge für eine Proteinanalyse unzureichend. Aus diesem Grund werden zur Zeit in Zusammenarbeit mit M. Hipp 2-D-Gelelektrophoresen etabliert. Um unabhängig von der Proteinanalyse mögliche relevante Unterschiede im Proteinbindungsmuster der verschiedenen Transkripte zu charakterisieren, wurden die

Abb. 26: Analyse des Protein-Bindungsmusters.

Biotin-markierte *in vitro* Transkripte der Plasmide pSVT7INS (INS), pSVT7 INS^{GC} (INS^{GC}), pT7Exon2 (Ex 2), pT7Exon3 (Ex 3), pT7Exon2/3 (Ex 2/3) und pT7Exon3^{GC} Ex (3^{GC}) wurden 30 Minuten in Gegenwart von Kernextrakt zusammen mit ATP, Kreatinphosphat, MgCl₂, Rnasin, DTT und tRNA inkubiert, anschließend für 60 Minuten bei 4°C mit Streptavidin-Beads inkubiert und nachfolgend gewaschen. Als Kontrolle der Spezifität dient eine Reaktion ohne Biotin-markierte RNA (-). Als Positivkontrolle (+) wurde unbehandelter Kernextrakt aufgetragen. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und durch Zinkfärbung dargestellt. **(A)** Pfeile markieren unspezifische Banden, Sterne spezifische bzw. präferenzielle Banden. Nach Entfärbung wurden die Proteine geblottet und mit Antikörpern gegen AUF1 (Kaninchen, polyklonal, Upstate Biotechnology) **(B)** und HuR (Maus, monoklonal, Santa Cruz Biotechnology) **(C)** und Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörpern (AP-Biotech) auf eine sequenzspezifische Bindung dieser Proteine analysiert.



Affinitätspräzipitations-Fractionen mittels Immuno-Blot auf die Interaktion mit Proteinen untersucht, die bereits für ihre Bindung an AU-reiche RNA-Sequenzen im Rahmen der RNA-Stabilitätsuntersuchungen beschrieben wurden.

3.1.6.4.3 Nachweis der AUF1-RNA Interaktion mittels Western Blot

Die durch die Affinitätspräzipitation erhaltenen Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern gegen AUF1 (hnRNP D) inkubiert. Diese Proteinfamilie steht im Zusammenhang mit der RNA-Degradation AU-reicher Elemente. Es zeigten sieben spezifische Banden in der Positivkontrolle (Kernextrakt), von denen fünf in Gegenwart der INS-Sequenz zu beobachten waren (Abb. 26B, mit * markiert). Bisher ist bekannt, dass AUF1 in vier alternativ gespleißten Formen zwischen 45 und 37 kDa auftritt, was die unteren vier Banden erklärt. In Gegenwart der INS^{GC}-Sequenz tritt von diesen vier Banden die oberste Bande mit einer im Vergleich zur INS-Sequenz deutlich höheren Intensität auf. Diese Bande zeigte sich ebenfalls in Abhängigkeit von den Exons 2 und 3, wobei eine geringe Bindung an das Exon 2 und eine stärkere Bindung an das Exon 3 und die Exons 2/3 zu beobachten war. Eine Erhöhung des GC-Gehalts im Exon 3 verhinderte die Proteinbindung. Bei den Leaderexonsequenzen korreliert die Signalintensität des detektierten Proteins mit der Instabilität der untersuchten Sequenzabschnitte. Da dieses Protein als ein im Rahmen der RNA-Destabilisierung bindendes Proteins charakterisiert worden war, lässt in diesem Fall die Bindung einen funktionellen Zusammenhang als wahrscheinlich erscheinen. Die Bindung an INS und INS^{GC}-Sequenzen scheint komplexer. Falls die Bindung von AUF1 hier ursächlich mit der RNA-Stabilität gekoppelt sein sollte, könnte eine Multimerisierung wie sie für die hnRNP-Proteine allgemein zu beobachten ist [157], für die AUF1-Wirkung eine zusätzliche Rolle spielen. Dabei könnten zunächst die kleineren AUF1 Isoformen aufgrund ihrer höheren ARE-Bindungsaffinitäten [303] zunächst die INS-Sequenzen binden und damit die Bindung des hochmolekularen p45 reduzieren. Die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen stimmen darin überein, dass diese niedermolekularen AUF1-Formen stärker zur Degradation beitragen als die hochmolekulare p45 Form [196;248;262]. sodass die Bindung kleinerer Protein-Isoformen die Destabilisierung stärker begünstigen könnte, als die alleinige Bindung der größeren Isoform.

3.1.6.4.4 Nachweis der HuR/RNA-Interaktion mittels Western Blot

Um zu untersuchen, ob das im Rahmen der Stabilisierung von RNA gefundene 36 KDa Protein HuR an die unterschiedlichen Leadersequenzen bindet, wurden Affinitäts-Präzipitationen im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mittels eines HuR

Antikörpers detektiert (Abb. 26C). Die Bindung von HuR, welches die RNA vor Degradation schützt [83;238], zeigt eine bevorzugte Bindung an die INS^{GC}-Sequenz, die wesentlich stärker war als die Bindung an die INS-Sequenz. Die Bindung an die Exons 2 und 3 zeigte nur geringe Unterschiede, wobei die Bindung an Exon 3^{GC} am stärksten war. Mit Ausnahme der im Vergleich zu Exon 3 schwachen Bindung von HuR an Exon 2 korrelierte die Bindung von HuR nicht mit dem AU-Gehalt der untersuchten RNA-Sequenzen. Dies ist erstaunlich, da im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass HuR an AU-reiche Sequenzen bindet. In den hier gemachten Experimenten zeigte sich dagegen eine stärkere Bindung an GC-reiche Sequenzen (Exon 3 vs. Exon 3^{GC} und INS vs. INS^{GC}). Mit Ausnahme des Exons 2, das eine im Vergleich zu Exon 3 geringere HuR-Bindung zeigte, korrelierte damit die Bindung von HuR mit der relativen Stabilität der untersuchten RNA-Sequenzen.

3.2 Ein kurzer offener Leserahmen im Leader kann die Expression 3'-wärts liegender Leserahmen stimulieren

Alternativ gespleißte HIV-Leadersequenzen können nicht nur posttranskriptional die prä-mRNA-Stabilität (siehe 3.1) beeinflussen, die Variation des Leaders ist auch für die Translation essenziell. Da allgemein davon ausgegangen wird, dass die HIV-1 Translation Cap-abhängig erfolgt, müssen die verschiedenen Leserahmen (ORFs, open reading frames) in einen für die Translation förderlichen Kontext gebracht werden. Tatsächlich kann durch alternatives Spleißen jeder HIV-1-Leserahmen — mit Ausnahme des *env*-ORFs — in die Position des primären Leserahmens am 5'-Ende des Transkripts gelangen. Weiterhin ist gezeigt worden, dass 3'-wärts auf HIV-1 Transkripten liegende Leserahmen nur dann zusätzlich abgelesen werden konnten, wenn der primäre Leserahmen nur ineffizient translatiert wird. So erlaubte die ineffiziente Initiationsstelle des *rev*- oder *vpu*-Leserahmens auch die Translation weiter 3'-wärts liegender Leserahmen durch „leaky scanning“. Umgekehrt inhibierte die effiziente Initiationsstelle des *tat*-Leserahmens die Translation an den 3'-wärts folgenden Leserahmen [273].

Das Konstrukt LTR-E/X-pA enthält den 3'-Bereich des HIV-1 Genoms mit den *tat*-, *rev*-, *vpu*- und *env*-ORFs unter der Kontrolle des HIV-Promotors im LTR. Da der Hauptspleißdonor 1 nicht mehr vorhanden ist, kann im 5'-Leader nicht das HIV-spezifische alternative Spleißen erfolgen. Mit *tat* als primärem Leserahmen, wäre demnach keine Expression von Rev und Env zu erwarten. Dieses, im Rahmen der Analyse der Env-Expression klonierte Konstrukt [265], zeigte dennoch eine effiziente Env-Expression, die bei CD4-positiven Zellen in der Zellkultur zur Syncytienbildung führte (Abb. 27B, rechts) und daher physiologisch relevant sein dürfte. Eine genauere Begutachtung der Sequenzen 5'-wärts des *tat*-Startkodons zeigte, dass bei der Klonierung durch die Ligation zweier Restriktionsfragmente zufällig ein zusätzliches Startkodon im Leaderbereich zwischen LTR und *tat*-Leserahmen entstanden war. Dieses Konstrukt — aufgrund seines upstream open reading frame (uORF) LTR-E/X-pA uORF genannt — besitzt damit 5'-wärts der HIV-1 *tat*-, *rev*-, *vpu*- und *env*-Leserahmen einen zusätzlichen, artifiziellen Leserahmen mit einer Länge von 51 nt (Abb. 27A). Die Mutation dieses zusätzlichen AUG zu CCG in dem Konstrukt LTR-E/X-pA Δ uORF (Abb. 27A) reduzierte die Env-Expression sehr deutlich, wie auch anhand der Syncytienbildung zu beobachten war (Abb. 27B).

Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Gegenwart des kleinen 5'-wärts gelegenen, offenen Leserahmens (uORF) innerhalb des Leaders die translationale Inhibition durch den tat-Leserahmen aufheben kann und die Translation der weiter 3'-wärts liegenden Leserahmen in der polycistronischen mRNA soweit stimuliert, dass sogar das vierte Cistron — in diesem Fall *env* — translatiert werden kann. Da es im viralen Kontext ebenfalls vorkommen kann, dass uORFs im Leader auftreten, wurde im Folgenden untersucht, ob hier ein bei HIV bisher nicht beschriebener Translationsmechanismus zugrunde liegt, der auch für die Translation der HIV-1-mRNAs von Bedeutung sein könnte.

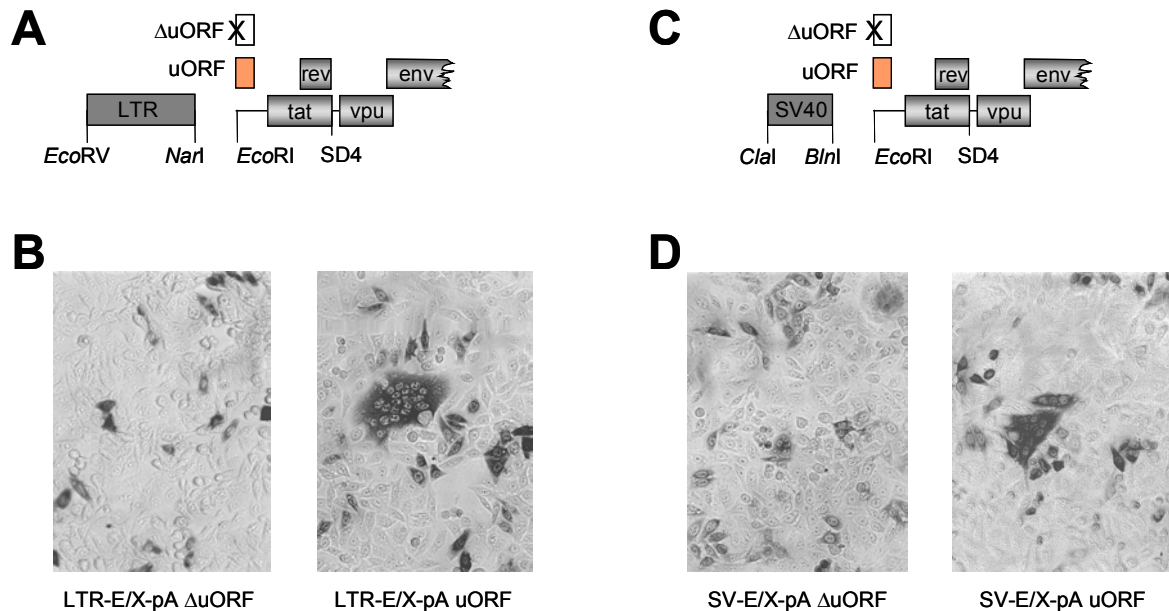


Abb. 27: Env-Expression von einer polycistronischen mRNA in Anwesenheit eines uORFs. (A, C) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Gezeigt sind die unterschiedlichen Promotoren (dunkelgrau, A: HIV-1-Promotor im LTR B: SV40-Promotor), sowie die offenen Leserahmen: HIV-1 ORFs (grau), artifiziereller uORF (orange). Die Abwesenheit des uORFs ist durch ein weißes Rechteck dargestellt (Δ uORF), die Mutation des Startkodons zu CCG wird durch das X symbolisiert. (B, D) Syncytienbildung in Abhängigkeit von der Gegenwart des uORFs. HeLa-T4⁺ lacZ-Zellen wurden mit LTR-E/X-pA Δ uORF und LTR-E/X-pA uORF (B), sowie den Konstrukten SV-E/X-pA Δ uORF und SV-E/X-pA uORF (D) transfiziert und auf Syncytienbildung und Tat-abhängige β -Galaktosidase-Färbung untersucht. Gefärbte Zellen zeigten die Expression von Tat durch die Stimulation des stabil integrierten β -Galaktosidase-Gens unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors. Die Syncytienbildung resultiert aus der Bindung von Env an CD4-Rezeptoren benachbarter Zellen. Die Anzahl und Größe der Syncytien korreliert mit der zellulären Env-Expression.

3.2.1 Die uORF vermittelte Expressionssteigerung 3'-wärts positionierter Leserahmen ist Promotor-unabhängig

Um zu untersuchen, ob die uORF-vermittelte Expression 3'-wärts liegender Cistrons auch in Gegenwart eines nicht Tat-induzierten Promotors zu beobachten ist, wurde der HIV-1 Promotor der beiden Konstrukte LTR-E/X-pA uORF und LTR-E/X-pA Δ uORF gegen einen SV40-early-Promotor ausgetauscht (Abb. 27C, SV-E/X-pA uORF, SV-E/X-pA Δ uORF). Auch hier zeigte das Konstrukt mit zusätzlichem uORF Syncytienbildung (SV-E/X-pA uORF, Abb. 27D, rechts), während das Vergleichskonstrukt ohne uORF keine Syncytienbildung induzierte (SV-E/X-pA Δ uORF, Abb. 27D). Die uORF-vermittelte Env-Expression war also unabhängig von der Wahl des Promotors zu beobachten. Damit zeigte sich, dass die beschriebene Inhibition der Translation von *rev* und *env* durch das effizient genutzte *tat*-AUG nicht für alle HIV-1 mRNAs zutreffen muss.

3.2.2 Verschiedene Eigenschaften des uORFs modulieren die Wirkung auf 3'-wärts liegende Leserahmen

Um zu analysieren, welche Eigenschaften eines uORFs das Translationspotential einer polycistronischen mRNA beeinflussen können, wurden mehrere Konstruktsreihen mit Unterschieden in der uORF-Länge (3.2.2.1), im intercistronischem Abstand (3.2.2.2) oder in der uORF-AUG-Stärke (3.2.2.3) kloniert und die Expression des ersten (*tat*) und des zweiten (*rev*) Leserahmens 3'-wärts des uORFs untersucht.

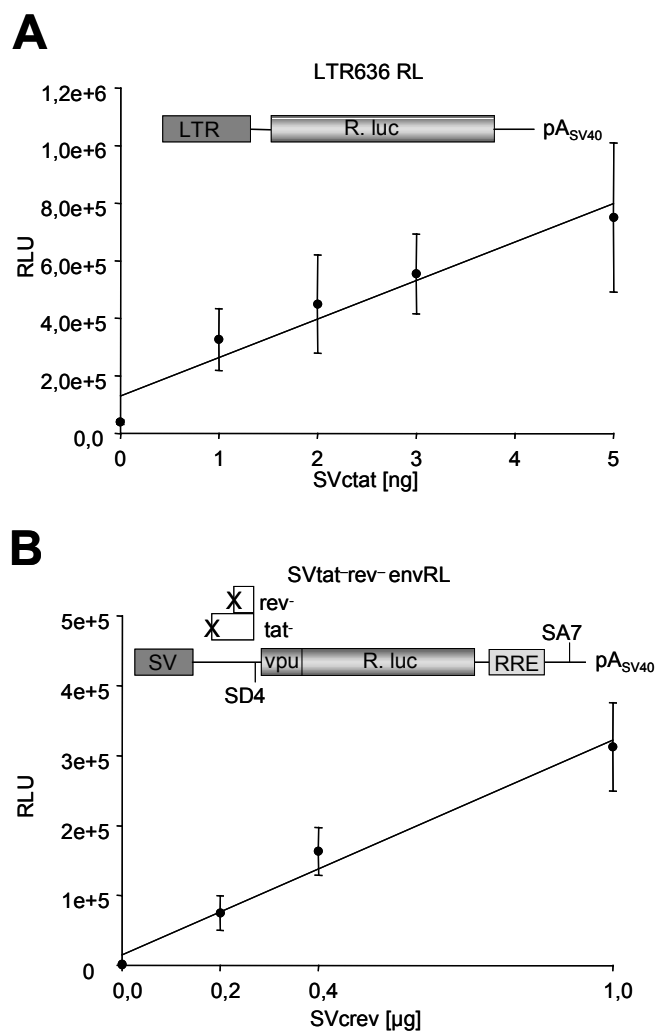
Da für die Tat- und Rev-Quantifizierung keine adäquaten Antikörper zur Verfügung standen, wurden zwei unterschiedliche funktionelle Reporterassays etabliert, die auf einer zur Menge des exprimierten Tat- bzw. Rev-Proteins proportionalen Expression des Luziferasegens aus *Renilla reniformis* beruhen. Das Tat-reaktive Reporterplasmid (Abb. 28A, LTR636RL) enthält die HIV-1 LTR-Sequenz 5'-wärts des Luziferasegens und am 3'-Ende ein SV40-Polyadenylierungssignal. In Abhängigkeit von der in *trans* gebildeten Tat-Menge kommt es zur Bindung von Tat an die TAR-Region am 5'-Ende des Transkripts und damit zur effizienten Transkription des Luziferasegens, während in Abwesenheit von Tat nur ein basaler Transkriptionslevel nachweisbar ist. Das Rev-reaktive Reporter-Plasmid (Abb. 28B, SVtat⁻rev⁻envRL) enthält einen SV40-Promotor und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Da keine Bindestelle für Tat vorhanden ist, erfolgt die

Transkription Tat-unabhängig. In diesem Konstrukt ersetzt das *Renilla reniformis* Luziferase-Reportergen die gp120-Sequenz 5'-wärts des RREs, liegt also im Intron, das durch die 5'-Spleißstelle SD4 und die 3'-Spleißstelle SA7 begrenzt wird. Die Leserahmen von *tat* und *rev* können auf Grund von Punktmutationen in den Startkodons nicht translatiert werden. In Abhängigkeit von der in *trans* vorhandenen Rev-Menge kommt es zur Bindung von Rev an das RRE der Reporter-Gen-Transkripte und dadurch zum Export ungespleißter RNA in das Zytoplasma. Dadurch kann der im Intron liegende Leserahmen der *Renilla reniformis*-Luziferase translatiert werden.

Um die funktionelle Reaktivität der Tat- und Rev- Expressionsassays zu ermitteln, wurden HeLa-T4⁺-Zellen mit 1 µg des Tat-Reporterplasmids LTR636RL und 1 bis 5 ng des Tat-Expressionsplasmids SVctat (Abb. 28A) bzw. mit 1 µg des Rev-Reporterplasmids (SVtat⁻

Abb. 28: Reporterplasmide zur Messung der Tat- und Rev-Expression der uORF-Konstrukte.

Normierte Renilla Proteinexpression in HeLa-T4⁺-Zellen 48 h nach Transfektion. Im oberen Teil der Abbildungen sind die Reporterplasmide LTR636RL (A) und SVtat⁻rev⁻envRL (B) dargestellt. Die Rechtecke symbolisieren den Promotor (dunkelgrau), sowie die Leserahmen (hellgrau), weiße Rechtecke stellen das Fehlen eines Leserahmens aufgrund einer Mutation im Startkodon (X) dar. (A) Für die Analyse der Tat-Reaktivität wurden HeLa- T4⁺- Zellen mit dem Tat-Reporterplasmid (LTR636RL) und 0, 1, 2, 3 oder 5 ng des Tat-Expressionsplasmids SVctat kotransfiziert. Nach 48 h wurde die Renilla-Luziferase-Expression in einem Biolumineszenzassay (Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. (B) Analyse der Rev-Reaktivität von Zellen, die mit dem Rev-Reporterplasmid (SVtat⁻rev⁻envRL) und 0, 0,2, 0,4 oder 1 µg des Rev-Expressionsplasmids SVcrev transfiziert worden sind. Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei Transfektionen ± Standardfehler.



rev⁻envRL) und 0,2 bis 1 µg des Rev-Expressionsplasmids SVcrev transfiziert (Abb. 28B). Das kotransfizierte Plasmid pGL3-Control diente in beiden Assays der Normierung der Experimente auf die Transfektionseffizienz. Die Grafiken zeigen einen proportionalen Anstieg der Reporterexpression (Renilla-Luziferase) in Abhängigkeit von der Menge kotransfizierter Tat- bzw. Rev-Expressionsvektoren. Dies erlaubt den Einsatz der Reportergenkonstrukte für die Quantifizierung der Tat- und Rev-Mengen.

3.2.2.1 Die Länge des uORFs beeinflusst die Translation 3'-wärts liegender Leserahmen

Um zu untersuchen, ob die uORF-vermittelte Stimulation der Translation 3'-wärts liegender Leserahmen durch die Länge des uORFs beeinflusst wird, wurde die Tat- und Rev-Expression in Gegenwart von uORFs unterschiedlicher Länge untersucht. Ausgehend von dem ursprünglichen Konstrukt mit einem uORF von 17 Kodons Länge, wurden durch Deletionen bzw. Insertionen innerhalb des Leserahmens verkürzte uORFs, die für 7 oder

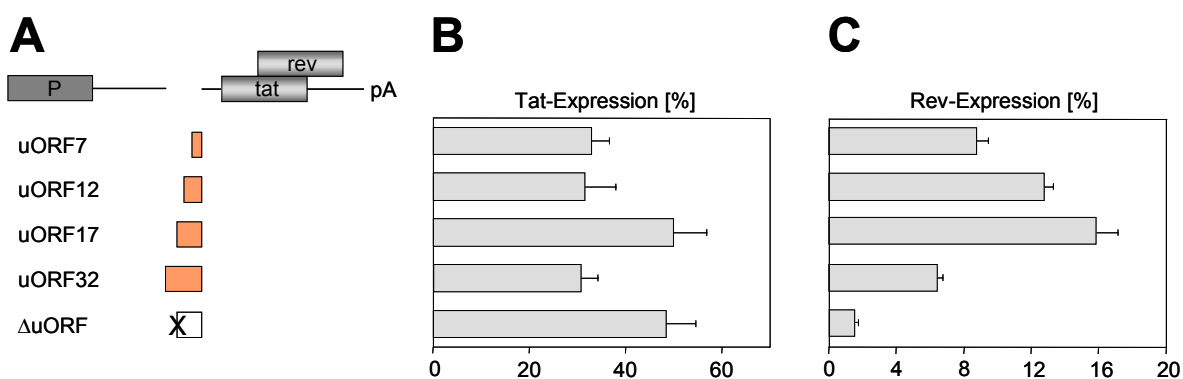


Abb. 29: Relative Tat- und Rev-Expression abhängig von der uORF-Länge. (A) Schematische Darstellung der untersuchten HIV-Konstrukte. Der Promotor (P, dunkelgraues Rechteck) ist für die Messung der Tat-Menge ein SV40-Promotor, für die Messung der Rev-Menge der HIV-1 Promotor. Weiterhin dargestellt sind die HIV-1 ORFs (grau), artifizelle uORFs (orange) und das Fehlen des uORFs. (weißes Rechteck) durch Punktmutation im AUG (X). (B, C) HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit 0,5 µg pGL3-Control zur Bestimmung der Transfektionseffizienz, mit 1 µg des entsprechenden Tat- oder Rev-Reporterplasmids (vgl. Abb. 28) und mit polycistronischen HIV-1 Konstrukten unterschiedlicher uORF-Längen transfiziert. Abweichend zu den in Material und Methoden erwähnten Mengen wurden je 1 ng der zu untersuchenden Plasmide (SVuORFXctatrev) für die funktionelle Tat-Expressionsanalyse (B) bzw. für die funktionelle Rev-Expressionsanalyse 2 µg der zu untersuchenden Plasmide (LTRuORFXctatrev) und 0,1 µg SVctat zur maximalen Tat-Stimulation verwendet (C). Die Renilla-Expression wurde quantifiziert und normiert wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe 2.8). Die Expression des entsprechenden Kontroll-Plasmids SVctat (5 ng) bzw. SVcrev (0,2 µg) wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die auf die Transfektionseffizienz normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler.

12 Aminosäuren kodieren und ein verlängerter uORF, der für 32 Aminosäuren kodiert, kloniert (Abb. 29A). Die Mutationen wurden 3'-wärts des dritten Kodons des uORFs eingesetzt, um die für die Translationsinitiation relevante Sequenzumgebung des AUGs (siehe 3.2.2.3) konstant zu halten. Dabei wurden zwei Vektorsysteme verwendet. Für die Tat-Quantifizierung wurden Konstrukte mit einem SV40-Promotor verwendet (SVuORFXctatrev), sodass eine Tat-induzierte Steigerung der Expression auszuschließen war. Die Rev-Expression wurde von einem Vektor mit Tat-stimulierbarem HIV-1-Promotor (LTRuORFXctatrev) gemessen, weil dieses System eine effiziente Rev-Expression gewährleistete.

Die Tat-Expressionsanalyse (Abb. 29B) zeigte für das Ausgangskonstrukt uORF17 eine vergleichbare Expression wie für das Konstrukt mit Punktmutation des uORF17 AUGs (uORF17 und Δ uORF). Die Konstrukte mit den uORFs, die für 7, 12, oder 32 Aminosäuren kodierten, zeigten eine um ein Drittel reduzierte Tat-Expression. Die ursprünglich beobachteten Unterschiede in der Env-Expression (vgl. Abb. 27) beruhten demnach nicht auf unterschiedlichen Tat-Mengen.

Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen [271;273] konnte bei keinem dieser Konstrukte eine inhibierende Wirkung auf den 3'-wärts gelegenen *rev*-ORF durch die Translationsinitiation am *tat*-Startkodon beobachtet werden (Abb. 29C). Das uORF17 Konstrukt zeigte die höchste Rev-Expression (16 % im Vgl. zu SVcrev mit 100 %), während eine Verlängerung oder Verkürzung des uORFs zu eine Abnahme der Rev-Expression führten (uORF7: 55 %, uORF12: 80 %, uORF32: 40 %). Die Daten zeigten, dass der uORF die Rev-Expression und damit auch die Env-Expression und die Syncytienbildung ermöglichte. Die optimale uORF Länge für eine effiziente Rev-Expression lag zwischen dem Kodierungspotential von 12 und 32 Aminosäuren, also zwischen 36 und 96 nt.

3.2.2.2 Eine Verlängerung des intercistronischen Abstands reduziert die Rev-Expression

Gemäß dem Modell der Termination und Reinitiation erlangen die Ribosomen nach der Translation eines uORFs erst im Verlauf des erneuten Scannens ihre Initiationskompetenz zurück [133;170]. Die Rev-Translation ließe sich demnach durch die vorherige Erkennung

des uORFs und ein Überlesen des *tat*-AUGs durch einen Teil der Ribosomen im Reinitiations-inkompetenten Zustand erklären. Daher stellte sich die Frage, ob die Translation von *tat* und *rev* durch die Veränderung des intercistronischen Abstands zum uORF beeinflusst werden kann.

Um dies zu untersuchen, wurden Plasmide kloniert, die eine Verlängerung des intercistronischen Abstandes zwischen uORF und *tat*-Leserahmen von ursprünglich 38 auf 62, 88 bzw. 121 Nukleotiden enthielten (Abb. 30A). Die zwei Konstruktsreihen mit unterschiedlichen Promotoren für die Tat- und Rev-Messung wurden nach transients Transfektion in HeLa-T4⁺-Zellen im dualen Luziferaseassay auf ihre Tat- bzw. Rev-Expression untersucht (Abb. 30B und C). Bei Verlängerung des intercistronischen Abstands wurde eine graduell leicht reduzierte Tat-Expression beobachtet, wobei jedoch selbst mit einem Abstand von 122 nt noch zwei Drittel der Expression erhalten blieb (Abb. 30B). Die Rev-Expression zeigte dagegen bei einer Verlängerung des intercistronischen Abstands von ursprünglich 177 nt auf 260 nt eine deutliche Verringerung um den Faktor 8 (Abb. 30C). Die Rev-Expression des Konstrukts, mit einem

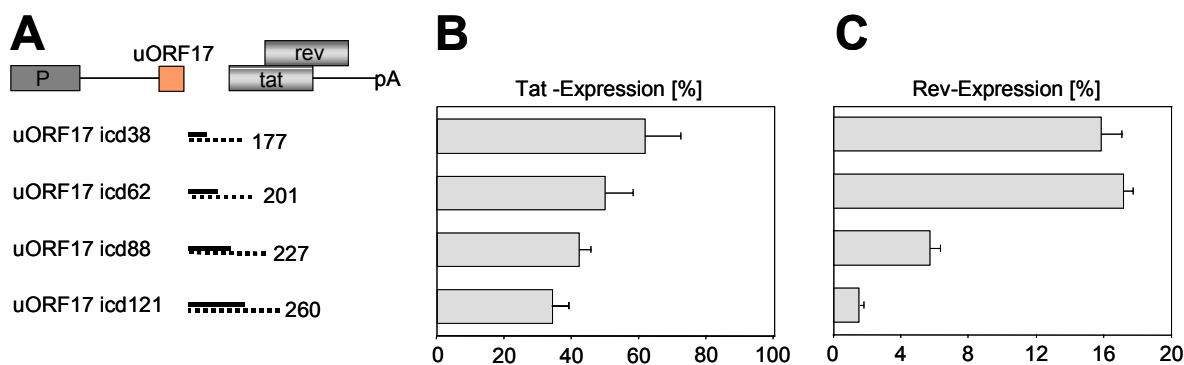


Abb. 30: Relative Tat- und Rev-Expression abhängig vom intercistronischen Abstand. (A) Schematische Darstellung der untersuchten HIV-Konstrukte. Der Promotor (P, dunkelgraues Rechteck) ist für die Messung der Tat-Menge ein SV40-Promotor, für die Messung der Rev-Menge der HIV-1 Promotor. Weiterhin dargestellt sind die HIV-1 ORFs (grau), der artifizielle uORF (orange) und intercistronische Abstände (nt) zum *tat*- (schwarze Linien) bzw. *rev*-Startkodon (gestrichelte Linien). **(B)** und **(C)** HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit pGL3-Control zur Bestimmung der Transfektionseffizienz, mit den entsprechenden Tat- oder Rev-Reporterplasmiden (vgl. Abb. 28) und mit den polycistronischen HIV-1 Konstrukten mit unterschiedlichen intercistronischen Abständen transfiziert. Abweichend zu den in Material und Methoden erwähnten Mengen wurden je 1 ng der zu untersuchenden Plasmide (SVuORF17icdXctatcrev) für die funktionelle Tat-Expressions-Analyse **(B)** bzw. für die funktionelle Rev-Expressions-Analyse 2 µg der zu untersuchenden Plasmide (LTRuORF17icdXctatcrev) und 0,1 µg SVctat zur maximalen Tat-Stimulation eingesetzt **(C)**. Die Renilla-Luziferase-Expression wurde quantifiziert und normiert wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe 2.8). Die Expression des entsprechenden Kontroll-Plasmids SVctat (5 ng) bzw. SVcrev (0,2 µg) wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die auf die Transfektionseffizienz normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler.

intercistronischen Abstands von 260 nt, war mit 2 % vergleichbar mit der Expression des Konstrukts ohne zusätzlichen uORF (vgl. mit Abb. 29C, Δ uORF 2 % bezogen auf die Expression des Referenzkonstrukts SVcrev). Die Verlängerung des intercistronischen Abstands reduzierte also die Expression des weiter 3'-wärts gelegenen *rev*-Leserahmens weit stärker, als die des weiter 5'-wärts und damit unmittelbar hinter dem uORF positionierten *tat*-Leserahmens, dessen Expression kaum beeinflusst wurde. Der intercistronische Abstand des uORFs zu dem 3'-wärts liegenden *rev*-ORF stellte somit ein wesentliches Kriterium für den expressionsfördernden Effekt des uORFs dar.

3.2.2.3 Analyse der uORF-AUG-umgebenden Sequenzen

Für die Effizienz der Translationsinitiation ist die Sequenzumgebung des Initiationskodons von entscheidender Bedeutung. Die Konsensussequenz für ein effizient genutztes Initiationskodon GCCRCCAUGG wurde von Kozak an Hand der Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in 699 Translationsinitiationsstellen bestimmt (Abb. 31A) [168]. Als besonders wichtig für die Translationsinitiation stellten sich ein Purin in Position -3 und ein Guanin in Position +4 heraus [167]. Neben der Länge des uORFs und dem intercistronischen Abstand zu den nachfolgenden ORFs, könnte also auch die Erkennung des uORFs durch unterschiedliche AUG-Umgebungen das Translationspotential der mRNA beeinflussen. Um dies zu untersuchen, sollte zunächst die Effizienz verschiedener AUG-Umgebungen experimentell bestimmt werden. Um Veränderungen innerhalb der kodierenden Sequenz zu vermeiden, wurden bei der Klonierung von Luziferase-Reporterkonstrukten mit unterschiedlichen Initiationsstellen allerdings nur die 5'-Bereiche vor den Startkodons ausgetauscht.

Es wurde bereits beschrieben, dass die AUG-Sequenzumgebung von *tat* (CAAGAAAUGG) eine effiziente Translation ermöglicht, während die *vpu*-AUG-Sequenzumgebung (CAUGUAAUGA) ein „leaky scanning“ erlaubt [273]. Daher wurden die entsprechenden 5'-Sequenzen in einen Luziferase-Reportergenkonstrukt (pRLSV40, ohne Abb.) eingebracht, das 5'-wärts des Startkodons der Konsensus-Initiationsstelle entsprach und dessen Expression als 100 % festgesetzt wurde. Diese drei Vektoren wurde als Bezugssystem genutzt, um die relative Effizienz der uORF-Initiationsstelle GUGGCGAUGA zu bestimmen (Abb. 31C). Nach transienten Transfektionen von HeLa-

T4⁺-Zellen mit diesen Konstrukten und Analyse im dualen Luziferase-Reporterassay wurde die Expression des Ausgangsvektors mit der Konsensus-AUG-Umgebung (pRLSV40=100 %) sowie der übrigen Konstrukte bestimmt. Für die Konstrukte, welche die uORF- und die *tat*-Startkodon-Sequenzumgebung enthielten, wurde eine vergleichbar starke Expression nachgewiesen (Abb. 31B, C: pRL^{5'uORF}, 84 % bzw. pRL^{5'tat}, 102 %). Die *vpu*-AUG-Sequenzumgebung führte zu einer signifikant niedrigeren Renilla Luziferase-Expression (pRL^{5'vpu}, 6 %). Dies stimmte mit der Beobachtung überein, dass in HIV-Transkripten die *vpu*-AUG-Umgebung ineffizient, die des *tat*-AUGs dagegen effizient erkannt wird [273] und erlaubte die Einordnung der uORF AUG-Umgebung als effiziente Translationsinitiationsstelle. Auf die beiden weiteren Kontrollvektoren pRL^{5'vpu-5U} und pRL^{5'vpu-3U-5U} wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

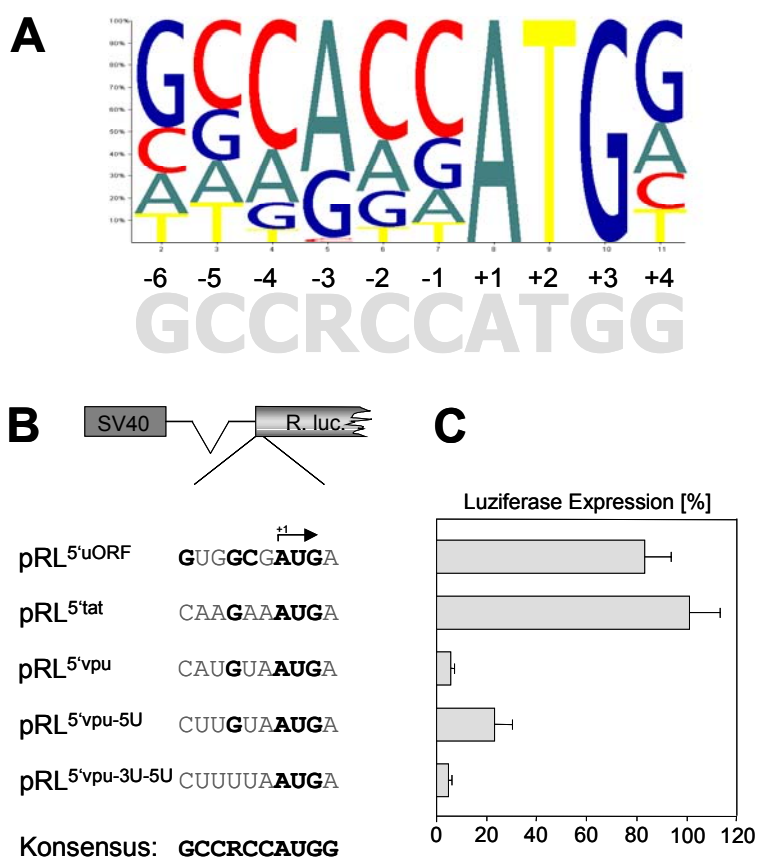


Abb. 31: Effizienzbestimmungen von unterschiedlichen AUG-Sequenzumgebungen. (A) Die Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der Nukleotide in der Umgebung von 699 Translationsinitiationskodons durch Kozak (Darstellung mit der Software Winlogo von T. Preuss) führte zur Formulierung der Konsensussequenz GCCRCCAUGG (R=Purin) für ein effizientes Startcodon (unterhalb) [168;169]. (B) Schematische Darstellung der Reporter-Gen-Konstrukte. Die Konstrukte enthalten einen SV40 Promotor (dunkelgrau), ein Intron und das Renilla Luziferase-Reporter-Gen (R. luc, grau). Die AUG-Umgebung des Reporter-Gen wurde durch Punktmutationen variiert. Die dem Konsensus für ein effizientes Startcodon entsprechenden Nukleotide sind fett gedruckt.

(C) Relative Renilla Luziferase-Genexpression in Abhängigkeit von der 5'-Leader-sequenz des AUGs. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden mit den unterschiedlichen Startkodons sowie mit pGL3-Control transfiziert. Die relative Reporter-Gen-Expression wurde im dualen Luziferase Assay bestimmt und die Expression des Konstrukts pRLSV40 wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die auf die Transfektionseffizienz normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen \pm Standardfehler.

3.2.2.3.1 Unterschiede in der uORF-Translationsinitiationseffizienz beeinflussen die Translation 3'-wärts liegender Leserahmen

Nachdem die Effizienz der Translationsinitiationsstellen bestimmt worden war, wurden die AUG-Umgebungen in die Position 5'-wärts des uORFs kloniert (uORF17^{tat}, uORF17^{vpu}), um zu untersuchen, in wie weit dies die Expression der Leserahmen 3'-wärts des uORFs beeinflusst (Abb. 32). Um die kodierende Sequenz zu erhalten, wurden wie in der vorherigen Analyse (vgl. Abb. 31) alle 3'-wärts liegenden Positionen der kodierenden Sequenz, also auch die für die Translationseffizienz wichtige Position +4, nicht verändert. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und die Tat- und Rev-Expression im dualen Luziferaseassay bestimmt. Dabei wirkten die unterschiedlichen uORF-AUGs sowohl auf die Expression von Tat (Abb. 32B) als auch auf von Rev (Abb. 32C).

Die Bestimmung der Rev-Mengen ergab für das Konstrukt ohne uORF, wie bereits bekannt, die geringste Rev-Expression (vgl. Abb. 29 und Abb. 32C: LTRΔuORF 3 %, im Vergleich zum Referenzplasmid SVcrev mit 100 %). Das Konstrukt mit *tat*-AUG-Umgebung (LTRuORF17^{tat}) zeigte mit einer Rev-Expression von 45 % eine annähernd so hohe Rev-Expression wie das Konstrukt mit der ebenfalls effizienten ursprünglichen uORF-Umgebung (LTRuORF17, 55 %). Das Konstrukt mit der ineffizienten *vpu*-Initiationsstelle exprimierte dagegen deutlich weniger Rev (LTRuORF17^{vpu}, 17 %). Die zuvor gemessene Effizienz der Initiationsstellen (Abb. 31) korrelierte demnach mit der Rev-Expression. Je effizienter die Translationsinitiation am uORF war, desto mehr Rev-Expression konnte gemessen werden. Die Rev-Expression hing also direkt von der Erkennung des uORFs ab.

Die höchste Tat-Expression zeigten, wie bereits in Abb. 29 gesehen, das Konstrukt ohne uORF, bei dem der *tat*-Leserahmen der erste Leserahmen des Transkriptes war (SVΔuORF: 79 %) sowie das Konstrukt uORF17 (SVuORF17: 67 %). Ebenfalls eine hohe Tat-Expression zeigte das Konstrukt mit der *tat*-AUG-Sequenzumgebung (Abb. 32B: SVuORF17^{tat}, 52 %). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass sowohl die *tat*- als auch die uORF-AUG-Umgebung effiziente Initiationsstellen sind (vgl. Abb. 31). Interessanterweise zeigte jedoch auch das Konstrukt SVuORF17^{vpu} mit 53 % eine

vergleichbar hohe Tat-Expression. Während das relative Expressionsverhalten der übrigen Konstrukte mit uORF- und *tat*-AUGs also weitgehend mit den ermittelten AUG-Stärken korrelierte, war die Tat-Expression des Konstrukts SVuORF17^{vpu} deutlich höher, als an Hand der Effizienz der Initiationsstelle zu vermuten war.

Insgesamt zeigte sich damit ein gleichgerichteter Einfluss der Effizienz der Initiationsstelle des uORFs sowohl auf die Tat- als auch auf die Rev-Expression. Lediglich bei Nutzung der *vpu*-AUG-Umgebung war ein unterschiedlicher Einfluss des uORFs auf die Tat- und Rev-Expression zu beobachten. Dieser Umstand könnte auf die Gegenwart eines zweiten minimalen uORFs innerhalb der *vpu*-AUG-Umgebung zurückzuführen sein, der nur aus einem Start- und einem Stoppkodon besteht (CAUGUAAUG). Ein Sequenzvergleich des 5'-Bereichs des *vpu*-AUGs und des *tat*-AUGs unterstützte diese These ebenfalls. Bezogen auf den Konsensus für ein effizientes AUG zeigen beide AUG-Leaderbereiche keine wesentlichen Unterschiede, zumal beide Konstrukte — im Gegensatz zu den authentischen

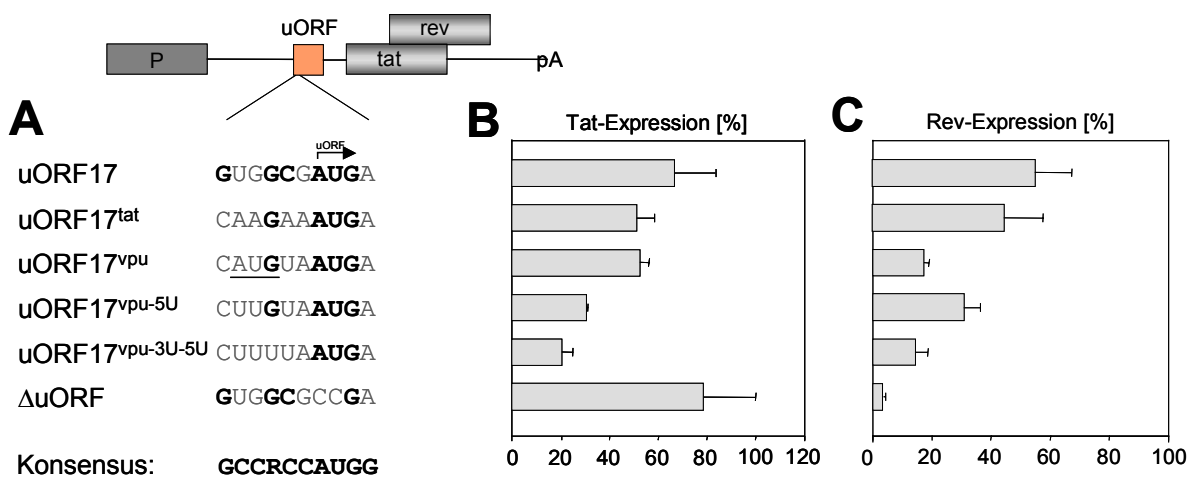


Abb. 32: Unterschiedliche uORF-AUG-Umgebungen beeinflussen die Tat- und die Rev-Expression. (A) Schematische Darstellung der untersuchten HIV-Konstrukte. Der Promotor (P, dunkelgraues Rechteck) ist für die Messung der Tat-Menge ein SV40-Promotor, für die Messung der Rev-Menge der HIV-1-Promotor. Weiterhin dargestellt sind die HIV-1 ORFs (grau), sowie der artifizielle uORF (orange). Die Grafik zeigt die unterschiedlichen analysierten AUG-Umgebungen des uORFs. Nukleotide, die dem Konsensus entsprechen sind fett gedruckt. (B, C) HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit pGL3-Control zur Bestimmung der Transfektionseffizienz sowie dem entsprechenden Tat- oder Rev-Reporterplasmid (vgl. Abb. 27) und mit polycistronischen HIV-1 Konstrukten unterschiedlicher 5'-Umgebung des uORF AUGs transfiziert. Abweichend zu den in Material und Methoden erwähnten Mengen wurden je 1 ng der zu untersuchenden Plasmide (SVuORF17^xctatcrev) für die funktionelle Tat-Expressionsanalyse (B) bzw. für die funktionelle Rev-Expressionsanalyse 2 µg der zu untersuchenden Plasmide (LTRuORF17^xctatcrev) und 0,1 µg SVctat zur maximalen Tat-Stimulation verwendet (C). Die Renilla-Luziferase-Expression wurde quantifiziert und normiert wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe 2.8). Die Expression des entsprechenden Kontroll-Plasmids SVctat (5 ng) bzw. SVcrev (0,2 µg) wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die auf die Transfektionseffizienz normierten Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardfehler.

Initiationsstellen von *tat* und *vpu* — an der wichtigen Position +4 ein A aufwiesen. Auch die von Kozak hervorgehobene Position -3 war in beiden Fällen identisch. Es könnte also sein, dass nicht die fehlende Übereinstimmung mit der Konsensussequenz das *vpu*-AUG zu einer ineffizienten Initiationsstelle macht, sondern die Präsenz eines Minimal-uORFs vor dem *vpu*-AUG. Die Mutation dieses Minimal-uORF-AUG zu UUG (CuUGUAAUG in pRL^{5'vpu-5U}) sollte eine Differenzierung zwischen beiden Effekten ermöglichen, da dies gemäß der Nukleotid-Häufigkeitsverteilung der Initiationsstelle (vgl. Abb. 31A) keine Erhöhung der Translationsinitiationsrate am *vpu*-AUG bewirken sollte. Dennoch führte die Mutation -5U zu einem mehr als 3-fachen Anstieg der Renilla-Luziferase-Expression (Abb. 31C: vgl. pRL^{5'vpu}, 6 % mit pRL^{5'vpu-5U}, 23 %). Dies unterstützte die Hypothese, dass der Minimal-uORF vor dem *vpu*-AUG die Translation des *vpu*-Leserahmens inhibierte. Eine zusätzlich eingeführte Mutation von G nach U an der wichtigen Position -3 (CuUuUAAUG in pRL^{5'vpu-3U-5U}) diene als Kontrolle und bestätigte die Relevanz eines Purins an Position -3. Wie erwartet reduzierte diese Mutation die durch -5U erhöhte Expression wieder, da das U in Position -3 nicht dem laut Konsensus bevorzugten Nukleotid entsprach.

Um zu untersuchen, ob der Minimal-uORF in der *vpu*-AUG-Umgebung auch für die auffällig hohe Tat-Expression in den polycistronischen Transkripten verantwortlich war, wurden die beschriebenen Mutationen in der *vpu*-AUG-Umgebung in das uORF-Konstrukt kloniert (Abb. 32). Tatsächlich zeigten die Konstrukte SVuORF17^{vpu-5U}ctatcrev (31 %) und SVuORF17^{vpu-3U-5U}ctatcrev (21 %) eine deutlich geringere Tat-Expression als das Konstrukt SVuORF17^{vpu}ctatcrev (53 %). Die Rev-Expression (Abb. 32C) des Konstrukts LTRuORF17^{vpu}ctatcrev war dagegen mit 17 % vergleichbar mit der des Konstrukts LTRuORF^{vpu-3U-5U}ctatcrev (14 %), während das Konstrukt LTRuORF17^{vpu-5U}ctatcrev (31 %) eine höhere Expression zeigte. Damit decken sich die Ergebnisse der Rev-Expression qualitativ mit der zuvor am Luziferase-Reporter gemachten AUG-Effizienz-Analyse. Der zusätzliche Minimal-uORF in der *vpu*-AUG-Umgebung war demnach in der Lage die Tat-Expression zu erhöhen, wohingegen die Rev-Expression sich gleichzeitig verringerte.

Die Erkennung des Minimal-uORFs statt des uORFs selbst erhöhte den intercistronischen Abstand zum *tat*-AUG von 38 nt auf 91 nt. Die Ribosomen könnten also nach Erkennung

des Minimal-uORF dementsprechend 53 nt früher Reinitiations-kompetent werden als nach der Erkennung des uORFs. Außerdem sollten an Ribosomen, die durch das Erkennen des kurzen Minimal-uORFs das eigentliche Startkodon überlesen haben, mehr Initiationsfaktoren gebunden geblieben sein, als dies bei Ribosomen nach Translation des längeren uORFs der Fall wäre. Aus diesen Faktoren könnte eine erhöhte Reinitiation am *tat*-AUG resultieren, wodurch für einen Translationsstart am *rev*-AUG weniger Ribosomen bereitstehen. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass der Minimal-uORF 5'-wärts des *vpu*-AUGs auch im authentischen, polycistronischen *vpu-env*-Transkript die Env-Expression beeinflussen könnte.

3.2.3 uORFs verändern das Expressionsprofil authentischer HIV-1 Transkripte

3.2.3.1 Der Minimal-uORF 5'-wärts des *vpu*-AUGs begünstigt die effiziente Env-Expression von *vpu-env*-Transkripten

Anders als für die übrigen HIV-Proteine gibt es keine alternativ gespleißten mRNAs, die Env als primären Leserahmen tragen. Env wird stattdessen als zweiter ORF von polycistronischen *vpu-env*-Transkripten translatiert. Um zu untersuchen, ob der Minimal-uORF innerhalb der *vpu*-AUG-Umgebung in der *vpu-env* mRNA eine effizientere Translation des weiter 3'-wärts liegenden *env*-Leserahmens bewirkt, wurden Konstrukte kloniert, deren Transkripte dem Spleißereignis von SD1 auf SA5 entsprachen (Abb. 33A, SV1.5E *vpu* uORF). Davon abgeleitet wurde ein Konstrukt in dem der Minimal-uORF 5'-wärts der *vpu*-Initiationsstelle durch eine A zu U Mutation an der Position -5 der *vpu*-Initiationsstelle inaktiviert wurde (Abb. 33A, SV1.5E *vpu* Δ uORF). Dies entsprach der Mutation -5U in der Analyse der AUG-Sequenzumgebungen (siehe 3.2.2.3, Abb. 31, 32). Das Konstrukt sollte, aufgrund des fehlenden Minimal-uORFs bei vergleichbarer Homologie der *vpu*-AUG-Sequenzumgebung zum Konsensus eine reduzierte Translation des *env*-Leserahmens zeigen. Die Untersuchung der Env-Expression nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen zeigte tatsächlich im Western Blot eine Reduktion der Env-Menge um den Faktor 2 (Abb. 33B und C, vgl. SV1.5E *vpu* uORF, 100 % mit SV1.5E *vpu* Δ uORF, 40 %). Als Gegenkontrolle wurde die Minimal-uORF-AUG-Umgebung gegen die effiziente *tat*-AUG-Umgebung ausgetauscht. Die dabei eingefügten

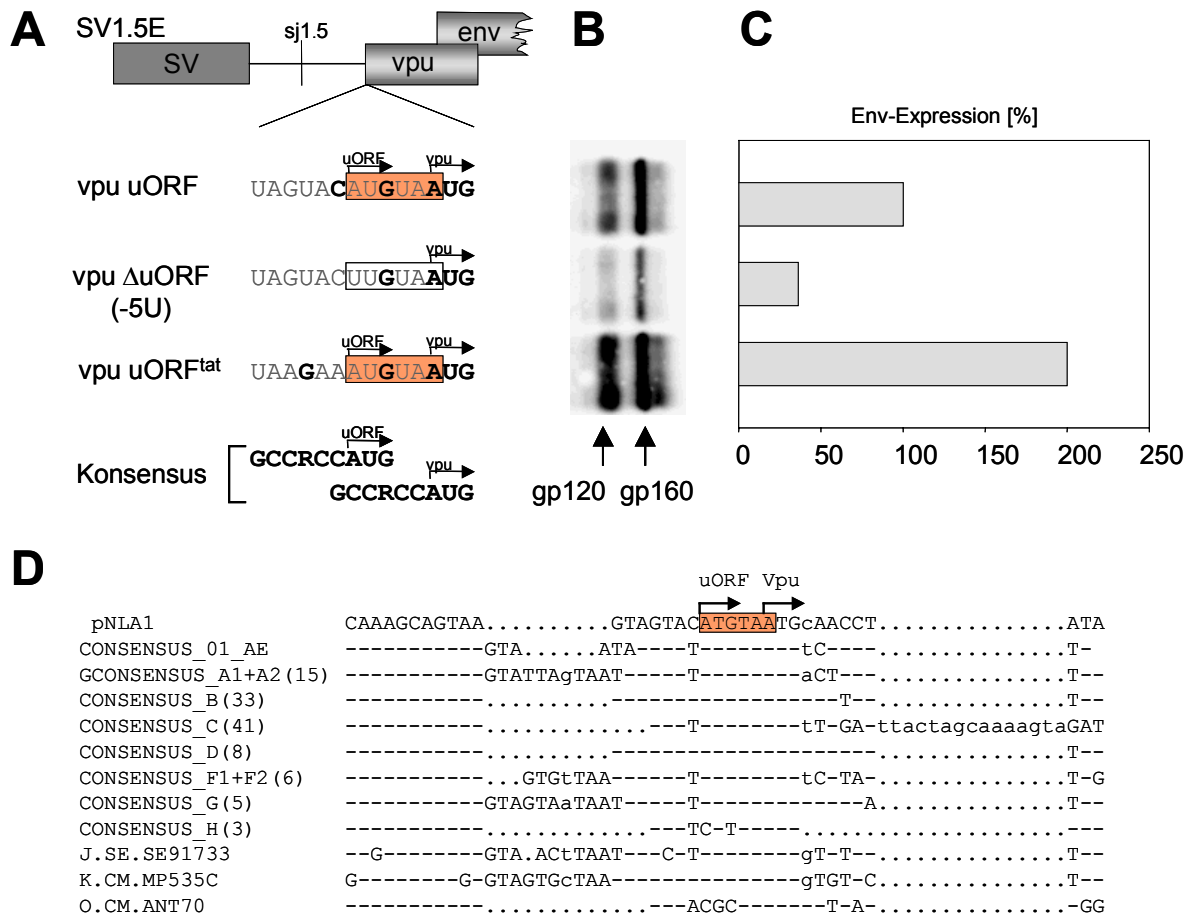


Abb. 33: Variation der Env-Expression aufgrund von Unterschieden im Minimal-uORF in der vpu-AUG-Umgebung. (A) Dargestellt ist der schematische Aufbau der untersuchten Konstrukte (SV1.5E vpu uORF, SV1.5E vpu ΔuORF, SV1.5E vpu uORF^{tat}). Als Promotor (dunkelgraues Rechteck (SV)) wurde ein „SV40 early“-Promotor verwendet, 3'-wärts davon liegen die Leserahmen von env und vpu (hellgraue Rechtecke). Unterhalb sind die mutierten Sequenzen 5'-wärts des vpu-AUGs dargestellt. Der Beginn des Minimal-uORF (orange) und des vpu-Leserahmens ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das vpu-AUG und Übereinstimmungen mit dem Konsensus der Initiationsstelle sind fett gedruckt. (B) Abweichend zu den in Material und Methoden erwähnten Mengen wurden HeLa-T4+-Zellen mit 2 µg der Konstrukte der SV1.5E Serie transfiziert und auf Env-Expression im Westernblot analysiert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet, mit PBS gewaschen und ein Aliquot für die Bestimmung des Proteingehalts und der Transfektionseffizienz durch Bradford- und Luziferase-Messung entnommen. Die restlichen Zellen wurden in SDS-Gelladepuffer aufgenommen. Die normierten Mengen des Zellextraktes wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem Maus-anti-gp120-Antikörper (87-133/026 Dade-Behring) und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG-Zweitantikörper detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System (AP Biotech). (C) Quantifizierung der Bandenintensitäten mittels Lumi-Imager F1 und Lumianalyst Software 3.1 (Roche). (D) Vergleich der vpu-ATG-Umgebung mit den HIV-1 Subtyp-Konsensussequenzen. Dargestellt ist die Sequenzumgebung des vpu-Initiationsstelle der Konsensussequenzen AE bis O. Orange unterlegt ist der minimal uORF der in neun von elf Subtyp-Sequenzen konserviert ist. Der uORF- und der vpu-Translationsstartpunkt ist jeweils durch einen Pfeil markiert. Konservierte Sequenzen innerhalb eines Subtyps sind durch Großbuchstaben, Konsensussequenzen mit Abweichungen innerhalb eines Subtyps sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Nukleotidlücken wurden mit . , konservierte Nukleotide zwischen den verschiedenen Subtypen mit - gekennzeichnet. Der Sequenzvergleich erfolgte mit der Rip1.9 Beta Software (http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/RIPPER/rip_test.html).

Veränderungen des 5'-Bereichs betrafen Positionen mit keiner bzw. geringer Relevanz bezüglich des Konsensus des *vpu*-AUGs (Abb. 33, SV1.5E *vpu* uORF^{tat}). Diese effizientere Translationsinitiationsstelle des Minimal-uORFs führte zu einer 2-fach höheren Env-Expression. Damit konnte gezeigt werden, dass der Minimal-uORF 5'-wärts des *vpu*-AUGs wesentlich zur effizienten Expression des 3'-wärts liegenden *env*-Leserahmens der polycistronischen *vpu-env*-Transkripte beitrug. Die Bedeutung des Minimal-uORFs wurde auch durch seine Konservierung in 9 von 11 Konsensussequenzen verschiedener HIV-1 Subtypen unterstützt (Abb. 33D). Die *vpu*-Initiationsstelle verhält sich also nicht wegen mangelhafter Komplementarität zur Konsensussequenz, sondern wegen des 5'-wärts liegenden Minimal uORFs als schwacher Translationsstartpunkt.

3.2.3.2 Eine Mutation des *vpr*-AUGs generiert uORFs, welche die Transkription 3'-wärts gelegener Leserahmen stimulieren

Die vorhergegangenen Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass ein artifizieller uORF 5'-wärts des *tat*-AUGs die Expression des 3'-wärts gelegenen *rev*-Leserahmens stimuliert. Daher stellte sich die Frage, in wie weit der *vpr*-Leserahmen, der in authentischen HIV-1 Transkripten 5'-wärts des *tat*-ORFs liegt, einen ähnlichen Effekt ausüben kann. Um diese Frage zu untersuchen wurde die Konstruktsreihe 1.3ΔSD3 kloniert (Abb. 34A). Diese Konstrukte entsprachen dem Spleißereignis von Spleißdonor 1 (SD1) auf Spleißakzeptor 3 (SA3) und enthielten zusätzlich eine spleißinaktivierende Mutation des darauffolgenden Spleißdonors 3, um ein alternatives Spleißen im Leaderbereich zu verhindern. In den Env-kodierenden Konstrukten der Serie war das Spleißereignis von SD4 auf SA7 noch möglich, während die Tat- und Rev-Expressionsplasmide der Konstruktsreihe die entsprechenden cDNA-Sequenzen ohne die Env-kodierende Intronsequenz enthielten.

Im Folgenden wurden verschiedene *vpr*-Sequenzen auf eine mögliche Funktion als uORF untersucht. Der *vpr*-Volllängen-ORF wies ein Kodierungspotential von 96 Aminosäuren auf (Abb. 34A, *vpr*96). Aufgrund des Überlappens mit dem *tat*-Leserahmen und aufgrund seiner Länge schien dieser *vpr*-Leserahmen als uORF zur Förderung der Translation 3'-wärts liegender Leserahmen jedoch ungeeignet. Bei der Messung der Tat- und Rev-Mengen zeigten sich auch im Vergleich zu dem bereits bekannten artifiziellen uORF 17 nur eine geringe Tat-Expression (Abb. 34B, vgl uORF, 60% mit *vpr*96, 15 %) und kaum

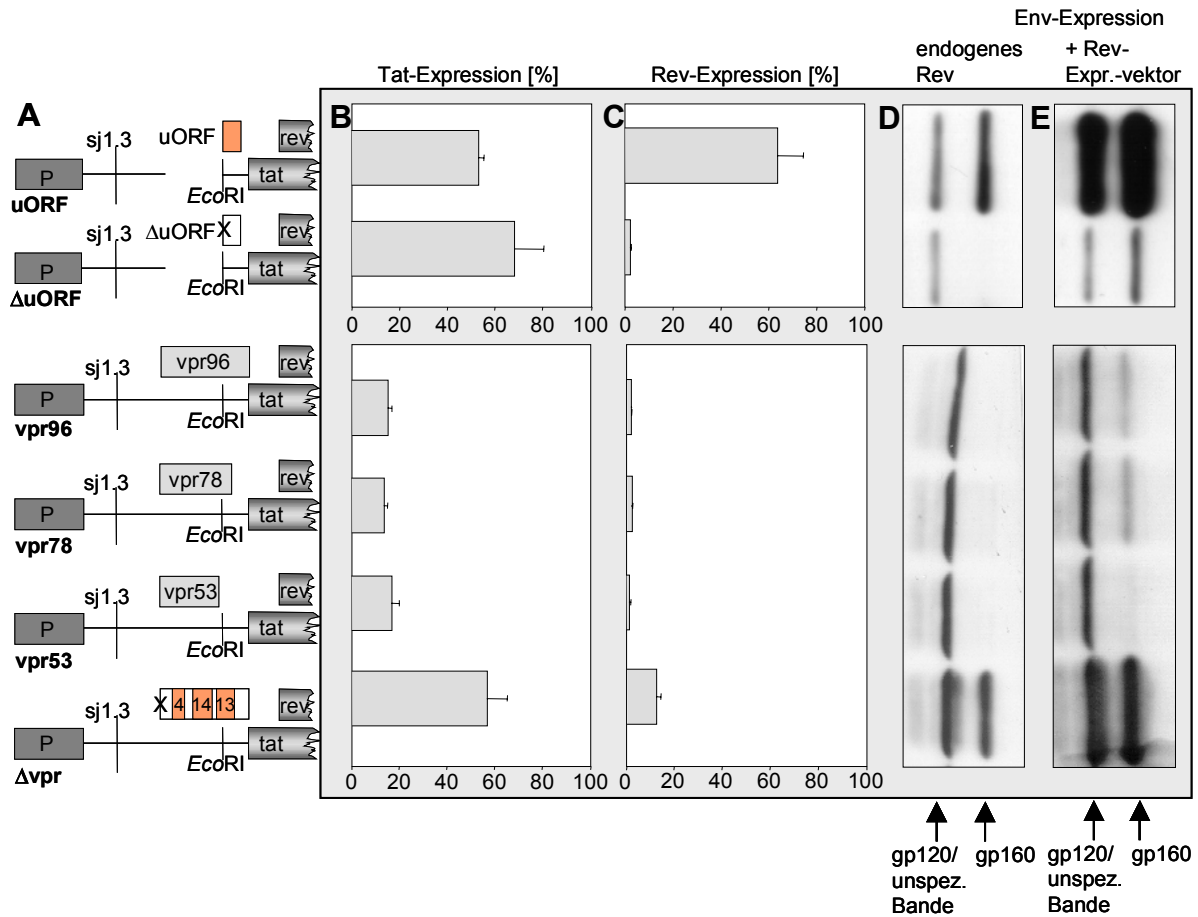


Abb. 34: Analyse der Wirkung von *vpr*-Mutationen auf die Expression 3'-wärts gelegener Leserahmen. (A) Schematische Darstellung der untersuchten Konstrukte. Gezeigt sind der Promotor (P, dunkelgraues Rechteck), sowie die HIV-1 ORFs (grau), uORFs (orange) und das Fehlen von Leserahmen (weißes Rechteck) durch Mutation des AUGs (X). Es wurden Konstrukte verwendet, die HIV-1 cDNA Derivaten mit einem Spleißereignis von SD1 auf SA3 entsprachen. Für die Tat-Expressionsanalyse (B) wurden SV-Konstrukte ohne TAR-Region (SV 1.3 Δ SD3 X ctatcrev Δ PS) und für die Rev-Expressionsanalyse (C) LTR-Konstrukte (pNLA1 1.3 Δ SD3 X ctatcrev) verwendet, beide jeweils mit der cDNA Sequenz des ctat/crev Spleißereignisses von SD4 auf SA7. Für die Env-Expressionsanalysen (D, E) wurden LTR-Konstrukte mit Env-Kodierungspotential (pNLA1 1.3 Δ SD3 X) verwendet. Die im oberen Teil dargestellten Konstrukte enthielten den artifiziellen uORF17 (uORF) bzw. durch Mutation des Startkodons keinen uORF (Δ uORF, vgl. Abb. 32). Die im unteren Teil der Abbildung dargestellten Konstrukte entsprechen cDNA-Derivaten authentischer HIV-1 Sequenzen mit unterschiedlichen *vpr*-Sequenzen. Die eingefügten Mutationen verkürzten den Leserahmen des Wildtyp *vpr* (vpr96) auf 78 (vpr78) oder 53 (vpr53) Kodons Länge (234 bzw. 159 Nukleotide). Eine Punktmutation des *vpr*-Startkodons (Δ vpr) führte zur Offenlegung interner kurzer Leserahmen (orange). Die Diagramme zur Tat- und Rev-Expression basieren auf den auf die Transfektionseffizienz normierten Reporter-Gen-Expressionen aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Die Env-Expression wurde in Gegenwart sättigender Mengen von Tat ohne Kotransfektion eines Rev-Expressionsplasmids (D) und nach Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmids SVcrev analysiert (E). Die Detektion erfolgte im Immunoblot wie unter Abb. 33 beschrieben.

Rev-Expression vergleichbar zu dem Referenzkonstrukt ohne uORF (Abb. 34C, vgl. Δ uORF, 2,1 % und vpr96, 1,9 %). Aus diesem Grund wurden weitere Konstrukte untersucht, deren *vpr*-Leserahmen durch vorzeitige Stoppkodons verkürzt waren. Die erste *vpr*-Sequenz entstammte dem HIV-1 Isolat HXB10, in dem eine Leserastermutation zu einem *vpr* mit 78 Kodons führt (Abb. 34A, vpr78), die zweite *vpr*-Sequenz basiert auf einer beschriebenen Editierung der RNA innerhalb der *vpr*-Sequenz von G nach A [24], was zu einer Verkürzung des *vpr*-Leserahmens auf 53 Kodons führen würde (Abb. 34A, vpr53). Auch diese kürzeren ORFs 5'-wärts des *tat*-AUGs zeigten bezüglich der Tat- (Abb. 34B, vpr78, 14 % und vpr53, 17 %) und Rev-Expression (Abb. 34C, vpr78, 2,2 % und vpr53, 1,3 %) keinen relevanten Unterschied zum Vollängen-vpr96 und damit keine Stimulation der Translation 3'-wärts liegender Leserahmen.

Als weiteres wurde untersucht, welche Auswirkung eine Mutation des *vpr*-Startkodons in der vpr96-Sequenz bewirkt (Abb. 34A, Δ vpr). Durch diese Punktmutation wurden innerhalb des vormaligen *vpr*-Leserahmens, der über 6 interne AUGs verfügt, drei kleine offene Leserahmen freigelegt. Diese internen Leserahmen kodierten Peptide von 4 bzw. von 9 Aminosäuren, wobei das Startkodon des Letzteren innerhalb des ersten uORFs lag. Ferner lagen zwei weitere Leserahmen mit einer Länge von 14 Kodons, und 13 Kodons vor, die beide noch ein zusätzliches internes AUG im gleichen Leserahmen besaßen.

Die Tat-Expression des Konstrukts Δ vpr lag mit 56 % um den Faktor drei höher als bei den zuvor genannten Konstrukten (Abb. 34B, Δ vpr). Für die Rev-Expression zeigte sich mit 12 % eine ebenfalls deutliche, 5-fache Erhöhung im Vergleich zu den übrigen *vpr*-Konstrukten (Abb. 34C, Δ vpr). Offenbar ermöglichte die Punktmutation des *vpr*-Startkodons in dieser polycistronischen RNA neben der Tat- auch die effiziente Rev-Expression. Bezüglich der Env-Expression zeigte sich in Abhängigkeit von den *vpr*-Sequenzen eine effiziente Expression ebenfalls nur in Gegenwart der Δ vpr-Mutante bzw. in Gegenwart des artifiziellen uORFs. Diese Beobachtung war nicht alleine auf unterschiedliche Rev-Mengen sondern auch auf eine erhöhte Translation am env-ORF zurückzuführen, da die Env-Expression auch in Gegenwart sättigender Mengen von Rev (+Rev-Expr.-Vektor) bei diesen Konstrukten erhöht war. Die nach Mutation des *vpr*-Startkodons freiliegenden, internen Leserahmen konnten demnach als uORFs wirken und die Expression der 3'-wärts liegenden Leserahmen stimulieren. Dies kann für Studien zur

Untersuchung der *vpr*-Funktion von Bedeutung sein, da eine Mutation des Startkodons eine gleichzeitige Beeinflussung der Virusreplikation durch uORFs nach sich ziehen könnte.

3.2.3.3 Ein uORF von 24 Kodons im HIV-Exon 1 stimuliert die Rev- und Env-Expression

Bourara *et al.* konnten nach Isolation der RNA chronisch mit HIV-1 infizierter H9-Zellen mittels RT-PCR und Sequenzierung ein RNA-Editing im Exon 1 verschiedener HIV-Transkripte nachweisen. Gemäß des von ihnen beschriebenen RNA-Editings könnte in diesem Fall einer G zu A Transition im HIV-1 Leaderexon 1 an Position 181 ein AUG und damit ein uORF mit 24 Kodons gebildet werden [24]. Um diesen uORF in einer Position 5'-wärts des *tat*-Leserahmens zu untersuchen, wurden Konstrukte verwendet, die dem Spleißereignis von SD1 auf SA4 entsprachen. Zur Insertion des uORFs wurde an Position 181 ein G zu A Austausch vorgenommen (Abb. 35A). Die entsprechende Konstruktreihe wurde 1.4 uORF24e genannt. Da bereits gezeigt wurde, dass ein uORF mit vergleichbarer Länge die Expression der 3'-wärts liegenden Leserahmen polycistronischer mRNAs stimuliert (3.2.2.1), wäre es möglich, dass ein solches Editieren im Rahmen der HIV-1 mRNA Reifung, das Kodierungspotential der RNA zugunsten der 3'-wärts liegenden Leserahmen beeinflusst.

Nach Transfektion von entsprechenden cDNA-Konstrukten, die die Tat- und Rev-Expression erlaubten, konnte im funktionellen dualen Luziferaseassay kein Einfluss des uORFs auf die Tat-Expression beobachtet werden (Abb. 35B). Die Analyse der Rev-Expression zeigte dagegen eine 8-fache Erhöhung in Gegenwart des uORF24e (Abb. 35C). Auch die Analyse der Env-Expression ohne (Abb. 35D) oder nach Kotransfektion von SVcrev (Abb. 35E) zeigte jeweils eine deutlich höhere Env-Expression in Gegenwart des uORF24e. Die Env-Expression bei Kotransfektion sättigender Mengen von Rev war in Gegenwart des uORFs 8-fach höher. Eine Transfektion von HeLa-T4⁺-Zellen mit den Konstrukten LTR1.4envpA bzw. LTR1.4envpAuORF24e und Kotransfektion von SVcrev im Northern Blot (Abb. 35F) ergab in der Quantifizierung eine leicht erhöhte Menge gespleißter RNA (Abb. 35G, 122 %) und eine leicht reduzierte Menge der ungespleißten RNA (Abb. 35G, 77%). Da die geringfügige Zunahme der gespleißten RNA nicht die beobachtete Erhöhung der Rev-Menge erklären konnte und die Env-Expression trotz leicht

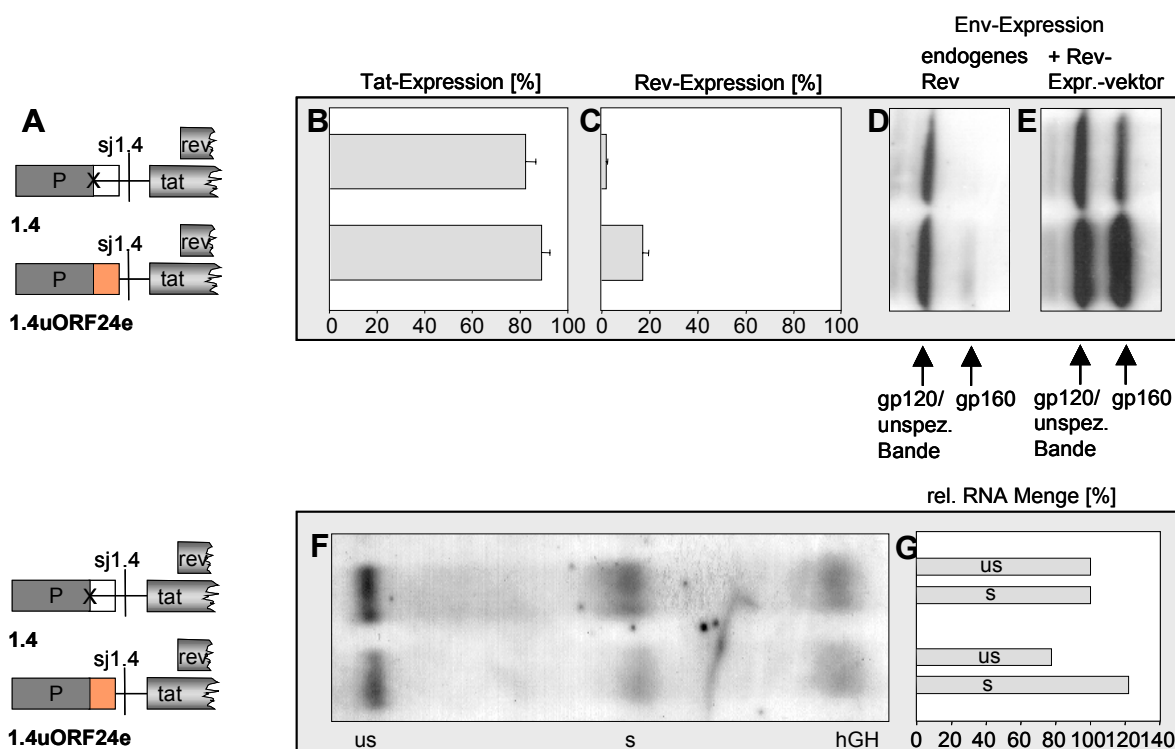


Abb. 35: Analyse der Wirkung eines uORFs im HIV-1-Exon 1 auf die Förderung der Expression 3'-wärts gelegener Leserahmen. Die hier verwendeten Konstrukte entsprechen cDNA-Derivaten authentischer HIV-1 Sequenzen, die dem Spleißereignis von SD1 auf SA4 entsprechen. Es wurden 3 Konstruktsreien zur Analyse der Env-, Rev- und Tat-Expression verwendet (vgl. Abb. 33). Für die Bestimmung der Tat-Expression wurden die Konstrukte SV1.4 uORF24ectatcrev Δ PS und SV1.4ctatcrev Δ PS, für die Rev-Expressionsanalysen die Konstrukte LTR1.4uORF24ectatcrev und LTR1.4ctatcrev verwendet. Die Env-Expressionsanalyse und die Northern Blot Analyse erfolgte mit den Konstrukten LTR1.4EuORF24e und LTR1.4E. Gemäß des von Bourara *et al.* beobachteten RNA-Editings von G zu A an Position 181 der mRNA, das zu einem AUG mit einem resultierenden uORF von 24 Kodons Länge führt [24], wurde eine entsprechende Mutation im Leaderexon eingefügt (**A**). Die Abbildung zeigt die relative, endogene Tat- (**B**) und Rev-Expression (**C**). Die Diagramme zur Tat- und Rev-Expression basieren auf den auf die Transfektionseffizienz normierten Reporter-gen-Expressionen aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Die Env-Expression wurde in Gegenwart sättigender Mengen von Tat in Abwesenheit (**D**) und nach Kotransfektion mit dem Rev-Expressionsplasmid SVcrev analysiert (**E**). Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 33 beschrieben. Zur Bestätigung des Translationseffekts wurde die Menge gebildeter *env*-Transkripte nach Transfektion der Expressionsplasmide im Northern Blot analysiert (**F**) und die relative, mittels hGH auf die Transfektionseffizienz normierte Bandenintensität der gespleißten (s) und ungespleißten (us), poly (A)⁺-aufgereinigten RNAs ermittelt (**G**).

reduzierter Mengen ungespleißter RNA erhöht war, basieren die beobachteten Änderungen in der Rev- und Env-Proteinmenge eindeutig auf einem Translationseffekt. Eine Editierung der RNA-Sequenz an Position 181 konnte also das Translationspotential von 1.4 gespleißten HIV-1-Transkripten zugunsten der 3'-wärts von *tat* gelegenen *rev*- und *env*-Leserahmen verändern.

4 Diskussion

Während der Replikation von HIV-1 ist es von entscheidender Bedeutung, dass die verschiedenen HIV-Proteine zum richtigen Zeitpunkt des Infektionszyklus in korrekten Mengenverhältnissen zueinander vorliegen. Dies ist nur sehr begrenzt durch Regulation auf der Transkriptionsebene zu erreichen, da nur ein Promotor im 5'-LTR genutzt wird, was zur Transkription polycistronischer prä-mRNAs führt. Für die Regulation der Proteinmenge spielen daher posttranskriptionale Regulationsmechanismen, wie das alternative Spleißen auf RNA-Ebene oder ribosomale Leserasterverschiebung auf der Translationsebene, eine wichtige Rolle. Die vorliegende Arbeit diente der Charakterisierung einiger bisher kaum untersuchter posttranskriptionaler Regulationsmechanismen der HIV-1 Genexpression. Analysiert wurden zum Einen die Wirkung von alternativ gespleißten HIV-1 mRNA Leadersequenzen auf die RNA-Mengen (3.1) und zum Anderen die Wirkung von kurzen 5'-Leserahmen auf das Translationspotential polycistronischer HIV-1 mRNAs (3.2).

4.1 Der HIV-1-Leader moduliert die Menge der mRNA

HIV-1 kann durch alternatives Spleißen mehr als 30 verschiedene mRNAs bilden, deren Großteil sich im Leaderbereich durch das Fehlen oder Vorhandensein der nichtkodierenden Exons 2 und 3 unterscheiden. Diese Exons treten besonders häufig in der Klasse der 1,8 kb mRNAs aber auch in der Klasse der 4 kb mRNAs auf. Die Konservierung der flankierenden Spleißstellen in den verschiedenen HIV-1 Isolaten legt den Schluss nahe, dass diese nicht kodierenden Exons für die Virusreplikation von Relevanz sind. Die Arbeitsgruppe um Müsing beobachtete bei einer Untersuchung der nicht kodierenden Exons eine 2-fache Stimulation von LTR-CAT-Reportergenkonstrukten durch Exon 2 enthaltende, und eine 5-fache Stimulation durch Exon 3 enthaltende *tat*-cDNA-Konstrukte [220]. Schwartz *et al.* beobachteten durch die Gegenwart der nicht kodierenden Exons eine geringfügige Erhöhung der Expression von *nef*-cDNA-Klonen in konstitutiv Tat-exprimierenden Hltat-Zellen [270]. Dagegen konnte in unserem Labor eine mehr als 2-fache Stimulation der CAT- Reportergenexpression nur für das Exon 2 beobachtet werden. Die Anwesenheit des Exons 3 führte stattdessen zu einer mehr als 3-fachen Inhibition der Genexpression. Diese Effekte ließen sich bereits auf der Ebene der mRNA nachweisen [174;186]. Um die Wirkung der Sequenz von Exon 2 und 3 auf die nukleäre und

zytoplasmatische RNA-Menge zu untersuchen und ihre Funktionsweise zu analysieren, wurden diese Sequenzen in den Leader verschiedener Konstruktserien inseriert und in transienten Transfektionen *in vivo* und mittels Degradationsassay und Affinitäts-Präzipitationsanalysen *in vitro* untersucht.

4.1.1 Der HIV-1-Leader moduliert die nukleäre RNA-Menge

Durch Analyse der Env und CAT-Expression und durch Analyse der RNA im Northern Blot, war in unserem Labor ein Einfluss der unterschiedlichen Leaderexonsequenzen auf die Menge der RNA gezeigt worden [174;186]. Zusätzlich zeigten „pulse chase“ Experimente mit gleichzeitiger Inhibierung der RNA Synthese durch Actinomycin D keine Leaderexon-bedingten Unterschiede der zytoplasmatischen RNA-Halbwertszeiten [186]. Durch die präparative Trennung von Kern- und Zytoplasma-RNA war es möglich, den expressionsstimulierenden Effekt von Exon 2 und den expressionsinhibierenden Effekt von Exon 3 bereits auf Ebene der prä-mRNA im Kern nachzuweisen (siehe 3.1.1.1, Abb. 9B, C). Außerdem belegte eine *in vitro* Transkription von cDNA-Konstrukten, die sich durch die An- oder Abwesenheit der nicht kodierenden HIV-1 Exons unterschieden, in HeLa-Kernextrakt (siehe 3.1.6.1, Abb. 20) sowie in unserem Labor bereits zuvor gemachte Run-on-Analysen der Transkriptionsraten [186], dass die Transkriptionsraten unabhängig von der Gegenwart unterschiedlicher Leadersequenzen waren. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Leader-vermittelten Mengenunterschiede der nukleären RNA auf posttranskriptionaler, nukleärer Ebene und damit auf Ebene der nukleären RNA-Stabilität auftraten. Dies konnte in dieser Arbeit zusätzlich durch die sequenzspezifischen RNA-Degradationsraten in HeLa-Kernextrakt *in vitro* bestätigt werden (siehe 3.1.6.3).

Obwohl bis heute mehr über die zytoplasmatische als über die nukleäre RNA-Degradation bekannt ist, stellte sich heraus, dass bis zu 95 % der von der RNAP II polymerisierten Transkripte bereits im Kern degradiert werden [143]. Diese RNA-Degradation scheint eng mit der Transkription sowie der RNA-Prozessierung der prä-mRNA verbunden zu sein, was eine Qualitätskontrolle der Transkripte ermöglicht [149;251]. Weiterhin erlaubt der hohe RNA-Turnover im Kern eine nukleäre, posttranskriptionale Regulation der translatierbaren RNA-Menge. Bekannte Beispiele für die Modulation der nukleären RNA-Stabilität sind das 60 nt lange Fragment der Folat-Rezeptor α (FR α) Sequenz, das für eine

nukleäre Instabilität im Zuge der gewebespezifischen Expression verantwortlich ist [327], die GM-CSF prä-mRNA-Destabilisierung durch IL4 [5] oder die Kern-RNA-Stabilisierung des Dihydrofolatreduktase-Transkripts in sich teilenden Zellen [188]. Auch für die *mr1*-Expression konnte gezeigt werden, dass ihre Induktion durch das *c-myc* Protein ein nukleäres, posttranskriptionales Ereignis ist [244]. Für die *eIF-2 α* - [58], bzw. die MHC I-Expression [296], und eine Reihe weiterer Gene [80;227;300], konnte ebenfalls eine nukleäre, posttranskriptionale Regulation nachgewiesen werden. Allerdings wurden die Mechanismen, die den unterschiedlichen RNA-Stabilitäten zugrunde liegen, nicht weiter charakterisiert. Eine der wenigen Untersuchungen, die eine Destabilisierung von RNA im Kern weiter analysierten, galt einem AU-reichen Element (ARE) des Typ II in Transkripten des humanen Papillomavirus. Durch die Experimente von Schwartz *et al.* konnte für dieses ARE nachgewiesen werden, dass eine artifizielle Transkription der Sequenz im Zytoplasma mit einem Vaccinia/T7 RNA-Polymerase System die destabilisierende Funktion des AREs umgeht. Die Transkription der Sequenz im Kern selbst war Voraussetzung für den destabilisierenden Effekt des AREs [289]. Eine Kompensation der Expressionsinhibition dieses AREs konnte durch Insertion eines RREs und Rev-abhängigen Export bzw. durch Insertion eines konstitutiven Transport Elements umgangen werden [289]. Dies impliziert eine Wirkung dieses Elementes im Kern im Zuge der späten mRNA-Reifung bzw. des Transports. Um den Mechanismus zu charakterisieren, der zur leaderabhängigen Variation der RNA-Stabilität führte, wurden hier zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum Einen wurde versucht einzugrenzen, zu welchem Zeitpunkt der RNA-Prozessierung die nicht kodierenden HIV-1 Exons wirkten, zum Anderen wurde versucht, Proteine zu charakterisieren, die zur RNA-Stabilisierung oder -Degradation beitragen.

4.1.2 Der HIV-1-Leader moduliert die nukleäre RNA-Menge vor dem Spleißen

Um herauszufinden, ob die Leaderexon-vermittelten, nukleären Effekte vor oder nach dem Spleißen stattfinden und dadurch eine zeitliche Einordnung in der RNA Prozessierung zu ermöglichen, wurden die Sequenzen der Leaderexons in ein Intron im 5'-untranslatierten Bereich eines CAT-Reportergenkonstrukts kloniert. Damit wurden die Leaderexonsequenzen beim Spleißen aus der prä-mRNA entfernt. Auch unter diesen Bedingungen erhöhte Exon 2 die CAT-Expression, während Exon 3 sie reduzierte (siehe

3.1.1.3). Die Leadersequenz-abhängigen Expressionsunterschiede bei der Positionierung der Sequenzen im Intron blieben damit vergleichbar mit den Ergebnissen bei Positionierung der Leaderexons in nicht spleißbaren cDNA Derivaten (siehe 3.1.1.1). Die Beeinflussung der RNA-Menge im Kern durch die Sequenz des Exons 2 oder 3 fand also bereits vor dem Spleißen statt.

Eine Besonderheit zeigte sich bei gleichzeitiger Gegenwart beider Exonsequenzen im Intron. Diese Konstellation führte zu einer hohen Menge ungespleißter RNA im Kern jedoch nur zu einer geringen Menge gespleißter RNA im Kern und im Zytoplasma. Daraus folgte eine Inhibition der CAT-Expression. Durch das Zusammenlegen der Sequenzen von Exon 2 und 3 in ein Intron wurde also offenbar ein künstliches, spleißinhibierendes Element entdeckt, das als Beleg für den modularen Aufbau von Spleißenhancern oder –silencern gelten darf. Weitergehende Analysen in unserem Labor deuten darauf hin, dass Bindungen von SR- und hnRNP-Proteinen beim Zustandekommen dieser Spleißinhibition eine Rolle spielen (siehe 3.1.6.4.3, Abb. 26 und M. Hipp, pers. Mitteilung). So wurde beispielsweise von Bilodeau *et al.* auch eine Bindung von hnRNP A1 an Exon 3 nachgewiesen, das zu einer reduzierten Spleißeffizienz führte [19]. Nach der Insertion eines RREs (siehe 4.1.3) in den 3'-Bereich des Transkripts konnte die Spleißinhibition durch Rev umgangen werden, was sich in einer hohen Rev-Induzierbarkeit der CAT-Expression und der zytoplasmatischen mRNA-Menge äußerte. Rev war also in der Lage, die im Kern akkumulierende RNA in das Zytoplasma zu transportieren, wodurch die Verweildauer im Kern herabgesetzt und die Wahrscheinlichkeit einer RNA-Degradation verringert wurde. Um die Wirkung der Leaderexons möglicherweise zeitlich weiter einzugrenzen, wurde das RRE auch in den 3'-Bereich der übrigen Konstrukte mit den Leadersequenzen im Intron kloniert. Dabei war es entscheidend, eine RRE-Struktur zu verwenden, die eine effiziente Rev-Induktion bei gleichzeitiger Abwesenheit eines CRS-Effekt ermöglicht (4.1.3).

4.1.3 Einfluss der RRE-Strukturen auf mRNA-Menge und Rev-Funktion

Durch die Bindung von Rev an das RRE werden ungespleißte virale Transkripte in das Zytoplasma transportiert. Die Rev/RRE-Wechselwirkung findet also vor dem Spleißen statt. Um zu untersuchen, ob die Wirkung unterschiedlicher Leadersequenzen auf die RNA-Stabilität bereits vor der Rev/RRE-Interaktion einsetzt, sollte ein RRE in den

3'-Bereich der CAT-Reportergergenkonstrukte mit den Leaderexonsequenzen im Intron kloniert werden (siehe 4.1.4). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden jedoch Sequenzbereiche innerhalb des RREs charakterisiert, die in Abwesenheit von Rev zu einer Expressions-Reduktion führten, während die Rev-Reaktivität gleichzeitig erhöht war [34;138;255]. Solche als *cis* wirkende repressive Sequenzen (CRS) bezeichneten Elemente sind auch an anderen Positionen des HIV-Genoms, z.B. in der *gag*-Sequenz, zu finden und werden als eine Voraussetzung für die Rev-Induzierbarkeit der HIV-Replikation angesehen [55;120;255]. Um eine Überlagerung mit RNA-destabilisierenden Effekten der Leadersequenz wie z.B. durch die Exon 3 Sequenz zu vermeiden, wurde eine RRE-Sekundärstruktur gesucht, die nicht als CRS-Element wirkt, aber trotzdem eine effiziente Rev-Induktion erlaubt. Da die bisher publizierten Ergebnisse keine einheitliche Identifizierung des CRS-Elements im RRE zuließen, wurde anhand von CAT-Reportergergenkonstrukten untersucht, ob und welche RRE-Teilsequenzen als CRS-Element wirken können und welche der Teilsequenzen die RNA-Exportfunktion des RREs gewährleisten. Dazu wurden verschiedene RRE-Deletionsmutanten *in vivo* in CAT-Assays auf ihre Wirkung als CRS-Element und auf die Induzierbarkeit der CAT-Expression durch Rev und *in vitro* in Elektrophorese-Mobilitätshift-Experimenten auf ihre Fähigkeit zur Rev-Bindung untersucht.

Die Elektrophorese-Mobilitätshift-Experimente zur Analyse der Rev-Bindung zeigten, dass eine initiale Rev-Bindung bereits bei einer kleinen RRE-Struktur zu beobachten war, die nur aus Stamm 2 und dem Beginn des sich anschließenden Stamms 1 bestand (RRE94). Dies steht in Übereinstimmung mit der Lokalisation der initialen Rev-Bindestelle in Stamm 2b [138;208;284]. Nach der initialen Rev-Bindung findet eine Multimerisierung weiterer Rev-Proteine über den Stamm 1 statt, die mit der Rev-Funktion korreliert [208]. Im HIV-Replikationszyklus muss daher zunächst eine bestimmte Rev-Konzentration erreicht werden, bevor der Export intronhaltiger Konstrukte und damit die Translation der Strukturproteine und Enzyme möglich wird [243]. Eine Multimerisierung von Rev war dementsprechend im *in vitro* Experiment durch mehrere distinkte Shift-Ereignisse an einem vollständigen RRE (RRE351) aber nicht an dem kurzen RRE94 nachweisbar.

Die Notwendigkeit zur Multimerisierung von Rev an der Stamm 1 Sequenz bestätigte sich in den *in vivo* Experimenten. Die initiale Rev-Bindung der kleinen RRE-Struktur war für

die funktionelle Rev-Reaktivität eines CAT-Reportergenkonstrukts *in vivo* nicht ausreichend, da hier nur eine 2-fache Rev-abhängige Stimulation der CAT-Expression nachzuweisen war. Das vollständige RRE351 sowie das RRE mit einem nur leicht verkürzten Stamm 1 (RRE234) führten dagegen zu einer 8-fachen Rev-Induzierbarkeit (siehe 3.1.2.2, Abb. 14E). Auch eine Deletion der Sequenzen von Stamm 3, 4 und 5 (RRE261) zeigte keinen Einfluss auf diese Rev-Induktion. Daraus ließ sich schließen, dass eine Mindestlänge des Stamms 1 nötig war, um eine multimere Rev-Bindung und damit eine funktionelle Rev-Reaktivität zu erhalten, während Stamm 3-5 und die äußere Region des Stamms 1 dafür nicht nötig waren. Diese Beobachtungen standen in guter Übereinstimmung mit den von Solomin *et al.* gemachten Deletionsanalysen zur Rev-Reaktivität. Auch dort konnte eine Deletion der Stamm-Strukturen 3, 4 und 5 die Rev-Reaktivität nicht unterdrücken und eine Verkürzung des Stamms 1 ließ auf ein minimales Rev-reaktives RRE mit einer Gesamtlänge von 204 nt schließen (Abb. 36A) [284].

Bereits in früheren Arbeiten wurde eine verringerte Reporter-Gen-Expression in Anwesenheit der RRE-Sequenz beschrieben. Dieser negative Effekt wurde z.B. von Rosen und Mitarbeitern auf 42 nt im Stamm 1 zurückgeführt (Abb. 36B, blau), die in einem CAT-Reportergenkonstrukt zu einer 4-fachen Verringerung der Genexpression und einer gleichzeitigen Erhöhung der Rev-Reaktivität um den Faktor 3 führten [255]. Brighty und Rosenberg bezeichneten in *Drosophila*-Zellen sogar einen Großteil des RREs, beginnend mit der Stamm 2-Sequenz bis hin zu einer *HindIII* Schnittstelle am 3'-Ende des RREs (nt 7796-8131 der pNLA1 Sequenz) als CRS-Element (Abb. 36B, grau unterlegte Sequenz) [34]. Die Feststellung, dass das RRE in seiner Gesamtheit als CRS-Element wirkt, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Insertion des vollständigen RREs in den heterologen Kontext des CAT-Reportergenkonstrukts hatte keinen negativen Effekt auf die CAT-Expression, das vollständige RRE wirkte also nicht als CRS-Element (siehe 3.1.2.2, Abb. 14B). Auch die Insertion eines RREs mit Deletion der Stamm 3, 4 und 5 Sequenz (RRE261) zeigte keinen Effekt auf die Expression. Die Insertion einer minimalen RRE-Struktur, bestehend aus Stamm 2 und dem angrenzenden Teil des Stamms 1 (RRE94), führte sogar zu einer erhöhten CAT-Expression. In Kombination mit einem verkürzten Stamm 1 wirkten jedoch die Stamm 3, 4 und 5 Sequenz (RRE184) sowie der mittlere Teil des Stamms 1 (RRE234) als CRS-Element (Abb. 36C, rot) und führten zu einer Inhibition

der CAT-Expression. Dabei war die Sequenz in Stamm 1 mit der von Rosen beschriebenen CRS-Sequenz (Abb. 36 B, blau) teilweise deckungsgleich.

Während von Malim zunächst eine RRE-Struktur von 234 nt theoretisch vorhergesagt wurde [205], konnten Mann und Mitarbeiter später experimentell anhand von „nuclease protection assays“ zeigen, dass die Sequenzen von Stamm 3, 4 und 5 *in vivo* eine andere Sekundärstruktur aufweisen als vorhergesagt. Die vollständigen RRE-Sekundärstruktur wird demnach aus einer Sequenz von 351 nt Länge gebildet [205;208]. Dies war von Interesse, da ein negativer Effekt auf die Expression in den hier vorgestellten Experimenten nur bei Insertion von artifiziellen, im Stamm 1 verkürzten RRE-Teilstrukturen auftrat, was darauf beruhen könnte, dass bei einer Verkürzung des Stammes 1 eine andere Sekundärstruktur ausgebildet wird. Dieser Zusammenhang wurde auch durch Experimente von Huang und Mitarbeitern unterstützt. Bei Deletionsanalysen zeigte sich hier für eine Sequenz, die neben dem RRE auch weitere von Rosen charakterisierte CRS-haltige Sequenzen 5'-wärts des RREs enthielt [255] ,und zunächst auch für die Stamm 2 Sequenz, eine Funktion als CRS-Element [138]. Eine selektive Insertion einer Teilsequenz

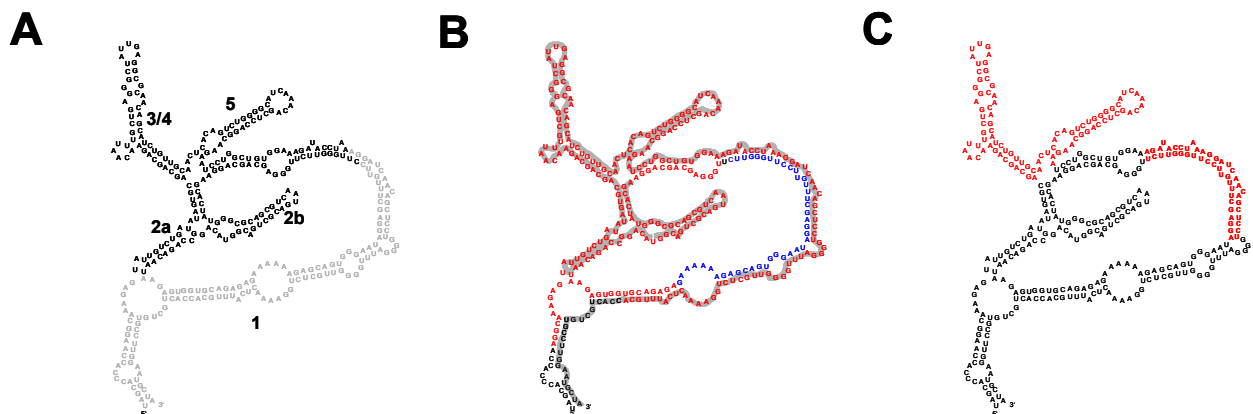


Abb. 36: RRE-Sekundärstruktur. (A) Darstellung der *in vivo* funktionellen minimalen RRE-Sequenz mit 204 nt nach Solomin ([284] schwarz hervorgehoben). Die hier gewählte Darstellung der Sekundärstruktur entspricht der von Mann experimentell ermittelten Basenpaarung [208]. (B) Blau hervorgehoben ist die von Rosen *et al.* als CRS charakterisierte Sequenz [255]. Grau unterlegt sind die von Brighty *et al.* gemachte Deletion des CRS [34]. Rot hervorgehoben ist die von Huang *et al.* verwendete RRE-Sequenz; die keinen Einfluss auf die Expression zeigte [138]. (C) Rot hervorgehoben sind die, in der vorliegenden Arbeit im Kontext eines verkürzten RREs ermittelten, destabilisierenden Sequenzen. Die zusätzliche Nummerierung in (A) zeigt die Benennung der einzelnen Stamm-Strukturen an.

des RREs von 318 nt, die eine Sekundärstruktur mit 280 nt Länge und einem nahezu vollständigen Stamm 1 ausbilden sollte, führte dagegen — ähnlich zu den hier gezeigten Ergebnissen mit der RRE351-Struktur — nicht zu einer Inhibition der Expression (36B, rote + blaue Sequenz) [138]. Der Befund, dass ein CRS-Effekt nur in artifiziellen RRE-Strukturen mit verkürztem Stamm 1 zu beobachten war, könnte auch relevant für die unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sein. Die Tatsache, dass aufgrund der eingefügten Deletionen unterschiedlich lange Sequenzen als RRE untersucht wurden, könnte auch bei dem von Rosen *et al.* im RRE gefundenen CRS-Element eine Erklärung für die beobachteten Effekte sein. Insgesamt legten die Experimente nahe, dass die beobachtete Wirkung als CRS-Element von der eingefügten bzw. sich bildenden Sekundärstruktur, jedoch nicht notwendigerweise von der eingefügten Sequenz abhing.

Nach diesem Ergebnis wurde für die weiteren Experimente zur Charakterisierung der RNA-Stabilität in Abhängigkeit von der Leadersequenz ein vollständiges RRE (RRE351) verwendet, das keine negative Wirkung auf die CAT-Expression und eine 8-fache Induktion durch Rev zeigte.

4.1.4 Mögliche zeitliche Eingrenzung der Wirkung der kleinen nichtkodierenden Exons durch die Rev/RRE-Interaktion

Aufgrund der Rev/RRE-Wechselwirkung vor einem möglichen Spleißereignis sollte die Insertion des RRE351 eine genauere zeitliche Eingrenzung der Wirkung der Sequenzen von Exon 2 und 3 erlauben. Dabei stellte sich heraus, dass die Insertion des RREs bereits bei einem Konstrukt mit Minimal-Intron zu einer erhöhten CAT-Reporterexpression führte (siehe 3.1.2.2, Abb. 15). Auf Ebene der Kern-RNA konnte eine Erhöhung der prä-mRNA-Menge durch die Anwesenheit der Exon 2 Sequenz im Intron und eine Erniedrigung der prä-mRNA-Menge durch die Anwesenheit der Exon 3 Sequenz im Intron nach wie vor beobachtet werden (siehe 3.1.4, Abb. 16C nc). Die Erniedrigung der prä-mRNA-Menge durch die Anwesenheit der Exon 3 Sequenz war auch auf Ebene der CAT-Expression und der zytoplasmatischen mRNA-Menge nachweisbar (vergleiche 3.1.1.3, Abb. 11B, C, E/P, EX 3 und 3.1.4, Abb. 16B, C E/P R, EX 3 R). Die Gegenwart der Sequenz des Exons 3 bzw. der Exons 2/3 führte zusätzlich zu einer Spleißinhibition, die die Menge gespleißter RNA reduzierte. Für das Konstrukt mit Exon 2 im Intron konnte eine mögliche Stabilisierung durch Exon 2 in Gegenwart des RREs nicht mehr beobachtet

werden, da hier möglicherweise eine gleichzeitig auftretende Spleiß- oder Transportinhibition des Exons 2 die zytoplasmatische mRNA-Menge reduzierte (3.1.4, Abb. 16C E/P R, EX 2 R). Diese Spleiß- oder Transportinhibition der Sequenz des Exons 2 im Intron war nur in Kombination mit dem RRE zu beobachten.

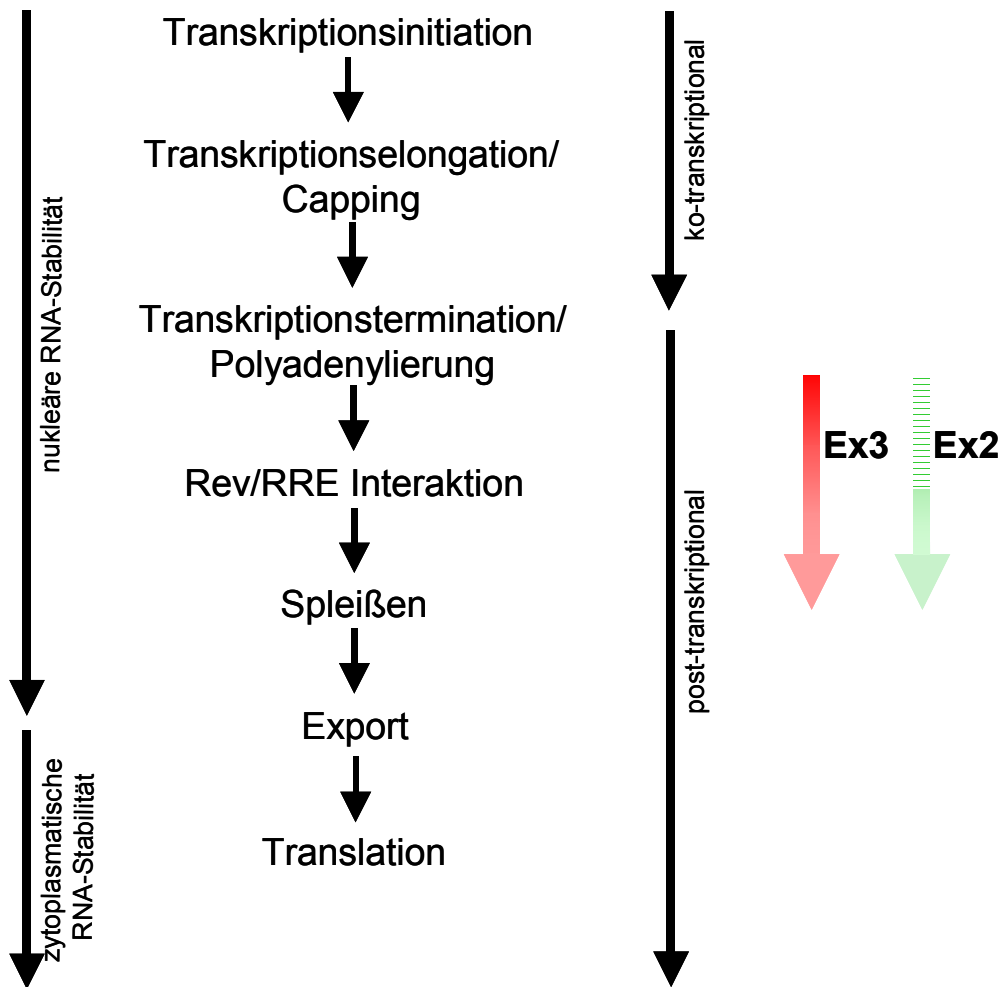


Abb. 37: Chronologischer Ablauf der RNA-Prozessierung. Schematische Darstellung der verschiedenen Ereignisse von der Transkriptionsinitiation bis zur Translation. Anhand der Experimente konnte die Wirkung der Leaderexons (roter und grüner Pfeil) auf die RNA-Stabilität als nukleäres, posttranskriptionales Ereignis charakterisiert werden, dass die Transkriptionsrate nicht beeinflusst und vor dem Spleißen (Ex 2) bzw. vor der Rev/RRE-Interaktion (Ex 3) stattfindet.

In Gegenwart von Rev wurde die ungespleißte prä-mRNA in das Zytoplasma transportiert. Dadurch ließ sich die nukleäre sequenzabhängige prä-mRNA-Mengenverteilung ansatzweise im Zytoplasma wiederfinden. Die Rev-Zugabe erhöhte auch die relative Menge der Exon 2-haltigen Transkripte. Allerdings war auch unter diesen Bedingungen die Bestimmung der stabilisierenden Wirkung der Sequenz des Exons 2 behindert, sodass auf dessen stabilisierende Wirkung vor oder nach der Rev/RRE-Wechselwirkung nicht sicher geschlossen werden konnte. Die hier gemachten Untersuchungen ergaben, dass das Capping der RNA die durch die nicht kodierenden Exons hervorgerufenen Unterschiede reduziert aber nicht aufhebt. Die Capping-Effizienz selbst war nicht abhängig von der Gegenwart der verschiedenen nicht kodierenden Exons (3.1.6.2). Ebenso wenig beeinflussten die Sequenzen der Leaderexons offenbar die Polyadenylierungseffizienz [186]. Damit ließ sich die Wirkung des Leaderexons 2 als ein nukleäres posttranskriptionales Ereignis charakterisieren, das bereits vor dem Spleißen beginnt, während die Wirkung des Leaderexons 3 bereits vor der Rev/RRE-Wechselwirkung beginnt (Abb. 37).

4.1.5 RNA-Degradation *in vitro*

Um ein experimentelles System zu schaffen, in dem biochemische und mechanistische Aspekte der nukleären Degradation untersucht werden können, wurde ein *in vitro* Assay zur Analyse der RNA-Stabilität etabliert. In Gegensatz zu den bereits bekannten *in vitro* Assays, mit denen die zytoplasmatische RNA-Stabilität unter Nutzung eines S100-Extrakts reproduziert werden konnte [92], sollte in diesem Assay die nukleäre RNA-Stabilität unter Nutzung eines Extrakts aus HeLa-Zellkernen reproduziert werden. *In vitro* Transkripte mit den alternativen nicht kodierenden Exons wurden für 1-2 Stunden in Gegenwart von NTPs, Kreatinphosphat, DTT und MgCl₂ in HeLa-Kernextrakt inkubiert und die verbleibende RNA quantifiziert (siehe 2.23). Unter diesen Bedingungen konnte ein stabilisierender Effekt für die Sequenz des Exons 2 und ein destabilisierender Effekt für die Sequenz des Exons 3 nachgewiesen werden. Auch ein weiteres bereits beschriebenes RNA-destabilisierendes Element, das Instabilitätselement INS1 aus der p17-*gag*-Sequenz der HIV-1 mRNA [272], zeigte in diesem Assay ein sequenzspezifisches Abbauverhalten. Die *in vivo* beobachteten, sequenzbedingten nukleären RNA-Stabilitätsunterschiede konnten somit hier erstmals in einer *in vitro* Degradation dargestellt werden. Der Einsatz des

zytoplasmatischen S100-Extrakt in den Degradationsassays als zusätzliche Kontrolle führte zu einem Abbauverhalten, welches sich deutlich von den *in vivo* und in Gegenwart von Kernextrakt *in vitro* gemachten Beobachtungen unterschied. Daraus kann geschlossen werden, dass die RNA-Degradation im Kern und im Zytoplasma unterschiedlich verläuft. Möglicherweise tragen kernspezifische Faktoren, deren Beteiligung am nukleären RNA-Abbau bereits gezeigt wurde, wie Rat1p, Rrp6p oder Mrt4p [64] dazu bei.

4.1.5.1 Cap-Abhängigkeit

Die Untersuchung des RNA-Abbaus *in vitro* zeigte in Gegenwart einer Cap-Struktur eine Reduktion der sequenzspezifischen Unterschiede der RNA-Stabilität aber keine Nivellierung. Der verbleibende Abbau erwies sich also auch in Gegenwart der Cap-Struktur als sequenzabhängig. Dies ließ sich als eine primäre Stabilisierung durch die Cap-Struktur zusammen mit einem sequenzabhängigen mRNA-Abbau interpretieren.

Die vorliegenden Daten ließen ein Decapping der HIV-1-mRNAs in Abhängigkeit von den variierenden Leadersequenzen möglich erscheinen. Daher wurde untersucht, ob die nicht kodierenden Exons die Capping-Effizienz der Transkripte beeinflussen (siehe 3.1.6.2). Die Experimente ergaben keinen Unterschied des Verhältnis von gecappten und ungecappten Transkripten in Gegenwart der verschiedenen Leaderexons, die Leadersequenzen beeinflussten demnach die Capping-Effizienz nicht. Allerdings zeigten die HIV-1 Transkripte selbst unter Kotransfektion mit einem Tat-Expressionsplasmid eine Capping-Effizienz, die 40 % unter der Kontrolle der GAPDH mRNA lag. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den von Chiu *et al.* gemachten Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass die HIV-1 Capping-Effizienz Tat-abhängig und in Gegenwart der TAR-Struktur gering ist [49]. Daher ist nicht auszuschließen, dass die reduzierte Capping-Effizienz oder verstärktes Decapping bei HIV-1 Transkripten die Leadersequenz-abhängige Degradation der RNA beschleunigt, was dann zu den deutlichen Sequenz-vermittelten RNA-Mengenunterschieden führt. Sollten die ungecappten RNAs trotzdem für die Translation zur Verfügung stehen, muss die RNA anderweitig stabilisiert und außerdem über nicht Cap-abhängige Translationsmechanismen abgelesen werden. Da der HIV-1-Leader durch seine ausgeprägten Sekundärstrukturen möglicherweise die RNA stabilisieren kann [151] und mehrere interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) beschrieben wurden [28;37], die eine Cap-unabhängige Translation ermöglichen könnten,

könnte eine reduzierte Capping-Effizienz Teil des Gesamtregulationsmechanismus der Genexpression von HIV-1 sein und den Effekt der Sequenzen der Exons 2 und 3 während der Replikation verstärken.

4.1.6 Exon 3 und INS können zu den Typ III ARE gezählt werden

Für das INS1-Element war bereits bekannt, dass ein Vergleichskonstrukt mit 28 stillen Mutationen in der p17-Sequenz, die den AU-Gehalt von 57 % auf 50 % reduzierten, zu höheren RNA-Mengen und einer effizienteren p17-Expression führt [269]. Daher wurden diese RNA-Sequenzelemente ebenfalls im nukleären Degradationsassay untersucht. Auch in diesem Fall konnte das *in vivo* Ergebnis reproduziert und *in vitro* eine geringere RNA-Stabilität des INS-Elements im Vergleich zum mutierten INS^{GC}-Elements nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit der nukleären RNA-Stabilität vom AU-Gehalt tritt auch in anderen Zusammenhängen auf. So destabilisiert ein 60 nt großes RNA-Fragment des Folat-Rezeptor- α (Fr- α) mit einem AU-Gehalt von 51 % die nukleäre RNA, während das korrespondierende nicht destabilisierende Fr- β Fragment einen AU-Gehalt von 35 % aufweist [327]. Diese Übereinstimmung legt es nahe, den AU-Gehalt an sich bereits als Marker der nukleären RNA-Stabilität anzusehen. Da auch die Exon 3 Sequenz mit 59 % einen hohen AU-Gehalt aufweist, wurde das Vergleichskonstrukt Exon 3^{GC} mit 20 stillen Punktmutationen im *vif*-Leserahmen und niedrigerem AU-Gehalt von 32 % kloniert und analysiert. Auch die mutierte Sequenz des Exons 3 (Ex 3^{GC}) zeigte wie die INS1 Mutante eine Erhöhung der mRNA-Mengen basierend auf nukleären Ereignissen. Aufgrund des AU-Gehaltes und dessen RNA-reduzierender Wirkung lassen sich die Exon 3 und INS-Sequenzen zur Klasse der RNA-Stabilität beeinflussenden AU-reichen Elemente zählen.

Ob und inwieweit AU-reiche Sequenzen als destabilisierende AU-reiche Elemente fungieren, hängt von ihrer Sequenz und auch von den daraus resultierenden Sekundärstrukturen ab [317]. Sequenzen, die neben einem hohen AU-Gehalt das AUUUA Motiv enthalten, werden bei verteiltem Auftreten des Motivs, wie beispielsweise bei c-fos, als Typ I Element bezeichnet. Tauchen die Motive in Verkettung auf, wie beispielsweise bei GM-CSF, werden sie dem Typ II zugeordnet. Fehlen diese AUUUA Motive, wie beispielsweise bei c-jun, sind die Sequenzen den Typ III AU reichen Elementen zuzurechnen [320]. Da die hier untersuchten HIV-Sequenzen des p17-INS1-Elementes und

des Exon 3 AU-reich sind, dabei jedoch keine klassischen AUUUA Motive enthalten, können sie den Typ III AU-reichen Elementen zugeordnet werden. Unterstützt wurde die mögliche Zugehörigkeit der destabilisierenden Sequenz des Exons 3 zu der Gruppe AU-reicher Elemente des Typs III durch das Abbauverhalten: Bei einer Messung der RNA-Halbwertszeit nach Actinomycin D Inhibition der Polymerase II ist der destabilisierende Effekt nicht AUUUA enthaltender Typ III Elementen, wie beispielsweise bei c-jun, nicht zu beobachten [44;237]. Dies traf auch auf die Sequenz des Exons 3 zu, dessen Abbauverhalten nicht in Actinomycin D [186], wohl aber unter physiologischen Bedingungen des *in vitro* Assay in Kernextrakt nachweisbar war (siehe 3.1.6.3.2).

Ungewöhnlich für ein ARE des Typs III ist allerdings die Positionierung des kleinen nicht kodierenden Exon 3 und des INS-Elements am 5'-Ende der Transkripte. Diese Position ist in vielen beschriebenen Fällen stabilisierenden Sequenzen vorbehalten. So konnte hier für die Exon 2 Sequenz gezeigt werden, dass der stabilisierende Einfluss von der Positionierung im 5'-UTR abhängig ist. Eine Positionierung der Leaderexons 3'-wärts des CAT-Leserahmens zeigte für alle inserierten Leaderexons eine reduzierte Genexpression (vgl. 3.1.1.2, Abb. 10). Außerdem gibt es einige Fälle, in denen Sequenzen im 5'-UTR - vergleichbar zur der Wirkung der hier untersuchten Wirkung der Exons 2 Sequenz - zur Stabilisierung beitragen. So führen die ersten 114 nt der IL2-mRNA bei Stimulierung der MAPK/ERK Kinase Kinase 1 (MEKK1: Teil der stressinduzierten JNK Signal Transduktion und über IKK1-Phosphorylierung des NF-kappaB Signal Kaskade) zur Stabilisierung der RNA [46]. Unter der Annahme, dass Exon 3 als ein AU-reiches Element die RNA-Menge im Kern reduziert, stellt sich die Frage, in wie weit ARE anderer Gene im Leaderbereich ihre Funktion ausüben. Die meisten der bekannten RNA-destabilisierenden ARE sind im 3'-UTR und einige in der kodierenden Sequenz zu finden. Für die FR α -Sequenz erwies sich ein Teil der kodierenden Sequenz als gewebespezifisches, destabilisierendes Element [327]. Weiterhin sind destabilisierende ARE in der kodierenden Region des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2 [295] und von c-fos gefunden worden [302]. Allerdings sind destabilisierende Elemente im 5'-Bereich nicht völlig unbekannt. So konnte für die Mäuse-Thymus-Sialidase die Gegenwart einer AU-reichen destabilisierenden Sequenz im 5'-UTR der RNA nachgewiesen werden. Das Vorhandensein dieser Sequenz im Transkript korrelierte mit der thymusspezifischen Expression der Sialidase [162]. Die 319 nt lange Leadersequenz enthielt ebenfalls keine

AUUUA-Motive, sodass auch dieses Sequenzelement zu den Typ III ARE gezählt werden kann.

4.1.7 Interaktion der ARE mit spezifischen Proteinkomponenten

Nachdem für die Leaderexons und die INS1-Sequenz eine sequenzabhängige Degradation nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, wie diese Degradation vermittelt wird. Daher wurde untersucht, ob ein sequenzabhängiges Bindeverhalten von Proteinen vorliegt, die den RNA-Abbau stimulieren oder inhibieren können.

Für die zytoplasmatisch wirkenden ARE konnte eine spezifische Bindung des RNA-stabilisierenden Proteins HuR bzw. der destabilisierenden Proteine AUF1 (hnRNP D) und Tristetraprolin beobachtet werden. Da es sich bei den oben genannten Proteinen um „shuttle“-Proteine handelt, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden sind, könnten diese Proteine auch zur nukleären RNA-Stabilisierung bzw. Destabilisierung beitragen. Dies erscheint um so wahrscheinlicher, da auch die übrigen bekannten für den RNA-Abbau nötigen Komponenten wie beispielsweise Exosomen oder 5'-3'-Exonukleasen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorzufinden sind [26]. So vermuten Moore und Mitarbeiter, dass nukleäre mRNA durch Bindung von HuR im Kern vor einem nukleären Abbau geschützt werden und ins Zytoplasma geleitet werden kann [218]. In den hier gezeigten Affinitätspräzipitations-Experimenten konnte eine sequenzspezifische Bindung von AUF1 und HuR für das INS-Element beobachtet werden. Überraschenderweise zeigte sich nach der Immunodetektion mit einem AUF1-Antikörper eine Bindung verschiedener AUF1-Isoformen mit geringerem Molekulargewicht an die Sequenz des INS-Elements. Das Ins^{GC}-Element zeigte dagegen eine starke Bindung eines hochmolekularen Proteins. Möglicherweise basiert die Bindung der verschiedenen AUF1-Isoformen auf unterschiedlichen Sekundärstrukturen, die die beiden Sequenzen (INS und INS^{GC}) bilden können. Die Wirkung von AUF1 ist unter anderem vom Phosphorylierungszustand abhängig. So führt unphosphoryliertes p40-AUF1 zu einer kondensierten RNA Formation, die bei Phosphorylierung nicht auftritt. [316]. Außerdem konnte für das ARE des TNF α beispielsweise eine Mg²⁺-Abhängigkeit der AUF1-Bindung nachgewiesen werden, was ebenfalls mit einer RNA-Konformationsänderung in Zusammenhang gebracht werden könnte [317].

Für das INS-Element und die Ins^{GC}-Mutation korrelierte danach die Bindung der niedermolekularen AUF1-Formen mit der Destabilisierung. Dafür spricht außerdem, dass die kleineren Isoformen p37 und p40 im höheren Maß ubiquitiniert werden [182], wobei die Ubiquitinierung wahrscheinlich zum AUF1-vermittelten RNA-Abbauprozess beiträgt [181]. Daher lässt sich postulieren, dass die Bindung niedermolekularer AUF1-Isoformen besonders zur Destabilisierung von INS1 beiträgt. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den von verschiedenen Arbeitsgruppen gemachten Beobachtungen, dass die niedermolekularen AUF1-Isoformen stärker zur Degradation beitragen als die hochmolekulare p45 Form [196;248;262].

Die Bindung von AUF1 an die Sequenzen der Exons 2 und 3 lieferte nur ein Signal für die hochmolekulare Bande. Diese war in Gegenwart des Exons 3 deutlich stärker als in Gegenwart des Exons 2 und des Exon 3^{GC}. Damit korrelierte hier die Menge der gebundenen hochmolekularen Form von AUF1 mit der zuvor beobachteten Instabilität. Die Bindung der hochmolekularen Protein-Form deckt sich mit dem primär nukleären Auftreten der hochmolekularen AUF1-Formen p42 und p45 [326]. Da für AUF1 eine Degradation von RNA mit ARE des Typ III beobachtet worden war [262], könnte AUF1 sowohl im Fall des INS-Elementes als auch im Fall der Exon 2 und 3 Sequenzen die RNA für einen nukleären Degradationsprozess markieren und den Abbau der RNA bewirken. Es bleibt zu klären, welche Rolle die hochmolekulare AUF1-Isoform spielt und ob unterschiedliche Mechanismen für die Degradation durch Exon 3 oder das INS-Element verantwortlich sind.

Ein weiteres Protein, das an AU-reiche Elemente bindet ist HuR, welches stabilisierend auf die RNA wirkt. Trotz seiner reduzierten Affinität zu Typ III ARE [46] könnte dieses primär nukleäre Protein an die RNA der Exon- und INS-Sequenzen sowie die GC-reichen Mutationen von Exon 3 und INS1 binden und sie vor Degradation schützen. Für HuR wurde eine Variation der Funktion durch Phosphorylierung beobachtet. So führte die Phosphorylierung durch eine AMP-abhängige Kinase zu einer Kernretention von HuR [305], eine weitere Möglichkeit der HuR-Regulation basiert auf der Methylierung von HuR nach LPS-Stimulation [190]. HuR zeigte eine bevorzugte Bindung bei INS^{GC}, sowie von Exon 3^{GC}, was sich mit der stabilisierenden Funktion von HuR korreliert. Allerdings korrespondiert die geringe Bindung von HuR an Exon 2 bzw. Exon 2/3 nicht mit deren

relativer Stabilität. Die Stabilisierung durch Exon 2 scheint also über andere Proteine vermittelt zu werden, was auch der Tatsache entspricht, dass die Sequenz des Exons 2 keine AU-reichen Elemente enthält.

Möglicherweise müssen die Stabilisierung oder Destabilisierung auch als Konkurrenz der beiden Proteine AUF1 und HuR an der gleichen RNA gewertet werden, wie bereits von Moore postuliert [218]. Die HuR-Bindung könnte so einen Schutz der ARE-enhaltende RNA vor AUF1-Bindung darstellen und, da AUF1 auch mit dem Exosom interagiert [43], die RNA vor dem Abbau schützen. Damit müsste nicht die Bindung eines der Proteine sondern das Zusammenspiel der stabilisierenden bzw. destabilisierenden Faktoren in Abhängigkeit von der jeweiligen Affinität der Proteine und zusätzlichen Kofaktoren betrachtet werden. So könnte in dem einen Fall die Bindung stabilisierender Proteine wie HuR überwiegen, während im nächsten Fall die Bindung destabilisierender Proteine wie AUF1 überwiegen würde. Eine erste Analyse des Quotienten von HuR zu AUF1-Bindung im Immunoblot zeigte eine hohe Übereinstimmung mit den *in vivo* beobachteten RNA-Stabilitäten. So lagen die Werte für die stabilen Sequenzen INS^{GC} und Exon 2 oberhalb von 1, während die Werte für die übrigen analysierten Konstrukte unter 1 lagen.

4.1.8 Modell

Ausgehend von den unterschiedlichen Stabilitäten der Konstrukte INS-1/INS-1^{GC} und Exon 3 Exon 3^{GC} mit einer Beschränkung der Instabilität auf das Kernkompartiment, wurde die Modellvorstellung entwickelt, dass das Maß an Destabilisierung zum Einen vom AU-Gehalt der Sequenzen und zum Anderen von der Verweildauer im Kern abhängt. Die Verweildauer selbst kann durch die Förderung des Exports reduziert werden. Dies konnte durch zusätzliche Transportelemente wie z.B. das RRE oder durch die Erhöhung der Spleißeffizienz durch einen verbesserten Spleißakzeptor geschehen. Beim Fehlen effizienter Spleißereignisse (z.B. *env*-Konstrukte bzw. Konstrukte mit suboptimalen Spleißakzeptoren, oder ohne effiziente Spleißstellen, wie bei verschiedenen CAT-Konstrukten) ist die Verweildauer des einzelnen Transkripts im Kern hoch, die Konstrukte werden sequenzabhängig zu einem Großteil degradiert. Wird die Exporteffizienz erhöht, z.B. durch den Rev/RRE-Export, sinkt die Verweildauer im Kern und damit die Destabilisierung. Dies steht in Übereinstimmung mit der beobachteten höheren Rev-Reaktivität - d.h. der Rev-vermittelten RNA-Exportsteigerung - der instabilen Konstrukte

INS-1 und Exon 3 in Gegenwart eines weniger effizienten Spleißakzeptors (siehe 3.1.5, Abb. 19D). In Gegenwart eines effizienten Spleißakzeptors kommt es, wie bei der Wirkung von Rev und RRE, zu einer vergleichbaren Erhöhung der Expression. Ein zusätzlicher Effekt von Rev war in Gegenwart eines optimierten Akzeptors allerdings nicht mehr zu beobachten (Abb. 19E). Dies stand in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus unserem Labor, dass Rev-Reaktivität und Akzeptor-Güte sich umgekehrt proportional zueinander verhalten und ein effizienter Akzeptor mit dem Rev/RRE-Export konkurriert [151]. Damit scheint die Erhöhung der zytoplasmatischen mRNA bei beiden Ereignissen — Rev/RRE-Interaktion und Erhöhung der Spleißeffizienz — aus dem gleichen prä-mRNA-Pool gespeist zu werden, der ohne Rev/RRE- oder Spleiß-vermittelten Export zum größten Teil abgebaut wird. Der Abbau selbst erfolgt über die nukleären RNA-Degradationsmechanismen, die notwendige Markierung der RNA für den Abbau oder den Schutz vor Abbau könnte beispielsweise über HuR oder AUF1 (siehe 4.1.7) sequenzspezifisch erfolgen.

4.1.9 Perspektive

Über nukleäre, postranskriptionale Regulationsmechanismen ist zur Zeit noch relativ wenig bekannt. Erst im Laufe der letzten Jahre wurde deutlich, dass diese Prozesse Schlüsselpositionen der Genregulation darstellen. Damit begannen einige Arbeitsgruppen auch nukleäre RNA-Stabilitäten sowie zugrunde liegende Degradationsmechanismen und die Überwachungsmechanismen, die eine Translation fehlerhafter RNAs verhindern, zu untersuchen [26;132;294;312]. Bei diesen Untersuchungen konnten bereits verschiedene RNA bindende Proteine isoliert werden, wobei deren Einfluss auf nukleäre oder zytoplasmatische Prozessierung bisher nur unvollständig verstanden ist [312]. Mit Hilfe des hier entwickelten *in vitro* Degradationsassays sollten sich in Zukunft Proteine über Affinitäts- oder Immuno-Depletion funktionell auf ihre Rolle im nukleären RNA-Abbau untersuchen lassen. Weiterhin sollte über den Ansatz eines North/Western Blots oder über Hochskalieren der Affinitäts-Präzipitations-Experimente eine Isolierung und Charakterisierung der spezifisch an destabilisierende RNA-Elemente bindenden Proteine möglich sein. Entsprechende Ansätze werden zur Zeit in unserem Labor weiterverfolgt. Eine zusätzliche Möglichkeit zur Untersuchung von sequenzspezifisch RNA-bindenden Proteinen würde sich mit einem Hefe „three hybrid system“ anbieten [147]. Zur

Charakterisierung der sequenzspezifischen Wirkung der nicht kodierenden Exons 2 und 3 wäre es auch interessant, ihre Wirkung in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, um so mögliche Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Wirkung der Exons nachzuweisen.

4.2 Einfluss der Leadersequenzen auf die Translation

Neben RNA-stabilisierenden und destabilisierenden Elementen können auch zusätzliche Leserahmen im 5'-Leader die von einer mRNA translatierten Proteinmengen verändern. Mehr und mehr Daten unterstützen die Vorstellung, dass solche kurzen „upstream“ Leserahmen (uORFs) bei der eukaryontischen Translationsregulation eine Rolle spielen [108;109]. In einigen Fällen liegen diese kurzen Leserahmen vor den Hauptleserahmen von Protoonkogenen, die für Zellwachstum oder -differenzierung verantwortlich sind, wie beispielsweise vor dem humanen *bcl-2*- oder dem murinen *p53*-Gen [166;171]. Diese uORFs zeigen oft einen inhibierenden Effekt auf die Expression des Hauptleserahmens, was im Einklang mit einer linearen Erkennung der Leserahmen steht. In wenigen Fällen wurde aber auch eine Regulation der Genexpression über stimulierende uORFs beobachtet, beispielsweise bei der Expression von *GCN4* der Hefe, oder der Replikation von Cauliflower Mosaic Virus oder Rous Sarkoma Virus [75;101;129;133]. Diese Regulation lässt sich nur über einen Terminations- und Reinitiationsmechanismus der Translation erklären, bei dem reinitiationskompetente Ribosomen am Startkodon des Hauptleserahmens initiieren (siehe 1.3.2.2).

Die Translation von HIV-1 erfolgt in der Regel linear und in Abhängigkeit von der Cap-Struktur. Durch alternatives Spleißen gelangen die verschiedenen Leserahmen in die 5'-Position des Transkriptes und können so effizient translatiert werden. Je nach Stärke des 5'-AUGs hemmt der erste Leserahmen die Translation weiter 3'-wärts gelegener ORFs, wie im Fall des effizient genutzten *tat*-ORFs, oder er erlaubt einen „leaky scanning“-Mechanismus, bei dem ein Teil der Ribosomen das erste, ineffiziente AUG überlesen und an weiter 3'-wärts gelegenen ORFs initiieren. Dies ermöglicht z.B. in den polycistronischen *vpu-env*-Transkripten das Überlesen des *vpu*-AUGs und eine Initiation am *env*-ORF [271]. Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass ein zusätzlicher, 5'-wärts vor dem *tat*-AUG gelegener uORF das Translationsmuster der polycistronischen HIV mRNA zugunsten einer 3'-wärts initiierten Translation und distaler AUG Erkennung beeinflussen kann. Die Beobachtung wurde mit verschiedenen Konstruktsreien gemacht,

was ihren allgemeingültigen Charakter unterstreicht. Die Gegenwart eines uORFs ermöglichte ein Überspringen des effizienten *tat*-AUGs und führte zu einer gleichzeitigen Expression von Rev und Env von einem polycistronischen HIV-Transkript. Um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen eine uORF vermittelte Translation erfolgt, wurde unter Nutzung verschiedener Promotoren der Einfluss der uORF-Länge, des intercistronischen Abstands und der Initiationseffizienz des uORF-Startkodons analysiert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Beispiele uORF-beeinflusster HIV-1-Translation untersucht.

4.2.1 Einfluss der uORF-Länge auf die Rev-Expression

In vorhergehenden Experimenten wurde bereits gezeigt, dass die Länge des uORFs die Effizienz der Reinitiation beeinflusst [173;197]. Luukkonen *et al.* konnten zeigen, dass eine Zunahme der uORF-Länge von 24 auf 40 Kodons mit einer Abnahme der Translation am 3'-wärts gelegenen Hauptleserahmen korreliert. Hieraus extrapolierten sie, dass ein uORF mit 55 Kodons die Translation des 3'-Leserahmens völlig inhibieren sollte. Allerdings wurde in diesen Konstrukten gleichzeitig die Länge des intercistronischen Abstands von 67 auf 19 nt verkürzt, so dass keine eindeutige Zuordnung des Effekts möglich war [197]. In Experimenten von Kozak, in denen nur die Länge des uORFs verändert wurde, waren dagegen zwei Phasen zu beobachten. Mit einem Abstand von 71 nt zum CAT-Reportergen zeigte sich bei einer uORF Länge zwischen 3 und 13 Kodons keine Änderung der CAT-Expression, während die weitere Verlängerung des uORFs die Translation des Hauptleserahmens graduell inhibierte [173]. Hwang und Su konnten Vergleichbares für das Cd2 Minicistron 120 nt 5'-wärts des Hepatitis B Virus P ORFs zeigen. Sie beobachteten eine optimale 3'-Translation und keine Unterschiede bei einer uORF-Länge zwischen 8 und 13 Kodons, während längere uORFs die Translation des Hauptleserahmens graduell inhibierten [139]. Allen Untersuchungen war jedoch gemein, dass nur die Expression des unmittelbar 3'-wärts des uORFs folgenden Leserahmens analysiert wurde.

Das in dieser Arbeit untersuchte HIV-Konstrukt zeigte in der Zellkultur Syncytienbildung. Es erfolgte also eine Translation des *env*-ORFs, der als vierter ORF auf der polycistronischen mRNA lokalisiert war. Da die *env*-Expression nur Rev-abhängig stattfinden kann, wurde daher neben dem Einfluss der uORF-Länge auf den ersten

Leserahmen (*tat*) auch die Translation des zweiten, weiter 3'-wärts liegenden Leserahmens (*rev*) analysiert. Dazu wurde die Expression von Konstrukten mit uORF-Längen zwischen 7 und 32 Kodons in einem festen Abstand von 38 nt zum *tat*- und 177 nt zum *rev*-Leserahmen in funktionellen Reporterassays gemessen. Dabei war für die Rev-Expression in Korrelation zur zunehmenden uORF-Länge von 7 bis 17 Kodons zunächst eine Zunahme, in Gegenwart des längsten uORF mit 32 Kodons aber eine Abnahme zu beobachten (Abb. 29). Eine gleichbleibende Expression bei einer uORF Länge zwischen 8 und 13 Kodons, wie sie von Kozak sowie Hwang und Su für den ersten Leserahmen nach dem uORF beobachtet wurden, traf also hier für den zweiten Leserahmen nicht zu. Die Beobachtung einer optimalen uORF-Länge bei ca. 17 Kodons korreliert jedoch recht gut mit Ergebnissen von Fütterer und Hohn, die die Wirkung verschieden langer uORFs in Pflanzenprotoplasten auf zwei unterschiedliche 3'-Hauptleserahmen untersuchten. Dabei zeigte sich für den distalen ORF mit Zunahme der uORF-Länge zunächst eine Zunahme dann eine Abnahme der Expression, wobei sich eine uORF-Länge von 28-34 Kodons als optimal erwies [100]. An beiden Versuchssystemen (HIV und CaMV) war außerdem auffällig, dass für eine nachweisbare Expression des distalen Leserahmens eine Transaktivierung der Expression nötig war. Im Zuge der Untersuchungen durch Fütterer *et al.* wurde das CaMV Translations-Transaktivatorprotein TAV benötigt, während zur Untersuchung der Expression des distalen *rev*-ORFs im HIV-1 System, eine zusätzliche Stimulation der Expression durch Tat nötig war. Die Expression des distalen Leserahmens ist also gering, reicht aber nach Stimulation, um eine physiologisch relevante Expression beispielsweise des *env* ORFs zu ermöglichen die in der Zellkultur zur Syncytienbildung führte.

Unterschiede zwischen den beiden Versuchssystemen zeigten sich jedoch bei der Expression des proximalen ORFs. Während die zunehmende uORF-Länge bei Fütterer und Hohn mit einer Abnahme der Expression des proximalen ORFs korrelierte, konnte dieser Effekt bei den hier verwendeten HIV-Konstrukten nicht beobachtet werden (siehe 3.2.2.1). Wie bei der Rev-Expression zeigte sich die höchste Tat-Expression in Gegenwart des uORF mit 17 Kodons, wobei die anderen Konstrukte mit uORFs mit 7, 12 oder 32 Kodons eine vergleichbare, nur leicht reduzierte Expression zeigten. Interessanterweise wurde bei dem zu uORF17 gleichlangen Kontrollkonstrukt ohne uORF (Δ uORF) ebenfalls

eine leicht erhöhte Expression beobachtet. Da die Konstrukte uORF17 und Δ uORF die gleiche HIV-1 Sequenz beinhalten, könnte die Insertion oder die Deletionen an der Position +9 des uORFs bei der Generierung der übrigen Konstrukte zu einer Veränderung der Sekundärstruktur geführt haben. Eine Vorhersage der Sekundärstruktur mit dem RNA-fold server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi> [135]) unterstützte diese Hypothese, da für die uORF17 Leadersequenz zwischen *Hind*III und *Mfe*I eine andere

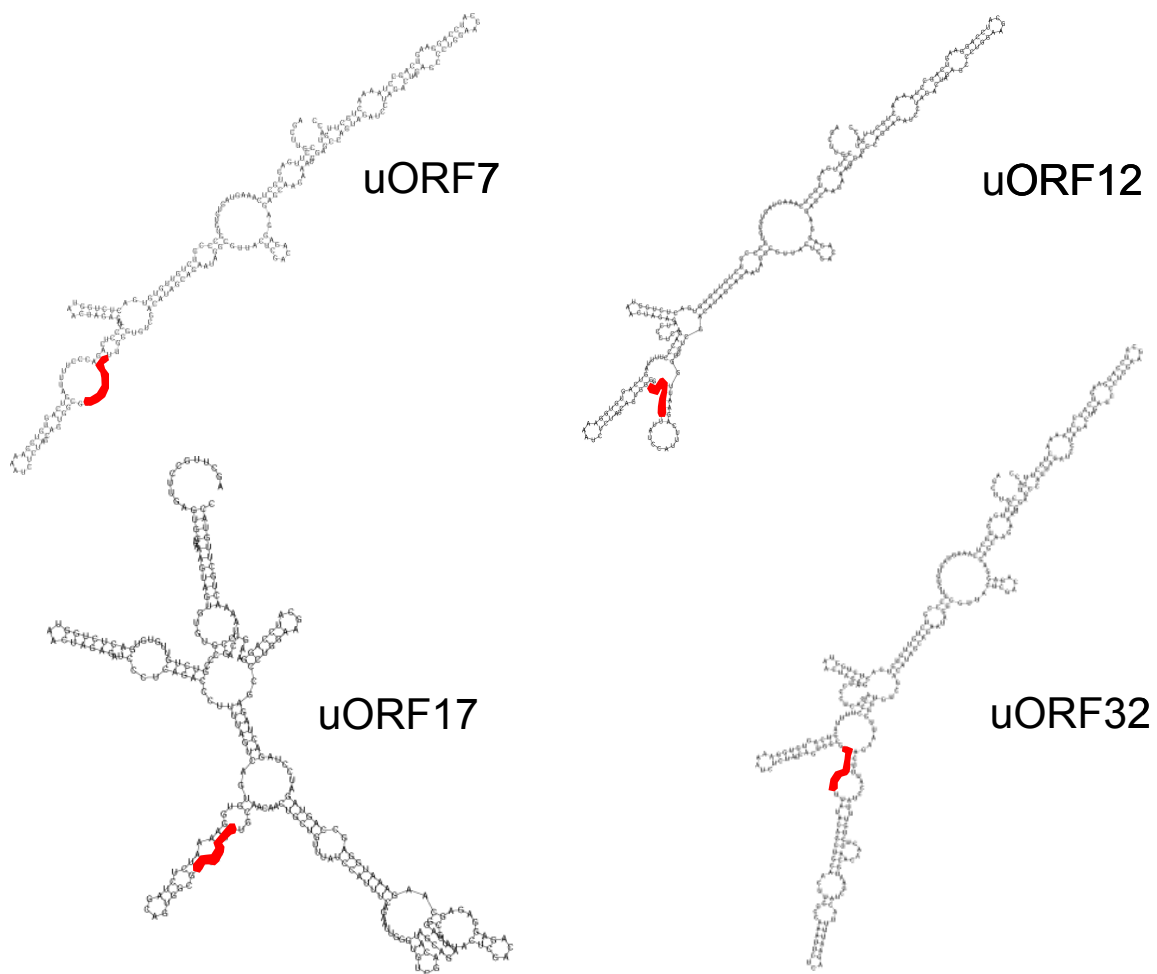


Abb. 38: Vorhersage der Faltung der Leadersequenzen bei unterschiedlichen uORF-Längen. Dargestellt sind die mit dem RNA Fold Server (minimum free energy, RNA-parameters, no GU-pairs at end of helices, avoid isolated base pairs [135]) vorhergesagten Sekundärstrukturen des *Hind*III/*Mfe*I Fragments der Konstrukte uORF7 uORF12 uORF17 und uORF32. Rot unterlegt ist die Position des uORF Startkodons, sowie die angrenzende *Eco*RI Schnittstelle.

Faltung, als bei Verlängerung oder Verkürzung der uORF-Sequenz berechnet wurde (Abb. 38). Eine solche Veränderung in der Sekundärstruktur des Leaders könnte zu einer veränderten Translationsinitiation führen. So konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass Sequenzveränderungen in der intercistronischen Sequenz aber auch 5'-wärts des uORFs, im uORF selbst oder im 3'-Cistron die Expression beeinflussen können [115;116;219]. Die im Rahmen der uORF-Untersuchungen gemachten Insertionen und Deletionen müssen also mit Vorbehalt betrachtet werden. Es kann weder ausgeschlossen werden, dass die Tat-Expression vollständig unabhängig von der uORF-Länge verläuft noch, dass die Tat-Expression in Abhängigkeit von der uORF-Länge einen zur Rev-Expression gleichgerichteten, wenn auch geringeren Effekt zeigt.

Zusammengenommen deuten die Daten für die Wirkung unterschiedlicher uORF-Längen auf die Expression von mindestens zwei 3'-wärts gelegenen Hauptleserahmen eher gegen einen rein linearen Mechanismus und unterstützen die Idee einer optimalen uORF-Länge für die Translation des distalen Leserahmens, ähnlich den Daten von Fütterer und Hohn [100].

4.2.2 Einfluss des intercistronischen Abstands auf die Rev-Expression

Untersuchungen von Kozak zeigten, dass ein uORF mit 3 Kodons die Translation an einem 3'-wärts liegenden Preproinsulin-Leserahmen inhibiert. Eine Verlängerung des Abstands zwischen uORF und Preproinsulin Leserahmens auf 79 nt konnte diese Inhibition aufheben und erlaubte eine Expression, die ebenso effizient war, wie in Abwesenheit des uORFs [170]. Daraus ließ sich schließen, dass eine effiziente Reinitiation einen Mindestabstand zwischen uORF und Hauptleserahmen benötigt. Dieser Abstand zur Erlangung der Reinitiationskompetenz ist außerdem vom Status der Zelle abhängig. Hunger-Bedingungen können beispielsweise bei der Regulation der GCN4-Expression in Hefe zu einem Mangel beladener Methionyl-tRNA und so zu verspäteter Neubeladung der Ribosomen und einem Überlesen von Startkodons führen [1].

Aufgrund dieser Daten war es wahrscheinlich, dass bei den hier gemachten Experimenten ein intercistronischer Abstand von ursprünglich 38 nt zum *tat*-ORF nur wenige reinitiationskompetente Ribosomen für den *tat*-Leserahmen bereitstellen kann, während der Großteil der Ribosomen reinitiationskompetent den 177 nt entfernten *rev*-ORF

erreichen sollten. Nach einer Verlängerung des intercistronischen Abstands zum *tat*-ORF auf 88 oder 121 nt sollten danach die Ribosomen die Translationskompetenz vor dem *tat*-AUG wiedererlangen, was die Translation von Rev verhindern würde. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese war eine 8-fache, graduelle Abnahme der Rev-Expression auf ein Niveau zu beobachten, das einer Inhibition der Rev-Expression durch den *tat*-Leserahmen ohne uORF entsprach (vgl. 3.2.2.1, Abb.29: Δ uORF und 3.2.2.2, Abb. 30: icd121). Allerdings wurde gleichzeitig statt einer Zunahme, eine leichte Abnahme der *tat*-Expression um ein Drittel beobachtet. Eine mögliche Erklärung dieses Unterschieds könnte die unterschiedliche Länge der verwendeten uORFs sein. Der 17-Kodons lange uORF führt vermutlich zu einer höheren Dissoziation von Initiationsfaktoren und damit zu einer höheren Ablösung von Ribosomen nach der Translation des uORFs als dies nach Translation eines uORFs mit 3 Kodons im Experiment von Kozak der Fall war [170]. Diese höhere Dissoziation beträfe sowohl die *Tat*- als auch die *Rev*-Translation und könnte in den hier gemachten Experimenten die Reassoziaton von neuen tRNAs so überlagern, dass statt einer Erhöhung der Expression, wie sie mit einem uORF von 3 Kodons stattfindet, in Gegenwart des 17-Kodon uORF sogar eine geringere Abnahme der *Tat*-Expression zu beobachten war. Damit zeigte die getrennte Analyse von intercistronischem Abstand und uORF-Länge hier ihre Limitierung. Ein weiterer Grund der ebenfalls zur Reduktion der *Tat*-Expression führen könnte, ist der mit der Verlängerung des intercistronischen Abstands ebenfalls zunehmende Abstand von der Cap-Struktur.

4.2.3 Einfluss der uORF Translationsinitiationsstelle auf die Rev-Expression

Ausgehend von den Beobachtungen von Kozak, dass die Sequenzumgebung des AUGs die Effizienz der Translation bestimmt [168] und der daraus ermittelten Konsensussequenz [141;168], wurde hier erstmalig der Einfluss verschieden effizienter Sequenzumgebungen des uORF-Startkodons auf die *Tat*- und *Rev*-Expression untersucht. Dabei führten starke Initiationsstellen des uORFs zu einer 3- bis 4-fach höheren *Tat*- und *Rev*-Expression. Eine starke uORF-AUG-Umgebung ermöglichte demnach eine effiziente Translation beider ORFs im 3'-Bereich. Es war also, wie zuvor bei der Variation des intercistronischen Abstands, ein gleichgerichteter Effekt auf den *tat*- und *rev*-Leserahmen nachweisbar. Dabei war jedoch auch hier, wie bei den Experimenten zur uORF Länge, in Abwesenheit des uORFs eine vergleichbare *Tat*-Expression zu beobachten, wie auch in Gegenwart des

uORFs mit seiner ursprünglichen, effizienten AUG-Sequenzumgebung. Die Tat-Expression wird also durch den uORF beeinflusst, kann aber natürlich auch ohne uORF stattfinden, da der *tat*-Leserahmen dann an erster Stelle nach dem Cap liegt. Eine Rev-Expression erfolgt dagegen nur in Anwesenheit des uORFs. Dies zeigt, dass erst durch den uORF ein Überlesen des *tat*-Startkodons, wahrscheinlich aufgrund von an dieser Stelle noch nicht reinitiationskompetenten Ribosomen, möglich wird.

4.2.4 Analyse des Einflusses möglicher uORFs auf die HIV-1-Expression

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob in HIV-1 Transkripten uORFs das Expressionsprofil zugunsten weiter 3'-wärts liegender Leserahmen verändern können. Dabei wurden der *vpr*- und *vpu*-Leserahmen sowie ein durch RNA-Editing im 5'-Leader entstehender Leserahmen untersucht.

4.2.4.1 Der *vpr*-ORF stimuliert die Translation 3'-wärts liegender ORFs nicht

Naheliegend war zunächst die Untersuchung des *vpr*-Leserahmens, der 5'-wärts des *tat*-AUGs und damit an einer vergleichbaren Position wie der bisher untersuchte uORF mit 17 Kodons lag. Während der uORF17 jedoch einen intercistronischen Abstand von 32 nt zum *tat*-AUG aufwies, überlappt der *vpr*-Leserahmen in fast allen HIV-1 Isolaten mit dem *tat*-Leserahmen. Auch im Bezug auf die Rev-Expression zeigte der *vpr*-ORF keinen stimulierenden Effekt. Dies ließ sich aufgrund der Länge des *vpr*-ORFs von 96 Kodons bereits vermuten, da die optimale uORF-Länge in den vorangegangenen Experimenten zwischen 12 und 32 Kodons ermittelt worden war und nach Experimenten von Luukkonen *et al.* ab einer uORF Länge von 55 Kodons keine Stimulation der 3'-wärts liegenden Leserahmen mehr zu erwarten ist. Aus diesem Grund konnten offenbar auch weitere, in der Literatur beschriebene *vpr*-Varianten nicht als uORF wirken: eine Leserastermutation des HIV-1 Isolats HXB10 führt zu einem 78 Kodons langen *vpr*-ORF mit einem intercistronischen Abstand zum *tat*- und *rev*-AUG der identisch zu dem des uORF17 war. Diese *vpr*-Mutation führte allerdings im Gegensatz zum uORF17 nicht zu einer verstärkten Rev-Expression. Ein *vpr*-ORF mit 53 Kodons, der durch ein beschriebenes RNA-Editing entstehen könnte, wirkte ebenfalls nicht expressionsfördernd. Lediglich bei einer Punktmutation des *vpr*-AUGs, durch die zusätzliche, kleine, interne Leserahmen freigelegt

wurden, konnte eine Steigerung der Tat-, Rev- und Env-Expression nachgewiesen werden (siehe 3.2.3.2, Abb. 34).

4.2.4.2 Ein Minimal-uORF in der 5'-Umgebung des *vpu* AUGs fördert die *env*-Expression

Bei der Untersuchung unterschiedlich effizienter Translationsinitiationsstellen war aufgefallen, dass die experimentell ermittelten AUG-Stärken größtenteils mit der aufgrund der Konsensussequenz zu erwartenden AUG-Stärke korrelierten [168]. Dies traf jedoch nicht auf das *vpu*-AUG zu. Obwohl die Sequenz der *vpu*-AUG-Umgebung nur zwei Basenaustausche im Vergleich zum starken *tat*-AUG aufwies und in der kritischen Position -3 mit der Konsensussequenz für ein effizient genutztes Startkodon übereinstimmte, war die Translationsinitiation hier sehr gering (siehe 3.2.2.3, Abb. 31). Da der *vpu*-ORF in authentischen HIV-1 Transkripten immer dem *env*-Leserahmen vorausgeht, der als einziger ORF nicht durch alternatives Spleißen an die erste Position nach der Cap-Struktur gelangen kann [273], ist eine ineffiziente Initiation am *vpu*-ORF essenziell für die Virusreplikation. Die hier vorliegenden Daten zeigten erstmals, dass sich die schwache Translationsinitiation am *vpu*-Startkodon auf die Gegenwart eines Minimal-uORFs innerhalb der *vpu*-Initiationstelle zurückführen ließ. Dieser Minimal-uORF bestand nur aus Start- und Stopp-Kodon und erhöhte bei einem intercistronischen Abstand von 159 nt zum *env*-Leserahmen die *env*-Expression 2-fach bis 3-fach (siehe 3.2.3.1, Abb. 33). Offenbar erkannten die Ribosomen teilweise statt des *vpu*-AUG das AUG des Minimal-uORF und führten dann zur Erkennung der Leserahmen weiter 3'-wärts des *vpu*-Leserahmens (siehe 3.2.2.3.1, Abb. 32 und 3.2.3.1, Abb. 33). Dabei könnte es sich, wie bei den übrigen uORFs, um einen Terminations-Reinitiationsmechanismus handeln, der zur Erkennung des dem *vpu*-AUG folgenden Leserahmens führte. Möglicherweise bleiben jedoch bei Erkennung des Minimal-uORFs neben den Initiationsfaktoren auch die Methionyl-tRNAs an den Ribosomen für eine erneute Translationsinitiation erhalten. Dies könnte eine frühere Reinitiationskompetenz nach sich ziehen und die Translation des unmittelbar dem *vpu*-ORF folgenden Leserahmens begünstigen.

Diese Ergebnisse werden auch durch Beobachtungen von Schwartz *et al.* unterstützt, die auch bereits eine potenzielle Funktion des Minimal-uORFs für die *env*-Expression ins Auge fassten. Hier zeigte ein Konstrukt mit Minimal-uORF und *vpu*-AUG sogar eine höhere

env-Expression als ein Konstrukt in dem der Minimal uORF und das *vpu*-AUG durch Punktmutation inaktiviert wurden [273]. Ein weiterer Hinweis auf die biologische Relevanz dieses Minimal-uORFs ist seine Konservierung innerhalb der verschiedenen HIV-1-Subtypen. Hier wiesen lediglich zwei von elf Subtypen eine Mutation des Minimal-uORF-Startkodons bei gleichzeitiger Abschwächung der *vpu*-Initiationsstelle auf (siehe 3.2.3.1, Abb. 33D).

4.2.4.3 Ein RNA-Editing im 5'-Leader kann die Inhibition der Translation von Rev durch das effiziente *tat*-AUG umgehen

Die Analyse eines von Bourara beschriebenen RNA-Editings im HIV-1 Leader, das zu einem Startkodon und damit zu einem uORF mit 24 Kodons und einem intercistronischen Abstand von 90 nt zum *tat*-Leserahmens führt (229 nt bis zum *rev*-AUG), zeigte, dass dieser kurze Leserahmen die Genexpression ebenfalls zugunsten der 3'-wärts initiiierenden Translation verschieben kann (siehe 3.2.3.3). Dabei blieb die Wirkung der uORFs nicht auf die Stimulation der Rev-Expression beschränkt. In Gegenwart von Rev stimulierte der uORF24 ebenfalls die Expression des *env*-Leserahmens. Diese Stimulation der Expression durch den uORF24 steht in Einklang mit der zuvor bestimmten optimalen uORF-Länge zwischen 12 und 32 Kodons (siehe 3.2.2.1) und einem optimalen intercistronischen Abstand kleiner als 121 nt (siehe 3.2.2.2), die zu einer effizienten Rev- und Env-Expression führten.

4.2.5 Modell zum Einfluss eines uORFs auf die Translation 3'-wärts gelegener Leserahmen in einer polycistronischen HIV-1 mRNA

In allen hier untersuchten Konstrukten war die Gegenwart eines uORFs für die Rev-Translation zwingend notwendig, um das starke *tat*-AUG umgehen zu können. Daher ist davon auszugehen, dass die Ribosomen, die die Translation 3'-wärts des *tat*-ORFs ermöglichen, über die Translation des uORFs rekrutiert wurden. Das uORF-Initiationskodon beeinflusste die Expression beider folgender Leserahmen, wobei eine starke uORF-Initiationsstelle sowohl die Tat- als auch die Rev-Expression stimulierte. Diese Beobachtung lässt sich so interpretieren, dass die Initiation sowohl am *tat*- als auch am *rev*-Startkodon größtenteils durch Ribosomen erfolgt, die zuvor am uORF initiiert haben. Dies steht auch in Übereinstimmung mit dem experimentellen Befund, dass das

AUG des uORFs aufgrund seiner Sequenzumgebung ähnlich effizient genutzt werden kann wie das *tat*-AUG. Die beobachtete graduelle Abnahme der Translation bei Verlängerung des intercistronischen Abstands, kann nach der Translation des uORFs durch eine Dissoziation der Ribosomen von der RNA während des Scannens erklärt werden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein intercistronischer Abstand von 121 nt die Reinitiation 3'-wärts des *tat*-AUGs nicht mehr ermöglicht. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Abstand (260 nt zum *rev*-AUG) dazu führt, dass keine reinitiationskompetenten Ribosomen mehr das Rev-Startkodon erreichen, das heißt, dass diese Ribosomen entweder abdissoziiert sind oder stattdessen den *tat*-Leserahmen bzw. einen internen im *tat*-ORF vorhandenen Leserahmen translatiert haben. Der Vergleich der uORF-Längen zeigte, dass ein uORF mit bis zu 32 Kodons die Translation 3'-wärts des *tat*-AUGs ermöglicht, ein *vpr*-Leserahmen mit 53 Kodons jedoch genauso wenig die 3'-Translation stimuliert, wie der *vpr*-Volllängen Leserahmen mit 96 Kodons (Abb. 39).

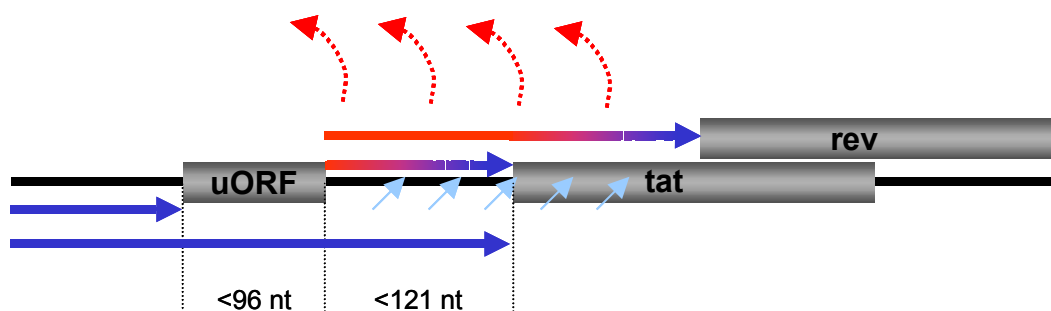


Abb. 39: Mögliche Translationsmechanismen der uORF enthaltenden Transkripte. Die Translation beginnt am 5'-Ende der RNA mit einem Cap-abhängigen Scanning (dunkelblaue Pfeile), welches entweder zur Translation des uORFs führt (kurzer blauer Pfeil) oder via „leaky Scanning“ zur Translation des Tat-ORFs (langer blauer Pfeil). Nach der Translation des uORFs können die Ribosomen abdissoziieren (rote Pfeile). Außerdem können die an der RNA verbliebenen Ribosomen sukzessiv durch Aufnahme von t-RNA und Initiationsfaktoren (hellblaue Pfeile) reinitiations-kompetent werden, wobei die Translation von Rev durch fehlende Reinitiationskompetenz scannender Ribosomen am Tat AUG (Pfeil zum Rev-Leserahmen) erfolgt.

4.2.6 Perspektive

Die Analyse der uORF-vermittelten Translation 3'-wärts gelegener Leserahmen zeigte deutlich, dass Termination und Reinitiation einen „leaky-scanning“-Mechanismus überlagern kann. Obwohl die graduelle Abnahme der Expression nach Erhöhung des intercistronischen Abstands bereits gegen einen „Shunt“-Mechanismus spricht, könnte der Mechanismus der uORFs über Einfügen stabiler „Stemloop“-Strukturen zwischen uORF

und *tat*-Leserahmen weiter charakterisiert werden. Dies würde ein Scannen der Ribosomen verhindern und zeigen, ob die reinitiiierenden Ribosomen solche „Stemloop“ Strukturen über einen „Shunt“ umgehen bzw. auflösen oder ob sie vor diesen arretieren. Die Tatsache, dass ein uORF die Translation eines weiter 3'-wärts gelegenen Leserahmens begünstigt, lässt sich in Zukunft auch für die Klonierung polycistronischer Expressionsvektoren nutzen ohne dort zusätzliche IRES-Sequenzen einzufügen.

Neuere Daten über IRES-Elemente in der Primer Bindungsstelle der HIV-1 Leadersequenz [28] oder in der *gag*-Sequenz [37] lassen noch eine weit komplexere Regulation der HIV-1-Translation möglich erscheinen. Die Konstrukte der LTR-uORF-Reihe tragen die ersten 78 Nukleotide des durch Deletionsanalysen von Brasley auf eine Länge von 139 nt bestimmten internen ribosomalen Eintrittsstelle; die Konstrukte mit authentischem HIV Leader (die SV1.5E-, die 1.3.ΔSD3- und die 1.4-Reihe) tragen die gesamte Leader-IRES-Sequenz. Damit könnten zusätzliche Ribosomen zur RNA rekrutiert werden, die nicht an der Cap-Struktur mit einem „Scanning“ beginnen. Dies ist auch im Zusammenhang mit der bereits zuvor erwähnten geringeren Capping-Effizienz von HIV-1-Transkripten interessant (vgl. 4.1.5.1) [49]. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Rev-Expression durch die IRES-Strukturen der LTR-Konstrukte begünstigt wird in dem die IRES-Strukturen mit dem uORF-AUG kooperativ funktionieren, wie es zum Beispiel beim Polio-Virus bereits gezeigt wurde [211].

5 Zusammenfassung

Das HIV-1 Genom wird von einem Promotor im 5'-LTR in eine polycistronische prä-mRNA transkribiert. Um trotz der Cap-abhängigen Translation der Wirtszelle alle viralen Proteine zu translatieren, muss die virale RNA alternativ gespleißt werden, sodass unterschiedliche Leserahmen an das 5'-Ende des Transkripts gelangen. Die mehr als 30 HIV-mRNAs unterscheiden sich auch durch die An- oder Abwesenheit der nichtkodierenden Exons 2 und 3 im Leader. Die Konservierung der flankierenden Spleißstellen weist auf eine Bedeutung dieser Exons für die Virusreplikation hin. Die Wirkung der Exons 2 und 3 konnte *in vivo* nach transienten Transfektionen und RNA-Analyse bis auf die Ebene der nukleären RNA zurückverfolgt werden. Dabei erhöhte die Exon 2 Sequenz die RNA-Menge, während das Exon 3 sie reduzierte. Da sich *in vitro* weder die Transkriptionsrate, noch die Capping-Effizienz unterschied, wurde auf eine unterschiedliche nukleäre RNA-Stabilität geschlossen. Dabei handelte es sich um posttranskriptionale Ereignisse, die für Exon 2 vor dem Spleißen und für Exon 3 bereits vor der Rev/RRE-Interaktion stattfanden. Die nukleären Stabilitätsunterschiede konnten außerdem erstmalig *in vitro* in einem nukleären RNA-Degradationsassays dargestellt werden. Damit stand zum Ende der Arbeit ein *in vitro* System zur Verfügung, das UV-Quervernetzungs und Affinitätspräzipitations-Experimente erlaubte, in denen Unterschiede in der Bindung der Proteine AUF1 (hnRNP D) und HuR an die Leaderexons gezeigt werden konnten.

Neben dem Einfluss auf die RNA-Stabilität können Leadersequenzen auch durch die Präsenz kurzer, 5'-wärts gelegener Leserahmen (uORFs) das Translationspotential polycistronischer HIV-Transkripte verändern. Das lineare, ribosomale Scannen der RNA, bei dem das effiziente *tat*-AUG zur Inhibition der Translation folgender Leserahmen führt, wurde mit dem uORF durch einen Terminations-Reinitiations Mechanismus ersetzt. Die nach Translation des uORFs zunächst Reinitiations-inkompetenten Ribosomen übergangen zum Teil das effiziente *tat*-AUG und initiierten an den weiter 3'-wärts liegenden Leserahmen. Solch ein uORF kann in authentischen HIV-1 Transkripten durch RNA-Editing im Exon 1 entstehen und die Expression der 3'-wärts von *tat* liegenden Leserahmen ermöglichen. Die Inhibition der *env*-Translation durch das starke *tat*-AUG trifft also nicht, wie bisher angenommen, für alle HIV-mRNAs zu. Weiterhin wurde gezeigt, dass in *vpu/env*-Transkripten ein Minimal-uORF vor dem *vpu*-AUG die Translation des folgenden *env*-ORFs stimulierte.

Literaturverzeichnis

1. Abastado JP, Miller PF, Jackson BM, Hinnebusch AG: Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:486-496.
2. Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Luhrmann R: A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.* 1999;18:5789-5802.
3. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA: Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J.Virol.* 1986;59:284-291.
4. Afonina E, Neumann M, Pavlakis GN: Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J.Biol.Chem.* 1997;272:2307-2311.
5. Akahane K, Pluznik DH: Interleukin-4 inhibits interleukin-1 alpha-induced granulocyte- macrophage colony-stimulating factor gene expression in a murine B-lymphocyte cell line via downregulation of RNA precursor. *Blood* 1992;79:3188.
6. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-1958.
7. Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P: The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev.* 1999;13:2148-2158.
8. Alonso A, Peterlin BM: Effects of human chromosome 12 on interactions between Tat and TAR of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1994;68:6505-6513.
9. Amendt BA, Hesslein D, Chang LJ, Stoltzfus CM: 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.* 1994;14:3960-3970.
10. Ashe MP, Griffin P, James W, Proudfoot NJ: Poly(A) site selection in the HIV-1 provirus: inhibition of promoter-proximal polyadenylation by the downstream major splice donor site. *Genes Dev.* 1995;9:3008-3025.
11. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds.: *Current protocols in molecular biology.* New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1991.

12. Barber GN: Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 2001;8:113-126.
13. Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD: A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates. *J.Cell Biol.* 1997;136:761-773.
14. Beelman CA, Parker R: Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *J.Biol.Chem.* 1994;269:9687-9692.
15. Berkhout B, Silverman RH, Jeang KT: Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 1989;59:273-282.
16. Bernstein P, Peltz SW, Ross J: The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol.Cell Biol.* 1989;9:659-670.
17. Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW: A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J.Virol.* 1996;70:6288-6295.
18. Bilicic D: 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. 1994.
19. Bilodeau PS, Domsic JK, Mayeda A, Krainer AR, Stoltzfus CM: 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.* 2001;75:8487-8497.
20. Birckbichler PJ, Pryme IF: Fractionation of membrane-bound polysomes, free polysomes, and nuclei from tissue-cultured cells. *Eur.J.Biochem.* 1973;33:368-373.
21. Blackshear PJ: Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem.Soc.Trans.* 2002;30:945-952.
22. Boeck R, Tarun S, Jr., Rieger M, Deardorff JA, Muller-Auer S, Sachs AB: The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein- stimulated poly(A)-nuclease activity. *J.Biol.Chem.* 1996;271:432-438.
23. Bonnerot C, Boeck R, Lapeyre B: The Two Proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p Interact In Vivo, Are Required for mRNA Decay, and Are Functionally Linked to Pab1p. *Mol.Cell.Biol.* 2000;20:5939-5946.
24. Bourara K, Litvak S, Araya A: Generation of G-to-A and C-to-U changes in HIV-1 transcripts by RNA editing. *Science* 2000;289:1564-1566.
25. Bourgeois CF, Kim YK, Churcher MJ, West MJ, Karn J: Spt5 Cooperates with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat by Preventing Premature RNA Release at Terminator Sequences. *Mol.Cell.Biol.* 2002;22:1079-1093.

26. Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D: Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 2000;102:765-775.
27. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976;72:248-254.
28. Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N: The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G2/M Phase of the Cell Cycle. *J.Virol.* 2003;77:3939.
29. Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N: The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G2/M Phase of the Cell Cycle. *J.Virol.* 2003;77:3939-3949.
30. Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability. *Cell Mol.Life Sci.* 2001;58:266-277.
31. Bres V, Tagami H, Peloponese JM, Loret E, Jeang KT, Nakatani Y, Emiliani S, Benkirane M, Kiernan RE: Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co- activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J.* 2002;21:6811-6819.
32. Brewer G: An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:2460-2466.
33. Briggs MW, Burkard KT, Butler JS: Rrp6p, the Yeast Homologue of the Human PM-Scl 100-kDa Autoantigen, Is Essential for Efficient 5.8S rRNA 3' End Formation. *J.Biol.Chem.* 1998;273:13255-13263.
34. Brighty DW, Rosenberg M: 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.* 1994;91:8314-8318.
35. Brown CE, Tarun SZ, Jr., Boeck R, Sachs AB: PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:5744-5753.
36. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM: Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:2525-2529.
37. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF: The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J.Virol.* 2001;75:181-191.

38. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF: The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site. *J.Virol.* 2001;75:181-191.
39. Bukrinsky M, Adzhubei A: Viral protein R of HIV-1. *Rev.Med.Virol.* 1999;9:39-49.
40. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, Stevenson M: Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992;89:6580-6584.
41. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ: Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 1998;281:1001-1005.
42. Chapman KB, Boeke JD: Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell* 1991;65:483-492.
43. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M: AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 2001;107:451-464.
44. Chen CY, Shyu AB: AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.Sci.* 1995;20:465-470.
45. Chen CY, Xu N, Shyu AB: mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol.Cell.Biol.* 1995;15:5777-5788.
46. Chen CY, Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M: Stabilization of Interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway. *Science* 1998;280:1945.
47. Cheng J, Maquat LE: Nonsense codons can reduce the abundance of nuclear mRNA without affecting the abundance of pre-mRNA or the half-life of cytoplasmic mRNA. *Mol.Cell Biol.* 1993;13:1892-1902.
48. Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR, Aaronson SA: Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* 1985;317:366-368.
49. Chiu YL, Coronel E, Ho CK, Shuman S, Rana TM: HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J.Biol.Chem.* 2001;276:12959-12966.
50. Chiu YL, Ho CK, Saha N, Schwer B, Shuman S, Rana TM: Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Mol.Cell* 2002;10:585-597.
51. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: The beta-chemokine

- receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-1148.
52. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987;162:156-159.
53. Clement JQ, Qian L, Kaplinsky N, Wilkinson MF: The stability and fate of a spliced intron from vertebrate cells. *RNA* 1999;5:206-220.
54. Cochrane A, Kramer R, Ruben S, Levine J, Rosen CA: The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* 1989;171:264-266.
55. Cochrane AW, Jones KS, Beidas S, Dillon PJ, Skalka AM, Rosen CA: Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J.Virol.* 1991;65:5305-5313.
56. Cochrane AW, Perkins A, Rosen CA: Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J.Virol.* 1990;64:881-885.
57. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al: What to call the AIDS virus? [letter]. *Nature* 1986;321:10.
58. Cohen RB, Boal TR, Safer B: Increased eIF-2 alpha expression in mitogen-activated primary T lymphocytes. *EMBO J.* 1990;9:3831.
59. Colgan DF, Manley JL: Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 1997;11:2755-2766.
60. Colombini S, Arya SK, Reitz MS, Jagodzinski L, Beaver B, Wong Staal F: Structure of simian immunodeficiency virus regulatory genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:4813-4817.
61. Craigie R: HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J.Biol.Chem.* 2001;276:23213-23216.
62. Cullen BR: Journey to the center of the cell. *Cell* 2001;105:697-700.
63. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-767.
64. Das B, Butler JS, Sherman F: Degradation of Normal mRNA in the Nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* 2003;23:5502-5515.
65. Davis JL, Clements JE: Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:414-418.

66. Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA: The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 1986;44:941-947.
67. de Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavrois MV, Moir RD, Goldman RD, Greene WC: Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 2001;294:1105-1108.
68. Decker CJ, Parker R: A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* 1993;7:1632-1643.
69. Dehlin E, Wormington M, Korner CG, Wahle E: Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 2000;19:1079-1086.
70. DeMaria CT, Brewer G: AUF1 Binding Affinity to A+U-rich Elements Correlates with Rapid mRNA Degradation. *J.Biol.Chem.* 1996;271:12179.
71. Deml L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, Wolf H, Wagner R: Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J.Virol.* 2001;75:10991-11001.
72. Dempsey LA, Li MJ, DePace A, Bray-Ward P, Maizels N: The human HNRPD locus maps to 4q21 and encodes a highly conserved protein. *Genomics* 1998;49:378-384.
73. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* 1996;381:661-666.
74. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic.Acids.Res.* 1983;11:1475-1489.
75. Donze O, Damay P, Spahr PF: The first and third uORFs in RSV leader RNA are efficiently translated: implications for translational regulation and viral RNA packaging. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:861-868.
76. Donze O, Spahr PF: Role of the open reading frames of Rous sarcoma virus leader RNA in translation and genome packaging. *EMBO J.* 1992;11:3747-3757.
77. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-1158.
78. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: HIV-1 entry into CD4+ cells is

- mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature* 1996;381:667-673.
79. Dunckley T, Parker R: The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 1999;18:5411-5422.
80. El Meskini R, Boudouresque F, Ouafik L: Estrogen regulation of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase messenger ribonucleic acid levels by a nuclear posttranscriptional event. *Endocrinology* 1997;138:5256-5265.
81. Endo S, Kubota S, Siomi H, Adachi A, Oroszlan S, Maki M, Hatanaka M: A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes* 1989;3:99-110.
82. Englmeier L, Olivo JC, Mattaj IW: Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr.Biol.* 1999;9:30-41.
83. Fan XC, Steitz JA: Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* 1998;17:3448-3460.
84. Fan XC, Steitz JA: HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *PNAS* 1998;95:15293-15298.
85. Feinberg MB, Baltimore D, Frankel AD: 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.* 1991;88:4045-4049.
86. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven- transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 1996;272:872-877.
87. Fernandez-Patron C, Castellanos-Serra L, Rodriguez P: Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *Biotechniques* 1992;12:564-573.
88. Ferreras M, Gavilanes JG, Garcia-Segura JM: A permanent Zn²⁺ reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 1993;213:206-212.
89. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R: The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995;82:475-483.
90. Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, et al: The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 1986;320:367-371.

91. Ford LP, Watson J, Keene JD, Wilusz J: ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev.* 1999;13:188-201.
92. Ford LP, Wilusz J: An in vitro system using HeLa cytoplasmic extracts that reproduces regulated mRNA stability. *Methods* 1999;17:21-27.
93. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW: CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]. *Cell* 1997;90:1051-1060.
94. Fouchier RA, Malim MH: Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv.Virus Res.* 1999;52:275-299.
95. Fouillot N, Tlouzeau S, Rossignol JM, Jean-Jean O: Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation. *J.Virol.* 1993;67:4886-4895.
96. Frankel AD: Activation of HIV transcription by Tat. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1992;2:293-298.
97. Frankel AD, Young JA: HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu.Rev.Biochem.* 1998;67:1-25:1-25.
98. Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC: An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 2002;295:2258-2261.
99. Furtado MR, Balachandran R, Gupta P, Wolinsky SM: Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* 1991;185:258-270.
100. Futterer J, Hohn T: Role of an upstream open reading frame in the translation of polycistronic mRNAs in plant cells. *Nucleic.Acids.Res.* 1992;20:3851-3857.
101. Futterer J, Kiss Laszlo Z, Hohn T: Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* 1993;73:789-802.
102. Gallie DR: A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 1998;216:1-11.
103. Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA: Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* 2001;7:1348.
104. Gallouzi IE, Steitz JA: Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* 2001;294:1895-1901.
105. Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA: HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *PNAS* 2000;97:3073-3078.

106. Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J: Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol.Cell* 2000;5:479-488.
107. Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW, Wilusz J: A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* 2001;20:1134-1143.
108. Geballe AP: Translational control mediated by upstream AUG codons; in: Hershey J, Matthews M, Sonnenberg N (eds): *Translational Control*. Cold Spring Harbour, N.Y., Cold Spring Harbour Press pp 173-197.
109. Geballe AP, Morris DR: Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends.Biochem.Sci.* 1994;19:159-164.
110. Gil J, Esteban M: Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* 2000;5:107-114.
111. Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, Emerman M: HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat.Med.* 1998;4:65-71.
112. Gonda MA, Wong Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV: Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 1985;227:173-177.
113. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* 1981;305:1425-1431.
114. Gottlinger HG, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA: Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:7381-7385.
115. Grant CM, Hinnebusch AG: Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Mol.Cell Biol.* 1994;14:606-618.
116. Grant CM, Miller PF, Hinnebusch AG: Sequences 5' of the first upstream open reading frame in GCN4 mRNA are required for efficient translational reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:3980-3988.
117. Greenberg ME, Ziff EB: Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto- oncogene. *Nature* 1984;311:433-438.
118. Grunert S, Jackson RJ: The immediate downstream codon strongly influences the efficiency of utilization of eukaryotic translation initiation codons. *EMBO J.* 1994;13:3618-3630.

119. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M: Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1987;326:662-669.
120. Hadzopoulou Cladaras M, Felber BK, Cladaras C, Athanassopoulos A, Tse A, Pavlakis GN: The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J.Virol.* 1989;63:1265-1274.
121. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W: Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 1992;360:358-361.
122. Hammarskjold ML, Li H, Rekosh D, Prasad S: Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev- independent if the env region is not defined as an intron. *J.Virol.* 1994;68:951-958.
123. Hannon GJ: RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251.
124. Hauber J, Bouvier M, Malim MH, Cullen BR: Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1988;62:4801-4804.
125. Hauber J, Malim MH, Cullen BR: Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J.Virol.* 1989;63:1181-1187.
126. He W, Parker R: Functions of lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2000;12:346-350.
127. Heaphy S, Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA: HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* 1990;60:685-693.
128. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M: The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:7311-7315.
129. Hemmings-Mieszczak M, Hohn T: A stable hairpin preceded by a short open reading frame promotes nonlinear ribosome migration on a synthetic mRNA leader. *RNA.* 1999;5:1149-1157.
130. Herrmann CH, Rice AP: Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* 1993;197:601-608.
131. Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N: Translational Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

132. Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH: Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 2001;413:538-542.
133. Hinnebusch AG: Translational Control of GCN4: Gene-specific Regulation by Phosphorylation of eIF2; in: Hershey J, Matthews M, Sonnenberg N (eds): *Translational Control*. Cold Spring Harbour, N.Y., Cold Spring Harbour Press pp 199-244.
134. Hinnebusch AG: Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J.Biol.Chem.* 1997;272:21661-21664.
135. Hofacker IL: Vienna RNA secondary structure server. *Nucl.Acids.Res.* 2003;31:3429-3431.
136. Hope TJ: The ins and outs of HIV Rev. *Arch.Biochem.Biophys.* 1999;365:186-191.
137. Hosoda N, Kobayashi T, Uchida N, Funakoshi Y, Kikuchi Y, Hoshino S, Katada T: Translation Termination Factor eRF3 Mediates mRNA Decay through the Regulation of Deadenylation. *J.Biol.Chem.* 2003;278:38287-38291.
138. Huang XJ, Hope TJ, Bond BL, McDonald D, Grahl K, Parslow TG: Minimal Rev-response element for type 1 human immunodeficiency virus. *J.Virol.* 1991;65:2131-2134.
139. Hwang WL, Su TS: Translational regulation of hepatitis B virus polymerase gene by termination-reinitiation of an upstream minicistron in a length- dependent manner. *J.Gen.Virol.* 1998;79:2181-2189.
140. Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR: Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 2001;293:1139-1142.
141. Iida Y, Masuda T: Strength of translation initiation signal sequence of mRNA as studied by quantification method: effect of nucleotide substitutions upon translation efficiency in rat preproinsulin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:3313-3316.
142. Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE: Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 2001;106:607-617.
143. Jackson DA, Pombo A, Iborra F: The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells. *FASEB J.* 2000;14:242-254.
144. Jacobs JS, Anderson AR, Parker RP: The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 1998;17:1497-1506.
145. Jacobson A, Peltz SW: Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu.Rev.Biochem.* 1996;65:693-739.

146. Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Metivier D, Lenoir C, Geuskens M, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G: Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J.Exp.Med.* 2001;193:509-519.
147. Jaeger S, Eriani G, Martin F: Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett.* 2004;556:7-12.
148. Jeang KT, Xiao H, Rich EA: Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J.Biol.Chem.* 1999;274:28837-28840.
149. Jensen TH, Dower K, Libri D, Rosbash M: Early Formation of mRNP. License for Export or Quality Control? *Mol.Cell* 2003;11:1129-1138.
150. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS: The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J.Virol.* 1995;69:6304-6313.
151. Kammler S: Der Einfluss von Spleißstellen auf die Rev-abhängige HIV-1 *env*-Expression
Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2004.
152. Kammler S, Leurs C, Freund M, Krummheuer J, Seidel K, Tange TO, Lund MK, 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;7:421-434.
153. Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM: Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 1987;330:489-493.
154. Karn J: Tackling Tat. *J.Mol.Biol.* 1999;293:235-254.
155. Kato H, Sumimoto H, Pognonec P, Chen CH, Rosen CA, Roeder RG: HIV-1 Tat acts as a processivity factor *in vitro* in conjunction with cellular elongation factors. *Genes Dev.* 1992;6:655-666.
156. Kiledjian M, DeMaria CT, Brewer G, Novick K: Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol.Cell Biol.* 1997;17:4870-4876.
157. Kim JH, Hahm B, Kim YK, Choi M, Jang SK: Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J.Mol.Biol.* 2000;298:395-405.
158. Kjems J, Askjaer P: Rev protein and its cellular partners. *Adv.Pharmacol.* 2000;48:251-298.
159. Kjems J, Egebjerg J, Christiansen J: Analysis of RNA-Protein Complexes *in vitro*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V., 1998.

160. Klaver B, Berkhout B: Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J.Virol.* 1994;68:3830-3840.
161. Korner CG, Wahle E: Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J.Biol.Chem.* 1997;272:10448-10456.
162. Kotani K, Kuroiwa A, Saito T, Matsuda Y, Koda T, Kijimoto-Ochiai S: Cloning, chromosomal mapping, and characteristic 5'-UTR sequence of murine cytosolic sialidase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2001;286:250-258.
163. Kotsopoulou E, Kim VN, Kingsman AJ, Kingsman SM, Mitrophanous KA: A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Based Vector That Exploits a Codon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene. *J.Virol.* 2000;74:4839-4852.
164. Kozak M: How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 1978;15:1109-1123.
165. Kozak M: Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic.Acids.Res.* 1984;12:3873-3893.
166. Kozak M: Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* 1986;47:481-483.
167. Kozak M: Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986;44:283-292.
168. Kozak M: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic.Acids.Res.* 1987;15:8125-8148.
169. Kozak M: At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J.Mol.Biol.* 1987;196:947-950.
170. Kozak M: Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol.Cell Biol.* 1987;7:3438-3445.
171. Kozak M: An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J.Cell Biol.* 1991;115:887-903.
172. Kozak M: Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 1999;234:187-208.
173. Kozak M: Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:5226-5232.
174. Krummheuer J: Untersuchungen zum Expressionsmuster alternativ gespleisster HIV-1 mRNAs. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1997.

175. Krummheuer J: Untersuchungen zum Expressionsmuster alternativ gespleiter HIV-1 mRNAs. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1997.
176. 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;285:276-289.
177. Kuppaswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G: Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic.Acids.Res.* 1989;17:3551-3561.
178. LaGrandeur TE, Parker R: Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* 1998;17:1487-1496.
179. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ: Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Mol.Cell.Biol.* 1999;19:4311-4323.
180. Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ: Control of mRNA Decay by Heat Shock-Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Science* 1999;284:499-502.
181. Laroia G, Sarkar B, Schneider RJ: Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *PNAS* 2002;99:1842-1846.
182. Laroia G, Schneider RJ: Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucl.Acids.Res.* 2002;30:3052-3058.
183. Latorre P, Kolakofsky D, Curran J: Sendai Virus Y Proteins Are Initiated by a Ribosomal Shunt. *Mol.Cell.Biol.* 1998;18:5021-5031.
184. Lee B, Doranz BJ, Ratajczak MZ, Doms RW: An intricate Web: chemokine receptors, HIV-1 and hematopoiesis. *Stem.Cells* 1998;16:79-88.
185. Lejeune F, Li X, Maquat LE: Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol.Cell* 2003;12:675-687.
186. Lenz C: Einfluß der 5'-untranslatierten Leadersequenz auf die Genexpression des humanen Immundefizienz Virus Typ 1. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1997.
187. Lenz C, Scheid A, Schaal H: Exon 1 leader sequences downstream of U5 are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J.Virol.* 1997;71:2757-2764.

188. Leys EJ, Crouse GF, Kellems RE: Dihydrofolate reductase gene expression in cultured mouse cells is regulated by transcript stabilization in the nucleus. *J.Cell Biol.* 1984;99:180-187.
189. Li G, Xiang Y, Sabapathy K, Silverman RH: An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase. *J.Biol.Chem.* 2003;M305893200.
190. Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, Aswad DW, Stallcup MR, Laird-Offringa IA: Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J.Biol.Chem.* 2002;277:44623-44630.
191. Libri D, Dower K, Boulay J, Thomsen R, Rosbash M, Jensen TH: Interactions between mRNA Export Commitment, 3'-End Quality Control, and Nuclear Degradation. *Mol.Cell.Biol.* 2002;22:8254-8266.
192. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S, Moss B, Wong Staal F, Steimer KS, Engleman EG: Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986;323:725-728.
193. Lin CG, Lo SJ: Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus pol gene from the viral pregenome RNA. *Virology* 1992;188:342-352.
194. Lincoln AJ, Monczak Y, Williams SC, Johnson PF: Inhibition of CCAAT/Enhancer-binding Protein alpha and beta Translation by Upstream Open Reading Frames. *J.Biol.Chem.* 1998;273:9552-9560.
195. Liu CC, Simonsen CC, Levinson AD: Initiation of translation at internal AUG codons in mammalian cells. *Nature* 1984;309:82-85.
196. Loflin P, Chen CY, Shyu AB: Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 1999;13:1884-1897.
197. Luukkonen BG, Tan W, Schwartz S: Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J.Virol.* 1995;69:4086-4094.
198. Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA: Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 2000;103:1121-1131.
199. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H: Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J.Biol.Chem.* 1996;271:8144-8151.

200. Ma WJ, Chung S, Furneaux H: The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucl.Acids.Res.* 1997;25:3564-3569.
201. Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986;47:333-348.
202. Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, Kieber-Emmons T, Kao GD, Muschel RJ, Weiner DB: HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:3419-3424.
203. Maldarelli F, Martin MA, Strebel K: Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J.Virol.* 1991;65:5732-5743.
204. Malim MH, Cullen BR: HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 1991;65:241-248.
205. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR: The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989;338:254-257.
206. Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rusche JR, Hauber J, Cullen BR: HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* 1990;60:675-683.
207. Maniatis T, Reed R: An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 2002;416:499-506.
208. Mann DA, Mikaelian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, Kimura T, Singh M, Butler PJ, Gait MJ, Karn J: 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.* 1994;241:193-207.
209. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R: A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol.Cell* 1998;1:565-574.
210. McCracken S, Fong N, Rosonina E, Yankulov K, Brothers G, Siderovski D, Hessel A, Foster S, Program AE, Shuman S, Bentley DL: 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 1997;11:3306.
211. Meerovitch K, Nicholson R, Sonenberg N: In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements within the poliovirus type 2 5' untranslated region. *J.Virol.* 1991;65:5895-5901.

212. Meijer HA, Thomas AA: Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem.J.* 2002;367:1-11.
213. Meyer BE, Malim MH: The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 1994;8:1538-1547.
214. Minvielle-Sebastia L, Keller W: mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999;11:352-357.
215. Misra VK, Draper DE: On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers (Nucleic Acid Science)* 1998;48:113-135.
216. Mitchell P, Tollervey D: mRNA stability in eukaryotes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2000;10:193-198.
217. Mitchell P, Tollervey D: An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'-->5' degradation. *Mol.Cell* 2003;11:1405-1413.
218. Moore MJ: Nuclear RNA turnover. *Cell* 2002;108:431-434.
219. Morris DR, Geballe AP: Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol.Cell.Biol.* 2000;20:8635-8642.
220. Muesing MA, Smith DH, Capon DJ: Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 1987;48:691-701.
221. Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS, Wilusz J: The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 2002;21:165-174.
222. Muthumani K, Hwang DS, Desai BM, Zhang D, Dayes N, Green DR, Weiner DB: HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J.Biol.Chem.* 2002;277:37820-37831.
223. Myers G, Korber B, Hahn BH, Jeang KT, Mellors JW, McCutchan FE, Henderson LE, Pavlakis GN: Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos, New Mexico, USA, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, 1995.
224. Myers G, Korber B, Hahn BH, Jeang KT, Mellors JW, McCutchan FE, Henderson LE, Pavlakis GN: Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, New Mexico, 1995.
225. Nagy E, Maquat LE: A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem.Sci.* 1998;23:198-199.

226. Najera I, Krieg M, Karn J: Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J.Mol.Biol.* 1999;285:1951-1964.
227. Narayan P, Towle HC: Stabilization of a specific nuclear mRNA precursor by thyroid hormone. *Mol.Cell Biol.* 1985;5:2642-2646.
228. Nasioulas G, Zolotukhin AS, Tabernero C, Solomin L, Cunningham CP, Pavlakis GN, Felber BK: Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J.Virol.* 1994;68:2986-2993.
229. Ohlmann T, Prevot D, Decimo D, Roux F, Garin J, Morley SJ, Darlix JL: In Vitro Cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 Protease and its Effects on Translation in the Rabbit Reticulocyte Lysate System. *J.Mol.Biol.* 2002;318:9-20.
230. Padgett KA, Sorge JA: Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* 1996;168:31-35.
231. Palangat M, Meier TI, Keene RG, Landick R: Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol.Cell* 1998;1:1033-1042.
232. Pauls K: Untersuchungen zum Einfluß von Spleißdonor-Sequenzen auf die Genexpression des HIV-1-Glykoproteins Env. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1998.
233. Pavlakis GN, Schwartz S, Benko DM, Drysdale CM, Solomin L, Robinson R, Harrison J, Campbell M, Felber BK: Genome Organization and Regulation of HIV-1 Expression; in: Haseltine WA, Wong-Staal F (eds): Genetic Structure and Regulation of HIV. New York, Raven Press, vol. 1, pp 175-192.
234. Paxton W, Connor RI, Landau NR: Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J.Virol.* 1993;67:7229-7237.
235. Peabody DS, Berg P: Termination-reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Mol.Cell Biol.* 1986;6:2695-2703.
236. Pende A, Tremmel KD, DeMaria CT, Blaxall BC, Minobe WA, Sherman JA, Bisognano JD, Bristow MR, Brewer G, Port JD: Regulation of the mRNA-binding Protein AUF1 by Activation of the beta-Adrenergic Receptor Signal Transduction Pathway. *J.Biol.Chem.* 1996;271:8493-8501.
237. Peng SS, Chen CY, Shyu AB: Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c- jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:1490-1499.
238. Peng SS, Chen CY, Xu N, Shyu AB: RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* 1998;17:3461-3470.

239. Perales C, Carrasco L, Ventoso I: Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett.* 2003;533:89-94.
240. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CUT: Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *PNAS* 2001;98:7029-7036.
241. Peterlin BM, Luciw PA, Barr PJ, Walker MD: Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;83:9734-9738.
242. Player MR, Torrence PF: The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol.Ther.* 1998;78:55-113.
243. Pomerantz RJ, Seshamma T, Trono D: Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J.Virol.* 1992;66:1809-1813.
244. Prendergast GC, Cole MD: Posttranscriptional regulation of cellular gene expression by the c-myc oncogene. *Mol.Cell Biol.* 1989;9:124-134.
245. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ: Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 2002;108:501-512.
246. Purcell DF, Martin MA: Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J.Virol.* 1993;67:6365-6378.
247. Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL: Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *PNAS* 2001;98:11668-11673.
248. Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C: Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucl.Acids.Res.* 2004;32:1279-1288.
249. Rappaport J, Lee SJ, Khalili K, Wong Staal F: The acidic amino-terminal region of the HIV-1 Tat protein constitutes an essential activating domain. *New Biol.* 1989;1:101-110.
250. Reddy TR, Kraus G, Suhasini M, Leavitt MC, Wong Staal F: Identification and mapping of inhibitory sequences in the human immunodeficiency virus type 2 vif gene. *J.Virol.* 1995;69:5167-5170.
251. Reed R, Magni K: A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat.Cell Biol.* 2001;3:E201-E204.

252. Remm M, Remm A, Ustav M: Human Papillomavirus Type 18 E1 Protein Is Translated from Polycistronic mRNA by a Discontinuous Scanning Mechanism. *J.Virol.* 1999;73:3062-3070.
253. Ribbeck K, Kutay U, Paraskeva E, Gorlich D: The translocation of transport-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr.Biol.* 1999;9:47-50.
254. Rogel ME, Wu LI, Emerman M: The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J.Virol.* 1995;69:882-888.
255. Rosen CA, Terwilliger E, Dayton A, Sodroski JG, Haseltine WA: Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988;85:2071-2075.
256. Roumier T, Vieira HL, Castedo M, Ferri KF, Boya P, Andreau K, Druillennec S, Joza N, Penninger JM, Roques B, Kroemer G: The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death.Differ.* 2002;9:1212-1219.
257. Ruan H, Shantz LM, Pegg AE, Morris DR: The Upstream Open Reading Frame of the mRNA Encoding S-Adenosylmethionine Decarboxylase Is a Polyamine-responsive Translational Control Element. *J.Biol.Chem.* 1996;271:29576-29582.
258. Ryabova LA, Hohn T: Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev.* 2000;14:817-829.
259. Sachs AB, Davis RW: The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* 1989;58:857-867.
260. Sadaie MR, Benter T, Wong Staal F: Site-directed mutagenesis of two trans-regulatory genes (tat-III, trs) of HIV-1. *Science* 1988;239:910-913.
261. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed 2. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
262. Sarkar B, Xi Q, He C, Schneider RJ: Selective Degradation of AU-Rich mRNAs Promoted by the p37 AUF1 Protein Isoform. *Mol.Cell.Biol.* 2003;23:6685-6693.
263. Sarrazin S, Starck J, Gonnet C, Doubeikovski A, Melet F, Morle F: Negative and Translation Termination-Dependent Positive Control of FLI-1 Protein Synthesis by Conserved Overlapping 5' Upstream Open Reading Frames in Fli-1 mRNA. *Mol.Cell.Biol.* 2000;20:2959-2969.
264. Schaal H, Klein M, Gehrman P, Adams O, Scheid A: Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J.Virol.* 1995;69:3308-3314.

265. Schaal H, Pfeiffer P, Klein M, Gehrman P, Scheid A: 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* 1993;124:275-280.
266. Schiller DJ: Untersuchungen zum Einfluß 5'-liegender Sequenzen auf die HIV-1 Rev-RRE-Interaktion. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1997.
267. Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN: Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J.Virol.* 1997;71:4892-4903.
268. Schwartz DC, Parker R: Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 1999;19:5247-5256.
269. Schwartz S, Campbell M, Nasioulas G, Harrison J, Felber BK, Pavlakis GN: Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J.Virol.* 1992;66:7176-7182.
270. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyo EM, Pavlakis GN: Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1990;64:2519-2529.
271. Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN: Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J.Virol.* 1990;64:5448-5456.
272. Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN: 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.* 1992;66:150-159.
273. Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN: Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol.Cell Biol.* 1992;12:207-219.
274. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD: Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol.Cell Biol.* 1986;6:3173-3179.
275. Shatkin AJ, Manley JL: The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat.Struct.Biol.* 2000;7:838-842.
276. Sheiness D, Darnell JE: Polyadenylic acid segment in mRNA becomes shorter with age. *Nat.New Biol.* 1973;241:265-268.

277. Sheldon M, Ratnasabapathy R, Hernandez N: 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.* 1993;13:1251-1263.
278. Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC: Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J.Virol.* 2001;75:1522-1532.
279. Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME: Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.* 1991;5:221-231.
280. Siomi H, Shida H, Maki M, Hatanaka M: Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J.Virol.* 1990;64:1803-1807.
281. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W: A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 1986;321:412-417.
282. Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong Staal F, Haseltine W: Location of the trans-activating region on the genome of human T- cell lymphotropic virus III. *Science* 1985;229:74-77.
283. Sodroski J, Rosen C, Wong Staal F, Salahuddin SZ, Popovic M, Arya S, Gallo RC, Haseltine WA: Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 1985;227:171-173.
284. Solomin L, Felber BK, Pavlakis GN: Different sites of interaction for Rev, Tef, and Rex proteins within the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1990;64:6010-6017.
285. Stein BS, Engleman EG: Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J.Biol.Chem.* 1990;265:2640-2649.
286. Stewart SA, Poon B, Song JY, Chen IS: Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J.Virol.* 2000;74:3105-3111.
287. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA: The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987;328:728-730.
288. Takahashi S, Araki Y, Sakuno T, Katada T: Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 2003;22:3951-3959.
289. Tan W, Schwartz S: The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 counteracts the effect of an AU-rich negative element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region. *J.Virol.* 1995;69:2932-2945.

290. Terwilliger E, Burghoff R, Sia R, Sodroski J, Haseltine W, Rosen C: The art gene product of human immunodeficiency virus is required for replication. *J.Virol.* 1988;62:655-658.
291. Tharun S, He W, Mayes AE, Lennertz P, Beggs JD, Parker R: Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 2000;404:515-518.
292. Thomas G, Siegmann M, Bowman PD, Gordon J: The isolation and analysis of polysomes and ribosomal RNA from cells growing in monolayer culture. *Exp.Cell Res.* 1977;108:253-258.
293. Thomas SL, Oft M, Jaksche H, Casari G, Heger P, Dobrovnik M, Bevec D, Hauber J: Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J.Virol.* 1998;72:2935-2944.
294. Thomsen R, Libri D, Boulay J, Rosbash M, Jensen TH: Localization of nuclear retained mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 2003;9:1049-1057.
295. Tierney MJ, Medcalf RL: Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 Contains mRNA Instability Elements within Exon 4 of the Coding Region. SEQUENCE HOMOLOGY TO CODING REGION INSTABILITY DETERMINANTS IN OTHER mRNAs. *J.Biol.Chem.* 2001;276:13675-13684.
296. Vaessen RT, Houweling A, van der Eb AJ: Post-transcriptional control of class I MHC mRNA expression in adenovirus 12-transformed cells. *Science* 1987;235:1486-1488.
297. van Dijk E, Le Hir H, Seraphin B: DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:12081-12086.
298. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R: Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 2002;295:2262-2264.
299. van Hoof A, Parker R: The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* 1999;99:347-350.
300. Vannice JL, Taylor JM, Ringold GM: Glucocorticoid-mediated induction of alpha 1-acid glycoprotein: evidence for hormone-regulated RNA processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1984;81:4241-4245.
301. Vedeler A, Pryme IF, Hesketh JE: The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krebs II ascites and 3T3 cells. *Mol.Cell Biochem.* 1991;100:183-193.
302. Veyrune JL, Carillo S, Vie A, Blanchard JM: c-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation. *Oncogene* 1995;11:2127-2134.

303. Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G: Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 1998;48:195-202.
304. Wagner E, Lykke-Andersen J: mRNA surveillance: the perfect persist. *J.Cell Sci.* 2002;115:3033-3038.
305. Wang W, Fan J, Yang X, Furer-Galban S, Lopez dS, I, von Kobbe C, Guo J, Georas SN, Foufelle F, Hardie DG, Carling D, Gorospe M: AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol.Cell Biol.* 2002;22:3425-3436.
306. Wang Z, Kiledjian M: Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 2001;107:751-762.
307. Wang Z, Jiao X, Carr-Schmid A, Kiledjian M: From the Cover: The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *PNAS* 2002;99:12663-12668.
308. Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM: Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* 1990;249:1281-1285.
309. Wen Y, Shatkin AJ: Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev.* 1999;13:1774-1779.
310. White JM: Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu.Rev.Physiol.* 1990;52:675-97:675-697.
311. WHO and UNAIDS. AIDS epidemic update Dec 2003
<http://www.who.int/hiv/facts/en/>. 2003.
Ref Type: Internet Communication
312. Wilkinson MF, Shyu AB: Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays* 2001;23:775-787.
313. Wilkinson MF, Shyu AB: RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat.Cell Biol.* 2002;4:E144-E147.
314. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J.Virol.* 1992;66:7193-7200.
315. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J.Virol.* 1992;66:226-234.
316. Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Suarez Y, Sinha S, Brewer B, Villanueva-Feliciano EC, Ysla RM, Charles S, Brewer G: Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A+U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J.Biol.Chem.* 2003;M305775200.

317. Wilson GM, Sutphen K, Chuang Ky, Brewer G: Folding of A+U-rich RNA Elements Modulates AUF1 Binding. POTENTIAL ROLES IN REGULATION OF mRNA TURNOVER. *J.Biol.Chem.* 2001;276:8695.
318. Wilusz CJ, Wang W, Peltz SW: Curbing the nonsense: the activation and regulation of mRNA surveillance. *Genes Dev.* 2001;15:2781-2785.
319. Wu-Baer F, Sigman D, Gaynor RB: Specific binding of RNA polymerase II to the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA is regulated by cellular cofactors and Tat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:7153-7157.
320. Xu N, Chen CY, Shyu AB: Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol.Cell.Biol.* 1997;17:4611-4621.
321. Xu N, Chen CY, Shyu AB: Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol.Cell Biol.* 2001;21:6960-6971.
322. Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M: The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 2003;113:519-531.
323. Yueh A, Schneider RJ: Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev.* 2000;14:414-421.
324. Zapp ML, Green MR: Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 1989;342:714-716.
325. Zapp ML, Hope TJ, Parslow TG, Green MR: Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991;88:7734-7738.
326. Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, DeHaven K, Long L, Brewer G: Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol.Cell Biol.* 1993;13:7652-7665.
327. Zheng X, Kelley K, Elnakat H, Yan W, Dorn T, Ratnam M: 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.* 2003;23:2202.
328. Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH, Brady JN: 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.* 2000;20:5077-5086.

329. Zolotukhin AS, Felber BK: Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J.Virol.* 1999;73:120-127.
330. Zundel C: Der Einfluß von Tat auf die Polyadenylierung der HIV-1 mRNA. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1998.

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.

Krummheuer J., Kammler S., Asang C., Schaal H. An upstream open reading frame enables efficient expression of HIV-1 rev and env, in preparation

Poster:

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., 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



Lebenslauf

Jörg Krummheuer

Dienstanschrift: Institut für Virologie,
Universitäts-Klinikum Düsseldorf
Universitätsstr.1
40225 Düsseldorf
Tel.:(0049)-211 81 14546
e-mail: joerg_krummheuer@web.de
Privatanschrift: Kronprinzenstr. 132
40217 Düsseldorf

Persönliche Daten:

Familienstand:	ledig
Geburtsdatum:	21.09.1968
Geburtsort:	Solingen

Ausbildung:

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

Vordiplom 16/02/1993
Diplom 09/04/1997
Diplomthema: Untersuchungen zum Expressionsmuster alternativ
gespleißter HIV-1mRNAs;
ausgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie;
AG Prof. Dr. A. Scheid.

10/1997-2004 Promotionsstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berufliche Tätigkeiten:

10/1997-2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf im Rahmen der Promotionsarbeit

sonstiges:

9/1988-3/1990 Zivildienst im Stoffwechsellabor der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, AG Prof. Dr. I. Lombeck
HPLC-Trennung von Phospholipiden aus Milchpulver

4/2002 Gastaufenthalt an der Universität Aarhus, Dänemark, AG Prof. Dr. J. Kjems

