

Die Funktion des U1 snRNPs
in der HIV-1 *env*-Expression

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Marcel Freund

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2004

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

Referent(in): Prof. Dr. Heiner Schaal

Korreferent(in): Prof. Dr. Rolf Wagner
Prof. Dr. Ralf Wagner

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

Inhaltsverzeichnis	
Danksagung	6
Abkürzungen	7
Einheiten	9
1 Einleitung	10
1.1 Das Spleißen eukaryotischer Primärtranskripte	10
1.1.1 Die Assemblierung des Spleißosoms	12
1.1.1.1 Die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP	12
1.1.1.2 Die Erkennung der 3'-Spleißstelle	14
1.1.1.3 Der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs	16
1.1.1.4 Die Katalyse der Transester Reaktionen	18
1.1.2 Der Einfluss cis-wirkender spleißregulierender Sequenzelemente	20
1.1.2.1 Die Regulation des prä-mRNA Spleißens durch SR-Proteine	21
1.1.2.2 Die Regulation des prä-mRNA Spleißens durch heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)	26
1.2 Das humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)	30
1.2.1 Die antiretrovirale Therapie	31
1.2.2 Der Replikationszyklus von HIV-1	33
1.2.2.1 Die Env-vermittelte Infektion der Wirtszelle	34
1.2.2.2 Die Tat-vermittelte Transaktivierung der viralen Transkription	35
1.2.2.3 Der Rev-vermittelte nukleocytoplasmatische Export intronhaltiger mRNAs	36
1.3 Zielsetzung	41
2 Material und Methoden	42
2.1 Material	42
2.1.1 Chemikalien, Medien und Lösungen	42
2.1.2 Escherichia coli Stämme	42
2.1.3 Zelllinien	42
2.1.4 Oligonukleotide	43
2.1.5 Rekombinante Plasmide	43
2.1.5.1 env-Expressionsvektoren	43
2.1.5.2 U1 snRNA Plasmide	48
2.1.5.3 MS2-SR Fusionsproteine	49
2.1.5.4 env-eGFP Konstrukte	50
2.1.5.5 Plasmide zur Kotransfektion	50
2.1.5.6 Plasmide zur in vitro Transkription	51
2.1.5.7 Plasmide zur SR-Protein Aufreinigung	52
2.2 Methoden	52
2.2.1 Klonierung rekombinanter Plasmide	52
2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“)	52
2.2.1.2 Restriktion, Aufreinigung und Ligation von Plasmid-Fragmenten	53
2.2.1.3 Herstellung kompetenter Escherichia colis	53
2.2.1.4 Transformation kompetenter Escherichia colis	53
2.2.1.5 Analytische Präparation von Plasmid-DNA	54
2.2.2 Präparative Plasmid-Isolierung über CsCl-Gradienten bzw. Anionen-Austauscher-Säulen	54
2.2.3 Zellkultur	55

2.2.3.1	Transfektion mittels Elektroporation bzw. unter Verwendung des Transfektionsreagenz (Fugene TM 6).....	55	
2.2.4	Protein-Analysen mittels Immunoblot.....	56	
2.2.4.1	Proteinpräparation aus HeLa-T4 ⁺ Zellen.....	56	
2.2.4.2	Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration nach Bradford.....	57	
2.2.4.3	Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay.....	57	
2.2.4.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	58	
2.2.4.5	Westernblot	58	
2.2.5	RNA-Analysen mittels Northernblot	58	
2.2.5.1	Präparation von Gesamt-RNA	58	
2.2.5.2	Isolierung polyadenylierter RNA	59	
2.2.5.3	Northern Blot-Analyse.....	59	
2.2.5.4	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung von DIG-gekoppelten RNA-Sonden	60	
2.2.6	Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA)	61	
2.2.6.1	Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem SF2/ASF	über ein „Histidin-tag“	61
2.2.6.2	<i>In vitro</i> Transkription von [³² P]-markierten Transkripten	62	
2.2.6.3	Native elektrophoretische Auftrennung der RNA/Protein-Komplexe	62	
2.2.7	„Pull-down“ Analysen.....	63	
2.2.7.1	Herstellung von biotinylierten <i>in vitro</i> Transkripten.....	63	
2.2.7.2	Komplexbildung unter Spleißbedingungen	63	
2.2.7.3	<i>In vitro</i> Transkription von [³² P]-markierten „antisense“ RNA-Sonden	64	
3	Ergebnisse.....	66	
3.1	Der Einfluss der Spleißdonorsequenz auf die Rev-vermittelte <i>env</i>-Expression.....	66	
3.1.1	Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA als Voraussetzung für die <i>env</i>-Expression.....	67	
3.1.2	Eine Basenpaarung zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle ist an den Positionen -3 bis +8 möglich	69	
3.1.3	Zentrale Fehlbasenpaarungen innerhalb der zu der U1 snRNA komplementären SD4 Sequenz können durch zusätzliche Basenpaarungen kompensiert werden.....	72	
3.1.4	Die Bindung des U1 snRNPs wird <i>in vitro</i> durch zentrale Fehlbasenpaarungen innerhalb der zu der U1 snRNA komplementären 5'-Spleißstellen Sequenz verhindert.....	74	
3.1.5	Entwicklung eines Algorithmus auf der Grundlage des Wasserstoffbrückenbindungsmodells zur Beschreibung von potentiellen U1 snRNA Bindungsstellen	76	
3.1.6	G:U Basenpaarungen tragen weniger zur U1 snRNA-abhängigen <i>env</i>-Expression bei als A:U Basenpaarungen	78	
3.1.7	Terminale Basenpaarungen stabilisieren die Bindung der U1 snRNA in geringerem Ausmaß als interne Basenpaarungen	83	
3.1.8	Eine G:U Basenpaarung an der Position +3 kann durch eine zusätzliche G:U Basenpaarung an der Position +4 stabilisiert werden.....	86	
3.1.9	Der „splicefinder“ stellt einen neuen Ansatz zur Beschreibung von U1 snRNA Bindungsstellen dar.....	90	
3.1.10	Analyse von humanen 5'-Spleißstellen durch den „splicefinder“ Algorithmus	92	
3.1.11	Grenzen des „splicefinder“ Algorithmus.....	95	

3.2	Der Einfluss der 5'-wärts des Spleißdonors gelegenen Sequenz auf die Rev-vermittelte <i>env</i> -Expression.....	99
3.2.1	Die potentielle U1 snRNA Bindestelle HIV#18 wird aufgrund ihrer 5'-wärts liegenden Sequenz nicht erkannt	100
3.2.2	Für eine effiziente 5'-Spleißstellen abhängige <i>env</i> -Expression ist die Anwesenheit der Exon 5 Sequenz „upstream“ des SD4 notwendig.....	101
3.2.3	Die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle SD4 ist von deren Komplementarität und den GAR Sequenzmotiven abhängig	103
3.2.4	Die GAR Sequenzwiederholungen wirken <i>in vitro</i> als SF2/SRp40 abhängiger „exonischer splicing enhancer“	105
3.2.5	Die GAR Sequenzwiederholungen unterstützen die Bindung des U1 snRNPs an die 3'-wärts gelegene 5'-Spleißstelle SD4.....	107
3.2.6	Die GAR Sequenzwiederholungen können durch ein MS2-SR/MS2 Bindungs-System funktionell ersetzt werden.....	109
3.2.7	Eine funktionelle „upstream“ Sequenz weist mindestens zwei SR-Protein Bindungsstellen 5'-wärts der 5'-Spleißstelle SD4 auf.....	111
3.2.8	Eine erweiterte Basenpaarung zwischen der 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA ist für eine effiziente <i>env</i> -Expression nicht ausreichend.....	113
3.2.9	In Gegenwart des E42 Elementes wird die zur <i>env</i> -Expression benötigte U1-Komplementarität der 5'-Spleißstelle reduziert	115
3.2.10	Die Funktionalität des E42 Elementes wird durch eine SF2- und eine SRp40 SR-Protein Bindungsstelle vermittelt.....	116
3.2.11	Ein putatives SF2/SRp40 Modul stromaufwärts der 5'-Spleißstelle gewährleistet nicht die Erkennung der Spleißdonorsequenz durch das U1 snRNP	118
3.2.12	<i>In vivo</i> SELEX, ein neuer Ansatz zur Ermittlung funktioneller Sequenzelemente	121
3.2.13	Interaktion zwischen SR-Proteinen und U1 snRNP.....	124
3.2.14	Konservierung der beschriebenen regulatorischen Elemente innerhalb verschiedener HIV-1 Stämme	127
4	Diskussion	130
4.1	Der Einfluss der Spleißdonorsequenz auf die Rev-vermittelte <i>env</i> -Expression.....	130
4.2	Der Einfluss der 5'-wärts des Spleißdonors gelegenen Sequenz auf die Rev-vermittelte <i>env</i> -Expression	138
5	Zusammenfassung.....	158
6	Literaturverzeichnis.....	159
	Publikationen.....	200
	Lebenslauf.....	202

Danksagung

Die Experimente dieser Arbeit wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal für die Gewährung von wissenschaftlichen Freiräumen und zugleich für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Andreas Scheid für die Vergabe des interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für sein Interesse an meiner Arbeit und die bereitwillige Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für sein Interesse an meiner Arbeit und die Erstellung des auswärtigen Gutachtens.

Frau Imke Meyer für ihre exzellente technische Assistenz und die ausgesprochen harmonische Zusammenarbeit.

PD Dr. Ortwin Adams, Corinna Asang, Martina Austrup, Dr. Massimo Caputi, Linda Hartmann, Marianne Hipp, Dr. Susanne Kammler, Carolin Konermann, Dr. Cathrin Krempe, Dr. Jörg Krummheuer, Dr. Cordula Leurs, Kornelia Neveling, Prof. Dr. Detlev Schindler, Magdalena Stosik, Stephan Theiss und Maria Thieme für die konstruktive Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Virologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Jorgen Kjems und Dr. Thomas O. Tange für ihre Gastfreundschaft bei meinem Aufenthalt an der Universität Aarhus.

Brigitte Freund, die durch ihre langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen den Grundstein dieser Arbeit gelegt hat.

Knud Kolaczinski und Ümit Erdemir für ihre moralische Unterstützung.

MA Susanne Rudolph für ihre aufopfernde Hilfe bei der Vollendung dieser Arbeit.

Abkürzungen

AIDS	„Acquired Immunodeficiency Syndrome“
ALV	„Avian Leukosis Virus“
Amp	Ampicillin
[α - ³² P]ATP	[α - ³² P] markiertes Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ASF/SF2	Alternativer Spleißfaktor/Spleißfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPS	„branch point sequence“ (Verzweigungssequenz)
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinder-Serumalbumin)
cDNA	„copy DNA“
CMV	Cytomegalie-Virus
CP	Creatin-Phosphat
CRS	„Cis-acting repressive sequence“
CTE	„Constitutive transport element“
ddH ₂ O	Deionisiertes und destilliertes Wasser
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMDC	Dimethyldicarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Env	HIV-1 Envelope-Protein
<i>env</i>	Gen für das HIV-1 Env Protein
ESE	„Exonic splicing enhancer“
ESS	„Exonic splicing silencer“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	„Fluorescence activated cell sorter“
FKS	Fötales Kälberserum
<i>gag</i>	„Group specific antigen“ (Gen für die HIV-1 Strukturproteine)
HC	„high complementarity“
HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
hGH	„Human growth hormone“

HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HSV	Herpes simplex Virus
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1
INS	„Instability sequence“
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
ISE	„Intronic splicing enhancer“
ISS	„Intronic splicing silencer“
LB	LB-Medium („Luria broth base medium“)
LC	„low complementarity“
LTR	„Long terminal repeat“
Luc	Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NE	„nuclear extract“ (Kernextrakt)
NPC	„nuclear pore complex“ (Kernporenkomplex)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	„Open reading frame“ (offener Leserahmen)
ori	„Origin of replication“ (Replikationsursprung)
pA	Polyadenylierungsstelle
PAA	Polyacrylamid
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
pH	$-\log[H^+]$
POD	Peroxidase
PPT	Polypyrimidin-Trakt
Rev	„Regulator of expression of virion proteins“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
rpm	„Rotations per minute“
RRE	„Rev responsive element“
RRM	„RNA recognition motif“
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SA	Spleißakzeptor, 3'-Spleißstelle
SD	Spleißdonor, 5'-Spleißstelle
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SELEX	„Systematic evolution of ligands by exponential enrichment“
SIV	„Simian Immunodeficiency Virus“
snRNA	„small nuclear RNA“
snRNP	„small nuclear ribonucleoprotein particle“
SRp	SR (Serin/Arginin-reiches)-Protein
SRrp	„SR related polypeptides“ (SR verwandtes Polypeptid)
ss	„Splice site“
SSC	„Standard saline citrate“
SV	„Simian Virus“
TAR	„Trans-activation response element“
Tat	„Trans-activator of transcription“
U2AF	„U2 snRNP auxiliary factor“
UV	Ultraviolett
v/v	„Volume per volume“
w/v	„Weight per volume“

Einheiten

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

1 Einleitung

Die Sequenzierung des humanen Genoms hat gezeigt, dass der Mensch, trotz seiner drei Milliarden Basenpaare, nur ca. 35.000 Gene besitzt von denen etwa 26.000 für Proteine kodieren (355, 636). Dies sind weniger als dreimal so viele Gene, wie das Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* aufweist. Dieser überraschend geringen Anzahl an Genen steht jedoch eine weitaus größere Menge von mehr als 90.000 humanen Proteinen gegenüber (260, 355). Durch die Synthese mehrerer unterschiedlicher mRNAs aus einem einzigen Gen, leistet das alternative Spleißen einen wichtigen Beitrag zur Proteom Diversifikation (58, 231). Aktuellen Daten zufolge werden ungefähr 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt (355, 404), wodurch die erhöhte Proteom Komplexität erklärt werden kann (44, 440). Das alternative Spleißen wird auch in *Drosophila melanogaster* intensiv genutzt, wie das Beispiel des *Down Syndroms Cell Adhesion Molecule (Dscam)* Gens zeigt. Von diesem Gen sollen durch alternatives Spleißen 38.016 verschiedene mRNAs generiert werden (89). Die Anzahl der, durch dieses einzelne Gen, gebildeten Proteine, entspricht demnach knapp der dreifachen Menge der Gene des gesamten *Drosophila* Genoms. Die Komplexität eines Organismus kann somit offensichtlich weder allein durch die Anzahl der Gene, noch allein durch die Anzahl der Proteine hinreichend erklärt werden.

1.1 Das Spleißen eukaryotischer Primärtranskripte

Während bzw. nach der Transkription wird die prä-mRNA zahlreichen Modifikationen unterzogen, bevor sie als reife mRNA in das Cytoplasma exportiert wird. Dazu zählt die Verknüpfung eines 7-Methyl-Guanosins („cap“) über eine 5'-5'-Pyrophosphatbindung am 5'-Ende, das Herausschneiden der nicht kodierenden Intronsequenzen, die Religation der Exonsequenzen und die Polyadenylierung am 3'-Ende (für eine Übersicht s.((403, 490, 553))).

Die meisten eukaryotischen Primärtranskripte (prä-mRNAs) enthalten Introns, welche vor ihrem nukleocytoplasmatischen Export entfernt werden müssen, um eine korrekte Translation ihres Leserahmens zu gewährleisten. Das Herausschneiden der Intronsequenzen erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Transester Reaktionen (474, 475, 520). In dem ersten Schritt der Spleißreaktion wird die Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleißstelle nukleophil durch die 2'-Hydroxylgruppe des Adenosins an der Verzweigungsstelle („branchpoint“)

angegriffen (Abb. 1). Dadurch entsteht eine neue 2'-5'-Phosphodiesterbindung an der Verzweigungsstelle stromaufwärts der 3'-Spleißstelle und eine freie 3'-Hydroxylgruppe an dem 5'-Exon. In dem zweiten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der freien 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons an der Phosphodiesterbindung des 3'-Spleißstelle, wodurch das Intron als Lariatstruktur freigesetzt wird und die beiden Exons verknüpft werden (236, 336). Der bimolekulare Ablauf der Spleißreaktion verlangt, dass die Reaktion innerhalb eines stabilen Spleißkomplexes stattfindet. Diese katalytische Funktion übernimmt in der Zelle ein 50-60S Ribonukleoproteinkomplex (228, 499), welcher als Spleißosom bezeichnet wird (für eine Übersicht s. (68, 298, 441, 498)).

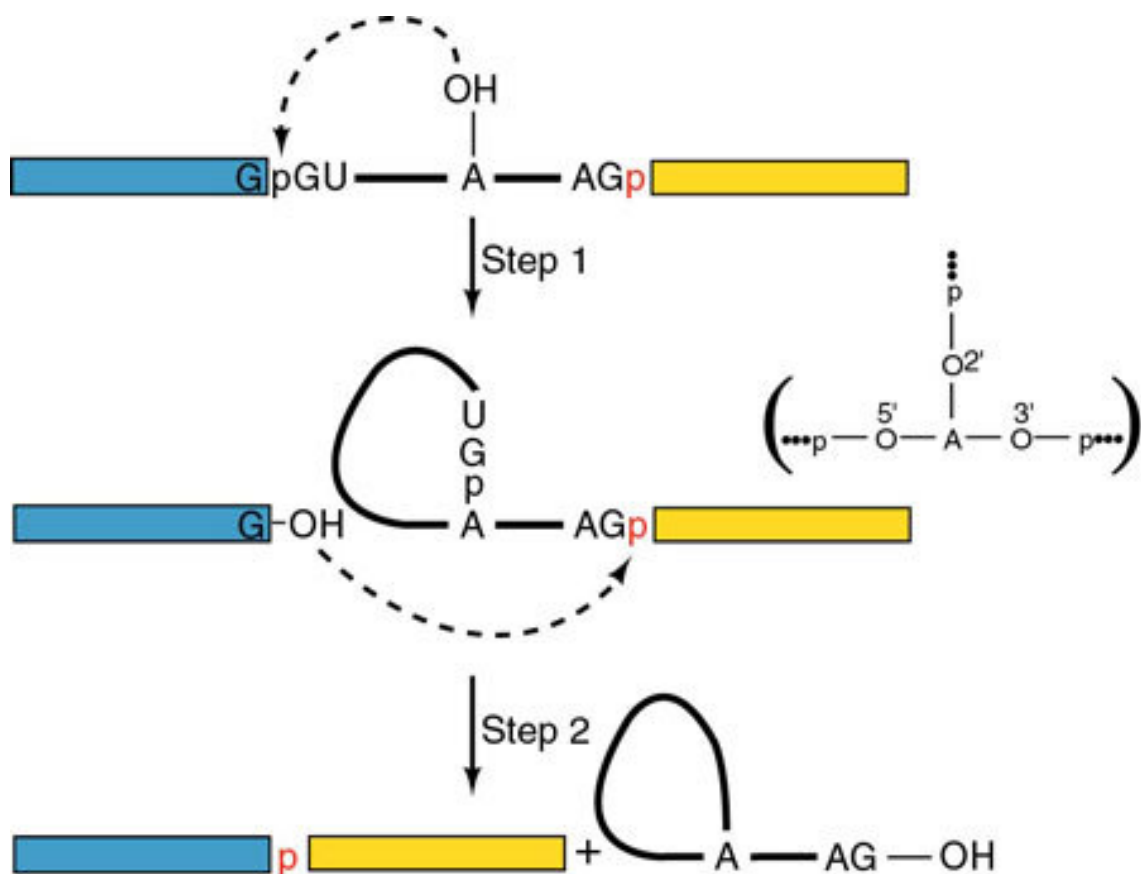


Abb. 1: Schematische Darstellung der Spleißreaktion. In dem ersten Schritt der Spleißreaktion wird die Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleißstelle nukleophil durch die 2'-Hydroxylgruppe des Adenosins an der Verzweigungsstelle angegriffen. Dadurch entsteht eine neue 2'-5'-Phosphodiesterbindung an der Verzweigungsstelle stromaufwärts der 3'-Spleißstelle und eine freie 3'-Hydroxylgruppe an dem 5'-Exon. In dem zweiten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der freien 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons an der Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle, wodurch das Intron als Lariatstruktur freigesetzt wird und die beiden Exons verknüpft werden.

1.1.1 Die Assemblierung des Spleißosoms

An der Assemblierung des reifen Spleißosoms sind fünf kleine nukleäre Ribonukleoprotein Partikel („small nuclear RNPs“ (snRNPs)), U1, U2, U4, U5 und U6 beteiligt. Jedes snRNP besteht aus einer kleinen nukleären RNA („small nuclear RNA“ (snRNA)), an die verschiedene Proteine fest gebunden sind, und die mit zahlreichen, weniger stabil assoziierten Spleißfaktoren interagieren (für eine Übersicht s. (68)). Die U snRNA gebundenen Proteine werden unterteilt in Proteine, die in allen U snRNPs gemeinsam vorkommen und in die U snRNP spezifischen Proteine (21). Die gemeinsamen Proteine werden als Sm-Proteine bezeichnet, da diese eine Reaktion mit anti-Sm Autoantikörpern von Patienten mit einer systemischen Lupus erythematoses (SLE) Autoimmunerkrankung zeigen (365). Die sieben Sm-Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F und G) binden an eine, von zwei „stem-loop“ Strukturen flankierte, einzelsträngige, Uracil-reiche Region, die Sm-Protein Bindungsstelle, welche vier der fünf spleißosomalen U snRNAs (U1, U2, U4 und U5) aufweisen ((56), für eine Übersicht s. ((650)). Innerhalb des U6 snRNPs werden diese Proteine als Sm-ähnliche Proteine („like Sm“: Lsm2p-Lsm8p) bezeichnet, da sie nicht an die Sm-Sequenzen anderer U snRNAs binden können (1). Allen Sm-Proteinen gemeinsam ist ein zweiteiliges Sequenzmotiv (Sm1 und Sm2), welches durch eine kurze variable Sequenz getrennt ist. Die Kristallstruktur von zwei Sm-Protein Heterodimeren (D3B und D1D2) legt eine geschlossene Ringstruktur mit einer positiv geladenen zentralen Öffnung nahe, in der die U snRNA gebunden ist (301). Die Assoziation der U snRNAs mit den Sm-Proteinen führt zu einer Hypermethylierung der Monomethylguanin (m^7G) „cap“-Struktur der U snRNAs zu einer 2,2,7-Trimethylguanin (m_3G) Form (411). Die Trimethylguanin „cap“-Struktur dient zusammen mit den assoziierten Sm-Proteinen als Kernlokalisierungssignal (183, 255) und vermittelt die Stabilität der spleißosomalen U snRNPs (296).

1.1.1.1 Die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP

Das U1 snRNP ist sowohl das häufigste der im Spleißprozess vorkommenden U snRNPs (402, 552), als auch das erste U snRNP von dem gezeigt werden konnte, dass es für die Spleißreaktion notwendig ist (338). Das humane U1 snRNP besteht aus der 164 Nukleotide langen U1 snRNA, den bereits beschriebenen sieben Sm-Proteinen und den drei U1-spezifischen Proteinen U1-70K, U1-A und U1-C (59, 456). Das U1-70K Protein enthält eine RNA Bindedomäne des RRM Typs („RNA recognition motif“), welche eine spezifische

Bindung an die „stem-loop I“ Struktur der U1 snRNA vermittelt (243, 253, 478, 493, 600). Die Bindung des U1-A Proteins an die „stem-loop II“ Struktur der U1 snRNA (243, 387, 535, 600) erfolgt ebenfalls direkt über eine RRM RNA-Bindedomäne (535, 564). Diese Interaktion konnte durch hochauflösende Kristallstruktur Aufnahmen der Bindung des U1 snRNP spezifischen Proteins U1-A an die „stem-loop II“ Struktur bestätigt werden (448, 472). Im Gegensatz zu dem U1-70K und dem U1-A Protein enthält das U1-spezifische U1-C Protein keine RNA-Bindedomäne, so dass die Assoziation mit dem U1 snRNP über Protein-Protein Wechselwirkungen erfolgt (453, 563). Bindungsstudien an U1-C Deletionsmutanten haben gezeigt, dass die N-terminale Domäne, welche ein Zink-Finger ähnliches Bindungsmotiv enthält, für eine Assoziation mit dem U1 snRNP sowohl notwendig, als auch ausreichend ist (244, 453). Zusätzlich ist für die Bindung des U1-C Proteins die N-terminale Domäne des U1-70K Proteins, sowie die Anwesenheit von mindestens einem Sm-Protein notwendig (454). Diese Strukturen konnten später durch kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen des vollständigen U1 snRNPs, die eine drei-dimensionale Struktur der Proteine und der an ihnen gebundenen RNA innerhalb des U1 snRNPs lieferten, bestätigt werden (585).

Die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle stellt den initialen Schritt der Spleißosomen Assemblierung dar. Diese Erkennung der 5'-Spleißstelle erfolgt über eine Basenpaarung des einzelsträngigen 5'-Endes der U1 snRNA mit der 5'-Spleißstelle (196, 302, 383, 690). Dieser stabile U1 snRNP/prä-mRNA Komplex konnte zuerst *in vitro* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (519, 549). Dieser, in der Hefe als „commitment complex“ (CC) bezeichnete, Komplex konnte später auch durch Gelfiltrations-Experimente in Säugern identifiziert werden, wo er als „early“ oder E-Komplex bezeichnet wird (Abb. 2) (431, 432). Neben der, zu dem 5'-Ende der U1 snRNA komplementären, Nukleotidsequenz der 5'-Spleißstelle spielen auch die Proteinkomponenten des U1 snRNPs eine wichtige Rolle bei der Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das U1 snRNP spezifische Protein U1-70K (290, 331), als auch das U1-C Protein (268, 290) zur Erkennung der 5'-Spleißstelle notwendig sind. Die initiale Bindung des U1 snRNPs dient dabei nicht nur der nukleotidgenauen Erkennung der 5'-Spleißstelle und dem daraus resultierenden Herausschneiden der Intronsequenzen, sondern dient auch als Schutz der prä-mRNA vor nukleärer Degradation (302, 383). Diese stabilisierende Funktion konnte von der spleißaktivierenden Funktion des U1 snRNPs getrennt werden (302). Die Bindung dieses Faktors scheint somit von zentraler Bedeutung für den weiteren Verlauf der Spleißreaktion zu sein.

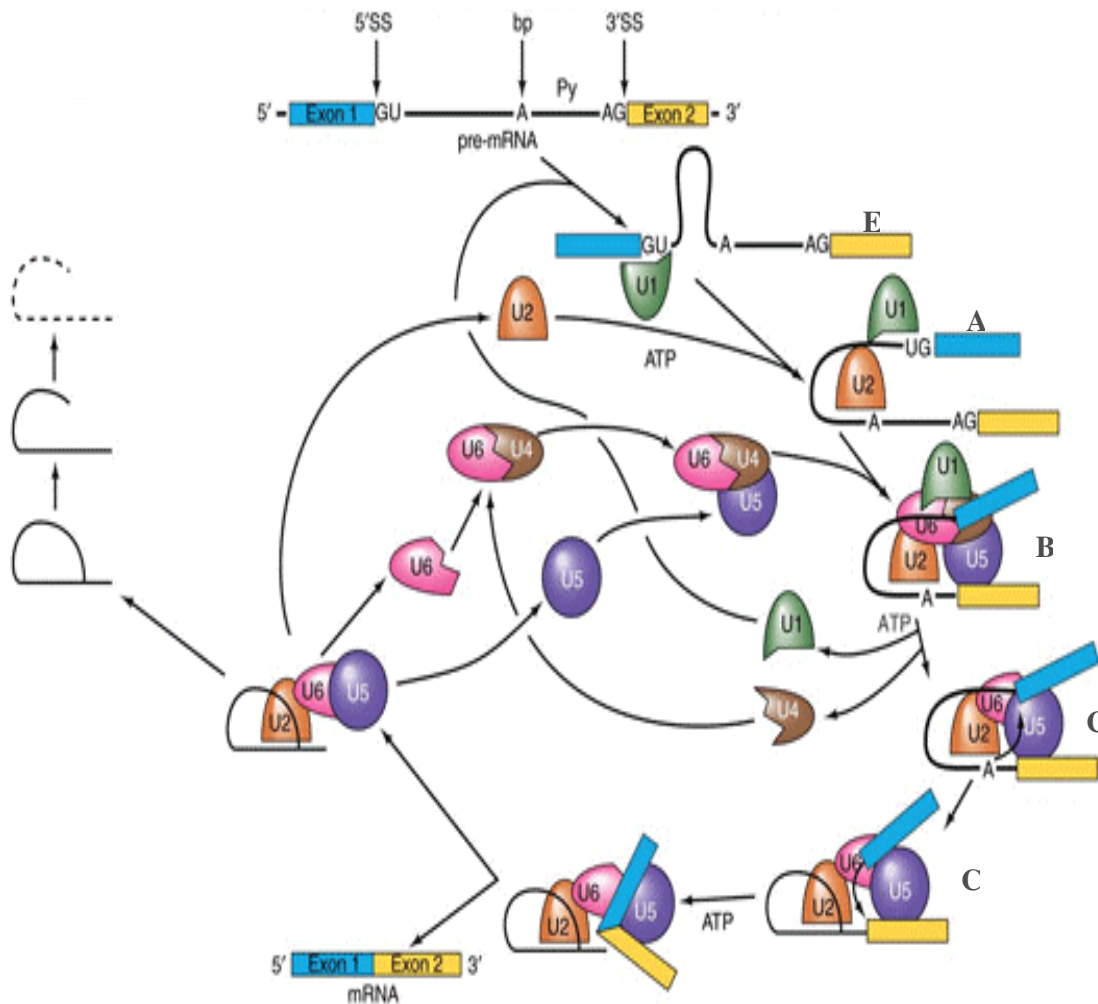


Abb. 2: Schematische Darstellung der Spleißosomen Assemblierung (modifiziert nach (441)). Die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle stellt den initialen Schritt in der Spleißosomen Assemblierung dar (E-Komplex). Die Bindung des U2 snRNPs an die Verzweigungsstelle markiert den A-Komplex und der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs stellt den Übergang zum B-Komplex dar. Die beiden Transester Reaktionen werden von dem reifen C-Komplex Spleißosom katalysiert, wodurch die beiden Exons, unter Herausspleißen des Intron Lariats, verknüpft werden.

1.1.1.2 Die Erkennung der 3'-Spleißstelle

Die Erkennung der 3'-Spleißstelle wird initiiert durch die spezifische Bindung des Spleißfaktors 1 (SF1, auch als mBBP „mammalian branchpoint binding protein“ bezeichnet) über eine KH-Domäne (hnRNP K homologe Domäne) an die Verzweigungsstelle („branchpoint“) stromaufwärts der 3'-Spleißstelle (11, 33, 34, 35, 480). Der U2 assoziierte Faktor U2AF („U2 auxiliary factor“) ist ein Heterodimer, welches aus den beiden

Untereinheiten U2AF65 und U2AF35 besteht (245, 246, 314, 659). Die größere Untereinheit U2AF65 bindet über ein RNA Erkennungsmotiv (RRM) an die Polypyrimidinsequenz, welche stromabwärts der Verzweigungsstelle und stromaufwärts der 3'-Spleißstelle lokalisiert ist, und verstärkt dadurch die Bindung von SF1/mBBP an die Verzweigungsstelle (23, 33, 480, 546). Die Interaktion der kleineren Untereinheit U2AF35 erfolgt ebenfalls über ein RNA Erkennungsmotiv (RRM) mit der 3'-Spleißstelle (425, 473, 659). Die Bindung von U2AF35 an die 3'-Spleißstelle kann wiederum die Bindung von U2AF65 an schwache Polypyrimidinsequenzen unterstützen (246). Durch die Bindung von SF1/mBBP und des U2AF Heterodimers an die prä-mRNA wird die Rekrutierung des U2 snRNPs an die Verzweigungsstelle vermittelt, welche mit einer ATP-abhängigen Verdrängung des Spleißfaktors SF1/mBBP einhergeht (30, 102, 247, 316, 339, 390, 480, 583).

Das U2 snRNP besteht aus der 188 Nukleotide langen U2 snRNA (68) und liegt in seiner prä-mRNA bindenden Form als 17S Ribonukleoprotein Partikel vor (337, 652). Die Bildung des 17S U2 snRNPs erfolgt durch Assoziation der 12S U2 snRNPs mit den beiden essentiellen Spleißfaktoren SF3a und SF3b (337, 455). Die Bindung dieser Spleißfaktoren ist sowohl notwendig für die Erkennung der Verzweigungsstelle durch das U2 snRNP, als auch für die nukleotidgenaue Entfernung der Intronsequenzen aus der prä-mRNA (215). Die Bindung von SF3a/SF3b erfolgt stromaufwärts der Verzweigungsstelle an eine Sequenz, die als Verankerungsregion („anchoring site“) bezeichnet wurde (227). Das SF3a Heterotrimer (SF3a60, SF3a66, SF3a120) (455) interagiert dabei mit der 3'-Hälfte der U2 snRNA (337). Der Spleißfaktor SF3b, welcher mit der 5'-Hälfte des U2 snRNPs interagiert, wurde zunächst als Heterotetramer (SF3b49, SF3b130, SF3b145 und SF3b155) beschrieben (337). Später konnte durch UV-Quervernetzungsexperimente ein weiteres 14 kDa Protein (p14) identifiziert werden, welches direkt mit dem Adenosin der Verzweigungsstelle über ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM) interagiert und ebenfalls eine Untereinheit des Spleißfaktors SF3b darstellt (651). Eine drei-dimensionale Struktur des Spleißfaktors SF3b konnte durch kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt werden, in der die SF3b155 Untereinheit die äußere Hülle bildet und das p14 Protein in dem zentralen Hohlraum lokalisiert ist (215).

Die ATP-abhängige Verdrängung des Spleißfaktors SF1/mBBP durch das 17S U2 snRNP an der Verzweigungsstelle markiert den Übergang vom E-Komplex zum A-Komplex, welcher auch als Prä-Spleißosom bezeichnet wird (Abb. 2) (92, 431). Kürzlich wurden verschiedene Methoden zur Aufreinigung von snRNP Komplexen unter nativen Bedingungen beschrieben (261, 297, 394). Eine Methode, welche zur nativen Aufreinigung eines A-Komplexes führte, beruht auf der hochaffinen Bindung des Aminoglykosid Antibiotikums Tobramycin an *in*

in vitro selektionierte, „stem-loop“ Struktur aufweisende, RNA-Aptamere (641). Die Tobramycin affinitätsaufgereinigten Prä-Spleißosomen wurden biochemisch und massenspektroskopisch untersucht. Durch die Analyse der A-Komplexe konnten mehr als 70 Prä-Spleißosomen assoziierte Proteine identifiziert werden. Neben sämtlichen bekannten U1- und U2 snRNP assoziierten Proteinen und den erwarteten nicht-snRNP Spleißfaktoren, konnten weitere Proteine innerhalb des Prä-Spleißosoms nachgewiesen werden. Hierunter befanden sich sowohl zahlreiche Proteine, die bisher nicht mit dem Spleißen in Verbindung gesetzt wurden, als auch Proteine, welche multiple Funktionen in der Zelle zu übernehmen scheinen, wie beispielsweise das Y-Box Bindeprotein 1 (YB-1), NFAR-2 und TLS/FUS (251, 364, 528, 529, 592). Weiterhin konnten mRNA Export Faktoren wie Aly und HuR (207, 686) und Proteine der DExH/D-box (Asp-Glu-x-Asp/His) Familie wie der RNA Helikase A (DDX9) und p68 identifiziert werden. Die p68 RNA Helikase interagiert während der Spleißosomen Assemblierung mit dem RNA-Duplex aus der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle (376). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von p68 zwar nicht die Erkennung der 5'-Spleißstelle beeinflusst, jedoch die Dissoziation des U1 snRNPs von der 5'-Spleißstelle inhibiert, wodurch die Assemblierung des Spleißosoms im A-Komplex arretiert und die prä-mRNA nicht gespleißt wird (376).

1.1.1.3 Der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs

Die durch die DExH/D-box Helikasen vermittelten, ATP-abhängigen, Auftrennungen bestehender RNA-Duplices sind somit für die weitere Assemblierung des reifen Spleißosoms essentiell (376). Der Eintritt des 25S U4/U6*U5 tri-snRNPs kennzeichnet den Übergang vom A-Komplex zum B-Komplex (Abb. 2) (226, 333, 353, 353). Dieses B-Komplex Spleißosom beinhaltet bereits alle für das Spleißen benötigten Komponenten, ist jedoch noch spleißinaktiv (50). Die Aktivierung des Spleißosoms erfolgt durch DExH/D-box Helikasen vermittelte RNA Umlagerungen (145, 254, 394, 649). DExH/D-box RNA Helikasen werden nicht nur für die Auftrennung von RNA/RNA-Duplices verantwortlich gemacht, sondern können auch die Freisetzung von RNA-gebundenen Protein regulieren (291, 539). Dies konnte in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* am Beispiel des DEAD-box Proteins Prp28p („pre mRNA processing protein 28“) gezeigt werden, welches die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle, durch Verdrängung des U1-C Proteins, löst (99, 584) und damit keinen Bestandteil des reifen Spleißosoms mehr darstellt (334). Das humane Homolog zu Prp28p ist die U5 snRNP assoziierte U5-100 kDa DEAD-box RNA-Helikase

(614). Nachfolgend wird die 5'-Spleißstelle durch die U6 snRNA erkannt (369), welche beim Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs eine Basenpaarung mit der U4 snRNA ausbildet (458, 583). Diese U4/U6 Basenpaarung wird in der Hefe, nach Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U6 snRNP, durch Prp8p, Prp28p und Prp44p/Brr2p aufgelöst (343, 344, 584), woraufhin auch das U4 snRNP freigesetzt wird (353). Bei Prp44p/Brr2p handelt es sich ebenfalls um eine DExD/H-box RNA-Helikase, welche Bestandteil des U5 snRNPs ist (humanes Homolog U5-200 kDa) (461, 494). Prp8p ist ein essentieller, hoch konservierter, U5 snRNP assoziierter Spleißfaktor, dessen humanes Homolog U5-220 kDa ist (385). Da Prp8p während der gesamten Spleißreaktion (344, 629) sowohl an der 5'-Spleißstelle (102, 660), als auch an der Verzweigungsstelle (390) und der 3'-Spleißstelle (119, 133, 615) nachgewiesen werden konnte, wurde es bereits als potentielles katalytisches Zentrum des Spleißosoms beschrieben (119, 120, 561).

Neben der Basenpaarung mit der 5'-Spleißstelle bildet die U6 snRNA zusätzlich Basenpaarungen mit der U2 snRNA an der Verzweigungsstelle aus, wodurch die 5'-Spleißstelle in räumliche Nähe zu der Verzweigungsstelle gebracht wird (392, 591). Diese Basenpaarungen zwischen der U6 snRNA und der U2 snRNA scheinen das katalytische Zentrum des Spleißosoms zu bilden, da in einem *in vitro* assemblierten, Protein-freien Komplex aus U2- und U6 snRNA Fragmenten gezeigt werden konnte, dass eine Spleiß-ähnliche Reaktion katalysiert werden konnte. Durch Zugabe eines RNA Oligonukleotids, welches die Konsensussequenz der prä-mRNA Verzweigungsstelle enthielt, konnte der U2/U6 Komplex eine Reaktion zwischen der 2'-Hydroxylgruppe des Adenosins der Verzweigungsstelle und der Phosphatbindung einer katalytisch wichtigen Region der U6 snRNA katalysieren (630, 631, 632).

Dieses katalytische Potential der spleißosomalen RNAs konnte durch die Beobachtung bestätigt werden, dass die katalytische Aktivität des Spleißosoms von der Koordination eines Mg^{2+} Ions durch die U6 snRNA abhängig ist (222, 668). Hierzu wurden innerhalb der U6 snRNA die komplexierenden Sauerstoff-Liganden gegen Schwefel-Liganden ausgetauscht, was in Gegenwart von Mg^{2+} Ionen zu einer Verminderung der Spleißeffizienz *in vitro* führte. Die Aktivität konnte durch Komplexierung der weicheren, schwefel-liebenderen Cd^{2+} oder Mn^{2+} Kationen wiederhergestellt werden (668). Dadurch weist die durch das Spleißosom katalysierte Transester Reaktion weitere Gemeinsamkeit zu den selbstspleißenden Gruppe-II-Introns der Mitochondrien von Pilzen auf (221, 222, 572). Demnach scheint das Spleißosom als Metalloenzym zu fungieren, in welchem die U6 snRNA das katalytische Zentrum darstellt (637).

1.1.1.4 Die Katalyse der Transester Reaktionen

Der Übergang von dem spleißinaktiven B-Komplex zu dem reifen C-Komplex ist durch die transiente Bindung des Prp2p Proteins gekennzeichnet (318, 323). Obwohl es sich bei Prp2p ebenfalls um ein Protein der DExD/H-box Familie handelt, welches ein konserviertes RNA Helikase Motiv aufweist, konnte bisher keine Helikase Aktivität nachgewiesen werden (319). Die durch Prp2p vermittelte ATP Hydrolyse führt zu der ersten Transester Reaktion innerhalb des reifen Spleißosoms und zu der Freisetzung der Prp2p ATPase (164, 518, 613). Aufgrund der direkten Kopplung der ATP-Hydrolyse und der ersten Spleißreaktion scheint Prp2p, dessen humanes Homolog DBP2 ist (285), die Rolle eines molekularen Motors in der Aktivierung des Spleißosoms zu übernehmen (319). Die U5 snRNA scheint, zumindest in Hefe, für die erste Transester Reaktion entbehrlich zu sein, jedoch ist eine Interaktion der „loop I“ Struktur mit dem 5'-Exon für die zweite katalytische Reaktion essentiell, um das 5'-Exon in räumliche Nähe zu der 3'-Spleißstelle zu halten (463). Zusätzlich findet zwischen den beiden Transester Reaktionen eine Umlagerung des U5 snRNPs statt, so dass direkte oder indirekte Kontakte zu dem an der Verzweigungsstelle gebundenen U2 snRNP, dem Polypyrimidintrakt und der 3'-Spleißstelle entstehen (103, 628). Durch diese simultane Interaktion mit dem 5'-Exon und der 3'-Spleißstelle wird für das U5 snRNP ebenfalls eine Funktion in der späteren Ligation der Exons vermutet (457).

Die zweite Transester Reaktion wird innerhalb des C-Komplexes, welcher manchmal auch als C-2 oder D-Komplex bezeichnet wird, erneut durch die transiente Bindung einer RNA-abhängigen ATPase eingeleitet (542). Die potentielle DExD/H-box RNA Helikase Prp16p bindet nach Abschluss der ersten Spleißreaktion an die 3'-Spleißstelle und induziert nach ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung der 3'-Spleißstelle und bewirkt dadurch seine eigene Freisetzung (541, 542, 628). Daraufhin erfolgt die, von Prp17p und Prp18p unterstützte, Bindung von Slu7p an die 3'-Spleißstelle und die zweite Transester Reaktion wird abgeschlossen (295). Die ATP-unabhängige Bindung von Slu7p über ein Zink-Finger Motiv scheint für die korrekte Wahl der 3'-Spleißstelle wichtig zu sein (193). Die Gene für Prp17p und Prp18p scheinen nicht essentiell zu sein, da in Abwesenheit der Proteine *in vitro* nur eine partielle Blockierung der zweiten Spleißreaktion beobachtet werden konnte (275, 295). Durch eine Überexpression von Prp16p konnte eine *PRP17* Mutation überwunden werden und eine Überexpression von Slu7p konnte eine *PRP18* Mutation supprimieren, was gemeinsame Funktionen dieser Proteine vermuten lässt (295). Die humanen Homologe zu Prp16p (hPRP16 (687)), Prp17p (hPRP17 (687)), Prp18p (hPRP18 (276)) und Slu7p (hSlu7 (111)) konnten identifiziert werden. Auch für das humane Homolog zu Prp16p (hPRP16)

konnte nach Immunodepletion eine spezifische Blockierung der Spleißreaktion nach der ersten Transester Reaktion gezeigt werden, welche durch Zugabe von rekombinatem hRP16 wieder aufgehoben werden konnte (470, 687). Die Wahl der korrekten 3'-Spleißstelle scheint ebenfalls durch das humane hSlu7 beeinflusst zu werden (112, 557).

Die Affinitätsaufreinigung eines C-Komplex Spleißosoms unter nativen Bedingungen konnte die Gegenwart der U2, U5 und U6 snRNAs, sowie die vorzeitige Freisetzung der U1 und U4 snRNA bestätigen (297). Durch massenspektroskopische Analysen dieser Komplexe konnten neben Sm-, Lsm Proteine und diversen U snRNP spezifischen Proteinen, auch die für die zweite Spleißreaktion essentiellen Faktoren Prp16p und Slu7p nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließ sich auch ein weiteres Prp Protein (Prp22p) aus der Familie der DEAH-box Proteine identifizieren (297), welches ATP-abhängig nach Abschluss der zweiten Transester Reaktion die Disassemblierung des Spleißosoms induziert (536, 540) und an der Freilassung der gespleißten mRNA beteiligt ist (75). Durch Mutation des humanen Homologs HRH1 konnte *in vitro* ebenfalls eine Inhibition der prä-mRNA Freisetzung beobachtet werden (466, 469). Der Abbau des Spleißosoms wird ATP-abhängig durch die DEAH-box RNA Helikase Prp43p (humanes Homolog hPRP43/DBP1/DDX15 (192, 213, 286)), unter Freilassung des Intron Lariats, abgeschlossen (408).

Wurde das Spleißosom noch vor wenigen Jahren als aus ungefähr 100 Spleißfaktoren bestehend betrachtet (68), hat sich durch verbesserte Aufreinigungsprotokolle von Spleißosomen Komplexen unter nativen Bedingungen (50, 50, 261, 297, 394, 685) und Fortschritte in deren massenspektroskopischer Analyse (555), inzwischen die Anzahl verdoppelt bis verdreifacht (299, 459, 496, 685). Diese Daten verdeutlichen sowohl die komplexe Zusammensetzung des Spleißosoms, als auch die direkt Vernetzung zu anderen nukleären Prozessen wie der Transkription, dem „capping“ und der Polyadenylierung (490, 496).

Das Risiko einer fehlerhaften Erkennung der Spleißstellen scheint bereits während der Spleißosomen Assemblierung durch die wiederholte Erkennung der Spleißstellen durch multiple Faktoren minimiert zu werden (für eine Übersicht s. (68, 583)). Dies erscheint als umso wichtiger, da die Spleißstellen Erkennungssequenzen selber nur relativ kurz sind (68) und untereinander stark variieren können (302). Darüber hinaus werden selbst der Konsensussequenz entsprechende Spleißstellen durch die Spleißmaschinerie häufig nicht genutzt (598). Ein durchschnittliches humanes Gen besteht aus acht Exons mit einer durchschnittlichen Länge von je 145 Nukleotiden, welche durch Intronsequenzen

voneinander getrennt sind, die mehr als das zehnfache dieser Länge aufweisen (355). Die größte Schwierigkeit für das Spleißosom ist demzufolge die Auswahl der richtigen Spleißstelle. Dies wird durch die Tatsache, dass ungefähr 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden, zusätzlich erschwert (58, 355, 404). Die Differenzierung zwischen Exon- und Intronsequenzen kann somit nicht allein durch die relative Position und die Stärke der Spleißstelle definiert werden, sondern muss auf zusätzliche Sequenzen außerhalb der Spleißstellen angewiesen sein (371, 598).

1.1.2 Der Einfluss *cis*-wirkender spleißregulierender Sequenzelemente

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Sequenzelementen existieren weitere kurze, *cis*-regulatorische Elemente, welche nicht Bestandteil der eigentlichen Spleißstellen Erkennungssequenzen sind und dennoch die Spleißeffizienz des betreffenden Exons modulieren können (643). Diese regulatorischen Sequenzelemente lassen sich in spleißaktivierende („splicing enhancer“) und in spleißinhibierende („splicing silencer“) Sequenzen unterteilen. Spleißaktivierende Elemente wurden zunächst als kurze, Purin-reiche Sequenzen beschrieben, welche die Spleißreaktion fördern, wenn sie innerhalb von Exons lokalisiert sind (ESE, „exonic splicing enhancer“) (607, 643). Diese ESE-Elemente können sowohl innerhalb des stromaufwärts liegenden Exons (54), als auch innerhalb des stromabwärts liegenden Exons (417) lokalisiert sein. Später konnte gezeigt werden, dass auch nicht Purin-reiche Sequenzen eine spleißaktivierende Wirkung ausüben können (126, 620) und, dass diese spleißfördernde Sequenzelemente auch innerhalb von Introns vorkommen können (ISE, „intronic splicing enhancer“) (81, 263, 439, 568). Spleißinhibierende Sequenzen werden positionsabhängig entweder als ESS („exonic splicing silencer“) (152, 303) oder als ISS („intronic splicing silencer“) (91, 214, 219, 305) bezeichnet.

Diese Sequenzelemente werden von nicht-snRNP Spleißfaktoren gebunden, welche als Proteine definiert sind, die essentiell an der Spleißreaktion beteiligt sind, aber nicht als stabiler Bestandteil von snRNPs nachgewiesen werden können (352). Zu diesen nicht-snRNP Spleißfaktoren zählen die Proteine der SR- (Serin/Arginin-reiche Proteine) und der hnRNP-Familie („heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“) (570). Diese Faktoren lassen sich zwar auch bei der nativen Aufreinigung verschiedener Spleißosomen Komplexe nachweisen, jedoch unterscheidet sich ihre Zusammensetzung in Abhängigkeit von dem verwendeten Spleißsubstrat (299). Außerdem lässt sich, aufgrund ihrer weniger stabilen

Assoziation mit dem Spleißosom, eine deutliche Abhängigkeit ihrer Nachweisbarkeit von den verwendeten Pufferbedingungen beobachten (501). Es konnte in verschiedenen experimentellen Systemen gezeigt werden, dass SR-Proteine, durch Bindung an ESE- (78, 84, 218, 357, 495, 599, 666) oder ISE-Elemente (205), eine Spleißaktivierung induzieren, während die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs), durch Bindung an ESS- (39, 79, 97) oder ISS-Elemente (609), eine spleißinhibierende Wirkung zeigen. Dies legt eine antagonistischen Wirkung dieser beiden nicht-snRNP Spleißfaktoren nahe (174, 414, 512, 688). Ein kürzlich beschriebenes, überlappendes ESE/ESS-Element, in dem positive und negative Regulatoren um eine gemeinsame Bindungsstelle kompetitieren (670), konnte diesen Antagonismus betätigen. Jedoch sind auch Gegenbeispiele bekannt, bei denen durch SR-Proteine eine Spleißinhibition (80, 305) bzw. eine Spleißaktivierung durch hnRNPs (60, 80, 108) induziert wird.

1.1.2.1 Die Regulation des prä-mRNA Spleißens durch SR-Proteine

Das erste beschriebene SR-Protein (SF2/ASF) wurde zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Weise entdeckt. Krainer et al. isolierten einen Faktor (SF2) aus HeLa Kernextrakt, welcher in der Lage war einen spleißinaktiven cytosolischen HeLa S100 Extrakt zu komplementieren (335), während Ge et al. einen Faktor (ASF „alternative splicing factor“) aus einem 293-Zellextrakt isolierten, welcher in der Lage war die Nutzung einer alternativen 5'-Spleißstelle zu induzieren (212). Daraufhin konnten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (mAB104) (517), welcher ein phosphoryliertes Epitop der SR-Proteine erkennt, weitere Proteine der SR-Familie identifiziert werden: SC35 (200, 201, 633), SRp20(671), SRp75 (673), 9G8 (88), SRp54 (681). Da alle SR-Proteine einen gemeinsamen modularen Aufbau aus einem (SRp20, 9G8, SC35) oder zwei (SF2/ASF, SRp54, SRp75) N-terminalen RNA-Erkennungsmotiv(en) (RRM) und einer C-terminalen Arginin/Serin reichen (RS)-Domäne unterschiedlicher Länge aufweisen (230, 526), konnten weitere Vertreter der SR-Familie über diese strukturellen Gemeinsamkeiten identifiziert werden (321, 322): SRp30c, SRp40, SRp55 (544).

Alle drei neu identifizierten SR-Proteine wiesen C-terminal ebenfalls zwei RRM Motive auf. Die Zugehörigkeit zu der Gruppe der SR-Proteine wurde über deren funktionelle Gemeinsamkeit, der Wiederherstellung der Spleißaktivität einer β -Globin prä-mRNA in einem SR-Protein freien HeLa S100 Extraktes, bestätigt (544). Hingegen herrscht Uneinigkeit darüber, inwiefern das, durch ein Retropseudogen kodierte, SRp46 (574) und

das spleißinhibierende SRp38 (556) dieser Gruppe der SR-Proteine zugeordnet werden können (für eine Übersicht s. (230, 526)). Mitglieder der SR-Protein Familie konnten bisher in allen untersuchten Metazoen und Pflanzen (216, 358, 377, 378, 379, 380) identifiziert werden. Eine Ausnahme scheinen die Ascomyceten zu bilden, da SR-Proteine bisher nicht in der Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae*, wohl aber in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* gefunden werden konnten (238, 388, 608). Die ebenfalls spleißregulatorisch wirkenden Proteine Tra („transformer“) (52) und Tra2 („transformer 2“) (10) wurden zunächst in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Später konnten deren humane Homologe hTra2 (28, 140) und hTra2 β (28, 139) identifiziert werden. Diese werden aufgrund ihres, von den SR-Proteinen abweichenden, Domänenaufbaus aus einem zentralen RRM Motiv und zwei flankierenden RS-Domänen zu der Gruppe der SR verwandten Polypeptide (SRrp, „SR related polypeptides“) zugeordnet.

SR-Proteine sind nicht nur essentielle Faktoren für das konstitutive Spleißen, sondern werden insbesondere für die Regulation des alternativen Spleißens benötigt (417, 525, 533, 604, 622). Die Bindung der SR-Proteine an die prä-mRNA erfolgt sequenzspezifisch über ein (SRp20, 9G8, SC35) oder zwei (SF2/ASF, SRp30c, SRp40, SRp54, SRp55, SRp75) N-terminale(s) RNA-Erkennungsmotiv(e) (42, 315). Das RNA-Erkennungsmotiv (RRM) ist eine konservierte RNA Bindungsdomäne mit einer Länge von ca. 80 Aminosäuren, welche aus zwei Sequenzelementen, dem RNP-1 Oktamer und dem RNP-2 Hexamer, zusammengesetzt ist (272, 448). Die dreidimensionale Struktur des RRM wird durch vier antiparallele β -Stränge gebildet, welche von zwei α -Helices flankiert werden. Das RNP-1 Oktamer und das RNP-2 Hexamer bilden einen Teil des zentralen β 3- bzw. des β 1-Stranges. Die Kontakte zu der RNA erfolgen über Stapel-Wechselwirkungen aromatischer Aminosäuren des β -Blattes (447). SR-Proteine mit einer zweiten RRM-Domäne weisen in diesem weniger konservierten Motiv eine kennzeichnende Heptamer-Sequenz (SWQDLKD) auf (42).

Um die RNA Bindungssequenzen verschiedener SR-Proteine identifizieren zu können, wurde die Bindung einzelner SR-Proteine *in vitro* in funktionellen SELEX („selected evolution of ligands through exponential enrichment“) Ansätzen analysiert (87, 374, 602, 603, 626). Basierend auf diesen SELEX Untersuchungen konnten inzwischen für einige der bisher beschriebenen, humanen SR-Proteine sechs bis zehn Nukleotide lange Konsensus Bindesequenzen identifiziert werden (534, 604). Jedoch muss eine Homologie zu den ermittelten Konsensus Motiven nicht immer eine Bindung des jeweiligen SR-Proteins

implizieren (373). Zur Detektion von Bindungsmotiven der SR-Proteine SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55 wurde ein, auf funktionellen SELEX Analysen basierender, Algorithmus im Internet zur Verfügung gestellt (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (374). Mit Fertigstellung dieser Arbeit wurden bereits zwei weitere alternative Algorithmen zur Identifizierung von ESE-Elementen publiziert (175, 682). Die Bindung der SR-Proteine an die meisten ESE-Elemente vermittelt entweder eine Aktivierung der Spleißreaktion an der stromaufwärts liegenden 3'-Spleißstelle, oder an der stromabwärts liegenden 5'-Spleißstelle. Es sind jedoch auch Fälle von bidirektionalen „enhancer“ Elementen beschrieben worden, welche zu einer simultanen Erkennung der 5'- und der 3'-Spleißstelle führen (54, 78, 547).

Die Aktivierung von Spleißstellen durch ESE gebundene SR-Proteine wird über deren C-terminale RS-Domäne vermittelt. Die RS-Domäne besteht aus Arginin/Serin Wiederholungen, welche durch weitere Aminosäuren unterbrochen sein können. Die Länge und die Sequenz der RS-Domäne ist innerhalb verschiedener SR-Proteine hoch konserviert (42, 671). Von der RS-Domäne konnte anhand von Fusionsproteinen, bei denen die RS-Domäne an das RNA-bindende Hüllprotein des MS2 Bakteriophagen fusioniert worden war, gezeigt werden, dass diese sowohl für Interaktionen zwischen SR-Proteinen untereinander, als auch für Wechselwirkungen zu anderen, essentiellen, RS-Domänen enthaltenden Spleißfaktoren notwendig ist (235, 485). Hingegen wird die Substratspezifität durch die N-terminale RNA Bindedomäne vermittelt, da gezeigt werden konnte, dass die Arginin/Serinreiche Domäne in manchen SR-Proteinen austauschbar ist, ohne dass die Substratspezifität dadurch beeinflusst wird (417, 603, 604).

Demnach scheinen SR-Proteine als molekulare Adapter zu fungieren, welche die Erkennung der Spleißstellen durch die Rekrutierung von snRNPs unterstützen (582, 657). Bereits in dem initialen Schritt der Spleißosomen Assemblierung, der Bildung eines RNA-Duplex zwischen der 5'-Spleißstelle und dem freien 5'-Endes der U1 snRNA, wird die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle zusätzlich durch die Interaktion mit RNA gebundenen Proteinen nahe der 5'-Spleißstelle stabilisiert (78, 147, 196, 302, 491, 678). Hier scheint die SR-Protein vermittelte Aktivierung der 5'-Spleißstelle über eine Rekrutierung des U1 snRNPs zu erfolgen (331). Dieses Rekrutierungsmodell wird durch die Nachweisbarkeit von Interaktionen zwischen den RS-Domänen verschiedener SR-Proteinen und den U1 snRNP spezifischen Proteinen U1-70K (76, 640, 657, 661) und U1-C (290) unterstützt. Die Erkennung der 3'-Spleißstelle erfolgt ebenfalls SR-Protein vermittelt unter Rekrutierung des U2AF65/35 Heterodimers (234, 642, 692), wobei Interaktionen zwischen den RS-Domänen verschiedener SR-Proteine und der U2AF35 Untereinheit experimentell nachgewiesen

werden konnten (657). Aktuellen Ergebnissen zufolge, ist die RS-Domäne von ESE gebundenen SR-Proteinen auch in der Lage direkt mit der Verzweigungsstelle der prä-mRNA zu interagieren (232, 554).

Einige experimentelle Ergebnisse sprechen für eine gemeinsame Erkennung der 5'- und der 3'-Spleißstellen durch die Spleißmaschinerie (32, 345, 508, 657). Von einem „Exon-Definitionsmodell“ wird gesprochen, wenn die gemeinsam erkannten Spleißstellen ein Exon flankieren, von einem „Intron-Definitionsmodell“, wenn diese das Intron flankieren (für eine Übersicht s. (4, 32, 43, 497, 506)). SR-Proteine vermitteln hierbei die Interaktionen zwischen den, an die zwei Spleißstelle gebundenen Spleißfaktoren entweder direkt (202, 497, 586, 657) oder über Spleiß-Koaktivatoren (47, 165). Diese Koaktivatoren besitzen zwei RS-Domänen, weisen jedoch kein RNA Erkennungsmotiv auf und werden somit der Familie der SR verwandten Polypeptide (SRrp, „SR related polypeptides“) zugeordnet (46, 48). Der Spleiß-Koaktivator SRm160/300, welcher aus dem 160kDa nukleären Matrixprotein und einem 300kDa Matrixantigen besteht, scheint die Interaktionen zwischen den 5'- und 3'-Spleißstellen gebundenen SR-Proteinen und snRNPs zu unterstützen (47, 165).

Neben der SR-Protein vermittelten Erkennung von Spleißstellen, sind auch Funktionen der SR-Proteine zu späteren Zeitpunkten der Spleißosomen Assemblierung beschrieben worden, wie etwa in der Rekrutierung des U4/U6*U5 tri-snRNPs (181, 514) oder zur Katalyse der ersten (202) und der zweiten Transester-Reaktion in einem „*trans* splicing assay“ (101).

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Serin-Reste innerhalb der RS-Domäne der SR-Proteine *in vivo* phosphoryliert werden (für eine Übersicht s. (434)). Es konnten vier Klassen von Kinasen identifiziert werden, welche zu einer substratspezifischen Phosphorylierung der RS-Domänen *in vitro* führen: die SR-Protein Kinase Familie (SRPK1 (121, 242) und SRPK2 (640)), die Clk/Sty Familie (Clk1/Sty (121) und Clk2-4 (452)), hPRP4 (332) und die DNA Topoisomerase I (516). Die Phosphorylierung der RS-Domäne beeinflusst sowohl die zelluläre Lokalisation (122, 241, 436, 640, 667), als auch die Aktivität (640, 662, 667) der SR-Proteine.

Serin/Arginin-reiche Proteine werden in Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrades ihrer RS-Domäne über SR-Protein spezifische Import Rezeptoren (TRN-SR1 und TRN-SR2, „Transportin-SR“), welche Homologien zu der Importin beta/Transportin Familie aufweisen, in den Kern transportiert (308, 348, 349). SR-Proteine und andere Spleißfaktoren sind subzellulär in nukleären „speckles“, welche auch als Spleißfaktor Kompartimente (SFCs,

„splicing factor compartments“) bezeichnet werden, lokalisiert (437). Obwohl die RS-Domäne der SR-Proteine ein Kernlokalisierungssignal (NLS, „nuclear localisation signal“) enthält, konnte gezeigt werden, dass dieses Signal bei den meisten SR-Proteinen nicht ausreichend ist, um eine subnukleäre Lokalisation in den Spleifaktor Kompartimenten zu erzielen (72). Es scheint, dass die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine ebenfalls Phosphorylierungs-abhängig über den Transportin-SR Rezeptor vermittelt wird (349). Während der Transkription werden die SR-Proteine aus den subnukleären Spleißfaktor Kompartimenten an die prä-mRNA rekrutiert (437). Die Phosphorylierung der Serin-Reste innerhalb der RS-Domäne stellt für diese Rekrutierung ebenfalls eine Voraussetzung dar (436). Zusätzlich konnte von einigen SR-Proteinen gezeigt werden, dass diese in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsgrades in der Lage sind zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln (73). Diese Beobachtung legt weitere Funktionen der SR-Proteine außerhalb des Spleißens nahe. Kürzlich konnte für das SR-Protein SF2/ASF eine cytoplasmatische Funktion in der Erhöhung der Translationseffizienz *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (525).

Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine modifizierte Phosphorylierung der Serin-Reste auch die Aktivität der SR-Proteine verändert, indem RS-Domänen vermittelte Protein-Protein Interaktionen in ihrer Effizienz und Spezifität beeinflusst werden können (489, 667). Die Phosphorylierung der RS-Domäne des SR-Proteins SF2/ASF ist beispielsweise für die Interaktion mit dem U1 spezifischen Protein U1-70K und für die Funktionalität des SR-Proteins während der Spleißosomen Assemblierung notwendig (640, 661, 662). Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine Hyper-, als auch eine Hypophosphorylierung der SR-Proteine zu einem Verlust der Spleißaktivität führen (489). Der durch eine Hypophosphorylierung vermittelte Verlust der Spleißaktivität wird beispielsweise gezielt von Adenoviren genutzt, die durch eine Virus induzierte Dephosphorylierung der zellulären SR-Proteine ihre zeitlich regulierte Genexpression gewährleisten (277, 306).

Diese regulierte Phosphorylierung und Dephosphorylierung der SR-Proteine scheint ebenfalls während der Spleißreaktion eine Rolle zu spielen, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass nach der Spleißosomen Assemblierung eine Dephosphorylierung von SF2/ASF für die erste Transester Reaktion notwendig ist (77). Die Dephosphorylierung der SR-Proteine wird durch die Serin/Threonin spezifischen Phosphatasen PP1 und PP2A katalysiert (427, 428, 438). Aktuelle experimentelle Ergebnisse sprechen der Dephosphorylierung der SR-Proteine ebenfalls eine Rolle im mRNA Export zu, da zumindest die SR-Proteine

SF2/ASF und 9G8 in ihrem hypophosphoryliertem Zustand eine erhöhte Affinität zu dem heterodimeren mRNA Export Rezeptor TAP (für eine Übersicht s. (500, 595)) aufweisen (281, 350).

Einige der beschriebenen Funktionen der SR-Proteine sind nicht nur für das konstitutive Spleißen essentiell, sondern dienen auch der Regulation des alternativen Spleißens. Die Auswahl alternativer Spleißstellen kann durch die Aktivierung schwacher Spleißstellen durch ESE-gebundene SR-Proteine erfolgen (674). Diese ESE-gebundenen SR-Proteine weisen wiederum unterschiedliche Spezifitäten auf (198, 290) und können über Phosphorylierungen und Dephosphorylierung in ihrer Aktivität und Lokalisation moduliert werden (640). Eine regulierte Rekrutierung von Spleißfaktoren aus den nukleären „speckles“ an die prä-mRNA ermöglicht eine Kontrolle der relativen Ratio an SR-Proteinen (435), welche einen weiteren wichtigen Faktor in der zellspezifischen Auswahl alternativer Spleißstellen darstellt (205, 212, 672). Darüber hinaus wird die Wirkung der SR-Proteine häufig durch heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) antagonisiert und das Verhältnis zwischen SR-Proteinen und hnRNPs beeinflusst ebenfalls die Auswahl alternativer Spleißstellen (74, 169, 259, 413, 414, 664).

1.1.2.2 Die Regulation des prä-mRNA Spleißens durch heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)

Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) wurden zunächst als Chromatin assoziierte RNA-Bindeproteine beschrieben, welche kotranskriptional an naszierende RNA Polymerase II Transkripte assoziieren und eine Nukleosomen-ähnliche Struktur ausbilden (für eine Übersicht s. (157)). Inzwischen sind mehr als 30 verschiedene hnRNPs beschrieben worden, welche an unterschiedlichen Aspekten der mRNA Biogenese, wie der Transkription, dem Spleißen, dem „capping“, der Polyadenylierung, dem nukleären Transport und der mRNA Stabilität, beteiligt sind (für eine Übersicht s. (341)). Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich die Zusammensetzung der hnRNPs substratspezifisch unterscheidet (31). Die meisten hnRNPs weisen einen modularen Aufbau, aus einer oder mehreren RNA-Bindungsdomänen (RRM, RGG-Box, KH-Domäne) und einer häufig Glycin-reichen Domäne, welche Protein-Protein Interaktionen vermittelt, auf (für eine Übersicht s. (66)). Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten lassen sich hnRNPs in verschiedene hnRNP Familien gruppieren. Im Folgenden werden nur die hnRNP Familien

vorgestellt, bei denen eine Funktion während des prä-mRNA Spleißens nachgewiesen werden konnten.

Die hnRNP A/B Familie umfasst die hnRNPs A1, A1b, A2 und B1, die eine gemeinsame RNA Substratspezifität aufweisen und dadurch ähnliche Funktionen im prä-mRNA Spleißen übernehmen (79). Als strukturelle Gemeinsamkeit weisen alle Vertreter der hnRNP A/B Familie N-terminal zwei RNA Bindungsdomänen des RRM-Typs und C-terminal eine Glycin-reiche Domäne auf (416). HnRNP A1 stellt einen Konzentrations-abhängigen Antagonisten der SR-Proteine dar (414). Bei einer prä-mRNA mit zwei alternativen 5'-Spleißstellen wurde in Gegenwart von hnRNP A1 die distale 5'-Spleißstelle und bei einem Überschuss an SF2/ASF die proximale 5'-Spleißstelle favorisiert (169, 414, 415). Die Bevorzugung distaler Spleißstellen durch hnRNP A1, gegenüber der Favorisierung proximaler Spleißstellen durch SF2/ASF, konnte auch anhand alternativer 3'-Spleißstellen demonstriert werden (22).

Die Repression konstitutiver Spleißstellen erfolgt häufig durch die Bindung von hnRNP A1 an ESS-Elemente (210), wie es beispielsweise im Fall der spinalen Muskelatrophie (SMA) am humanen SMN2 Gen („survival motor neuron 2“) beschrieben wurde (307). HnRNP A2 und hnRNP B1 weisen im Vergleich zu hnRNP A1 eine geringere Bindungsaffinität auf, zeigen jedoch eine erhöhte Aktivität bei der Nutzung alternativer Spleißstellen (415). HnRNP A1B ist eine alternativ gespleißte Isoform von hnRNP A1, welche durch eine längere Glycin-reiche Domäne affiner an die prä-mRNA bindet, aber eine geringere Aktivität in der Regulation des alternativen Spleißens besitzt (415). Die regulierte Genexpression von hnRNP A1B erfolgt über die Bindung von hnRNP A1 an Intronsequenzen der hnRNP A1 prä-mRNA und der daraus resultierenden Nutzung einer distal gelegenen 5'- Spleißstelle (45, 91, 284).

Die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine der hnRNP C Familie besitzen eine RNA-Bindungsdomäne des RRM-Typs, welche jedoch nur ein einziges RNP Motiv aufweist und eine C-terminale Leucin-reiche Domäne, welche ein „Leucin-Zipper“ ähnliches Motiv (bZLM, „bZIP-like-motif“) ausbildet und sowohl zur Oligomerisierung, als auch zur RNA Bindung notwendig ist (550, 639). HnRNP C zeigt eine hohe Affinität zu poly(U) Sequenzen (223), wodurch dessen Bindung an Uracil-reiche Regionen der U snRNAs, wie der Haarnadelschleife I der U2 snRNA (616) und dem 3'-Ende der U6 snRNA (189), erklärt werden kann. Weiterhin soll hnRNP C an der Auflösung des RNA-Duplex zwischen der U4 snRNA und der U6 snRNA innerhalb des U4/U6*U5 tri-snRNPs beteiligt sein (189). Die

Bindung von hnRNP C an die naszierende prä-mRNA wird durch die Phosphorylierung an Serin/Threonin-Resten reguliert (418). Diese Phosphorylierung scheint durch die Bindung an die U6 snRNA beeinflusst zu werden (419), so dass die U snRNA hnRNP C Interaktion der Rekrutierung der U snRNAs an die prä-mRNA dienen könnte (550). Bei HIV-1 konnte die Bindung von hnRNP C an eine intronische Kern-Retentions-Sequenz (NRS, „nuclear retention sequence“) innerhalb einer *cis*-wirkenden repressiven Sequenz (CRS, „*cis*-active repressive sequence“) nachgewiesen werden, welche die, zur Synthese der HIV Strukturproteine notwendigen, intronhaltigen RNAs im Kern zurückhielt (467, 597).

Die hnRNP G Familie weist N-terminal ein RNA-Erkennungsmotiv und C-Terminal eine Glycin-reiche Region auf (575). Von den Mitglieder der hnRNP G Familie konnte gezeigt werden, dass sie mit dem humanen Spleiß-Koaktivator hTra2beta interagieren und dessen Wirkung antagonisieren (634). Beide Faktoren können sowohl aktivierend, als auch inhibierend wirken. HnRNP G kann beispielsweise zellspezifisch den Einschluss eines Skelettmuskel spezifischen Exons des alpha-Tropomyosin Gens (TPM3) inhibieren und den Einschluss eines alternativen Exons stimulieren, während diese Regulation durch die Bindung von hTra2beta umgekehrt werden kann (449). Das Mengenverhältnis der beiden Faktoren scheint demnach eine zellspezifische Regulation des alternativen Spleißens zu gewährleisten.

Mitglieder der hnRNP H Familie, denen auch hnRNP F zugeordnet wird, weisen deutliche Sequenz Homologien auf und besitzen einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus meist drei Wiederholungen einer RNA-Bindungsdomäne, welche als quasi-RNA Erkennungsmotiv (qRRM) bezeichnet wird, und zwei Glycin-reichen Domänen (273). Für hnRNP H ist sowohl eine negative Regulation der Spleißaktivität durch die Bindung eines exonischen Spleiß „silencers“ (ESS) des β -Tropomyosin Gens der Ratte beschrieben worden (97), als auch durch die direkte Bindung einer 5'-Spleißstelle des humanen Neurofibromin Gens (NF-1) (65). Darüber hinaus konnte eine spleißfördernde Wirkung in der Regulation des alternativen Spleißens des *c-src* Gens durch Bindung an einen intronischen Spleiß „enhancer“ (ISE) nachgewiesen werden (108). Diese zellspezifische Aktivierung konnte durch eine hnRNP H Depletion des Zellextraktes bestätigt werden, da diese zu einem Verlust der Spleißaktivität der Substrat prä-mRNA führte (108). HnRNP F wurde über seine Interaktion mit den beiden Komponenten (CBP80 und CBP20) des „cap“-bindenden Proteinkomplexes (CBC, „cap-binding protein complex“) identifiziert und eine Depletion von hnRNP F in HeLa Kernextrakten führte zu einer Verringerung der Spleißeffizienz (208).

Darüber hinaus wurde ebenfalls eine Beteiligung von hnRNP F in der zellspezifischen Regulation des Spleißens des *c-src* Gens durch die Interaktion mit einem ISE-Element nachgewiesen (433). Die Interaktion von hnRNP F mit einem essentiellen Faktor der Transkriptionsinitiation, dem TATA Bindungsprotein (TBP), legt eine funktionelle Koordination der Transkription und des Spleißens nahe (669).

HnRNP I wurde zunächst als Protein identifiziert, welches in verschiedenen Introns an den Uracil-reichen Polypyrimidin Trakt stromaufwärts der 3'-Spleißstelle gebunden ist, und wird dementsprechend auch als Polypyrimidin Trakt bindendes Protein (PTB, „polypyrimidine tract binding protein“) bezeichnet (209). Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein I besitzt vier RNA Erkennungsmotive (RRM), wobei das zweite RRM für die Oligomerisierung und das dritte RRM für die RNA Bindung notwendig ist (481). Die spleißinhibierende Wirkung von hnRNP I wurde erstmalig am Beispiel des β -Tropomyosin Gens beschrieben, wo dessen Bindung zu einem Ausschluss eines internen Exons („exon skipping“) führte (444). Inzwischen sind zahlreiche Beispiele beschrieben worden, bei denen die Bindung von hnRNP I an Uracil-reiche, intronische Spleiß „silencer“ (ISS) zu einer Nicht-Erkennung eines Exons führt (18, 82, 94, 220, 576), während eine Bindung von hnRNP I an ESS-Elemente eher selten beobachtet werden kann (683). Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Depletion von hnRNP I die Exon Erkennung ermöglicht, und, dass sich diese durch Zugabe von rekombinantem hnRNP I erneut aufheben lässt (576). Mechanistisch kann die Repression der Exon Erkennung durch die Konkurrenz um eine überlappende Bindungsstelle für hnRNP I und dem U2 assoziierten Faktor U2AF65 erfolgen (372). Jedoch kann bei einigen, durch hnRNP I regulierten, alternativen Exons keine Überlappung der PTB-Bindungsstelle mit dem Polypyrimidintrakt oder der Verzweigungsstelle nachgewiesen werden (94, 220, 576). Aufgrund der Fähigkeit von hnRNP I zur Oligomerisierung wurde postuliert, dass die Bindung von hnRNP I sich über das gesamte Exon erstrecken kann (109, 481). Für dieses Modell spricht, dass *in vitro* gezeigt werden konnte, dass bei einem hnRNP I regulierten Exon, welches hnRNP I Bindungsstellen in beiden flankierenden Introns enthielt, durch Mutation der Bindungsstelle in dem 5'-wärts gelegenen Intron ebenfalls die hnRNP I Bindung innerhalb des 3'-wärts gelegenen Introns beeinflusst wurde und umgekehrt (109).

HnRNP K weist einen modularen Aufbau aus drei KH-Domänen („hnRNP K homology domain“) und einer Glycin-reichen Region auf (566, 567). Die dreidimensionale Struktur der KH-Domänen wird durch drei antiparallele β -Stränge und drei α -Helices gebildet, welche

jedoch eine relativ geringe Sequenz Konservierung zeigen (20). Für hnRNP K konnte eine Bindung an ein ISE-Element des beta-Tropomyosin Gens nachgewiesen werden, welche die Bindung des U1 snRNPs an die stromaufwärts liegende 5'-Spleißstelle fördert (173).

HnRNP L besitzt vier RNA Erkennungsmotive (RRM) und es konnte eine Interaktion mit hnRNP I (PTB) nachgewiesen werden (249). An dem humanen, endothelialen NO-Synthase Gen (eNOS) wurde beobachtet, dass die Bindung von HnRNP L an intronische Sequenzwiederholungen eines CA Motivs nicht nur die RNA Stabilität beeinflusst (282), sondern auch die Erkennung der 5'-Spleißstelle unterstützt (283). Weiterhin soll innerhalb des intronlosen Thymidinkinase Gens (TK) des Herpes simplex Virus (HSV) die Bindung von hnRNP L eine Intron-unabhängige Genexpression vermitteln können (375).

HnRNP M besitzt drei RNA Bindedomänen des RRM Typs (138). Für eine Beteiligung von hnRNP M am Spleißen spricht, dass sowohl ein hnRNP M depletierter Kernextrakt *in vitro* keine Spleißaktivität zeigte, als auch, dass sich eine Spleißinhibition durch Verwendung monoklonaler Antikörper gegen synthetische hnRNP M Peptide *in vitro* beobachten ließ (211).

Die koordinierte und zellspezifische Bindung dieser Vielzahl an verschiedenen hnRNPs und SR-Proteinen an spleißfördernde und spleißinhibierende Sequenzen, sowie deren gegenseitige Beeinflussung und deren Interaktionen mit snRNP assoziierten Spleißfaktoren, gibt einen Einblick in die Komplexität der Regulation des alternativen Spleißens.

1.2 Das humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)

Zu Beginn der 80er Jahre wurden in den USA die ersten Fälle von AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) beschrieben (224, 409). Die Kultivierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells“) eines Patienten führte zur Isolierung eines Retrovirus (24, 206). Die verschiedenen Isolate wurden unter dem Namen humanes Immundefizienz Virus (HIV, „human immunodeficiency virus“) als ätiologisches Agens von AIDS zusammengefasst (118). Nach der DNA Sequenzierung wurde das HI-Virus aufgrund seiner Sequenzhomologie mit dem Visna Virus einer Untergruppe der Retroviren, den Lentiviren, zugeordnet (217, 366). Aufgrund von Kreuzreaktivitäten in der Immunoblot Analyse von humanen Seren mit dem Affen Immundefizienz Virus (SIV, „simian immunodeficiency virus“), konnte aus westafrikanischen Patienten ein zweiter HIV Typ isoliert werden (113, 114), dessen Genom

sich um mehr als 50% von dem des ersten Typs unterschied und als HIV-2 klassifiziert wurde (248). Inzwischen hat sich AIDS zu einer Pandemie entwickelt. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit ca. 40 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert und alleine im Jahr 2003 gab es ca. fünf Millionen Neuinfektionen. Ungefähr drei Millionen Menschen starben im selben Jahr an den Folgen der HIV Infektion (<http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2003/en/>).

1.2.1 Die antiretrovirale Therapie

Die Behandlung von AIDS erfolgt mit der „hochaktiven antiretroviralen Therapie“ (HAART, „highly active antiretroviral therapy“), welche in den meisten Fällen zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast führt (für eine Übersicht s. (505)). Bei HAART handelt es sich um eine Kombination von Wirkstoffen, die sich meist aus zwei Nukleosidanaloga zur Inhibition der Reversen Transkriptase (NRTI, „nucleoside reverse-transcriptase inhibitors“), einem Protease Inhibitor (PI) und/oder einem nicht-nukleosidischem Hemmstoff der Reversen Transkriptase (NNRTI, „non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitor“) zusammensetzt.

Das erste Nukleosidanaloga zur Inhibition der reversen Transkriptase, welches in der HIV Therapie eingesetzt wurde, war das Azidothymidin (AZT, 3'-Azido-3'-desoxythymidin, Zidovudin) (für eine Übersicht s. (187)). AZT wird zunächst in der Zelle phosphoryliert und führt während der viralen reversen Transkription zu einem Kettenabbruch, da es keine 3'-OH Gruppe zur Bildung einer Phosphodiesterbindung besitzt, wodurch die Integration des Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle verhindert wird. Weitere NRTIs sind die Cytidinanaloga Zalcitabin (ddC, 2', 3'-Didesoxycytidin) und Lamivudin (3TC, 2', 3'-Didesoxy-3'-thiacytidin), das Guanosinanaloga Abacavir (ABV), das Thymidinanaloga Stavudin (d4T, 2', 3'-Didehydro-2', 3'-didesoxythymidin) und den Adenosinanaloga Tenofovir (TFV) und Didanosin (ddI, 2', 3'-Didesoxyinosin), welches in der Zelle nach der Phosphorylierung zu Didesoxyadenosin aminiert wird. Die Nukleosidanaloga besitzen zwar eine höhere Affinität zur reversen Transkriptase als zu zellulären DNA Polymerasen, jedoch scheint auch eine Blockierung der mitochondrialen DNA Polymerase γ aufzutreten (293). Außerdem besitzen Nukleosidanaloga eine cytostatische Wirkung und die Kinetik ihrer Inkorporation scheint mit den toxischen Nebenwirkungen dieser Wirkstoffe zu korrelieren (361).

Bei den nicht nukleosidischen Hemmstoffen der Reversen Transkriptase (NNRTI), zu denen Nevirapin, Delaviridin und Efavirenz zählen, handelt es sich um strukturell verschiedene, hydrophobe Wirkstoffe. Diese Inhibitoren werden nicht phosphoryliert und zeigen keine Konkurrenz mit den natürlichen Basenderivaten, sondern üben ihre hemmende Wirkung durch direkte Bindung an die reverse Transkriptase aus. Die Bindung der NNRTIs erfolgt außerhalb des aktiven Zentrums an eine hydrophobe Tasche der größeren Untereinheit der heterodimeren reversen Transkriptase. Diese führt zu Konformationsänderungen innerhalb der reversen Transkriptase, welche die Enzymaktivität reduzieren (172, 330, 577). NNRTIs weisen zwar geringere toxische Nebenwirkungen als NRTIs auf, jedoch zeigen NNRTIs nur eine geringe Wirksamkeit bei HIV-2 Isolaten (144).

Das molekulare Ziel der Protease Inhibitoren, zu denen Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir und Atazanavir zählen, ist das aktive Zentrum der viralen Protease. Die HIV Protease ist eine Aspartat-Protease, welche für die Prozessierung der Vorläuferproteine Gag (p55) und Gag-Pol (p160) in die funktionellen Matrix- (MA, p17), Capsid- (CA, p24), Nukleocapsid- (NC, p7) und Link-Proteine (LI, p6), sowie zur Bildung der essentiellen HIV-Enzyme Protease (PR, p9), reverse Transkriptase (RT, p66/51 Heterodimer) und Integrase (IN, p38) notwendig ist (für eine Übersicht s. (451)). Protease Inhibitoren sind meist von Peptiden abgeleitet, welche Proteasespaltstellen innerhalb der Vorläuferproteinen simulieren und dadurch das aktive Zentrum der Protease binden und blockieren. Durch die chemische Blockierung des aktiven Zentrums der Protease können essentielle Proteine des HI-Virus nicht mehr gebildet werden und die assemblierten Virionen zeigen keine Infektiosität (für eine Übersicht s. (110)).

Das Hauptproblem der aktuellen, antiretroviralen Therapie besteht darin, dass sie lediglich eine Verzögerung der Ausbildung der AIDS Symptome bewirkt, jedoch nicht die HIV-Infektion beseitigen kann. Dadurch üben diese antiretroviralen Wirkstoffe auf die Viren einen starken Selektionsdruck aus, so dass Virusvarianten selektiert werden, welche gegen die verschiedenen Inhibitoren resistent sind (für eine Übersicht s. (558)). Diese Selektion erfolgt, aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus (509), relativ schnell und es sind bereits zahlreiche Resistenzen sowohl in der reversen Transkriptase (146, 381), als auch in der viralen Protease (123) beschrieben worden. Darüber hinaus kann es auch zur Übertragung multiresistenter HIV Typen kommen (267), so dass die ständige Entwicklung neuer antiretroviraler Wirkstoffe und die Identifikation neuer, konservierter, molekularer Angriffspunkte von immenser Bedeutung im Kampf gegen AIDS sind.

1.2.2 Der Replikationszyklus von HIV-1

Für HIV-1 (Abb. 3A) stellt die Fusion mit der Zellmembran eine notwendige Voraussetzung für die Einschleusung des viralen Genoms in die Wirtszelle dar. Die Fusion wird über Interaktionen des viralen Hüllproteins (Env, „envelope“) mit dem CD4-Rezeptor und einem der Chemokin Rezeptoren CXCR4, oder CCR5 (6, 104, 104, 149, 155, 155, 155, 156, 180, 264, 264) auf der Wirtsmembran vermittelt (Abb. 3B) (für eine Übersicht s. (360)).

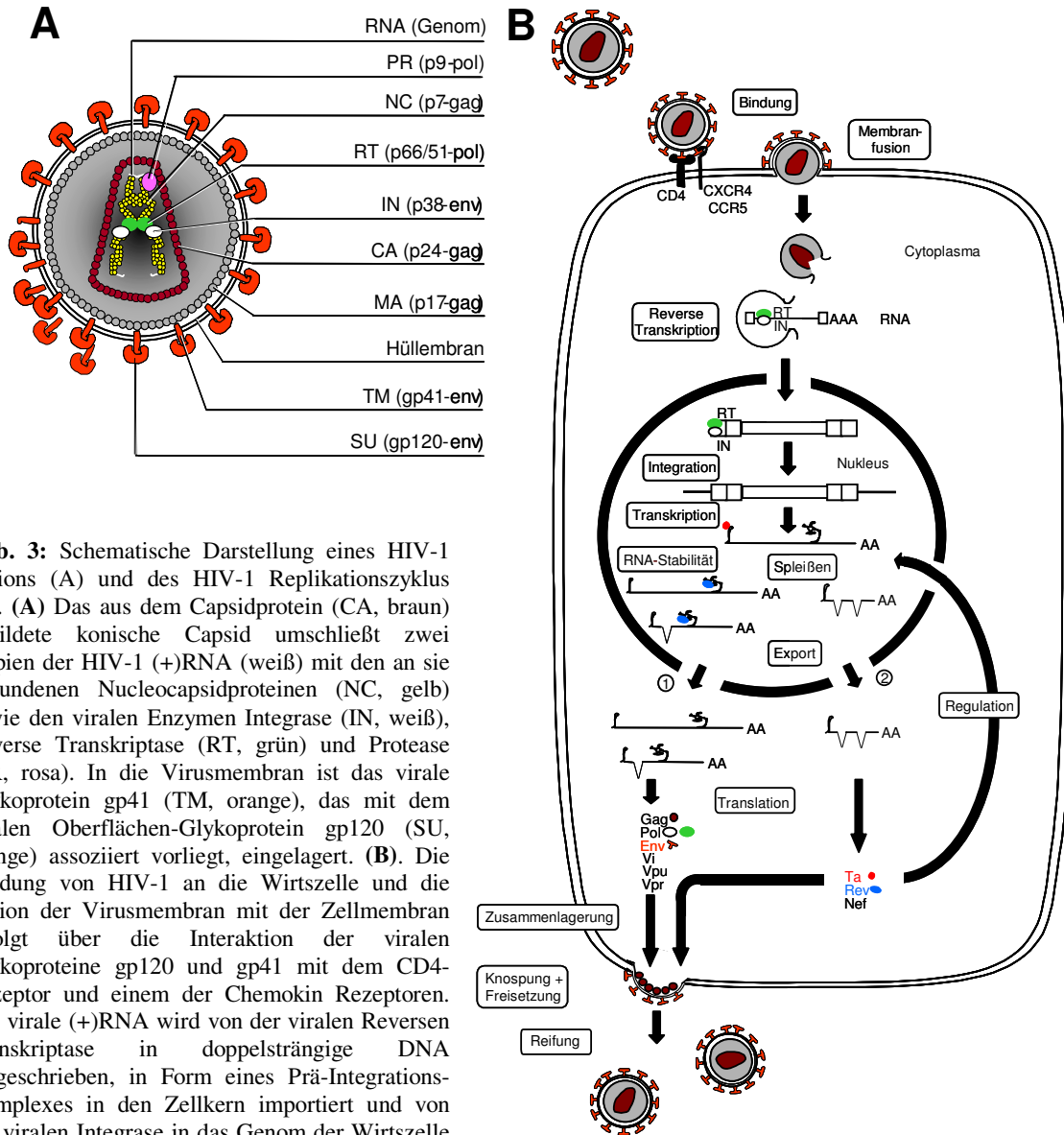


Abb. 3: Schematische Darstellung eines HIV-1 Virions (A) und des HIV-1 Replikationszyklus (B). (A) Das aus dem Capsidprotein (CA, braun) gebildete konische Capsid umschließt zwei Kopien der HIV-1 (+)RNA (weiß) mit den an sie gebundenen Nucleocapsidproteinen (NC, gelb) sowie den viralen Enzymen Integrase (IN, weiß), Reverse Transkriptase (RT, grün) und Protease (PR, rosa). In die Virusmembran ist das virale Glykoprotein gp41 (TM, orange), das mit dem viralen Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU, orange) assoziiert vorliegt, eingelagert. (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 der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, in Form eines Prä-Integrations-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. In der frühen Infektionsphase werden gespleißte Transkripte in das Cytoplasma 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 Cytoplasma (2). Nach Translation der intronhaltigen mRNAs beginnt die Zusammenlagerung der Virusbestandteile an der Zellmembran, gefolgt von der Freisetzung neuer Virionen und der Reifung zum infektiösen Virus.

1.2.2.1 Die Env-vermittelte Infektion der Wirtszelle

Das HIV-1 Glykoprotein (Env, gp160) ist ein Typ I integrales Membranprotein, welches aus den beiden nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten gp120 (SU, „surface“) und gp41 (TM, „transmembrane“) besteht. Beide Untereinheiten werden als Vorläuferprodukt translatiert und Signalsequenz-vermittelt an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) in das Lumen des ER eingeschleust (368). Innerhalb des ER findet die N-Glykosylierung an insgesamt 29 Glykosylierungsstellen statt, so dass Kohlenhydrate ca. 50% des Env Molekulargewichtes ausmachen (363). Diese ausgiebige Glykosylierung scheint der Maskierung immunogener Epitope vor neutralisierenden Antikörpern zu dienen (502). Zusätzlich erfolgt die Ausbildung von Disulfidbrücken und die vorübergehende Bindung an die molekularen Chaperone BiP/GRP78, Calreticulin und Calnexin (162, 471) zur Bildung von homotrimeren Strukturen, welche kompetent sind an CD4 zu binden (665). In der *cis* oder medialen Region des Golgi Apparates erfolgt die proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine durch eine zelluläre Furin-Protease (161, 250, 588), wodurch eine hydrophobe Sequenz am N-Terminus der gp41 (TM) Untereinheit exponiert wird, welche zur Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran notwendig ist (106, 107, 531). Die Bindung der gp120 (SU) Untereinheit erfolgt an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle (134, 327, 327, 346, 391). Diese Bindung führt sowohl zu einer Konformationsänderung innerhalb des CD4-Rezeptors (150), als auch innerhalb des viralen gp120 (527), wodurch die Korezeptor Bindungsstelle zugänglich wird (356, 507, 624, 627, 658) und es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen der variablen V3 Region des gp120, CD4 und einem der Chemokinrezeptoren kommt (627). Dieser trimolekulare Komplex induziert eine weitere Konformationsänderung zu einer „Sechs-Helix-Bündel“ Struktur („six-helix-bundle“), welche durch die drei gp41 Untereinheiten des Env Homotrimers gebildet werden (93, 646) und die Fusion der beiden Zellmembranen ermöglicht (153, 422).

Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle muss die virale (+)-Strang RNA zunächst in DNA revers transkribiert und die doppelsträngige DNA in das Genom integriert werden, bevor sich das HI-Virus replizieren kann (für eine Übersicht s. (13, 127, 131). Nach der Integration in das Wirtsgenom unterliegt die HIV Genexpression den Regulationsmechanismen eukaryotischer Gene. Dennoch gibt es eine Reihe von Besonderheiten, die auf den relativ hohen Grad an genomischer Komplexität zurückzuführen sind. Das gesamte virale Genom steht unter der Kontrolle nur eines einzigen Promotors innerhalb des 5'-LTRs („long terminal repeat“), wodurch eine einheitliche Population an polycistronischen Voll-Längen prä-mRNAs transkribiert wird, welche sämtliche offenen

Leserahmen (ORF, „open reading frames“) enthalten (195). Voraussetzung hierfür ist die, durch das virale Protein Tat („trans-activator of transcription“) vermittelte, Ausbildung eines RNA Polymerase II Komplexes mit einer hohen intrinsischen Prozessivität (für eine Übersicht s. (370)).

1.2.2.2 Die Tat-vermittelte Transaktivierung der viralen Transkription

Tat ist je nach HIV-1 Isolat ein 86 bis 101 Aminosäuren langes Protein, welches von zwei Exons kodiert wird, wobei das erste *tat* Exon für seine Funktionalität bereits ausreichend ist. Tat bindet an eine RNA Struktur innerhalb des 5'-LTRs, der sogenannten TAR-Region („trans-activation response element“) und bewirkt eine starke Erhöhung der viralen Genexpression (für eine Übersicht s. (194)). Die Inaktivierung von Tat führt zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit von HIV (141, 186). Tat besteht aus zwei funktionellen Domänen, der N-terminalen Aktivierungsdomäne (AS 1-47) und einer basischen RNA Bindedomäne (AS 48-57), welche für die Bindung an die TAR-Region benötigt wird (569). Es konnte gezeigt werden, dass seitens der TAR-Region *in vitro* eine kurze „stem-bulge“ Struktur zur Bindung von Tat ausreicht, während *in vivo* die gesamte „stem-loop“ Struktur benötigt wird (294). Daher wurde geschlossen, dass Tat zunächst mit einem zellulären Kofaktor interagieren muss, um die TAR-RNA sequenzspezifisch und mit hoher Affinität zu binden (für eine Übersicht s. (167)). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich in humanen und Primatenzellen eine deutlich stärkere Transaktivierung als in Nagerzellen nachweisen lässt (7). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die schwächere Transaktivierung durch Tat in CHO Zellen („chinese hamster ovary“) durch eine Überexpression von Cyclin T1 kompensieren lässt. (645). Cyclin T1 ist ein Partner der Cyclin-abhängigen Kinase CDK9 und damit eine Komponente des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P-TEFb) (689), was dafür spricht, dass Tat über das Bindeglied Cyclin T1 die Cyclin-abhängige Kinase 9 zur RNA Polymerase II rekrutiert (203, 645). Die Tat-assoziierte Kinase CDK9 scheint die Erhöhung der Prozessivität der RNA Polymerase II durch eine Hyperphosphorylierung der C-terminalen Dömäne der größten Untereinheit der RNA Polymerase II zu induzieren (270), wodurch der entscheidende Schritt beim Übergang von der Transkriptions-Initiation zur Elongation markiert wird (462).

Die Tat-vermittelte Transaktivierung der viralen Transkription führt zur Synthese einer ca. neun kb großen prä-mRNA, welche für mindestens neun verschiedene Gene kodiert.

Zusätzlich zu den, bei allen Retroviren vorkommenden, Strukturproteinen Gag, Pol und Env, werden bei HIV durch die polycistronische prä-mRNA weitere Nicht-Strukturproteine kodiert (für eine Übersicht s. (167)). Die Unterteilung der Nicht-Strukturproteine in regulatorische und akzessorische Proteine beruht auf der Eigenschaft, für die HIV Replikation essentiell oder nicht essentiell zu sein. Aufgrund dieser Klassifizierung zählen Tat und Rev zu den regulatorischen Proteinen und Vif, Vpr und Vpu zu den akzessorischen Proteinen. Nef nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, da es nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen für die Virusreplikation essentiell zu sein scheint (317). Aufgrund der hohen genomischen Komplexität der Retroviren überlagern sich die offenen Leserahmen der viralen Genen nicht nur, sondern liegen teilweise auch innerhalb der Intronsequenzen anderer Gene (479). Eine Definition einer Sequenz als Intron oder Exon ist somit abhängig von dem betrachteten Gen. Beispielsweise liegt der Großteil der kodierenden Sequenzen der HIV-1 Gene *gag* und *pol* in der Intronsequenz der mRNAs für *tat*, *rev*, *env*, *nef*, *vpu*, *vpr* und *vif* (Abb. 4). Dies bedingt, dass nicht gespleißte mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert werden muss, sondern auch nicht gespleißte oder nur teilweise gespleißte mRNA (49, 130, 324).

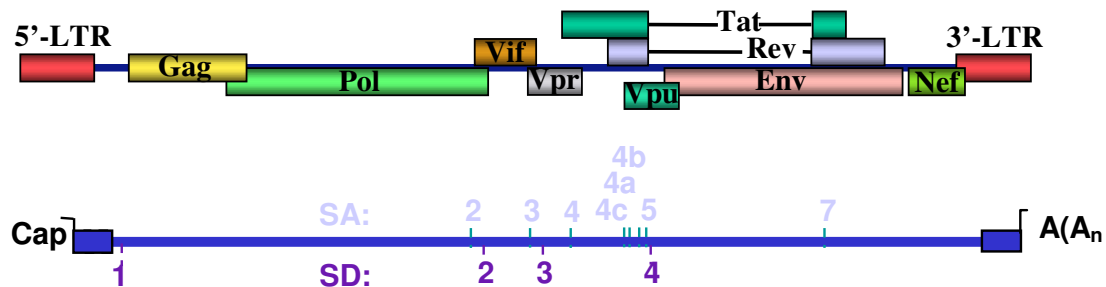


Abb. 4: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. In dem oberen Teil der Abbildung ist die Anordnung der überlappenden, offenen Leserahmen und deren Position relativ zu den beiden LTRs („long terminal repeats“) innerhalb des proviralen HIV-1 Genoms dargestellt. Der 5'-LTR dient dabei als Promotor, während der 3'-LTR als Polyadenylierungsstelle genutzt wird. Der untere Teil der Abbildung zeigt die von dem HIV-1 Genom transkribierte prä-mRNA mit der Position der darin enthaltenen Spleißstellen. Die Nummerierung der Spleißdonoren (SD) und Spleißakzeptoren (SA) wurde von Purcell und Martin (492) übernommen.

1.2.2.3 Der Rev-vermittelte nukleocytoplasmatische Export intronhaltiger mRNAs

HIV-1 Rev („regulator of expression of virion proteins“) ist ein von zwei Exons kodiertes Phosphoprotein (115, 262), welches sequenzspezifisch den nukleocytoplasmatischen Export intronhaltiger mRNAs vermitteln kann (für eine Übersicht s. (167, 274)). Durch

Mutationsanalysen konnten zwei funktionelle Domänen innerhalb der 166 Aminosäuren langen Sequenz identifiziert werden, welche beide für die posttranskriptionelle *trans*-Aktivierung essentiell sind (117, 325, 395). N-terminal befindet sich eine basische Domäne, welche sowohl als nukleäres/nukleoläres Lokalisationssignal (NLS) (117, 395, 482), als auch als sequenzspezifische RNA-Bindungsdomäne dient (53, 135, 258, 265, 325, 401, 606, 675, 676). Die N-terminale Domäne wird von Sequenzen flankiert (MI und MII), welche zur Rev Multimerisierung notwendig sind (393, 396, 619). C-terminal besitzt Rev eine essentielle, Leucin-reiche Aktivierungsdomäne (400). Mutationen innerhalb dieser Aktivierungsdomäne führten zu einer *trans*-dominanten Hemmung der Rev Funktion (426, 635), wodurch die Funktion von Rev als Oligomer bestätigt werden konnte (37, 171, 395, 398). In der C-terminalen Domäne konnte zusätzlich ein nukleäres Export Signal (NES) lokalisiert werden, welches, wenn es mit anderen Proteinen fusioniert ist, deren nukleocytoplasmatischen Export vermitteln konnte (182, 430, 647). Obwohl Rev aufgrund seiner NLS und NES Domänen zwischen Kern und Cytoplasma pendeln kann (300, 429, 504), wurde Rev hauptsächlich in den Nukleoli der Wirtszelle nachgewiesen, welche damit ein temporäres Reservoir für Rev darstellen könnten (132, 395, 482).

Die eigentliche Zielstruktur für das Rev Protein stellt eine ca. 240 Nukleotide lange RNA Sequenz innerhalb der kodierenden Region des *env* Gens dar. Diese als RRE („rev responsive element“) bezeichnete Sequenz bildet eine Sekundärstruktur mit mehreren „stem-loop“ Strukturen aus (116, 399). Für den Rev-vermittelten Export ungespleißter oder einfach gespleißter RRE-haltiger mRNAs ist die direkte Bindung von Rev an das RRE notwendig (399, 515). Obwohl innerhalb des gesamten RREs sequenzspezifische Bereiche identifiziert werden konnten, welche für die Bindung von Rev oder der RRE-Funktion notwendig sind (142), scheint die Sekundärstruktur des RREs eine größere Rolle zu spielen (401, 468). Innerhalb einer Haarnadelschleifen-Struktur („stem-loop IIB“) des RREs konnte eine hoch affine Rev Bindungsstelle identifiziert werden (26, 124, 287, 623), welche innerhalb eines Bereiches doppelsträngiger RNA eine Blasen-Struktur („bubble“) ausbildet (26, 265, 266, 483). Die Transaktivierung durch Rev ist auch mit einer minimalen, nur 90 Nukleotide umfassenden RRE Struktur möglich, welche die hoch affine Bindungsstelle einschließt (124, 265, 278), wobei die Effizienz dennoch durch Mutationen in den flankierenden Bereichen beeinträchtigt wird (116, 142, 143, 265, 401, 468).

Die Notwendigkeit des Rev Proteins wurde erstmalig durch den Vergleich des cytoplasmatischen mRNA Musters eines HIV-1 Provirus mit einem Rev-defekten Provirus deutlich (168, 179, 256, 399). In der frühen Infektionsphase werden von der

polycistronischen Voll-Längen prä-mRNA hauptsächlich vollständig gespleißte mRNAs gebildet, welche für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren (320). Der Verlust der, in der späten Phase der Infektion gebildeten, intronhaltigen mRNAs, die für Gag, Pol, Env, Vif, Vpr und Vpu kodieren, konnte durch die Koexpression eines Rev exprimierenden Plasmids korrigiert werden (328). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Übergang von der frühen in die späte HIV-1 Replikationsphase erfolgt, sobald eine ausreichende Menge an Rev Protein in der Zelle vorliegt (487). Die initiale Bindung von Rev an die hoch affine Bindungsstelle innerhalb der „stem-loop IIb“ Struktur RRE-haltiger prä-mRNAs (623) führt zu einer Multimerisierung von Rev entlang der RRE Struktur (405, 677). Die Multimerisierung von Rev erfolgt über die N-terminalen Multimerisierungsdomänen, welche das Kernlokalisierungssignal flankieren, so dass dies zu einer Maskierung der NLS-Sequenz führen könnte (269, 587). Das C-terminale nukleäre Export Signal (NES) scheint daraufhin den Export der intronhaltigen RNA durch Bindung des nukleären Export-Rezeptors CRM1 („chromosomal region maintenance“) und der GTP-gebundenen Form des G-Proteins Ran zu vermitteln (190).

Das 115 kDa Protein CRM1 wurde ursprünglich in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert (3) und wird aufgrund seiner Funktion als nukleärer Export-Rezeptor auch als Exportin 1/XPO1 bezeichnet (190, 578). Ein Zusammenhang von CRM1 und Rev wurde erstmalig bei der Suche nach Inhibitoren des Rev Exports beschrieben, welche zu der Identifikation des *Streptomyces* Metabolit Leptomycin B führte (654). Leptomycin B führt zu einer effizienten Blockierung des Rev-abhängigen Exports intronhaltiger RNAs durch Inhibition des CRM1 Export-Rezeptors (460), welche jedoch aufgrund der hohen Cytotoxizität des Leptomycin B nicht therapeutisch genutzt werden kann (654). Darüber hinaus konnte an *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt werden, dass durch Überexpression von humanem CRM1 die Leptomycin B induzierte Hemmung des Rev Exports überwunden werden kann (190). Weiterhin ließ sich durch die Überexpression von CRM1 der nukleäre Export von Rev, der U snRNAs und der 5S rRNA steigern, während der Export von tRNAs, mRNAs oder eines Kontrollproteins unbeeinflusst blieb (190), was auf einen distinkten klassenspezifischen Exportrezeptor hindeutet (182, 292). Die Bindung von CRM1 an Rev erfolgt an das nukleäre Exportsignal (NES) und scheint dabei auf die zusätzliche Anwesenheit der GTP gebundenen Form der GTPase Ran angewiesen zu sein (190). Die Bildung dieses ternären Export-Komplexes führt über Interaktionen von CRM1 mit Nukleoporinen des Kernporenkomplexes (NPC, „nuclear pore complex“) zur Translokation des Exportkomplexes in das Cytoplasma, wo es unter GTP-Hydrolyse zur Dissoziation des

Exportkomplexes kommt (51, 191, 691). Der Rev-vermittelte, nukleocytoplasmatische Export intronhaltiger RNA erfolgt somit über einen CRM1-abhängigen nicht-mRNA Exportweg, welcher an den Ran-GTPase Zyklus gekoppelt ist (185).

Der Rezeptor für den nukleären Import von Rev ist Importin, ein Heterodimer aus der kleinen Untereinheit Importin α und der großen Untereinheit Importin β . Im Gegensatz zu anderen NLS tragenden Proteinen werden sowohl Rev, als auch Tat initial nicht durch die Importin α -Untereinheit, sondern direkt durch die Importin β -Untereinheit erkannt (269, 625). Die Interaktion der Importin β -Untereinheit mit Ran-GDP und Nukleoporinen des Kernporenkomplexes (NPC) führt zur Translokation des Importkomplexes und die Freilassung von Rev erfolgt unter der nukleären Bindung von Ran-GTP an Importin β (503).

Durch die Möglichkeit des Rev-vermittelten Exports intronhaltiger RNAs ist HIV-1 in der Lage aus einer einzigen polycistronischen prä-mRNA durch die Kombination mehrerer alternativer 5'- und 3'-Spleißstellen im Verlauf des HIV-1 Replikationszyklus mehr als 40 verschiedene mRNAs zu synthetisieren (204, 492). Zur korrekten Expression aller offenen Leserahmen (ORFs) ist HIV auf die Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher mRNAs angewiesen, welche von einer allgemein ineffizienten Spleißreaktion abhängig ist (492). Es wurde diskutiert, ob Rev den nukleocytoplasmatischen Export RRE-haltiger RNAs in Abhängigkeit von Spleißstellen vermittelt (257, 596). Demnach soll Rev die Spleißreaktion direkt inhibieren können, indem es den Eintritt des U4/U6 * U5 tri-snRNP-Komplex blockiert und dadurch die Assemblierung des Spleißosoms verhindert (326). Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der zelluläre Spleißfaktor SF2/ASF eine Rev-abhängige Bindung an das RRE zeigt (488) und, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen Rev und dem SF2/ASF assoziierten Protein p32 nachgewiesen werden konnte (611).

Die Voraussetzung für die Rev Funktion sollen ineffiziente Spleißstellen sein (9, 160, 580), da gezeigt werden konnte, dass durch den Austausch von β -Globin Spleißstellen mit denen von HIV-1 der Export einer RRE-haltigen β -Globin RNA Rev-abhängig reguliert werden konnte (95). In nachfolgenden Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass die HIV 5'-Spleißstellen größtenteils effizient genutzt werden und es sich nur bei den 3'-Spleißstellen um schwache Spleißstellen handelt (160, 421, 464, 559, 580). Die Regulation der Spleißeffizienz erfolgt demnach bei HIV-1 über ineffiziente 3'-Spleißstellen (160, 199, 311, 421, 464, 559, 580, 679) und *cis*-wirkende „silencer“-Elemente innerhalb der Exons (ESS) (9, 14, 38, 79, 154, 560, 581, 648) oder innerhalb der Introns (ISS) (136, 407, 609).

Obwohl die, für die Rev Funktion essentielle, ineffiziente Spleißreaktion durch die HIV 3'-Spleißstellen vermittelt werden, konnte am Beispiel der *env*-Expression beobachtet werden, dass auch die Anwesenheit einer starken 5'-Spleißstelle stromaufwärts des *env*-Startcodons für die Rev Funktion notwendig ist (257, 383). Die *Env*-kodierende Region liegt größtenteils innerhalb der Intronsequenz von *tat* und *rev*, welche von der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 (SD, „Spleißdonor“) und der 3'-Spleißstelle SA7 (SA, „Spleißakzeptor“) flankiert wird, so dass zur Bildung des viralen Hüllproteins die Spleißreaktion von SD4 auf SA7 Rev-abhängig verhindert werden muss (Abb. 4).

An einem subgenomischen HIV-1 Fragment, welches unter der Kontrolle eines SV 40 Promotors stand, konnte gezeigt werden, dass die starke 5'-Spleißstelle SD4 benötigt wird um eine *env*-Expression zu ermöglichen (302, 383). Darüber hinaus beeinflusste die Erkennung der 5'-Spleißstelle SD4 durch die U1 snRNA die „steady-state“ Menge an *env*-mRNA (302, 383). Der durch Mutationen in der 5'-Spleißstelle induzierte Verlust der *env*-Expression konnte durch eine kompensatorische Mutation innerhalb der U1 snRNA korrigiert werden (302, 383). Diese Ergebnisse sprechen für eine zusätzliche, von der Spleißreaktion unabhängige, Funktion der U1 snRNA in der prä-mRNA Stabilisierung. In weiteren Untersuchungen konnten diese beiden Funktionen durch Verwendung einer spleißinaktiven U1 snRNA Bindestelle, welche dennoch eine zur Stabilisierung der prä-mRNA ausreichende U1 Komplementarität aufwies, voneinander getrennt werden (302). Diese stabilisierende Funktion der U1 snRNA scheint unabhängig von der Rev Funktion zu erfolgen, da sich auch bei Transkripten des Polyoma Virus eine bis zu 100-fache Reduktion der RNA Mengen durch Mutation der 5'-Spleißstelle beobachten ließ (25).

Die in der späten Phase des HIV-1 Replikationszyklus gebildeten, ungespleißten mRNAs dienen sowohl der Expression der Strukturproteine Gag und Pol, als auch als Genom für neue Virionen (70). Die Gag und Gag/Pol Vorläuferproteine werden während ihrer Synthese N-terminal myristyliert und mit Hilfe zellulärer Faktoren zur Wirtzellmembran transportiert, wo die Morphogenese neuer infektiöser Virionen stattfindet (für eine Übersicht s. (442)). An der mit Glykoproteinen besetzten Zelloberfläche stülpen sich Membranbereiche aus und bilden Vesikel. In diesen noch unreifen Viruspartikeln herrscht, bedingt durch die Virusproteine, ein leicht saurer pH, bei dem die Protease die Prozessierung der Gag/Pol Vorläuferproteine katalysiert. Durch strukturelle Umlagerungen und der Bildung des konischen Capsids werden die Viruspartikel infektiös und können neue Zellen infizieren (für eine Übersicht s. (63)).

1.3 Zielsetzung

Das HIV-1 Glykoprotein (Env, gp160) ist für die Infektiosität und Pathogenität von HIV-1 von entscheidender Bedeutung, da es den Eintritt des HIV-1 Genoms in die Wirtszelle durch die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen für die *env*-Expression in transienten Transfektionsexperimenten mit subgenomischen *env*-Expressionsvektoren in der Zellkultur näher untersucht. Einen Ausgangspunkt für die nachfolgenden Experimente stellte die Beobachtung von Lu et al. dar (383), der zufolge eine Mutation in der Position +5 des HIV-1 Spleißdonors 4 (SD4) die *env*-Expression verhinderte. Weiterhin hatten diese Autoren zeigen können, dass sich die Expression des Glykoproteins durch Kotransfektion einer Suppressor U1 snRNA, welche eine kompensatorische Mutation in dem korrespondierenden Nukleotid der U1 snRNA enthielt, wiederherstellen ließ. In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 durchgeführt, um hieran die Voraussetzungen für die RNA-Duplex Ausbildung mit der U1 snRNA umfassend beschreiben zu können. In dem zweiten Teil der Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss der flankierenden Sequenzen auf die Erkennung dieser 5'-Spleißstelle näher untersucht. Ziel dieser beiden Teile war es experimentelle Grundlagen für neue Algorithmen zur Beschreibung von Spleißdonorstellen zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien und Lösungen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Serva und Roth verwendet. Die Zusammensetzung der Medien und Lösungen sind im jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder entstammen andernfalls den gängigen Laborhandbüchern (19, 523).

2.1.2 *Escherichia coli* Stämme

Die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5 α F'IQ (Invitrogen Life Technologies). Für die Präparation von rekombinantem SF2/ASF Protein wurde der SF2-Expressionsvektor (pDS-H6F1-SF2 Δ RS) in *Escherichia coli* M15 (pREP4) (Qiagen) transformiert.

2.1.3 Zelllinien

Die Expressionsstudien wurden mit der adhärent wachsenden, humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa-T4⁺ durchgeführt, welche aufgrund einer stabil integrierten Genkopie konstitutiv den membranständigen CD4-Rezeptor konstitutiv exprimiert (391). Nach Transfektion der Zellen mit *env*-Expressionsvektoren interagiert das exprimierte Env-Glykoprotein (gp120) auf der Zelloberfläche mit dem CD4-Rezeptor der Nachbarzellen. Dies führt zur Bildung von vielkernigen Riesenzellen (Synzytien). Die Größe der gebildeten Zellfusionen, sowie die Anzahl der Kerne pro Synzytium erlauben Rückschlüsse auf die exprimierte Env-Glykoproteinmenge.

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit einem automatischen DNA-Synthesizer (Applied Biosystems, Modell 381 A) unter Abspaltung der endständigen Tritylgruppe hergestellt, mit NH_4OH vom Träger abgekoppelt (3x30 min) und für 15 h bei 55°C inkubiert, um die Schutzgruppen abzuspalten. Die Aufreinigung erfolgte über NAP25-Säulen (Pharmacia) und Elution mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Pharmacia, Ultrospec II-4050). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind bei den jeweiligen Plasmidbeschreibungen aufgeführt.

2.1.5 Rekombinante Plasmide

Die verwendeten Plasmide enthalten einen Replikationsursprung (ori, „origin of replication“) für die Replikation in *Escherichia coli* und als prokaryotischen Selektionmarker das β -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz, *amp^r*). Der Simian Virus (SV40) „early“ Promotor, das Intron des kleinen t-Antigens und die SV40 Polyadenylierungsstelle entstammen dem Plasmid pSVT7 (41). Alle verwendeten HIV-1 Sequenzen entstammen dem Vektor pNLA1 (594), einem cDNA-Derivat des molekularen Klons pNL4-3, der Sequenzen des New York 5 Isolats und des LAV Isolats enthält (2). Das verwendete Nummerierungssystem bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 (445). Die Sequenzen der aufgeführten Plasmide werden auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

2.1.5.1 env-Expressionsvektoren

Der verwendete *env*-Expressionsvektor SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^-$ enthält das subgenomische *EcoRI-XhoI* Fragment aus pNLA1, flankiert von einem SV40 „early“ Promotor und einer SV40-Polyadenylierungsstelle. Das subgenomische *EcoRI-XhoI* Fragment entspricht der 3'-Hälfte des HIV-1 Genoms, welches die kodierenden Sequenzen für *tat*, *rev*, *vpu* und *env* beinhaltet, wobei die Leserahmen für *tat* und *rev* durch Punktmutationen in ihren Translationsstartcodons inaktiviert wurden. Die Mutation des *tat* AUGs (tat^-) wurde eingeführt, um eine Inhibition der 3'-wärts liegenden Startcodons der Gene *vpu* und *env*

durch das starke tat AUG auf translatorischer Ebene auszuschließen (538). Die Mutation des *rev* Startcodons (rev^-) erfolgte, um eine variable *rev*-Expression als Ursache für eine unterschiedliche *env*-Expression ausschließen zu können. Gleiche Mengen an Rev wurden durch Kotransfektion eines *rev*-Expressionsplasmids (SV $_{crev}$) gewährleistet. Die Mutation des *tat* Startcodons (ATG GAG -> AGG CCT) erfolgte durch Austausch des *Sall*-*Xho*II Fragments (Nukleotide 5785-5841) gegen ein PCR-Fragment (Primer #135/#136, Template SV E/X). Für die Mutation des *rev* Startcodons (ATG -> ACG) wurde das *Mst*II-*Sac*I Fragment (Nukleotide 5954-6004) gegen ein PCR-Fragment (Primer #193/#187, Template SV E/X tat^-) ersetzt.

#135 (tat^-): 5'-GGGTGTCGACATAGCAGAATAGGCGTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAA

#136 (tat^-): 5'-GTCTAGGATCTACTGGAGGCCTTTCTTGCTCTCCTCT

#187 (rev^-): 5'-GATGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTC

#193 (rev^-): 5'-CAAAAGCCTTAGGGATCTCCTACGGCAGGAAGAAGCGGAGACA

Für die Mutationsanalyse der 5'-Spleißstelle SD4 wurde das *Hind*III-*Kpn*I (Nukleotide 6026-6343) des *env*-Expressionsvektors SV E/X tat^-rev^- gegen ein PCR-Fragment (Template SV E/X tat^-rev^-) substituiert. Der 5'-PCR Primer enthielt die *Hind*III Restriktionsstelle und die jeweilige Mutation der 5'-Spleißstelle SD4. Als 3'-PCR Primer wurde der Primer #183 verwendet. Die Sequenz der Mutation der 5'-Spleißstelle ist von Position -3 bis +8 unterstrichen dargestellt, wobei das erste Nukleotid des Introns als Position +1 bezeichnet wird. Die Nomenklatur der Konstrukte definiert jeweils die Position der Punktmutation und das an dieser Stelle ausgetauschte Nukleotid bezogen auf die Ausgangssequenz der 5'-Spleißstelle SD4. Die „cs“ Nomenklatur bezeichnet einen zusammenhängenden U1 komplementären Bereich („continuous stretch“, cs), bei dem die Basis den Beginn des komplementären Bereiches und der Exponent die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA angibt.

#183 (3'-PCR Primer): 5'-ATCCTGCAGGGCTTTAGGCTTTGATCCC

#444 (3U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTTAGTAGTACATGTAATGCA

#445 (-1G3U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTTAGTAGTACATGTAATGCA

#676 (-1G8U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTAAGTATTACATGT

#753 (-1G5U8U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTAATTATTACATGTAATGCA

#759 (-1G5U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTAATTAGTACATGT

#760 (-1G3U8U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTTAGTATTACATGTAATGCA

#770 (SD4 $^-$): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCACTAATCCGTACCTGTAATGCAACCTATAATAGT

#812 (3U8U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTTAGTATTACATGTAATGCA

#813 (4C): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTACGTAGTACATGTAATGCA
 #814 (4C8U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTACGTATTACATGTAATGCA
 #884 (-1G3U7U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTTAGTTGTACATGTAATGCA
 #893 (-2A-1G3U7U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGAGGTTAGTTGTACATGTAATGCA
 #900 (4U): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTATGTAGTACATGTAATGCA
 #905 (6A7C): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGACGTACATGTAATGCA
 #906 (7C): 5'-CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTCGTACATGTAATGCA
 #1013 (cs-4¹⁶): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACCAGGTTTCATGTACATGTAATGCA
 #1014 (cs-3¹⁵): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACAGGTATCATGTACATGTAATGCA
 #1015 (cs-2¹⁴): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGAGGTAACATGTACATGTAATGCA
 #1018 (cs-3¹³): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACAGGTTTCATGTACATGTAATGCA
 #1019 (cs-4¹⁸): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAACCAGGTATCATGTACATGTAATGCA
 #1020 (HIV#15): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGGGGTGGAAATTACATGTAATGCA
 #1226 (HIV#16): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAAATTGTGGGTCATACATGTAATGCA
 #1227 (HIV#17): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAATTTGGTAAATGTTACATGTAATGCA
 #1228 (HIV#18): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAATTTGGTAGGTTTTACATGTAATGCA
 #1264 (4G): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAGGTAGTACATGTAATGCA
 #1304 (3G7C): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTGAGTCGTACATGTAATGCA
 #1305 (4G7C): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAGGTCGTACATGTAATGCA
 #1329 (cs-3¹⁴): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTATGTGTTACATGTAATGCA
 #1332 (-1G3U7G8U): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAGCGGTTAGTGTACATGTAATGCA
 #1348 (SD2): 5'-CATCCTTAAGCTTCTCTATCAAAAAGGTGAAGGGTACATGTAATGCA

Zur Klonierung des Konstrukts SV E/X tat⁻ rev⁻ GAR⁻ wurde das *EcoRI-SacI* Fragment (Nukleotide 5742-6004) zunächst gegen ein Adapter-Fragment (#937/#938) ausgetauscht (SV *Sac-Sma*) und nachfolgend gegen ein *EcoRI-SacI* restringiertes PCR-Fragment (Primer #164/#1067) substituiert.

#164 (5'-Primer): 5'-ACAAATAGGGGTTCCGCGCACA
 #937 (Sac-Sma Adapter): 5'-AATTCGAGCTCACTCTACCCGGGCAGCT
 #938 (Sac-Sma Adapter): 5'-GCCCGGGTAGAGTGAGCTCG
 #1067 (GAR⁻): 5'-GATGAGCTCTTGGTCGCTGTCTGCGCTTGTGCTGCCGTAGGAG

Für die Klonierung des Konstruktes SV-env wurde das subgenomische HIV-1 *AvrII-KpnI* Fragment (Nukleotide 5206-6348) des Ausgangsvektors pNLA1 (594) gegen ein *AvrII-KpnI* geschnittenes PCR-Fragment (Primer #1095/#183, Template pNLA1) ersetzt und das *BamHI-AvrII* Fragment (Nukleotide 8470-5206) wurde gegen das *BamHI-XbaI* Fragment des Vektors SV E/X tat⁻ rev⁻, das *XbaI-ClaI* Fragment aus pASVT7paΔint (302) und das *ClaI-AvrII* Fragment aus SVrev (302) ausgetauscht. Die maximale U1 Komplementarität der

5'-Spleißstelle (cs11, unterstrichen dargestellt) wurde durch Austausch des *SacI-AflIII* Fragments gegen ein Adapter-Fragment (#1424/#1425) erzielt.

#183 (3'-PCR Primer): 5'-ATCCTGCAGGGCTTTAGGCTTTGATCCC

#1095 (5'-PCR-Primer): 5'-GGGCCTAGGAATTCTCTCTTGAGCTCGCAGTAAGTAGCTTAAGCTCTCC
GAAGACAGTGGCAATGAGAGT

#1424 (env-cs11): 5'-TTAAGATACTTACCTGGAGCT

#1425 (env-cs11): 5'-CCAGGTAAGTATC

Das GAR-ESE (#1098/#1099) und dessen Mutationen wurden über *EcoRI-SacI* Adapter in das Ausgangsplasmid SV-env eingeführt. Die stromaufwärts der putativen 5'-Spleißstelle HIV#18 gelegene Sequenz (hiv#18) wurden durch Substitution des *EcoRI-SacI* Fragments gegen ein *EcoRI-SacI* geschnittenes PCR-Fragment (Primer #1373/#1374, Template SV E/X tat⁻ rev⁻) eingeführt. Der Austausch des GAR-ESE gegen eine MS2 Bindungsstelle (SV-env/M1) erfolgte durch Substitution des *EcoRI-SacI* Fragments gegen ein Adapter-Fragment (#1710/#1711), wodurch die für die Klonierung genutzte *EcoRI* Restriktionsstelle mutiert wurde. Die Innerhalb des Adapter-Fragments (#1710/#1711) gelegene neue *EcoRI* Restriktionsstelle konnte für weitere Insertionen von MS2-Bindungsstellen genutzt werden (SV-env/M2). Die Mutation der 5'-Spleißstelle (unterstrichen dargestellt) erfolgte über die Verwendung von *SacI-AflIII* Adapter-Fragmenten.

#1098 (env-GAR): 5'-AATTCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCT

#1099 (env-GAR): 5'-GTCCTTCTTCGCCTCTGTCGCTGCTTC

#1138 (env-cs-2¹⁴): 5'-TTAAGGATGTTACCTCGAGCT

#1139 (env-cs-2¹⁴): 5'-CGAGGTAACATCC

#1373: (env-hiv#18): 5'-GAGCGAATTCTGGGCAAGTTTGTG

#1374: (env-hiv#18): 5'-TGATGAGCTCAGCCTCCTACTATC

#1598 (env-SRp40⁻): 5'-AATTCAGGAAGAAGCGGATTTAGCGACGAAGAGCT

#1599 (env-SRp40⁻): 5'-CTTCGTCGCTAAATCCGCTTCTTCCTG

#1600 (env-SF2⁻ SRp40⁻): 5'-AATTCAGGAATTAGCGGCGACTTCGCTTAAGAGCT

#1603 (env-SF2⁻ SRp40⁻): 5'-CTTAGGCGAAGTCGCCGCTAATTCCTG

#1613 (env-SF2⁻): 5'-AATTCAGGAATTAGCGGAGACAGCGCTTAAGAGCT

#1614 (env-SF2⁻): 5'-CTTAAGCGCTGTCTCCGCTAATTCCTG

#1658 (env-SF2): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGCAGACGAAGAGCT

#1659 (env-SF2): 5'-CTTCGTCGCTGCAAGCAGCTTCTTCAAG

#1668 (env-SRp40): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTTCTTACTGGAGAGCT

#1669 (env-SRp40): 5'-CTCCAGTAAGAAAGCAGCTTCTTCAAG

#1670 (env-SC35): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGGCCCTGCGAGCT

#1671 (env-SC35): 5'-CGCAGGGGCCCAAGCAGCTTCTTCAAG
 #1672 (env-SRp55): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGCTGCATCTTAGCT
 #1673 (env-SRp55): 5'-AAGATGCAGCCAAGCAGCTTCTTCAAG
 #1678 (env-SD4-SRp55): 5'-CTTAAGCTACTTACTGCCAGCT
 #1679 (env-SD4-SRp55): 5'-GGCAGTAAGTAGC
 #1693 (env-SF2-SF2): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGCAGACGAAGAGCACGCAGTAAGTAGC
 #1694 (env-SF2-SF2): 5'-TTAAGCTACTTACTGCGTGCTCTTCGTCTGCCAAGCAGCTTCTTCAAG
 #1696 (env-SC35-SF2): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGGCCCTGCGAGCACGCAGTAAGTAGC
 #1697 (env-SC35-SF2): 5'-TTAAGCTACTTACTGCGTGCTCGCAGGGGCCCAAGCAGCTTCTTCAAG
 #1699 (env-SD4-SRp40): 5'-TTAAGCTACTTACGATTAGCT
 #1700 (env-SD4-SRp40): 5'-AATCGTAAGTAGC
 #1702 (env-SF2(E42)-SRp40): 5'-AATTCCTGAAGAAGCTGCTTGGCAGACTCAGATCTAAATCGTAAGT
AGC
 #1703 (env-SF2(E42)-SRp40): 5'-TTAAGCTACTTACGATTAGATCTGAGTCTGCCAAGCAGCTTCTTCA
AG
 #1706 (env-SD4-SC35): 5'-CGTAGTAAGTAGA
 #1707 (env-SD4-SC35): 5'-TTAATCTACTTACTACGAGCT
 #1710 (env-MS2): 5'-AATTATTGACCGTACACCATCAGGGTACGCGAATTCATTAATGAGCT
 #1711 (env-MS2): 5'-CATTAAATGAATTCGCGTACCCTGATGGTGTACGGTCAAT
 #1912 (SF2-SRp40(E42)): 5'-AATTCCTCAGACTCATCTTCAAAGCCTCGAGCTCTTTCAGTAAGTAGC
 #1913 (SF2-SRp40(E42)): 5'-TTAAGCTACTTACTGAAAGAGCTCGAGGCTTGAAGATGAGTCTGAAG
 #1914 (SF2-SRp40): 5'- AATTCCTCAGACTCATCTCTAATCGAGCGAGCTCTTTCAGTAAGTAGC
 #1915 (SF2-SRp40): 5'- TTAAGCTACTTACTGAAAGAGCTCGCTCGATTAGAGATGAGTCTGAAG

Das Plasmid SV-env/E42 wurde durch Substitution des *SacI-AflIII* Fragments gegen ein *SacI-AflIII* geschnittenes PCR-Fragment (Primer #197/#1153, Template SV E/X $tat^- rev^-$) konstruiert. Die Erhöhung der U1 Komplementarität der 5'-Spleißstelle (cs11) erfolgte durch Substitution des *SacI-AflIII* Fragments gegen ein *SacI-AflIII* restringiertes PCR-Fragment (Primer #197/#1457, Template SV E/X $tat^- rev^-$).

#197 (T7 Primer): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG
 #1153 (E42): 5'-ATTACATGTACTTAAGCTACTTACTGCTTTGATA
 #1457 (E42 cs11): 5'-GAGCTTAAGATACTTACCTGTTTGATAGAGA

Zur Klonierung des Konstruktes SV-env/Ex5 wurde das *SacI-KpnI* Fragment des Vektors SV-env/GAR gegen das *SacI-KpnI* Fragment von SV-env/E42 ausgetauscht. Die Mutationen der 5'-Spleißstelle (unterstrichen dargestellt) wurden über *SacI-AflIII* Adapter-Fragmente eingeführt.

#1138 (env-cs-2¹⁴): 5'-TTAAGGATGTTACCTCGAGCT
 #1139 (env-cs-2¹⁴): 5'-CGAGGTAACATCC

#1144 (Ex5-SD1): 5'-CCTGGTGAGTACC
 #1146 (Ex5-SD2): 5'-CAAGGTGAAGGGC
 #1147 (Ex5-SD3): 5'-CAAGGTAGGATCC
 #1148 (Ex5-SD2): 5'-TTAAGCCCTTCACCTTGAGCT
 #1149 (Ex5-SD1): 5'-TTAAGGTACTCACCAGGAGCT
 #1150 (Ex5-SD3): 5'-TTAAGGATCCTACCTTGAGCT
 #1419 (Ex5-12gg5): 5'-TTAAGGCACCCACCTGGAGCT
 #1420 (Ex5-12gg5): 5'-CCAGGTGGGTGCC
 #1430 (Ex5-12gg3): 5'-CCAGGTGGGAGCC
 #1431 (Ex5-12gg3): 5'-TTAAGGCTCCACCTGGAGCT
 #1530 (Ex5-8gg5): 5'-CAAGGTGGGTGCC
 #1531 (Ex5-8gg5): 5'-TTAAGGCACCCACCTTGAGC
 #1551 (Ex5-10gg5): 5'-CAAGGTGGGTGCC
 #1552 (Ex5-10gg5): 5'-TTAAGGCACCCACCTTGAGCT
 #1740 (Ex5-8gg8): 5'-CGTGGTGGGTATC
 #1741 (Ex5-8gg8): 5'-TTAAGATACCCACCACGAGC
 #1742 (Ex5-8gg7): 5'-TTAAGGTACCCACCACGAGCT
 #1743 (Ex5-5gg8): 5'-TTAAGATACCCACTGCGAGCT
 #1744 (Ex5-8gg7): 5'-CGTGGTGGGTACC
 #1755 (Ex5-5gg8): 5'-CGCAGTGGGTATC
 #1769 (Ex5-4a5gg8): 5'-CCAAGTGGGTATC
 #1770 (Ex5-4a5gg8): 5'-TTAAGATACCCACTTGAGCT
 #1821 (E42w/oSR): 5'-GATCATAACAGTTAGACTCATCT
 #1822 (E42w/oSR): 5'-AGCTAGATGAGTCTAACTGTTAT
 #1823 (Ex5-8tt8): 5'-TTAAGATACAAACCGCGAGCT
 #1825 (Ex5-8tt8): 5'- CGCGGTTTGTATC
 #1947 (Ex5-SRp40): 5'-GAGAGCTTAAGCGACTTACTGATTTGATAGAGAAGCTTGATGAGTCTGACT
 GTTATGATGAGCTCTT
 #1956: (Ex5-SC35): 5'-GAGAGCTTAAGCGACTTACTGCTTTGATAGAGAAGCTTGATGAGCCTGACC
 GCCTTGATGAGCTCTT
 #1957: (Ex5-SF2): 5'-GAGAGCTTAAGCGACTTACTGCTTTGATAGAGAAGCTTGATGAGTCTGACTG
 TTATGATGAGCTCTT

2.1.5.2 U1 snRNA Plasmide

Das Ausgangsplasmid pUCBU1 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Marie-Louise. Hammarskjold (University of Virginia, USA) zur Verfügung gestellt. In dem Konstrukt pUCBAU1 wurde das *BgIII-PstI* Fragment (Nukleotide 440–726) gegen ein Adapter-Fragment (#1132/#1133), welches jeweils eine *BgIII*, *PstI* und *XhoI* Restriktionsstelle enthielt, ausgetauscht. Die Mutationen in der zur 5'-Spleißstelle komplementären Region der U1 snRNA wurden durch Austausch des *BgIII-XhoI* Fragments (Nukleotide 440-464) gegen

ein *BglIII-XhoI* geschnittenes PCR-Fragment (Template pUCBU1) eingeführt. Der 5'-PCR Primer enthielt die *BglIII* Restriktionsstelle und die jeweilige Mutation. Als 3'-PCR Primer wurde der Primer #1131 verwendet. Die zur 5'-Spleißstelle komplementäre Sequenz von Position +1 bis +11 ist unterstrichen dargestellt, wobei die Position +1 der U1 snRNA eine Basenpaarung mit dem Nukleotid an der Position +8 der 5'-Spleißstelle eingehen kann und die Position +11 das korrespondierende Nukleotid der Position -3 darstellt. Die Nomenklatur der Konstrukte definiert jeweils die Position der Punktmutation und das an dieser Stelle ausgetauschte Nukleotid bezogen auf die U1 snRNA Wildtyp Sequenz.

#1130 (U1 6A): 5'-CGAAGATCTCCATACTAACCTGGCAGGGGAGAT
 #1131 (3'-PCR Primer): 5'-ATCCTCGAGCCTCCACTGTAGGATTAAC
 #1132 (Δ U1 Adapter): 5'-GATCTCCCGGGCTGCAGGATATCCTCGAGTGCA
 #1133 (Δ U1 Adapter): 5'-CTCGAGGATATCCTGCAGCCCGGGA
 #1184 (U1 5G): 5'-CGAAGATCTCCATACGTACCTGGCAGGGGAGAT
 #1185 (U1 5A): 5'-CGAAGATCTCCATACATACCTGGCAGGGGAGAT
 #1204 (U1 6C): 5'-CGAAGATCTCCATACTCACCTGGCAGGGGAGAT
 #1207 (U1 9U10G11C): 5'-CGAAGATCTCCATACTTACTGCGCAGGGGAGAT
 #1220 (U16A Δ loop1): 5'-CGAAGATCTCCATACTAACCTGGCAGGGGAGATACCAACTAGTTGCTTCCT
 GGTTTTCCCAG
 #1222 (U1 3U4U10C11C): 5'-CGAAGATCTCATTTTTACCCCGCAGGGGAGAT
 #1230 (U1 5C10C11C): 5'-CGAAGATCTCCATACCTACCCCGCAGGGGAGAT
 #1559 (U1 cs14): 5'-CGAAGATCTCGTAATACTTACCTGGCAGGGGAGAT
 #1712 (U1 cs23): 5'-CGAAGATCTCCCTTAAGATACTTACCTGGAGCTCGCAGGGGAGAT

2.1.5.3 MS2-SR Fusionsproteine

Das Ausgangsplasmid pHISBIT-MS2-RS29G wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Brenton. Graveley (University of Connecticut, USA) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid SV-NLS-MS2-9G8 wurde durch Austausch des *XmaI-XhoI* Fragments aus SV SD4/SA7 ds pa gegen ein PCR-Fragment (Primer #1698/#1081, Template pHISBIT-MS2-9G8) konstruiert. Die Deletion der RS-Domäne (SV-NLS-MS2- Δ SR) erfolgte durch Substitution des *XmaI-XhoI* Fragments gegen ein *XmaI-XhoI* geschnittenes PCR-Fragment (Primer #1698/#1768, Template pHISBIT-MS2-RS29G). Durch Substitution des *BamHI-XhoI* Fragments gegen ein PCR-Fragment wurde die 9G8 RS-Domäne gegen die SRp40 RS-Domäne (Primer #1791/#1792, Template SV-NLS-MS2-9G8) bzw. gegen die SF2/ASF RS-Domäne (Primer #1795/#1796, Template SV-NLS-MS2-9G8) ausgetauscht.

#1081 (MS2-9G8): 5'-GGGCTCGAGTCAGTCCATTCTTTCAGGCCCGAGCTCAGTCAGGTAAGAAAGT
CC
#1698 (NLS-MS2): 5'-GATCCCGGGATGGGCCGCAAAAAACGCCGCAACGCCGGGCCCCACGGGGT
TTCATCAT
#1768 (MS2-ΔSR): 5'-TCTAGACTCGAGTCATCCACCACCACCACCGTA
#1791 (MS2-SRp40): 5'-GGTGGATCCAGCAAAAGGCAC
#1792 (MS2-SRp40): 5'-AGACTCGAGTTAATTGCCACT
#1795 (MS2-SF2): 5'-GGTGGATCCAGAAGTCCAAGTTATGGAAGATCTC
#1796 (MS2-SF2): 5'-AGACTCGAGTTATGTACGAGAGCGAGATCTGC

2.1.5.4 *env*-eGFP Konstrukte

Das Ausgangsplasmid pEF eGFP-Neo wurde freundlicherweise von PD Dr. Dirk Lindemann (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das *Bsr*GI-*Bam*HI Fragment des Vektors SV-*env*/GAR wurde gegen das *Bsr*GI-*Bg*III Fragment des Ausgangsplasmid pEF eGFP-Neo substituiert. Nachfolgend wurde das an diesem Zwischenklon amplifizierte PCR-Produkt (Primer#1848/#1849) *Bam*HI-*Xho*I geschnitten und in die *Bam*HI-*Xho*I geöffneten Vektoren SV-*env*/GAR SD4, SV-*env*/GAR 3U und SV-*env*/hiv#18 SD4 kloniert. Die resultierenden *env*-eGFP Konstrukte wurden sowohl für die Fluoreszenz Mikroskopie, als auch für die FACS Analysen verwendet.

#1848 (*env*-eGFP): 5'-GCAGGATCCGGAGGAGGAGGAGGAATGGCCCGATCTGTG
#1849 (*env*-eGFP): 5'-GCACTCGAGTTATTTGTACAGCTCGTCCAT

2.1.5.5 Plasmide zur Kotransfektion

SV*crev* wurde durch Austausch des *Eco*RI-*Xho*I Fragment aus pSVT7 gegen das *Eco*RI-*Xho*I Fragment aus pUH*crev* (342, 532) kloniert. Das Plasmid exprimiert die NL4-3 *rev*-cDNA Sequenz unter der Kontrolle des SV40 „early“ Promotors.

pGL3-control (Promega) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in den Immunoblot Analysen verwendet. Es exprimiert das *Luciferase* Gen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) unter der Kontrolle des SV40 „early“ Promotors.

pCMV63 wurde freundlicherweise von Jim Scott (University of Glasgow, Schottland) zur Verfügung gestellt. Es exprimiert das Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) Protein ICP27 unter der Kontrolle des Cytomegalie-Virus (CMV) Promotors.

pDsRed2 (Clontech) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in den FACS Analysen verwendet. Es exprimiert das rote Fluoreszenz Protein der Scheibenanemone (*Discosoma sp.*).

pXGH5 (545) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in RNA-Präparationen verwendet. Es exprimiert das menschliche Wachstumshormon (hGH, „human growth hormone“), welches normalerweise nur in den Zellen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert wird, unter der Kontrolle des Maus-Metallothionein-1 Promotors (mMT1).

pSVT7 (41) wurde bei Transfektionsexperimenten zur Protein-Analyse als Negativkontrolle und zum Ausgleich der DNA-Mengen verwendet.

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

2.1.5.6 Plasmide zur *in vitro* Transkription

pBSU1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. J. Kjems (University of Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt und diente nach Linearisierung mit *EcoRI* und *in vitro* Transkription mit T3-Polymerase unter Einbau von radioaktiv markiertem [α -³²P] UTP als „antisense“ U1 snRNA Sonde.

pBSU2b wurden freundlicherweise von Prof. Dr. J. Kjems (University of Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt und diente nach Linearisierung mit *BamHI* und *in vitro* Transkription mit T7-Polymerase unter Einbau von radioaktiv markiertem [α -³²P] UTP als „antisense“ U2 snRNA Sonde.

pUH3 Δ S/K entstand durch Deletion des *SauI/KpnI*-Fragments aus pUH3 und anschließender Ligation mit *Xenopus laevis* Ei-Extrakt (532). Nach Linearisierung mit *SalI* und *in vitro* Transkription und Digoxigeninmarkierung mit SP6-Polymerase entsteht eine 170 Nukleotide

lange „antisense“ RNA, welche komplementär zum ersten kodierenden *tat*-Exon von *SaII* bis *SauI* (Nukleotide 5785-5953) ist.

p73hGH enthält das *BglIII-XmaI*-Fragment aus dem Exon 5 des menschlichen Wachstumshormon (hGH) aus dem Plasmid pXGH5 (545) inseriert in pSP73 (Promega). Nach Linearisierung mit *BglIII* und anschließender *in vitro* Transkription und Digoxigeninmarkierung mit T7-Polymerase entsteht eine 180 Nukleotide lange „antisense“ RNA, die als hGH-spezifische Sonde genutzt wurde.

2.1.5.7 Plasmide zur SR-Protein Aufreinigung

Die für die Aufreinigung von rekombinantem SF2/ASF Protein eingesetzten Plasmide pDS56-6H-SF2 und pDS-H6F1-SF2 Δ RS wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Kjems (University of Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide besitzen N-terminal ein „Histidin-tag“. Das Plasmid pDS-H6F1-SF2 Δ RS besitzt eine Deletion der C-terminalen RS-Domäne.

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Restriktionsanalysen und Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning“ (523) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (19) entnommen.

2.2.1 Klonierung rekombinanter Plasmide

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“)

Die Amplifikation der für die Klonierungen benötigten DNA-Fragmente wurde in einem Volumen von 100 μ l mit 2,5 U Pwo-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 0,1 Volumen 10 x PCR-Puffer + MgSO₄ (Roche Molecular Biochemicals), je 330 μ M Desoxynukleosidtriphosphat (Perkin Elmer), je 0,5 μ M 3'- und 5'-Primer und 1 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Die PCR erfolgte in einem Robocycler Gradient 96 (Stratagene) (Denaturierung: 1 x 3 min 94°C; Amplifikation: 30 Zyklen mit 30 sek 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C; Extension: 1 x 10 min 72°C). Die PCR-Produkte wurden mit Phenol und

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, in 2,5 Vol EtOH und 1/10 Vol 4 M LiCl präzipitiert und in 32 µl Tris-EDTA (TE) resuspendiert.

2.2.1.2 Restriktion, Aufreinigung und Ligation von Plasmid-Fragmenten

Die Restriktion von PCR-Produkten oder der Plasmid-DNA erfolgte mit Enzymen der Firmen Roche, MBI Fermentas und New England Biolabs (NEB) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach den Protokollen der Hersteller. Die Reaktionsansätze wurden in einem 0,8% „Low melt Agarosegel“ (Biozym) mit TB1/10E als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Unter einer UV-Handlampe ($\lambda=320$ nm) wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und 10 min bei 65°C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen und die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Escherichia coli DH5 α F'IQ (Invitrogen) wurden auf Kanamycin-haltigem (25 µg Kanamycin/ml) LB-Agar (Luria Broth Base, Gibco BRL) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml Kanamycin-haltiges LB-Medium (25 µg Kanamycin/ml) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft, 1 h bei 37°C inkubiert, in eine 200 ml Kultur überführt und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 15 min mit 600 x g bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 80 ml TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂*4 H₂O, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂*2 H₂O, 15% Glycerin, auf pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, steril filtriert) resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 600 x g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 16 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, auf pH 6,8 mit NaOH eingestellt, autoklaviert) resuspendiert und in 50 µl Aliquots in einem Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.1.4 Transformation kompetenter *Escherichia coli*

Für die Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten *Escherichia coli* mit 5 µl eines Ligationsansatzes für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 sek Hitzeschock bei

42°C und anschließend kurzen Abkühlen auf Eis, wurde der Ansatz in 800 µl SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (220 r.p.m.) inkubiert. 400 µl der Bakteriensuspension wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Agar (Luria Broth Base, Gibco BRL) ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Analytische Präparation von Plasmid-DNA

Einzelkolonien wurden in 3 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C und 220 r.p.m. inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 1,5 ml der LB-Kultur nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse. Nach 1-minütiger Zentrifugation (12.000 x g) wurde das Pellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 300 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) versetzt, 5 min bei 20°C inkubiert und mit 300 µl Puffer 3 (3 M KAc; pH 5,5) neutralisiert. Nach 15 min Zentrifugation mit 12.000 x g bei 4°C wurde der Überstand nach Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol 30 min bei 12.000 x g gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert. Die Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente.

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

450 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium wurde mit einer *Escherichia coli* Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur (300 µl LB-Kultur, 700 µl Glycerin) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (220 r.p.m.) inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.800 x g wurde das Pellet in 30 ml Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 ml Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) erfolgte die Lyse der Zellen für 5 min bei 20°C. Das Lysat wurde mit 30 ml Puffer 3 (3 M KAc; pH 5,5) neutralisiert, 20 min bei 11.000 x g zentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell, 595½, Ø 150 mm) filtriert. Nach Präzipitation in 0,6 Vol. Isopropanol und Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA in 4,2 ml TE resuspendiert. Nach Zugabe von 4,2 g CsCl und 350 µl EtBr (10 mg/ml) erfolgte eine 16 h Ultrazentrifugation mit 32.0000 x g bei 20°C. Die Plasmid-DNA Bande wurde unter der UV-Handlampe ($\lambda=320$ nm) mit einer Kanüle (20G, 0,9 mm) isoliert, das EtBr mit H₂O-gesättigtem Butanol ausgeschüttelt und das CsCl durch 4 h Dialyse gegen „Low Tris-buffer“

(10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) entfernt. Nach LiCl/Ethanol Präzipitation und Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA in TE-Puffer (pH 8) resuspendiert.

Durch die Umstellung der Transfektionsmethode von einem Elektroporationsprotokoll zur Anwendung eines Transfektionsreagenz (FugeneTM6, Roche Molecular Biochemicals) ergab sich im Verlauf der experimentellen Arbeit ein geringerer Verbrauch an Plasmid-DNA. Dies führte zu einer Umstellung der CsCl-Präparation auf die Präparation über Anionen-Austauscher Säulen. Hierzu wurden 150 ml *Escherichia coli* Kultur über alkalische Lyse nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen Plasmid Maxi Kits) präpariert. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Pharmacia, Ultrospec II-4050) und auf 1 µg/µl eingestellt. Die Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA erfolgte durch Sequenzierung am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.3 Zellkultur

Die Expressionsstudien wurden in HeLa-T4⁺ Zellen unter nichtreplikativen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM („Dulbecco’s modified Eagles’s medium“) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Roche Molecular Biochemicals) und 100 µg/ml Geneticin (Invitrogen) in T175-Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Die Ablösung subkonfluenten Zell-Monolayer zur Passagierung oder zur Transfektion erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS_{def} („phosphate buffered saline deficient in Ca²⁺ and Mg²⁺“; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄*H₂O; 8,1 mM Na₂HPO₄*2H₂O; pH 7,4) durch Trypsinierung mit 2,5 ml ATV (0,025% (w/v) N-acetyliertes Trypsin; 0,05% (w/v) EDTA in PBS_{def}) für 10 min bei 37°C. Die Zellen wurden bis maximal zur 15. Passage in Kultur gehalten.

2.2.3.1 Transfektion mittels Elektroporation bzw. unter Verwendung des Transfektionsreagenz (FugeneTM6)

Nach Trypsinierung wurden die Zellen in 10 ml PBS_{def} aufgenommen und die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung (0,5% (w/v) Trypanblau in PBS_{def}) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die transiente Transfektion von 3×10^6 Zellen mittels Elektroporation erfolgte mit 25-40 µg Plasmid-DNA in 350 µl Ablöse-Medium

(„Eagle’s minimum essential medium“, supplementiert mit 10% FKS, 25 mM HEPES und 10 mM NaHCO₃). Die DNA-Menge in Kotransfektionsexperimenten wurde durch Zugabe von pSVT7-DNA konstant gehalten. Die Zellen wurden mit einem Puls von 550 V/cm und 960 µF (BioRad Gene Pulser mit Kapazitätserweiterung) behandelt und 5 min nach der Transfektion in Zellkulturflaschen überführt. Zur Analyse der RNA mittels Northernblot wurden je sechs gleiche Transfektionsansätze in einer T80-Flasche (Nunc) vereinigt und für 30 h in DMEM (supplementiert mit 10% FKS) bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Für Westernblot Analysen wurde ein Transfektionsansatz in eine T25-Flasche (Nunc) überführt, nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 h in DMEM (supplementiert mit 10% FKS) bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert.

Da die Transfektion mit dem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FugeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals) zu vergleichbaren Ergebnissen bei geringerem Materialverbrauch führte, wurde zu Beginn dieser Arbeit die Transfektionsmethode umgestellt. Für Northernblot Analysen wurden 3 x 10⁶ Zellen in T80-Flaschen (Nunc) für 24 h kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers in sechs gleichen Ansätzen mit je 3 bis 9 µg Plasmid-DNA unter Verwendung des 1,5-fachen Volumens an FugeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals) in DMEM mit einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Zellen wurden 30 h nach der Transfektion geerntet. Für Westernblot Analysen wurden in einer „6-well-Platte“ (Nunc) pro „well“ 3 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen ausplattiert und für 24 h kultiviert. Für die Transfektion wurden nach den Angaben des Herstellers 3 bis 9 µg Plasmid-DNA mit dem 1,5-fachen Volumen FuGENETM6 (Roche Molecular Biochemicals) ad 100 µl DMEM eingesetzt. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet.

2.2.4 Protein-Analysen mittels Immunoblot

2.2.4.1 Proteinpräparation aus HeLa-T4⁺ Zellen

HeLa-T4⁺ Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers in das Medium überführt, kurz zentrifugiert (14 sec, 12.000 x g), mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (14 sec, 12.000 x g) und in 500 µl PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 70 µl Aliquots zur Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration (2.2.4.2) und der Transfektionseffizienz (2.2.4.3) abgenommen. Der Zellaufschluss dieser Aliquots erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in einem Methanol/Trockeneis-Bad und Auftauen bei 37°C.

Nach Zentrifugation (1 min, 12.000 x g) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen 430 µl Zellsuspension wurden erneut zentrifugiert (1 min, 12.000 x g) und das Pellet in 200 µl „Treatment-Buffer“ (2% SDS; 65 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glycerin; 10% Dithiotreitol (DTT)) und 0,05 Volumen Gel-Ladepuffer (50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) resuspendiert und 10 min bei 95°C denaturiert.

2.2.4.2 Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration erfolgte nach der Bradford-Methode, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm bei Bindung von Proteinen beruht (55). Die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Probe in zwei Verdünnungen (1:20, 1:40) jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 50 µl verdünnten Zellextrakt und 200 µl Bradford-Reagenz (Protein-Assay, Bio-Rad, 1:5 verdünnt). Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte in Mikrotiterplatten (Nunc) in einem ELISA-Reader (SLT Labinstruments, SLT Rainbow) gegen einen Rinderserum-Albumin (BSA, „bovine serum albumin“) Standard von 0-20 µg Protein.

2.2.4.3 Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay

Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurden die für den Westernblot bestimmten Transfektionsansätze mit je 1 µg pGL3-control (Promega) kotransfiziert. Das von diesem Plasmid exprimierte Luciferase-Enzym des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) oxidiert das Substrat Luciferin in einer ATP- und Mg^{2+} -abhängigen Reaktion zu Oxiluciferin. Die dabei freiwerdende Biolumineszenz wurde in einem Luminometer (EG&G Berthold, Microlumat LB96P) in Form relativer Lichteinheiten (RLUs, „relative light units“) gemessen. Der durchgeführte Luciferase-Assay (Promega, Luciferase Assay System) erfolgte in Doppelbestimmung mit je 5 und 10 µl Zellextrakt in mit 20 µl Rinderserum-Albumin (BSA, 2 µg/µl) beschichteten Mikrotiterplatten (Nunc). Die Messung der Biolumineszenz erfolgte 2 sek nach der Substratzugabe über einen Zeitraum von 15 sec. Anhand der RLU-Werte erfolgte eine Normierung der Westernblot-Proben auf gleiche Transfektionseffizienzen.

2.2.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

2.2.4.5 Westernblot

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel erfolgte durch einen Elektroblot in Transferpuffer (200 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20% Methanol) für eine Stunde unter Durchflusskühlung bei 70 V auf eine PVDF-Membran (Millipore, Immobilon-P). Die Membran wurde für 15 min in Blockierungslösung (10% (w/v) Milchpulver; 0,1% Tween-20 in PBS) inkubiert. Die Erstantikörper Inkubation erfolgte für 1 h mit einem monoklonalen Maus-anti-gp120 Antikörper (87-133/026, Dade Behring, 1:5000 verdünnt in PBS mit 5% (w/v) Milchpulver, 0,1% Tween-20). Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBS erfolgte die Zweitantikörper Inkubation für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelten Schaf-anti-Maus-F(ab')₂-Fragmente Antikörper (NA9310, Amersham, 1:1000 verdünnt in PBS mit 10% (w/v) Milchpulver, 0,1% Tween-20) verwendet. Nach fünfmaligem Waschen für je 10 min in PBS erfolgte die Detektion über das ECL-System (Amersham) nach den Angaben des Herstellers und nachfolgender Film-Exposition (Amersham, ECL-Film) sowie Quantifizierung im Lumi-Imager F1 (Roche Molecular Biochemicals) mit der LumiAnalyst™ 3.1 Software.

2.2.5 RNA-Analysen mittels Northernblot

2.2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA

HeLa-T4⁺ Zellen wurden 30 h nach der Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers in das Medium überführt und für 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 5 ml RNA-clean (AGS, Heidelberg) unter Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform-

Isoamylalkohol (24:1) homogenisiert und die Zellsuspension zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 8.500 x g, 4°C). Die RNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt, pelletiert (20 min, 10.300 x g, 4°C), 2-mal mit je 2 ml 70% DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert.

Alternativ erfolgte die Gesamt-RNA Isolierung nach einem modifizierten Protokoll nach Chomczynski (105). Die pelletierten HeLa-T4⁺ Zellen einer T80-Flasche wurden in 3 ml Solution D (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Acetat pH 7; 0,5% N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 Volumen Na-Acetat (2 M; pH 4), 1 Volumen Phenol und 0,1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Es folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (20 min; 9200 x g; 4°C), worauf die wässrige RNA-haltige Phase mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei 4°C gefällt wurde. Nach Zentrifugation (20 min, 10.300 x g, 4°C) wurde die RNA zweimal mit je 2 ml 70% DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DMDC-ddH₂O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Pharmacia, Ultrospec II-4050).

2.2.5.2 Isolierung polyadenylierter RNA

Aus 100 µg Gesamt-RNA wurde die polyadenylierte RNA (poly(A)⁺ RNA) durch Hybridisierung an 2 mg Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (Dyna) und nachfolgende magnetische Separation nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Bindung der RNA an die Beads erfolgte in 200 µl Bindepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M LiCl; 1 mM EDTA). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA) wurde die poly(A)⁺-selektionierte RNA mit 20 µl Denaturierungs/Elutionspuffer (50% (v/v) Formamid; 2,15 M Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer, pH 7,0; 22,5% (v/v) DMDC-ddH₂O) bei 68°C für 2 min eluiert.

2.2.5.3 Northern Blot-Analyse

Die poly(A)⁺-selektionierte Gesamt-RNA wurde nach 15-minütiger Denaturierung bei 68°C und Zugabe von 1/10 Volumen Blaumarker in einem 1,2% Formaldehyd-Agarose-Gel mit 1 x MOPS-Puffer pH 7 (20 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; 8 mM NaAc; 1 mM

EDTA) als Laufpuffer bei 2-3 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel zur Entfernung des Formaldehyds für 15 min in dH₂O gespült und für 10 min in 20 x SSC (standard saline citrate: 3 M NaCl; 0,3 M tri-NaCitrat·2H₂O) äquilibriert. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Molecular Biochemicals) erfolgte durch 8-stündigen Kapillarblot mit 20 x SSC. Anschließend wurde die RNA durch UV-Quervernetzung mit 0,6 J/cm² (Biometra, Fluo-Link) auf der Membran immobilisiert. Die Membran wurde für 1 h bei 68°C in H-SDS Puffer (50% (v/v) Formamid; 5 x SSC; 50 mM Na-Phosphat, pH 7; 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 7% (w/v) SDS; 2% (w/v) Blocking Reagenz (Roche Molecular Biochemicals); 50 µg/ml Hefe-Gesamt-RNA) prähybridisiert und über Nacht mit Digoxigenin (DIG)-markierten antisense RNA-Sonden (siehe 2.2.5.4) hybridisiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Gelbeladung wurde eine Sonde komplementär zum Exon 5 des humanen Wachstumshormons (p73hGH) verwendet. Die HIV-spezifische RNA wurde durch Sonden komplementär zur 5'-Sequenz von *tat* (pUH3ΔS/K) nachgewiesen. Hybridisierte DIG-Sonden wurden nach Kopplung eines anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugates (50 mU/ml; Roche Molecular Biochemicals) mittels Chemilumineszenz (250 µM CDP-Star; Roche Molecular Biochemicals) gemäß Herstellerangaben nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wurde durch Film-Exposition detektiert (Amersham, ECL-Film). Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem LumiImager F1 (Roche) und die Normierung auf gleiche Transfektionseffizienzen über das hGH-Signal mit Hilfe der LumiAnalystTM3.1 Software.

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

Die Plasmide wurden in einem 30 µl Ansatz linearisiert, mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, in 4 M LiCl/Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 10 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert. Von dieser linearisierten Plasmid-DNA wurden Digoxigenin-markierte Sonden mit dem DIG RNA labeling Kit (Roche Molecular Biochemicals) gemäß Herstellerangaben transkribiert. Die 2-stündige *in vitro* Transkription erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit 20 U RNA-Polymerase (T7 oder SP6, Roche Molecular Biochemicals), 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (400 mM Tris pH 8, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin), 2 µl „10 x DIG-labeling-mix“ (10mM ATP, GTP, CTP, 6,5 mM UTP, 3,5mM DIG-11-UTP), 1 µl RNAsin (Promega; 20 U/µl) und 1 µg linearisierter Plasmid-DNA. Nach Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I (Ambion) und

15-minütiger Inkubation wurden die Transkripte mit NH_4OAc in 1 Vol Isopropanol präzipitiert, mit 70% DMDC-Ethanol gewaschen und in 50 μl DMDC- ddH_2O resuspendiert.

2.2.6 Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA)

2.2.6.1 Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem SF2/ASF über ein „Histidin-tag“

Eine 5 ml LB-Vorkultur (10 g Tryptophan, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) wurde mit pDS-H6F1-SF2 Δ RS bzw. pDS56-6H-SF2 transformierten *Escherichia coli* M15 (pREP4) angeimpft und 16 h bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde in 0,5 l 2 x YT-Medium (16 g Tryptophan, 10 g Yeast extract, 5 g NaCl ad 1 l, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) überführt und bis zu einer OD_{600} von 1,0 - 1,2 inkubiert. Nach IPTG-Induktion (1 mM IPTG-Endkonzentration) wurde die Kultur für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis, 15-minütiger Zentrifugation bei 7700 x g und 4°C, wurde das Pellet in 16 ml GuHCl (pH 8) resuspendiert. Nach 1 h langsamer Rotation bei 20°C wurde erneut für 15 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 0,5 ml Nickel-Agarose (Ni-NTA Superflow (25), Qiagen), welche zuvor mit SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 42 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 mM DTT; 0,2 mM EDTA; 15% Glycerin, 1 mM PMSF) gewaschen wurde, versetzt. Zur Komplexbildung der „Histidin-tags“ mit der Ni-Agarose erfolgte eine 45-minütige Rotation bei 20°C, woraufhin die Probe in eine Chromatographiesäule überführt und mit GuHCl-Puffer (100 mM Na-PO_4^{3-} ; 10 mM Tris; 6 M GuHCl; pH 8 eingestellt mit NaOH) gewaschen wurde. Nach weiteren Waschschritten mit GuHCL-Puffer pH 6.5 und 6.0 erfolgte die Elution mit GuHCl pH 5,0 in 0,5 ml Fraktionen. Zur Kontrolle der einzelnen Fraktionen wurde je 1 μl Proteinfraction (ad 20 μl ddH_2O + Gel-Ladepuffer) 3 min bei 95°C denaturiert und in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden über Coomassie Blue Färbung sichtbar gemacht. Die Dialyse der proteinhaltigen Fraktionen erfolgte schrittweise in 3 h von 6 M GuHCl auf 2 M GuHCl und über Nacht gegen SF2-Puffer bei 4°C. Nach abschließender Dialyse für 3 h gegen SF2-Puffer wurde das aufgereinigte SF2/ASF Protein aliquotiert und bei -20°C gelagert.

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

Die analysierten Konstrukte wurden 3'-wärts der zu untersuchenden Sequenz linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumen EtOH präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen und in TE resuspendiert. 1 µg der linearisierten DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 U T7 RNA-Polymerase (Ambion), 5 µl NTP-Mix (2 mM ATP, 2 mM CTP, 2 mM GTP, 0,2 mM UTP, Ambion), 40 µCi [α -³²P] UTP (37 MBq, 20 mCi/ml; 800 Ci/mmol, Amersham), 5 mM DTT, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Ambion) und 20 U RNasin (Promega) für 2 h bei 37°C *in vitro* transkribiert. Nach Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I (Ambion) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C, wurde die RNA nach Zugabe von 75 µl Präzipitationspuffer (0,3 M NaAc, 1 mM EDTA) in 2,5 Volumen EtOH bei -70°C gefällt, mit 70% EtOH gewaschen und in 20 µl TE resuspendiert. Die Transkripte wurden nach 3-minütiger Denaturierung bei 95°C in denaturierenden 6% Polyacrylamid-Gelen (8 M Harnstoff; 75 mM Tris-Borat; pH 8,3; 1,5 mM EDTA, National Diagnostics) bei 15 W (300 V) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Filmexposition wurden die Banden aus dem Gel herausgeschnitten, über Nacht in 300 µl Präzipitationspuffer (0,3 M NaAc, 1 mM EDTA) bei 4°C eluiert, Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert.

2.2.6.3 Native elektrophoretische Auftrennung der RNA/Protein-Komplexe

In 10 µl Reaktionsvolumen wurden jeweils ca. 1 µl der [³²P]-UTP markierten Transkripte (300 cps) mit 5 µl 2 x EMSA-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,9; 200 mM KCl; 4 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 2 mM DTT, 20% Glycerin; 100 ng/µl tRNA) mit ansteigenden Mengen an SF2ΔRS-Protein in SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,9, 42 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 15% Glycerin, 1 mM PMSF) für 15 min bei 20°C inkubiert. Die RNA/Protein-Komplexe wurden in einem nativen 5% TBE-Polyacrylamid-Gel (Proto-Gel Ultrapure, National Diagnostics) bei 4°C und maximal 5 W/300 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden vakuumgetrocknet und die Gel-Retardation durch Röntgen-Film (Hyperfilm-MPTM, Amersham) Exposition analysiert.

2.2.7 „Pull-down“ Analysen

2.2.7.1 Herstellung von biotinylierten *in vitro* Transkripten

Die analysierten Konstrukte wurden 3'-wärts der zu untersuchenden Sequenz linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumen EtOH präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen und in TE resuspendiert. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 3 µg der linearisierten DNA mit 10 U T7 RNA-Polymerase (Ambion), 7 µl NTP-Mix (7,5 mM ATP, 7,5 mM CTP, 7,5 mM GTP, 5,0 mM UTP, Ambion), 2,5 mM Biotin-16-UTP (Roche Molecular Biochemicals), 1 µl verdünntes [α -³²P] UTP (37 MBq, 20 mCi/ml; 800 Ci/mmol, Amersham) als „tracer“ zur Konzentrationsbestimmung, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Ambion) und 20 U RNasin (Promega) für 2 h bei 37°C *in vitro* transkribiert. Nach Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I (Ambion) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C, wurde die RNA nach Zugabe von 115 µl ddH₂O und 15 µl 5M NH₄OAc in 1 Vol Isopropanol für 15 min bei -20°C präzipitiert, mit 70% DMDC-Ethanol gewaschen und in 20 µl DMDC-ddH₂O resuspendiert.

2.2.7.2 Komplexbildung unter Spleißbedingungen

In einem 200 µl Gesamtvolumen wurden 10 µl biotinylierte RNA (300 cps) mit 70 µl HeLa-Kernextrakt (Cell culture center, Belgien; hergestellt nach einem Protokoll von Dignam et al. (151)), 10 mM ATP, 50 mM Creatinphosphat, 25 mM MgCl₂ und 30 µl Puffer D (100 mM KCl, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 20% Glycerin, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT) für 20 min bei 30°C inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden über Biotin/Streptavidin-Wechselwirkungen isoliert. Hierzu wurden 100 µl Streptavidin Dynabeads M-280 (10 mg/ml, Dynal) zunächst zweimal mit 1 ml NET2-Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,05% (v/v) Nonidet-P40, 0,5 mM DTT) gewaschen, mit 0,1 mg tRNA (*Escherichia coli* MRE600, Roche Molecular Biochemicals) und 0,05 mg BSA in 200 µl NET2-Puffer für 1 h bei 4°C blockiert und anschließend mit dem gesamten 200 µl *in vitro* Spleißreaktionsansatz für 1 h bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 1 ml Waschpuffer (500 mM KCl, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,05% (v/v) Nonidet-P40) erfolgte die Elution der gebundenen Komplexe in 300 µl Denaturierungspuffer (4 M Harnstoff, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% SDS, 10 mM EDTA, 0,3 M NaCl) für 5 min bei 37°C. Der Überstand wurde nach Phenol/Chloroform Extraktion und EtOH Präzipitation in RNA Gel-Ladepuffer (80% Formamid, 0,25%

Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) aufgenommen, für 30 sek bei 95°C denaturiert und in 8% denaturierenden Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Transfer auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Molecular Biochemicals) erfolgte über einen Elektroblot (Trans Blot Cell, Bio-Rad) in 0,5 x TBE für 1 h bei 20 V und anschließenden für 2 h bei 50 V (10 W). Die RNA wurde durch UV-Quervernetzung mit 0,6 J/cm² (Biometra, Fluo-Link) auf der Membran immobilisiert. Die Detektion der gebundenen U1 und U2 snRNA erfolgt über [³²P]-markierte „antisense“ RNA-Sonden (siehe 2.2.7.3). Alternativ wurden zur Analyse der gebundenen Proteine die Streptavidin Dynabeads (Dyna) mit WB300-Puffer (10 mM Tris, pH 7,6, 300 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 mM KF, 5 mM β-Glycerophosphat) gewaschen, in Gel-Ladepuffer (50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) aufgenommen, 10 min bei 95°C denaturiert und in 10% Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von SR-Proteinen erfolgte unter Verwendung des mAB104 Antikörpers (mAB104) (517).

2.2.7.3 *In vitro* Transkription von [³²P]-markierten „antisense“ RNA-Sonden

Zur Herstellung von U1 und U2 snRNA spezifischen, [³²P]-markierten „antisense“ RNA-Sonden wurde das Plasmid pBSU1 *Eco*RI linearisiert und mit T3 RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und das Plasmid pBSU2b *Bam*HI linearisiert und mit T7 RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert (333). Die *in vitro* Transkription von 2 µg linearisierter DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 20 U RNA-Polymerase (T3 oder T7, Ambion), 5 µl NTP-Mix (5 mM ATP, 5 mM CTP, 5 mM GTP, 0,05 mM UTP), 1,5 µl [α -³²P] UTP (37 MBq, 20 mCi/ml; 800 Ci/mmol, Amersham), 5 µl 10 x Transkriptionspuffer (Ambion), 5 mM DTT und 20 U RNasin (Promega) für 2 h bei 37°C. Nach Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I (Ambion) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C, wurde die RNA nach Zugabe von 75 µl Präzipitationspuffer (0,3 M NaAc, 1 mM EDTA) in 2,5 Volumen EtOH bei -70°C gefällt, mit 70% EtOH gewaschen und in 20 µl TE resuspendiert. Die Transkripte wurden nach 3-minütiger Denaturierung bei 95°C in denaturierenden 6% Polyacrylamid-Gelen (8 M Harnstoff; 75 mM Tris-Borat; pH 8,3; 1,5 mM EDTA, National Diagnostics) bei 15 W (300 V) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Filmexposition wurden die Banden aus dem Gel herausgeschnitten, über Nacht in 300 µl Präzipitationspuffer (0,3 M NaAc, 1 mM EDTA) bei 4°C eluiert, Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert. Die Membran wurde zunächst für 10 min bei 43°C mit 2 mg tRNA (*Escherichia coli* MRE600, Roche Molecular Biochemicals) in 20 ml Hybridisierungslösung (50% (v/v) Formamid, 0,12 M NaHPO₄, 0,25 M NaCl, 4,2% (v/v) SDS) blockiert und anschließend über Nacht mit 1000

cps der U1 snRNA Sonde und 2000 cps der U2 snRNA Sonde in 20 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Nach Waschen der Membran mit 75 ml 2 x SSC, 0,1 % SDS, erneutem Waschen mit 75 ml 0,5 x SSC, 0,1% SDS und abschließendem Waschen mit 75 ml 0,1 x SSC, 0,1% SDS für jeweils 15 min bei 20°C wurde die U snRNA Bindung durch Röntgen-Film (Hyperfilm-MPTM, Amersham) Exposition analysiert.

3 Ergebnisse

Der Eintritt des HIV-1 Genoms in die Wirtszelle wird durch die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle ermöglicht. Die Fusion dieser Membranen wird durch das von dem *env* Gen kodierte HIV-1 Glykoprotein induziert. Das virale Envelope Protein ist somit für die Infektiosität und Pathogenität von HIV-1 von entscheidender Bedeutung. Der Versuch einer Immunisierung war bisher jedoch nicht erfolgreich, da aufgrund der hohen Variabilität des viralen Hüllproteins die dauerhafte Erkennung immundominanter Epitope durch neutralisierende Antikörper nicht möglich zu sein scheint. Eine Immunantwort des Wirtes wird zusätzlich durch das komplexe Glykosylierungsmuster des Envelope Proteins erschwert.

Für die Expression des Glykoproteins ist die Funktion von Rev, den nukleären Export der nicht gespleißten *env*-mRNA zu vermitteln, essentiell. Eine Abhängigkeit der Rev-vermittelten *env*-Expression von der Gegenwart einer funktionellen 5'-Spleißstelle wurde bereits in der Literatur beschrieben (383). Dies lässt die Existenz von weiteren *cis*-wirkenden Sequenzelementen auf der Ebene der HIV-1 prä-mRNA vermuten, deren Mutation zu einer Inhibition der Expression des viralen Envelope Proteins führen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen für die *env*-Expression in transienten Transfektionsexperimenten mit subgenomischen *env*-Expressionsvektoren in der Zellkultur untersucht.

3.1 Der Einfluss der Spleißdonorsequenz auf die Rev-vermittelte *env*-Expression

Einen Ausgangspunkt für die nachfolgenden Experimente stellte die Beobachtung von Lu et al. dar (383), der zufolge eine Mutation in der Position +5 des HIV-1 Spleißdonors 4 (SD4) die *env*-Expression verhinderte. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass sich die Expression des Glykoproteins durch Kotransfektion einer Suppressor U1 snRNA, welche eine kompensatorische Mutation in dem korrespondierenden Nukleotid der U1 snRNA enthielt, wiederherstellen ließ.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutationsanalyse systematisch fortgeführt, um die Voraussetzungen für die Stabilisierung der Glykoprotein mRNA näher charakterisieren zu können. Aus diesen Ergebnissen wurde ein allgemein anwendbarer

Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA Bindestellen entwickelt (<http://www.splicefinder.net/>). Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in Fachzeitschriften publiziert (196, 302) oder auf Tagungen vorgestellt (s. Abschnitt Publikationen).

3.1.1 Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA als Voraussetzung für die *env*-Expression

Um die Funktion der 5'-Spleißstelle auf die Rev-abhängige *env*-Expression zu untersuchen, wurden Mutationen innerhalb der Spleißdonor 4 Sequenz in den *env*-Expressionsvektor SV E/X *tat*⁻ *rev*⁻ eingeführt. Der verwendete *env*-Expressionsvektor SV E/X *tat*⁻ *rev*⁻ enthält das subgenomische *EcoRI-XhoI* Fragment aus pNLA1, einem cDNA Derivat des HIV-1 Isolats NL4-3 (594), flankiert von einem SV40 „early“ Promotor und einer SV40-Polyadenylierungsstelle (Abb. 5). Das subgenomische *EcoRI-XhoI* Fragment entspricht der 3'-Hälfte des HIV-1 Genoms, welches die kodierenden Sequenzen für *tat*, *rev*, *vpu* und *env* beinhaltet, wobei die Leserahmen für *tat* und *rev* durch Punktmutationen in ihren Translationsstartcodons inaktiviert wurden. Die Mutation des *tat* AUGs (*tat*⁻) wurde eingeführt, um eine Inhibition der 3'-wärts liegenden Startcodons der Gene *vpu* und *env* durch das starke *tat* AUG auf translatorischer Ebene auszuschließen (538). Die Mutation des *rev* Startcodons (*rev*⁻) erfolgte, um eine variable *rev*-Expression als Ursache für eine unterschiedliche *env*-Expression ausschließen zu können. Gleiche Mengen an Rev wurden durch Kotransfektion eines *rev*-Expressionsplasmids (SVcrev) gewährleistet. Alle Transfektionsexperimente wurden in HeLa-T4⁺ Zellen unter nicht-replikativen Bedingungen durchgeführt.

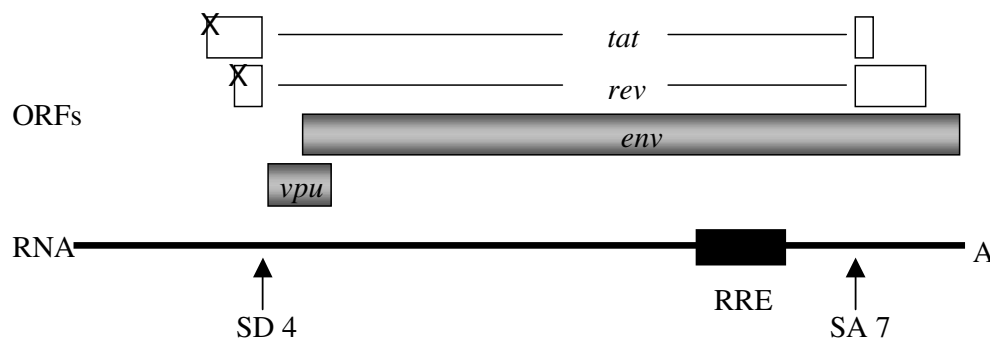


Abb. 5: Schematische Darstellung des verwendeten *env*-Expressionsvektors SV E/X *tat*⁻ *rev*⁻. Das für *env* kodierende *tat/rev* Intron wird von den Spleißstellen SD4 und SA7 flankiert. Die Zielstruktur des Rev Proteins, das RRE, ist innerhalb des *tat/rev* Introns lokalisiert. Die Translationsstartcodons der Gene *tat* und *rev* wurden durch Punktmutationen inaktiviert (X).

Um zu untersuchen, wie viele benachbarte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle notwendig sind, um eine *env*-Expression nachweisen zu können, wurde das parentale Konstrukt mit der authentischen SD4 Sequenz mit zwei weiteren Konstrukten, welche Fehlbasenpaarungen innerhalb der Spleißdonorsequenz an den Positionen +7 (7C) und an den Positionen +6/+7 (6A7C) enthielten, verglichen (Abb. 6). Durch die Mutationen innerhalb der 5'-Spleißstelle wird die Anzahl an komplementären Basen zu der U1 snRNA von 7 Basenpaarungen (SD4) auf 6 (7C) bzw. 5 (6A7C) herabgesetzt, was mit einer Verringerung der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen von 16 (SD4) auf 14 (7C) bzw. 12 (6A7C) Wasserstoffbrücken einhergeht. Zusätzlich wurde ein Konstrukt untersucht, welches Mutationen an den Positionen -1 und +8 (-1G8U) der Spleißdonorsequenz enthält und zu einer erhöhten Komplementarität von 9 Basenpaarungen unter Ausbildung von 21 Wasserstoffbrückenbindungen mit der U1 snRNA führt.

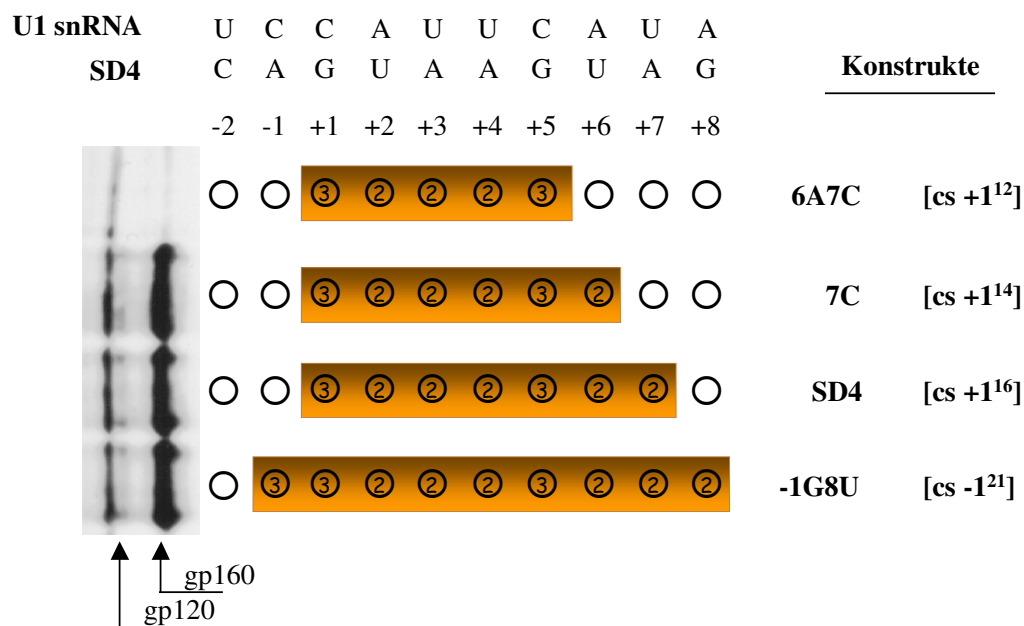


Abb. 6: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 µg der *env*-Expressionsvektoren, welche Mutationen der *tat/rev* 5'-Spleißstelle enthielten (rechts). Die Nomenklatur der Konstrukte definiert jeweils die Position der Punktmutation und das an dieser Stelle substituierte Nukleotid, bezogen auf die Ausgangssequenz der 5'-Spleißstelle SD4. Das erste Nukleotid des Intron wird dabei als +1 bezeichnet. Die „cs“ Nomenklatur bezeichnet einen zusammenhängenden U1 komplementären Bereich („continuous stretch“, cs), bei dem die Basis den Beginn des komplementären Bereiches und der Exponent die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA angibt. In dem mittleren Teil der Abbildung sind die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA an den jeweiligen Positionen dargestellt. Um gleiche Mengen an Rev Protein zu gewährleisten, wurde jeweils 1 µg des *rev*-Expressionsplasmids SV $_{crev}$ kotransfiziert. Die Normierung auf gleiche Transfektionseffizienzen erfolgte durch Kotransfektion von 1 µg pGL3-control, welches das Luciferase Enzym des Gluhwürmchens *Photinus pyralis* exprimiert. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des Transfektionreagenz FugeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals). Die Detektion des Glykoproteins erfolgte mittels eines monoklonalen Maus-anti-gp120 Antikörpers (87-133/026, Dade Behring).

Hierzu wurden HeLa-T4⁺ Zellen mit dem Ausgangskonstrukt und den beschriebenen Mutationen der 5'-Spleißstelle transient transfiziert. Da die *env*-mRNA nur in Anwesenheit von Rev effizient in das Cytoplasma exportiert wird, wurde das *rev*-Expressionsplasmid SV crev kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und anschließend die *env*-Expression im Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die *env*-Expression sowohl des Konstruktes mit erhöhter Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen (-1G8U), als auch des Konstruktes mit 14 Wasserstoffbrückenbindungen (7C) nicht von dem parentalen Ausgangskonstrukt (SD4) unterschieden. Hingegen ließ sich für das Konstrukt, welches nur noch 12 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA ausbilden konnte (6A7C), keine Glykoprotein Expression mehr nachweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass mindestens 6 benachbarte Basenpaarungen bzw. mehr als 12 benachbarte Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA notwendig waren, um Env Protein in der Immunoblot Analyse nachweisen zu können.

3.1.2 Eine Basenpaarung zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle ist an den Positionen -3 bis +8 möglich

Hieraus ergab sich die Frage, ob nur die Anzahl der Basenpaarungen, bzw. der Wasserstoffbrückenbindungen, die *env*-Expression beeinflusst oder auch deren Position innerhalb der Spleißdonorsequenz. Hierzu wurden zusätzliche Mutationen der 5'-Spleißstelle konstruiert, bei denen ein zusammenhängender komplementärer Bereich („continuous stretch“, cs) aus 6 Basenpaarungen unter Ausbildung von 14 bis 16 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA 5'-wärts verschoben wurde. Die Transfektionsexperimente der Konstrukte zeigten, dass die Positionen -2 und -3 der Spleißdonorsequenz in der Lage waren Fehlbasenpaarungen an den Positionen +5 und +6 auszugleichen (Abb. 7, vgl. cs+1¹⁴, cs-2¹⁴ und cs-3¹⁵), was für eine Beteiligung dieser Positionen an der U1 snRNA Bindung spricht. Im Gegensatz dazu, schien die Position -4 der Spleißdonorsequenz nicht mehr an der U1 snRNA Bindung mitzuwirken, da sich keine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse detektieren ließ (Abb. 7, cs-4¹⁶). Um zu überprüfen, ob in dem Konstrukt cs-4¹⁶ somit effektiv nur 13 Wasserstoffbrückenbindungen an der U1 snRNA Bindung beteiligt waren, wurde eine Fehlbasenpaarung an der Position -4 der 5'-Spleißstelle eingeführt. Da dieses Konstrukt ebenfalls zu keiner detektierbaren Glykoprotein Expression führte (Abb. 7, cs-3¹³), wurden 13 Wasserstoffbrückenbindungen

zu der U1 snRNA als nicht ausreichend betrachtet. Dies wurde durch die wiederhergestellte *env*-Expression eines zu *cs-4*¹⁶ vergleichbaren Konstruktes bestätigt, welches nur eine zusätzliche Basenpaarung an der Position +3 besaß (Abb. 7, *cs-4*¹⁸).

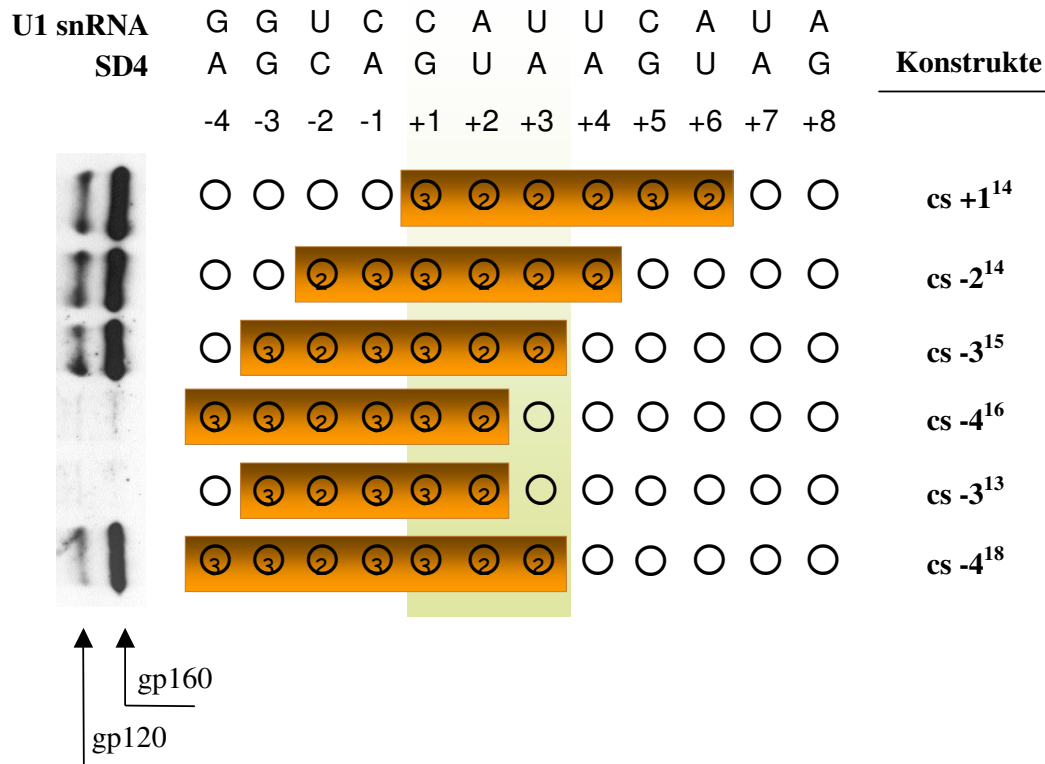


Abb. 7: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 µg des *env*-Expressionsvektors, 1 µg SVcrev und 1µg pGL3-control. Die „cs“ Nomenklatur bezeichnet einen zusammenhängenden U1 komplementären Bereich („continuous stretch“, cs), bei dem die Basis den Beginn des komplementären Bereiches und der Exponent die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA angibt. In dem mittleren Teil der Abbildung sind die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA an den jeweiligen Positionen dargestellt. Der markierte Bereich weist darauf hin, dass zwei funktionelle 5'-Spleißstellen nicht mehr als drei gemeinsame Nukleotide (Position +1 bis +3) aufweisen müssen. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des Transfektionreagenz FugeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals). Die Detektion des Glykoproteins erfolgte mittels eines monoklonalen Maus-anti-gp120 Antikörpers (87-133/026, Dade Behring).

Die Abb. 8 zeigt die Basenpaarung der U1 snRNA mit der Spleißdonorsequenz und stellt die zu der Position -4 komplementäre Base der U1 snRNA innerhalb einer „stem“-Sekundärstruktur dar, was die fehlende Beteiligung dieser Position, an einer Basenpaarung mit der 5'-Spleißstelle mitzuwirken, nochmals verdeutlicht.

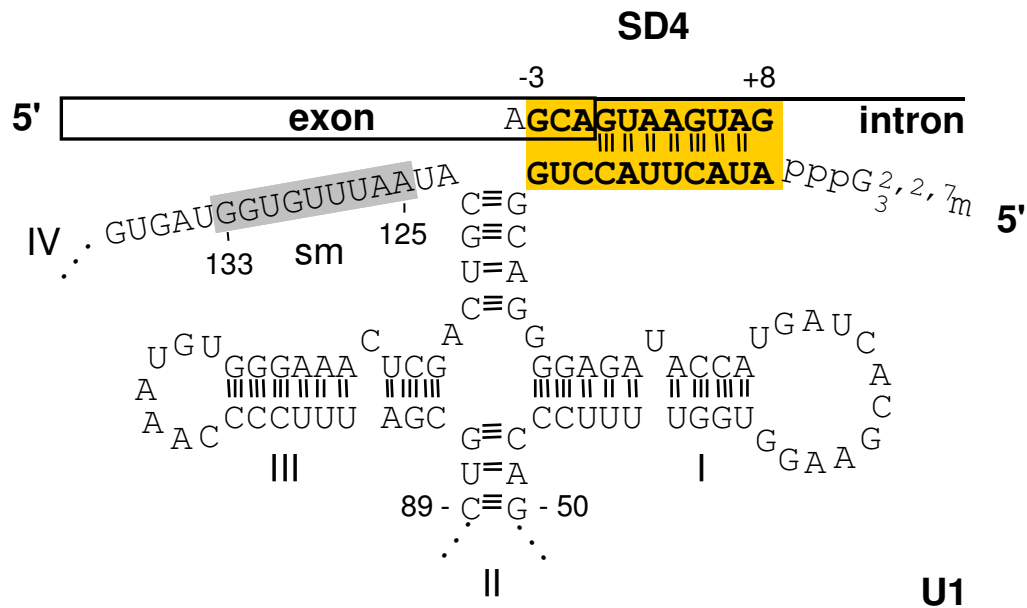


Abb. 8: Schematische Darstellung der RNA-Duplex Formation zwischen der 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA (modifiziert nach (56)).

Des weiteren wurde für die beschriebenen Mutationen in unserem Labor (302) auch die poly(A)⁺ RNA aus transient transfizierten HeLa-T4⁺ Zellen isoliert und im Northernblot analysiert. Es zeigte sich, in Analogie zu Abb. 7, dass nur für Konstrukte die effektiv mindestens 14 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden konnten (cs+1¹⁴, cs-2¹⁴, cs-3¹⁵ und cs-4¹⁸) sich polyadenylierte RNA im Northernblot nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). Die Nachweisbarkeit der RNA war dabei unabhängig von der Ab- bzw. Anwesenheit von Rev, da sowohl die gespleißte RNA (in Abwesenheit von Rev), als auch die ungespleißte, für *env*-kodierende, RNA (in Anwesenheit von Rev) bei unzureichender Komplementarität zu der U1 snRNA nicht mehr detektierbar war (302).

Zusammenfassend waren somit in diesem experimentellen System mindestens 6 benachbarte, zu der U1 snRNA komplementäre, Basen bzw. die Ausbildung von mindestens 14 benachbarten Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Spleißdonorsequenz von Position -3 bis +8 notwendig, um die Glykoprotein RNA ausreichend zu stabilisieren und somit eine *env*-Expression zu erzielen.

3.1.3 Zentrale Fehlbasenpaarungen innerhalb der zu der U1 snRNA komplementären SD4 Sequenz können durch zusätzliche Basenpaarungen kompensiert werden

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, inwieweit sich zentrale Fehlbasenpaarungen innerhalb eines ausreichend zu der U1 snRNA komplementären Bereiches der Spleißdonorsequenz auf die *env*-Expression auswirken können. Hierzu wurde zunächst eine Fehlbasenpaarung an die Position +3 der Spleißdonorsequenz eingeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass in diesem Fall eine *env*-Expression nicht mehr möglich war, obwohl in der Summe immer noch die vorher bestimmte, minimale Anzahl an 14 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden konnte (Abb. 9, 3U). Somit musste im Falle eines nicht zusammenhängenden Bereiches an komplementären Basen eine höhere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zur *env*-Expression notwendig sein. Um dies näher untersuchen zu können, wurden zusätzliche Punktmutationen in die Spleißdonor 4 Sequenz eingeführt, welche entweder eine zusätzliche Basenpaarung an der Position +8 (3U8U), an der Position -1 (-1G3U), oder an beiden Positionen erlaubten (-1G3U8U). Die Ergebnisse der Immunoblot Analyse zeigten, dass eine Erhöhung der Komplementarität 3'-wärts der Fehlbasenpaarung nicht ausreichte, um die *env*-Expression wieder herzustellen (Abb. 9, 3U8U). Hingegen führte sowohl die Erhöhung der Komplementarität 5'-wärts der Fehlbasenpaarung, als auch auf beiden Seiten der Fehlbasenpaarung wieder zur Expression des Glykoproteins (Abb. 9, -1G3U und -1G3U8U). Die Ergebnisse machten deutlich, dass auf beiden Seiten, 5'- und 3'-wärts der Fehlbasenpaarung, eine bestimmte Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zur *env*-Expression notwendig war.

Um zu beweisen, dass die Korrelation zwischen der Anzahl ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen und der *env*-Expression tatsächlich auf der RNA-Duplex Formation zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA beruhte, wurden die Transfektionsexperimente mit einer veränderten Suppressor U1 snRNA wiederholt, welche komplementär zu der Fehlbasenpaarung innerhalb der Spleißdonorsequenz war. Es zeigte sich erwartungsgemäß für alle 3U Mutationen eine Zunahme der *env*-Expression unter Verwendung der Suppressor U1 snRNA. Des weiteren ließ sich für die beiden Mutationen, welche nur fünf Wasserstoffbrückenbindungen 5'-wärts der Fehlbasenpaarung ausbilden konnten, jedoch eine unterschiedliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen 3'-wärts des „mismatches“ aufwiesen, eine erhöhte *env*-Expression bei dem Konstrukt mit einer insgesamt höheren Anzahl an potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen nachweisen (Abb. 9, vgl. 3U und 3U8U unter Kotransfektion mit 6A U1). Bei den beiden anderen Konstrukten konnte hingegen mit jeweils acht möglichen Wasserstoffbrückenbindungen 5'-wärts der

Fehlbasenpaarung keine Korrelation mehr zwischen der Gesamtzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und der *env*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9, vgl. -1G3U und -1G3U8U). Diese Ergebnisse machten deutlich, dass eine maximale *env*-Expression bereits durch eine nicht maximale Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen erreicht werden konnte, was die Ergebnisse aus Abb. 6 nochmals bestätigte (vgl. Abb. 6, *cs+1*¹⁴, *cs+1*¹⁶ und *cs+1*²¹ und Abb. 9, -1G3U und -1G3U8U unter Kotransfektion mit 6A U1). Somit war die Beteiligung eines einzelnen Nukleotids, wie z.B. der Position +8, an der RNA-Duplex Formation nur dann entscheidend, wenn das Wasserstoffbrückenbindungsmuster suboptimal war.

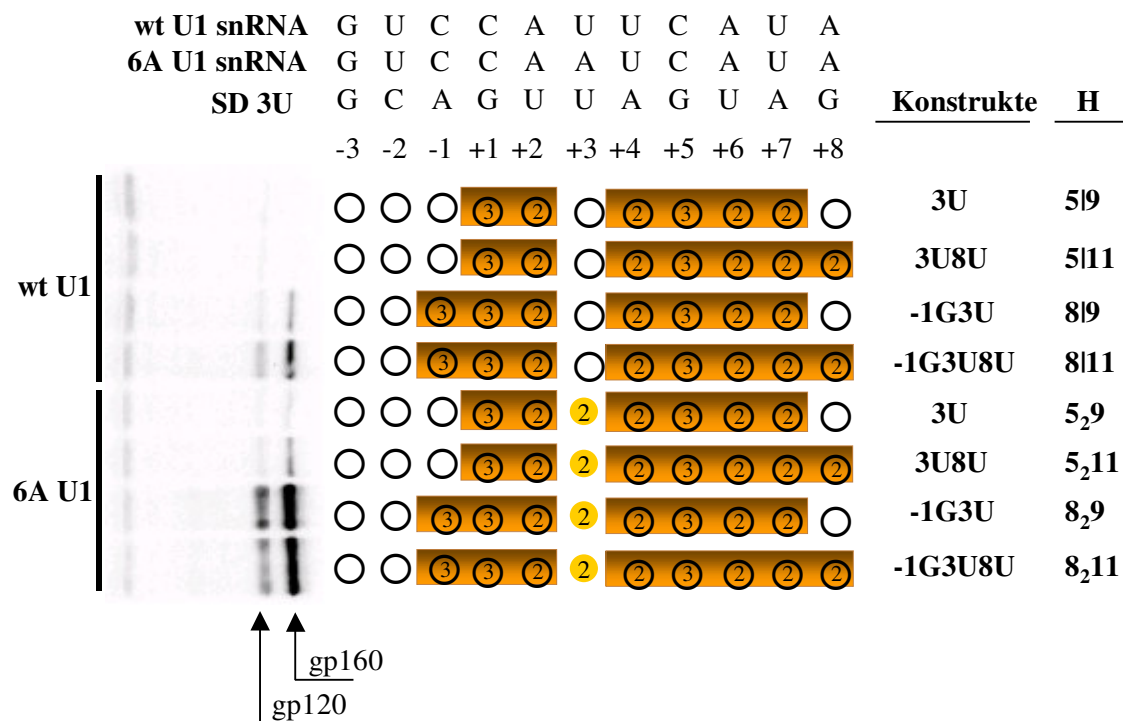


Abb. 9: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μ g des *env*-Expressionsvektors, 1 μ g SVcrev, 1 μ g pGL3-control und 1 μ g pUCBU1. Die Sequenz der Wildtyp U1 snRNA (wt U1), welche in den oberen vier Analysen verwendet wurde, sowie die Sequenz der kompensatorischen U1 snRNA (6A U1), welche in den unteren vier Analysen eingesetzt wurde, ist in dem oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Nomenklatur der Konstrukte definiert jeweils die Position der Punktmutation und das an dieser Stelle substituierte Nukleotid, bezogen auf die Ausgangssequenz. In dem mittleren Teil der Abbildung sind die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA an den jeweiligen Positionen dargestellt. Die zusätzlichen, durch Verwendung der kompensatorischen U1 snRNA möglichen, Wasserstoffbrückenbindungen sind gelb (Mitte) bzw. als tiefgestellte Zahl (H) dargestellt. Der Balken symbolisiert eine Fehlbasenpaarung an der betreffenden Position (H). Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des Transfektionreagens FugeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals). Die Detektion des Glykoproteins erfolgte mittels eines monoklonalen Maus-anti-gp120 Antikörpers (87-133/026, Dade Behring).

Die Konstrukte wurden in unserem Labor auch im Northernblot analysiert (302), wobei sich auch hier, in Korrelation zu Abb. 9, nur gespleißte (in Abwesenheit von Rev) bzw. ungespleißte RNA (in Anwesenheit von Rev) nachweisen ließ, wenn eine ausreichende Komplementarität zu der U1 snRNA vorlag (-1G3U und -1G3U8U) (302). Somit beeinflussten die Mutationen der 5'-Spleißstelle SD4 gleichermaßen die Menge an gespleißter und ungespleißter poly(A)⁺ RNA, was nahe legte, dass die Stabilisierung der prä-mRNA durch die U1 snRNA unabhängig von der eigentlichen Spleißreaktion erfolgte.

Die Mutationsanalyse wurde in unserem Labor auch für Fehlbasenpaarungen an den Positionen +4 und +5 der Spleißdonorsequenz fortgeführt, wobei sich auch für diese Positionen zeigte, dass sie sich durch zusätzliche Basenpaarungen 5'- und 3'-wärts des „mismatches“ kompensieren ließen (302). Genauere Analysen zeigten, dass bei einer zentralen Fehlbasenpaarung die Gesamtanzahl von 15 Wasserstoffbrückenbindungen nicht unterschritten werden darf, und dass zusätzlich mindestens sechs H-Brücken 5'-wärts und mindestens fünf H-Brücken 3'-wärts des „mismatches“ zu der U1 snRNA ausgebildet werden müssen, um eine 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression zu erzielen (196, 302).

3.1.4 Die Bindung des U1 snRNPs wird *in vitro* durch zentrale Fehlbasenpaarungen innerhalb der zu der U1 snRNA komplementären 5'-Spleißstellen Sequenz verhindert

Aus den bisherigen Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, dass die Ausbildung eines RNA-Duplex zwischen der HIV-1 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA die intrinsisch instabile HIV-1 *env* prä-mRNA vor Degradation schützt. Um zu prüfen, inwieweit die Mutationen innerhalb der Spleißdonorsequenz auch einen Einfluss auf die Bindung des U1 snRNPs *in vitro* ausüben, wurden „pull-down assays“ durchgeführt. Hierzu wurden von dem Ausgangskonstrukt SV E/X tat⁻ rev⁻ SD4 und drei weiteren Konstrukten mit Mutationen innerhalb der Spleißdonorsequenz (4C8U, 3U und SD4⁻) biotinylierte *in vitro* Transkripte hergestellt, welche die 5'-wärts des Spleißdonors gelegene Sequenz, die 5'-Spleißstelle und einen kurzen Anteil der Intronsequenz beinhalteten. Die Transkripte wurden in Gegenwart von HeLa Kernextrakt inkubiert und die gebildeten Komplexe über Streptavidin Bindungen (Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna)) isoliert. Anschließend wurde die RNA aus den Komplexen extrahiert und mit Hilfe einer U1 spezifischen „antisense“-Sonde im Northernblot detektiert. Es ließ sich nur mit der authentischen 5'-Spleißstelle SD4 eine

signifikante Menge an U1 snRNA Bindung nachweisen, wohingegen alle untersuchten Mutationen, auch wenn sie nur eine einzige Fehlbasenpaarung enthielten, keine vergleichbaren Mengen an gebundener U1 snRNA zeigten (Abb. 10A). Diese Ergebnisse bestätigten die vorherigen *in vivo* Beobachtungen, dass im Falle einer zentralen Fehlbasenpaarung mehr als 14 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA ausgebildet werden müssen, um eine Stabilisierung der *env* prä-mRNA zu erzielen. Die nur schwer nachweisbare U1 snRNA Bindung an das Konstrukt mit der intermediären Mutation 4C8U, welches geringe Mengen an Glykoprotein in der Immunoblot Analyse zeigte (Abb. 10B), waren wahrscheinlich auf Sensitivitätsunterschiede zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Experimenten zurückzuführen. Bemerkenswert war weiterhin, dass die U2 snRNP Bindung, welche als Kontrolle diente, unabhängig von der U1 snRNP Bindung stattfinden konnte (Abb. 10A).

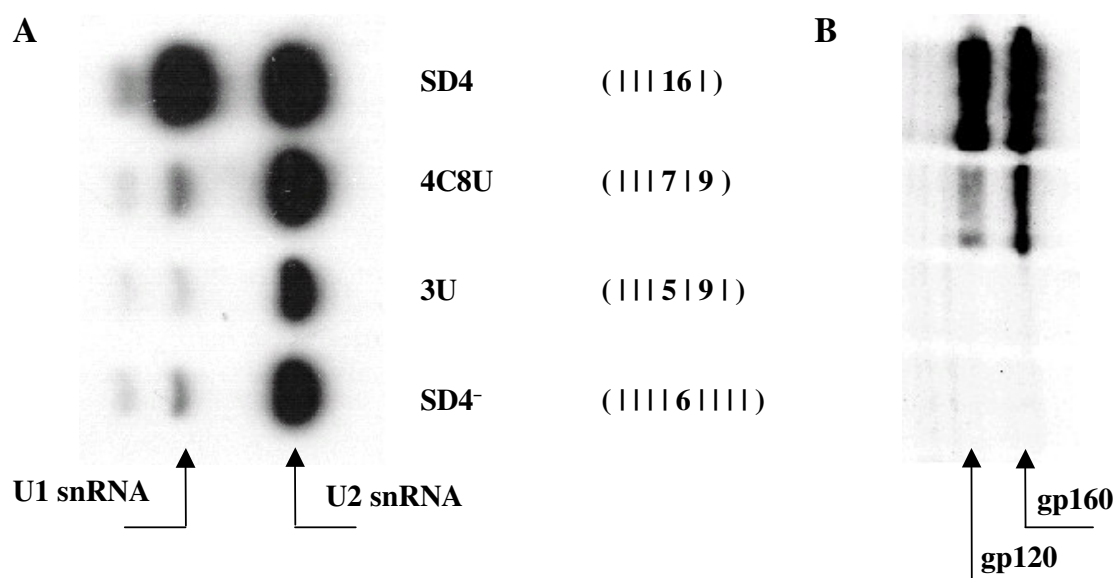


Abb. 10: (A) Northernblot Analyse der *in vitro* U1 snRNA Bindung an verschiedene Mutationen der 5'-Spleißstelle SD4. Von dem Ausgangskonstrukt SV E/X tat⁻ rev⁻ SD4 und drei weiteren Konstrukten mit verschiedenen Mutationen der Spleißdonorsequenz (4C8U, 3U und SD4⁻) wurden biotinylierte *in vitro* Transkripte hergestellt, welche die 5'-wärts des Spleißdonors gelegene Sequenz, die 5' Spleißstelle und einen kurzen Anteil der Intronsequenz enthielten. Die Transkripte wurden in Gegenwart von HeLa Kernextrakt inkubiert und die gebildeten Komplexe über Streptavidin Bindungen (Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna)) isoliert. Die RNA wurde aus den Komplexen extrahiert und mit Hilfe von U1 bzw. U2 spezifischen, [³²P] UTP markierten „antisense“-Sonden im Northernblot detektiert. Die Wasserstoffbrückenbindungsmuster (Mitte) sind als Summen der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt, wobei Fehlbasenpaarungen durch einen Balken dargestellt sind. (B) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins der im Northernblot (A) untersuchten Konstrukte. 3 x 10⁵ HeLa-T4+ Zellen wurden unter Verwendung von FuGeneTM 6 mit 1 µg des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 µg SVcrev und 1 µg pGL3-control transient transfiziert. Die Präparation der Proteine erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Proben wurden auf gleiche Transfektionseffizienzen und gleiche Proteinmengen normiert und in einem 7% PAA-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit Hilfe eines anti-gp120 Erstantikörper (Behring) und eines POD-gekoppelten Zweitantikörper (Amersham) über einen Biolumineszenznachweis (ECL-System, Amersham).

3.1.5 Entwicklung eines Algorithmus auf der Grundlage des Wasserstoffbrückenbindungsmodells zur Beschreibung von potentiellen U1 snRNA Bindungsstellen

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass eine zu geringe Komplementarität zwischen der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 und dem freien 5'-Ende der U1 snRNA sowohl in der Degradation der gespleißten, als auch der, für *env* kodierenden, ungespleißten RNA resultierte. Ursächlich hierfür schien die fehlende Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP zu sein, wenn diese Fehlbasenpaarungen enthielt. Die Nachweisbarkeit des HIV-1 Glykoproteins im Westernblot konnte somit als Kriterium für die Funktionalität einer 5'-Spleißstelle betrachtet werden. Auf Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse der Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 konnte ein auf Wasserstoffbrückenbindungen basierender Algorithmus zur Beschreibung von funktionellen U1 snRNA Bindestellen entwickelt werden.

Um zu überprüfen, ob die aus dem Wasserstoffbrückenbindungsmodell abgeleiteten Regeln auch auf die Beschreibung anderer 5'-Spleißstellen anwendbar sind, wurde zunächst das HIV-1 *env* Transkript auf potentielle, bisher nicht identifizierte U1 snRNA Bindestellen untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe des Algorithmus das *env* Gen im Bereich zwischen dem Translations-Startcodon und der 3'-Spleißstelle SA7, nach 11 Nukleotid langen, GT Dinukleotid enthaltenden Sequenzen durchsucht. Für sämtliche ermittelten GT-haltigen Sequenzen wurde die Anzahl, an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen (N_H) zu der U1 snRNA bestimmt, unabhängig davon ob diese direkt benachbart oder durch Fehlbasenpaarungen voneinander getrennt waren. Eine G:C Basenpaarung wurde dabei mit drei, und eine A:U Basenpaarung mit zwei Wasserstoffbrücken bewertet.

Neben den bisher untersuchten Standard Watson-Crick Basenpaarungen können jedoch auch G:U „wobble“ Basenpaarungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA ausgebildet werden, welche ebenfalls mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen von dem Algorithmus bewertet wurden. Basierend auf den vorherigen Immunoblot Analysen wurden Wasserstoffbrücken-Muster die eine *env*-Expression ermöglichten als „high complementarity“ (HC), und andererseits als „low complementarity“ (LC) eingestuft. Ein als HC eingestuftes Wasserstoffbrücken-Muster musste somit für einen benachbarten Bereich an Basenpaarungen die Bedingung $N_{H-cont} \geq 14$ erfüllen. Für einen durch Fehlbasenpaarungen unterbrochenen Bereich an Basenpaarungen musste sowohl die Bedingung $N_{H-discont} \geq 15$ erfüllt werden, als auch das 5'-wärts der Fehlbasenpaarung $N_{H-5'} \geq 6$ und 3'-wärts des

„mismatches“ $N_{H-3} \geq 5$ sein musste. Mit diesen Bedingungen fand der Algorithmus innerhalb des analysierten Bereiches des HIV-1 NL4-3 Genoms vier potentielle U1 snRNA Bindestellen (bezeichnet als #15 bis #18), die bisher nicht als funktionelle 5'-Spleißstellen beschrieben worden waren. Bei Betrachtung dieser potentiellen U1 snRNA Bindestellen fiel auf, dass alle G:U „wobble“ Basenpaarung enthielten (Abb. 11).

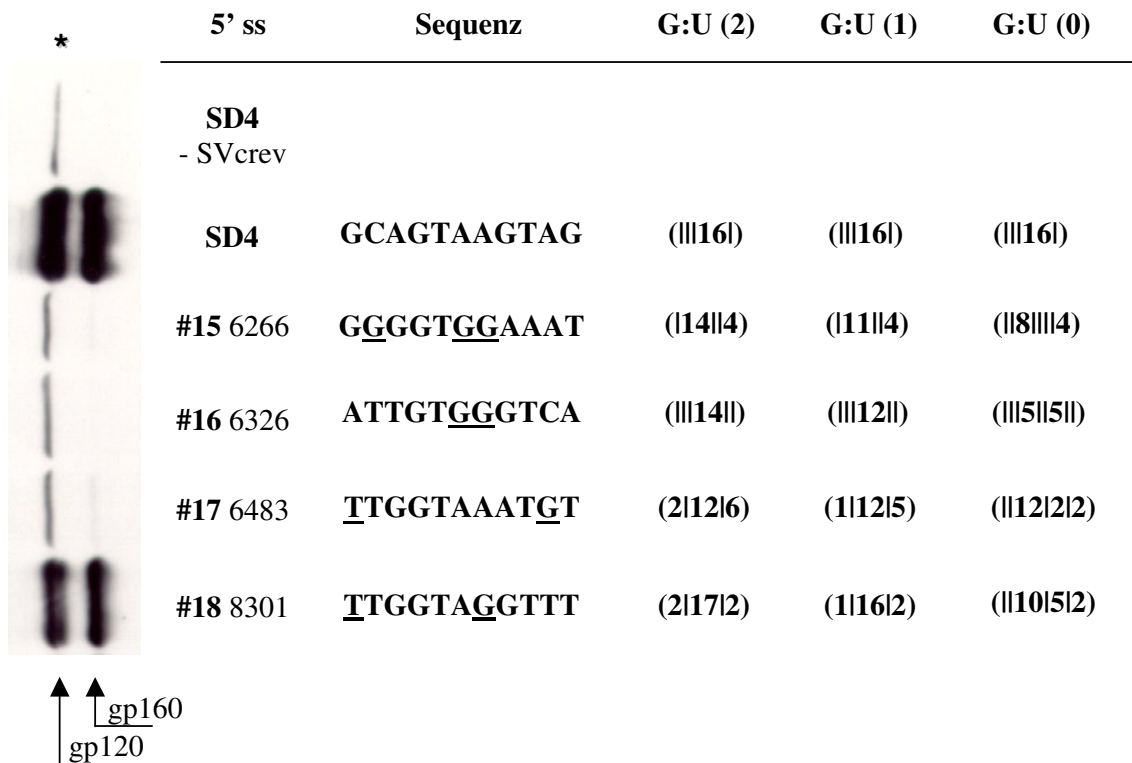


Abb. 11: Immunoblot Analyse der HIV-1 Glykoprotein Expression nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit $1 \mu\text{g}$ des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, $1 \mu\text{g}$ SVcrev und $1 \mu\text{g}$ pGL3-control unter Verwendung von FuGeneTM6 (links). Die 5'-Spleißstelle SD4 wurde gegen die, innerhalb des HIV-1 *env* Gens gefundenen, potentiellen Spleißdonorsequenzen (#15-#18) von der Position -3 bis +8 ausgetauscht. Die Position der potentiellen 5'-Spleißstellen innerhalb des HIV-1 Genoms ist jeweils hinter der Konstruktbezeichnung angegeben (6266-8301). Die Abbildung zeigt die Sequenzen der 5'-Spleißstellen, sowie die möglichen zu der U1 snRNA ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (rechts). Die Spalten G:U(2), GU(1) und G:U(0) geben die Summe der Wasserstoffbrücken nach unterschiedlicher Bewertung einer G:U Basenpaarung an (s. Abschnitt 3.1.6). Die Ausbildung von G:U Basenpaarungen zu der U1 snRNA ist an den unterstrichen dargestellten Positionen möglich. Der Balken (symbolisiert jeweils eine Fehlbasenpaarung zu der U1 snRNA. Die mit einem Stern (*) markierte, unterhalb des gp 120 detektierte Bande tritt aufgrund einer Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit einem zellulären Protein auf.

Um zu testen, ob die innerhalb des HIV-1 *env* Transkriptes vorhergesagten U1 snRNA Bindestellen in der Lage sind 5'-Spleißstellen abhängig *env* zu exprimieren, wurde in dem *env*-Expressionsvektor die Sequenz des Spleißdonors 4 gegen jede einzelne, gefundene Sequenz ausgetauscht. Überraschenderweise konnte jedoch nur eine der vier gefundenen Sequenzen (#18) den Spleißdonor 4 funktionell ersetzen, während für die anderen drei

U1 snRNA Bindestellen (#14 bis #17) kein Glykoprotein in der Immunoblot Analyse nachweisbar war (Abb. 11).

3.1.6 G:U Basenpaarungen tragen weniger zur U1 snRNA-abhängigen *env*-Expression bei als A:U Basenpaarungen

Um zu untersuchen, ob die durch den Algorithmus vorhergesagten U1 snRNA Bindestellen aufgrund einer zu geringen Komplementarität zu der U1 snRNA keine *env*-Expression zeigten, wurden die Transfektionsexperimente mit dem Expressionsplasmid, welches die potentielle 5'-Spleißstelle #15 enthielt, unter Verwendung zusätzlicher kompensatorischer U1 snRNAs wiederholt.

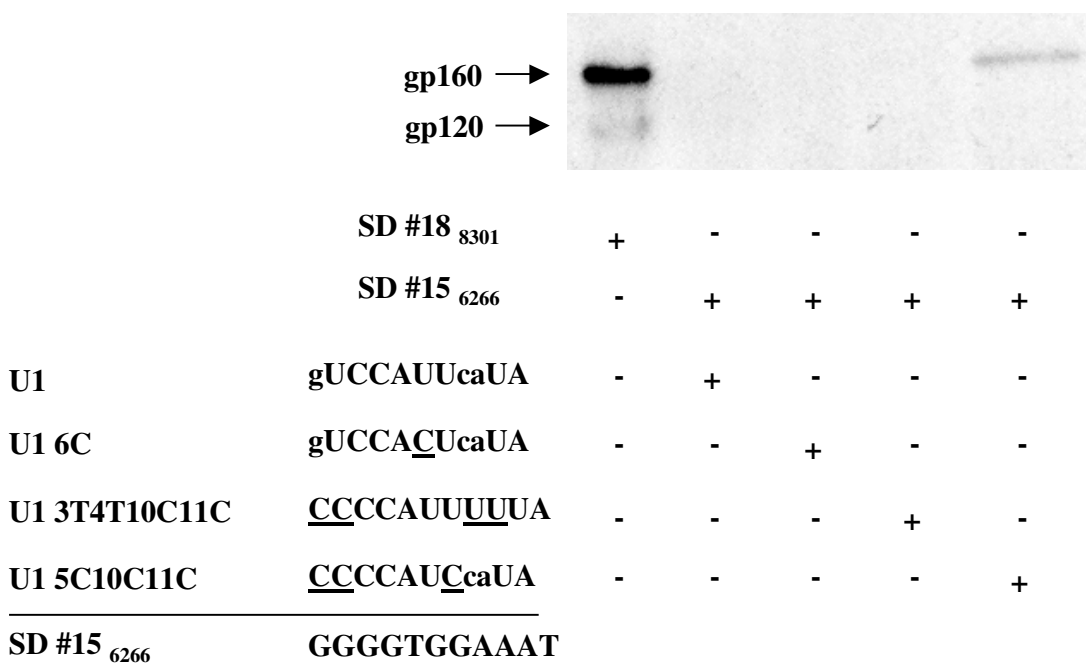


Abb. 12: Immunoblot Analyse der HIV-1 Glykoprotein Expression. Die Konstrukte enthalten an der Position der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 die Sequenz der potentiellen 5'-Spleißstellen #18 (Spur 1) bzw. #15 (Spur 2-5). Die Position der potentiellen 5'-Spleißstellen innerhalb des HIV-1 Genoms ist jeweils hinter der Konstruktbezeichnung angegeben (8301 bzw. 6266). Die Abbildung zeigt die Sequenzen der Wildtyp U1 snRNA, sowie die der verwendeten kompensatorischen U1 snRNAs. Die eingeführten Mutationen innerhalb der U1 snRNAs sind unterstrichen dargestellt. Fehlbasenpaarungen zu der 5'-Spleißstelle #15 sind kleingedruckt. 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen wurden unter Verwendung von FuGeneTM 6 mit 1 µg des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 µg pUCBU1, 1 µg SVcrev und 1 µg pGL3-control nach dem angegebenen Transfektionsschema (+, -) transient transfiziert.

Es ließ sich bestätigen, dass die potentielle U1 snRNA Bindestelle #18 die *env*-Expression unterstützten konnte (Abb. 12, Spur 1). Hingegen konnte für das Konstrukt, welches die U1 snRNA Bindestelle #15 enthielt, die Expression des Glykoproteins weder durch Kotransfektion der Wildtyp U1 snRNA, noch durch eine U1 snRNA, welche an der Position +3 der Spleißdonorsequenz die Ausbildung einer G:C anstelle einer G:U Basenpaarung (U1 6C) ermöglichen sollte und somit zu 15 möglichen Wasserstoffbrückenbindungen (115||4) führen sollte, erzielt werden (Abb. 12, Spur 2 und 3). Darüber hinaus ließ sich selbst bei Kotransfektion einer U1 snRNA, welche zusätzliche Basenpaarungen an den Positionen -3, -2, +5 und +6 ermöglichen sollte (U1 3U4U10C11C) und somit zu einer maximalen Komplementarität zu der U1 snRNA unter Ausbildung von 26 benachbarten Wasserstoffbrückenbindungen führen sollte, keine Expression des HIV-1 Glykoproteins in der Immunoblot Analyse nachweisen (Abb. 12, Spur 4). Überraschenderweise führte jedoch bereits die Ausbildung von 19 Wasserstoffbrückenbindungen unter Verwendung einer G:C anstelle einer G:U Basenpaarung an Position +4 der Spleißdonorsequenz (U1 5C10C11C) zu einer geringen *env*-Expression (Abb. 12, Spur 5). Somit ließen sich die Ergebnisse unter der Annahme, dass sich eine G:U „wobble“ Basenpaarung, gleichwertig einer A:U Basenpaarung, mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen an der Ausbildung eines RNA-Duplex beteiligt, nicht hinreichend beschreiben.

Eine alternative Bewertung einer G:U „wobble“ Basenpaarung lieferten Chen et al., die anhand von NMR-Spektroskopie Untersuchungen zeigen konnten, dass für ein $r(\text{GGCGUGCC})_2$ RNA-Duplex nur eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der G:U Basenpaarung ausgebildet wurde (100). Wurde dieses Ein-Wasserstoffbrückenbindungsmodell auf die hier betrachtete Ausbildung eines RNA-Duplex zwischen der U1 snRNA und ihrer potentiellen Bindestelle übertragen, ließ sich die nicht detektierbare 5'-Spleißstellen vermittelte *env*-Expression der Sequenzen #15 und #16 erklären, da diese eine nicht mehr ausreichende Komplementarität aufweisen würden (Abb. 11, Spalte G:U(1)). Jedoch zeigte die Substitution der Spleißdonorsequenz SD4 gegen die potentielle U1 snRNA Bindestelle #17 ebenfalls keine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse, obwohl diese Sequenz, auch unter Bewertung der G:U Basenpaarungen mit nur einer Wasserstoffbrückenbindung, eine ausreichende Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA hätte ausbilden können (Abb. 11, Spalte G:U(1)).

Um diesen scheinbaren Widerspruch aufzulösen wurden weitere Spleißdonorsequenzen getestet. Die hierzu analysierten Konstrukte enthielten, identisch zu der potentiellen U1 snRNA Bindesequenz #17, einen zusammenhängenden Bereich von 12

Wasserstoffbrückenbindungen an den Positionen -1 bis $+5$, unterschieden sich aber innerhalb der Positionen $+7$ und $+8$. Das Konstrukt mit der potentiellen U1 snRNA Bindestelle #17 besaß, selbst wenn es nur eine Wasserstoffbrückenbindung an der Position $+7$ ausgebildet hätte, insgesamt eine höhere Komplementarität zu der U1 snRNA als das Konstrukt $-1G5U$, welches an der Position $+7$ eine A:U Basenpaarung ausbilden konnte (Abb. 13).

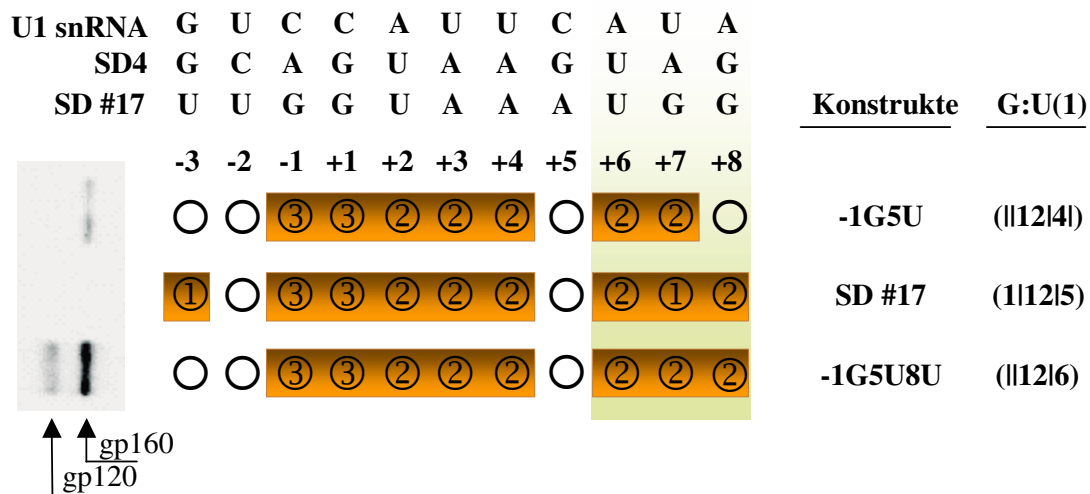


Abb. 13: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins. Die innerhalb des HIV-1 *env* Gens gefundene, potentielle 5'-Spleißstelle #17, sowie weitere Mutationen dieser Sequenz an den Positionen $+7$ und $+8$ (grün hinterlegt), wurden an der Position der *tat/rev* Spleißstelle SD4 in *env*-Expressionsvektoren untersucht. Hierzu wurden 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagens FuGeneTM6 mit $1 \mu\text{g}$ des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, $1 \mu\text{g}$ SVcrev und $1 \mu\text{g}$ pGL3-control transient transfiziert. Die Abbildung zeigt die Ausgangssequenz der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4, sowie die der potentiellen 5'-Spleißstelle #17 und der U1 snRNA (oben). Die an den einzelnen Positionen ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind in Kreisen dargestellt. Die Summe an möglichen H-Brücken ist in der Spalte G:U(1) aufgeführt.

Dennoch zeigte das Konstrukt $-1G5U$, trotz der geringeren Komplementarität zur U1 snRNA, im Gegensatz zu dem Konstrukt #17 in der Immunoblot Analyse eine schwache 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression (Abb. 13). Das vergleichbare Konstrukt mit der $-1G5U8U$ Mutation innerhalb der Spleißdonorsequenz zeigte hingegen eine deutliche *env*-Expression. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass eine G:U „wobble“ Basenpaarung in der Position $+7$ sich nur an der Ausbildung des RNA-Duplex beteiligte, wenn diese 5'- oder 3'-wärts von mehr als zwei Wasserstoffbrückenbindungen flankiert wurde. Weitere Transfektionsexperimente mit vergleichbaren Mutationen an der Position -2 der 5'-Spleißstelle bestätigten diese Vermutung (Daten nicht gezeigt).

Um zu prüfen, inwieweit sich das Ein-Wasserstoffbrückenbindungsmodell zur Beschreibung von G:U Basenpaarung auf interne „wobble“ Basenpaarungen anwenden ließ, wurde

zunächst die Position +4 der Spleißdonorsequenz genauer analysiert. Innerhalb der authentischen HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 befindet sich an der Position +4 ein Adenin, welches mit einem Uracil der U1 snRNA eine Basenpaarung ausbilden kann (Abb. 14, 4A). Durch Mutation dieser Position war es möglich den Einfluss dieser G:U Basenpaarung, welche auf beiden Seiten von 7 Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des RNA-Duplex flankiert wird, auf die 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression zu untersuchen. Wenn sich die G:U Basenpaarung an der Position +4 mit mindestens einer Wasserstoffbrückenbindung an der RNA-Duplex Ausbildung beteiligen würde, so entstünde ein zusammenhängender Bereich benachbarter Wasserstoffbrückenbindungen mit $N_H > 14$ und es sollte eine deutliche *env*-Expression detektierbar sein.

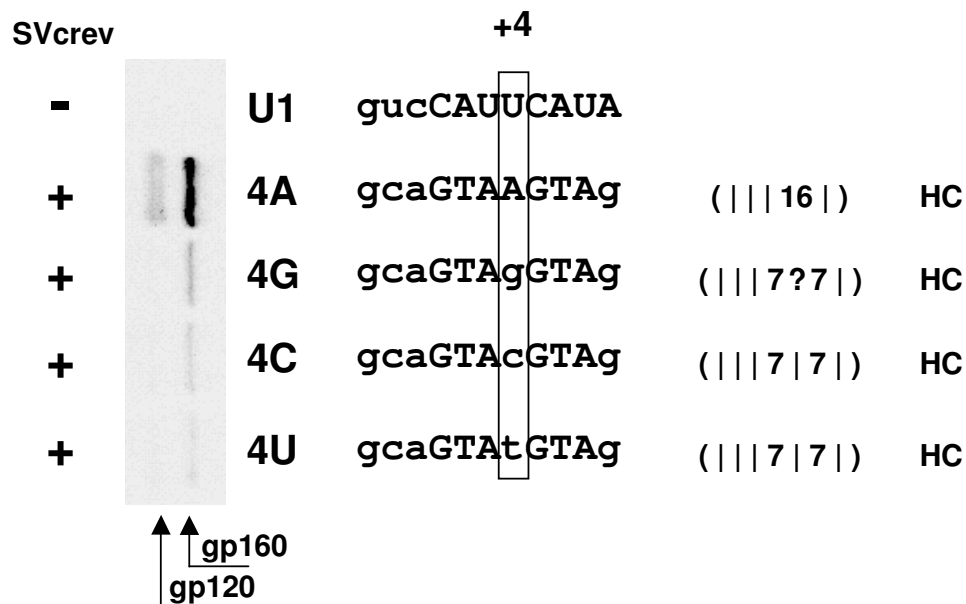


Abb. 14: Immunoblot Analyse der HIV-1 Glykoprotein Expression (links). Die Konstrukte enthalten Mutationen an der Position +4 (farblich markiert) der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4. Die Sequenzen der 5'-Spleißstellen, sowie die der U1 snRNA sind dargestellt, wobei Fehlbasenpaarungen kleingedruckt wurden. Die Summe der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen, sowie die Bewertung durch den „splicefinder“ sind aufgeführt (HC, „high complementarity“). 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen wurden unter Verwendung von FuGeneTM 6 mit 0,2 μ g SV E/X tat⁻ rev⁻ 4A bzw. 1 μ g der *env*-Expressionsplasmide 4G; 4C und 4U, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control transient transfiziert.

Die Immunoblot Analyse der mit diesen Konstrukten transfizierten HeLa-T4⁺ Zellen ließ jedoch erkennen, dass eine Substitution des Adenins gegen jede andere Base zu keiner zu dem Ausgangskonstrukt vergleichbaren *env*-Expression führte (Abb. 14, vgl. 4A mit 4G, 4C und 4U). Die Ergebnisse zeigten, dass sich an der Position +4 der 5'-Spleißstelle eine einzelne G:U Basenpaarung, selbst wenn diese 5'- und 3'-wärts von 7 Wasserstoffbrückenbindungen flankiert wurde, nicht an der RNA-Duplex Bildung beteiligte.

Eine thermodynamische Betrachtung dieser RNA-Duplices unter Verwendung der Algorithmen „Dyalign“ (410) oder „HyTher“ (484) hätte dieses Ergebnis nicht erwarten lassen. Beide Algorithmen berechnen einen nur geringen Unterschied an freier Energie von $\Delta G^{\circ} = 0.3$ kcal/mol („Dyalign“) bzw. $\Delta G^{\circ} = 0.35$ kcal/mol („HyTher“) im Vergleich des RNA-Duplex unter Verwendung der A:U Watson Crick Basenpaarung und der G:U „wobble“ Basenpaarung, gegenüber einem größeren Unterschied für den A:C „mismatch“ ($\Delta G^{\circ} = 4.1$ kcal/mol („Dyalign“) bzw. $\Delta G^{\circ} = 4.05$ kcal/mol („HyTher“)).

Um zu bestätigen, dass sich eine G:U Basenpaarung an der Position +4 der Spleißdonorsequenz nicht an der Stabilisierung des RNA-Duplex zu der U1 snRNA beteiligte, wurden Kotransfektionsexperimente mit verschiedenen kompensatorischen U1 snRNAs durchgeführt (Abb. 15).

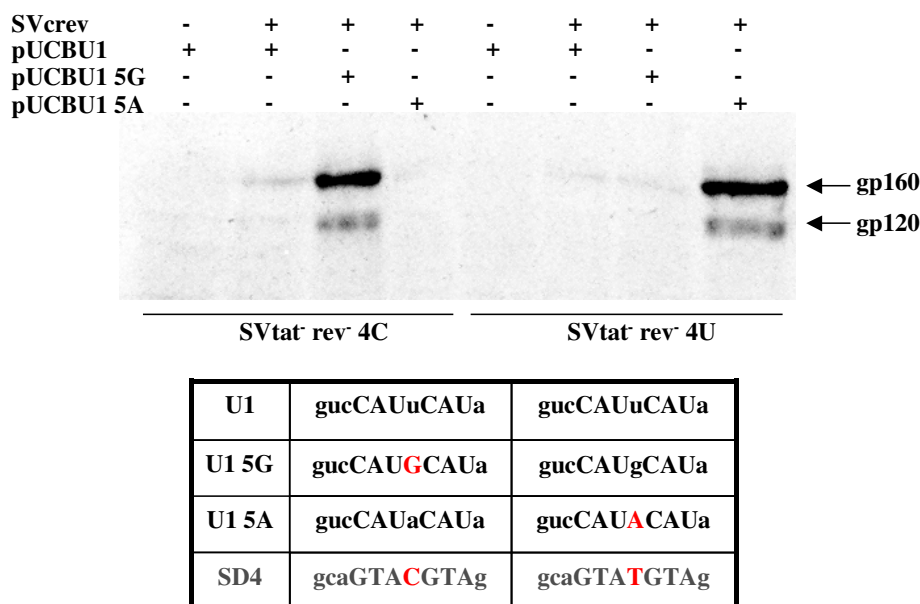


Abb. 15: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g pUCBU1, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control nach dem angegebenen Transfektionsschema (+, -). Die *env*-Expressionsplasmide enthalten an der Position +4 der HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle eine Punktmutation (4C, Spur 1-4; 4U, Spur 5-8). Die Abbildung zeigt die Sequenzen der kompensatorischen U1 snRNAs, wobei Fehlbasenpaarungen zu der 5'-Spleißstelle kleingedruckt und zusätzliche Basenpaarungen rot dargestellt sind.

Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente in Abb. 15 zeigen, dass sich die 4C Mutation des Spleißdonors 4 nur in Gegenwart der kompensatorischen U1 snRNA, welche an der korrespondierenden Position der U1 snRNA ein Guanin trug (U1 5G), komplementieren ließ (Abb. 15, Spur 3). Diese kompensatorische U1 snRNA war jedoch nicht in der Lage die 4U Mutation des Spleißdonors 4 zu komplementieren (Abb. 15, Spur 7). Die *env*-Expression der

4U Mutation ließ sich nur durch Kotransfektion einer U1 snRNA mit einem komplementären Adenin (U1 5A), wiederherstellen (Abb. 15, Spur 8), Somit bestätigten diese Ergebnisse erneut, dass sich innerhalb dieser Sequenz eine G:U „wobble“ Basenpaarung an der Position +4 sich nicht an der 5'-Spleißstellen abhängigen, Rev-vermittelten *env*-Expression beteiligte.

3.1.7 Terminale Basenpaarungen stabilisieren die Bindung der U1 snRNA in geringerem Ausmaß als interne Basenpaarungen

Die Ergebnisse in Abschnitt 3.1.6 hatten gezeigt, dass sich die Ausbildung einer G:U „wobble“ Basenpaarung an der Position +4 der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA, nicht an der Stabilisierung der *env* prä-mRNA beteiligte. Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf die direkt benachbarte Position +3 der Spleißdonorsequenz übertragen ließen. Hierzu wurden weitere Mutationen der 5'-Spleißstelle hergestellt, welche an der Position +3 eine G:U Basenpaarung zu der U1 snRNA ausbilden sollten (Abb. 16). In einem zusammenhängenden Bereich von sechs komplementären Nukleotiden an den Positionen -3 bis +3, zeigte eine terminal des RNA-Duplex gelegene G:U Basenpaarung an der Position +3 keine Beteiligung an der Rev-vermittelten *env*-Expression (Abb.16, cs-3¹⁴). Die G:U Basenpaarung an der Position +3 verhielt sich in diesem Konstrukt, welches unter Bewertung der „wobble“ Basenpaarung mit einer Wasserstoffbrückenbindung eine ausreichende Komplementarität von 14 H-Brücken zu der U1 snRNA besitzen sollte, wie eine Fehlbasenpaarung in dem Konstrukt cs-3¹³ (Abb. 16, vgl. cs-3¹⁴ und cs-3¹³). Für das vergleichbare Konstrukt unter Verwendung einer Watson-Crick Basenpaarung an der Position +3 ließ sich hingegen eine deutliche *env*-Expression in der Immunoblot Analyse detektieren (Abb. 16., cs-3¹⁵).

Die Ergebnisse zeigten, dass sich eine terminal des RNA-Duplex gelegene G:U Basenpaarung an der Position +3 nicht an der 5'-Spleißstellen abhängigen *env*-Expression beteiligte. Wurde hingegen die G:U Basenpaarung an der Position +3 auf beiden Seiten von zusätzlichen Basenpaarungen flankiert, ließ sich die *env*-Expression, wenn auch in geringem Ausmaß als unter Verwendung einer A:U Basenpaarung, wiederherstellen (Abb.16, vgl. 3G7C und cs-3¹⁵).

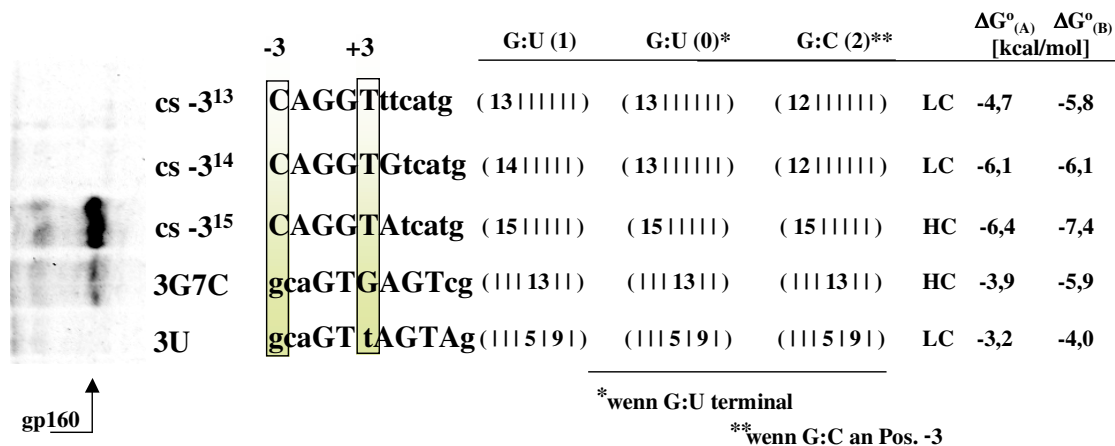


Abb. 16: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmids, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). Die Sequenzen der Spleißdonorsequenzen sind dargestellt, wobei die analysierten Positionen -3 und +3 farblich hinterlegt sind und Fehlbasenpaarungen zu der UI snRNA kleingedruckt sind. Die möglichen, zu der UI snRNA ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind als Summen angegeben. In der Spalte G:U (1) werden G:U Basenpaarungen mit einer Wasserstoffbrücke bewertet. In der Spalte G:U (0) werden endständige G:U Basenpaarungen nicht gewertet. Die Spalte G:C (2) zählt zusätzlich eine G:C Basenpaarung an der Position -3 mit zwei Wasserstoffbrücken. Die Kategorisierung der 5'-Spleißstellen in „HC“ und „LC“ ist angegeben. Die Berechnung der freien Energie erfolgte unter Anwendung von „Dyalign“ ($\Delta G^{\circ}_{(A)}$) (<http://rma.chem.rochester.edu/dyalign.html>) (410) und „HyTher“ ($\Delta G^{\circ}_{(B)}$) (<http://ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hythermain.html>) (484).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Beurteilung einer G:U Basenpaarung an der Position +3 nur unter zusätzlicher Betrachtung der benachbarten Basenpaarungen möglich war. Unter Berücksichtigung dieser experimentellen Ergebnisse wurde der Algorithmus dahingehend modifiziert, dass terminale G:U Basenpaarungen für die Bewertung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters nicht herangezogen wurden. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit thermodynamischen Betrachtungen terminaler Basenpaarungen, da durch fehlende „stacking“ Wechselwirkungen an den Helixenden die Energie terminaler Basenpaarungen reduziert ist. Um zu einer quantitativen Beurteilung terminaler Basenpaarungen zu gelangen, wurden die freien Energien dieser Mutationen mit Hilfe der Algorithmen „Dyalign“ (410) und „HyTher“ (484) berechnet. Jedoch konnte keines der Programme eine Korrelation zwischen der freien Energie dieser RNA-Duplices mit der hier beobachteten Effizienz der 5'-Spleißstellen vermittelten *env*-Expression herstellen (Abb. 16, Spalte ΔG°).

Eine weitere Schwierigkeit bei der Beschreibung der experimentellen Ergebnisse durch das Wasserstoffbrückenbindungsmodell fiel bei Betrachtung der Mutationen cs-3¹⁴, cs-3¹⁵ und 3G7C auf. Alle drei Konstrukte bildeten nach Vorhersage durch den Algorithmus einen

zusammenhängenden Bereich von 13 Wasserstoffbrücken zu der U1 snRNA aus, unterschieden sich jedoch in ihrer *env*-Expression deutlich (Abb. 16, Spalte G:U (0)). Die Übertragung der im vorherigen Abschnitt abgeleiteten Annahme, dass sich endständige Basenpaarungen weniger an der Stabilisierung des RNA-Duplex beteiligen, auf Standard Watson-Crick Basenpaarungen, würde für die G:C Basenpaarung an der Position -3 der Spleißdonorsequenz in den Konstrukten cs-3¹³, cs-3¹⁴ und cs-3¹⁵ bedeuten, dass diese Basenpaarungen dann nicht mit drei sondern z. B. nur mit zwei Wasserstoffbrücken bewertet werden müssten. Würden terminale Basenpaarungen des RNA-Duplex allgemein mit einer Wasserstoffbrückenbindung weniger bewertet werden, ließen sich die experimentellen Ergebnisse hinreichend beschreiben, da die Spleißdonorsequenz der Konstrukte cs-3¹³ und cs-3¹⁴ demnach nur noch mit 12 Wasserstoffbrückenbindungen berechnet würden (Abb. 16, Spalte G:C (2)). Das Konstrukt 3G7C, welches eine deutliche *env*-Expression in der Immunoblot Analyse zeigte, würde hingegen weiterhin mit 13 Wasserstoffbrückenbindungen bewertet werden (Abb. 16, Spalte G:C (2)). Demnach würde der Algorithmus eine korrekte Beschreibung aller experimentellen Ergebnisse mit einem Schwellenwert von $N_{H-cont} \geq 13$ liefern.

Um zu überprüfen, ob sich die Modifikationen des Algorithmus nicht nur hilfreich für das 5'-Ende des RNA-Duplex erwiesen, sondern auch auf das 3'-Ende Anwendung finden könnten, wurde auch die Position +8 der 5'-Spleißstelle näher betrachtet. Die hierzu ausgewählten Konstrukte mit verschiedenen Mutationen des 3'-Endes der Spleißdonorsequenz zeigten alle eine suboptimale *env*-Expression um Sättigungseffekte ausschließen zu können (Abb. 17). Auffallend war, dass auch unter Bewertung der endständigen A:U Basenpaarung an Position +8 mit nur einer Wasserstoffbrückenbindung, sämtliche Konstrukte weiterhin als „high complementarity“ (HC) klassifiziert werden konnten (Abb. 17, Spalte A:U (1)). Darüber hinaus zeigte sich durch diese Modifikation eine höhere Korrelation zwischen der Anzahl an Wasserstoffbrücken und der in der Immunoblot Analyse detektierten Menge an Glykoprotein. Die Konstrukte -1G3U7G8U und -1G3U zeigten bei vergleichbarer *env*-Expression das gleiche Muster an Wasserstoffbrückenbindungen, während die etwas höhere *env*-Expression des Konstruktes -1G3U8U auch eine höhere Komplementarität zu der U1 snRNA aufwies (Abb. 17 vgl. -1G3U7G8U, -1G3U und -1G3U8U und Spalte A:U (1)). Somit wurde die modifizierte Bewertung von terminalen Basenpaarung in den Algorithmus implementiert.

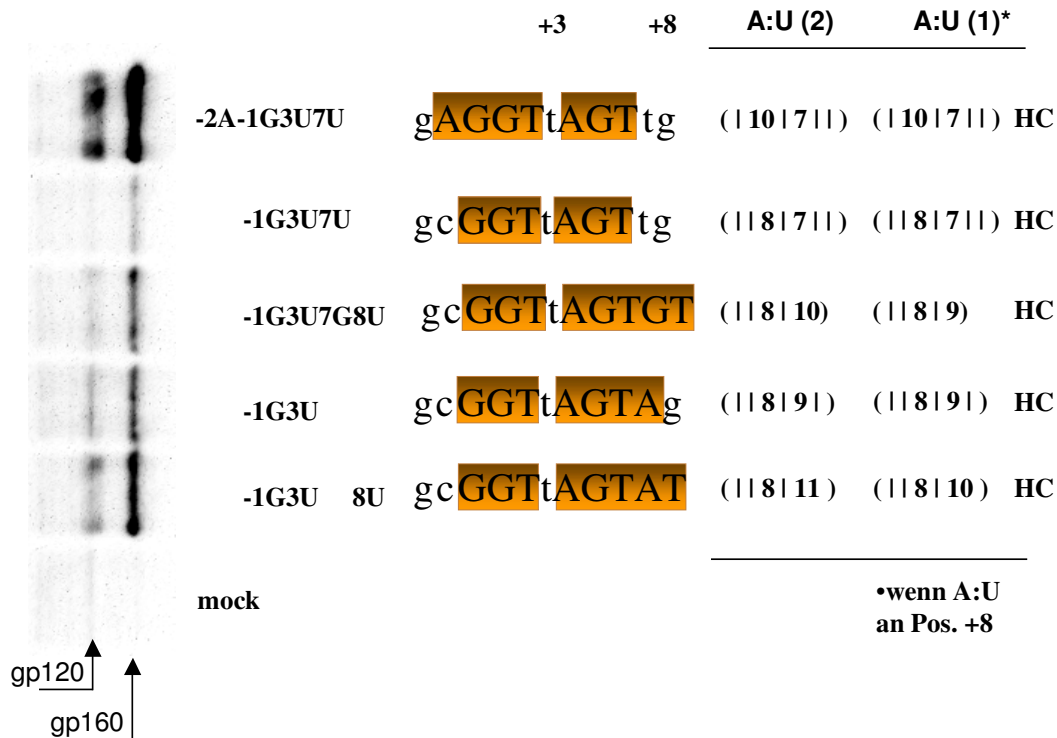


Abb. 17: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). Die Abbildung zeigt die Spleißdonorsequenzen, wobei die U1 komplementären Positionen farbig hinterlegt sind und Fehlbasenpaarungen zu der U1 snRNA kleingedruckt sind. Die möglichen, zu der U1 snRNA ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind als Summen angegeben. In der Spalte A:U (2) werden A:U Basenpaarungen mit zwei Wasserstoffbrücken bewertet. In der Spalte A:U (1) werden endständige A:U Basenpaarungen mit nur einer Wasserstoffbrücke gezählt. Die Kategorisierung des „splicefinders“ ist aufgeführt.

3.1.8 Eine G:U Basenpaarung an der Position +3 kann durch eine zusätzliche G:U Basenpaarung an der Position +4 stabilisiert werden

In Abschnitt 3.1.6 wurde demonstriert, dass sich eine G:U „wobble“ Basenpaarung an der Position +4 der 5'-Spleißstelle grundsätzlich nicht an der Stabilisierung der Glykoprotein mRNA beteiligt (s. Abb. 15). In Abschnitt 3.1.7 konnte gezeigt werden, dass die stabilisierende Wirkung einer G:U Basenpaarung an der Position +3 von benachbarten Basenpaarungen abhängig war (s. Abb. 16 vgl. cs-3¹⁴ und 3G7C) und einen qualitativen Unterschied im Vergleich zu einer A:U Basenpaarung zeigte (s. Abb. 16 vgl. 3G7C und cs-3¹⁵). Um zu untersuchen, ob eine G:U Basenpaarung an der Position +4 in der Lage ist, eine G:U Basenpaarung an der +3 zu stabilisieren, wurden verschiedene Mutationen der Spleißdonorsequenz, mit zwei benachbarten G:U Basenpaarungen an den Positionen +3 und

+4, in den *env*-Expressionsvektor eingeführt. Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten und anschließender Analyse der Zellextrakte im Immunoblot zeigte sich, dass trotz der benachbarten G:U Basenpaarungen, bei ausreichender Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA, eine *env*-Expression möglich war (Abb. 18).

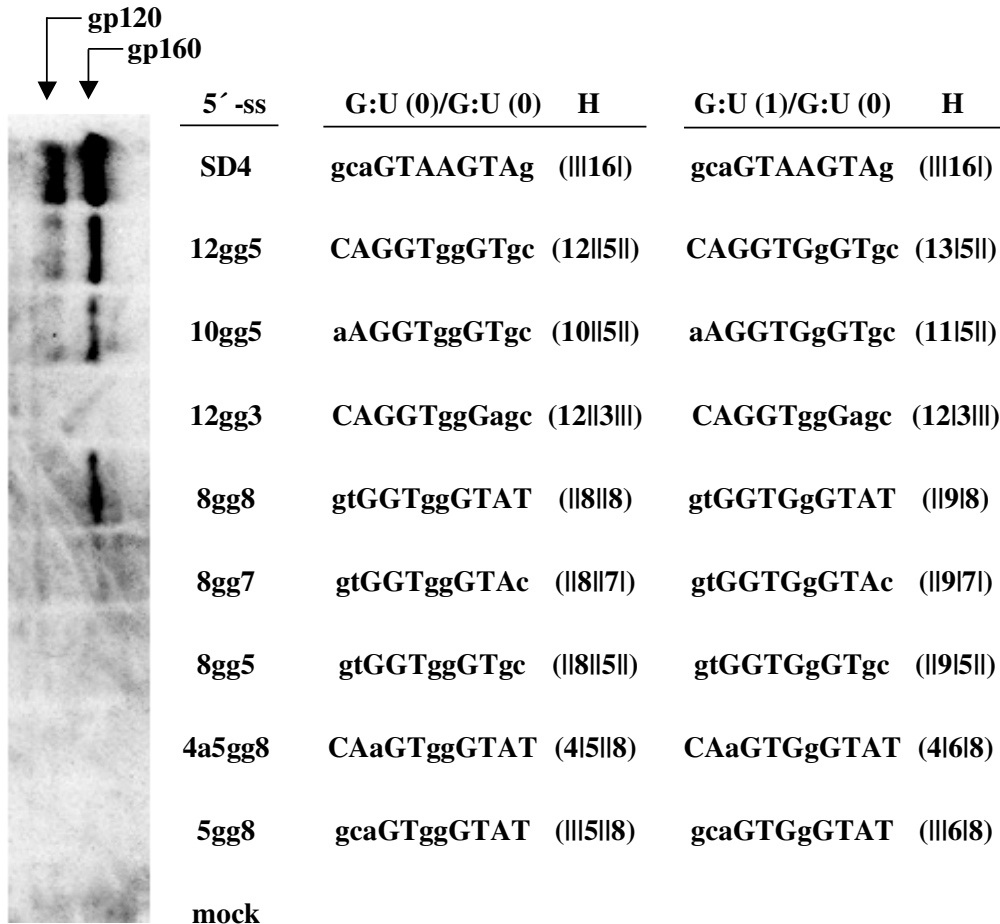


Abb. 18: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transients Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmids, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). Die Abbildung zeigt die Sequenzen der untersuchten 5'-Spleißstellen. Die *env*-Expressionsplasmide können an den Positionen +3 und +4 jeweils eine G:U Basenpaarung zu der U1 snRNA ausbilden. In der Spalte G:U(0)/G:U(0) werden die G:U Basenpaarungen an den beiden Positionen nicht bewertet. In der Spalte G:U(0)/G:U(1) wird die G:U Basenpaarung an der Position +3 nicht gezählt, während an der Position +4 die „wobble“ Basenpaarung mit einer Wasserstoffbrücke bewertet wird. Fehlbasenpaarungen zu der U1 snRNA sind kleingedruckt bzw. als Balken dargestellt (H).

Die Expression des Glykoproteins war zwar im Vergleich zum Ausgangskonstrukt mit der authentischen 5'-Spleißstelle SD4 reduziert, jedoch zeigten die Ergebnisse, dass sich eine doppelte G:U Basenpaarung durch ausreichende Basenpaarungen 5'- und 3'-wärts davon kompensieren ließ (Abb. 18, vgl. SD4 und z.B. 12gg5). Eine weiterführende Analyse der Ergebnisse verdeutlichte, dass sowohl bei zwölf, als auch bei zehn

Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA, mindestens fünf H-Brücken 3'-wärts der benachbarten G:U Basenpaarungen benötigt wurden, um eine detektierbare *env*-Expression zu ermöglichen (Abb. 18, vgl. 12gg5 und 10gg5 mit 12gg3). Bei nur acht Wasserstoffbrückenbindungen, „upstream“ der „wobble“ Basenpaarungen an den Positionen +3 und +4, wurden hingegen mindestens sieben H-Brücken 3'-wärts benötigt um eine Expression des Glykoproteins in der Immunoblot Analyse nachweisen zu können (Abb. 18, vgl. 8gg8 und 8gg7 mit 8gg5 oder 4l5gg8).

Um zu prüfen, ob die aufgestellten Regeln eine Besonderheit einer benachbarten G:U Basenpaarung innerhalb der 5'-Spleißstelle darstellten oder ob diese Regeln allgemein auf eine doppelte Fehlbasenpaarung anwendbar sind, wurde das Konstrukt, welches bei geringster U1 Komplementarität noch zu einer deutlichen *env*-Expression führte (8gg8), im Vergleich zu einem doppelten „mismatch“ (8tt8) untersucht.

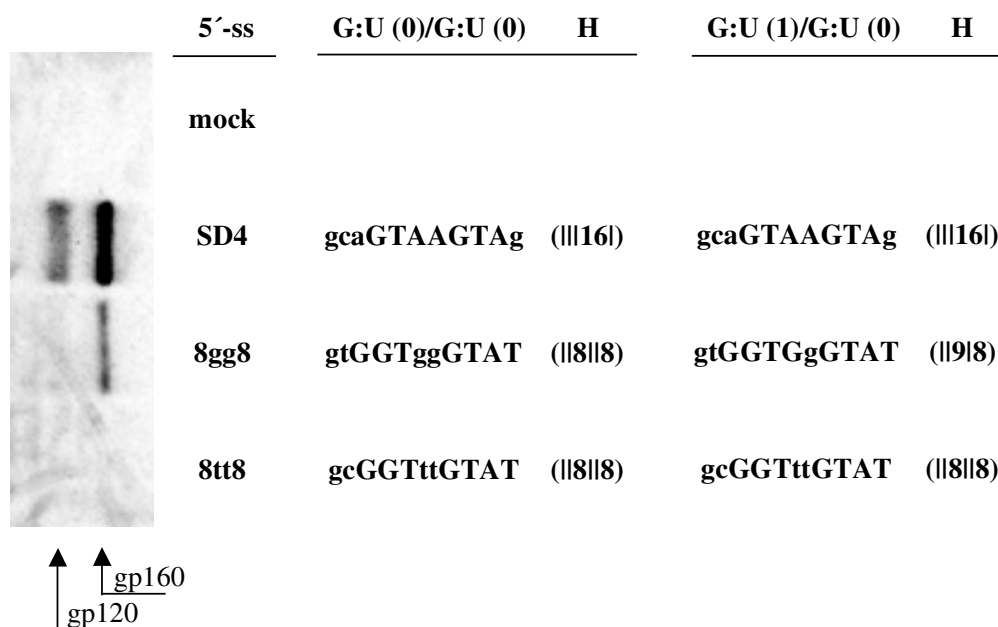


Abb. 19: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). Die Abbildung zeigt die Sequenzen der untersuchten 5'-Spleißstellen sowie die Komplementarität zu der U1 snRNA.

In der Immunoblot Analyse war zu erkennen, dass das Konstrukt mit der direkt benachbarten „wobble“ Basenpaarung an den Positionen +3 und +4 (8gg8) zwar eine reduzierte Menge an Glykoprotein im Vergleich zu dem Ausgangskonstrukt (SD4) exprimierte (Abb. 19, vgl. SD4 und 8gg8), hingegen das Konstrukt mit einer doppelten Fehlbasenpaarung an den

Positionen +3 und +4 zu keiner detektierbaren *env*-Expression führte (Abb. 19, vgl. 8gg8 und 8tt8). Diese Ergebnisse zeigten, dass eine direkt benachbarte G:U Basenpaarung nicht mit einer doppelten Fehlbasenpaarung gleichzusetzen ist.

Eine G:U „wobble“ Basenpaarung an der Position +4 beteiligte sich demnach zwar nicht direkt an der Stabilisierung des RNA-Duplex (Abb. 15), jedoch konnte eine G:U Basenpaarung an der Position +3 durch eine benachbarte „wobble“ Basenpaarung zusätzlich stabilisiert werden (Abb. 18 und 19). Die Ergebnisse ließen vermuten, dass diese zusätzliche Stabilisierung durch die G:U Basenpaarung an der Position +4 nur wirksam wird, wenn 3'-wärts davon mehr als drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können (Abb. 18, vgl. 12gg3 und 10gg5 bzw. 12gg5). Demzufolge wurde eine G:U/G:U Basenpaarung, wie in der Abb. 18 und Abb. 19 dargestellt, mit insgesamt einer Wasserstoffbrückenbindung bewertet, wenn 3'-wärts davon mehr als drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können (s. Abb. 18 und Abb. 19, Spalte G:U(1)/G:U(0)). Durch diese Modifikation ließ sich die unterschiedliche *env*-Expression der Konstrukte mit doppelter „wobble“ Basenpaarung (8gg8) und doppelter Fehlbasenpaarung (8tt8) hinreichend beschreiben.

Weitere Untersuchungen an Konstrukten mit doppelten Fehlbasenpaarungen innerhalb der 5'-Spleißstelle konnten den Unterschied zu einer benachbarten G:U Basenpaarung nochmals bestätigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart einer direkt benachbarten Fehlbasenpaarung die Gesamtanzahl von 17 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA nicht unterschritten werden durfte, um eine Stabilisierung der *env*-mRNA zu erzielen (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden auch 5'-Spleißstellen Mutationen untersucht, welche durch zwei nicht benachbarte Fehlbasenpaarungen einen fortlaufend U1 komplementären Bereich zweimal unterbrechen. Innerhalb dieser Gruppe konnten jedoch keine weiteren Mutationen gefunden werden, welche eine 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression unterstützten. Es zeigte sich, dass bereits ein maximal komplementärer Bereich mit zwei nicht benachbarten Fehlbasenpaarungen (4|5|10), aufgrund des isolierten kanonischen GTs, nicht zu einer Stabilisierung der prä-mRNA führte (Daten nicht gezeigt).

3.1.9 Der „splicefinder“ stellt einen neuen Ansatz zur Beschreibung von U1 snRNA Bindungsstellen dar

In der hier vorgestellten Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 wurde eine Vielzahl an Mutationen auf ihre Fähigkeit zur 5'-Spleißstellen abhängigen *env*-Expression untersucht. Aus diesen experimentellen Daten wurden allgemeine Regeln hergeleitet, welche sämtliche ermittelten Ergebnisse erklären konnten. Anhand dieser Regeln zur Bewertung von Wasserstoffbrückenbindungsmustern wurde ein Algorithmus entwickelt. Dieser Algorithmus ist im Internet frei zugänglich (<http://www.splicefinder.net/>) und klassifiziert, auf der Grundlage der hier vorgestellten Modifikationen des Wasserstoffbrückenbindungsmodells, potentielle 5'-Spleißstellen in die Kategorien „HC“ („high complementarity“) oder „LC“ („low complementarity“). Eine Sequenz wird als „HC“ eingestuft, wenn diese in der Lage ist, die 5'-Spleißstelle SD4 funktionell zu ersetzen. Die Funktionalität ist abhängig von der U1 snRNA vermittelten Stabilisierung der *env* prä-mRNA und der daraus resultierenden 5'-Spleißstellen abhängigen *env*-Expression.

Der Algorithmus beschränkt sich bisher auf die Analyse von „kanonischen GTs“ 5'-Spleißstellen, da diese in Säugern bereits ca. 96,3% aller 5'-Spleißstellen ausmachen (69). Es wurde gezeigt, dass sich die Positionen -3 bis +8 der 5'-Spleißstelle an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA beteiligen können (196, 302). Demnach gibt es $(4)^9 = 262144$ theoretische Möglichkeiten für eine GT-haltige 5'-Spleißstelle, von denen lediglich 85 Mutationen in dem beschriebenen experimentellen System analysiert wurden. Da diese vergleichsweise gering erscheinende Anzahl an Mutanten jedoch keine Aussage über die Richtigkeit der Kategorisierung der potentiellen 5'-Spleißstellen zuließ, wurde der „splicefinder“ mit einem häufig verwendeten Algorithmus zur Vorhersage von 5'-Spleißstellen verglichen (551). Dieser Algorithmus basiert auf einem systematischen Vergleich von 1895 5'-Spleißstellen aus der „GENBANK“ Datenbank. Anhand dieses Datensatzes wurde eine Häufigkeitsverteilung für bestimmte Nukleotide an bestimmten Positionen aufgestellt. Aufgrund von Ähnlichkeiten zu dieser „Konsensus Sequenz“ werden 5'-Spleißstellen mit einem Zahlenwert von 0-100 bewertet, wobei ein hoher Wert einer besonders effizienten 5'-Spleißstelle entspricht.

Um zu überprüfen, ob eine Bewertung einer 5'-Spleißstelle durch den „splicefinder“ als „HC“ mit einem hohen Wert durch den von Shapiro & Senapathy entwickelten Algorithmus (551) korrelierte, wurden verschiedene Spleißdonorsequenzen getestet. Es stellte sich heraus, dass im Einzelfall 5'-Spleißstellen mit einem hohen „S&S Wert“ von 80, durch den

„splicefinder“ sowohl als „HC“, als auch als „LC“ klassifiziert wurden. Gleiches trat auch bei geringeren „S&S scores“ von 65 auf, so dass keine Korrelation zwischen dem ermittelten „S&S score“ und der Kategorisierung einer 5'-Spleißstelle durch den „splicefinder“ in „HC“ und „LC“ beobachtet werden konnte. Um zu testen, ob die als „HC“ bewerteten 5'-Spleißstellen in der Lage waren den Spleißdonor 4 funktionell zu ersetzen, wurden diese 5'-Spleißstellen in dem *env*-Expressionsvektor experimentell analysiert. Die Auswertung der Konstrukte in der Immunoblot Analyse zeigte, dass die beiden als „HC“ bewerteten 5'-Spleißstellen, unabhängig von ihrem berechneten S&S Wert, zu einer deutlichen Glykoprotein Expression führten (Abb. 20, Spur 2 und Spur 4), während die beiden als „LC“ bewerteten Sequenzen keine 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression vermitteln konnten (Abb. 20, Spur 1 und Spur 3).

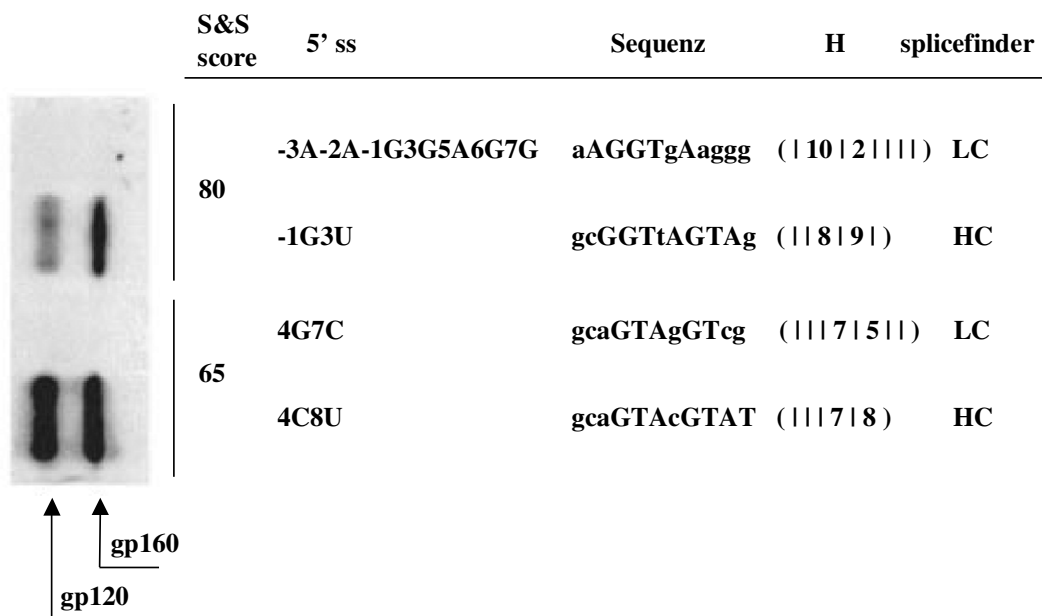


Abb. 20: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). Die Konstruktsbezeichnungen geben die Position und das ausgetauschte Nukleotid bezogen auf die SD4 Ausgangssequenz an. Die Abbildung zeigt die Sequenzen der untersuchten 5'-Spleißstellen, sowie die Komplementarität zu der U1 snRNA. U1 komplementäre Basen sind in Großbuchstaben gedruckt. Der „S&S score“ wurde mit dem von Shapiro und Senapathy entwickelten Algorithmus berechnet (551). Die Kategorisierung der potentiellen 5'-Spleißstellen in „HC“ und „LC“ mit Hilfe des „splicefinder“ Algorithmus ist angegeben.

Diese Ergebnisse konnten in weiteren Untersuchungen in unserem Labor (302) an einem 3-Exon-2-Intron Konstrukt, welches zusätzlich das HIV-1 Exon1 und den 5'-Teil des Introns 1 enthielt, bestätigt werden. Dieses Konstrukt ermöglichte eine zusätzliche Analyse des Einflusses der U1 Bindung auf die Exon Erkennung und auf das Spleißen. In RT-PCR

Analysen konnte gezeigt werden, dass die beiden „HC“ 5'-Spleißstellen funktionell sind und zu einer korrekten Exon Erkennung führten. Hingegen wurde bei den beiden „LC“ 5'-Spleißstellen ein „skipping“ des mittleren Exons beobachtet, was auf eine fehlende Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt) (196). Somit ist die Bewertung der 5'-Spleißstellen durch den, auf dem Wasserstoffbrückenbindungsmodell basierenden, „splicefinder“ zutreffender, als die Bewertung durch den, auf Konsensus Sequenzen basierenden, Shapiro & Senapathy Algorithmus.

3.1.10 Analyse von humanen 5'-Spleißstellen durch den „splicefinder“ Algorithmus

Da der „splicefinder“ ausschließlich von Mutationen der HIV-1 5'-Spleißstellen hergeleitet worden war, stellte sich die Frage ob der auf diesen experimentellen Daten basierende Algorithmus auch auf humane Spleißstellen anwendbar sein könnte. Um zu testen, ob die Klassifizierung von 5'-Spleißstellen in „HC“ und „LC“ auf der Grundlage des Wasserstoffbrückenbindungsmodells möglicherweise zwischen humanen 5'-Spleißstellen und bekannten Mutationen differenzieren könnte, wurde ein gut untersuchtes humanes Gen ausgewählt, welches aus einer hohen Anzahl an Exons besteht und an dem bereits möglichst viele 5'-Spleißstellen Mutationen beschrieben worden waren. Das *ATM* Gen („ataxia telangiectasia mutated“, MIM 208900, Louis-Bar-Syndrom) besteht aus 66 Exons und es wurden bereits mehr als 300 verschiedene Mutationen innerhalb dieses Gens beschrieben (*ATM* Mutation Database, http://www.benaroyaresearch.org/bri_investigators/atm.htm).

In Kollaboration mit Prof. Dr. Detlev Schindler vom Institut für Humangenetik in Würzburg wurden sämtliche zugängliche 5'-Spleißstellen Mutationen, welche die Positionen -3 bis +8, unter Beibehaltung des GTs an den Positionen +1 und +2 betrafen, zusammengestellt. Von diesen Mutationen wurden weiterhin diejenigen herausgefiltert, bei denen bereits RNA/cDNA Analysen durchgeführt worden waren, da Punktmutationen innerhalb einer 5'-Spleißstelle nicht notwendigerweise zu aberrantem Spleißen führen müssen. Unter Berücksichtigung dieser Auswahlkriterien standen der Analyse durch den Algorithmus insgesamt 21 Mutationen innerhalb 19 verschiedener *ATM* 5'-Spleißstellen zur Verfügung (Tabelle 1). Von den untersuchten 21 Mutationen der 5'-Spleißstelle des *ATM* Gens führten 17 aufgrund einer fehlenden Erkennung der Spleißdonorsequenz zu einem „skipping“ des Exons, wie es auch innerhalb eines 3-Exon-2-Intron Minigen HIV Reporterkonstruktes

beobachtet worden war. Die Analyse dieser 5'-Spleißstellen zeigte, dass in allen Fällen das Muster an möglichen, zu der U1 snRNA ausgebildeten, Wasserstoffbrückenbindungen in den mutierten Sequenzen geringer komplementär ist, als in den korrespondierenden Ausgangssequenzen (Tabelle 1, vgl. Spalte H-Brücken wt und Spalte H-Brücken mt).

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem von Shapiro-Senapathy entwickelten Algorithmus (551), welcher ebenfalls einen geringeren „score“ für die mutierten Sequenzen berechnete (Tabelle 1 vgl. S&S wt und S&S mt). Von den vier beschriebenen Mutationen, welche nicht zu einem aberranten Transkript führten, zeigten drei auch keine Veränderungen in ihrem Wasserstoffbrückenbindungsmuster (IVS4+6a>g, 8266A>T und IVS62+8a>c). Nach Bewertung durch den Shapiro-Senapathy Algorithmus wurde hingegen nur für eine Mutation ein gleichbleibender Wert (IVS62+8a>c) und in einem Fall für die Mutation sogar einen höheren Wert (IVS4+6a>g) berechnet. Die Mutation (IVS28+5g>t) bei der beide Algorithmen, trotz unverändertem Transkript, unterschiedliche Werte berechneten, zeigte nach Analyse des Wasserstoffbrückenbindungsmusters auch für die Mutante eine Klassifizierung der 5'-Spleißstelle als „HC“. Der Shapiro-Senapathy Algorithmus berechnete hingegen für die mutierte Sequenz einen deutlich niedrigeren Wert. Die beobachtete Korrelation zwischen Exon „skipping“ und der Klassifizierung als „HC“/„LC“ erwies sich, trotz des relativ geringen Datensatzes von 21 untersuchten Mutationen des humanen *ATM* Gens, als signifikant (Spearman $\rho = 0.54$, $P = 0.018$, χ^2 -Test). Somit ist das Wasserstoffbrückenbindungsmodell auch anwendbar auf die Charakterisierung von Mutationen an humanen 5'-Spleißstellen.

Mutation	Auswirkung auf das Transkript	5'-ss wt	H wt	th wt	5'-ss mt	H mt	th mt	S&S wt 9mer	S&S mt 9mer	Ref.
IVS4+6a>g	No change	aAGGTAgtaAa	(11211121)	LC	AAGGTAgtgAa	(11211121)	LC	70,65	71,63	web*
IVS7+5g>a	ES[7]	tAGGTAtGTtT	(1121511)	HC	TAGGTAtaTtT	(11211211)	LC	84,69	71,86	unpubl.*
662G>T	ES[8]	gAGGTAAtcta	(1141111)	HC	GAtGTAAtcta	(12191111)	LC	78,25	65,47	web*
IVS9+3a>t	ES[9]	aAGGTAtaaAg	(11211121)	LC	AAGGTttaaAg	(110111121)	LC	70,32	61,52	web*
IVS14+3del at	ES[14]	atGGTAtGTta	(11101511)	HC	AtGGTgttatac	(118111111)	LC	80,25	60,05	web*
2250G>A	ES[16]	aAGGTAgGaga	(11213111)	HC	AAaGTAgGaga	(121713111)	LC	83,70	71,31	(524)
2376G>A	ES[17]	aAGGTAAGatT	(117111)	HC	AAaGTAAGatT	(12112111)	LC	93,79	81,40	web*
IVS21+3a>t	ES[21] & ES[21&22]	atcGTAAGaAa	(11112121)	LC	AtcGTtAGaAa	(111515121)	LC	72,13	63,34	(524)
IVS21+3ins t	ES[21] & ES[21&22]	atcGTAAGaAa	(11112121)	LC	AtcGTtAagAa	(1115121121)	LC	72,13	51,48	web*
IVS21+5g>a	ES[21] & ES[21&22]	atcGTAAGaAa	(11112121)	LC	atcGTAAaaAa	(11191121)	LC	72,13	59,30	unpubl.*
3284G>C	ES[24]	tAGGTAAtggg	(1141111)	HC	tAcGTAAtggg	(12191111)	LC	77,97	64,51	web*
3576G>A	ES[26]	aAGGTAtaTAT	(112115)	HC	aAaGTAtaTAT	(1217115)	LC	75,61	63,22	(524)
IVS28+5g>t	No change	CAGGTAtGgcT	(1413111)	HC	CAGGTAttgcT	(1411111)	HC	85,05	72,00	web*
6095G>A	ES[43]	tAGGTAAaTtg	(1141211)	HC	tAaGTAAaTtg	(12191211)	LC	82,50	70,11	(524)
7788G>A	ES[54]	gAGGTAttTgg	(11211211)	LC	gAaGTAttTgg	(121711211)	LC	72,86	60,47	web*
7926A>C	ES[54&55] or ES[55]	gAaGTAtGTtT	(12171511)	LC	gcaGTAtGTtT	(11171511)	LC	73,52	65,11	web*
8150A>G	ES[57]	aAGGTGAGccT	(116111)	HC	agGGTGAGccT	(1114111)	HC	91,98	83,51	web*
8266A>T	No change	aAGGTAACtAT	(11415)	HC	tAGGTAACtAT	(11415)	HC	85,97	82,21	web*
IVS59+5_IVS59+8del gtga	ES[59]	atGGTGAGTga	(111611)	HC	atGGTgAcacc	(118121111)	LC	89,03	70,62	(71)
IVS62+8a>c	No change	aAGGTAAGTga	(11911)	HC	aAGGTAAGTgc	(11911)	HC	99,09	99,09	web*
8850G>T	ES[63]	gAGGTAaagta	(1141111)	HC	gAtGTAAagta	(12191111)	LC	79,39	66,62	(530)

Tab. 1: Die Nomenklatur der Mutationen folgt den Richtlinien von Beaudet et al. (27). Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf das GeneBank Format (Zugangsnummer NM_000051.2). Die Nummerierung der *ATM* Exons und Introns richtet sich nach Platzer et al. (486). Die durch die Mutation der 5'-Spleißstelle (5'-ss) hervorgerufene Nicht-Erkennung eines internen Exons (ES, „exon skipping“) ist dargestellt, wobei das ausgelassene Exon in Klammern angegeben ist. Die Sequenzen der Wildtyp (wt), sowie der mutierten (mt) 5'-Spleißstelle sind angegeben. Großbuchstaben entsprechen einem U1 komplementären Nukleotid. Die Wasserstoffbrückenbindungsmuster sind jeweils als Summen angegeben (H wt, H mt). Die Berechnung des „S&S scores“ erfolgte mit dem von Shapiro und Senapathy entwickelten Algorithmus (551) . Die Kategorisierung in „HC“ und „LC“ erfolgte unter Anwendung des „splicefinder“ Algorithmus (<http://www.splicefinder.net/>) (196). (web* Ataxia-telangiectasia mutation database (http://www.benaroyaresearch.org/bri_investigators/atm.htm)) (unpubl.* Sobeck, A., Nicke, M., Bendix R., Hüsing, U., Dörk, T., Schindler, D., (in Vorbereitung))

3.1.11 Grenzen des „splicefinder“ Algorithmus

Die Anwendungen des „splicefinder“ Algorithmus an humanen 5'-Spleißstellen konnten zeigen, dass eine qualitative Beschreibung von potentiellen 5'-Spleißstellen und deren Mutationen möglich ist. Jedoch eignet sich der Algorithmus, zumindest in der aktuellen Version, noch nicht zur Vorhersage von 5'-Spleißstellen, was anhand der folgenden Beispiele verdeutlicht werden soll.

Zur Überprüfung des Algorithmus wurde eine Analyse des gesamten HIV-1 NL4-3 Genoms durchgeführt. Innerhalb dieses Isolats sind vier 5'-Spleißstellen SD1-SD4 beschrieben worden. Zum direkten Vergleich wurde eine parallele Analyse mit einem weiteren Algorithmus durchgeführt, der auf eine Publikation von Brunak et al. zurückgeht (61) und ebenfalls im Internet verfügbar ist (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 21 dargestellt.

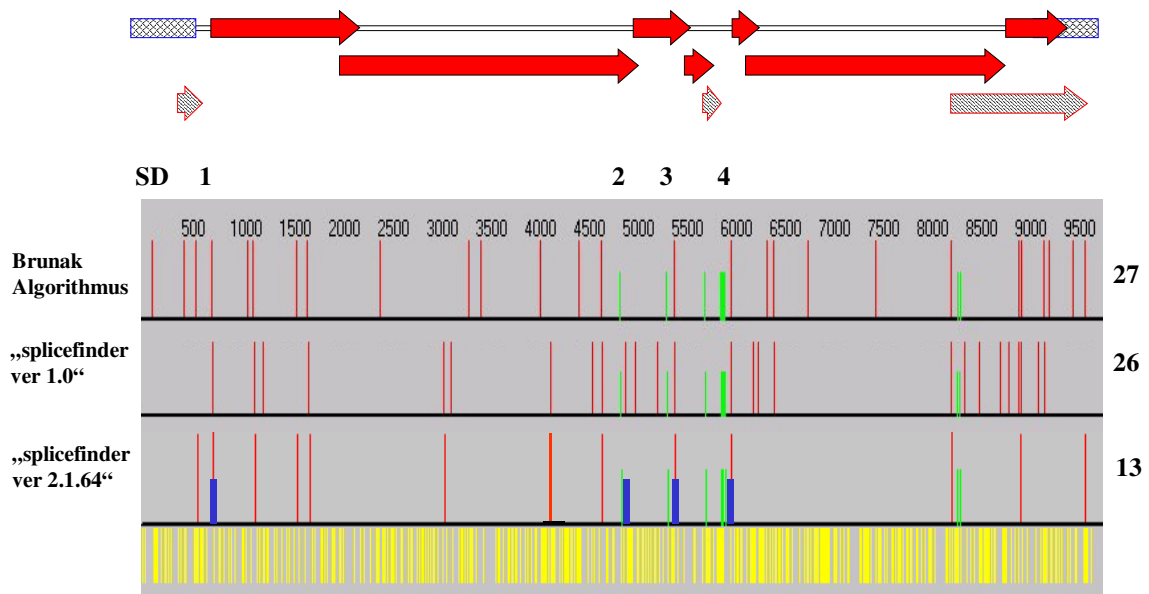


Abb. 21: Analyse des HIV-1 NL4-3 Genoms. Im oberen Teil der Abbildung ist das HIV Genom schematisch dargestellt und die Position der beschriebenen 5'-Spleißstellen (SD1 – SD4) angegeben. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis der Analyse des HIV Genoms mit dem von Brunak et al. entwickelten Algorithmus (61). Die gefundenen 5'-Spleißstellen sind als rote Balken dargestellt und als Summe am rechten Bildrand aufgeführt. Die grünen Balken definieren die Position der Spleißakzeptoren innerhalb des HIV-1 Genoms. Die Analyse mit der Version 2.1.64 des „splicefinder“ Algorithmus beinhaltet, im Gegensatz zu der Version 1.0, eine modifizierte Bewertung einzelner Positionen der 5'-Spleißstelle, sowie eine veränderte Gewichtung von G:U Basenpaarungen und terminalen Basenpaarungen. Die gelben Balken symbolisieren sämtliche innerhalb des HIV-1 NL4-3 vorkommenden GT-Dinukleotide.

Durch den Algorithmus von Brunak et al. wurden 27 putative 5'-Spleißstellen vorhergesagt, von denen jedoch nur drei (SD1, SD3 und SD4) den tatsächlich *in vivo* genutzten Spleißdonoren entsprachen (Abb. 21, Brunak Algorithmus). Bereits die Version 1.0 des „splicefinders“ identifizierte 26 5'-Spleißstellen innerhalb des HIV-1 Genoms und erkannte dabei alle vier authentischen HIV-1 Spleißdonoren (Abb. 21, „splicefinder ver. 1.0“). Das erste Problem des Algorithmus zur Vorhersage von 5'-Spleißstellen liegt demnach in der zusätzlichen Vorhersage von „falsch Positiven“ 5'-Spleißstellen. Die innerhalb des *env* Leserahmens identifizierten „falsch Positiven“ Spleißdonorsequenzen (HIV#15 – HIV#18) wurden daher in dieser Arbeit näher analysiert. Durch Modifikation der Bewertung von G:U Basenpaarungen und terminalen Basenpaarungen konnte die Spezifität des Programmes weiter erhöht werden, so dass die aktuelle Version des „splicefinders“ innerhalb des HIV-1 Genoms nur noch 13 5'-Spleißstellen vorhersagt (Abb. 21, „splicefinder ver. 2.1.64“). Durch die erhöhte Spezifität des Algorithmus wurde jedoch auch der authentische HIV-1 Spleißdonor 2 nicht mehr erkannt.

Daraus ergab sich die Frage, warum der HIV-1 Spleißdonor 2 nicht mehr durch den Algorithmus erkannt wurde. Der Algorithmus identifiziert eine Sequenz als 5'-Spleißstelle, wenn sie, nach Bewertung des ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungsmusters, den HIV-1 Spleißdonor 4 funktionell substituieren kann. Um dies experimentell zu prüfen, wurden alle vier authentischen HIV Spleißdonorsequenz an die Position des Spleißdonors 4 kloniert und auf ihre Fähigkeit getestet eine 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression zu vermitteln. Die Immunoblot Analyse zeigt, dass die Sequenz des Spleißdonors 2 die einzige Sequenz ist, die den Spleißdonor 4 funktionell nicht ersetzen konnte (Abb. 22A vgl. SD1, SD3 und SD4 mit SD2). Die Klassifizierung des Spleißdonors 2 als „LC“ durch den Algorithmus war somit schlüssig.

Das Wasserstoffbrückenbindungsmuster (I10I2IIII) des Spleißdonors 2 legt nahe, dass aufgrund einer zu geringen Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA keine 5'-Spleißstellen vermittelte *env*-Expression möglich war. Um dies zu überprüfen, wurden Kotransfektionsexperimente mit einer kompensatorischen U1 snRNA durchgeführt, welche eine zusätzliche Basenpaarung an der Position +3 ermöglichte. Die Immunoblot Analyse zeigte, dass bei erhöhter U1 Komplementarität in der Tat eine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse detektierbar war (Abb. 22B vgl. SD2 und SD2+U16C). Jedoch blieb die Frage offen, weshalb die HIV 5'-Spleißstelle 2 *in vivo* auch durch die zelluläre U1 snRNA offensichtlich erkannt und als Spleißdonor genutzt werden kann.

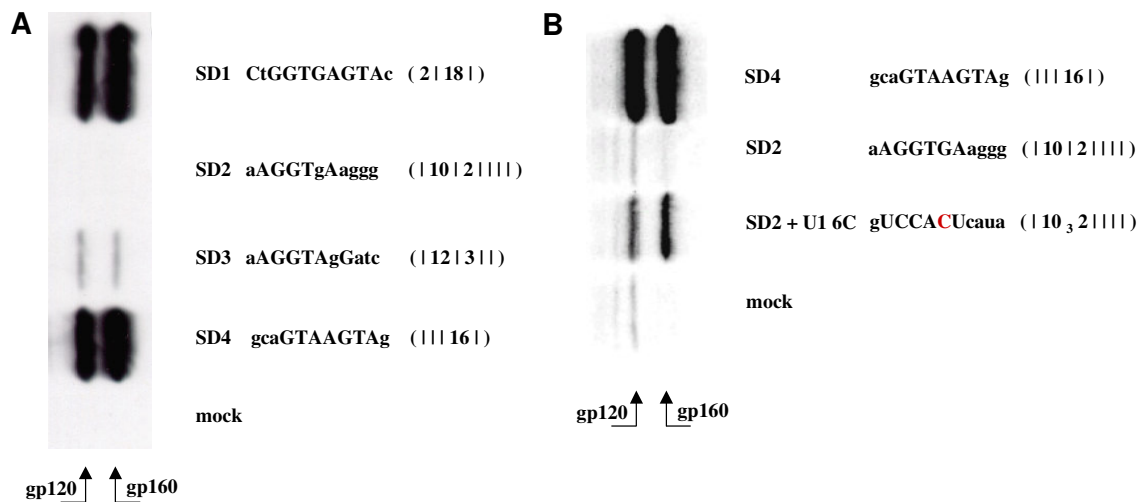



Abb. 22: (A) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control. Die HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle SD4 wurde gegen die dargestellten Sequenzen der Spleißdonoren SD2-SD4 ausgetauscht. (B) Immunoblot Analyse nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev, 1 μ g pGL3-control und 1 μ g pUCBU1. Durch die Kotransfektion der kompensatorischen U1 6C snRNA, wird eine weitere Basenpaarung an der Position +3 (rot dargestellt) ermöglicht.

Der umgekehrte Fall wird bei Betrachtung der „falsch Positiven“ 5'-Spleißstellen innerhalb des *env* Leserahmens offensichtlich. Die Abbildung 23 verdeutlicht nochmals die Änderungen der Bewertungen des Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen der „splicefinder“ Version 1.0 und der Version 2.1.64.

	5'-ss	Sequenz	„splicefinder ver. 1.0“	„splicefinder ver. 2.1.64“
* 	SD4 (-SVcrev)			
	SD4	GCAGTAAGTAG	(1 16) HC	(1 16) HC
	#15 6266	GGGGTGGAAAT	(14 4) HC	(18 11 3) LC
	#16 6326	ATTGTGGGTCA	(11 14) HC	(11 5 11) LC
	#17 6483	TTGGTAAATGT	(2 12 6) HC	(112 2 1) LC
	#18 8301	TTGGTAGGTTT	(2 17 2) HC	(110 5 1) HC

gp120 ↑ gp160 ↑

Abb. 23: Vergleichende Analyse der, innerhalb des HIV-1 *env* Gens gefundenen, potentiellen 5'-Spleißstellen #15 - #18 durch die „splicefinder“ Versionen 1.0 und 2.1.64. Immunoblot Analyse (links) des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen (s. Abb. 11).

Wurden durch die Version 1.0 noch alle vier „falsch Positiven“ 5'-Spleißstellen als „HC“ bewertet (HIV#15-HIV#18), so zeigte sich durch Einführung der Version 2.1.64 eine Reduktion der „falsch Positiven“ auf eine einzige 5'-Spleißstelle innerhalb des *env* Leserahmens. Jedoch blieb auch hier die Frage offen, weshalb die potentielle 5'-Spleißstelle HIV#18 den Spleißdonor 4 zwar funktionell ersetzen kann und folgerichtig durch den „splicefinder“ als „HC“ bewertet wird, jedoch *in vivo* nicht genutzt wird.

3.2 Der Einfluss der 5'-wärts des Spleißdonors gelegenen Sequenz auf die Rev-vermittelte env-Expression

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der intrinsisch instabilen HIV-1 *env* prä-mRNA ausübt (302). Auf der Grundlage der experimentellen Mutationsanalysen der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 (196, 302) konnte ein neuer Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA Bindungsstellen entwickelt werden (<http://www.splicefinder.net/>). Trotz den beschriebenen Modifikationen des Algorithmus konnte bisher jedoch keine vollständige Korrelation zwischen einer „HC/LC“ Bewertung durch das Programm und der tatsächlichen Nutzung/Nicht-Nutzung einer potentiellen 5'-Spleißstelle *in vivo* hergestellt werden.

Die korrekte Erkennung der Spleißstellen ist jedoch von immenser Bedeutung, da im humanen Genom ungefähr 10% aller krankheitsverursachenden Punktmutationen innerhalb von Spleißstellen auftreten (HGMD, „human gene mutation database“: <http://www.hgmd.org/>). Die Vorhersagbarkeit von Spleißstellen wird zusätzlich erschwert, da ungefähr 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden (355, 404), wodurch die Proteom Komplexität signifikant erhöht wird (44, 440). Die Regulation des alternativen Spleißens kann sowohl zelltyp-, als auch entwicklungs-, oder geschlechtsspezifisch erfolgen (84, 593). Des weiteren wurden zahlreiche, krankheitsassoziierte Mutationen außerhalb von Spleißstellen beschrieben ((12, 83, 340, 617), für eine Übersicht s. (177)), welche zu einem verändertem Spleißverhalten führten, sei es durch Ausschluss eines internen, konstitutiven Exons (565) oder durch Einschluss eines zusätzlichen Exons (476). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die selektive Erkennung einer 5'-Spleißstelle nicht nur in der 11 Nukleotide langen U1 komplementären Sequenz kodiert sein kann (371), sondern dass weitere *cis*-wirkende Sequenzelemente innerhalb der prä-mRNA an der Auswahl alternativer 5'-Spleißstellen beteiligt sein müssen.

In dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Mutationsanalyse auf Sequenzen außerhalb der 5'-Spleißstelle ausgedehnt, um weitere Voraussetzungen für die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP zu charakterisieren. Bezogen auf das HI-Virus würde dies bedeuten, dass es weitere Sequenzen außerhalb der 5'-Spleißstelle SD4 geben könnte, deren Mutation das empfindliches Gleichgewicht zwischen ungespleißter und gespleißter RNA stören könnte und dadurch die Expression des viralen Hüllproteins inhibiert

werden würde. Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in Fachzeitschriften publiziert (78, 196, 302) oder auf Tagungen vorgestellt (s. Abschnitt Publikationen).

3.2.1 Die potentielle U1 snRNA Bindestelle HIV#18 wird aufgrund ihrer 5'-wärts liegenden Sequenz nicht erkannt

Anhand der bisherigen Ergebnissen konnte nicht geklärt werden, weshalb die durch den Algorithmus als „high complementarity“ klassifizierte potentielle U1 snRNA Bindungsstelle HIV#18 *in vivo* nicht genutzt wird. Um zu untersuchen, ob weitere, außerhalb der 11 Nukleotide der Spleißdonorsequenz liegende, Sequenzen einen Einfluss auf die Nutzung von potentiellen 5'-Spleißstellen haben, wurde die 5'-wärts des authentischen HIV-1 Spleißdonors 4 lokalisierte Sequenz gegen die „upstream“ Sequenz der potentiellen U1 snRNA Bindungsstelle HIV#18 ausgetauscht (Abb. 24).

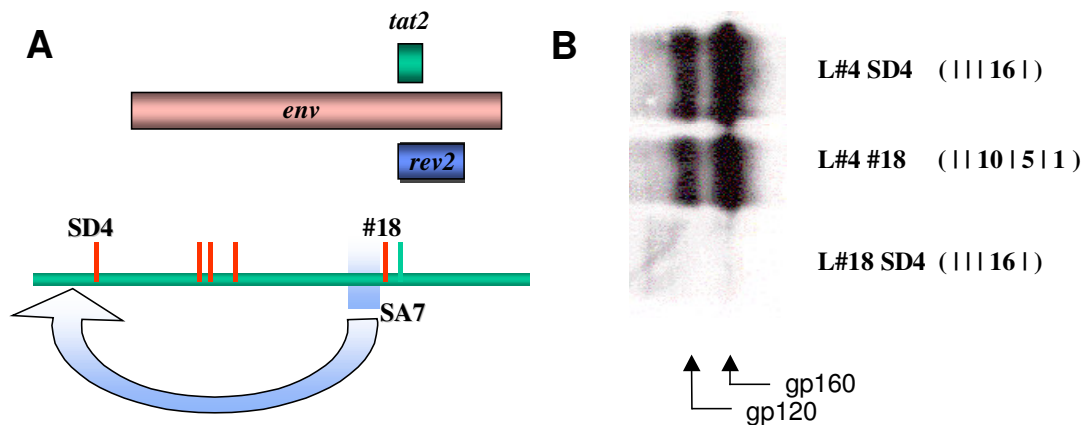


Abb. 24: (A) Schematische Darstellung der Konstruktion des L#18 SD4 Vektors. Die stromaufwärts der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 gelegene Sequenz wurde gegen die Region „upstream“ der potentiellen 5'-Spleißstelle HIV#18 ausgetauscht. Die roten Balken definieren die Position der potentiellen 5'-Spleißstellen innerhalb des HIV-1 *env* Gens und der grüne Balken die Position der 3'-Spleißstelle SA7. (B) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control. Die Nomenklatur der Konstrukte gibt die stromaufwärts der 5'-Spleißstelle gelegene Sequenz (L#4, L#18, „leader“) und die Sequenz der 5'-Spleißstelle an (SD4, #18).

Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen und anschließender Analyse der Zellextrakte im Immunoblot, ließ sich erwartungsgemäß sowohl für das Ausgangskonstrukt mit der HIV-1 5'-Spleißstelle 4 in Gegenwart ihrer authentischen „upstream“ Sequenz (L#4 SD4), als auch für das Konstrukt, bei dem die Sequenz des Spleißdonors 4 gegen die funktionelle U1 snRNA Bindungsstelle HIV#18 substituiert worden war (L#4 HIV#18), eine deutliche *env*-

Expression detektieren (Abb. 24, vgl. Spur 1 und 2). Der Austausch der „upstream“ Sequenz des Spleißdonors 4, gegen die 5'-wärts der HIV#18 Bindungsstelle liegende Sequenz identischer Länge (L#18 SD4), führte hingegen zu einem Verlust der Nachweisbarkeit der Glykoprotein Expression in der Immunoblot Analyse (Abb. 24, Spur 3). Die *env*-Expression konnte auch nicht durch Kotransfektion einer Suppressor U1 snRNA unter Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass auch die 5'-wärts der Spleißdonorsequenz gelegene Sequenz einen entscheidenden Einfluss auf die Nutzung der „downstream“ liegenden 5'-Spleißstelle ausübt. Es wäre einerseits denkbar, dass innerhalb der HIV#18 „leader“-Sequenz (L#18) inhibitorische Elemente enthalten sind, welche eine Bindung des U1 snRNPs an seine Bindungsstelle verhindern, oder andererseits, dass die „upstream“ Sequenz des Spleißdonors 4 die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle fördert.

3.2.2 Für eine effiziente 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression ist die Anwesenheit der Exon 5 Sequenz „upstream“ des SD4 notwendig

Um zu untersuchen, ob innerhalb der 5'-wärts des SD4 gelegenen Sequenz aktivierende Elemente enthalten sind, welche eine Bindung des U1 snRNPs fördern könnten, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden Konstrukte kloniert, welche zwar die identische Sequenz der 5'-Spleißstelle 4 besitzen, sich jedoch in der Länge der HIV-1 Sequenzen stromaufwärts davon unterscheiden (Abb. 25).

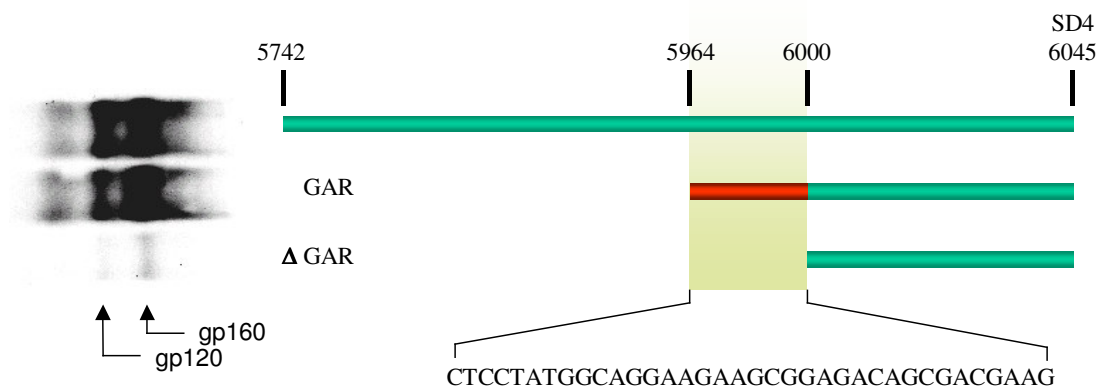


Abb. 25: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transients Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen unter Verwendung von FuGeneTM6 mit jeweils 1 μ g *env*-Expressionsplasmid, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control (links). In dem rechten Teil der Abbildung sind die untersuchten *env*-Expressionsplasmide schematisch dargestellt. Die für die *env*-Expression essentielle Region (GAR) stromaufwärts der HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle SD4 ist farblich hervorgehoben. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 in der HIV Datenbank von Myers et al (446).

Da diese Deletionen innerhalb des *tat/rev* Exons liegen, enthielten sämtliche Konstrukte einen Tat unabhängigen SV40 Promotor. Gleiche Mengen an funktionalem Rev-Protein wurden durch Kotransfektion eines Rev-Expressionsplasmids gewährleistet. Die Transfektionsexperimente der Konstrukte zeigen, dass, ausgehend von dem parentalen Konstrukt SV E/X *tat⁻ rev⁻*, eine Deletion der 222 Nukleotide von Position 5742-5964 (die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 in der HIV Datenbank von Myers et al (446)) keinen Einfluss auf die *env-Expression* ausübte (Abb. 25, Spur 2). Hingegen führte eine weitere Deletion von nur 36 Nukleotiden (Position 5964-6000) zu einer drastischen Reduktion an exprimiertem Glykoprotein (Abb. 25, Spur 3).

Diese innerhalb des Leserahmens für *tat* und *rev* liegende Sequenz ist Purin-reich und besteht aus mehreren Wiederholungen der Nukleotidabfolge GAR (R: Purin). Ein solches Sequenzmotiv wurde bereits als Bindungsstelle für SR-Proteine beschrieben (166, 357, 663). Aufgrund der Ähnlichkeit dieses GAR Motivs mit bereits charakterisierten Bindungssequenzen für das SR-Protein SF2/ASF innerhalb „exonic splicing enhancer“ (ESE) (374, 603, 604), wurde eine Bindung des humanen Spleißfaktors SF2/ASF an die GAR-Motive untersucht (Abb. 26).

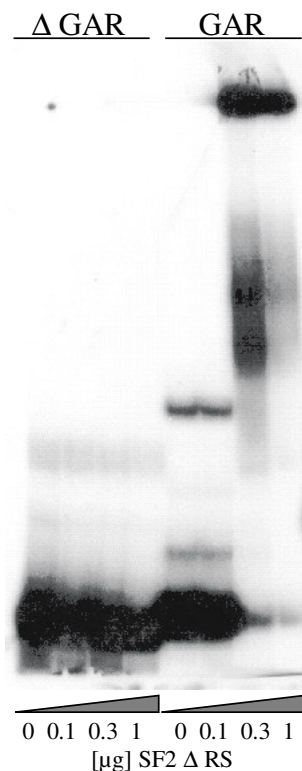


Abb. 26: Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) der Konstrukte in An- (GAR) und Abwesenheit (Δ GAR) der 36 Nukleotide langen Sequenz stromaufwärts der *tat/rev* 5'-Spleißstelle SD4. Die Konstrukte wurden 3'-wärts der 5'-Spleißstelle linearisiert und *in vitro* unter Einbau von [α - 32 P] UTP transkribiert. Die Transkripte wurden in 6% Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Rekombinantes SF2 Δ RS Protein wurde aus mit pDS-H6F1-SF2 Δ RS transformierten *Escherichia coli* M15 (pREP4) isoliert. In 10 μ l Reaktionsvolumen wurden jeweils ca. 1 μ l der [32 P]-UTP markierten Transkripte (300 cps) mit 5 μ l 2 x EMSA-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,9; 200 mM KCl; 4 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 2 mM DTT, 20% Glycerin; 100 ng/ μ l tRNA) mit ansteigenden Mengen an SF2 Δ RS-Protein in SF2-Puffer (0,5 M GuHCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,9, 42 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 15% Glycerin, 1 mM PMSF) für 15 min bei 20°C inkubiert. Die RNA/Protein-Komplexe wurden in einem nativen 5% TBE-Polyacrylamid-Gel (Proto-Gel Ultrapure, National Diagnostics) bei 4°C und maximal 5 W/300 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden vakuumgetrocknet und die Gel-Retardation durch Röntgen-Film (Hyperfilm-MPTM, Amersham) Exposition analysiert.

Hierzu wurden sowohl das Konstrukt mit den GAR Sequenzwiederholungen (SV-env/GAR), als auch die Deletionsmutante (SV-env), 3'-wärts der 5'-Spleißstelle linearisiert und [³²P]-markierte *in vitro* Transkripte hergestellt. Die radioaktiv markierten Transkripte wurden anschließend mit steigenden Mengen an rekombinantem SF2/ASF-Protein, welches eine Deletion der RS-Domäne aufwies um RS-Domänen vermittelte Protein-Protein Interaktionen auszuschließen, inkubiert. Das Laufverhalten der gebildeten RNA/Protein-Komplexe wurde unter nativen Bedingungen in der Polyacrylamid Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigten, dass nur das GAR-haltige Transkript aufgrund einer Komplexformation mit dem SR-Protein ein retardiertes Laufverhalten aufwies (Abb. 26, vgl. GAR und ΔGAR), wodurch bestätigt wurde, dass SF2/ASF an die GAR Sequenzwiederholungen binden kann.

3.2.3 Die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle SD4 ist von deren Komplementarität und den GAR Sequenzmotiven abhängig

Die Experimente haben gezeigt, dass für eine effiziente *env*-Expression nicht nur eine ausreichende Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA bestehen muss, sondern zusätzlich auch geeignete SR-Protein Bindungsstellen stromaufwärts des Spleißdonors notwendig sind. Um auszuschließen, dass die beobachtete Verminderung der *env*-Expression nicht auf der Unterschreitung eines kritischen Abstandes der 5'-Spleißstelle zu der „5'-cap“ Struktur basierte, wurden, unter Beibehaltung der Länge der „leader“-Sequenz, vier der GAR Motive zu CAR mutiert. Die Immunoblot Analyse der mit diesem Konstrukt transfizierten HeLa-T4⁺ Zellen, zeigte ebenfalls eine deutlich reduzierte *env*-Expression (Abb. 27A, Spur 5 und Abb. 27B, Spur 2), so dass ein Einfluss der Entfernung der 5'-Spleißstelle zu der „cap“-Struktur ausgeschlossen werden konnte. Die verminderte *env*-Expression konnte, wie bei den Mutationen der 5'-Spleißstelle, in Northernblot Analysen auf eine verminderte Stabilität der Glykoprotein mRNA zurückgeführt werden (302).

Da sowohl eine zu geringe Komplementarität der 5'-Spleißstelle, als auch das Fehlen einer geeigneten „leader“-Sequenz zu einer verminderten Stabilität der Glykoprotein mRNA führten, lag die Vermutung nahe, dass die Degradation der prä-mRNA in beiden Fällen durch eine ausbleibende RNA-Duplex Bildung mit der U1 snRNA verursacht worden war. Um zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit zwischen der „leader“-Sequenz und der

Komplementarität der 5'-Spleißstelle besteht, wurden die RNA-Duplex Bildung in An- und Abwesenheit eines funktionellen GAR Motivs getestet.

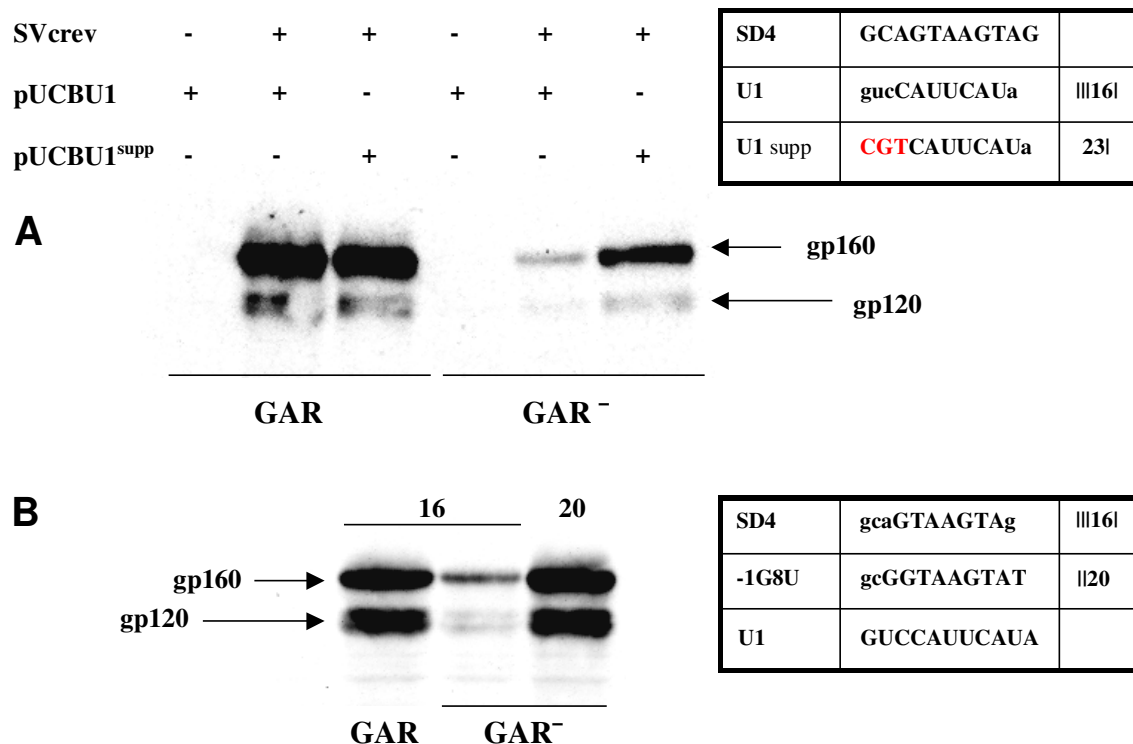


Abb. 27: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins. **(A)** 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen wurden unter Verwendung von FuGeneTM6 mit 1 μ g des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 μ g pUCBU1, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control nach dem angegebenen Transfektionsschema (+, -) transient transfiziert. Die Konstrukte besitzen die authentische HIV-1 5'-Spleißstelle SD4, unterscheiden sich jedoch in der stromaufwärts davon gelegenen Sequenz (GAR, GAR⁻). Das U1 snRNA Expressionsplasmid pUCBU1^{supp} kann, im Gegensatz zu der Wildtyp U1 snRNA (pUCBU1), zusätzliche Basenpaarungen mit den Positionen -3 bis -1 (rot dargestellt) der 5'-Spleißstelle ausbilden. **(B)** Die analysierten Konstrukte unterscheiden sich sowohl in der Sequenz der HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle (SD4, -1G8U), als auch in der stromaufwärts gelegenen Sequenz (GAR, GAR⁻). Die Sequenzen der 5'-Spleißstellen, sowie die Summe an möglichen ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (16, 20), sind am rechten Bildrand aufgeführt. Mögliche Basenpaarungen zu der U1 snRNA sind in Großbuchstaben gedruckt.

Die Immunoblot Analyse der Transfektionsexperimente zeigte, dass sich die Rev-abhängige *env*-Expression durch die Mutation des GAR Motivs zu CAR (GAR⁻) deutlich reduzieren ließ (Abb. 27A, vgl. Spur 2 und 5 bzw. Abb. 27B, vgl. Spur 1 und 2). Durch Kotransfektion einer mutierten U1 snRNA, welche eine Komplementarität zu der 5'-Spleißstelle SD4 an den Positionen -3 bis +7 aufwies, ließ sich die bereits maximale *env*-Expression des Ausgangskonstruktes nicht mehr steigern (Abb. 27A, vgl. Spur 2 und 3). Hingegen führte die Kotransfektion dieser U1 snRNA bei dem Konstrukt mit nicht funktionellen GAR Wiederholungen zu einer teilweisen Wiederherstellung der Glykoprotein Expression (Abb. 27A: vgl. Spur 5 und 6).

Um zu bestätigen, dass das Fehlen der GAR-Motiv Wiederholungen durch eine erhöhte Anzahl an komplementären Basen zu der U1 snRNA kompensiert werden kann, wurde die *env*-Expression des Konstruktes SV E/X $\text{tat}^- \text{rev}^- \text{GAR}^- \text{cs-1}^{20}$, welches zwar die Mutation des GAR-Motives trägt, jedoch, im Vergleich zu dem Spleißdonor 4, zwei zusätzliche Basenpaarungen zu der U1 snRNA ausbilden kann, untersucht. Wie in Abbildung 27B gezeigt, ließ sich durch die zwei zusätzlichen Basenpaarungen eine zum Ausgangskonstrukt vergleichbare *env*-Expression erzielen (Abb. 27B, vgl. Spur 1 und 3). Demnach ließ sich eine suboptimale „leader“-Sequenz durch die Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA kompensieren.

3.2.4 Die GAR Sequenzwiederholungen wirken *in vitro* als SF2/SRp40 abhängiger „exonischer splicing enhancer“

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass die Purin-reichen GAR Sequenzwiederholungen innerhalb des HIV-1 Exons 5 die Expression der *env* mRNA, möglicherweise durch eine SF2-abhängige Rekrutierung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle, verstärkten. Um diesen potentiellen „Exon splicing enhancer“ (ESE) näher zu charakterisieren, wurde in Kollaboration mit Dr. Massimo Caputi die GAR Sequenz 3'-wärts des distalen Exons in ein, aus dem *Drosophila melanogaster doublesex (dsx)* Gen abgeleitetes, „enhancer“-abhängiges Minigen Konstrukt kloniert (Abb. 28A). Dieses System wird häufig als Spleißreporter verwendet, da das Intron des *dsx* Gen, aufgrund einer schwachen 3'-Spleißstelle, nur effizient gespleißt werden kann, wenn sich ein SR-abhängiger „enhancer“ innerhalb des „downstream“ liegenden Exons befindet (235, 621, 622).

Die Ergebnisse der, in HeLa Kernextrakt durchgeführten, *in vitro* Spleißreaktionen zeigten, dass das Substrat ohne 3'-wärts gelegenen „enhancer“ (*dsx*- Δ E) zu keinem detektierbarem gespleißten Produkt führte (Abb. 28B, Spur 1). Die Insertion eines bereits beschriebenen ESE-Elements aus dem aviären Leukose-Sarkom-Virus (ASLV), führte hingegen zu einer Aktivierung des Spleißens (Abb. 28B, Spur 2). Diese Aktivierung erfolgte durch die Stabilisierung der an die schwache 3'-Spleißstelle gebundenen Spleißfaktoren durch die ESE-gebundenen SR-Proteine (233, 622). Das GAR-Fragment enthaltende Spleißsubstrat (*dsx*-GAR) wies eine zu der Positivkontrolle (*dsx*-ASLV) vergleichbare Spleißeffizienz in HeLa Kernextrakt auf (Abb. 28B, Spur 3), welche die vermutete ESE Funktion der GAR

Sequenzmotive bestätigte. Bei Durchführung vergleichbarer Experimente in Abwesenheit von SR-Proteinen in einem cytoplasmatischen HeLa S100 Extrakt, ließ sich kein Spleißprodukt detektieren, wodurch die SR-Abhängigkeit des GAR „enhancers“ bestätigt wurde (Abb. 28B, Spur 4). Komplementationsexperimente zeigten, dass sich die Spleißdefizienz in dem S100 Extrakt durch Zugabe einer Gesamt SR-Protein Präparation (Abb. 28B, Spur 5) oder durch einzelne Zugabe von SF2/ASF (Abb. 28B, Spur 7) oder SRp40 (Abb. 28B, Spur 8) aufheben ließ. Eine Aktivierung durch die SR-Proteine SC35, SRp55, oder SRp70 ließ sich hingegen nicht detektieren (Abb. 28B, Spur 6, 9 und 10).

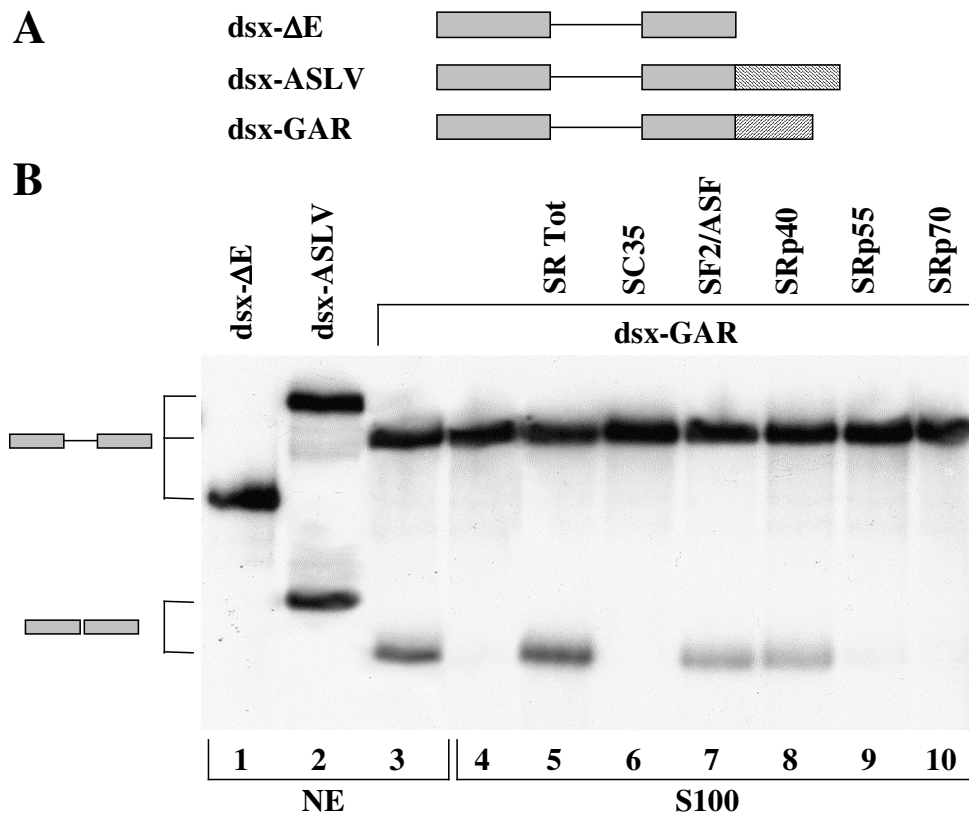


Abb. 28: (A) Schematische Darstellung der für die *in vitro* Spleißreaktion verwendeten Konstrukte. Die GAR Sequenz befindet sich 3'-wärts des distalen Exons in einem, aus dem *Drosophila melanogaster doublesex* (*dsx*) Gen abgeleiteten, „enhancer“-abhängigen Minigen Konstrukt (*dsx*-GAR). Das *dsx*-ASLV Konstrukt enthält ein ESE-Element aus dem aviären Leukose-Sarkom-Virus (ASLV), während das *dsx*- Δ E Konstrukt keine ESE Sequenz besitzt. (B) *In vitro* Spleißreaktion der unter (A) beschriebenen Konstrukte in HeLa Kernextrakt (NE, Spur 1-3) oder in SR-Protein depletiertem S100 Extrakt (Spur 4-10). Der S100 Extrakt wurde durch Zugabe einer Gesamt SR-Protein Präparation (Spur 5) oder durch einzelne SR-Proteine (Spur 6-10) komplementiert. Sämtliche SR-Protein Präparationen konnten die Spleißaktivität einer β -Globin mRNA in S100 Extrakt komplementieren (Daten nicht gezeigt). Die obere Bande entspricht jeweils dem ungespleißten, intronhaltigen Substrat und die untere Bande dem gespleißten Produkt (s. schematische Darstellung am linken Bildrand).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die GAR Sequenzwiederholungen als SF2/SRp40 abhängiger „exon splicing enhancer“ wirken. Darüber hinaus scheint diese Wirkung bidirektional zu sein, da durch dieses Element sowohl eine Aktivierung der 5'-Spleißstelle (Abb. 25), als auch der 3'-Spleißstelle (Abb. 28B) vermittelt wurde.

3.2.5 Die GAR Sequenzwiederholungen unterstützen die Bindung des U1 snRNPs an die 3'-wärts gelegene 5'-Spleißstelle SD4

Um zu überprüfen, ob die für die 3'-Spleißstelle ermittelte SF2/SRp40 Abhängigkeit des GAR „enhancers“ auch auf die HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 zutrifft, wurden weitere Mutationsanalysen der GAR Sequenzwiederholungen durchgeführt. Um die potentiellen SR-Protein Bindungsstellen gezielt mutieren zu können, wurde das GAR Fragment mit Hilfe des „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) analysiert (86). Der „ESE-Finder“ Algorithmus, welcher auf funktionellen SELEX Experimenten basiert, ermittelte innerhalb des GAR Elementes zwei SF2/ASF, eine SRp40 und eine SRp55 Bindungsstelle. Um zu untersuchen, welchen Einfluss diese Bindungsstellen auf die Erkennung der 5'-Spleißstelle SD4 durch das U1 snRNP ausüben, wurden die in Abbildung 29A dargestellten Mutationen in den *env*-Expressionsvektor SV-*env*/GAR eingeführt. Als Negativkontrolle diente die „upstream“ der potentiellen U1 snRNA Bindungsstelle HIV#18 liegende Sequenz identischer Länge, welche die Erkennung der 5'-Spleißstelle nicht unterstützen konnte (Abb. 29A, hiv#18).

Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ mit diesen Konstrukten und anschließender Immunoblot Analyse zeigte sich, dass die Wildtyp GAR Sequenz zu einer effizienten *env*-Expression führte (Abb. 29B, Spur 1), während die Substitution der GAR Sequenz mit der 5'-Sequenz der potentiellen U1 snRNA Bindestelle HIV#18 die Expression des Glykoproteins nicht unterstützte (Abb. 29B, Spur 2). Hingegen zeigte die Mutation der potentiellen SRp55 Bindungsstelle keinen Einfluss auf die *env*-Expression (Daten nicht gezeigt), wodurch die in Abbildung 28B dargestellten Ergebnisse nochmals bestätigt wurden (vgl. Abb. 28, Spur 9). Demnach fand entweder keine Bindung von SRp55 an das GAR Fragmentes statt, oder dessen Bindung übte weder einen Einfluss auf die Nutzung der 5'-, noch auf die 3'-Spleißstelle aus. Die Inaktivierung der vorhergesagten SRp40 Bindungsstelle führte zu einer dreifachen Reduktion der *env*-Expression (Abb. 29B, Spur 3). Der Effekt der Mutation der beiden SF2 Bindungsstellen, bzw. der SF2/SRp40 Doppelmutation, zeigte mit

einer 30- bzw. 12-fachen Reduktion einen noch eindeutigeren Einfluss der 5'-wärts liegenden SR-Protein Bindungsstellen auf die Expression des HIV-1 Glykoproteins (Abb. 29B, Spur 4 und 5). Darüber hinaus konnte in Kollaboration mit Dr. Massimo Caputi in RNA Affinitäts-Chromatographie Untersuchungen gezeigt werden, dass die Menge an detektiertem Glykoprotein mit der Menge an gebundenem U1 snRNP korrelierte (Abb. 29B, unterer Teil).

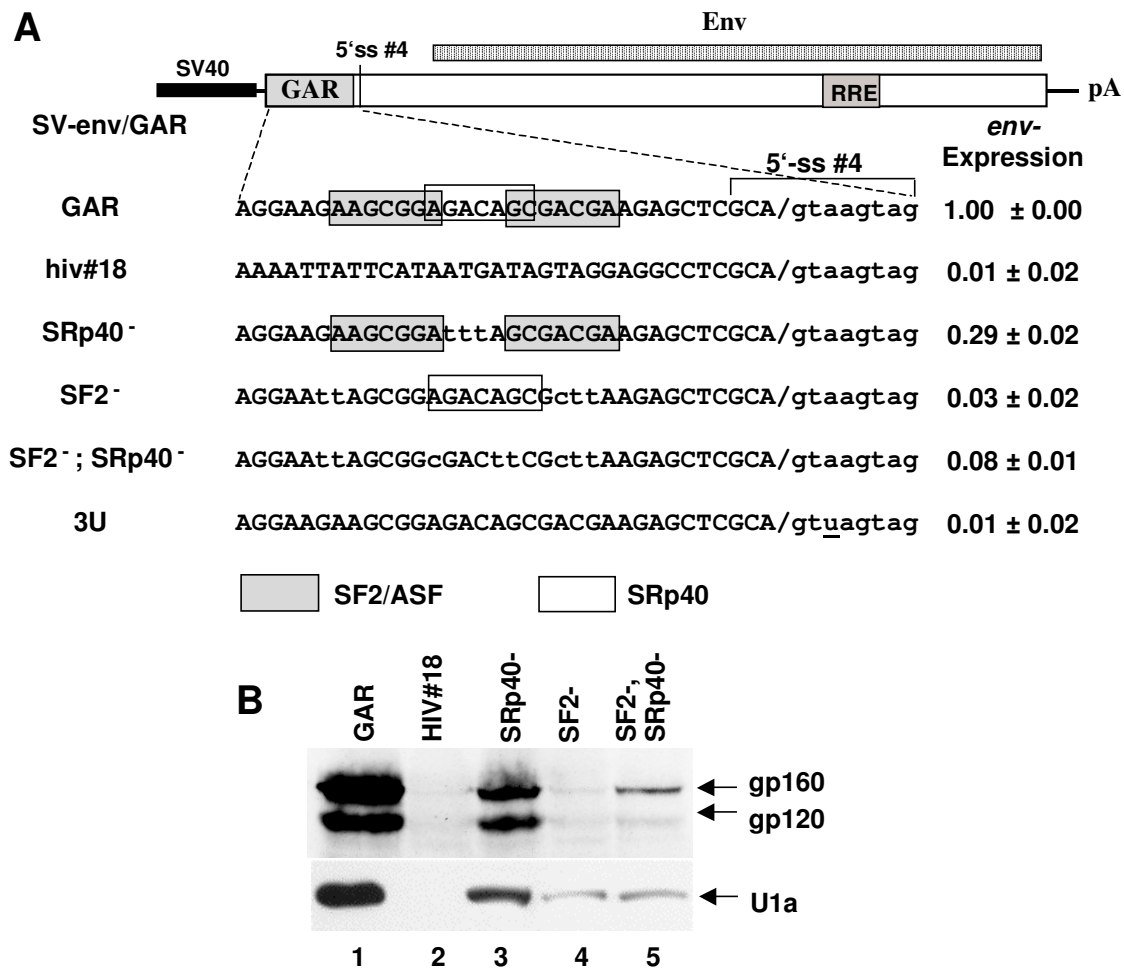


Abb. 29: (A) Schematische Darstellung der verwendeten SV-env/GAR Konstrukte. Die Konstrukte enthalten den offenen Leserahmen des *env* Gens und das stromaufwärts gelegene GAR-ESE-Element flankiert von einem SV40 „early“ Promotor (SV40) und der SV40 Polyadenylierungsstelle (pA). Die durch den „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86) vorhergesagten SR-Protein Bindungsstellen sind innerhalb der jeweiligen Sequenzen markiert (grau: SF2/ASF, weiß: SRp40). Die unter (B) dargestellte Immunoblot Analyse wurde unter Verwendung des Lumi-Imagers F1 (Roche Molecular Biochemicals) und der LumiAnalyst™ 3.1 Software quantifiziert (linker Bildrand). (B) Im oberen Teil der Abbildung ist die Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins der unter (A) dargestellten Konstrukte gezeigt. 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen wurden unter Verwendung von FuGene™6 mit 1 µg des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 µg SVcrev und 1 µg pGL3-control transient transfiziert. Im unteren Teil der Abbildung ist die Bindung des U1 snRNPs an die HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle SD4 dargestellt. *In vitro* Transkripte der Konstrukte wurden an Adipinsäure-Dihydrazid-Agarose (Sigma) kovalent gebunden und mit HeLa Kernextrakt inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, in einem SDS-Polacrylamidgel aufgetrennt und mit einem U1-A spezifischen Antikörper detektiert.

Um zu prüfen, ob durch die Mutationen der SF2 und SRp40 Bindungsstellen auch die *in vitro* Spleißeffizienz betroffen ist, wurden die gleichen Mutationen auch in den *Drosophila dsx*-Konstrukte untersucht. In Analogie zu den hier vorgestellten Immunoblot Analysen konnte auch in dem *in vitro* „Spleißassay“ gezeigt werden, dass die Mutation der SRp40 Bindungsstelle zu einer intermediären Reduktion der Spleißeffizienz führt, während die Mutation der beiden SF2 Bindungsstellen bzw. die SF2/SRp40 Doppelmutation eine stärkere Reduktion der Spleißeffizienz bewirkte (Daten nicht gezeigt) (78). Somit wurde durch die Mutation der SF2 und SRp40 Bindungsstellen innerhalb des GAR „enhancers“ nicht nur die Rekrutierung des U1 snRNPs an die „downstream“ gelegene 5'-Spleißstelle SD4 *in vivo* beeinflusst, sondern auch die *in vitro* Spleißeffizienz, durch Regulation der „upstream“ gelegenen schwachen 3'-Spleißstelle, im *Drosophila dsx* System.

Weitere Untersuchungen in unserem Labor konnten zeigen, dass die Bidirektionalität des SF2/SRp40-abhängigen GAR „enhancer“ auch in der authentischen Sequenzumgebung innerhalb des HIV-1 Exon 5 genutzt wird. Eine RT-PCR Analyse der Spleißmuster verschiedener 3-Exon-2-Intron Minigen Konstrukte, welche das HIV-1 Exon 1, eine Deletion der *gag-pol* Region und den vollständigen *ref-env-nef* Leserahmen enthielten, zeigte, dass das mittlere Exon nur in Gegenwart eines funktionellen GAR Motivs korrekt erkannt wird. Ein „exon skipping“ konnte auch durch Mutation der 5'-Spleißstelle (3U Mutation) erzielt werden (Daten nicht gezeigt) (78).

3.2.6 Die GAR Sequenzwiederholungen können durch ein MS2-SR/MS2 Bindungs-System funktionell ersetzt werden

Die Analysen der *env*-Expression und der U1 snRNP Bindung hatten gezeigt, dass die Mutation sowohl der SF2-, als auch der SRp40-Bindungsstelle einen geringeren Einfluss ausübten als die alleinige Mutation der SF2 Bindungsstellen (Abb. 29B, vgl. Spur 5 und 4). Diese geringfügig erhöhte *env*-Expression der SF2⁻/SRp40⁻ Doppelmutation könnte auf der Entstehung einer neuen suboptimalen SR-Protein Bindungsstelle oder auf einer Erhöhung der mRNA Stabilität beruhen. Um nochmals zu bestätigen, dass für eine effiziente *env*-Expression die Bindung dieser SR-Proteine stromaufwärts der 5'-Spleißstelle SD4 notwendig ist, wurde die GAR Sequenz innerhalb des *env*-Expressionsvektors SV-*env*/GAR gegen eine (SV-*env*/M1) bzw. zwei Bindungssequenzen (SV-*env*/M2) für das Hüllprotein des MS2 Bakteriophagen substituiert (Abb. 30A). In einem weiteren Hybridprotein-

Expressionsplasmid wurde das MS2-Hüllprotein an die RS-Domäne des SF2- (MS2-SF2), bzw. des SRp-40 Proteins (MS2-SRp40), fusioniert (Abb. 30B) (Carolin Konermann, Diplomarbeit). Von diesem Hybrid-System konnte bereits gezeigt werden, dass es eine funktionelle ESE/SR-Protein Interaktion effizient ersetzen kann (235). Um einen nukleären Transport des Fusionsproteins zu gewährleisten, wurde es N-terminal mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) versehen.

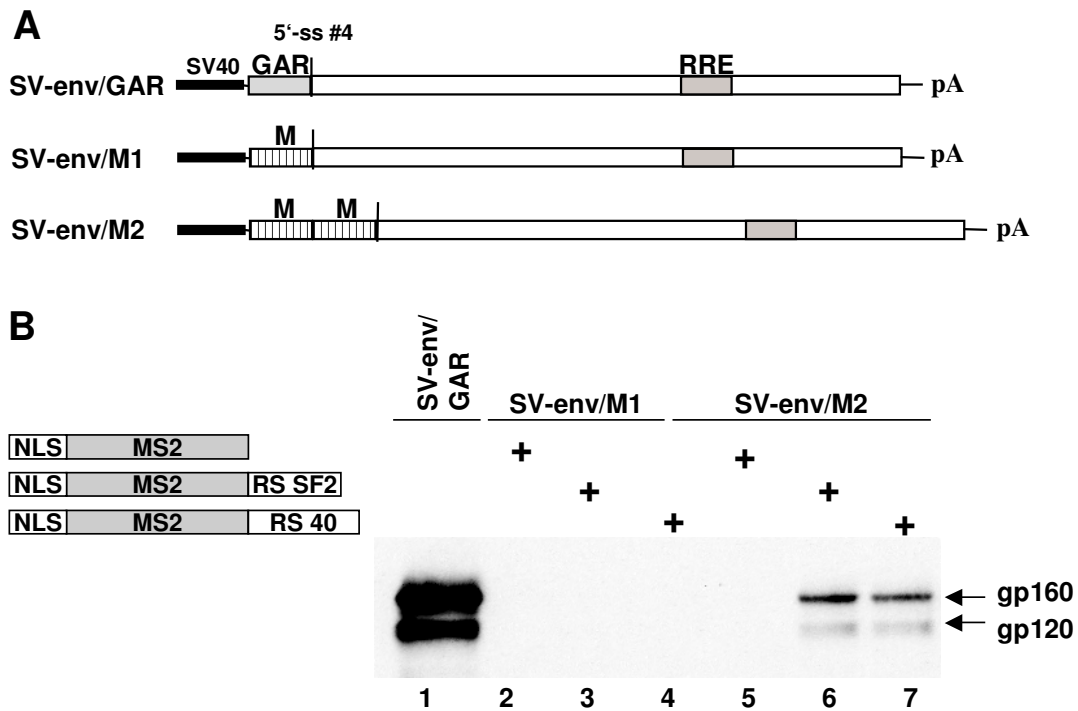


Abb. 30: (A) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte, bei denen das GAR-ESE-Element gegen eine (SV-env/M1) bzw. zwei (SV-env/M2) Bindungsstellen für das MS2 Protein ausgetauscht wurde. (B) Schematische Darstellung der MS2-Hybridproteine (links). Das MS2-Hüllprotein wurde N-terminal mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) versehen und C-terminal wurde die RS-Domäne des SF2- (MS2-SF2), bzw. des SRp-40 Proteins (MS2-SRp40), fusioniert. Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (rechts). 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen wurden unter Verwendung von FuGeneTM6 mit 1 μ g des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 μ g MS2-Fusionsprotein, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control nach dem angegebenen Transfektionsschema (+, -) transient transfiziert

Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten und anschließender Immunoblot Analyse zeigte sich, dass die Substitution der GAR Sequenz gegen eine MS2-Bindungsstelle weder unter Kotransfektion des MS2-SF2-, noch durch das MS2-SRp40 Expressionsplasmid zu einer detektierbaren *env*-Expression führte (Abb. 30B, Spur 3 und 4). Durch Ersetzen der GAR-Sequenz gegen zwei MS2-Bindungsstellen konnte hingegen die *env*-Expression in beiden Fällen wiederhergestellt werden (Abb. 30B, Spur 6 und 7). Die Kotransfektion eines Expressionsplasmids für ein MS2-Protein ohne SR-Domäne führte

erwartungsgemäß zu keiner Expression des HIV Glykoproteins (Abb. 30B, Spur 2 und 5). Die Untersuchungen der *env*-Expression in dem MS2-Hybrid-System bestätigten somit nochmals die SF2/SRp40 Abhängigkeit des GAR „enhancers“. Darüber hinaus ließen die Ergebnisse vermuten, dass zwei Protein-Bindungsstellen 5'-wärts des HIV-1 Spleißdonors 4 für eine effiziente Bindung des U1 snRNPs, und der daraus resultierenden *env*-Expression, notwendig sind.

3.2.7 Eine funktionelle „upstream“ Sequenz weist mindestens zwei SR-Protein Bindungsstellen 5'-wärts der 5'-Spleißstelle SD4 auf

Die in Abbildung 30B vorgestellten Ergebnisse hatten gezeigt, dass sich die GAR Sequenz nicht durch eine einzelne MS2-Bindungsstelle funktionell substituieren ließ (Abb. 30B, Spur 3 und 4). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass dieses Ergebnis auf einer kooperativen Bindung der MS2-Fusionsproteine an ihre Zielstruktur zurückzuführen ist, wurden unter Verwendung des „ESE-Finder“ hoch affine SR-Protein Bindungsstellen generiert, welche anstelle des GAR-ESE in das *env*-Expressionsplasmid SV-*env*/GAR kloniert wurden (SV-*env*/SF2, SV-*env*/SC35, SV-*env*/SRp40 und SV-*env*/SRp55). Sämtliche anderen potentiellen SR-Protein Bindungssequenzen innerhalb der 5'-wärts des SD4 liegenden Sequenz wurden, unter Beibehaltung der Gesamtlänge, in diesen Konstrukten mutiert. Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Expressionsplasmiden und anschließender Immunoblot Analyse ließ sich für keines der Konstrukte eine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse nachweisen (Abb. 31, vgl. Spur 1 und Spur 2-5).

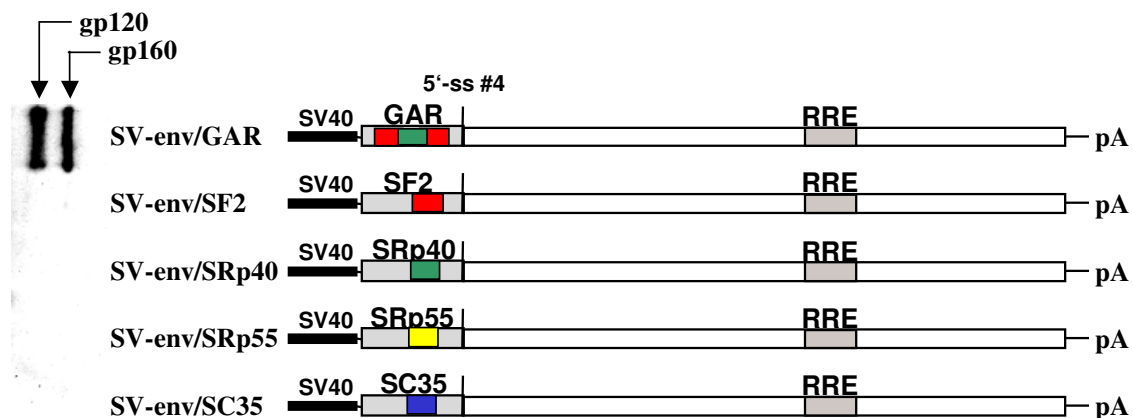


Abb. 31: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μ g des *env*-Expressionsvektors (rechts), 1 μ g SV*crev* und 1 μ g pGL3-control. Die Konstrukte enthalten stromaufwärts der 5'-Spleißstelle SD4 entweder das vollständige GAR-ESE (SV-*env*/GAR) oder einzelne SR-Protein Bindungsstellen (SF2, SRp40, Srp55, SC35).

Da die Untersuchungen an dem MS2-Hybrid-System die Vermutung nahe gelegt hatten, dass mindestens zwei funktionelle SR-Protein Bindungsstellen in der Sequenz „upstream“ des Spleißdonors 4 für eine effiziente *env*-Expression notwendig sind, wurden die genannten Konstrukte um jeweils eine weitere SR-Protein Bindesequenz ergänzt (SV-*env*/SF2-SF2, SV-*env*/SF2-SRp40 usw.) und ebenfalls im Immunoblot analysiert (Abb. 32).

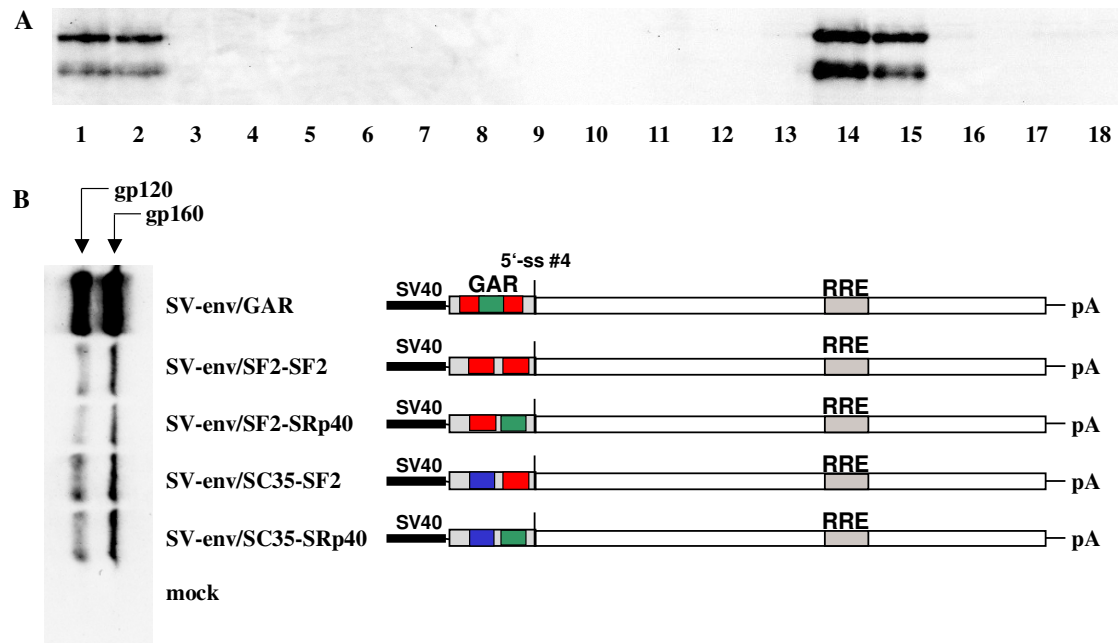


Abb. 32: (A) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μ g des *env*-Expressionsvektors, 1 μ g SV $crev$ und 1 μ g pGL3-control. Die Konstrukte enthalten stromaufwärts der 5'-Spleißstelle SD4 jeweils eine Kombination aus zwei SR-Protein Bindungsstellen. (1) SV-*env*/SF2-SF2/SD4, (2) SV-*env*/SF2-SRp40/SD4, (3) SV-*env*/SF2-SRp55/SD4, (4) SV-*env*/SF2-SC35/SD4, (5) SV-*env*/SRp40-SF2/SD4, (6) SV-*env*/SRp40-SRp40/SD4, (7) SV-*env*/SRp40-SRp55/SD4, (8) SV-*env*/SRp40-SC35/SD4, (9) mock, (10) SV-*env*/SRp55-SF2/SD4, (11) SV-*env*/SRp55-SRp40/SD4, (12) SV-*env*/SRp55-SRp55/SD4, (13) SV-*env*/SRp55-SC35/SD4, (14) SV-*env*/SC35-SF2/SD4, (15) SV-*env*/SC35-SRp40/SD4, (16) SV-*env*/SC35-SRp55/SD4, (17) SV-*env*/SC35-SC35/SD4, (18) mock. (B) Vergleich der *env*-Expression sämtlicher Konstrukte mit funktionellen Kombinationen aus zwei SR-Protein Bindungsstellen stromaufwärts der *tat/rev* 5'-Spleißstelle SD4 mit der GAR-ESE Ausgangssequenz (SV-*env*/GAR). Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μ g des *env*-Expressionsvektors, 1 μ g SV $crev$ und 1 μ g pGL3-control (links). Die funktionellen Konstrukte sind schematisch dargestellt (rot: SF2/ASF, grün: SRp40, blau: SC35).

Es ließ sich erkennen, dass von den 16 theoretischen Kombinationsmöglichkeiten an SR-Proteinen nur vier (SF2/SF2, SF2/SRp40, SC35/SF2 und SC35/SRp40) eine *env*-Expression ermöglichten (Abb. 32A, Spur 1, 2, 14 und 15). Interessanterweise schien nicht nur die Kombination zweier bestimmter SR-Proteine essentiell zu sein, sondern auch deren Reihenfolge innerhalb der „upstream“ des Spleißdonors liegenden Sequenz, da die Kombination SF2/SRp40 die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle unterstützte, nicht aber die umgekehrte Kombination SRp40/SF2 (Abb. 32A, vgl. Spur 2 und Spur 5).

Ein Vergleich der vier funktionellen Kombinationen an SR-Proteinen untereinander, zeigte keine signifikanten Unterschiede in ihrer Glykoprotein Expression (Abb. 32B, vgl. Spur 2-5). Die geringfügig stärker ausgeprägte *env*-Expression des Ausgangskonstruktes, mit den authentischen HIV-1 GAR Wiederholungen, könnte auf die Anwesenheit von zwei funktionellen Kombinationen an SR-Proteinen innerhalb des GAR „enhancers“ (SF2/SF2 und SF2/SRp40) zurückgeführt werden (Abb. 32B, vgl. Spur 1 mit Spur 2-5).

3.2.8 Eine erweiterte Basenpaarung zwischen der 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA ist für eine effiziente *env*-Expression nicht ausreichend

Um die Funktion der stromaufwärts des Spleißdonors 4 gelegenen SR-Protein Bindungsstellen auf die Rekrutierung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle genauer zu untersuchen, wurden die in Abbildung 33A dargestellten Konstrukte analysiert.

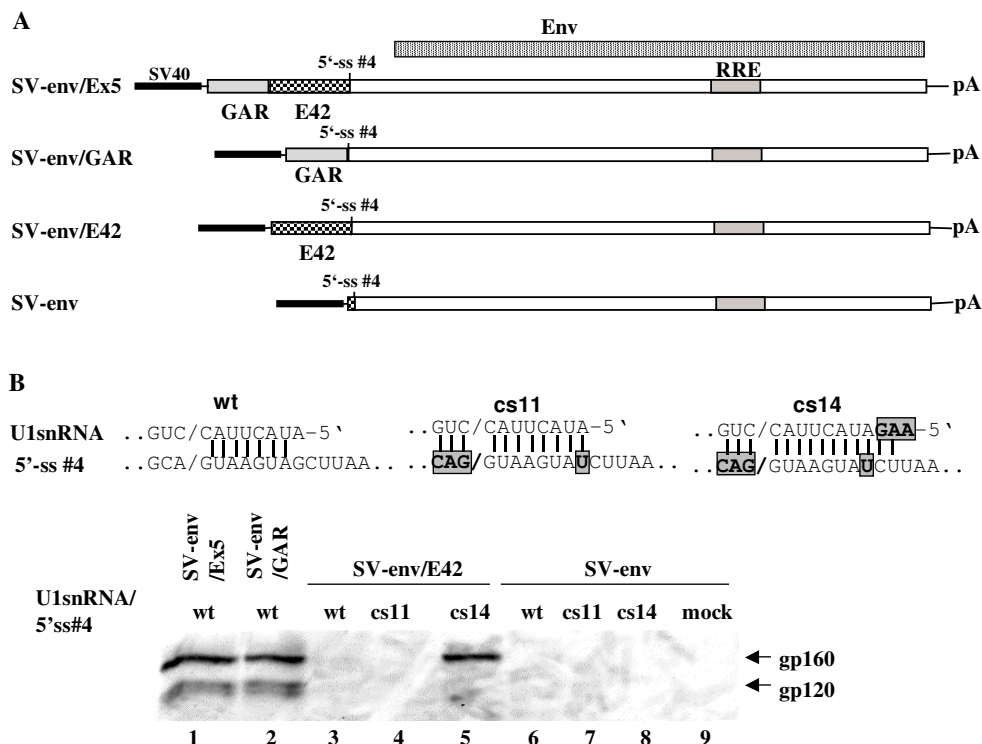


Abb. 33: (A) Schematische Darstellung der verwendeten *env*-Expressionsvektoren. Die Konstrukte enthalten stromaufwärts des *env* Leserahmens entweder die vollständige Exon 5 Sequenz (SV-*env*/Ex5), das GAR-ESE-Element (SV-*env*/GAR), die 3'-Hälfte des Exon 5 (SV-*env*/E42) oder keine Exon 5 Sequenz (SV-*env*). (B) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μ g des *env*-Expressionsvektors, 1 μ g pUCBU1, 1 μ g SV*crev* und 1 μ g pGL3-control. (wt): Dargestellt ist die Basenpaarung an den Positionen +1 bis +7 der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 mit der U1 snRNA. (cs 11): Die *tatrev* 5'-Spleißstelle wurde an den Positionen -3, -2, -1 und +8 mutiert, so dass diese eine vollständige Komplementarität zu der U1 snRNA aufwies. (cs14): Durch Kotransfektion einer U1 snRNA mit verlängertem 5'-Ende wurde eine zusätzliche Basenpaarungen innerhalb der Intronssequenz ermöglicht (grau hinterlegt).

Erwartungsgemäß führte sowohl das Konstrukt mit der gesamten HIV-1 Exon 5 Sequenz (SV-env/Ex5), als auch das Konstrukt mit dem funktionellen GAR-ESE (SV-env/GAR), zu einer effizienten *env*-Expression (Abb. 33B, Spur 1 und 2). Für das Konstrukt, welches nur die innerhalb des HIV-1 Exon 5 direkt stromwärts des Spleißdonors #4 liegenden 42 Nukleotide, ohne die GAR Sequenzwiederholungen, enthielt (SV-env/E42), ließ sich hingegen keine Glykoprotein Expression in der Immunoblot Analyse detektieren (Abb. 33B, Spur 3).

Die Bindung des U1 snRNPs an die HIV-1 5'-Spleißstelle 4 wurde durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 7 komplementären Basen, an den Positionen +1 bis +7 der Spleißdonorsequenz, stabilisiert (Abb. 33B, wt). Da beschrieben worden war, dass durch die Interaktion von SR-Proteinen mit ESE-Elementen die Bindung des U1 snRNPs an schwache 5'-Spleißstellen zusätzlich stabilisiert werden kann (230), wäre es vorstellbar, dass durch eine erhöhte Basenpaarung zwischen der 5'-Spleißstelle SD4 und der U1 snRNA die Abwesenheit des GAR „enhancers“ kompensiert werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurde durch Mutation der 5'-Spleißstelle die Komplementarität zu der U1 snRNA auf 11 mögliche Basenpaarungen erhöht (SV-env/E42 cs11) (Abb. 33B, cs11). Jedoch zeigte das Konstrukt auch bei maximaler U1 snRNA Komplementarität von Position -3 bis +8 der 5'-Spleißstelle keine detektierbare *env*-Expression im Immunoblot (Abb. 33B, Spur 4). Eine weitere Stabilisierung der Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle wurde durch Klonierung einer Suppressor U1 snRNA erzielt, welche einen verlängerten freien 5'-Arm besitzt und dadurch zusätzliche Basenpaarungen innerhalb des HIV-1 Introns an den Positionen +9 bis +11 ausbilden konnte (Abb. 33B, cs14). Nach Kotransfektion dieser Suppressor U1 snRNA, welche mit der 5'-Spleißstelle 14 Basenpaarungen ausbilden kann (cs14), ließ sich für das SV-env/E42 Konstrukt in der Immunoblot Analyse eine deutliche *env*-Expression erkennen (Abb. 33B, Spur 5).

In Abwesenheit der HIV-1 Exon 5 Sequenz (SV-env) konnte hingegen die *env*-Expression weder durch Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle (Abb. 33B, Spur 7), noch durch Verwendung der Suppressor U1 snRNA unter Ausbildung von 14 Basenpaarungen (Abb. 33B, Spur 8), wiederhergestellt werden. Eine Expression des Glykoproteins konnte auch nicht durch Kotransfektion einer Suppressor U1 snRNA unter Ausbildung von 23 Basenpaarungen (Position -9 bis +14 der 5'-Spleißstelle) erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass, selbst bei erhöhter Basenpaarung zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA, eine stabile Bindung des U1 snRNPs an die Spleißdonorsequenz von der Gegenwart geeigneter, „upstream“ liegender SR-Protein Bindungsstellen abhängig war. Darüber hinaus schien innerhalb des E42 Fragmentes ein weiteres, suboptimales „enhancer“ Element vorhanden zu sein, da es die *env*-Expression, bei Erhöhung der Komplementarität der U1 snRNA zu der 5'-Spleißstelle auf 14 mögliche Basenpaarungen, unterstützte.

3.2.9 In Gegenwart des E42 Elementes wird die zur *env*-Expression benötigte U1-Komplementarität der 5'-Spleißstelle reduziert

Die Transfektionsexperimente hatten gezeigt, dass unter *in vivo* Bedingungen das E42 Element alleine keine Nutzung der HIV-1 5'-Spleißstelle 4 vermitteln konnte, da die *env*-Expression nur unter Verwendung einer synthetischen U1 snRNA in der Immunoblot Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 33B, Spur 5). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass dieses suboptimale „enhancer“ Element innerhalb des E42 Fragmentes nur kooperativ mit dem GAR-ESE wirken kann. Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Gegenwart des E42 Elementes die GAR-abhängige *env*-Expression beeinflusst, wurden Konstrukte mit verschiedenen 5'-Spleißstellen kloniert, welche entweder das GAR Element alleine, oder zusammen mit dem E42 Element enthielten (Abb. 34).

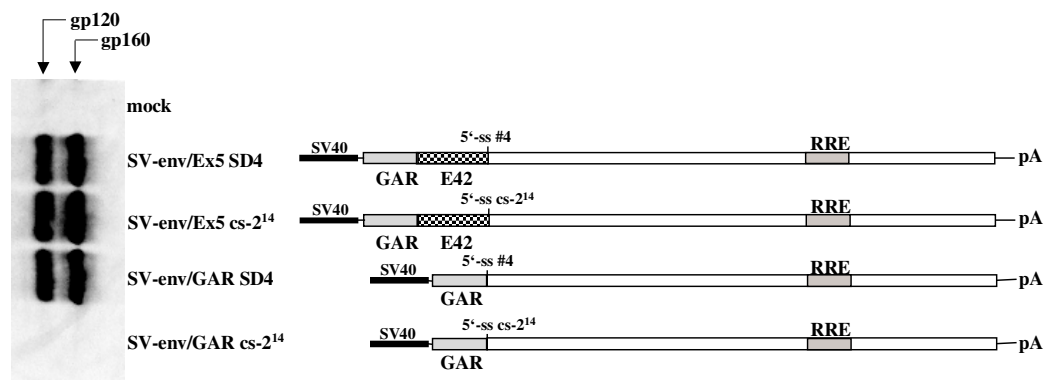


Abb. 34: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit $1 \mu\text{g}$ des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, $1 \mu\text{g}$ SVcrev und $1 \mu\text{g}$ pGL3-control. Die verwendeten Konstrukte enthalten entweder das vollständige HIV-1 Exon 5 (SV-*env*/Ex5), oder nur die GAR-ESE Sequenz (SV-*env*/GAR). Die 5'-Spleißstellen unterscheiden sich in ihrer Komplementarität zu der U1 snRNA. Die „cs“ Nomenklatur bezeichnet einen zusammenhängenden U1 komplementären Bereich („continuous stretch“, cs), bei dem die Basis den Beginn des komplementären Bereiches und der Exponent die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA angibt. Die HIV-1 *tat/rev* 5'-Spleißstelle #4 würde dieser Nomenklatur nach einem $\text{cs}+1^{16}$ „stretch“ entsprechen.

Die Analyse der Konstrukte im Immunoblot zeigte, dass sich die Konstrukte mit der 5'-Spleißstelle 4, welche 16 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA ausbilden kann, nicht in ihrer *env*-Expression unterschieden (Abb. 34, vgl. Spur 2 und 4). Das Konstrukt mit der authentischen HIV-1 „upstream“ Sequenz (SV-*env*/Ex5), welche sowohl das GAR- als auch das E42 Element beinhaltet, zeigte erwartungsgemäß keine verminderte *env*-Expression bei einer Reduktion der U1-Komplementarität auf 14 Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 34, vgl. Spur 2 und 3). Für das Konstrukt ohne E42 Element (SV-*env*/GAR), welches nur noch 14 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA ausbilden kann (*cs-2*¹⁴), ließ sich hingegen kein HIV-1 Glykoprotein mehr in der Immunoblot Analyse nachweisen (Abb. 34, Spur 5). Somit scheint der suboptimale „enhancer“ innerhalb des E42 Fragmentes kooperativ mit dem GAR-ESE zu wirken, indem er den Schwellenwert für die 5'-Spleißstellen abhängige *env*-Expression um zwei Wasserstoffbrückenbindungen reduziert.

3.2.10 Die Funktionalität des E42 Elementes wird durch eine SF2- und eine SRp40 SR-Protein Bindungsstelle vermittelt

Um zu überprüfen, ob die, durch das E42 Element vermittelte, Verminderung der zur *env*-Expression benötigten U1-Komplementarität der 5'-Spleißstelle ebenfalls SR-Protein abhängig erfolgte, wurde das E42 Fragment unter Verwendung des „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) analysiert auf potentielle SR-Protein Bindungsstellen analysiert (86). Innerhalb dieses Fragmentes wurden zwei SRp40 und eine SF2 Bindungsstellen durch das Programm vorhergesagt. Diese potentiellen SR-Protein Bindungsstellen wurden, unter Beibehaltung der Gesamtlänge des Konstruktes SV-*env*/Ex5 *cs-2*¹⁴, einzeln oder gemeinsam mutiert (Abb. 35). Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Konstrukten und anschließender Analyse der Zellextrakte im Immunoblot, ließ sich für das Ausgangskonstrukt (SV-*env*/Ex5 *cs-2*¹⁴) eine deutliche *env*-Expression detektieren (Abb. 35, Spur 1). Für das Konstrukt bei dem sämtliche innerhalb des E42 Fragmentes lokalisierten SR-Protein Bindungsstellen mutiert worden waren (SV-*env*/Ex5-SR⁻ *cs-2*¹⁴), zeigte sich hingegen ein vollständiger Verlust der *env*-Expression, wenn nur 14 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA ausgebildet werden konnten (Abb. 35, Spur 2). Dieses Ergebnis sprach dafür, dass auch die Schwellenwert regulierende Funktion des E42 Fragmentes über die Bindung von SR-Proteinen vermittelt worden war. Eine genauere Mutationsanalyse zeigte, dass die erste der beiden potentiellen SRp40 Bindungsstellen für diese Funktion nicht notwendig war (Abb. 35, Spur 3), während sowohl

die zweite SRp40- (Abb. 35, Spur 4), als auch die SF2 Bindungsstelle, für die *env*-Expression bei geringer Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA essentiell waren (Abb. 35, Spur 5).

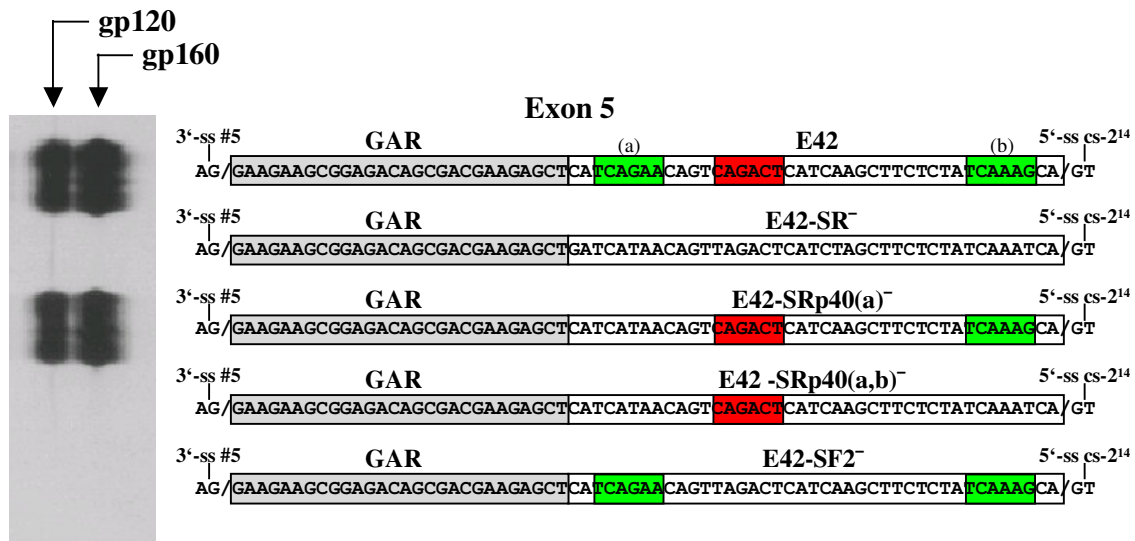


Abb. 35: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4⁺ Zellen mit jeweils 1 μg *env*-Expressionsplasmid, 1 μg SVcrev und 1 μg pGL3-control. Die verwendeten Konstrukte enthalten das vollständige HIV-1 Exon 5 (SV-*env*/Ex5) mit den schematisch dargestellten Mutationen innerhalb des E42 Fragments (rechts). Die Bindungsstelle für das SR-Protein SF2/ASF ist rot dargestellt und die SRp40 Bindungsstellen (a, b) sind grün markiert. Die Funktionalität des E42 Fragments wurde in Gegenwart der 5'-Spleißstelle cs-2¹⁴ an der Position des *tat/rev* Spleißdonors untersucht.

Bei dem Vergleich dieser Ergebnisse mit den in Abschnitt 3.2.7 ermittelten funktionellen Kombinationen an SR-Proteinen zeigte sich, dass auch innerhalb des E42 Fragmentes mit einer SF2- und einer 3'-wärts davon lokalisierten SRp40 Bindungsstelle eine funktionelle Einheit vorliegt (vgl. Abb. 35, Spur 3 und Abb. 32B, Spur 3). Dies ließ einen modularen Aufbau für 5'-wärts des Spleißdonors liegende „enhancer“ Elemente vermuten. Die Ergebnisse hatten gezeigt, dass der SF2/SRp40 abhängige GAR „enhancer“ für die Rekrutierung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle 4 essentiell war. Die Gegenwart eines weiteren funktionellen Moduls „downstream“ davon, wie hier innerhalb des E42 Elementes, schien die Erkennung der 5'-Spleißstelle auch bei geringerer Komplementarität zu der U1 snRNA zu gewährleisten.

Auffallend war andererseits, dass das aus einer SF2- und einer SRp40 Bindungsstelle bestehende funktionelle Modul innerhalb des Konstruktes SV-*env*/SF2-SRp40 eine effiziente Erkennung der 5'-Spleißstelle 4 auch in Abwesenheit des GAR-ESE vermitteln konnte (vgl. Abb. 32B, Spur 3). Hingegen war für das SV-*env*/E42 Konstrukt, welches

ebenfalls eine SF2 und eine SRp40 Bindungsstelle 5'-wärts des HIV-1 Spleißdonors 4 besitzt, keine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse detektierbar (vgl. Abb. 33B, Spur 3).

3.2.11 Ein putatives SF2/SRp40 Modul stromaufwärts der 5'-Spleißstelle gewährleistet nicht die Erkennung der Spleißdonorsequenz durch das U1 snRNP

Daraus ergab sich die Frage, warum das SF2/SRp40 Modul in einem Fall die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle, unabhängig von der Gegenwart des GAR-ESE, unterstützen konnte (SV-*env*/SF2-SRp40, (Abb. 32B, Spur 3)), jedoch in dem anderen Fall nicht zu einer 5'-Spleißstellen abhängigen *env*-Expression führte (SV-*env*/E42 (Abb. 33B, Spur 3)). Um dies näher zu untersuchen, wurden weitere Konstrukte kloniert und nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen im Immunoblot analysiert (Abb. 36).

Erwartungsgemäß zeigten sowohl das Konstrukt mit der vollständigen Exon 5 Sequenz (SV-*env*/Ex5 (Abb. 36, Spur 1)), als auch das Konstrukt mit dem GAR-ESE Motiv (SV-*env*/GAR (Abb. 36, Spur 2)) „upstream“ der 5'-Spleißstelle SD4 eine deutliche *env*-Expression. Die schematische Darstellung der potentiellen SR-Protein Bindungsstellen innerhalb der „leader“-Sequenzen verdeutlicht die Unterschiede zwischen dem Konstrukt, welches zu keiner detektierbaren 5'-Spleißstellen vermittelten Glykoprotein Expression führte (SV-*env*/E42 (Abb. 36, Spur 3)) und dem Konstrukt, welches ein funktionelles SF2/SRp40 Modul innerhalb der „upstream“ Sequenz aufweist (SV-SF2/SRp40 (Abb. 36, Spur 4)). Da von der ersten SRp40 Bindungsstelle innerhalb des E42 Fragmentes gezeigt werden konnte, dass diese keinen Einfluss auf die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP ausübte (Abb. 35, vgl. Spur 1 und 3), wurde diese potentielle Protein Bindungsstelle in der folgenden Analyse nicht mehr mit einbezogen.

Innerhalb des E42 Fragmentes werden die beiden putativen SR-Protein Bindungsstellen für SF2 und SRP40 durch 14 Nukleotiden voneinander getrennt, während innerhalb des funktionellen SF2/SRp40 Modul nur vier Nukleotide zwischen ihnen liegen (Abb. 36, vgl. Spur 3 und 4). Um zu prüfen, ob durch den erhöhten Abstand innerhalb des E42 Fragments evtl. eine Kommunikation der beiden SR-Domänen verhindert würde, wurden die beiden SR-Protein Bindesequenzen aus dem E42 Fragment in den SV-*env*/SF2-SRp40 Vektor eingeführt (SV-*env*/SF2(E42)-SRp40(E42)). Jedoch zeigte sich auch für dieses Konstrukt keine detektierbare *env*-Expression in der Immunoblot Analyse (Abb. 36, Spur 5).

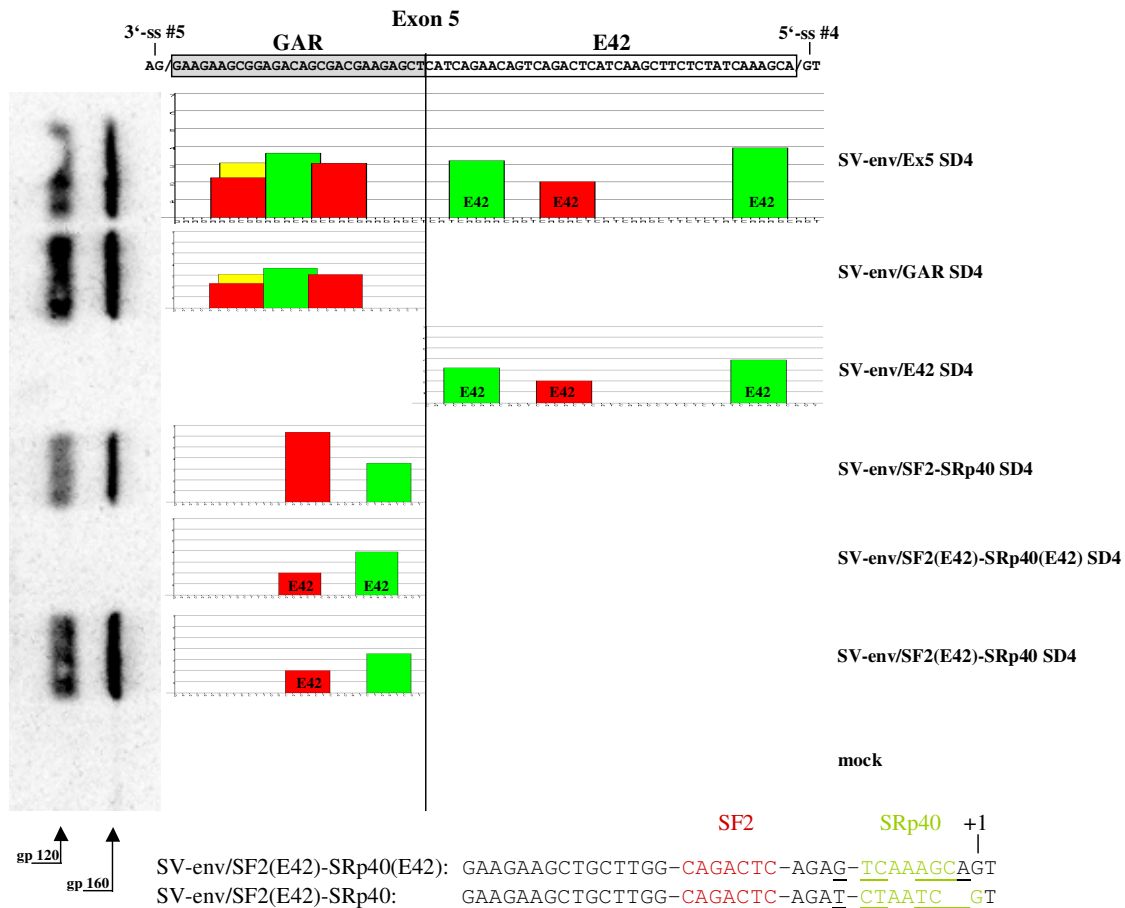


Abb. 36: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit jeweils $1 \mu\text{g}$ *env*-Expressionsplasmid, $1 \mu\text{g}$ SVcrev und $1 \mu\text{g}$ pGL3-control. Die von den Spleißstellen SA5 und SD4 flankierte HIV-1 Exon 5 Sequenz ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die analysierten Konstrukte enthalten entweder das gesamte HIV-1 Exon 5 (SV-env/Ex5), das GAR-ESE (SV-env/GAR) oder das E42 Element (SV-env/E42). In dem Konstrukt SV-env/SF2-SRp40 wurde das GAR-ESE gegen eine funktionelle Kombination einer SF2- und einer SRp40 Bindungsstelle ausgetauscht. Die Konstrukte SV-env/SF2(E42)-SRp40(E42) und SV-env/SF2(E42)-SRp40 enthalten die jeweils gekennzeichneten SR-Protein Bindungssequenzen aus dem Exon 5 E42 Fragment. Die putativen Bindungssequenzen für SF2/ASF sind rot und die SRp40 Bindungsstellen grün dargestellt. Der untere Teil der Abbildung verdeutlicht die Sequenzunterschiede zwischen dem nicht funktionellen SF2(E42)-SRp40(E42) Konstrukt und dem *env* exprimierenden SF2(E42)-SRp40 Konstrukt.

Diese Beobachtung legte nahe, dass die Funktionalität des SF2/SRp40 Moduls nicht über den Abstand der beiden Bindungsstellen zueinander vermittelt wurde, sondern eher über deren Bindungssequenz selber. Der zur Analyse der potentiellen SR-Protein Bindungsstellen verwendete „ESE-Finder“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86) beruht auf einer funktionellen SELEX Methode, wobei Sequenzen, die eine hohe Homologie zu der ermittelten „winner“ Sequenz aufweisen, einen höheren Wert erhalten als Sequenzen mit geringerer Homologie. Diese Ähnlichkeit zu der ermittelten „Konsensus“ Sequenz wird in der graphischen Auftragung durch die Balkenhöhe wiedergegeben. Um zu untersuchen, ob

die Funktionalität des SF2/SRp40 Moduls durch die hochaffine SF2 Bindungsstelle („score“ 6.34) vermittelt wurde, wurde diese gegen die SF2 Bindungssequenz aus dem HIV-1 E42 Fragment („score“ 2.02) ausgetauscht (SV-env/SF2(E42)-SRp40). Die Analyse dieses Konstrukte im Immunoblot zeigte eine deutliche Expression des viralen Glykoproteins (Abb. 36, Spur 6), so dass die Funktionalität der 5'-Sequenz nicht von der hochaffinen SF2 Bindesequenz abhängig war.

Vergleicht man die „upstream“ Sequenz des Konstruktes, welches eine Erkennung der 5'-Spleißstelle in Abwesenheit der GAR Wiederholungen unterstützte (SV-env/SF2(E42)-SRp40), mit der aus dem E42 Fragment abgeleiteten „leader“-Sequenz, welche zu einer GAR-ESE abhängigen Verringerung des, zur U1 snRNP Bindung benötigten, Schwellenwertes führte (SV-env/SF2(E42)-SRp40(E42)), unterschieden sich diese lediglich in acht Nukleotiden voneinander (Abb. 36, unterer Teil). Auffallend war zunächst, dass sich die beiden „upstream“ Sequenzen voneinander in ihrer Gesamtlänge um zwei Nukleotide unterschieden. Diese Nukleotide wurden bei der Substitution der SR-Protein Bindungssequenzen eingeführt, um eine Entstehung zusätzlicher Bindungsstellen zu vermeiden. Des weiteren ist zu erkennen, dass in dem GAR-ESE unabhängigen Konstrukt (SV-env/SF2(E42)-SRp40) die SRp40 Bindungssequenz mit der Sequenz der 5'-Spleißstelle bis an Position +1 überlappt, während in dem GAR-ESE abhängigen Konstrukt (SV-env/SF2(E42)-SRp40(E42)) die Überlappung nur bis an Position -2 erfolgt (Abb. 36, unterer Teil). Sowohl die Gesamtlänge der „upstream“ Sequenz, als auch die Überlappung der SRp40 Sequenz mit der 5'-Spleißstelle, konnte jedoch in weiteren Untersuchungen als Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Konstrukte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Demnach konnte die Entscheidung, ob eine „upstream“ Sequenz auf die Gegenwart eines zusätzlichen ESE-Elementes angewiesen ist oder nicht, nur noch in der SRp40 Bindungsstelle selbst, oder in der Sequenz zwischen den beiden SR-Protein Bindungsstellen kodiert sein. Die Experimente hatten gezeigt, dass anscheinend nicht jede SF2 Bindungsstelle mit jeder SRp40 Bindungsstelle ein funktionelles Modul ausbilden konnte (Abb. 36, vgl. Spur 4-6). Dies würde für eine kooperative Bindung der SR-Proteine an ihre Zielsequenzen sprechen, welche über Interaktionen der RS-Domänen der SR-Proteine vermittelt werden würde (436, 662).

Da die Mutation der SRp40 Bindungsstelle innerhalb des E42 Fragments zu einem Verlust der Fähigkeit zur *env*-Expression bei geringerer Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der

U1 snRNA führte (Abb. 35, vgl. Spur 3 und 4), ist es unwahrscheinlich, dass keine Proteinbindung an diese Sequenz erfolgte. Diese SRp40 Bindungsstelle konnte jedoch kein funktionelles Modul mit der 5'-wärts davon liegenden SF2 Bindungsstelle ausbilden und dadurch auch nicht zu einer GAR-ESE unabhängigen *env*-Expression führen (Abb. 36, Spur 3 und 5).

Zu bedenken ist dabei jedoch, dass der zur Analyse der „upstream“ Sequenz verwendete „ESE-Finder“ nur die Bindung von vier, der bisher in Säugern beschriebenen, SR-Proteinen identifizieren kann. Somit wäre es ebenso vorstellbar, dass innerhalb des E42 Fragments weitere SR-Proteine binden könnten, deren Bindesequenzen evtl. gemeinsame Schnittstellen zu denen von SF2 bzw. SRp40 aufweisen. Für diese Theorie spräche, dass durch das E42 Fragment eine grundsätzlich von einem funktionellen SF2/SRP40 Modul unterscheidbare Funktion vermittelt wurde. Während das SF2/SRp40 Modul die Rekrutierung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle vermittelte (Abb. 32B, Spur 3), führte das authentische HIV-1 E42 Fragment zu einer Absenkung des, für die U1 snRNP Bindung benötigten, Schwellenwertes an Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 34, vgl. Spur 5 und 3). Die Rekrutierung des U1 snRNPs erfolgte weiterhin unabhängig von einem ESE-Element (Abb. 32B, Spur 3), während die Regulation des Schwellenwertes auf ein 5'-wärts liegendes ESE-Element angewiesen war (Abb. 33, vgl. Spur 1 und 3).

3.2.12 *In vivo* SELEX, ein neuer Ansatz zur Ermittlung funktioneller Sequenzelemente

Um eine hohe Anzahl verschiedenster Mutationen innerhalb der 5'-wärts des Spleißdonors liegenden Sequenz effizient analysieren zu können, wurde ein neues Reportersystem etabliert. Hierzu wurde innerhalb des *env*-Expressionsvektors SV-*env*/GAR der *env* Leserahmen 3'-wärts des Spleißakzeptors 7 gegen den Leserahmen für das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) substituiert. Da innerhalb des entstandenen eGFP-Reporters, sowohl der *env* Leserahmen, als auch die Rev Zielsequenz, das RRE, weiterhin vorhanden sind, sollte in Anwesenheit von Rev ein Env-eGFP Fusionsprotein nachweisbar sein, da sich beide Proteine innerhalb des selben Leserahmens befinden und durch eine Abfolge mehrerer Glycin Wiederholungen sterisch voneinander getrennt sein sollten. Wird hingegen in Abwesenheit von Rev, der zwischen den Spleißstellen SD4 und SA7 befindliche *env* Leserahmen, gespleißt, so sollte ebenfalls ein funktionelles „enhanced green fluorescent

protein“ nachweisbar sein, da 3'-wärts des Spleißakzeptors ein ansonsten internes Methionin als Translationsstartcodon dienen könnte.

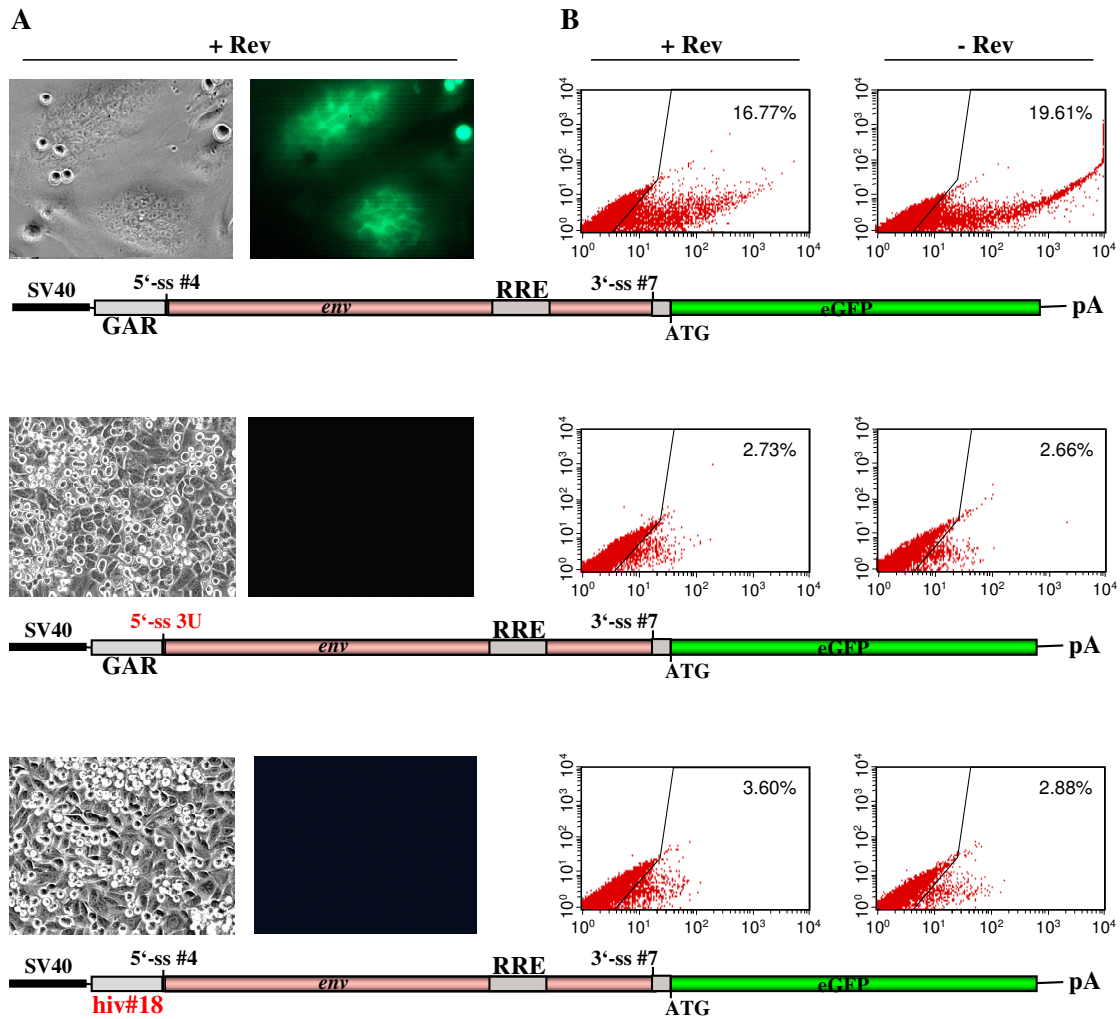


Abb. 37: 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ *env*-eGFP Expressionsplasmid, $1 \mu\text{g}$ pDsRed2 und zusätzlich entweder mit $1 \mu\text{g}$ SVcrev (+Rev), oder $1 \mu\text{g}$ pSVT7 (-Rev) transient transfiziert. Nach 48h Inkubation bei 37°C und 7% CO_2 wurden 1×10^6 HeLa-T4+ Zellen in 1 ml FACS-Puffer (1% FKS, 0,1% Natriumazid in PBS) aufgenommen. Ein Aliquot wurde für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (links) entnommen, der Rest wurde im FACS (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Die Auswertung (rechts) erfolgte mit der CellQuest Software (BD Biosciences). Die *env*-eGFP Konstrukte enthalten stromabwärts der HIV-1 3'-Spleißstelle SA7 eine kurze Glycin „linker“ Region (grau) und den eGFP Leserahmen (grün). In Anwesenheit von Rev entsteht ein *env*-eGFP Fusionsprotein. In Abwesenheit von Rev kann ein ansonsten internes Methionin als Translationsstartcodon (ATG) dienen. Die Konstrukte tragen im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (SV-GAR-SD4/*env*-eGFP) eine Mutation der 5'-Spleißstelle (SV-GAR-3U/*env*-eGFP) oder eine nicht funktionelle Sequenz 3'-wärts der 5'-Spleißstelle (SV-hiv#18-SD4/*env*-eGFP).

Durch den Erhalt des authentischen HIV-1 Kontext ist weiterhin zu erwarten, dass die Bildung des Fusionsproteins, bzw. des eGFPs, sowohl von der Komplementarität der Spleißdonorsequenz, als auch von 5'-wärts davon liegenden ESE-Elementen abhängig ist. Um dies zu prüfen, wurden zunächst drei Kontrollkonstrukte näher untersucht. Das erste

Konstrukt enthielt das authentische GAR-ESE-Element 5'-wärts der HIV-1 Spleißdonorsequenz 4 (SV-GAR-SD4/env-eGFP) und zeigte nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen in Gegenwart von Rev eine deutliche Glykoprotein-vermittelte Synzytienbildung (Abb. 37A). Eine Betrachtung der Synzytien unter dem Fluoreszenz Mikroskop bestätigte, dass die Bildung der vielkernigen Riesenzellen auch durch das Env-eGFP Fusionsprotein induziert werden konnte. Hingegen ließ sich weder bei Konstrukten mit „LC“ Mutationen der 5'-Spleißstelle (SV-GAR-3U/env-eGFP), noch bei Konstrukten mit nicht funktionellen „upstream“ Sequenzen (SV-hiv#18-SD4/env-eGFP) eine Expression des Glykoproteins oder des Fluoreszenz Proteins mikroskopisch detektieren (Abb. 37A).

Eine anschließende FACS Analyse der Zellen ermöglichte eine Quantifizierung der Menge an gebildetem Env-eGFP Fusionsprotein in Anwesenheit von Rev, bzw. einer Quantifizierung des gebildeten eGFP Proteins in Abwesenheit von Rev. Die Auswertung zeigte, dass in Anwesenheit von Rev 16,77% der Zellen, nach Transfektion mit dem Ausgangskonstrukt, das Env-eGFP Fusionsprotein exprimierten (Abb. 37B (+Rev)). Sowohl durch die Mutation der 5'-Spleißstelle (SV-GAR-3U/env-eGFP), als auch durch Substitution des GAR-ESE-Elements gegen die Sequenz, welche die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle nicht unterstützte (SV-hiv#18-SD4/env-eGFP), konnte die Menge an gebildetem Fusionsprotein drastisch reduziert werden (GAR-3U: 2,73%; hiv#18-SD4: 3,60) (Abb. 37B (+Rev)). Auch in Abwesenheit von Rev wurde durch das Ausgangskonstrukt SV-GAR-SD4/env-eGFP eine signifikant höhere eGFP-Expression erzielt (19,61%), als durch die Konstrukte mit Mutationen innerhalb des Spleißdonors 4 (GAR-3U: 2,66%) oder der 5'-wärts davon liegenden Sequenz (hiv#18-SD4: 2,88%) (Abb. 37B (-Rev)). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass auch in diesem experimentellen System die Funktionalität der 5'-Spleißstelle, bzw. der „upstream“ Sequenz, einen erheblichen Einfluss auf die Expression des eGFP Reportergens ausüben. Die relativ geringe eGFP-Expression des Ausgangskonstruktes (GAR-SD4: 16,77% bzw. 19,61%) ist höchstwahrscheinlich auf die Effizienz der verwendeten Transfektionsmethode zurückzuführen.

Um zu testen, ob sich mit dieser Methode funktionelle Sequenzen selektionieren ließen, wurde eine 5'-Spleißstellen Plasmidbank erstellt. Hierzu wurden Oligonukleotide synthetisiert, die, bis auf das GT an den Positionen +1 und +2, zufällige Nukleotide an den flankierenden Positionen -3 bis -1 sowie an den Positionen +3 bis +8 der 5'-Spleißstelle enthielten (NNNGTNNNNN). Nach PCR Amplifikation wurden die erhaltenen Sequenzen an die Position des Spleißdonors 4 in die *env*-Expressionsvektoren kloniert. Nach

Transformation von *E. coli* DH5 α F'IQ Zellen mit dieser Plasmidbank, wurde die Plasmid DNA isoliert und HeLa-T4⁺ Zellen transfiziert. Die HeLa-T4⁺ Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet und die eGFP exprimierenden Zellen wurden mit Hilfe eines „Cell Sorters“ isoliert. Da nur die HeLa-T4⁺ Zellen eGFP exprimieren konnten, welche ein Plasmid mit einer funktionellen 5'-Spleißstelle durch die Transfektion erhalten hatten, wurde die Plasmid-DNA aus den HeLa Zellen isoliert und anschließend in „96 well“ Platten sequenziert, wobei sich funktionelle 5'-Spleißstellen identifizieren ließen (Daten nicht gezeigt). Demnach sollte dieser experimentelle Ansatz auch geeignet sein, um unbekannte, funktionelle Motive innerhalb der 5'-wärts des Spleißdonors liegenden Sequenz identifizieren zu können.

3.2.13 Interaktion zwischen SR-Proteinen und U1 snRNP

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine ausreichende Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA notwendig war, sondern auch eine funktionelle Kombination aus mindestens zwei SR-Proteinen 5'-wärts der Spleißdonorsequenz gebunden haben musste, um eine *env*-Expression unter diesen experimentellen Bedingungen zu ermöglichen. Um zu untersuchen, wie die stromaufwärts der 5'-Spleißstelle gebundenen SR-Proteine zu einer effizienten Erkennung der Spleißdonorsequenz durch das U1 snRNP beitragen, wurden weitere Mutationen in die U1 snRNA eingeführt.

Das humane U1 snRNP besteht aus der 164 Nukleotide langen U1 snRNA, einer Gruppe von sieben Sm-Proteinen, welche alle U snRNPs gemeinsam aufweisen und drei U1 spezifischen Proteinen: U1-70K, U1-A und U1-C (59). Das U1-70K Protein enthält eine RNA Bindungsdomäne des RRM Typs, welche spezifisch an die „stem loop A“ Struktur der U1 snRNA bindet (243, 253, 493, 600). Durch die Deletion dieser Zielstruktur innerhalb der U1 snRNA sollte es möglich sein, den Einfluss von U1-70K auf die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP näher untersuchen zu können.

Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen und anschließender Analyse der Zellextrakte im Immunoblot zeigte sich erwartungsgemäß, dass sich durch ein Konstrukt mit einer Mutation der 5'-Spleißstelle zu 3U erwartungsgemäß weder in Abwesenheit (Abb. 38, Spur 1), noch in Anwesenheit von Rev (Abb. 38, Spur 2), eine *env*-Expression nachweisen ließ. Die Expression des viralen Glykoproteins konnte jedoch durch Kotransfektion einer kompensatorischen 6A-U1 snRNA wiederhergestellt werden (Abb. 38, Spur 3), solange die

Bindungssequenz für das U1-70K Protein innerhalb der U1 snRNA vorhanden war (Abb. 38, Spur 4).

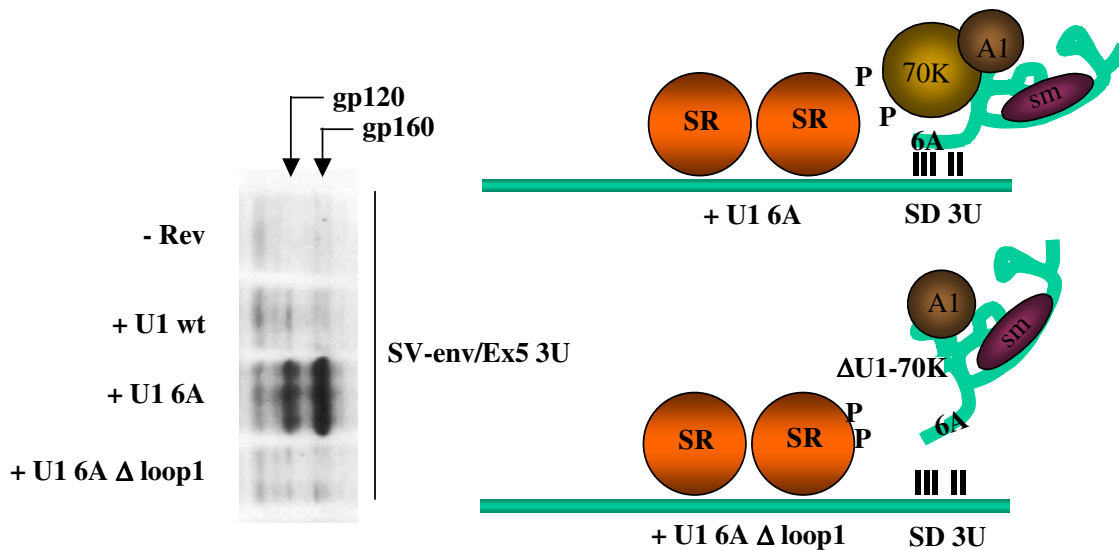


Abb. 38: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit jeweils 1 μg *env*-Expressionsplasmid, 1 μg SVcrev, 1 μg pGL3-control und 1 μg pUCBU1. Das verwendete *env* Konstrukt enthält eine Punktmutation (3U) innerhalb der *tat/rev* 5'-Spleißstelle. Die Kotransfektion erfolgte mit der Wildtyp U1 snRNA (U1 wt), der kompensatorischen 6A U1 snRNA (U1 6A) und einer 6A U1 snRNA, welche eine Deletion der Bindungsstelle für das U1 snRNP spezifische U1-70K Protein enthält (s. schematische Darstellung (rechts)).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung des U1-70K Proteins an die U1 snRNA notwendig ist, um eine Erkennung der 5'-Spleißstelle zu gewährleisten. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass das U1-70K Protein C-terminal zwei RS Domänen besitzt, welche Interaktionen mit SR-Proteinen vermitteln (331). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass innerhalb der ersten RS-Domäne zwei Wiederholungen der Aminosäuren Arg-Arg-Arg-Ser-Arg-Ser-Arg-Asp für die Bindung von SF2/ASF notwendig sind (76). Die Funktion von SR-Proteinen wird über die Phosphorylierung ihrer RS-Domänen durch SR-Protein spezifische Kinasen (SRPKs) reguliert (241, 662). Von einem Herpes simplex virus 1 (HSV-1) Protein (ICP27), welches auf das wirtsspezifische Spleißen inhibierend wirkt, konnte gezeigt werden, dass dieses mit der SR-Protein Kinase1 (SRPK1) interagiert (241, 242).

Insofern ist es denkbar, dass ICP27 die Interaktion zwischen prä-mRNA gebundenen SR-Proteinen stromaufwärts der 5'-Spleißstelle mit dem an die U1 snRNA gebundenen U1-70K Protein inhibieren könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurden verschiedene Konstrukte mit ansteigender Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA in Anwesenheit von ICP27 im Immunoblot analysiert. Es ist zu erkennen, dass selbst bei maximaler Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA, sich die Menge an detektierbarem HIV-1 Glykoprotein in Anwesenheit von ICP27 deutlich reduzieren ließ (Abb. 39, vgl. Spur 4 und 8).

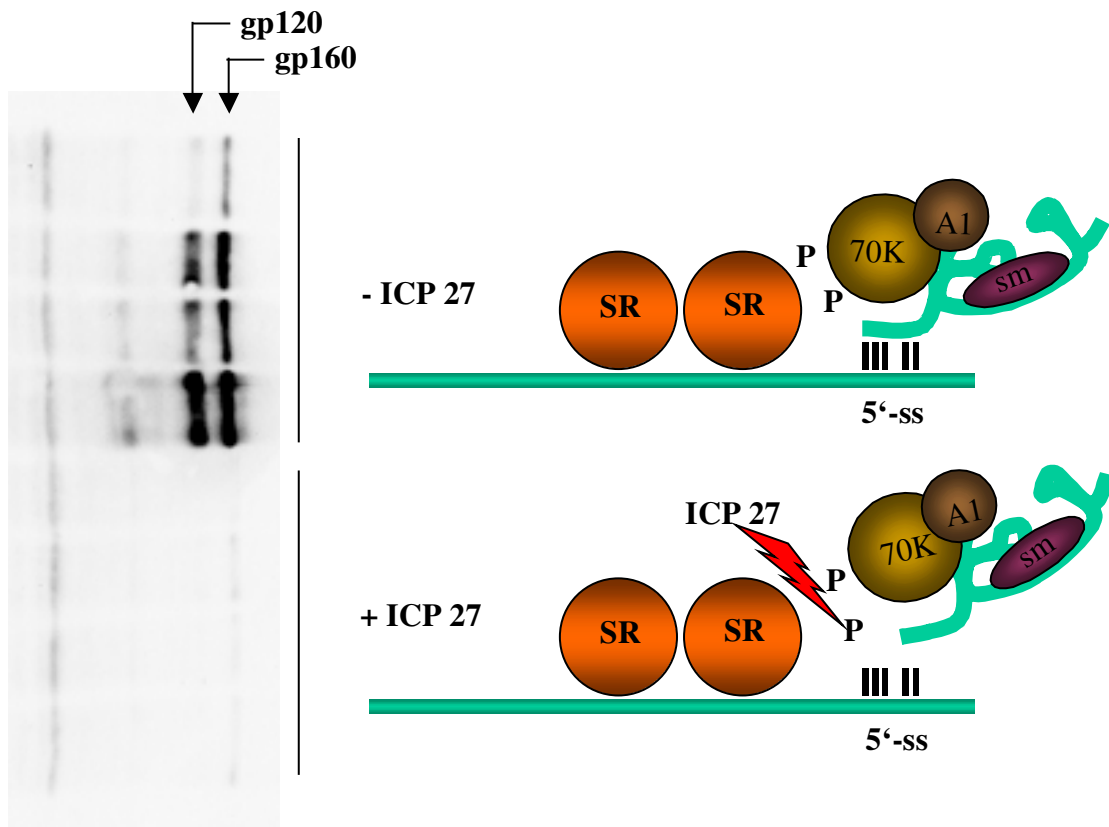


Abb. 39: Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links) nach transienter Transfektion von 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen mit jeweils $1 \mu\text{g}$ *env*-Expressionsplasmid, $1 \mu\text{g}$ SVcrev und $1 \mu\text{g}$ pGL3-control in Ab- und Anwesenheit von ICP27 (- ICP27, + ICP 27). Die analysierten Konstrukte weisen eine ansteigende Komplementarität der *tat/rev* 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA auf. Die ICP27-vermittelte Dephosphorylierung der SR-Proteine ist in der Abbildung vereinfacht dargestellt (rechts).

Dieses Ergebnis spricht für eine Abhängigkeit der Funktion von SR-Proteinen von ihrem Phosphorylierungsgrad. Ähnlich dem hier gezeigten negativen Einfluss aufgrund einer Hypophosphorylierung der SR-Proteine, konnte in weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Kinasen ebenfalls ein negativer Effekt einer Hyperphosphorylierung gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.14 Konservierung der beschriebenen regulatorischen Elemente innerhalb verschiedener HIV-1 Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden Elemente charakterisiert, welche für eine regulierte Genexpression bei HIV-1 von entscheidender Bedeutung sind. Die Komplementarität der 5'-Spleißstelle SD4 zu der U1 snRNA ist für die Stabilisierung der prä-mRNA essentiell und hat somit sowohl Auswirkungen auf die gespleißte, für *tat/rev* kodierende RNA, als auch auf die ungespleißte, *env* kodierende RNA (302). Darüber hinaus konnte ein bidirektionales „enhancer“ Element identifiziert werden, welches innerhalb des Exons 5 stromaufwärts der 5'-Spleißstelle lokalisiert ist und sowohl für die Erkennung des Spleißdonors 4, als auch des Spleißakzeptors 7 essentiell ist (78). Stromabwärts des GAR-ESE konnte ein weiteres Element charakterisiert werden, welches die, zur Rev-vermittelten *env*-Expression, notwendige Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA herabsetzt.

HI-Virus Isolate unterscheiden sich aufgrund der hohen Mutationsrate innerhalb des viralen Genoms häufig deutlich voneinander, so dass homologe Virus Stämme zu HIV Subtypen zusammengefasst werden. Um zu prüfen, ob die beschriebenen Elemente in verschiedenen HIV Subtypen konserviert sind, wurde ein Sequenzvergleich der betreffenden Region durchgeführt. Die Abbildung 40A zeigt, dass in allen HIV Subtypen die Sequenz der 5'-Spleißstelle SD4 konserviert ist. Nur innerhalb eines Subtyps (CONS02_AG) tritt an der Position +3 der 5'-Spleißstelle ein Guanin anstelle eines Adenins auf. Diese Mutation innerhalb des Spleißdonors 4 führt jedoch, nach Bewertung durch den „splicefinder“ Algorithmus, nicht zu einer verminderten Erkennung der 5'-Spleißstelle.

Das GAR-ESE-Element scheint auf den ersten Blick in verschiedenen HIV Subtypen weniger konserviert zu sein (Abb. 40A). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die funktionelle Einheit dieses „enhancers“ aus zwei SF2 Bindungsstellen bzw. aus einer SF2- und einer SRp40 Bindungsstelle besteht. Ein Vergleich der Sequenzen auf der Ebene der SR-Proteinbindungsstellen zeigt deutlich, dass mindestens eine funktionelle Einheit in jedem HIV Subtyp vorhanden ist (Abb. 40A).

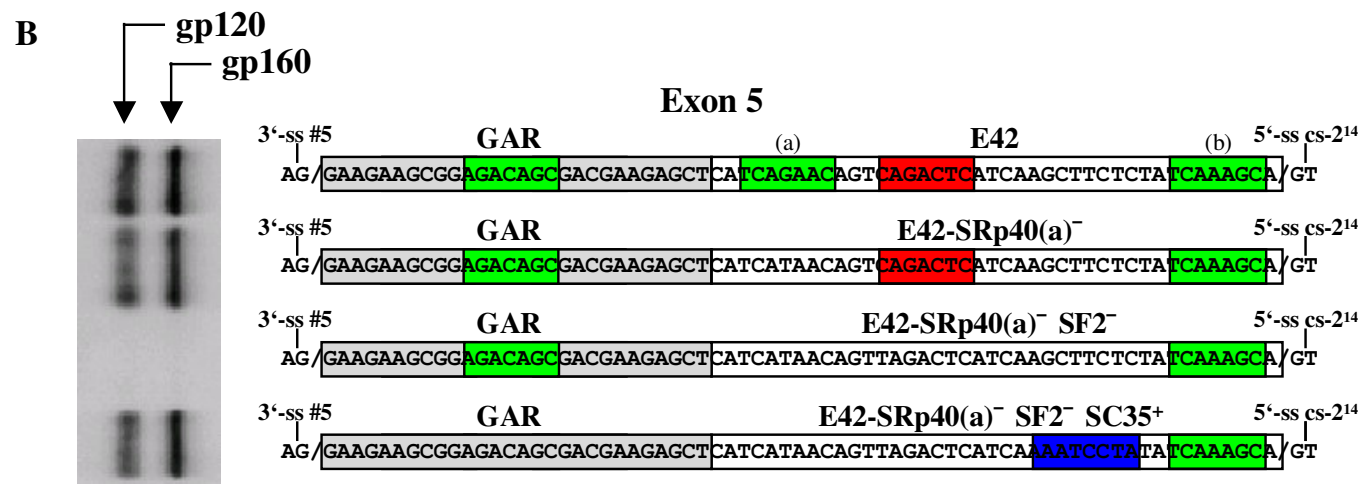
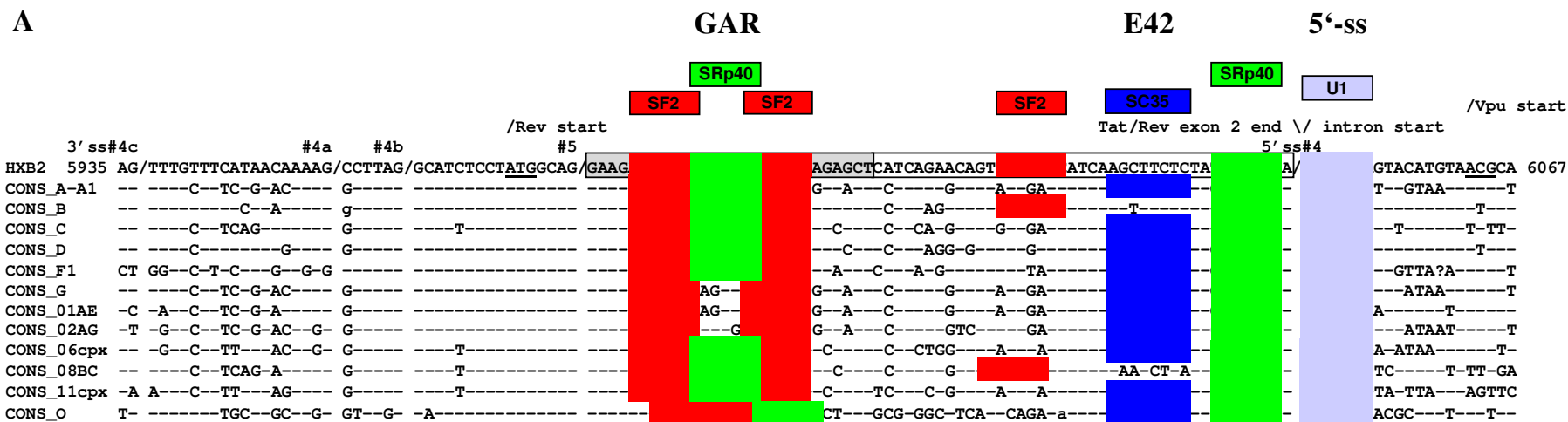


Abb. 40: (A) Konservierung der analysierten Elemente innerhalb verschiedener HIV Subtypen. Die Abbildung zeigt die vollständige HIV Exon 5 Sequenz. Putative SR-Protein Bindungsstellen sind farbig gekennzeichnet (rot: SF2/ASF, grün: SRp40, blau: SC35). Die Analyse erfolgte unter Anwendung des „ESE-Finder“ version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86). (B) Immunoblot Analyse des exprimierten HIV-1 Glykoproteins (links). 3×10^5 HeLa-T4+ Zellen

wurden mit 1 μ g des jeweiligen *env*-Expressionsplasmids, 1 μ g SVcrev und 1 μ g pGL3-control transient transfiziert. Die analysierten Konstrukte enthalten das vollständige HIV-1 Exon 5 (SV-*env*/Ex5) mit den dargestellten Mutationen innerhalb des E42 Fragments (rechts). Die Funktionalität des E42 Fragments wurde in Gegenwart der 5'-Spleißstelle *cs-2*¹⁴ an der Position des *tat/rev* Spleißdonors untersucht.

Betrachtet man die Konservierung des E42 Elements fällt auf, dass lediglich die SRp40 Bindungsstelle in allen HIV Subtypen auftritt. Die ebenfalls notwendige SF2 Bindungsstelle ist in den meisten Subtypen durch eine putative SC35 Bindungsstelle ersetzt. Um zu prüfen, ob auch eine Kombination aus einer SC35 und einer SRp40 Bindungsstelle innerhalb des E42 Fragments zu einer Absenkung des zur *env*-Expression benötigten Schwellenwertes der 5'-Spleißstelle führt, wurden weitere Mutationen in das E42 Fragment eingeführt. Hierzu wurde innerhalb des *env*-Expressionsvektors SV-*env*/Ex5, die SF2- gegen eine SC35 Bindungsstelle ausgetauscht und auf die Fähigkeit zur *env*-Expression, bei Ausbildung von nur 14 möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA, getestet. Erwartungsgemäß zeigte die Analyse der Zellextrakte im Immunoblot sowohl eine deutliche *env*-Expression des Ausgangskonstruktes (SV-*env*/Ex5) (Abb. 40B, Spur 1), als auch nach Mutation der ersten SRp40 Bindungsstelle (SV-*env*/Ex5-Srp40(a)⁻) (Abb. 40B, Spur 2). Durch zusätzliche Mutation der SF2 Bindungsstelle innerhalb des E42 Fragmentes ließ sich keine Expression des viralen Glykoproteins mehr detektieren (SV-*env*/Ex5-Srp40(a)⁻ SF2⁻) (Abb. 40B, Spur 3). Die *env*-Expression dieses Konstruktes ließ sich hingegen durch zusätzliches Einführen einer SC35 Bindungsstelle, auch unter Ausbildung von nur 14 Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA, wiederherstellen (SV-*env*/Ex5-Srp40(a)⁻ SF2⁻ SC35⁺) (Abb. 40B, Spur 4).

Die Ergebnisse zeigen, dass das E42 Element, auch unter Verwendung einer SC35 und einer SRp40 Bindungsstelle, eine *env*-Expression bei geringer Komplementarität der 5'-Spleißstelle ermöglicht, so dass auch das E42 Element in allen HIV Subtypen auf der Ebene der SR-Proteine funktionell konserviert ist (Abb. 40A). Weiterhin ist anzumerken, dass sowohl das GAR-ESE, als auch das E42 Element innerhalb des *tat/rev* Leserahmens liegen, wodurch beide einem nochmals erhöhten selektiven Druck auf dem Erhalt dieser Sequenzen unterliegen. Da die beschriebenen, konservierten Elemente eine essentielle Rolle in der Regulation der viralen Genexpression übernehmen, stellen diese ein neues Ziel in der antiretroviralen Therapie dar.

4 Diskussion

Die Expression des HIV-1 Glykoproteins stellt eine Grundvoraussetzung für die Einschleusung des viralen Genoms in die Wirtszelle dar. In transienten Transfektionsexperimenten konnte eine Abhängigkeit der *env*-Expression von der Komplementarität der 5'-Spleißstelle SD4 zu der U1 snRNA nachgewiesen werden. Aufgrund einer systematischen Mutationsanalyse dieser 5'-Spleißstelle war es möglich einen neuen Algorithmus zur Beschreibung von 5'-Spleißstellen zu entwickeln (196, 302). Durch Mutationsanalysen der umgebenen Sequenzen konnten weitere, bisher nicht beschriebene, *cis*-regulatorische Sequenzelemente identifiziert und charakterisiert werden, welche für die Regulation der viralen Genexpression essentiell sind (78).

4.1 Der Einfluss der Spleißdonorsequenz auf die Rev-vermittelte *env*-Expression

Die generelle Beobachtung, dass die meisten Gene auf die Gegenwart einer Intronsequenz angewiesen sind, um innerhalb eines Expressionsvektors zu einer effizienten Genexpression zu führen, wird bereits seit 1979 diskutiert (239, 252). Ein aktuellerer Vergleich der Exportraten verschiedener prä-mRNAs und ihrer jeweiligen cDNAs zeigte, dass durch das Spleißen der prä-mRNA die Effizienz des mRNA Transports erhöht wird (386). An dieser Steigerung der mRNA Exportrate sind Proteine der Spleißmaschinerie beteiligt, welche erst nach Abschluss der Spleißreaktion eine stabile Bindung an die Exon/Exon Grenzen zeigen und somit als Markierung für eine erfolgreich abgeschlossene Spleißreaktion dienen könnten (359). Manche dieser Proteine stellen essentielle Bestandteile des Intron-abhängigen nukleocytoplasmatischen mRNA Transports dar, was eine funktionelle Kopplung zwischen dem prä-mRNA Spleißen und dem nukleocytoplasmatischen mRNA Export bestätigt (309). Unvollständig prozessierte prä-mRNAs werden hingegen im Kern zurückgehalten und degradiert (163, 255, 362). Durch diesen Mechanismus kann, ähnlich dem durch frühzeitige Stopcodons („nonsense mediated decay“, NMD) oder durch fehlende Stopcodons („nonstop mediated decay“) vermittelten RNA Abbau, eine Translation fehlerhafter Proteine vermieden werden (für eine Übersicht s. (406, 638)).

Die Notwendigkeit des Spleißens für die Bildung stabiler RNAs (62, 252, 521) ist allerdings kein generelles Phänomen, da beispielsweise die Histon Proteine (312), die Herpes Simplex Virus Typ-1 Thymidin Kinase (HSV-TK) (420) oder der β -Adrenergen Rezeptor (329) von

intronlosen Genen exprimiert werden. Innerhalb der transkribierten Region des Intron-unabhängigen HSV-TK Gens konnte eine Sequenz identifiziert werden, welche auch einen effizienten nukleocytoplasmatischen Export eines β -Globin Transkriptes ermöglichte (375). Dies führte zu der Hypothese, dass Transkripte, welche von intronlosen Genen synthetisiert werden, *cis*-regulatorische RNA-Elemente enthalten, die deren Prozessierung und Transport vermitteln können. An der Vermittlung dieser Intron-unabhängigen Genexpression können sowohl Proteine der hnRNP-Familie (375), als auch der SR-Familie (280) beteiligt sein, welche als Adaptorproteine für die Bindung an den zellulären Exportrezeptor Tap dienen sollen (98, 279).

Retroviren müssen neben gespleißten RNAs auch intronhaltige RNAs in das Cytoplasma exportieren, wodurch eine Unterscheidung von Intron-abhängiger und Intron-unabhängiger Genexpression erschwert wird. Einfache Retroviren, wie beispielsweise das Mason-Pfizer Affen Virus (MPMV) (57) oder das Rous Sarkom Virus (RSV) (465), verfügen hierzu über konstitutive Transportelemente (CTE), welche direkt mit dem Exportrezeptor Tap interagieren können (240, 304). Bei komplexen Retroviren wird der nukleocytoplasmatische Export intronhaltiger RNAs durch die Interaktion mit zusätzlichen Virus kodierten Regulatorproteinen, wie dem Rev-Protein bei HIV oder dem Rex-Protein bei HTLV, vermittelt (178). Rev umgeht in der späten Phase des HIV-1 Infektionszyklus die Kernretention intronhaltiger RNAs durch Nutzung eines U snRNA- bzw. 5S RNA-spezifischen, CRM1-abhängigen Exportweges. (182, 191, 397).

Transfektionsexperimente mit subgenomischen HIV-1 Expressionsvektoren hatten, bezüglich der Notwendigkeit einer 5'-Spleißstelle stromaufwärts des *env* Leserahmens, in der Vergangenheit zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Untersuchungen, bei denen die Rev Funktion als Voraussetzung für die Suppression von Spleißstellen und für den nukleocytoplasmatischen Export der *env* mRNAs betrachtet wurde, führten zu dem Schluss, dass eine funktionsfähige 5'-Spleißstelle für die Rev-vermittelte *env*-Expression notwendig ist (95, 383, 596). Lu et al. demonstrierten die Notwendigkeit der 5'-Spleißstelle durch eine Mutation des Spleißdonors 4 an der Position +5, welche zu einem Verlust der *env*-Expression führte und sich durch eine kompensatorische Mutation innerhalb der U1 snRNA wiederaufheben ließ (383). Eine Fehlbasenpaarung an der Position +5 der 5'-Spleißstelle führt jedoch nicht generell zu einem Verlust der Funktionalität der Spleißstelle, da beispielsweise die Sequenz des Spleißdonors 2 (SD2) in natürlich auftretenden HIV-Isolaten eine identische Fehlbasenpaarung an dieser Position enthält und diese 5'-Spleißstelle

trotzdem genutzt wird. In anderen Untersuchungen, welche zu einem erfolgreichen nukleocytoplasmatischen Export von intronlosen, RRE-haltigen mRNAs führten, wurde die Notwendigkeit einer 5'-Spleißstelle in der Rev-vermittelten Genexpression bestritten (184, 450). Rückblickend wurden diese Experimente und ihre Interpretation sowohl durch die Verwendung unterschiedlicher experimenteller Systeme, als auch durch die simultane Betrachtung verschiedener Effekte der 5'-Spleißstelle, zum einem in der Vermittlung der prä-mRNA Stabilität und zum anderen in der Notwendigkeit für die Rev Antwort, erschwert. Untersuchungen an dem intrinsisch instabilen, subgenomischen HIV-1 *env* Transkript in unserem Labor sprechen für eine essentielle Funktion der 5'-Spleißstelle beim Schutz der prä-mRNA vor nukleärer Degradation, welche unabhängig von der Spleißreaktion erfolgt (302).

Vermutlich sind diese Beobachtungen bezüglich des Schutzes der RNA vor nukleärer Degradation auch auf andere, proximal zur „cap“-Struktur lokalisierte, 5'-Spleißstellen übertragbar. Demnach wäre es denkbar, dass im Fall der polycistronischen HIV-1 prä-mRNA die 5'-Spleißstelle SD1 von ähnlicher Bedeutung ist, wie die Funktion der 5'-Spleißstelle SD4 in den Transkripten der subgenomischen HIV Konstrukte. In diesem Fall würde eine Mutation der 5'-Spleißstelle SD1 nicht nur das HIV-1 Spleißmuster beeinflussen, sondern auch zu einer Destabilisierung des Primärtranskriptes führen. Ebenso würde dies die Interpretation von Experimenten, welche eine Mutation der proximal zur „cap“-Struktur gelegenen 5'-Spleißstelle beinhalten, wie beispielsweise der Spleißstellen-regulierten Inaktivierung der HIV-1 5'-LTR Polyadenylierungsstelle, erschweren (15, 16, 17).

Andererseits konnte an einem synthetischen *gag* Transkript gezeigt werden, dass eine Deletion der HIV-1 5'-Spleißstelle SD1 die Menge an exprimierten Gag Protein nicht beeinflusste (229). Darüber hinaus war der nukleocytoplasmatische Export dieses Transkriptes nicht von einer Rev/RRE Interaktion abhängig und ließ sich nicht durch Leptomycin B inhibieren, was für einen CRM1 unabhängigen Exportweg spricht (229). Zurückzuführen war diese 5'-Spleißstellen unabhängige *gag*-Expression auf eine umfangreiche Veränderung der Codon-Nutzung innerhalb dieses synthetischen Transkriptes (229). Durch die veränderte „codon usage“ wurde eine Reduktion des AU-Gehalts erzielt, was zu einer erhöhten RNA Stabilität und einer gesteigerten *gag*-Expression in Säugerzellen führte (148).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sprechen für eine zusätzliche Erhöhung der Intron-abhängigen Genexpression durch die stabilisierende Funktion der 5'-Spleißstelle,

welche bereits vor, bzw. unabhängig von der Spleißreaktion erfolgen kann. Dieses zusätzliche, von der Spleißreaktion unabhängige, Stabilisierungsereignis wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich die Rev-vermittelte *env*-Expression auch in Gegenwart eines stabilisierenden, aber spleißinaktiven Spleißdonors nachweisen lässt (196). Die stabilisierende Funktion der 5'-Spleißstelle wird durch die Bildung eines RNA-Duplex zu dem freien 5'-Ende der U1 snRNA vermittelt. Die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle, dient neben der Initiation der Spleißosomen Assemblierung, zumindest in manchen Fällen auch dem Schutz der prä-mRNA vor nukleärer Degradation (25, 302, 383). Durch wiederholtes *in vitro* Spleißen zufälliger RNA Sequenzen in HeLa Kernextrakt ließen sich auch mit einer U1 snRNA, welche eine Deletion des 5'-Endes aufwies, funktionelle 5'-Spleißstellen selektionieren (384). Dieses Ergebnis steht jedoch nicht im Widerspruch mit dem Ergebnis, dass eine Basenpaarung zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle für das Spleißen der prä-mRNA *in vivo* notwendig ist (690). Wahrscheinlich wird die Erkennung der Spleißdonorsequenz, in Abwesenheit einer Basenpaarung zu der U1 snRNA, durch zusätzliche Protein Interaktionen zwischen dem U1 snRNP und der 5'-Spleißstelle vermittelt (158, 159, 188). Dies könnte auch erklären, weshalb Spleißstellen bei Metazoen, im Vergleich zu Spleißstellen bei Säugern, nur wenig konserviert sind (68, 443, 474, 551).

Trotzdem wurden in der Vergangenheit Versuche unternommen, Konsensus Sequenzen für Spleißstellen aufzustellen, welche die Häufigkeiten einzelner Nukleotide an bestimmten Positionen widerspiegeln. Für die 5'-Spleißstelle wurde durch Sequenzvergleiche folgende Konsensus Sequenz für die Positionen -2 bis +6 ermittelt: AG/GURAGU, wobei die Exon/Intron Grenze durch den Schrägstrich symbolisiert wird und R für eine der Purinbasen Adenin oder Guanin steht (441, 551). Diese Konsensus Sequenz ist komplementär zu der Sequenz von der Position +3 bis +10 am 5'-Ende der U1 snRNA. Die Mutationsanalyse der Sequenz der 5'-Spleißstelle SD4 hat jedoch gezeigt, dass sich generell die Positionen -3 bis +8 an der Ausbildung eines RNA-Duplex mit der U1 snRNA beteiligen können. Das Unvermögen der Position -4 eine Fehlbasenpaarung zu kompensieren steht im Einklang mit Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass die Position -4 eine interne Basenpaarung innerhalb einer „stem“-Sekundärstruktur der U1 snRNA ausbildet (56). Da anhand von Sequenzvergleichen keine Konservierung der 5'-Spleißstelle an den Positionen -3, +7 und +8 zu beobachten war, wurde geschlussfolgert, dass sich diese Basen normalerweise nicht an der RNA-Duplex Formation mit der U1 snRNA beteiligen (68).

In der hier vorgestellten Mutationsanalyse der 5'-Spleißstelle ließ sich jedoch experimentell eine deutliche Abhängigkeit von diesen Positionen nachweisen, da einige Mutationen auf die

zusätzliche Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in diesen Bereichen angewiesen waren, um eine *env*-Expression zu ermöglichen (Abb. 9) (196, 302). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit ähnlichen Beobachtungen an 5'-Spleißstellen des Rous Sarkom Virus (RSV), bei denen ebenfalls eine funktionelle Beteiligung der Positionen +7 und +8 nachgewiesen werden konnte (271). Darüber hinaus ließ sich in einem *in vitro* Ansatz zur Selektion funktioneller 5'-Spleißstellen aus zufälligen RNA Sequenzen eine Bevorzugung einer Purinbase an der Position +7 beobachten (384). Weiterhin konnte in unserem Labor, anhand von *in vivo* Spleißexperimenten, eine Beteiligung der Positionen +7 und +8 an der Exon Erkennung nachgewiesen werden (196). Die fehlende Konservierung an diesen Positionen deutet darauf hin, dass statistisch gesehen eine Beteiligung dieser Positionen selten auftritt und somit eine U1 Komplementarität an den zentralen Positionen der 5'-Spleißstelle bei den meisten Spleißdonorsequenzen bereits ausreichend ist, um eine stabile Bindung der U1 snRNA zu gewährleisten.

Eine Erhöhung der U1 Komplementarität der 5'-Spleißstelle SD4 über diesen, zur stabilen Bindung des U1 snRNPs notwendigen, Schwellenwert führte zu keiner weiteren Steigerung der *env*-Expression in der Immunoblot Analyse (Abb. 6). In Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte durch eine erhöhte Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA *in vitro* eine verminderte Spleißeffizienz beobachtet werden (584). Nach dieser Theorie der Hyperstabilisierung kann die U1 snRNA, im weiteren Verlauf der Spleißreaktion, nicht mehr durch die U6 snRNA von der 5'-Spleißstelle verdrängt werden (584). Die Verdrängung der U1 snRNA wird unter ATP-Verbrauch durch eine DEAD-box RNA-Helikase vermittelt (584, 614).

In HeLa Zellen ist das Phänomen der Hyperstabilisierung hingegen nicht zu beobachten, da selbst bei maximaler Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA keine verminderte Spleißeffizienz zu beobachten war (Freund et al., in Vorbereitung). Darüber hinaus scheint eine erhöhte Komplementarität der 5'-Spleißstelle SD4 zu der U6 snRNA, bei gleichbleibender U1 Komplementarität, weder einen Einfluss auf die Spleißeffizienz, noch auf die Stabilisierung der prä-mRNA auszuüben (Freund et al., in Vorbereitung). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in Untersuchungen an dem Moloney-Maus Leukämie Virus durch eine Erhöhung der U6 Komplementarität an der Position +4 der 5'-Spleißstelle ebenfalls keine Erhöhung der Spleißeffizienz beobachtet werden (5). Durch eine zusätzliche U6 komplementäre Base an der Position +6 der 5'-Spleißstelle konnte hingegen die Spleißeffizienz verdoppelt werden (5). Diese Ergebnisse würden für eine unterschiedliche Gewichtung der Basenpaarungen zu der U6 snRNA sprechen, wie sie

hinsichtlich der U1 Komplementarität, aufgrund der Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4, bereits gezeigt werden konnte (196, 302). Eine durch Mutation der 5'-Spleißstelle veränderte U6 Komplementarität sollte, bei gleichbleibender U1 Komplementarität, keinen Einfluss auf die Stabilisierung der ungespleißten *env* mRNA ausüben, da der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs erst nach der Bindung von Rev an die RRE Struktur erfolgt (326).

In NMR spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zwischen G:U „wobble“ Basenpaarungen, in Abhängigkeit der benachbarten Basenpaarungen, nur eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet wird (100). Insofern wurde die Beteiligung von G:U Basenpaarungen an der Stabilisierung der prä-mRNA an sämtlichen möglichen Positionen innerhalb des RNA-Duplex analysiert. Für alle Positionen der 5'-Spleißstelle ließ sich, im Vergleich zu einer Standard Watson-Crick A:U Basenpaarung an derselben Position, eine geringere Beteiligung einer G:U „wobble“ Basenpaarung an der U1 snRNA-abhängigen Rev-vermittelten *env*-Expression beobachten. Da eine A:U Basenpaarung durch den „splicefinder“ Algorithmus mit maximal zwei Wasserstoffbrückenbindungen bewertet wird, wird die geringere Beteiligung einer G:U Basenpaarung mit nur einer Wasserstoffbrückenbindung gezählt. Jedoch zeigten manche G:U Basenpaarungen, wenn sie nicht durch eine ausreichende Anzahl an benachbarten Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wurden, keine Beteiligung an der Stabilisierung des RNA-Duplex, so dass diese durch den Algorithmus als Fehlbasenpaarung bewertet werden.

Weiterhin wurde beobachtet, dass eine A3G Punktmutation der 5'-Spleißstelle zu einem vollständigen Verlust der Glykoprotein Nachweisbarkeit in der Immunoblot Analyse führen kann (Abb. 16, vgl. cs-3¹⁵ und cs-3¹⁴). Unter Betrachtung der aufgestellten Spleißstellen Konsensus Sequenz (AG/GURAGU) würde man dieses Ergebnis nicht erwarten, da die beiden Purinbasen statistisch mit nahezu gleicher Häufigkeit an der Position +3 der 5'-Spleißstelle auftreten. Dies steht jedoch in deutlichem Gegensatz zu einer analogen A3G Punktmutation, die bei Patienten der X-chromosomalen Retinitis pigmentosa (XLRP, „X-linked retinitis pigmentosa“) beschrieben wurde. Die IVS4+3a>g Punktmutation innerhalb des Retinitis pigmentosa GTPase Regulators (RPGR) Gens führt durch eine ausbleibende Erkennung des Exons 4 des RPGR Gens zu dieser hereditären Augenerkrankung (64). Durch die Analyse der Mutation durch den „splicefinder“ Algorithmus wird diese Nicht-Erkennung des Exons korrekt vorhergesagt, da die Wildtyp-Sequenz (CAGGTatagt), unter Ausbildung von 14 Wasserstoffbrückenbindungen, als „HC“ bewertet wird, während die IVS4+3a>g Mutation (CAGGTgtagt) mit 12 Wasserstoffbrückenbindungen als „LC“

bewertet wird. Die durch die Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 ermittelten, experimentellen Ergebnisse werden zusätzlich durch statistische Untersuchungen unterstützt, bei denen eine deutliche Präferenz für ein Adenin, gegenüber einem Guanin, an der Position +3 zu beobachten war, wenn eine Fehlbasenpaarung an der Position +5 der 5'-Spleißstelle auftrat (67). Darüber hinaus konnte durch Sequenzvergleiche der selten auftretenden, nicht kanonischen GC-AG Spleißstellen (176), ebenfalls eine Bevorzugung eines Adenins an der Position +3 der 5'-Spleißstelle nachgewiesen werden (618). Untersuchungen an Minigen-Konstrukten mit GC-AG Spleißstellen konnten die Präferenz eines Adenins an der Position +3 ebenfalls bestätigen, da andere Basen an dieser Position zu einer Nicht-Erkennung des zentralen Exons führten (573).

Durch die zusätzliche Annahme, dass sich die endständigen Basenpaarungen an den Positionen -3 und +8 der 5'-Spleißstelle, im Vergleich zu zentralen Watson-Crick Basenpaarungen, mit einer Wasserstoffbrückenbindung weniger an der Stabilisierung des RNA-Duplex beteiligen, ließ sich die Menge an exprimiertem Glykoprotein mit der Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zu der U1 snRNA korrelieren. Die verminderte Stabilität einer Basenpaarung zwischen der Position -3 der 5'-Spleißstelle und der Position +11 der U1 snRNA könnte, bedingt durch ihre direkt an die „stem I“-Struktur angrenzende Position, durch eine verminderte Flexibilität dieser Position und einer daraus resultierenden sterischen Hinderung erklärt werden (56).

Die Zugänglichkeit der 5'-Spleißstelle könnte die Bindung der U1 snRNA ebenfalls beeinflussen, beispielsweise durch lokale, intramolekulare RNA Wechselwirkungen an der Spleißstelle oder in ihrer direkten Umgebung, wie es bei der HIV-1 3'-Spleißstelle SA3 beschrieben wurde (289). Um zu untersuchen, ob durch Sekundärstrukturen der prä-mRNA die Bindung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle inhibiert werden kann, wurde die HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 gegen die „stem-loop“ Struktur tragende Spleißstelle SD1 ausgetauscht (36). Es konnte jedoch, selbst durch Verlängerung der Stammstruktur, keine Verminderung der 5'-Spleißstellen abhängigen, Rev-vermittelten *env*-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann es als unwahrscheinlich betrachtet werden, dass in der hier vorgestellte Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 die U1 snRNA Bindung zusätzlich durch RNA Sekundärstrukturen beeinflusst wurde.

Basierend auf den Mutationsanalysen der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 wurde ein Algorithmus zur Beschreibung von U1 snRNA Bindungsstellen entwickelt. Der „splicefinder“ Algorithmus ist im Internet unter <http://www.splicefinder.net/> frei zugänglich und analysiert

potentielle 5'-Spleißstellen auf der Grundlage des zur U1 snRNA ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungsmusters. Die Klassifizierung von U1 snRNA Bindungsstellen erfolgt als „high complementarity“ (HC) oder „low complementarity“ (LC), in Abhängigkeit ihrer Fähigkeit die HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 in der Rev-vermittelten *env*-Expression funktionell ersetzen zu können. Dieses Konzept zur Beschreibung von potentiellen 5'-Spleißstellen beruht auf der Grundlage des zur U1 snRNA ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungsmusters, unter zusätzlicher Berücksichtigung benachbarter Basenpaarungen und einer unterschiedlichen Gewichtung der einzelnen Positionen innerhalb des RNA-Duplex. Dieser Ansatz liefert eine zuverlässigere Beschreibung als der Versuch, 5'-Spleißstellen auf der alleinigen Grundlage von statistischen Häufigkeitsverteilungen bestimmter Nukleotide an Exon/Intron Grenzen identifizieren zu wollen (68, 443, 474, 551), da unterschiedliche, funktionelle 5'-Spleißstellen nicht mehr als drei gemeinsame Nukleotide aufweisen müssen (Abb. 7, vgl. $cs +1^{14}$ und $cs +4^{18}$). Weiterhin zeigt die Bewertung der HIV-1 5'-Spleißstellen auf der Grundlage des Wasserstoffbrückenbindungsmodells eine Korrelation mit den von O'Reilly et al. experimentell ermittelten Spleißeffizienzen dieser Spleißdonorsequenzen (464).

Die exemplarische Analyse der 5'-Spleißstellen des humanen *ATM* Gens demonstrierte die generelle Anwendbarkeit des „splicefinder“ Algorithmus auch an nicht HIV spezifischen Sequenzen. Die Untersuchung erfolgte mit dem aus der Mutationsanalyse des HIV-1 SD4 abgeleiteten Schwellenwert von $N_{H-cont} \geq 13$ und führte zu einer korrekten Klassifizierung von 51, der insgesamt 64 innerhalb des *ATM* Gens beschriebenen, kanonischen 5'-Spleißstellen als „high complementarity“ (HC), was einer Sensitivität des Algorithmus von 80% entspricht. Eine Verringerung des Schwellenwertes um eine Wasserstoffbrückenbindung auf $N_{H-cont} \geq 12$ führte zu einer korrekten Beschreibung von 60 der 64 5'-Spleißstellen als HC, was einer Steigerung der Sensitivität auf 94% entspricht. Jedoch resultierte diese Modifikation der Schwellenwert Einstellung, innerhalb eines Datensatzes von 17 beschriebenen Spleißstellen Mutationen des humanen *ATM* Gens, welche zu einer Nicht-Erkennung eines Exons führten („exon skipping“), zugleich in einer verminderten Sensitivität der Erkennung dieser Spleißstellen als „low complementarity“ (LC) von 16/17 (94% Sensitivität) auf 14/17 (82% Sensitivität). Diese Beobachtungen sprechen für zusätzliche Regulationsebenen in der Erkennung von Spleißstellen.

4.2 Der Einfluss der 5'-wärts des Spleißdonors gelegenen Sequenz auf die Rev-vermittelte *env*-Expression

Die Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA scheint alleine nicht auszureichen, um eine Nutzung der Spleißdonorsequenz zu gewährleisten. Dies konnte experimentell bestätigt werden, da eine 5'-Spleißstelle in Abwesenheit einer funktionellen „upstream“ Sequenz, selbst bei maximaler Komplementarität, nicht zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression führte (Abb. 33). In der Literatur wird hingegen beschrieben, dass ESE- bzw. ISE-Elemente lediglich für die Erkennung schwacher 5'-Spleißstellen essentiell sind, während starke 5'-Spleißstellen „enhancer“-unabhängig erkannt werden sollen (für eine Übersicht s. (230)). Die bisherige Definition einer Spleißdonorsequenz als „starke“ bzw. „schwache“ 5'-Spleißstelle auf der Grundlage von Häufigkeitsverteilungen bestimmter Nukleotide an den Exon/Intron Grenzen, stellt sich jedoch aus den im vorherigen Abschnitt vorgestellten Gründen als problematisch dar. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb des SV-*env* Konstruktes, durch die Deletion der stromaufwärts des Spleißdonors liegenden Sequenz ein kritischer Abstand der 5'-Spleißstelle zu der „cap“-Struktur unterschritten wurde, wodurch eine Inhibition der RNA-Duplex Bildung an der 5'-Spleißstelle vorstellbar wäre.

Die Notwendigkeit zusätzlicher, außerhalb der Spleißstelle liegender Sequenzen legte die Frage nahe, welche Voraussetzungen eine spleißfördernde Sequenz erfüllen muss, um eine Rev-vermittelte *env*-Expression zu ermöglichen. Die Aktivierung von Spleißstellen durch diese Sequenzelemente erfolgt meist über die Bindung von SR-Proteinen, welche zu einer Rekrutierung essentieller Spleißfaktoren führt (78, 84, 205, 218, 357, 495, 599, 666). Aus diesem Grund wurden, unter Verwendung des „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86), Konstrukte mit hochaffinen Bindungsstellen für die SR-Proteine SF2/ASF, SRp40, SC35 und SRp55 stromaufwärts der *tat/rev* Spleißstelle SD4 kloniert und auf ihre Fähigkeit zur Erkennung der 5'-Spleißstelle analysiert. Eine SR-Protein vermittelte Bindung des U1 snRNPs an die Spleißdonorsequenz sollte zu einer Stabilisierung der prä-mRNA führen, welche in Anwesenheit von Rev zu einer Expression des viralen Glykoproteins führt. Es konnte gezeigt werden, dass eine einzelne SR-Protein Bindungsstelle nicht in der Lage ist, zu einer in der Immunoblot Analyse nachweisbaren *env*-Expression zu führen (Abb. 31).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass spezifische Kombination aus zwei SR-Protein Bindungsstellen stromaufwärts des SD4 eine *env*-Expression vermitteln können (Abb. 32).

Unter den betrachteten nicht-snRNP Spleißfaktoren scheint das SR-Protein SF2/ASF das Einzige zu sein, welches als Homodimer eine Erkennung der 5'-Spleißstelle unterstützt und zu einer nachweisbaren *env*-Expression in der Immunoblot Analyse führte (Abb. 32). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von Tacke et al., die zeigen konnten, dass durch die Kombination von drei SF2/ASF Bindungsstellen ein starkes „enhancer“ Element generiert werden kann, wohingegen dies durch die Kombination dreier SC35 Bindungsstellen nicht möglich war (603). In einer darauf folgenden Publikation wurde zwar auch die Bildung eines funktionellen „enhancers“ durch drei aufeinanderfolgende SRp40 Bindungsstellen beschrieben, diese Bindung von SRp40 an die verwendete Bindesequenz war jedoch stark von dem Phosphorylierungsgrad der RS-Domäne abhängig (602). Folgende Experimente konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der RS-Domänen notwendig ist, um Interaktionen zwischen SR-Proteinen untereinander auszubilden (235, 485), wodurch eine Beteiligung weiterer SR-Proteine innerhalb dieses SRp40 Homotrimer „enhancers“ nicht auszuschließen ist. Die Substratspezifität der SR-Proteine wird hingegen durch die N-terminale RNA Bindedomäne vermittelt, da gezeigt werden konnte, dass die Arginin/Serinreiche Domäne in manchen SR-Proteinen austauschbar ist, ohne dass die Substratspezifität dadurch beeinflusst wird (417, 603, 604). Die vermutete Beteiligung weiterer SR-Proteine innerhalb des beschriebenen SRp40 „enhancers“ wird zusätzlich durch die Analyse der verwendeten SRp40 Bindesequenz (GAGCAGTCGGCTC) mit dem „ESE-Finder“ Algorithmus unterstützt, welcher die Bindung des SR-Proteins SF2/ASF an ein Fragment dieser Sequenz (CAGTCGG) vorhersagt.

Die Erkennung der 5'-Spleißstelle konnte in unserem experimentellen System zusätzlich durch spezifische Heterodimere aus SF2/SRp40, SC35/SF2 und SC35/SRp40 Bindungsstellen unterstützt werden, während das untersuchte SRp55 weder als Homodimer, noch als Heterodimer eine Rev-vermittelte *env*-Expression ermöglichte (Abb. 32). Auffallend bei der Betrachtung der spleißfördernde Kombinationen an SR-Protein Bindungsstellen ist, dass die Bindung der SR-Proteine scheinbar in einer spezifischen Reihenfolge auftreten muss. Das SR-Protein SC35 kann die Erkennung der 5'-Spleißstelle nur in der distalen Position unterstützen, während SRp40 an der proximalen Position gebunden sein muss. Die distal der 5'-Spleißstelle SD4 gelegene Bindungsstelle würde sich in authentischen HIV-Transkripten gleichzeitig proximal zu der stromaufwärts gelegenen 3'-Spleißstelle befinden. Die Notwendigkeit der Bindung von SC35 an die distal des Spleißdonors gelegene Bindungsstelle könnte durch die beschriebene Funktion von SC35 sowohl an der Erkennung der 5'-Spleißstelle, als auch an der Erkennung der 3'-Spleißstelle

beteiligt zu sein, erklärt werden (202). Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass SC35 in der Lage ist einen spleißdefizienten, U2AF depletierten Zellextrakt durch eine funktionelle Substitution des an den Polypyrimidintrakt bindenden U2AF65, zu komplementieren (389). Die Notwendigkeit der Bindung von SRp40 an die Spleißdonor proximale Position könnte durch Beobachtungen von Yeakly et al. erklärt werden, welche eine Kofaktor-Abhängigkeit der SRp40 Bindung an GAA Sequenzwiederholungen beschrieben haben (666). In dem hier betrachteten Fall könnte das, an die distale SR-Protein Bindungsstelle gebundene, SF2/ASF bzw. SC35 als Kofaktor dienen, welcher über Interaktionen der RS-Domänen zu einer Rekrutierung von SRp40 an die Spleißdonor proximale Bindungsstelle führen könnte.

Die „enhancer“ gebundenen SR-Proteine unterstützen die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP über Interaktionen ihrer RS-Domänen mit den RS-Domäne von U1 snRNP assoziierten Proteinen (331). Dieses Rekrutierungsmodell wird durch die Nachweisbarkeit von Interaktionen zwischen den RS-Domänen verschiedener SR-Proteinen und dem U1 snRNP assoziierten Proteinen U1-70K unterstützt (76, 640, 657, 661). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte eine Deletion der U1-70K Bindungssequenz innerhalb der U1 snRNA zu einem Verlust der Nachweisbarkeit der *env*-Expression in der Immunoblot Analyse (Abb. 38). Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Phosphorylierung sowohl der RS-Domänen der ESE-gebundenen SR-Proteine (640, 662, 667), als auch der RS-Domäne des U1-70K Proteins (655) für diese Interaktion essentiell ist (für eine Übersicht s. (434)). In Übereinstimmung mit diesem Modell führte die Kotransfektion eines, aus dem Herpes simplex virus 1 (HSV-1) stammenden, Inhibitors (ICP27) (543) der zellulären SR-Protein Kinase1 (SRPK1) (241, 242), zu einer deutlichen Reduktion der detektierbaren Menge an HIV-1 Glykoprotein (Abb. 39). Die durch ICP27 induzierte Hypophosphorylierung der RS-Domänen führte nicht zu einer vollständigen Inhibition der *env*-Expression, da die Arginin/Serin-reichen Domänen, zumindest *in vitro*, neben der SR-Protein Kinase 1 auch durch weitere zelluläre Kinasen phosphoryliert werden können (121, 332, 452, 516, 640, 656).

Ähnlich der Hypophosphorylierung scheint auch eine Hyperphosphorylierung der RS-Domänen zu einer reduzierten Interaktionsfähigkeit zwischen den RS-Domänen zu führen, da durch Kotransfektion verschiedener Kinasen Expressionsplasmide ebenfalls eine verminderte *env*-Expression beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von Prasad et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass sowohl eine Hypo-, als auch eine Hyperphosphorylierung der SR-Proteine zu

einer Inhibition der Spleißaktivität führt (489). Die regulierte Phosphorylierung und Dephosphorylierung der SR-Proteine scheint auch während der Spleißreaktion eine Rolle zu spielen, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass nach der Spleißosomen Assemblierung eine Dephosphorylierung von SF2/ASF für die erste Transester Reaktion notwendig ist (77).

Demnach ist eine Selektion alternativer Spleißstellen nicht nur durch die Bindung der SR-Proteine an spleißfördernde und spleißinhibierende Sequenzen möglich, sondern auch der Phosphorylierungsgrad der SR-Proteine selbst kann eine Regulationsebene des alternativen Spleißens darstellen. Die Regulation der Funktion von SR-Proteinen erfolgt über die Phosphorylierung ihrer RS-Domänen durch SR-Protein spezifische Kinasen (241, 662), wodurch sowohl die Aktivität der SR-Proteine (640, 662, 667), als auch die zelluläre Lokalisation (122, 241, 436, 640, 667) beeinflusst wird. Somit könnte die Phosphorylierung von SR-Proteinen durch spezifische Proteinkinasen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Vernetzung extrazellulärer Signale mit der Regulation alternativer Spleißereignisse übernehmen. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von SRp40 über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3) Signalweg erfolgen kann, was zu einer alternativ gespleißten Proteinkinase-C betaII (PKC β II) mRNA führte (477). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von hnRNP A1 an ein, innerhalb eines alternativen Exons der CD44 prä-mRNA lokalisiertes, ESS-Element durch die Aktivierung des ERK („extrazellulär regulierte Kinase“) MAP-Kinase Signalwegs aufgehoben werden konnte (412, 644).

Innerhalb des HIV-1 Exons 5 konnte ein neues, bisher nicht beschriebenes ESE-Element identifiziert werden (78). Dieses als GAR-ESE bezeichnete Element weist eine Purin-reiche Region auf, welche aus mehreren Wiederholungen eines GAR Motivs besteht. Ein solches Motiv wurde bereits als Bindungsstelle für das SR-Protein SF2/ASF beschrieben (603). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte die Bindung von SF2/ASF an dieses Fragment in einer „elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Analyse“ (EMSA, „electrophoretic mobility shift assay“) nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Mutation der GAR Sequenzwiederholungen zu CAR (GAR⁻ Mutation) führte zu einer deutlichen, jedoch nicht vollständigen, Reduktion der Rev-vermittelten *env*-Expression (Abb. 27A, vgl. Spur 2 und 5 oder Abb. 27B, vgl. Spur 1 und 2). Eine Analyse der eingeführten GAR⁻ Mutation mit Hilfe des „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86) könnte die unvollständige Inhibition der Glykoprotein Expression erklären, da durch die Mutation lediglich eine der drei funktionellen SR-Protein Bindungsstellen mutiert wurde.

Interessanterweise ließ sich der, durch die GAR⁻ Mutation hervorgerufene, Verlust einer SF2/ASF Bindungsstelle innerhalb des ESE-Elements durch eine Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA kompensieren (Abb. 27B, vgl. Spur 2 und 3). Die GAR⁻ Mutation ließ sich dabei durch die direkte Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle effizienter kompensieren, als durch Kotransfektion einer mutierten U1 snRNA, da diese mit der zellulären U1 snRNA um die Bindung an der 5'-Spleißstelle kompetitiert (Abb. 27A, vgl. Spur 5 und 6). Die beobachtete Kompensationsfähigkeit der GAR⁻ Mutation bestätigt die beschriebene Beziehung zwischen der Stärke einer 5'-Spleißstelle und der Notwendigkeit einer „enhancer“-Sequenz (für eine Übersicht s. (230)). Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine Deletion des ESE-Elements nicht durch eine maximale U1 Komplementarität der 5'-Spleißstelle ausgeglichen werden (Abb. 33).

Die Beobachtung, dass die Anwesenheit des GAR-ESE für die virale *env*-Expression notwendig ist, unterstreicht die essentielle Rolle dieses ESE-Elements in der viralen Genexpression. Innerhalb des HIV-1 Genoms wurden bereits spleißregulierende Sequenzen identifiziert, bei denen es sich in nahezu allen bisher beschriebenen Fällen um stromabwärts einer 3'-Spleißstelle gelegene ESS-Elemente („exonic splicing silencer“) handelt (8, 9, 9, 39, 288, 289, 559, 560). Eine Ausnahme bildet das innerhalb des Introns stromaufwärts des SA7 lokalisierte ISS-Element („intronic splicing silencer“) (610). Spleißfördernde ESE-Elemente wurden bei HIV bisher nur in direkter Nachbarschaft zu ESS-Elementen beschrieben, welche daher als zusammengesetzte ESS/ESE-Elemente betrachtet werden (560), und sich ebenfalls stromabwärts der zu regulierenden 3'-Spleißstelle befinden (80, 581, 648).

Die Vielzahl an beschriebenen ESS-Elementen innerhalb des HIV Genoms ist auf die Notwendigkeit ineffizienter Spleißakzeptoren für die Rev-Funktion zurückzuführen (559, 580). Die spleißinhibierenden ESS-Elemente reduzieren die Nutzung der stromaufwärts liegenden 3'-Spleißstelle meist über die Bindung von hnRNP Proteinen (79, 210, 288, 289, 611). Neben dieser spezifischen Inhibition der Spleißakzeptoren durch *cis*-regulatorische Sequenzelemente, weisen die HIV 3'-Spleißstellen auch eine intrinsische Ineffizienz auf. Diese ist auf suboptimale, Purin-haltige Polypyrimidinbereiche und auf Verzweigungsstellen, welche Fehlbasenpaarungen zu der U2 snRNA aufweisen, zurückzuführen (137, 160, 580, 601). Die Ineffizienz der 3'-Spleißstellen könnte eine Verlangsamung der Spleißkinetik bewirken (354) und dadurch, bei ausreichender Stabilisierung der prä-mRNA durch die 5'-Spleißstelle (302), den Export der ungespleißten RNA ermöglichen.

Spleißfördernde ESE-Elemente sind, im Vergleich zu ESS-Elementen, innerhalb des HIV Genoms seltener beschrieben worden. Bei den bisher identifizierten ESE-Elementen handelt es sich um zusammengesetzte ESS/ESE-Elemente „downstream“ der 3'-Spleißstelle SA7 (581) und stromabwärts des, nur in bestimmten HIV Isolaten genutzten (492, 537), Spleißakzeptors 6 (80, 648). Weiterhin konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass sich die Spleißeffizienz der 3'-Spleißstelle SA2 in Gegenwart ihrer stromabwärts gelegenen Sequenz deutlich steigern lässt, was für eine Beteiligung eines weiteren, bisher nicht identifizierten, ESE-Elements in dieser Region spricht (Dr. Susanne Kammler, Dissertation; Marianne Hipp, persönliche Mitteilung). Die ESE gebundenen SR-Proteine unterstützen die Erkennung der 3'-Spleißstelle durch Rekrutierung des U2AF65/35 Heterodimers (234, 642, 692), wobei Interaktionen zwischen den RS-Domänen verschiedener SR-Proteine und der U2AF35 Untereinheit experimentell nachgewiesen werden konnten (657). Die RS-Domäne der ESE gebundenen SR-Proteinen scheint auch direkt mit der Verzweigungsstelle der prä-mRNA interagieren zu können (232, 554).

Die Bindung von SR-Proteinen an die meisten ESE-Elemente scheint entweder eine Aktivierung der Spleißreaktion an der stromaufwärts liegenden 3'-Spleißstelle, oder an der stromabwärts liegenden 5'-Spleißstelle zu vermitteln. Bidirektionale „enhancer“ Elemente, welche zu einer simultanen Erkennung der 5'- und der 3'-Spleißstelle führen (54, 351, 547), sind innerhalb des HIV Genoms bisher nicht beschrieben worden. Innerhalb des HIV-1 Exons 5, das von den alternativen 3'-Spleißstellen SA4c, SA4a, SA4b und SA5 und der 5'-Spleißstelle SD4 flankiert wird, konnte ein neues, bidirektionales ESE-Element identifiziert werden, welches das Spleißen der Gene für *rev*, *vpu*, *env* und *nef* reguliert (78).

Die aktivierende Wirkung des ESE-Elements auf die stromaufwärts gelegene 3'-Spleißstelle wurde in einem *in vitro* Spleißassay demonstriert, in dem sich eine *trans*-aktivierende Bindung der beiden SR-Proteine SF2/ASF und SRp40 an das GAR-ESE-Element nachweisen ließ (Abb. 28B). Darüber hinaus zeigte die Analyse der GAR-ESE Funktion in einem subgenomischen 3-Exon-2-Intron Minigen Konstrukt, dass dieses Element für den korrekten Einschluss des *rev/nef* Exons 2 notwendig ist, da eine Mutation innerhalb des ESE-Elements zu einem Ausschluss dieses Exons führte (78). Ein vollständiger Ausschluss („exon skipping“) des HIV-1 Exons 5 ließ sich in dem Minigen Konstrukt ebenfalls nur durch eine Mutation des Spleißdonors 4 erzielen (78, 196). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Exon-Definitionsmodell, welches komplexe Interaktionen der Spleißmaschinerie über die gesamte Länge interner Exons von der 3'-Spleißstelle bis zur 5'-Spleißstelle erfordert (32).

Weiterhin ließ sich durch die Mutation des GAR-ESE eine verminderte Nutzung der 3'-Spleißstelle SA5 beobachten (78). Im Gegensatz zu den anderen ineffizienten HIV Spleißakzeptoren scheint die 3'-Spleißstelle SA5 somit auf eine stromabwärts liegende ESE Sequenz angewiesen zu sein. Dieser Unterschied könnte durch die direkte Nachbarschaft des SA5 zu den 3'-Spleißstellen SA4c, SA4a und SA4b, sowie der daraus resultierenden konkurrierenden Bindung von Spleißfaktoren an sich überlagernde Bindungssequenzen erklärt werden (601). Dieses Modell wird durch Beobachtungen von Bilodeau et al. bestätigt, die zeigen konnten, dass die Mutation des SA4b zu einer erhöhten Nutzung des SA5 führte (40).

Für eine Beteiligung des GAR-ESE an der Regulation der alternativen HIV-1 3'-Spleißstellen sprechen weiterhin Experimente in einem 3-Intron-2-Exon Konstrukt, in dem das GAR-ESE durch zwei Bindungsstellen für Bakteriophagenproteine (MS2 und PP7) substituiert wurde. Durch die Kotransfektion von Expressionsplasmiden, welche für RS-Domänen tragende Fusionsproteine kodieren, ließ sich in diesem Minigen Konstrukt eine unterschiedliche Nutzung der alternativen 3'-Spleißstellen beobachten. Die Kotransfektion von SF2/ASF Fusionsproteinen unterstützte die Erkennung der 3'-Spleißstellen SA4c, SA4a und SA4b. Die gemeinsame Kotransfektion von SF2/ASF- und SRp40 Expressionsplasmiden führte hingegen zu einer erhöhten Nutzung der 3'-Spleißstellen SA5 (Carolin Konermann, persönliche Mitteilung). Aktuelle Ergebnisse von Ropers et al. unterstützen diese SR-Protein vermittelte Nutzung alternativer HIV-1 3'-Spleißstellen (513). Diese Beobachtungen könnten weiterhin erklären, weshalb innerhalb des GAR-ESE drei funktionelle SR-Protein Bindungsstellen identifiziert werden konnten (Abb. 29), für eine minimale „enhancer“ Sequenz jedoch die Kombination von zwei SR-Protein Bindungsstellen bereits ausreichend war (Abb. 32).

Eine vollständige Degradation der RNA aufgrund einer nicht ausreichenden Komplementarität der 5'-Spleißstelle zu der U1 snRNA, ließ sich in dem 3-Exon-2-Intron Minigen Konstrukt nicht beobachten, da sich der Spleißdonor 4 in diesem Konstrukt nicht in der „cap“ proximalen Position befindet (78, 196, 302). Dennoch führte sowohl eine fehlende Bindung der SR-Proteine an das ESE-Element, als auch Mutationen der 5'-Spleißstelle SD4 in diesem Konstrukt zu einer reduzierten Gesamtmenge an gespleißter mRNA (78, 196). Es scheint, dass obwohl ein Teil der prä-mRNA unter Ausschluss des Exons 5 gespleißt wird, der Großteil der prä-mRNA nicht gespleißt, sondern aufgrund einer suboptimalen U1 snRNA Bindung an die 5'-Spleißstelle nukleär degradiert wird. Somit führt auch der Verlust des GAR-ESE zu einer zusätzlichen Reduktion der prä-mRNA Stabilität durch die

ausbleibende Rekrutierung der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle SD4. Ein zusätzlicher Einfluss auf die Effizienz des nukleocytoplasmatischen Exports der ungespleißten RNA kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

Die bidirektionale Wirkung des GAR-ESE konnte durch *in vivo* Transfektionsexperimente demonstriert werden, da sich hier eine zusätzliche, SR-Protein abhängige Wirkung des ESE-Elements auf die Erkennung der stromabwärts gelegene 5'-Spleißstelle SD4 durch das U1 snRNP nachweisen ließ (78). Eine gezielte Mutation der potentiellen SR-Protein Bindungsstellen innerhalb des GAR Fragmentes erfolgte unter Zuhilfenahme des „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86) und führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit der *env*-Expression in der Immunoblot Analyse (Abb. 29). Die durch den „ESE-Finder“ vorhergesagten, potentiellen Bindungsstellen für SF2/ASF und SRp40 konnten *in vitro* bestätigt werden, da diese für die Funktionalität des GAR-ESE essentiell waren (78). Darüber hinaus ließ sich die Substitution der GAR Sequenz gegen zwei MS2 Bindungsstellen durch Kotransfektion von RS-Domänen tragenden MS2-RS Fusionsproteinen funktionell wiederherstellen, wodurch die SR-Protein Abhängigkeit des ESE-Elements nochmals bestätigt wurde (Abb. 30). Weiterhin werden, durch die beobachtete Notwendigkeit von mindestens zwei MS2 Bindungsstellen, die experimentell ermittelten Daten zur Generierung einer Sequenz, welche die Erkennung einer 5'-Spleißstelle fördert, bestätigt (vgl. Abb. 30 und Abb. 32). Die GAR-ESE gebundenen SR-Proteine scheinen sowohl bei der Erkennung der 5'-Spleißstelle, als auch bei der Erkennung der 3'-Spleißstelle als molekulare Adapter zu fungieren, welche die Rekrutierung essentieller Spleißfaktoren an die flankierenden Spleißstellen vermitteln (582, 657).

Die essentielle Funktion des GAR-ESE-Elements in der Rev-vermittelten *env*-Expression wurde durch die experimentelle Erhöhung der Komplementarität der 5'-Spleißstelle SD4 zu der U1 snRNA deutlich. In Abwesenheit des ESE-Elements ließ sich selbst bei maximaler Komplementarität, unter Ausbildung von elf Basenpaarungen zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA, keine *env*-Expression in der Immunoblot Analyse detektieren (Abb. 33, Spur 4). Durch die zusätzliche Deletion der stromabwärts des GAR-ESE-Elements lokalisierten E42 Sequenz, ließ sich die *env*-Expression auch durch eine erweiterte Basenpaarung von 14 komplementären Nukleotiden zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA nicht wiederherstellen (Abb. 33, Spur 8). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass ein weiteres spleißregulatorisches Element innerhalb dieser Sequenz lokalisiert sein muss.

Eine weiterführende Analyse des E42 Elements zeigte, dass dieses Element nicht als Bestandteil des bidirektionalen GAR-ESE betrachtet werden kann, da ein Einfluss dieser Sequenz auf die stromaufwärts lokalisierten 3'-Spleißstellen nicht beobachtet werden konnte (Dr. Susanne Kammler, persönliche Mitteilung). Dieses Element scheint hingegen die Wirkung des GAR-ESE auf die stromabwärts gelegene 5'-Spleißstelle SD4 zu unterstützen. Die Sequenz scheint zwar keine essentielle Funktion bei der Erkennung der SD4 Ausgangssequenz zu besitzen (Abb. 34, Spur 4), die Anwesenheit des E42 Elements ist jedoch erforderlich, sobald die 5'-Spleißstelle eine geringere Komplementarität zu der U1 snRNA aufweist (Abb. 34, vgl. Spur 3 und 5). Diese Reduktion des zur Rev-vermittelten *env*-Expression benötigten Schwellenwerts, erfolgte jedoch nur in Gegenwart der stromaufwärts gelegenen GAR-Sequenz, da das E42 Element alleine nicht in der Lage war die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP zu vermitteln (Abb. 33).

Diese Beobachtung spricht für einen modularen Aufbau von ESE-Elementen, bei dem die zur Erkennung einer 5'-Spleißstelle benötigte U1 Komplementarität durch das Zusammenspiel verschiedener ESE gebundener SR-Proteine weiter reduziert werden kann. Nach diesem Modell würde eine minimale „enhancer“- Sequenz aus einer funktionellen Kombination von zwei SR-Proteinen bestehen (Abb. 32). Innerhalb des GAR-ESE konnten bereits drei funktionelle SR-Protein Bindungsstellen identifiziert werden, wobei die Nutzung der alternativen Kombination SF2/SF2 und SF2/SRp40 zu der Erkennung unterschiedlicher 3'-Spleißstellen führte (Corinna Asang, Carolin Konermann, persönliche Mitteilung). Die zusätzliche Anwesenheit des proximal der 5'-Spleißstelle gelegenen E42 Elements, erhöht die Komplexität des im HIV-1 Exon 5 liegenden ESEs auf fünf funktionelle SR-Bindungsstellen, wodurch die beobachtete Verringerung der notwendigen U1 Komplementarität erklärt werden könnte (Abb. 34). Demnach wäre die Effizienz eines ESE-Elements von der Anzahl funktioneller SR-Protein Kombinationen abhängig. Dieses Modell steht in Einklang mit experimentellen Untersuchungen zur Stärke von ESE-Elementen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Stärke eines ESE-Elements sowohl von der Anzahl und Aktivität der gebundenen SR-Proteine, als auch von der Distanz zu der Spleißstelle abhängig sein kann (233). Die zusätzliche Anwesenheit des Spleißdonor proximalen E42 Elements scheint somit zu einer Erhöhung der lokalen Konzentration an SR-Proteinen an dieser 5'-Spleißstelle zu führen.

Es konnte hingegen nicht eindeutig geklärt werden, weshalb das innerhalb des E42 Fragmentes vorhandene Modul aus einer SF2/ASF und einer SRp40 Bindungsstelle in Abwesenheit des GAR-ESE nicht in der Lage war, zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression

zu führen. In weiteren Mutationsanalysen konnten Faktoren wie die Gesamtlänge der stromaufwärts der Spleißdonors liegenden Sequenz, der Abstand der beiden SR-Protein Bindungsstellen zueinander, sowie der Abstand der Bindungsstellen zu der 5'-Spleißstelle ausgeschlossen werden. Damit ist das Unvermögen des E42 Elements GAR-ESE unabhängig zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression zu führen, wahrscheinlich auf der Sequenzebene zu suchen. Die Sequenzunterschiede zweier Konstrukte, welche sich in ihrer Fähigkeit zur Rev-vermittelten *env*-Expression unterschieden, konnten bis auf sieben Nukleotide reduziert werden.

Die Mutationsanalyse der verbleibenden Nukleotide hätte sowohl zu einer Veränderung der U1 Komplementarität der 5'-Spleißstelle, als auch, nach Vorhersage durch den „ESE-Finder version 2.0“ (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (86), zu einer Entstehung neuer SR-Protein Bindungsstellen geführt, wodurch die weitere Charakterisierung dieses Fragments erschwert wurde. Die Sequenzunterschiede der beiden funktionell unterscheidbaren Konstrukte liegen innerhalb der SRp40 Bindungsstelle und in den die Bindungsstelle direkt flankierenden Nukleotiden (Abb. 36). Ein Einfluss der potentiellen SF2/ASF Bindungsstelle kann somit ausgeschlossen werden. Dies wird durch die Austauschbarkeit dieser Sequenz zwischen den beiden Konstrukten bestätigt, welche nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der *env*-Expression führte (Abb. 36). Demnach muss der funktionelle Unterschied der beiden Konstrukte im Bereich der SRp40 Bindungsstelle lokalisiert sein.

Die Vorhersage der SR-Protein Bindungsstellen beruht zwar auf funktionellen SELEX-Untersuchungen, jedoch muss eine Homologie zu den ermittelten Konsensus Motiven nicht immer eine Bindung des jeweiligen SR-Proteins implizieren (373). Dennoch führte die Mutation dieser SRp40 Bindungsstelle innerhalb des SV-*env*/Ex5 Konstruktes, welches sowohl das GAR-ESE, als auch das E42 Element enthielt, zu einem Verlust der Erkennung der 5'-Spleißstelle bei einer verminderten U1 Komplementarität (Abb. 35, vgl. Spur 3 und 4), was die Bindung eines *trans*-aktivierenden Faktors an diese Sequenz nahegelegt wird. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass der zur Analyse der E42 Sequenz verwendete „ESE-Finder“, lediglich die Bindung von vier der neun eindeutig in Säugern beschriebenen SR-Proteinen identifizieren kann. Dadurch wäre es vorstellbar, dass an die SRp40 Bindungssequenz ein nicht durch den „ESE-Finder“ detektierbares SR-Protein bindet. Die teilweise nachgewiesene funktionelle Redundanz der SR-Proteine (für eine Übersicht s. (604)) wird durch den Sequenzvergleich des E42 Elements in verschiedenen HIV Subtypen bestätigt, da in zehn von 13 betrachteten Isolaten anstelle der SF2 Bindungsstelle eine putative SC35 Bindungsstelle auftritt (Abb. 40A). Die Funktionalität der SC35

Bindungsstelle innerhalb des E42 Fragments konnte, in Bezug auf die Fähigkeit zur Erkennung einer 5'-Spleißstelle mit verminderter U1 Komplementarität, experimentell nachgewiesen werden (Abb. 40B).

Eine Analyse der stromabwärts der 5'-Spleißstelle SD4 gelegenen Sequenz innerhalb des *tat/rev* Introns führte zu keiner weiteren Identifikation spleißregulatorischer Sequenzen, da eine 148 Nukleotide umfassende Deletion des *vpu* Leserahmens nicht zu einer detektierbaren Veränderung in der Erkennung der 5'-Spleißstelle führte (Daten nicht gezeigt). Eine weiterführende Deletionsanalyse ist in dem hier beschriebenen experimentellen System nicht möglich, da durch sie der *env* Leserahmen betroffen wäre. Darüber hinaus scheint die stromabwärts des Spleißdonors 4 gelegene Sequenz keinen Einfluss auf die Erkennung der 5'-Spleißstelle auszuüben, da der Austausch der SD4 proximalen 3'-Sequenz sowohl gegen die GAR-ESE Sequenz, als auch gegen die *hiv#18* „leader“-Sequenz identischer Länge, nicht zu einer veränderten *env*-Expression führte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin scheinen SR-Protein abhängige, spleißfördernde Elemente insgesamt weitaus häufiger in Exon- (78, 84, 218, 357, 495, 599, 666), als in Intronsequenzen (205) vorzukommen.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine zuverlässige Vorhersage von 5'-Spleißstellen nur unter zusätzlicher Betrachtung der flankierenden Sequenzen möglich ist. Eine verbesserte Beschreibung von 5'-Spleißstellen durch den „splicefinder“ Algorithmus wurde bisher durch die Betrachtung des vollständigen U1 snRNA komplementären Bereiches der 5'-Spleißstelle von der Position von -3 bis +8 erzielt (196, 302). Andere Algorithmen vernachlässigen die Positionen +7 und +8 (551) aufgrund einer nicht zu beobachtenden Präferenz für ein bestimmtes Nukleotid (68). Eine hinreichende Beschreibung von 5'-Spleißstellen auf der Grundlage von Konsensus Sequenzen scheint insgesamt ungeeignet, da gezeigt werden konnte, dass zwei funktionelle 5'-Spleißstellen nicht mehr als drei gemeinsame Nukleotide besitzen müssen (Abb. 7). Trotzdem wurden zahlreiche Versuche unternommen, eine Vorhersage von 5'-Spleißstellen, nur aufgrund von Ähnlichkeiten zu der Konsensus Sequenz, zu erzielen (548, 551, 579, 589). Eine verbesserte Vorhersage von 5'-Spleißstellen wurde durch die zusätzliche Betrachtung der Einflüsse benachbarter Basenpaarungen erzielt (67, 313, 423, 571, 680) und durch die Beobachtung, dass sich bestimmte Nukleotide an verschiedenen Positionen gegenseitig beeinflussen (510).

Die Analyse potentieller 5'-Spleißstellen durch den „splicefinder“ Algorithmus auf der Grundlage des Wasserstoffbrückenbindungsmodells beinhaltet zusätzlich eine modifizierte Beurteilung endständiger Basenpaarungen, sowie eine positionsabhängige Bewertung von

G:U „wobble“ Basenpaarungen (196). Da sich in dem hier verwendeten experimentellen System eine deutliche Abhängigkeit der Nutzung der *tat/rev* Spleißstelle SD4 von der stromaufwärts liegenden Sequenz zeigte (78), würde eine weiter verbesserte Klassifizierung einer potentiellen 5'-Spleißstelle in „HC“ oder „LC“, eine Analyse der flankierenden Sequenzen miteinbeziehen. Einer entsprechenden Analyse würde nach der Charakterisierung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters einer U1 snRNA Bindungsstelle, eine Analyse der flankierenden Sequenzen folgen. Hierzu bräuchte die, aus der Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 abgeleitete, Zählweise nicht verändert werden, sondern es müsste lediglich eine automatisierte Anpassung des Schwellenwertes zur Einteilung in „HC“ oder „LC“ an die jeweiligen flankierenden Sequenzen erfolgen. Der Schwellenwert würde demnach in Anwesenheit einer ESE oder ISE Sequenz herabgesetzt werden, während in Anwesenheit einer ISS oder ESS Sequenz der Schwellenwert zur Kategorisierung einer potentiellen 5'-Spleißstelle als „HC“ angehoben werden müsste.

Die freie Zugänglichkeit der Sequenz des humanen Genoms und die bereits erfolgte Charakterisierung von mehreren Tausenden an konstitutiv und alternativ genutzten 5'-Spleißstellen, liefert die Möglichkeit mit Hilfe des „splicefinder“ Algorithmus Datensätze von 5'-Spleißstellen mit vergleichbaren Wasserstoffbrückenbindungsmustern zu generieren. Mit Hilfe dieser Datensätze sollte es möglich sein, gemeinsame Motive innerhalb der flankierenden Sequenzen vergleichbarer 5'-Spleißstellen identifizieren zu können, von denen manche als „enhancer“ und andere als „silencer“ fungieren sollten. Eine zusätzliche Unterteilung der Datensätze in konstitutiv und alternativ gespleißte Exons könnte zu der Identifikation weiterer regulatorischer Elemente führen. Die tolerierte Varianz innerhalb dieser ermittelten Sequenzen lässt sich mit der vorgestellten *in vivo* SELEX Methode überprüfen, so dass definierte Bindungssequenzen für bisher nicht charakterisierte Spleißfaktoren aufgestellt werden könnten. Das innerhalb des E42 Fragment lokalisierte SF2/SRp40 Modul wird zurzeit mit dieser Methode analysiert, um zu überprüfen, ob es sich um zwei voneinander trennbare Bindungssequenzen handelt, oder ob die Verringerung des Schwellenwerts durch weitere, spezifische *trans*-aktivierende Faktoren vermittelt wird. Demnach liegt der Anwendungsbereich des „splicefinder“ Algorithmus zum jetzigen Zeitpunkt eher in der Vorhersage von spleißregulatorischen Sequenzen, als in der Vorhersage von tatsächlich genutzten Spleißstellen.

Der gemeinsame Funktionsmechanismus verschiedener SR-Proteine, die Bindung des U1 snRNPs an 5'-Spleißstellen mit geringer Komplementarität zu unterstützen, könnte ihre teilweise nachgewiesene funktionelle Redundanz erklären (für eine Übersicht s. (604)).

Nicht-redundante Funktionen der SR-Proteine könnten beispielsweise in der Vermittlung einer U1 snRNP Bindung in Abwesenheit einer U1 komplementären Sequenz liegen. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass sich durch einen Überschuss an SR-Proteinen die Spleißdefizienz eines U1 snRNP depletierten Zellextrakts *in vitro* wiederherstellen ließ (128, 129, 612). Diese Beobachtungen stehen zunächst im Widerspruch zu der hier beschriebenen Funktion der SR-Proteine in der Rekrutierung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle und der dadurch vermittelten Stabilisierung der prä-mRNA. Es ist jedoch zu bedenken, dass es sich bei der beobachteten U1 snRNP-unabhängigen Spleißreaktion um *in vitro* Experimente handelt, bei denen nur eine begrenzte Anzahl an potentiellen 5'-Spleißstellen vorliegt, so dass ihre Nutzung ohne weitere Kontrolle über die U1 Komplementarität erfolgen könnte. Für eine weniger spezifische Erkennung der vorhandenen 5'-Spleißstellen in Abwesenheit des U1 snRNPs, könnte auch die beobachtete Nutzung einer kryptischen Spleißstelle sprechen (612). Weiterhin erfolgte die durchgeführte U1 snRNP Depletion des Kernextraktes durch eine „antisense“ Affinitätsaufreinigung, welche häufig nicht vollständig erfolgt, so dass eine Restaktivität des U1 snRNPs in dem Zellextrakt nicht ausgeschlossen werden kann (128).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die Nutzung einer potentiellen 5'-Spleißstelle nicht nur von der Komplementarität zu der U1 snRNA abhängt, sondern auch die Anwesenheit weiterer spleißregulatorischer Sequenzen bei der Auswahl alternativer Spleißstellen eine essentielle Rolle spielt. Die Berücksichtigung dieser zusätzlichen Regulationsebene durch positiv auf die Spleißstellenerkennung wirkende ESE- bzw. ISE-Elemente, sowie negativ wirkende ESS- bzw. ISS-Elemente, konnte die ausbleibende Nutzung der potentiellen 5'-Spleißstelle HIV#18 innerhalb des *env* Leserahmens erklären. Diese U1 snRNA Bindungsstelle wurde aufgrund ihrer U1 Komplementarität durch den „splicefinder“ Algorithmus als „HC“ kategorisiert. Die Richtigkeit der Einteilung dieser potentiellen 5'-Spleißstelle durch den „splicefinder“, wurde durch den Austausch der SD4 Sequenz gegen diese Sequenz deutlich, da auch die HIV#18 Sequenz zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression führte (Abb. 23). Der Austausch der stromaufwärts der HIV#18 Spleißstelle gelegenen Sequenz (hiv#18) führte hingegen zu einem Verlust der *env*-Expression in einem SD4 tragenden Konstrukt (Abb. 24), wodurch demonstriert werden konnte, dass dieses Fragment die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Spleißstelle nicht unterstützt. Das hiv#18 Fragment zeigte dementsprechend auch keine spleißfördernde Wirkung auf die Nutzung der stromaufwärts liegenden 3'-Spleißstelle in den *in vitro* Spleißanalysen (78).

Hingegen konnte eine Nutzung der authentischen HIV-1 5'-Spleißstelle SD2 *in vivo* nachgewiesen werden (464, 492), obwohl der „splicefinder“ Algorithmus diese Spleißdonorsequenz als „LC“ kategorisiert, da sie an der Position des SD4 nicht in der Lage ist zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression zu führen (Abb. 22A). Die Funktionalität der 5'-Spleißstelle SD2 ließ sich zwar durch Kotransfektion einer U1 snRNA, welche eine erhöhte Komplementarität zu dieser Spleißstelle aufwies, nachweisen (Abb. 22B), jedoch kann hierdurch nicht die Nutzung dieser Spleißstelle *in vivo* erklärt werden. Ein Einfluss der stromaufwärts der 5'-Spleißstelle gelegenen Exonsequenz auf die Erkennung des SD2 konnte in diesem Fall ausgeschlossen werden, da ein SD2 tragendes Konstrukt auch in Gegenwart seiner natürlichen Sequenzumgebung in einem 2-Exon-1-Intron Konstrukt nicht in der Lage war zu einer Rev-vermittelten *env*-Expression zu führen (Daten nicht gezeigt). Aktuelle Ergebnisse aus unserem Labor sprechen hingegen dafür, dass die Erkennung des Spleißdonors 2 in Abhängigkeit der 5'-wärts gelegenen 3'-Spleißstelle SA2 erfolgt, da in einem 3-Exon-2-Intron Konstrukt eine Erkennung des Spleißdonors 2 in Abhängigkeit der Effizienz des stromaufwärts liegenden Spleißakzeptors beobachtet werden konnte (Kornelia Neveling, persönliche Mitteilung).

Demnach scheinen die HIV-1 3'-Spleißstellen nicht nur eine, für die Rev Wirkung notwendige, Verlangsamung der Spleißkinetik zu bewirken (354) (Dr. Susanne Kammler, Dissertation), sondern wären auch an der Erkennung der stromabwärts gelegenen 5'-Spleißstellen beteiligt. Eine paarweise Erkennung von Spleißstellen in internen Exons wurde sowohl durch Interaktionen der Exon flankierenden Spleißstellen, als auch durch eine Überbrückung des Introns beschrieben (508, 511, 590, 605). Demnach könnte die Erkennung der schwachen 5'-Spleißstelle SD2 durch die Effizienz der stromaufwärts liegenden 3'-Spleißstelle SA2 kompensiert werden. Das innerhalb des Exon 5 identifizierte, bidirektionale GAR-ESE vermittelt ebenfalls eine paarweise Erkennung der Exon flankierenden Spleißstellen SA4c,a,b, SA5 und SD4 (78) und unterstützt somit das Exon-Definitionsmodell (508). Das Modell einer paarweisen, Exon überspannenden Erkennung von Spleißstellen (508) wird auch durch Beobachtungen an dem, von den Spleißstellen SA3 und SD3 flankierten, HIV Exon 3 bestätigt, da sowohl eine Erhöhung der U1 Komplementarität der 5'-Spleißstelle, als auch eine Mutation des stromabwärts des SA3 lokalisierten ESS-Elements zu einer effizienteren Erkennung dieses Exons führten (39).

Vergleicht man weiterhin die durch den „splicefinder“ Algorithmus ermittelten 5'-Spleißstellen mit den tatsächlich genutzten Spleißstellen innerhalb des HIV-1 Genoms (Abb. 21), so fällt auf, dass die Nutzung der Spleißstellen bestimmten Regelmäßigkeiten zu

unterliegen scheint. Demnach würde, bei Anwesenheit mehrerer alternativer Spleißstellen, die direkt auf einen Spleißakzeptor folgende 5'-Spleißstelle von der Spleißmaschinerie ausgewählt werden. Diese Vermutung konnte durch die „splicefinder“ Analyse einer größeren Datenmenge am Beispiel annotierter Exons der humanen Chromosomen 6, 13 und 20 bestätigt werden, da sich hier zeigte, dass in mehr als 85% der über 10.000 untersuchten Exons, zwischen dem Spleißakzeptor und dem Spleißdonor keine 5'-Spleißstelle mit höherer Komplementarität, gemäß der Klassifizierung des „splicefinder“ Algorithmus, zu finden war (Prof. Dr. Heiner Schaal, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen liefern somit ein deutliches Argument für das Exon-Definitionsmodell (508).

Andererseits sprechen diese Daten auch für eine differenzierte Erkennung der „cap“ proximalen 5'-Spleißstelle im Vergleich zu internen Spleißdonorsequenzen. Es konnte bereits eine Abhängigkeit bei der Erkennung der „cap“ proximalen 5'-Spleißstelle von der Anwesenheit des „cap“-bindenden Proteinkomplexes (CBC, „cap-binding protein complex“) beobachtet werden (367). Die nukleäre Bindung des, aus den Proteinen CBP80 und CBP20 bestehenden, „cap“-bindenden Proteinkomplexes an die 7-Methyl-Guanosin Struktur am 5'-Ende der prä-mRNA dient dem Schutz der prä-mRNA vor vorzeitiger Degradation durch Nukleasen (für eine Übersicht s. (403, 490, 553)). Eine Mutation der 5'-Spleißstelle SD4 an der „cap“ proximalen Position innerhalb eines 2-Exon-1-Intron Konstruktes führte zu einem vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit der *env* mRNA (302), während die Mutation des SD4s innerhalb eines internen Exons in einem 3-Exon-2-Intron Konstruktes hauptsächlich zu einer Nicht-Erkennung („exon skipping“) des internen Exons führte und nur eine geringfügigere Degradation der RNA zu beobachten war (78, 196). Die direkte Kopplung der „capping“- und der Spleißreaktion könnte somit eine Erklärung für die unterschiedliche RNA Degradation liefern. Für eine Kopplung der nukleären RNA Prozessierungsreaktionen spricht weiterhin, dass ebenfalls eine Abhängigkeit der Effizienz der Polyadenylierung von der stromaufwärts gelegenen 3'-Spleißstelle des terminalen Exons beschrieben wurde (125).

Die nukleotidgenaue Erkennung von Spleißstellen ist von außerordentlicher Wichtigkeit um eine korrekte Genexpression zu gewährleisten. Die Auswahl der 5'-Spleißstelle erfolgt auf verschiedenen regulatorischen Ebenen. Die Erkennung der Spleißdonorsequenz durch das komplementäre U1 snRNP stellt den initialen Schritt der Spleißreaktion dar (196, 302, 383, 690). Bei der Auswahl der 5'-Spleißstelle scheint deren Position bzw. die Distanz zu der stromaufwärts gelegenen 3'-Spleißstelle ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (508). Sowohl die Auswahl alternativer, als auch die Nutzung konstitutiver Spleißstellen wird zusätzlich durch die Bindung von SR-Proteinen an spleißfördernde Sequenzelemente

beeinflusst (78, 84, 218, 357, 495, 599, 666). Die durch den Phosphorylierungsgrad der SR-Proteine determinierte Aktivität (640, 662, 667), sowie deren lokale Konzentration (122, 241, 436, 640, 667), können dabei weitere Regulationsebenen bilden. Demgegenüber kann eine, häufig antagonistische, Regulation durch die Bindung von heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen an spleißinhibierende Sequenzelemente (174, 414, 512, 670, 688) oder an die 5'-Spleißstelle selbst (65) stehen. Im weiteren Verlauf der Spleißreaktion wird die Auswahl der 5'-Spleißstelle nochmals durch die Bindung des komplementären U6 snRNP überprüft (369).

Eine effiziente virale Replikation ist bei HIV-1 von einer strikt kontrollierten Regulation des alternativen Spleißens abhängig. Eine Kombination aus größtenteils starken 5'-Spleißstellen, schwachen 3'-Spleißstellen, spleißfördernden und spleißinhibierenden Elementen ist für das korrekte Spleißen der polycistronischen prä-mRNA in mehr als 40 verschiedene virale mRNAs verantwortlich. Ein Verständnis der Mechanismen und die Kenntnis der zellulären Faktoren, welche an der Regulation der viralen mRNA Prozessierung beteiligt sind, könnten zur Identifikation neuer Ziele der antiviralen Therapie führen. Aufgrund der hohen Mutationsrate des viralen Genoms unterscheiden sich verschiedene Virus Isolate deutlich voneinander. Virus Stämme, welche höhere Homologien zueinander aufweisen, werden in Virus Subtypen zusammengefasst. Sequenzunterschiede in verschiedenen HIV-1 Stämmen und Subtypen lassen vermuten, dass die Regulation des alternativen Spleißens sich in unterschiedlichen Stämmen unterscheiden könnte.

Überraschenderweise zeigte die Analyse der hier betrachteten viralen Sequenzen verschiedener Subtypen, dass diese in allen HIV Subtypen gut konserviert sind (Abb. 40A). Die 5'-Spleißstelle SD4 ist in zwölf von 13 Subtypen vollständig konserviert, wodurch deren Wichtigkeit innerhalb der viralen Genexpression nochmals bestätigt wird. Die einzige aufgetretene Mutation innerhalb der 5'-Spleißstelle stellt eine A>G Punktmutation an der Position +3 dar, welche nach Analyse durch den „splicefinder“ Algorithmus die Komplementarität zu der U1 snRNA um nur eine Wasserstoffbrückenbindung reduziert und somit weiterhin zu einer „HC“ Klassifizierung führt.

Das innerhalb des Exons 5 lokalisierte GAR-ESE-Element scheint auf Sequenzebene bis auf den evolutionär entfernten O Subtyp ebenfalls gut konserviert zu sein (Abb. 40A). Betrachtet man hingegen das GAR-ESE-Element als funktionelles Modul zur Bindung von SR-Proteinen, so sind in zehn von 13 HIV Subtypen beide funktionellen Module (SF2/SF2 und SF2/SRp40) innerhalb des „enhancers“ konserviert, während in den restlichen drei HIV

Subtypen zumindest ein funktionelles Modul (SF2/SF2) erhalten geblieben ist. Die Konservierung des GAR-ESE bestätigt die essentielle Rolle dieses Elements in der Erkennung der flankierenden Spleißstellen. Ähnliches trifft auch für die Konservierung des E42 Elements zu. Während auf Sequenzebene keine deutliche Konservierung dieses Elements zu beobachten ist, scheint die Bindung der SR-Proteine innerhalb dieses spleißregulatorischen Elements konserviert zu sein (Abb. 40A), da gezeigt werden konnte, dass das funktionelle Modul aus einer SC35/SRp40 Bindungsstelle, ebenso wie das SF2/SRp40 Modul, zu einer Reduktion des zur *env*-Expression benötigten Schwellenwerts führte (Abb. 40B).

Daraus ergibt sich jedoch die Frage, weshalb das E42 Element in den verschiedenen HIV Subtypen konserviert ist, obwohl bereits die 5'-Spleißstelle eine nahezu vollständige Konservierung aufweist. Die HIV *tat/rev* Spleißstelle SD4 ist zur Synthese der, für die virale Replikation notwendigen, Proteine Rev und Env notwendig. Die Anwesenheit des E42 Elements innerhalb des HIV Genoms dient höchstwahrscheinlich der unveränderten Erkennung der essentiellen 5'-Spleißstelle SD4, falls dennoch eine Punktmutationen innerhalb dieser Sequenz im Verlauf des HIV Replikationszyklus auftreten sollte. Demnach würde das E42 Element als zusätzlicher Sicherungsmechanismus der viralen Replikation bei kritischen Mutationen der 5'-Spleißstelle fungieren.

Aufgrund von ständig neu auftretenden Resistenzen gegen die etablierte HAART-Therapie (für eine Übersicht s. (558)) stellt die Entwicklung neuer, antiretroviraler Wirkstoffe das Hauptziel in der HIV Forschung dar. Vielversprechende Ergebnisse konnten neben der Entwicklung neuer Inhibitoren der viralen Integrase (für eine Übersicht s. (653)), vor allem durch Inhibitoren des Viruseintritts (für eine Übersicht s. (237)) erzielt werden. Bei dem ersten zugelassenen Fusionsinhibitor handelt es sich um einen Peptidwirkstoff mit dem Namen Enfurvitide (ENF, T-20), welcher den Viruseintritt nach der Korezeptorbindung durch den gp120 Anteil des Env Proteins verhindert. Enfurvitide blockiert die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran durch dessen Bindung an eine essentielle Region innerhalb des gp41 Anteils des viralen Glykoproteins. Jedoch sind bereits ein Jahr nach der Zulassung von Enfurvitide erste Resistenzen beschrieben worden (382, 424). Diese Beobachtungen demonstrieren die Notwendigkeit neuer, konservierter Angriffspunkte für eine antiretrovirale Therapie.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Sequenzelemente stellen aufgrund ihrer Konservierung ein mögliches Ziel in der Entwicklung neuer antiretroviraler Wirkstoffe dar. Die Synthese des

Env Proteins ist für HIV von entscheidender Bedeutung, da die Expression des Glykoproteins an der Virusoberfläche für die Infektion der Wirtszelle notwendig ist (für eine Übersicht s. (360)). Die *env*-Expression ließ sich in Zellkulturexperimenten sowohl durch die Mutation der 5'-Spleißstelle, als auch durch die Mutation des stromaufwärts gelegenen ESE-Elements effizient inhibieren. Die Mutation der *tat/rev* Spleißstelle SD4 führte in Abhängigkeit ihrer Position innerhalb der prä-mRNA entweder zu einer Degradation der viralen RNA (302) oder zu einer Nicht-Erkennung eines internen Exons (78, 196), wodurch in beiden Fällen die Synthese der *env*-mRNA inhibiert werden könnte. Die Relevanz der hier vorgestellten Mutationen der 5'-Spleißstelle SD4 wurde bereits in Zellkulturexperimenten mit infektiösen Viruspartikeln untersucht, bei denen sich eine deutlich reduzierte Virusreplikation nachweisen ließ (Ben Berkhout, persönliche Mitteilung). Die Degradation der viralen RNA konnte in unserem experimentellen System auf eine Nicht-Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP zurückgeführt werden (78, 196, 302), so dass eine Inhibition der *env*-Expression durch eine spezifische Blockierung der U1 snRNP Bindungsstelle denkbar wäre.

Eine solche Bindungsstellenblockierung wäre ebenso für das stromaufwärts gelegenen ESE-Element vorstellbar, da die U1 snRNP Bindung an die 5'-Spleißstelle auf die zusätzliche Gegenwart dieser Elemente angewiesen ist (Abb. 33). Da sich die *env*-kodierende Region größtenteils innerhalb der Intronsequenz von *tat* und *rev* befindet, welche von der 5'-Spleißstelle SD4 und der 3'-Spleißstelle SA7 flankiert wird (Abb. 4), könnte, aufgrund dieser speziellen genomischen Lokalisation des *env* Leserahmens, eine gezielte Manipulation des empfindlich regulierten Vorgangs des alternativen Spleißens ebenfalls einen neuen Ansatzpunkt in der antiretroviralen Therapie darstellen.

Durch Erhöhung der Spleißeffizienz dieses Introns könnte die Wirkung des viralen Rev Proteins umgangen werden, so dass keine Synthese des Env Proteins mehr möglich wäre. Die Steigerung der Spleißeffizienz wäre sowohl durch Optimierung des stromaufwärts des SD4 gelegenen ESE-Elements, als auch durch eine Mutation des stromabwärts des SA7 lokalisierten ESS-Elements denkbar. Die prinzipielle Funktionalität eines solchen Ansatzes konnte bereits bei Vogel Retroviren gezeigt werden, da eine Mutation innerhalb eines *cis*-wirkenden, spleißregulatorischen Elements zu einer erhöhten Spleißeffizienz und dadurch zu einer verminderten Virus Infektiosität führte (310).

Veränderte Spleißmuster konnten ebenfalls in verschiedenen HIV-Isolaten aufgrund von natürlich auftretenden Polymorphismen beobachtet werden. Ein Beispiel hierfür zeigt der

Einschluss des, von den Spleißstellen SA6 und SD5 flankierten, HIV Exons 6, welches in Transkripten des Isolats HXB2 beschrieben wurde (537). Durch diesen zusätzlichen Exon Einschluss entsteht eine *tev* mRNA, welche für ein Protein kodiert, welches Sequenzen aus den *tat*, *env* und *rev* Leserahmen enthält (29, 225, 522). Eine natürlich auftretende Punktmutation innerhalb des, stromabwärts der 3'-Spleißstelle SA6 gelegenen, ESS-Elements (648) führt zu einem verstärkten Einschluss des Exons 6, welcher mit einer Abnahme der *tat*, *rev*, *vpu*, *env* und *nef* Transkripte einhergeht und dadurch eine drastische Reduktion der Virusreplikation zur Folge hat (80, 648). Die in dieser Arbeit verwendeten subgenomischen Expressionsplasmide leiten sich hingegen von dem HIV NL4-3 Isolat ab, bei dem eine Synthese von *Tev*, aufgrund einer Mutation der 5'-Spleißstelle an der Position +1 nicht möglich zu sein scheint (492).

Ein sequenzspezifischer Eingriff in die Regulation des alternativen Spleißens konnte *in vitro* durch die Verwendung von „antisense“ Oligonukleotiden gezeigt werden (562). Weiterhin konnte der Einsatz von Morpholino modifizierten „antisense“ Oligonukleotiden zu einer Wiederherstellung des normalen Spleißmusters, innerhalb der prä-mRNA des HBB Gens in einer von einem β -Thalassämie Patienten stammenden Zelllinie, führen (347). In einer aus einem zystischen Fibrose Patienten stammenden Zelllinie konnte, mit Phospho-Thioate modifizierten „antisense“ Oligonukleotiden eine Korrektur des Spleißmusters durch spezifische Blockierung einer aberranten Spleißstelle innerhalb der CTFR prä-mRNA erzielt werden (197). Eine selektive Degradation bestimmter Spleißformen konnte ebenfalls durch Verwendung von „antisense“ DNA Oligonukleotiden (170) oder durch Einsatz von siRNAs („short interfering RNAs“) (90) nachgewiesen werden. Von einer gegen den HIV Korezeptor CXCR4 gerichteten siRNA konnte gezeigt werden, dass diese den Eintritt des HI-Virus in die Wirtszelle inhibieren kann (684).

Darüber hinaus konnte durch die chemische Kopplung von SR-Domänen an „antisense“ Oligonukleotide die Gegenwart eines ESE-Elements innerhalb der prä-mRNA simuliert werden, da sich ein krankheitsassoziierter Exonausschluss innerhalb der BRCA1 („breast cancer 1“- oder der SMN2 („survival motor neuron 2“) prä-mRNA aufheben ließ (85). Weiterhin konnte an einer Faktor VIII (F8) „knockout“ Maus demonstriert werden, dass durch ein „Spleißosom-vermitteltes RNA *trans*-Spleißen“ („SmaRT“, „spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing“) sich deren Hämophilie A Phänotyp durch eine RNA Reparatur korrigieren ließ (96).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein genaues Verständnis der zellulären Spleißregulation den Einsatz dieser Technologien zur sequenzspezifischen Aktivierung bzw. Inhibition alternativer Spleißvorgänge ermöglicht. Die vorstellbaren Anwendungen gehen dabei weit über die Bekämpfung des HI-Virus hinaus, da sie ebenso zu Wiederherstellung des korrekten Spleißprozesses bei genetischen Defekten verwendet werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die Transkription des HIV-1 Genoms führt zu einer einzigen prä-mRNA, welche alternativ in mehr als 40 Transkripte gespleißt wird. Durch die Mutationsanalyse der HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 in subgenomischen *env*-Expressionsvektoren konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung eines RNA-Duplex zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1 snRNA nicht nur dem Spleißvorgang selbst dient, sondern auch einen Schutz der viralen prä-mRNA vor nukleärer Degradation darstellt. Die sequenzabhängige Bindung des U1 snRNPs an die Spleißdonorstelle konnte *in vitro* ebenfalls mit dem Wasserstoffbrücken-Muster in Einklang gebracht werden. Eine systematische Mutationsanalyse der 5'-Spleißstelle SD4 schaffte die experimentelle Grundlage für die Entwicklung eines neuen, auf der Grundlage des ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungsmusters basierenden, Algorithmus zur Beschreibung der Stärke von 5'-Spleißstellen.

Der „splicefinder“ Algorithmus (<http://www.splicefinder.net/>) analysiert die U1 snRNA Komplementarität einer putativen 5'-Spleißstelle von den Positionen -3 bis +8 unter zusätzlicher Berücksichtigung benachbarter Nukleotide und einer unterschiedlichen Gewichtung der einzelnen Positionen innerhalb des RNA-Duplex. Die Kategorisierung einer potentiellen 5'-Spleißstelle in „hoch komplementär“ (HC) und „gering komplementär“ (LC) entspricht der Fähigkeit einer U1 snRNA Bindungsstelle die HIV-1 5'-Spleißstelle SD4 funktionell ersetzen zu können. Diese funktionelle Klassifizierung konnte an einem Datensatz von humanen 5'-Spleißstellen innerhalb des *ATM* Gens bestätigt werden, wodurch die generelle Anwendbarkeit des „splicefinder“ Algorithmus auf Säuger-Spleißdonorstellen demonstriert wurde.

Darüber hinaus konnte innerhalb des HIV-1 Exons 5, welches von den alternativen 3'-Spleißstellen SA4c, SA4a, SA4b, SA5 und der 5'-Spleißstelle SD4 flankiert wird, ein bisher nicht beschriebenes bidirektionales ESE-Element identifiziert werden. Diese Sequenz reguliert, in Abhängigkeit der SR-Proteine SF2/ASF und SRp40, die Expression der HIV-1 *env*, *vpu*, *rev* und *nef* mRNAs. Die Anwesenheit von mindestens zwei spezifischen SR-Protein Bindungsstellen stromaufwärts der 5'-Spleißstelle ist für die Erkennung der HIV 5'-Spleißstelle SD4 durch das U1 snRNP essentiell. Die Erkennung schwacher 5'-Spleißstellen wird durch die zusätzliche Gegenwart einer weiteren Kombination aus zwei funktionellen SR-Protein Bindungsstellen ermöglicht. Aufgrund dieser Schlüsselrolle in der viralen Genexpression stellen diese konservierten Sequenzen innerhalb des HIV Exons 5 ein neues Ziel in der antiretroviralen Therapie dar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Achsel, T., H. Brahms, B. Kastner, A. Bachi, M. Wilm, and R. Luhrmann.** 1999. 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.* **18**:5789-5802.
2. **Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.
3. **Adachi, Y. and M. Yanagida.** 1989. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115- kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J. Cell Biol.* **108**:1195-1207.
4. **Adams, M. D., D. Z. Rudner, and D. C. Rio.** 1996. Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:331-339.
5. **Ainsworth, J. R., L. M. Rossi, and E. C. Murphy, Jr.** 1996. The Moloney murine sarcoma virus ts110 5' splice site signal contributes to the regulation of splicing efficiency and thermosensitivity. *J. Virol.* **70**:6474-6478.
6. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-1958.
7. **Alonso, A., D. Derse, and B. M. Peterlin.** 1992. Human chromosome 12 is required for optimal interactions between Tat and TAR of human immunodeficiency virus type 1 in rodent cells. *J. Virol.* **66**:4617-4621.
8. **Amendt, B. A., D. Hesslein, L. J. Chang, and C. M. Stoltzfus.** 1994. Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **14**:3960-3970.
9. **Amendt, B. A., Z. H. Si, and C. M. Stoltzfus.** 1995. Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 and tat-rev exon 3: evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol. Cell Biol.* **15**:4606-4615.
10. **Amrein, H., M. Gorman, and R. Nothiger.** 1988. The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**:1025-1035.
11. **Arning, S., P. Gruter, G. Bilbe, and A. Kramer.** 1996. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA.* **2**:794-810.
12. **Ars, E., E. Serra, J. Garcia, H. Kruyer, A. Gaona, C. Lazaro, and X. Estivill.** 2000. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* **9**:237-247.
13. **Arts, E. J. and S. F. Le Grice.** 1998. Interaction of retroviral reverse transcriptase with template-primer duplexes during replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**:339-393.
14. **Asai, K., C. Platt, and A. Cochrane.** 2003. Control of HIV-1 env RNA splicing and transport: investigating the role of hnRNP A1 in exon splicing silencer (ESS3a) function. *Virology* **314**:229-242.
15. **Ashe, M. P., A. Furger, and N. J. Proudfoot.** 2000. Stem-loop 1 of the U1 snRNP plays a critical role in the suppression of HIV-1 polyadenylation. *RNA.* **6**:170-177.
16. **Ashe, M. P., P. Griffin, W. James, and N. J. Proudfoot.** 1995. Poly(A) site selection in the HIV-1 provirus: inhibition of promoter-proximal polyadenylation by the downstream major splice donor site. *Genes Dev.* **9**:3008-3025.

17. **Ashe, M. P., L. H. Pearson, and N. J. Proudfoot.** 1997. The HIV-1 5' LTR poly(A) site is inactivated by U1 snRNP interaction with the downstream major splice donor site. *EMBO J.* **16**:5752-5763.
18. **Ashiya, M. and P. J. Grabowski.** 1997. A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA.* **3**:996-1015.
19. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, and eds.** 1991. *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
20. **Baber, J. L., D. Libutti, D. Levens, and N. Tjandra.** 1999. High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor. *J. Mol. Biol.* **289**:949-962.
21. **Bach, M., G. Winkelmann, and R. Luhrmann.** 1989. 20S small nuclear ribonucleoprotein U5 shows a surprisingly complex protein composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:6038-6042.
22. **Bai, Y., D. Lee, T. Yu, and L. A. Chasin.** 1999. Control of 3' splice site choice in vivo by ASF/SF2 and hnRNP A1. *Nucleic Acids Res.* **27**:1126-1134.
23. **Banerjee, H., A. Rahn, B. Gawande, S. Guth, J. Valcarcel, and R. Singh.** 2004. The conserved RNA recognition motif 3 of U2 snRNA auxiliary factor (U2AF 65) is essential in vivo but dispensable for activity in vitro. *RNA.* **10**:240-253.
24. **Barre Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler Blin, F. Vezinet Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
25. **Barrett, N. L., X. Li, and G. G. Carmichael.** 1995. The sequence and context of the 5' splice site govern the nuclear stability of polyoma virus late RNAs. *Nucleic Acids Res.* **23**:4812-4817.
26. **Bartel, D. P., M. L. Zapp, M. R. Green, and J. W. Szostak.** 1991. HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* **67**:529-536.
27. **Beaudet, A. L. and L. C. Tsui.** 1993. A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum. Mutat.* **2**:245-248.
28. **Beil, B., G. Screaton, and S. Stamm.** 1997. Molecular cloning of htra2-beta-1 and htra2-beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing. *DNA Cell Biol.* **16**:679-690.
29. **Benko, D. M., S. Schwartz, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1990. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J. Virol.* **64**:2505-2518.
30. **Bennett, M., S. Michaud, J. Kingston, and R. Reed.** 1992. Protein components specifically associated with pre-spliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev.* **6**:1986-2000.
31. **Bennett, M., S. Pinol Roma, D. Staknis, G. Dreyfuss, and R. Reed.** 1992. Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro. *Mol. Cell Biol.* **12**:3165-3175.
32. **Berget, S. M.** 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* **270**:2411-2414.
33. **Berglund, J. A., N. Abovich, and M. Rosbash.** 1998. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev.* **12**:858-867.
34. **Berglund, J. A., K. Chua, N. Abovich, R. Reed, and M. Rosbash.** 1997. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**:781-787.

35. **Berglund, J. A., M. L. Fleming, and M. Rosbash.** 1998. The KH domain of the branchpoint sequence binding protein determines specificity for the pre-mRNA branchpoint sequence. *RNA*. **4**:998-1006.
36. **Berkhout, B.** 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **54**:1-34.
37. **Bevec, D., M. Dobrovnik, J. Hauber, and E. Bohnlein.** 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:9870-9874.
38. **Bilodeau, P. S., J. K. Domsic, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2001. RNA Splicing at Human Immunodeficiency Virus Type 1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element. *J. Virol.* **75**:8487-8497.
39. **Bilodeau, P. S., J. K. Domsic, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2001. RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element. *J. Virol.* **75**:8487-8497.
40. **Bilodeau, P. S., J. K. Domsic, and C. M. Stoltzfus.** 1999. Splicing regulatory elements within tat exon 2 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are characteristic of group M but not group O HIV-1 strains. *J. Virol.* **73**:9764-9772.
41. **Bird, P., M. J. Gething, and J. Sambrook.** 1987. Translocation in yeast and mammalian cells: not all signal sequences are functionally equivalent. *J. Cell Biol.* **105**:2905-2914.
42. **Birney, E., S. Kumar, and A. R. Krainer.** 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**:5803-5816.
43. **Black, D. L.** 1995. Finding splice sites within a wilderness of RNA. *RNA*. **1**:763-771.
44. **Black, D. L.** 2000. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**:367-370.
45. **Blanchette, M. and B. Chabot.** 1999. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* **18**:1939-1952.
46. **Blencowe, B. J.** 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* **25**:106-110.
47. **Blencowe, B. J., G. Bauren, A. G. Eldridge, R. Issner, J. A. Nickerson, E. Rosonina, and P. A. Sharp.** 2000. The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA* **6**:111-120.
48. **Blencowe, B. J., J. A. Bowman, S. McCracken, and E. Rosonina.** 1999. SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem. Cell Biol.* **77**:277-291.
49. **Bodem, J., M. Lochelt, P. Yang, and R. M. Flugel.** 1997. Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors. *Stem. Cells* **15 Suppl 1**:141-147.
50. **Boehringer, D., E. M. Makarov, B. Sander, O. V. Makarova, B. Kastner, R. Luhrmann, and H. Stark.** 2004. Three-dimensional structure of a pre-catalytic human spliceosomal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:463-468.
51. **Bogerd, H. P., A. Echarri, T. M. Ross, and B. R. Cullen.** 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J. Virol.* **72**:8627-8635.

52. **Boggs, R. T., P. Gregor, S. Idriss, J. M. Belote, and M. McKeown.** 1987. Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. *Cell* **50**:739-747.
53. **Bohnlein, E., J. Berger, and J. Hauber.** 1991. Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J. Virol.* **65**:7051-7055.
54. **Bourgeois, C. F., M. Popielarz, G. Hildwein, and J. Stevenin.** 1999. Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol. Cell Biol.* **19**:7347-7356.
55. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
56. **Branlant, C., A. Krol, J. P. Ebel, H. Gallinaro, E. Lazar, and M. Jacob.** 1981. The conformation of chicken, rat and human U1A RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* **9**:841-858.
57. **Bray, M., S. Prasad, J. W. Dubay, E. Hunter, K. T. Jeang, D. Rekosh, and M. L. Hammarskjold.** 1994. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:1256-1260.
58. **Brett, D., H. Pospisil, J. Valcarcel, J. Reich, and P. Bork.** 2002. Alternative splicing and genome complexity. *Nat. Genet.* **30**:29-30.
59. **Bringmann, P. and R. Luhrmann.** 1986. Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *EMBO J.* **5**:3509-3516.
60. **Broderick, J., J. Wang, and A. Andreadis.** 2004. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2 binds to tau exon 10 and moderately activates its splicing. *Gene* **331**:107-114.
61. **Brunak, S., J. Engelbrecht, and S. Knudsen.** 1991. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* **220**:49-65.
62. **Buchman, A. R. and P. Berg.** 1988. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol. Cell Biol.* **8**:4395-4405.
63. **Bukrinskaya, A. G.** 2004. HIV-1 assembly and maturation. *Arch. Virol.* **149**:1067-1082.
64. **Buraczynska, M., W. Wu, R. Fujita, K. Buraczynska, E. Phelps, S. Andreasson, J. Bennett, D. G. Birch, G. A. Fishman, D. R. Hoffman, G. Inana, S. G. Jacobson, M. A. Musarella, P. A. Sieving, and A. Swaroop.** 1997. Spectrum of mutations in the RPGR gene that are identified in 20% of families with X-linked retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* **61**:1287-1292.
65. **Buratti, E., M. Baralle, L. De Conti, D. Baralle, M. Romano, Y. M. Ayala, and F. E. Baralle.** 2004. hnRNP H binding at the 5' splice site correlates with the pathological effect of two intronic mutations in the NF-1 and TSHbeta genes. *Nucleic Acids Res.* **32**:4224-4236.
66. **Burd, C. G. and G. Dreyfuss.** 1994. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **13**:1197-1204.
67. **Burge, C. and S. Karlin.** 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* **268**:78-94.
68. **Burge, C. B., T. Tuschl, and P. A. Sharp.** 1999. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes, p. 525-560. *In* R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
69. **Burset, M., I. A. Seledtsov, and V. V. Solovyev.** 2000. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**:4364-4375.

70. **Butsch, M. and K. Boris-Lawrie.** 2000. Translation is not required To generate virion precursor RNA in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J. Virol.* **74**:11531-11537.
71. **Buzin, C. H., R. A. Gatti, V. Q. Nguyen, C. Y. Wen, M. Mitui, O. Sanal, J. S. Chen, G. Nozari, A. Mengos, X. Li, F. Fujimura, and S. S. Sommer.** 2003. Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S. *Hum. Mutat.* **21**:123-131.
72. **Caceres, J. F., T. Misteli, G. R. Sreaton, D. L. Spector, and A. R. Krainer.** 1997. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.* **138**:225-238.
73. **Caceres, J. F., G. R. Sreaton, and A. R. Krainer.** 1998. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **12**:55-66.
74. **Caceres, J. F., S. Stamm, D. M. Helfman, and A. R. Krainer.** 1994. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**:1706-1709.
75. **Campononico, E. and B. Schwer.** 2002. ATP-dependent remodeling of the spliceosome: intragenic suppressors of release-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Prp22. *Genetics* **160**:407-415.
76. **Cao, W. and M. A. Garcia-Blanco.** 1998. A serine/arginine-rich domain in the human U1 70k protein is necessary and sufficient for ASF/SF2 binding. *J. Biol. Chem.* **273**:20629-20635.
77. **Cao, W., S. F. Jamison, and M. A. Garcia-Blanco.** 1997. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA.* **3**:1456-1467.
78. **Caputi, M., M. Freund, S. Kammler, C. Asang, and H. Schaal.** 2004. A bidirectional SF2/ASF- and SRp40-dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression. *J. Virol.* **78**:6517-6526.
79. **Caputi, M., A. Mayeda, A. R. Krainer, and A. M. Zahler.** 1999. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **18**:4060-4067.
80. **Caputi, M. and A. M. Zahler.** 2002. SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *EMBO J.* **21**:845-855.
81. **Carlo, T., D. A. Sterner, and S. M. Berget.** 1996. An intron splicing enhancer containing a G-rich repeat facilitates inclusion of a vertebrate micro-exon. *RNA.* **2**:342-353.
82. **Carstens, R. P., E. J. Wagner, and M. A. Garcia-Blanco.** 2000. An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol. Cell Biol.* **20**:7388-7400.
83. **Cartegni, L., S. L. Chew, and A. R. Krainer.** 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**:285-298.
84. **Cartegni, L. and A. R. Krainer.** 2002. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* **30**:377-384.
85. **Cartegni, L. and A. R. Krainer.** 2003. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat. Struct. Biol.* **10**:120-125.
86. **Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer.** 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* **31**:3568-3571.
87. **Cavaloc, Y., C. F. Bourgeois, L. Kister, and J. Stevenin.** 1999. The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *RNA.* **5**:468-483.

88. **Cavaloc, Y., M. Popielarz, J. P. Fuchs, R. Gattoni, and J. Stevenin.** 1994. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO J.* **13**:2639-2649.
89. **Celotto, A. M. and B. R. Graveley.** 2001. Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. *Genetics* **159**:599-608.
90. **Celotto, A. M. and B. R. Graveley.** 2002. Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA*. **8**:718-724.
91. **Chabot, B., M. Blanchette, I. Lapierre, and La Branch.** 1997. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol. Cell Biol.* **17**:1776-1786.
92. **Champion-Arnaud, P., O. Gozani, L. Palandjian, and R. Reed.** 1995. Accumulation of a novel spliceosomal complex on pre-mRNAs containing branch site mutations. *Mol. Cell Biol.* **15**:5750-5756.
93. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
94. **Chan, R. C. and D. L. Black.** 1997. The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol. Cell Biol.* **17**:4667-4676.
95. **Chang, D. D. and P. A. Sharp.** 1989. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**:789-795.
96. **Chao, H., S. G. Mansfield, R. C. Bartel, S. Hiriyanna, L. G. Mitchell, M. A. Garcia-Blanco, and C. E. Walsh.** 2003. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Med.* **9**:1015-1019.
97. **Chen, C. D., R. Kobayashi, and D. M. Helfman.** 1999. Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev.* **13**:593-606.
98. **Chen, I. H., K. S. Sciabica, and R. M. Sandri-Goldin.** 2002. ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J. Virol.* **76**:12877-12889.
99. **Chen, J. Y., L. Stands, J. P. Staley, R. R. Jackups, Jr., L. J. Latus, and T. H. Chang.** 2001. Specific alterations of U1-C protein or U1 small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD box splicing factor. *Mol. Cell* **7**:227-232.
100. **Chen, X., J. A. McDowell, R. Kierzek, T. R. Krugh, and D. H. Turner.** 2000. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular modeling reveal that different hydrogen bonding patterns are possible for G.U pairs: one hydrogen bond for each G.U pair in r(GGCGUGCC)(2) and two for each G.U pair in r(GAGUGCUC)(2). *Biochemistry* **39**:8970-8982.
101. **Chew, S. L., H. X. Liu, A. Mayeda, and A. R. Krainer.** 1999. Evidence for the function of an exonic splicing enhancer after the first catalytic step of pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:10655-10660.
102. **Chiara, M. D., O. Gozani, M. Bennett, P. Champion-Arnaud, L. Palandjian, and R. Reed.** 1996. Identification of proteins that interact with exon sequences, splice sites, and the branchpoint sequence during each stage of spliceosome assembly. *Mol. Cell Biol.* **16**:3317-3326.
103. **Chiara, M. D., L. Palandjian, K. R. Feld, and R. Reed.** 1997. Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals. *EMBO J.* **16**:4746-4759.

104. **Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.
105. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
106. **Choppin, P. W., C. D. Richardson, D. C. Merz, W. W. Hall, and A. Scheid.** 1981. The functions and inhibition of the membrane glycoproteins of paramyxoviruses and myxoviruses and the role of the measles virus M protein in subacute sclerosing panencephalitis. *J. Infect. Dis.* **143**:352-363.
107. **Choppin, P. W. and A. Scheid.** 1980. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev. Infect. Dis.* **2**:40-61.
108. **Chou, M. Y., N. Rooke, C. W. Turck, and D. L. Black.** 1999. hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol. Cell Biol.* **19**:69-77.
109. **Chou, M. Y., J. G. Underwood, J. Nikolic, M. H. Luu, and D. L. Black.** 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol. Cell* **5**:949-957.
110. **Chrusciel, R. A. and J. W. Strohbach.** 2004. Non-peptidic HIV protease inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**:1097-1114.
111. **Chua, K. and R. Reed.** 1999. Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.* **13**:841-850.
112. **Chua, K. and R. Reed.** 1999. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* **402**:207-210.
113. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
114. **Clavel, F., K. Mansinho, S. Chamaret, D. Guetard, V. Favier, J. Nina, M. O. Santos Ferreira, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* **316**:1180-1185.
115. **Cochrane, A., R. Kramer, S. Ruben, J. Levine, and C. A. Rosen.** 1989. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**:264-266.
116. **Cochrane, A. W., C. H. Chen, and C. A. Rosen.** 1990. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:1198-1202.
117. **Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen.** 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J. Virol.* **64**:881-885.
118. **Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al.** 1986. What to call the AIDS virus? [letter]. *Nature* **321**:10.
119. **Collins, C. A. and C. Guthrie.** 1999. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev.* **13**:1970-1982.
120. **Collins, C. A. and C. Guthrie.** 2000. The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat. Struct. Biol.* **7**:850-854.

121. **Colwill, K., L. L. Feng, J. M. Yeakley, G. D. Gish, J. F. Caceres, T. Pawson, and X. D. Fu.** 1996. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.* **271**:24569-24575.
122. **Colwill, K., T. Pawson, B. Andrews, J. Prasad, J. L. Manley, J. C. Bell, and P. I. Duncan.** 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* **15**:265-275.
123. **Condra, J. H., W. A. Schleif, O. M. Blahy, L. J. Gabryelski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, and .** 1995. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**:569-571.
124. **Cook, K. S., G. J. Fisk, J. Hauber, N. Usman, T. J. Daly, and J. R. Rusche.** 1991. Characterization of HIV-1 REV protein: binding stoichiometry and minimal RNA substrate. *Nucleic. Acids. Res.* **19**:1577-1583.
125. **Cooke, C., H. Hans, and J. C. Alwine.** 1999. Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol. Cell Biol.* **19**:4971-4979.
126. **Coulter, L. R., M. A. Landree, and T. A. Cooper.** 1997. Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol. Cell Biol.* **17**:2143-2150.
127. **Craigie, R.** 2001. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J. Biol. Chem.* **276**:23213-23216.
128. **Crispino, J. D., B. J. Blencowe, and P. A. Sharp.** 1994. Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* **265**:1866-1869.
129. **Crispino, J. D. and P. A. Sharp.** 1995. A U6 snRNA:pre-mRNA interaction can be rate-limiting for U1-independent splicing. *Genes Dev.* **9**:2314-2323.
130. **Cullen, B. R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol. Rev.* **56**:375-394.
131. **Cullen, B. R.** 2001. Journey to the center of the cell. *Cell* **105**:697-700.
132. **Cullen, B. R., J. Hauber, K. Campbell, J. G. Sodroski, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1988. Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product. *J. Virol.* **62**:2498-2501.
133. **Dagher, S. F. and X. D. Fu.** 2001. Evidence for a role of Sky1p-mediated phosphorylation in 3' splice site recognition involving both Prp8 and Prp17/Slu4. *RNA.* **7**:1284-1297.
134. **Dagleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
135. **Daly, T. J., K. S. Cook, G. S. Gray, T. E. Maione, and J. R. Rusche.** 1989. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev- responsive element in vitro. *Nature* **342**:816-819.
136. **Damgaard, C. K., T. O. Tange, and J. Kjems.** 2002. hnRNP A1 controls HIV-1 mRNA splicing through cooperative binding to intron and exon splicing silencers in the context of a conserved secondary structure. *RNA* **8**:1401-1415.
137. **Damier, L., L. Domenjoud, and C. Branlant.** 1997. The D1-A2 and D2-A2 pairs of splice sites from human immunodeficiency virus type 1 are highly efficient in vitro, in spite of an unusual branch site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**:182-187.

138. **Datar, K. V., G. Dreyfuss, and M. S. Swanson.** 1993. The human hnRNP M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* **21**:439-446.
139. **Dauwalder, B., F. Amaya-Manzanares, and W. Mattox.** 1996. A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:9004-9009.
140. **Dauwalder, B., F. Amaya-Manzanares, and W. Mattox.** 1996. A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:9004-9009.
141. **Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine.** 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-947.
142. **Dayton, E. T., D. A. Konings, D. M. Powell, B. A. Shapiro, L. Butini, J. V. Maizel, and A. I. Dayton.** 1992. Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *J. Virol.* **66**:1139-1151.
143. **Dayton, E. T., D. M. Powell, and A. I. Dayton.** 1989. Functional analysis of CAR, the target sequence for the Rev protein of HIV-1. *Science* **246**:1625-1629.
144. **De Clercq, E.** 1993. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. *Med. Res. Rev.* **13**:229-258.
145. **de La, C. J., D. Kressler, and P. Linder.** 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* **24**:192-198.
146. **Deeks, S. G.** 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **26 Suppl 1**:S25-S33.
147. **Del Gatto-Konczak, F., C. F. Bourgeois, C. Le Guiner, L. Kister, M. C. Gesnel, J. Stevenin, and R. Breathnach.** 2000. The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* **20**:6287-6299.
148. **Deml, L., A. Bojak, S. Steck, M. Graf, J. Wild, R. Schirmbeck, H. Wolf, and R. Wagner.** 2001. 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.* **75**:10991-11001.
149. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* **381**:661-666.
150. **Denisova, G., D. Raviv, I. Mondor, Q. J. Sattentau, and J. M. Gershoni.** 1997. Conformational transitions in CD4 due to complexation with HIV envelope glycoprotein gp120. *J. Immunol.* **158**:1157-1164.
151. **Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic. Acids. Res.* **11**:1475-1489.
152. **Dominski, Z. and R. Kole.** 1994. Identification of exon sequences involved in splice site selection. *J. Biol. Chem.* **269**:23590-23596.
153. **Doms, R. W. and J. P. Moore.** 2000. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J. Cell Biol.* **151**:F9-14.

154. **Domsic, J. K., Y. Wang, A. Mayeda, A. R. Krainer, and C. M. Stoltzfus.** 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 hnRNP A/B-Dependent Exonic Splicing Silencer ESSV Antagonizes Binding of U2AF65 to Viral Polypyrimidine Tracts. *Mol. Cell Biol.* **23**:8762-8772.
155. **Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms.** 1996. 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* **85**:1149-1158.
156. **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature* **381**:667-673.
157. **Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C. G. Burd.** 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:289-321.
158. **Du, H. and M. Rosbash.** 2001. Yeast U1 snRNP-pre-mRNA complex formation without U1snRNA-pre-mRNA base pairing. *RNA.* **7**:133-142.
159. **Du, H. and M. Rosbash.** 2002. The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. *Nature* **419**:86-90.
160. **Dyhr-Mikkelsen, H. and J. Kjems.** 1995. Inefficient spliceosome assembly and abnormal branch site selection in splicing of an HIV-1 transcript in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**:24060-24066.
161. **Earl, P. L., R. W. Doms, and B. Moss.** 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:648-652.
162. **Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
163. **Eckner, R., W. Ellmeier, and M. L. Birnstiel.** 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *EMBO J.* **10**:3513-3522.
164. **Edwalds-Gilbert, G., D. H. Kim, E. Silverman, and R. J. Lin.** 2004. Definition of a spliceosome interaction domain in yeast Prp2 ATPase. *RNA.* **10**:210-220.
165. **Eldridge, A. G., Y. Li, P. A. Sharp, and B. J. Blencowe.** 1999. The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:6125-6130.
166. **Elrick, L. L., M. B. Humphrey, T. A. Cooper, and S. M. Berget.** 1998. A short sequence within two purine-rich enhancers determines 5' splice site specificity. *Mol. Cell Biol.* **18**:343-352.
167. **Emerman, M. and M. H. Malim.** 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**:1880-1884.
168. **Emerman, M., R. Vazeux, and K. Peden.** 1989. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* **57**:1155-1165.
169. **Eperon, I. C., O. V. Makarova, A. Mayeda, S. H. Munroe, J. F. Caceres, D. G. Hayward, and A. R. Krainer.** 2000. Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1. *Mol. Cell Biol.* **20**:8303-8318.
170. **Epstein, P. M.** 1998. Antisense inhibition of phosphodiesterase expression. *Methods* **14**:21-33.
171. **Escaich, S., C. Kalfoglou, I. Plavec, S. Kaushal, J. D. Mosca, and E. Bohnlein.** 1995. RevM10-mediated inhibition of HIV-1 replication in chronically infected T cells. *Hum. Gene Ther.* **6**:625-634.
172. **Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* **2**:303-308.

173. **Expert-Bezancon, A., J. P. Le Caer, and J. Marie.** 2002. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **277**:16614-16623.
174. **Expert-Bezancon, A., A. Sureau, P. Durosay, R. Salesse, H. Groeneveld, J. P. Lecaer, and J. Marie.** 2004. HnRNP A1 and SR proteins, ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta -tropomyosin exon 6B. *J. Biol. Chem.*
175. **Fairbrother, W. G., G. W. Yeo, R. Yeh, P. Goldstein, M. Mawson, P. A. Sharp, and C. B. Burge.** 2004. RESCUE-ESE identifies candidate exonic splicing enhancers in vertebrate exons. *Nucleic Acids Res.* **32**:W187-W190.
176. **Farrer, T., A. B. Roller, W. J. Kent, and A. M. Zahler.** 2002. Analysis of the role of *Caenorhabditis elegans* GC-AG introns in regulated splicing. *Nucleic Acids Res.* **30**:3360-3367.
177. **Faustino, N. A. and T. A. Cooper.** 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**:419-437.
178. **Felber, B. K., D. Derse, A. Athanassopoulos, M. Campbell, and G. N. Pavlakis.** 1989. Cross-activation of the Rex proteins of HTLV-I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and nonreciprocal interactions with their RNA responsive elements. *New Biol.* **1**:318-328.
179. **Felber, B. K., M. Hadzopoulou Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G. N. Pavlakis.** 1989. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1495-1499.
180. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven- transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* **272**:872-877.
181. **Fetzer, S., J. Lauber, C. L. Will, and R. Luhrmann.** 1997. The [U4/U6.U5] tri-snRNP-specific 27K protein is a novel SR protein that can be phosphorylated by the snRNP-associated protein kinase. *RNA.* **3**:344-355.
182. **Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj, and R. Luhrmann.** 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**:475-483.
183. **Fischer, U. and R. Luhrmann.** 1990. An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science* **249**:786-790.
184. **Fischer, U., S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Luhrmann, and G. Rautmann.** 1994. Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J.* **13**:4105-4112.
185. **Fischer, U., V. W. Pollard, R. Luhrmann, M. Teufel, M. W. Michael, G. Dreyfuss, and M. H. Malim.** 1999. Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic. Acids. Res.* **27**:4128-4134.
186. **Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al.** 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:367-371.
187. **Fisher, R. A., J. M. Bertonis, W. Meier, V. A. Johnson, D. S. Costopoulos, T. Liu, R. Tizard, B. D. Walker, M. S. Hirsch, and R. T. Schooley.** 1988. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* **331**:76-78.
188. **Forch, P., O. Puig, C. Martinez, B. Seraphin, and J. Valcarcel.** 2002. The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J.* **21**:6882-6892.

189. **Forne, T., F. Rossi, E. Labourier, E. Antoine, G. Cathala, C. Brunel, and J. Tazi.** 1995. Disruption of base-paired U4.U6 small nuclear RNAs induced by mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C protein. *J. Biol. Chem.* **270**:16476-16481.
190. **Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]. *Cell* **90**:1051-1060.
191. **Fornerod, M., D. J. van, B. S. van, A. Reynolds, D. Davis, K. G. Murti, J. Franssen, and G. Grosveld.** 1997. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**:807-816.
192. **Fouraux, M. A., M. J. Kolkman, H. A. Van der, A. S. De Jong, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2002. The human La (SS-B) autoantigen interacts with DDX15/hPrp43, a putative DEAH-box RNA helicase. *RNA.* **8**:1428-1443.
193. **Frank, D. and C. Guthrie.** 1992. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**:2112-2124.
194. **Frankel, A. D.** 1992. Activation of HIV transcription by Tat. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**:293-298.
195. **Freed, E. O.** 2001. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**:13-33.
196. **Freund, M., C. Asang, S. Kammler, C. Konermann, J. Krummheuer, M. Hipp, I. Meyer, W. Gierling, S. Theiss, T. Preuss, D. Schindler, J. Kjems, and H. Schaal.** 2003. A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res.* **31**:6963-6975.
197. **Friedman, K. J., J. Kole, J. A. Cohn, M. R. Knowles, L. M. Silverman, and R. Kole.** 1999. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **274**:36193-36199.
198. **Fu, X. D.** 1993. Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* **365**:82-85.
199. **Fu, X. D., R. A. Katz, A. M. Skalka, and T. Maniatis.** 1991. The role of branchpoint and 3'-exon sequences in the control of balanced splicing of avian retrovirus RNA. *Genes Dev.* **5**:211-220.
200. **Fu, X. D. and T. Maniatis.** 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* **343**:437-441.
201. **Fu, X. D. and T. Maniatis.** 1992. Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* **256**:535-538.
202. **Fu, X. D. and T. Maniatis.** 1992. The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:1725-1729.
203. **Fujinaga, K., T. P. Cujec, J. Peng, J. Garriga, D. H. Price, X. Grana, and B. M. Peterlin.** 1998. The ability of positive transcription elongation factor b To transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat [In Process Citation]. *J. Virol.* **72**:7154-7159.
204. **Furtado, M. R., R. Balachandran, P. Gupta, and S. M. Wolinsky.** 1991. Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* **185**:258-270.
205. **Gallego, M. E., R. Gattoni, J. Stevenin, J. Marie, and A. Expert-Bezancon.** 1997. The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. *EMBO J.* **16**:1772-1784.
206. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of

- cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
207. **Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, and J. A. Steitz.** 2001. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* **7**:1348.
208. **Gamberi, C., E. Izaurralde, C. Beisel, and I. W. Mattaj.** 1997. Interaction between the human nuclear cap-binding protein complex and hnRNP F. *Mol. Cell Biol.* **17**:2587-2597.
209. **Garcia-Blanco, M. A., S. F. Jamison, and P. A. Sharp.** 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.* **3**:1874-1886.
210. **Gatto-Konczak, F., M. Olive, M. C. Gesnel, and R. Breathnach.** 1999. hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol. Cell Biol.* **19**:251-260.
211. **Gattoni, R., D. Mahe, P. Mahl, N. Fischer, M. G. Mattei, J. Stevenin, and J. P. Fuchs.** 1996. The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Res.* **24**:2535-2542.
212. **Ge, H. and J. L. Manley.** 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* **62**:25-34.
213. **Gee, S., S. W. Krauss, E. Miller, K. Aoyagi, J. Arenas, and J. G. Conboy.** 1997. Cloning of mDEAH9, a putative RNA helicase and mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor Prp43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:11803-11807.
214. **Gilbert, E., F. Del Gatto, P. Champion-Arnaud, M. C. Gesnel, and R. Breathnach.** 1993. Control of BEK and K-SAM splice sites in alternative splicing of the fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* **13**:5461-5468.
215. **Golas, M. M., B. Sander, C. L. Will, R. Luhrmann, and H. Stark.** 2003. Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science* **300**:980-984.
216. **Golovkin, M. and A. S. Reddy.** 1998. The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. *Plant Cell* **10**:1637-1648.
217. **Gonda, M. A., F. Wong Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden.** 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**:173-177.
218. **Gontarek, R. R. and D. Derse.** 1996. Interactions among SR proteins, an exonic splicing enhancer, and a lentivirus Rev protein regulate alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **16**:2325-2331.
219. **Gooding, C., G. C. Roberts, G. Moreau, B. Nadal-Ginard, and C. W. Smith.** 1994. Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon. *EMBO J.* **13**:3861-3872.
220. **Gooding, C., G. C. Roberts, and C. W. Smith.** 1998. Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *RNA.* **4**:85-100.
221. **Gordon, P. M. and J. A. Piccirilli.** 2001. Metal ion coordination by the AGC triad in domain 5 contributes to group II intron catalysis. *Nat. Struct. Biol.* **8**:893-898.
222. **Gordon, P. M., E. J. Sontheimer, and J. A. Piccirilli.** 2000. Metal ion catalysis during the exon-ligation step of nuclear pre-mRNA splicing: extending the parallels between the spliceosome and group II introns. *RNA.* **6**:199-205.
223. **Gorlach, M., C. G. Burd, and G. Dreyfuss.** 1994. The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. *J. Biol. Chem.* **269**:23074-23078.

224. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1431.
225. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine.** 1992. The role of the tnv protein and tnv RNA splicing signals in replication of HIV-1 III_B isolates. *Virology* **189**:618-628.
226. **Gottschalk, A., G. Neubauer, J. Banroques, M. Mann, R. Luhrmann, and P. Fabrizio.** 1999. Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *EMBO J.* **18**:4535-4548.
227. **Gozani, O., R. Feld, and R. Reed.** 1996. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev.* **10**:233-243.
228. **Grabowski, P. J., S. R. Seiler, and P. A. Sharp.** 1985. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**:345-353.
229. **Graf, M., A. Bojak, L. Deml, K. Bieler, H. Wolf, and R. Wagner.** 2000. Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* **74**:10822-10826.
230. **Graveley, B. R.** 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* **6**:1197-1211.
231. **Graveley, B. R.** 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* **17**:100-107.
232. **Graveley, B. R.** 2004. A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome. *Mol. Cell* **13**:302-304.
233. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 1998. A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *EMBO J.* **17**:6747-6756.
234. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 2001. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA* **7**:806-818.
235. **Graveley, B. R. and T. Maniatis.** 1998. Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **1**:765-771.
236. **Green, M. R.** 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:559-599.
237. **Greenberg, M., N. Cammack, M. Salgo, and L. Smiley.** 2004. HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev. Med. Virol.* **14**:321-337.
238. **Gross, T., K. Richert, C. Mierke, M. Lutzberger, and N. F. Kauffer.** 1998. Identification and characterization of srp1, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **26**:505-511.
239. **Gruss, P., C. J. Lai, R. Dhar, and G. Khoury.** 1979. Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4317-4321.
240. **Gruter, P., C. Tabernero, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber, and E. Izaurralde.** 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell* **1**:649-659.
241. **Gui, J. F., W. S. Lane, and X. D. Fu.** 1994. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* **369**:678-682.

242. **Gui, J. F., H. Tronchere, S. D. Chandler, and X. D. Fu.** 1994. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:10824-10828.
243. **Gunderson, S. I., M. Polycarpou-Schwarz, and I. W. Mattaj.** 1998. U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol. Cell* **1**:255-264.
244. **Gunnewiek, J. M., Y. van Aarssen, R. Wassenaar, P. Legrain, W. J. van Venrooij, and R. L. Nelissen.** 1995. Homodimerization of the human U1 snRNP-specific protein C. *Nucleic Acids Res.* **23**:4864-4871.
245. **Guth, S., C. Martinez, R. K. Gaur, and J. Valcarcel.** 1999. Evidence for substrate-specific requirement of the splicing factor U2AF(35) and for its function after polypyrimidine tract recognition by U2AF(65). *Mol. Cell Biol.* **19**:8263-8271.
246. **Guth, S., T. O. Tange, E. Kellenberger, and J. Valcarcel.** 2001. Dual function for U2AF(35) in AG-dependent pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* **21**:7673-7681.
247. **Guth, S. and J. Valcarcel.** 2000. Kinetic role for mammalian SF1/BBP in spliceosome assembly and function after polypyrimidine tract recognition by U2AF. *J. Biol. Chem.* **275**:38059-38066.
248. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
249. **Hahm, B., O. H. Cho, J. E. Kim, Y. K. Kim, J. H. Kim, Y. L. Oh, and S. K. Jang.** 1998. Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L. *FEBS Lett.* **425**:401-406.
250. **Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358-361.
251. **Hallier, M., A. Lerga, S. Barnache, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin.** 1998. The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J. Biol. Chem.* **273**:4838-4842.
252. **Hamer, D. H. and P. Leder.** 1979. Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**:1299-1302.
253. **Hamm, J., N. A. Dathan, D. Scherly, and I. W. Mattaj.** 1990. Multiple domains of U1 snRNA, including U1 specific protein binding sites, are required for splicing. *EMBO J.* **9**:1237-1244.
254. **Hamm, J. and A. I. Lamond.** 1998. Spliceosome assembly: the unwinding role of DEAD-box proteins. *Curr. Biol.* **8**:R532-R534.
255. **Hamm, J. and I. W. Mattaj.** 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* **63**:109-118.
256. **Hammariskjold, M. L., J. Heimer, B. Hammariskjold, I. Sangwan, L. Albert, and D. Rekosh.** 1989. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *J. Virol.* **63**:1959-1966.
257. **Hammariskjold, M. L., H. Li, D. Rekosh, and S. Prasad.** 1994. Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev- independent if the env region is not defined as an intron. *J. Virol.* **68**:951-958.
258. **Hammerschmid, M., D. Palmeri, M. Ruhl, H. Jaksche, I. Weichselbraun, E. Bohnlein, M. H. Malim, and J. Hauber.** 1994. Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J. Virol.* **68**:7329-7335.
259. **Hanamura, A., J. F. Caceres, A. Mayeda, B. R. Franza, Jr., and A. R. Krainer.** 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* **4**:430-444.

260. **Harrison, P. M., A. Kumar, N. Lang, M. Snyder, and M. Gerstein.** 2002. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res.* **30**:1083-1090.
261. **Hartmuth, K., H. Urlaub, H. P. Vornlocher, C. L. Will, M. Gentzel, M. Wilm, and R. Luhrmann.** 2002. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:16719-16724.
262. **Hauber, J., M. Bouvier, M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1988. Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **62**:4801-4804.
263. **Haut, D. D. and D. J. Pintel.** 1999. Inclusion of the NS2-specific exon in minute virus of mice mRNA is facilitated by an intronic splicing enhancer that affects definition of the downstream small intron. *Virology* **258**:84-94.
264. **He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski, and D. Gabuzda.** 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**:645-649.
265. **Heaphy, S., C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, and M. A. Skinner.** 1990. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**:685-693.
266. **Heaphy, S., J. T. Finch, M. J. Gait, J. Karn, and M. Singh.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7366-7370.
267. **Hecht, F. M., R. M. Grant, C. J. Petropoulos, B. Dillon, M. A. Chesney, H. Tian, N. S. Hellmann, N. I. Bandrapalli, L. Digilio, B. Branson, and J. O. Kahn.** 1998. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **339**:307-311.
268. **Heinrichs, V., M. Bach, G. Winkelmann, and R. Luhrmann.** 1990. U1-specific protein C needed for efficient complex formation of U1 snRNP with a 5' splice site. *Science* **247**:69-72.
269. **Henderson, B. R. and P. Percipalle.** 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J. Mol. Biol.* **274**:693-707.
270. **Herrmann, C. H. and A. P. Rice.** 1995. Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J. Virol.* **69**:1612-1620.
271. **Hibbert, C. S., R. R. Gontarek, and K. L. Beemon.** 1999. The role of overlapping U1 and U11 5' splice site sequences in a negative regulator of splicing. *RNA.* **5**:333-343.
272. **Hoffman, D. W., C. C. Query, B. L. Golden, S. W. White, and J. D. Keene.** 1991. RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:2495-2499.
273. **Honore, B., H. H. Rasmussen, H. Vorum, K. Dejgaard, X. Liu, P. Gromov, P. Madsen, B. Gesser, N. Tommerup, and J. E. Celis.** 1995. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *J. Biol. Chem.* **270**:28780-28789.
274. **Hope, T. J.** 1999. The ins and outs of HIV Rev. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**:186-191.
275. **Horowitz, D. S. and J. Abelson.** 1993. Stages in the second reaction of pre-mRNA splicing: the final step is ATP independent. *Genes Dev.* **7**:320-329.

276. **Horowitz, D. S. and A. R. Krainer.** 1997. A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing is functionally related to a yeast splicing factor. *Genes Dev.* **11**:139-151.
277. **Huang, T. S., C. E. Nilsson, T. Punga, and G. Akusjarvi.** 2002. Functional inactivation of the SR family of splicing factors during a vaccinia virus infection. *EMBO Rep.* **3**:1088-1093.
278. **Huang, X. J., T. J. Hope, B. L. Bond, D. McDonald, K. Grahl, and T. G. Parslow.** 1991. Minimal Rev-response element for type 1 human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **65**:2131-2134.
279. **Huang, Y., R. Gattoni, J. Stevenin, and J. A. Steitz.** 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell* **11**:837-843.
280. **Huang, Y. and J. A. Steitz.** 2001. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol. Cell* **7**:899-905.
281. **Huang, Y., T. A. Yario, and J. A. Steitz.** 2004. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:9666-9670.
282. **Hui, J., G. Reither, and A. Bindereif.** 2003. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA.* **9**:931-936.
283. **Hui, J., K. Stangl, W. S. Lane, and A. Bindereif.** 2003. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat. Struct. Biol.* **10**:33-37.
284. **Hutchison, S., C. LeBel, M. Blanchette, and B. Chabot.** 2002. Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. *J. Biol. Chem.* **277**:29745-29752.
285. **Imamura, O., K. Saiki, T. Tani, Y. Ohshima, M. Sugawara, and Y. Furuichi.** 1998. Cloning and characterization of a human DEAH-box RNA helicase, a functional homolog of fission yeast Cdc28/Prp8. *Nucleic Acids Res.* **26**:2063-2068.
286. **Imamura, O., M. Sugawara, and Y. Furuichi.** 1997. Cloning and characterization of a putative human RNA helicase gene of the DEAH-box protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**:335-340.
287. **Iwai, S., C. Pritchard, D. A. Mann, J. Karn, and M. J. Gait.** 1992. Recognition of the high affinity binding site in rev-response element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucleic. Acids. Res.* **20**:6465-6472.
288. **Jacquenet, S., A. Mereau, P. S. Bilodeau, L. Damier, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. A second exon splicing silencer within human immunodeficiency virus type 1 tat exon 2 represses splicing of Tat mRNA and binds protein hnRNP H. *J. Biol. Chem.*
289. **Jacquenet, S., D. Ropers, P. S. Bilodeau, L. Damier, A. Mouglin, C. M. Stoltzfus, and C. Branlant.** 2001. Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **29**:464-478.
290. **Jamison, S. F., Z. Pisman, J. Wang, C. Will, R. Luhrmann, J. L. Manley, and M. A. Garcia-Blanco.** 1995. U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic Acids Res.* **23**:3260-3267.
291. **Jankowsky, E., C. H. Gross, S. Shuman, and A. M. Pyle.** 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* **291**:121-125.
292. **Jarmolowski, A., W. C. Boelens, E. Izaurralde, and I. W. Mattaj.** 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* **124**:627-635.

293. **Johnson, A. A., A. S. Ray, J. Hanes, Z. Suo, J. M. Colacino, K. S. Anderson, and K. A. Johnson.** 2001. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **276**:40847-40857.
294. **Jones, K. A. and B. M. Peterlin.** 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:717-743.
295. **Jones, M. H., D. N. Frank, and C. Guthrie.** 1995. Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:9687-9691.
296. **Jones, M. H. and C. Guthrie.** 1990. Unexpected flexibility in an evolutionarily conserved protein-RNA interaction: genetic analysis of the Sm binding site. *EMBO J.* **9**:2555-2561.
297. **Jurica, M. S., L. J. Licklider, S. R. Gygi, N. Grigorieff, and M. J. Moore.** 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*. **8**:426-439.
298. **Jurica, M. S. and M. J. Moore.** 2003. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* **12**:5-14.
299. **Jurica, M. S., D. Sousa, M. J. Moore, and N. Grigorieff.** 2004. Three-dimensional structure of C complex spliceosomes by electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:265-269.
300. **Kalland, K. H., A. M. Szilvay, K. A. Brokstad, W. Saetrevik, and G. Haukenes.** 1994. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol. Cell Biol.* **14**:7436-7444.
301. **Kambach, C., S. Walke, R. Young, J. M. Avis, E. de la Fortelle, V. A. Raker, R. Luhrmann, J. Li, and K. NAGAI.** 1999. Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**:375-387.
302. **Kammler, S., C. Leurs, M. Freund, J. Krummheuer, K. Seidel, T. O. Tange, M. K. Lund, J. Kjems, A. Scheid, and H. Schaal.** 2001. The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA. *RNA*. **7**:421-434.
303. **Kan, J. L. and M. R. Green.** 1999. Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. *Genes Dev.* **13**:462-471.
304. **Kang, Y. and B. R. Cullen.** 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* **13**:1126-1139.
305. **Kanopka, A., O. Muhlemann, and G. Akusjarvi.** 1996. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**:535-538.
306. **Kanopka, A., O. Muhlemann, S. Petersen-Mahrt, C. Estmer, C. Ohrmalm, and G. Akusjarvi.** 1998. Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* **393**:185-187.
307. **Kashima, T. and J. L. Manley.** 2003. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*
308. **Kataoka, N., J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss.** 1999. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145**:1145-1152.
309. **Kataoka, N., J. Yong, V. N. Kim, F. Velazquez, R. A. Perkinson, F. Wang, and G. Dreyfuss.** 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm [In Process Citation]. *Mol. Cell* **6**:673-682.

310. **Katz, R. A., M. Kotler, and A. M. Skalka.** 1988. cis-acting intron mutations that affect the efficiency of avian retroviral RNA splicing: implication for mechanisms of control. *J. Virol.* **62**:2686-2695.
311. **Katz, R. A. and A. M. Skalka.** 1990. Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. *Mol. Cell Biol.* **10**:696-704.
312. **Kedes, L. H.** 1979. Histone genes and histone messengers. *Annu. Rev. Biochem.* **48**:837-70:837-870.
313. **Kel, A. E., M. P. Ponomarenko, E. A. Likhachev, Y. Orlov, I. V. Ischenko, L. Milanese, and N. A. Kolchanov.** 1993. SITEVIDEO: a computer system for functional site analysis and recognition. Investigation of the human splice sites. *Comput. Appl. Biosci.* **9**:617-627.
314. **Kellenberger, E., G. Stier, and M. Sattler.** 2002. Induced folding of the U2AF35 RRM upon binding to U2AF65. *FEBS Lett.* **528**:171-176.
315. **Kenan, D. J., C. C. Query, and J. D. Keene.** 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends. Biochem. Sci.* **16**:214-220.
316. **Kent, O. A., A. Reayi, L. Foong, K. A. Chilibeck, and A. M. MacMillan.** 2003. Structuring of the 3' splice site by U2AF65. *J. Biol. Chem.* **278**:50572-50577.
317. **Kestler, H. W. 3., D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers.** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-662.
318. **Kim, S. H. and R. J. Lin.** 1993. Pre-mRNA splicing within an assembled yeast spliceosome requires an RNA-dependent ATPase and ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:888-892.
319. **Kim, S. H. and R. J. Lin.** 1996. Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* **16**:6810-6819.
320. **Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore.** 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**:3708-3713.
321. **Kim, Y. J. and B. S. Baker.** 1993. Isolation of RRM-type RNA-binding protein genes and the analysis of their relatedness by using a numerical approach. *Mol. Cell Biol.* **13**:174-183.
322. **Kim, Y. J., P. Zuo, J. L. Manley, and B. S. Baker.** 1992. The Drosophila RNA-binding protein RBP1 is localized to transcriptionally active sites of chromosomes and shows a functional similarity to human splicing factor ASF/SF2. *Genes Dev.* **6**:2569-2579.
323. **King, D. S. and J. D. Beggs.** 1990. Interactions of PRP2 protein with pre-mRNA splicing complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**:6559-6564.
324. **Kiss-Laszlo, Z. and T. Hohn.** 1996. Pararetro- and retrovirus RNA: splicing and the control of nuclear export. *Trends. Microbiol.* **4**:480-485.
325. **Kjems, J., B. J. Calnan, A. D. Frankel, and P. A. Sharp.** 1992. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J.* **11**:1119-1129.
326. **Kjems, J. and P. A. Sharp.** 1993. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J. Virol.* **67**:4769-4776.
327. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.

328. **Knight, D. M., F. A. Flomerfelt, and J. Ghrayeb.** 1987. Expression of the art/trs protein of HIV and study of its role in viral envelope synthesis. *Science* **236**:837-840.
329. **Kobilka, B. K., T. Frielle, S. Collins, T. Yang-Feng, T. S. Kobilka, U. Francke, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron.** 1987. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* **329**:75-79.
330. **Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, and T. A. Steitz.** 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**:1783-1790.
331. **Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Luhrmann, M. A. Garcia-Blanco, and J. L. Manley.** 1994. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**:119-124.
332. **Kojima, T., T. Zama, K. Wada, H. Onogi, and M. Hagiwara.** 2001. Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J. Biol. Chem.* **276**:32247-32256.
333. **Konarska, M. M. and P. A. Sharp.** 1987. Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* **49**:763-774.
334. **Konforti, B. B., M. J. Koziolkiewicz, and M. M. Konarska.** 1993. Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly. *Cell* **75**:863-873.
335. **Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak.** 1990. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.* **4**:1158-1171.
336. **Kramer, A.** 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:367-409:367-409.
337. **Kramer, A., P. Gruter, K. Groning, and B. Kastner.** 1999. Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP. *J. Cell Biol.* **145**:1355-1368.
338. **Kramer, A., W. Keller, B. Appel, and R. Luhrmann.** 1984. The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **38**:299-307.
339. **Kramer, A. and U. Utans.** 1991. Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO J.* **10**:1503-1509.
340. **Krawczak, M., J. Reiss, and D. N. Cooper.** 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* **90**:41-54.
341. **Krecic, A. M. and M. S. Swanson.** 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:363-371.
342. **Krummheuer, J., C. Lenz, S. Kammler, A. Scheid, and H. Schaal.** 2001. Influence of the Small Leader Exons 2 and 3 on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Virology* **285**:276-289.
343. **Kuhn, A. N., Z. Li, and D. A. Brow.** 1999. Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol. Cell* **3**:65-75.
344. **Kuhn, A. N., E. M. Reichl, and D. A. Brow.** 2002. Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:9145-9149.
345. **Kuo, H. C., F. H. Nasim, and P. J. Grabowski.** 1991. Control of alternative splicing by the differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Science* **251**:1045-1050.

346. **Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody [see comments]. *Nature* **393**:648-659.
347. **Lacerra, G., H. Sierakowska, C. Carestia, S. Fucharoen, J. Summerton, D. Weller, and R. Kole.** 2000. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:9591-9596.
348. **Lai, M. C., R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai, and W. Y. Tarn.** 2000. A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* **275**:7950-7957.
349. **Lai, M. C., R. I. Lin, and W. Y. Tarn.** 2001. Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:10154-10159.
350. **Lai, M. C. and W. Y. Tarn.** 2004. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.* **279**:31745-31749.
351. **Lam, B. J. and K. J. Hertel.** 2002. A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA* **8**:1233-1241.
352. **Lamm, G. M. and A. I. Lamond.** 1993. Non-snRNP protein splicing factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1173**:247-265.
353. **Lamond, A. I., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, and P. A. Sharp.** 1988. Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:411-415.
354. **Lamond, A. I., M. M. Konarska, and P. A. Sharp.** 1987. A mutational analysis of spliceosome assembly: evidence for splice site collaboration during spliceosome formation. *Genes Dev.* **1**:532-543.
355. **Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dwar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, B. M. de la, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D.**

- Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, J. Szustakowski, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, and S. Choi.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921.
356. **Lapham, C. K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Nguyen, D. S. Dimitrov, and H. Golding.** 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines [see comments]. *Science* **274**:602-605.
357. **Lavigne, A., H. La Branche, A. R. Kornblihtt, and B. Chabot.** 1993. A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.* **7**:2405-2417.
358. **Lazar, G., T. Schaal, T. Maniatis, and H. M. Goodman.** 1995. Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian splicing factor SF2/ASF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:7672-7676.
359. **Le Hir, H., M. J. Moore, and L. E. Maquat.** 2000. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* **14**:1098-1108.
360. **Lee, B., B. J. Doranz, M. Z. Ratajczak, and R. W. Doms.** 1998. An intricate Web: chemokine receptors, HIV-1 and hematopoiesis. *Stem. Cells* **16**:79-88.
361. **Lee, H., J. Hanes, and K. A. Johnson.** 2003. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry* **42**:14711-14719.
362. **Legrain, P. and M. Rosbash.** 1989. Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**:573-583.
363. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-10382.
364. **Lerga, A., M. Hallier, L. Delva, C. Orvain, I. Gallais, J. Marie, and F. Moreau-Gachelin.** 2001. Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J. Biol. Chem.* **276**:6807-6816.
365. **Lerner, M. R. and J. A. Steitz.** 1979. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:5495-5499.
366. **Levy, J. A., L. S. Kaminsky, W. J. Morrow, K. Steimer, P. Luciw, D. Dina, J. Hoxie, and L. Oshiro.** 1985. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical, biological, and molecular features. *Ann. Intern. Med.* **103**:694-699.
367. **Lewis, J. D., E. Izaurralde, A. Jarmolowski, C. McGuigan, and I. W. Mattaj.** 1996. A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev.* **10**:1683-1698.
368. **Li, Y., L. Luo, D. Y. Thomas, and C. Y. Kang.** 2000. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**:417-428.
369. **Li, Z. and D. A. Brow.** 1996. A spontaneous duplication in U6 spliceosomal RNA uncouples the early and late functions of the ACAGA element in vivo. *RNA.* **2**:879-894.
370. **Liang, C. and M. A. Wainberg.** 2002. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev.* **4**:41-49.

371. **Lim, L. P. and C. B. Burge.** 2001. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:11193-11198.
372. **Lin, C. H. and J. G. Patton.** 1995. Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *RNA*. **1**:234-245.
373. **Liu, H. X., S. L. Chew, L. Cartegni, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer.** 2000. Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol. Cell Biol.* **20**:1063-1071.
374. **Liu, H. X., M. Zhang, and A. R. Krainer.** 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* **12**:1998-2012.
375. **Liu, X. and J. E. Mertz.** 1995. HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron- dependent gene expression. *Genes Dev.* **9**:1766-1780.
376. **Liu, Z. R.** 2002. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol. Cell Biol.* **22**:5443-5450.
377. **Lopato, S., R. Gattoni, G. Fabini, J. Stevenin, and A. Barta.** 1999. A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: examination of RNA binding and splicing activities. *Plant Mol. Biol.* **39**:761-773.
378. **Lopato, S., M. Kalyna, S. Dorner, R. Kobayashi, A. R. Krainer, and A. Barta.** 1999. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev.* **13**:987-1001.
379. **Lopato, S., A. Mayeda, A. R. Krainer, and A. Barta.** 1996. Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:3074-3079.
380. **Lopato, S., E. Wajmann, and A. Barta.** 1996. Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**:2255-2264.
381. **Loveday, C.** 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **26 Suppl 1**:S10-S24.
382. **Lu, J., P. Sista, F. Giguel, M. Greenberg, and D. R. Kuritzkes.** 2004. Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). *J. Virol.* **78**:4628-4637.
383. **Lu, X. B., J. Heimer, D. Rekosh, and M. L. Hammariskjold.** 1990. U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev-regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:7598-7602.
384. **Lund, M. and J. Kjems.** 2002. Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. *RNA*. **8**:166-179.
385. **Luo, H. R., G. A. Moreau, N. Levin, and M. J. Moore.** 1999. The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. *RNA*. **5**:893-908.
386. **Luo, M. and R. Reed.** 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:14937-14942.
387. **Lutz-Freyermuth, C., J. D. Keene, and C. Lutz-Reyermuth.** 1989. The U1 RNA-binding site of the U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)-associated A protein suggests a similarity with U2 snRNPs. *Mol. Cell Biol.* **9**:2975-2982.
388. **Lutzelberger, M., T. Gross, and N. F. Kaufer.** 1999. Srp2, an SR protein family member of fission yeast: in vivo characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res.* **27**:2618-2626.

389. **MacMillan, A. M., P. S. McCaw, J. D. Crispino, and P. A. Sharp.** 1997. SC35-mediated reconstitution of splicing in U2AF-depleted nuclear extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:133-136.
390. **MacMillan, A. M., C. C. Query, C. R. Allerson, S. Chen, G. L. Verdine, and P. A. Sharp.** 1994. Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region. *Genes Dev.* **8**:3008-3020.
391. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
392. **Madhani, H. D. and C. Guthrie.** 1992. A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* **71**:803-817.
393. **Madore, S. J., L. S. Tiley, M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1994. Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. *Virology* **202**:186-194.
394. **Makarov, E. M., O. V. Makarova, H. Urlaub, M. Gentzel, C. L. Will, M. Wilm, and R. Luhrmann.** 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**:2205-2208.
395. **Malim, M. H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-- derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**:205-214.
396. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**:241-248.
397. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* **13**:6180-6189.
398. **Malim, M. H., W. W. Freimuth, J. Liu, T. J. Boyle, H. K. Lyerly, B. R. Cullen, and G. J. Nabel.** 1992. Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J. Exp. Med.* **176**:1197-1201.
399. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
400. **Malim, M. H., D. F. McCarn, L. S. Tiley, and B. R. Cullen.** 1991. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J. Virol.* **65**:4248-4254.
401. **Malim, M. H., L. S. Tiley, D. F. McCarn, J. R. Rusche, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**:675-683.
402. **Maniatis, T. and R. Reed.** 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**:673-678.
403. **Maniatis, T. and R. Reed.** 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**:499-506.
404. **Maniatis, T. and B. Tasic.** 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**:236-243.
405. **Mann, D. A., I. Mikaelian, R. W. Zimmel, S. M. Green, A. D. Lowe, T. Kimura, M. Singh, P. J. Butler, M. J. Gait, and J. Karn.** 1994. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type- 1 late gene expression. *J. Mol. Biol.* **241**:193-207.
406. **Maquat, L. E.** 1995. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA.* **1**:453-465.

407. **Marchand, V., A. Mereau, S. Jacquenet, D. Thomas, A. Mougin, R. Gattoni, J. Stevenin, and C. Branlant.** 2002. A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding. *J. Mol. Biol.* **323**:629-652.
408. **Martin, A., S. Schneider, and B. Schwer.** 2002. Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.* **277**:17743-17750.
409. **Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-1438.
410. **Mathews, D. H. and D. H. Turner.** 2002. Dynalign: an algorithm for finding the secondary structure common to two RNA sequences. *J. Mol. Biol.* **317**:191-203.
411. **Mattaj, I. W.** 1986. Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**:905-911.
412. **Matter, N., M. Marx, S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, and H. Konig.** 2000. Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**:35353-35360.
413. **Mayeda, A., D. M. Helfman, and A. R. Krainer.** 1993. Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol. Cell Biol.* **13**:2993-3001.
414. **Mayeda, A. and A. R. Krainer.** 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**:365-375.
415. **Mayeda, A., S. H. Munroe, J. F. Caceres, and A. R. Krainer.** 1994. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *EMBO J.* **13**:5483-5495.
416. **Mayeda, A., S. H. Munroe, R. M. Xu, and A. R. Krainer.** 1998. Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1. *RNA.* **4**:1111-1123.
417. **Mayeda, A., G. R. Sreaton, S. D. Chandler, X. D. Fu, and A. R. Krainer.** 1999. Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol. Cell Biol.* **19**:1853-1863.
418. **Mayrand, S. H., P. Dwen, and T. Pederson.** 1993. Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to pre-mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:7764-7768.
419. **Mayrand, S. H., P. A. Fung, and T. Pederson.** 1996. A discrete 3' region of U6 small nuclear RNA modulates the phosphorylation cycle of the C1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle protein. *Mol. Cell Biol.* **16**:1241-1246.
420. **McKnight, S. L.** 1980. The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic. Acids. Res.* **8**:5949-5964.
421. **McNally, M. T. and K. Beemon.** 1992. Intronic sequences and 3' splice sites control Rous sarcoma virus RNA splicing. *J. Virol.* **66**:6-11.
422. **Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen.** 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**:413-423.
423. **Mengeritsky, G. and T. F. Smith.** 1989. New analytical tool for analysis of splice site sequence determinants. *Comput. Appl. Biosci.* **5**:97-100.
424. **Menzo, S., A. Castagna, A. Monachetti, H. Hasson, A. Danise, E. Carini, P. Bagnarelli, A. Lazzarin, and M. Clementi.** 2004. Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency

- virus type 1 resistance to enfuvirtide during long-term treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3253-3259.
425. **Merendino, L., S. Guth, D. Bilbao, C. Martinez, and J. Valcarcel.** 1999. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. *Nature* **402**:838-841.
426. **Mermer, B., B. K. Felber, M. Campbell, and G. N. Pavlakis.** 1990. Identification of trans-dominant HIV-1 rev protein mutants by direct transfer of bacterially produced proteins into human cells. *Nucleic. Acids. Res.* **18**:2037-2044.
427. **Mermoud, J. E., P. Cohen, and A. I. Lamond.** 1992. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **20**:5263-5269.
428. **Mermoud, J. E., P. T. Cohen, and A. I. Lamond.** 1994. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* **13**:5679-5688.
429. **Meyer, B. E. and M. H. Malim.** 1994. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **8**:1538-1547.
430. **Meyer, B. E., J. L. Meinkoth, and M. H. Malim.** 1996. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* **70**:2350-2359.
431. **Michaud, S. and R. Reed.** 1991. An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev.* **5**:2534-2546.
432. **Michaud, S. and R. Reed.** 1993. A functional association between the 5' and 3' splice site is established in the earliest prespliceosome complex (E) in mammals. *Genes Dev.* **7**:1008-1020.
433. **Min, H., R. C. Chan, and D. L. Black.** 1995. The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre- mRNA splicing event. *Genes Dev.* **9**:2659-2671.
434. **Misteli, T.** 1999. RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr. Biol.* **9**:R198-R200.
435. **Misteli, T.** 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 11)**:1841-1849.
436. **Misteli, T., J. F. Caceres, J. Q. Clement, A. R. Krainer, M. F. Wilkinson, and D. L. Spector.** 1998. Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J. Cell Biol.* **143**:297-307.
437. **Misteli, T., J. F. Caceres, and D. L. Spector.** 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**:523-527.
438. **Misteli, T. and D. L. Spector.** 1996. Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol. Biol. Cell* **7**:1559-1572.
439. **Modafferi, E. F. and D. L. Black.** 1997. A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon. *Mol. Cell Biol.* **17**:6537-6545.
440. **Modrek, B. and C. Lee.** 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* **30**:13-19.
441. **Moore, M. J., C. C. Query, and P. A. Sharp.** 1993. Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome, p. 303-357. *In* R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
442. **Morikawa, Y.** 2003. HIV capsid assembly. *Curr. HIV. Res.* **1**:1-14.
443. **Mount, S. M.** 1982. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**:459-472.

444. **Mulligan, G. J., W. Guo, S. Wormsley, and D. M. Helfman.** 1992. Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **267**:25480-25487.
445. **Myers, G., B. Korber, B. H. Hahn, K. T. Jeang, J. W. Mellors, F. E. McCutchan, L. E. Henderson, and G. N. Pavlakis.** 1995. Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
446. **Myers, G., B. Korber, B. H. Hahn, K. T. Jeang, J. W. Mellors, F. E. McCutchan, L. E. Henderson, and G. N. Pavlakis.** 1995. Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, New Mexico.
447. **Nagai, K., C. Oubridge, N. Ito, T. H. Jessen, J. Avis, and P. Evans.** 1995. Crystal structure of the U1A spliceosomal protein complexed with its cognate RNA hairpin. *Nucleic Acids Symp. Ser.1-2.*
448. **Nagai, K., C. Oubridge, T. H. Jessen, J. Li, and P. R. Evans.** 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**:515-520.
449. **Nasim, M. T., T. K. Chernova, H. M. Chowdhury, B. G. Yue, and I. C. Eperon.** 2003. HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. *Hum. Mol. Genet.* **12**:1337-1348.
450. **Nasioulas, G., A. S. Zolotukhin, C. Taberner, L. Solomin, C. P. Cunningham, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1994. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J. Virol.* **68**:2986-2993.
451. **Navia, M. A. and B. M. McKeever.** 1990. A role for the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in the orchestration of virus assembly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **616**:73-85.
452. **Nayler, O., W. Stratling, J. P. Bourquin, I. Stagljar, L. Lindemann, H. Jasper, A. M. Hartmann, F. O. Fackelmayer, A. Ullrich, and S. Stamm.** 1998. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.* **26**:3542-3549.
453. **Nelissen, R. L., V. Heinrichs, W. J. Habets, F. Simons, R. Luhrmann, and W. J. van Venrooij.** 1991. Zinc finger-like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acids Res.* **19**:449-454.
454. **Nelissen, R. L., C. L. Will, W. J. van Venrooij, and R. Luhrmann.** 1994. The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1 snRNPs is mediated in part by common U snRNP proteins. *EMBO J.* **13**:4113-4125.
455. **Nesic, D. and A. Kramer.** 2001. Domains in human splicing factors SF3a60 and SF3a66 required for binding to SF3a120, assembly of the 17S U2 snRNP, and prespliceosome formation. *Mol. Cell Biol.* **21**:6406-6417.
456. **Neubauer, G., A. Gottschalk, P. Fabrizio, B. Seraphin, R. Luhrmann, and M. Mann.** 1997. Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:385-390.
457. **Newman, A. J. and C. Norman.** 1992. U5 snRNA interacts with exon sequences at 5' and 3' splice sites. *Cell* **68**:743-754.
458. **Nilsen, T. W.** 1998. RNA-RNA Interactions in Nuclear Pre-mRNA Splicing, p. 279-307. *In* R. W. Simons and M. Grunberg-Manago (eds.), *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
459. **Nilsen, T. W.** 2003. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* **25**:1147-1149.

460. **Nishi, K., M. Yoshida, D. Fujiwara, M. Nishikawa, S. Horinouchi, and T. Beppu.** 1994. Leptomycin B targets a regulatory cascade of crml1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**:6320-6324.
461. **Noble, S. M. and C. Guthrie.** 1996. Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics* **143**:67-80.
462. **O'Brien, T., S. Hardin, A. Greenleaf, and J. T. Lis.** 1994. Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* **370**:75-77.
463. **O'Keefe, R. T., C. Norman, and A. J. Newman.** 1996. The invariant U5 snRNA loop 1 sequence is dispensable for the first catalytic step of pre-mRNA splicing in yeast. *Cell* **86**:679-689.
464. **O'Reilly, M. M., M. T. McNally, and K. L. Beemon.** 1995. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* **213**:373-385.
465. **Ogert, R. A., L. H. Lee, and K. L. Beemon.** 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *J. Virol.* **70**:3834-3843.
466. **Ohno, M. and Y. Shimura.** 1996. A human RNA helicase-like protein, HRH1, facilitates nuclear export of spliced mRNA by releasing the RNA from the spliceosome. *Genes Dev.* **10**:997-1007.
467. **Olsen, H. S., A. W. Cochrane, and C. Rosen.** 1992. Interaction of cellular factors with intragenic cis-acting repressive sequences within the HIV genome. *Virology* **191**:709-715.
468. **Olsen, H. S., P. Nelbock, A. W. Cochrane, and C. A. Rosen.** 1990. Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA. *Science* **247**:845-848.
469. **Ono, Y., M. Ohno, and Y. Shimura.** 1994. Identification of a putative RNA helicase (HRH1), a human homolog of yeast Prp22. *Mol. Cell Biol.* **14**:7611-7620.
470. **Ortlepp, D., B. Lagerbauer, S. Mullner, T. Achsel, B. Kirschbaum, and R. Luhrmann.** 1998. The mammalian homologue of Prp16p is overexpressed in a cell line tolerant to Leflunomide, a new immunoregulatory drug effective against rheumatoid arthritis. *RNA.* **4**:1007-1018.
471. **Otteken, A. and B. Moss.** 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J. Biol. Chem.* **271**:97-103.
472. **Oubridge, C., N. Ito, P. R. Evans, C. H. Teo, and K. NAGAI.** 1994. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* **372**:432-438.
473. **Pacheco, T. R., A. Q. Gomes, N. L. Barbosa-Morais, V. Benes, W. Ansorge, M. Wollerton, C. W. Smith, J. Valcarcel, and M. Carmo-Fonseca.** 2004. Diversity of vertebrate splicing factor U2AF35: identification of alternatively spliced U2AF1 mRNAs. *J. Biol. Chem.* **279**:27039-27049.
474. **Padgett, R. A., P. J. Grabowski, M. M. Konarska, S. Seiler, and P. A. Sharp.** 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**:1119-50:1119-1150.
475. **Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy, and P. A. Sharp.** 1984. Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**:898-903.
476. **Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, R. Bendix, T. Dork, and F. E. Baralle.** 2002. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat. Genet.* **30**:426-429.
477. **Patel, N. A., C. E. Chalfant, J. E. Watson, J. R. Wyatt, N. M. Dean, D. C. Eichler, and D. R. Cooper.** 2001. Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a

- phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**:22648-22654.
478. **Patton, J. R. and T. Pederson.** 1988. The Mr 70,000 protein of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle binds to the 5' stem-loop of U1 RNA and interacts with Sm domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:747-751.
479. **Pavlakakis, G. N., S. Schwartz, D. M. Benko, C. M. Drysdale, L. Solomin, R. Robinson, J. Harrison, M. Campbell, and B. K. Felber.** 1991. Genome Organization and Regulation of HIV-1 Expression, p. 175-192. *In* W. A. Haseltine and F. Wong-Staal (eds.), *Genetic Structure and Regulation of HIV*. Raven Press, New York.
480. **Peled-Zehavi, H., J. A. Berglund, M. Rosbash, and A. D. Frankel.** 2001. Recognition of RNA branch point sequences by the KH domain of splicing factor 1 (mammalian branch point binding protein) in a splicing factor complex. *Mol. Cell Biol.* **21**:5232-5241.
481. **Perez, I., J. G. McAfee, and J. G. Patton.** 1997. Multiple RRM domains contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry* **36**:11881-11890.
482. **Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2**:256-263.
483. **Peterson, R. D., D. P. Bartel, J. W. Szostak, S. J. Horvath, and J. Feigon.** 1994. 1H NMR studies of the high-affinity Rev binding site of the Rev responsive element of HIV-1 mRNA: base pairing in the core binding element. *Biochemistry* **33**:5357-5366.
484. **Peyret, N., P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, and J. SantaLucia, Jr.** 1999. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry* **38**:3468-3477.
485. **Philipps, D., A. M. Celotto, Q. Q. Wang, R. S. Tarng, and B. R. Graveley.** 2003. Arginine/serine repeats are sufficient to constitute a splicing activation domain. *Nucleic Acids Res.* **31**:6502-6508.
486. **Platzer, M., G. Rotman, D. Bauer, T. Uziel, K. Savitsky, A. Bar-Shira, S. Gilad, Y. Shiloh, and A. Rosenthal.** 1997. Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene. *Genome Res.* **7**:592-605.
487. **Pomerantz, R. J., T. Seshamma, and D. Trono.** 1992. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J. Virol.* **66**:1809-1813.
488. **Powell, D. M., M. C. Amaral, J. Y. Wu, T. Maniatis, and W. C. Greene.** 1997. HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev responsive element: Possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:973-978.
489. **Prasad, J., K. Colwill, T. Pawson, and J. L. Manley.** 1999. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol. Cell Biol.* **19**:6991-7000.
490. **Proudfoot, N. J., A. Furger, and M. J. Dye.** 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**:501-512.
491. **Puig, O., A. Gottschalk, P. Fabrizio, and B. Seraphin.** 1999. Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.* **13**:569-580.
492. **Purcell, D. F. and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-6378.
493. **Query, C. C., R. C. Bentley, and J. D. Keene.** 1989. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* **57**:89-101.

494. **Raghunathan, P. L. and C. Guthrie.** 1998. RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.* **8**:847-855.
495. **Ramchatesingh, J., A. M. Zahler, K. M. Neugebauer, M. B. Roth, and T. A. Cooper.** 1995. A subset of SR proteins activates splicing of the cardiac troponin T alternative exon by direct interactions with an exonic enhancer. *Mol. Cell Biol.* **15**:4898-4907.
496. **Rappsilber, J., U. Ryder, A. I. Lamond, and M. Mann.** 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* **12**:1231-1245.
497. **Reed, R.** 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**:215-220.
498. **Reed, R.** 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:340-345.
499. **Reed, R., J. Griffith, and T. Maniatis.** 1988. Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell* **53**:949-961.
500. **Reed, R. and E. Hurt.** 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**:523-531.
501. **Reichert, V. L., H. Le Hir, M. S. Jurica, and M. J. Moore.** 2002. 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev.* **16**:2778-2791.
502. **Reitter, J. N., R. E. Means, and R. C. Desrosiers.** 1998. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **4**:679-684.
503. **Rexach, M. and G. Blobel.** 1995. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**:683-692.
504. **Richard, N., S. Iacampo, and A. Cochrane.** 1994. HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm. *Virology* **204**:123-131.
505. **Richman, D. D.** 2001. HIV chemotherapy. *Nature* **410**:995-1001.
506. **Rio, D. C.** 1993. Splicing of pre-mRNA: mechanism, regulation and role in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**:574-584.
507. **Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski.** 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-1953.
508. **Robberson, B. L., G. J. Cote, and S. M. Berget.** 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell Biol.* **10**:84-94.
509. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-1173.
510. **Rogozin, I. B. and L. Milanesi.** 1997. Analysis of donor splice sites in different eukaryotic organisms. *J. Mol. Evol.* **45**:50-59.
511. **Romfo, C. M., C. J. Alvarez, W. J. van Heeckeren, C. J. Webb, and J. A. Wise.** 2000. Evidence for splice site pairing via intron definition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **20**:7955-7970.
512. **Rooke, N., V. Markovtsov, E. Cagavi, and D. L. Black.** 2003. Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. *Mol. Cell Biol.* **23**:1874-1884.

513. **Ropers, D., L. Ayadi, R. Gattoni, S. Jacquenet, L. Damier, C. Branlant, and J. Stevenin.** 2004. Differential effects of the SR proteins 9G8, SC35, ASF/SF2, and SRp40 on the utilization of the A1 to A5 splicing sites of HIV-1 RNA. *J. Biol. Chem.* **279**:29963-29973.
514. **Roscigno, R. F. and M. A. Garcia-Blanco.** 1995. SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA.* **1**:692-706.
515. **Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:2071-2075.
516. **Rossi, F., E. Labourier, T. Forne, G. Divita, J. Derancourt, J. F. Riou, E. Antoine, G. Cathala, C. Brunel, and J. Tazi.** 1996. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**:80-82.
517. **Roth, M. B., A. M. Zahler, and J. A. Stolk.** 1991. A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* **115**:587-596.
518. **Roy, J., K. Kim, J. R. Maddock, J. G. Anthony, and J. L. Woolford, Jr.** 1995. The final stages of spliceosome maturation require Spp2p that can interact with the DEAH box protein Prp2p and promote step 1 of splicing. *RNA.* **1**:375-390.
519. **Ruby, S. W. and J. Abelson.** 1988. An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science* **242**:1028-1035.
520. **Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis, and M. R. Green.** 1984. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre- mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**:317-331.
521. **Ryu, W. S. and J. E. Mertz.** 1989. Simian virus 40 late transcripts lacking excisable intervening sequences are defective in both stability in the nucleus and transport to the cytoplasm. *J. Virol.* **63**:4386-4394.
522. **Salfeld, J., H. G. Gottlinger, R. A. Sia, R. E. Park, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J.* **9**:965-970.
523. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
524. **Sandoval, N., M. Platzer, A. Rosenthal, T. Dork, R. Bendix, B. Skawran, M. Stuhmann, R. D. Wegner, K. Sperling, S. Banin, Y. Shiloh, A. Baumer, U. Bernthaler, H. Sennfelder, M. Brohm, B. H. Weber, and D. Schindler.** 1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum. Mol. Genet.* **8**:69-79.
525. **Sanford, J. R., N. K. Gray, K. Beckmann, and J. F. Caceres.** 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev.* **18**:755-768.
526. **Sanford, J. R., D. Longman, and J. F. Caceres.** 2003. Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **31**:33-58.
527. **Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Poignard.** 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* **67**:7383-7393.
528. **Saunders, L. R., V. Jurecic, and G. N. Barber.** 2001. The 90- and 110-kDa human NFAR proteins are translated from two differentially spliced mRNAs encoded on chromosome 19p13. *Genomics* **71**:256-259.
529. **Saunders, L. R., D. J. Perkins, S. Balachandran, R. Michaels, R. Ford, A. Mayeda, and G. N. Barber.** 2001. Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* **276**:32300-32312.

530. **Saviozzi, S., A. Saluto, M. Piane, S. Prudente, N. Migone, M. DeMarchi, A. Brusco, and L. Chessa.** 2003. Six novel ATM mutations in Italian patients with classical ataxia-telangiectasia. *Hum. Mutat.* **21**:450.
531. **Schaal, H., M. Klein, P. Gehrman, O. Adams, and A. Scheid.** 1995. Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J. Virol.* **69**:3308-3314.
532. **Schaal, H., P. Pfeiffer, M. Klein, P. Gehrman, and A. Scheid.** 1993. Use of DNA end joining activity of a *Xenopus laevis* egg extract for construction of deletions and expression vectors for HIV-1 Tat and Rev proteins. *Gene* **124**:275-280.
533. **Schaal, T. D. and T. Maniatis.** 1999. Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* **19**:261-273.
534. **Schaal, T. D. and T. Maniatis.** 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell Biol.* **19**:1705-1719.
535. **Scherly, D., W. Boelens, W. J. van Venrooij, N. A. Dathan, J. Hamm, and I. W. Mattaj.** 1989. Identification of the RNA binding segment of human U1 A protein and definition of its binding site on U1 snRNA. *EMBO J.* **8**:4163-4170.
536. **Schneider, S., E. Campodonico, and B. Schwer.** 2004. Motifs IV and V in the DEAH box splicing factor Prp22 are important for RNA unwinding, and helicase-defective Prp22 mutants are suppressed by Prp8. *J. Biol. Chem.* **279**:8617-8626.
537. **Schwartz, S., B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:2519-2529.
538. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**:5448-5456.
539. **Schwer, B.** 2001. A new twist on RNA helicases: DExH/D box proteins as RNPs. *Nat. Struct. Biol.* **8**:113-116.
540. **Schwer, B. and C. H. Gross.** 1998. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**:2086-2094.
541. **Schwer, B. and C. Guthrie.** 1991. PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature* **349**:494-499.
542. **Schwer, B. and C. Guthrie.** 1992. A conformational rearrangement in the spliceosome is dependent on PRP16 and ATP hydrolysis. *EMBO J.* **11**:5033-5039.
543. **Sciabica, K. S., Q. J. Dai, and R. M. Sandri-Goldin.** 2003. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J.* **22**:1608-1619.
544. **Screaton, G. R., J. F. Caceres, A. Mayeda, M. V. Bell, M. Plebanski, D. G. Jackson, J. I. Bell, and A. R. Krainer.** 1995. Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *EMBO J.* **14**:4336-4349.
545. **Selden, R. F., K. B. Howie, M. E. Rowe, H. M. Goodman, and D. D. Moore.** 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell Biol.* **6**:3173-3179.
546. **Selenko, P., G. Gregorovic, R. Sprangers, G. Stier, Z. Rhani, A. Kramer, and M. Sattler.** 2003. Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. *Mol. Cell* **11**:965-976.

547. **Selvakumar, M. and D. M. Helfman.** 1999. Exonic splicing enhancers contribute to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA. *RNA*. **5**:378-394.
548. **Senapathy, P., M. B. Shapiro, and N. L. Harris.** 1990. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol.* **183**:252-278.
549. **Seraphin, B. and M. Rosbash.** 1989. Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing. *Cell* **59**:349-358.
550. **Shahied-Milam, L., S. R. Soltaninassab, G. V. Iyer, and W. M. LeSturgeon.** 1998. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C protein tetramer binds U1, U2, and U6 snRNAs through its high affinity RNA binding domain (the bZIP-like motif). *J. Biol. Chem.* **273**:21359-21367.
551. **Shapiro, M. B. and P. Senapathy.** 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* **15**:7155-7174.
552. **Sharp, P. A.** 1987. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* **235**:766-771.
553. **Shatkin, A. J. and J. L. Manley.** 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* **7**:838-842.
554. **Shen, H., J. L. Kan, and M. R. Green.** 2004. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol. Cell* **13**:367-376.
555. **Shevchenko, A., I. Chernushevich, M. Wilm, and M. Mann.** 2000. De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods Mol. Biol.* **146**:1-16.
556. **Shin, C. and J. L. Manley.** 2002. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* **111**:407-417.
557. **Shomron, N., M. Reznik, and G. Ast.** 2004. Splicing Factor hSlu7 Contains a Unique Functional Domain Required to Retain the Protein within the Nucleus. *Mol. Biol. Cell* **15**:3782-3795.
558. **Shulman, N. and M. Winters.** 2003. A review of HIV-1 resistance to the nucleoside and nucleotide inhibitors. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **3**:273-281.
559. **Si, Z. H., B. A. Amendt, and C. M. Stoltzfus.** 1997. Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon. *Nucleic. Acids. Res.* **25**:861-867.
560. **Si, Z. H., D. Rauch, and C. M. Stoltzfus.** 1998. The exon splicing silencer in human immunodeficiency virus type 1 Tat exon 3 is bipartite and acts early in spliceosome assembly. *Mol. Cell Biol.* **18**:5404-5413.
561. **Siatecka, M., J. L. Reyes, and M. M. Konarska.** 1999. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev.* **13**:1983-1993.
562. **Sierakowska, H., L. Gorman, S. H. Kang, and R. Kole.** 2000. Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing. *Methods Enzymol.* **313**:506-521.
563. **Sillekens, P. T., R. P. Beijer, W. J. Habets, and W. J. van Venrooij.** 1988. Human U1 snRNP-specific C protein: complete cDNA and protein sequence and identification of a multigene family in mammals. *Nucleic Acids Res.* **16**:8307-8321.
564. **Sillekens, P. T., W. J. Habets, R. P. Beijer, and W. J. van Venrooij.** 1987. cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A protein: extensive homology between U1 and U2 snRNP-specific proteins. *EMBO J.* **6**:3841-3848.

565. **Singh, N. N., E. J. Androphy, and R. N. Singh.** 2004. An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**:381-388.
566. **Siomi, H., M. Choi, M. C. Siomi, R. L. Nussbaum, and G. Dreyfuss.** 1994. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**:33-39.
567. **Siomi, H., M. J. Matunis, W. M. Michael, and G. Dreyfuss.** 1993. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* **21**:1193-1198.
568. **Sirand-Pugnet, P., P. Durosay, E. Brody, and J. Marie.** 1995. An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:3501-3507.
569. **Smith, C. A., S. Crotty, Y. Harada, and A. D. Frankel.** 1998. Altering the Context of an RNA Bulge Switches the Binding Specificities of Two Viral Tat Proteins. *Biochemistry* **37**:10808-10814.
570. **Smith, C. W. and J. Valcarcel.** 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**:381-388.
571. **Solovyev, V. V., A. A. Salamov, and C. B. Lawrence.** 1994. Predicting internal exons by oligonucleotide composition and discriminant analysis of spliceable open reading frames. *Nucleic Acids Res.* **22**:5156-5163.
572. **Sontheimer, E. J., P. M. Gordon, and J. A. Piccirilli.** 1999. Metal ion catalysis during group II intron self-splicing: parallels with the spliceosome. *Genes Dev.* **13**:1729-1741.
573. **Sorek, R., G. Lev-Maor, M. Reznik, T. Dagan, F. Belinky, D. Graur, and G. Ast.** 2004. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in alu exons. *Mol. Cell* **14**:221-231.
574. **Soret, J., R. Gattoni, C. Guyon, A. Sureau, M. Popielarz, E. Le Rouzic, S. Dumon, F. Apiou, B. Dutrillaux, H. Voss, W. Ansorge, J. Stevenin, and B. Perbal.** 1998. Characterization of SRp46, a novel human SR splicing factor encoded by a PR264/SC35 retropseudogene. *Mol. Cell Biol.* **18**:4924-4934.
575. **Soulard, M., V. Della, V. M. C. Siomi, S. Pinol-Roma, P. Codogno, C. Bauvy, M. Bellini, J. C. Lacroix, G. Monod, G. Dreyfuss, and .** 1993. hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **21**:4210-4217.
576. **Southby, J., C. Gooding, and C. W. Smith.** 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol. Cell Biol.* **19**:2699-2711.
577. **Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson, and K. A. Johnson.** 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**:988-993.
578. **Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie, and K. Weis.** 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041-1050.
579. **Staden, R.** 1984. Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res.* **12**:505-519.
580. **Staffa, A. and A. Cochrane.** 1994. The tat/rev intron of human immunodeficiency virus type 1 is inefficiently spliced because of suboptimal signals in the 3' splice site. *J. Virol.* **68**:3071-3079.
581. **Staffa, A. and A. Cochrane.** 1995. Identification of positive and negative splicing regulatory elements within the terminal tat-rev exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **15**:4597-4605.

582. **Staknis, D. and R. Reed.** 1994. SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell Biol.* **14**:7670-7682.
583. **Staley, J. P. and C. Guthrie.** 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**:315-326.
584. **Staley, J. P. and C. Guthrie.** 1999. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol. Cell* **3**:55-64.
585. **Stark, H., P. Dube, R. Luhrmann, and B. Kastner.** 2001. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409**:539-542.
586. **Stark, J. M., D. P. Bazett-Jones, M. Herfort, and M. B. Roth.** 1998. SR proteins are sufficient for exon bridging across an intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:2163-2168.
587. **Stauber, R. H., E. Afonina, S. Gulnik, J. Erickson, and G. N. Pavlakis.** 1998. Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* **251**:38-48.
588. **Stein, B. S. and E. G. Engleman.** 1990. 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.* **265**:2640-2649.
589. **Stephens, R. M. and T. D. Schneider.** 1992. Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites. *J. Mol. Biol.* **228**:1124-1136.
590. **Sterner, D. A., T. Carlo, and S. M. Berget.** 1996. Architectural limits on split genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:15081-15085.
591. **Stevens, S. W., D. E. Ryan, H. Y. Ge, R. E. Moore, M. K. Young, T. D. Lee, and J. Abelson.** 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell* **9**:31-44.
592. **Stickeler, E., S. D. Fraser, A. Honig, A. L. Chen, S. M. Berget, and T. A. Cooper.** 2001. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J.* **20**:3821-3830.
593. **Stoilov, P., E. Meshorer, M. Gencheva, D. Glick, H. Soreq, and S. Stamm.** 2002. Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases. *DNA Cell Biol.* **21**:803-818.
594. **Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-730.
595. **Stutz, F. and E. Izaurralde.** 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.* **13**:319-327.
596. **Stutz, F. and M. Rosbash.** 1994. A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *EMBO J.* **13**:4096-4104.
597. **Suh, D., B. Seguin, S. Atkinson, B. Ozdamar, A. Staffa, A. Emili, A. Mouland, and A. Cochrane.** 2003. Mapping of determinants required for the function of the HIV-1 env nuclear retention sequence. *Virology* **310**:85-99.
598. **Sun, H. and L. A. Chasin.** 2000. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol. Cell Biol.* **20**:6414-6425.
599. **Sun, Q., A. Mayeda, R. K. Hampson, A. R. Krainer, and F. M. Rottman.** 1993. General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* **7**:2598-2608.

600. **Surowy, C. S., V. L. van Santen, S. M. Scheib-Wixted, and R. A. Spritz.** 1989. Direct, sequence-specific binding of the human U1-70K ribonucleoprotein antigen protein to loop I of U1 small nuclear RNA. *Mol. Cell Biol.* **9**:4179-4186.
601. **Swanson, A. K. and C. M. Stoltzfus.** 1998. Overlapping cis sites used for splicing of HIV-1 env/nef and rev mRNAs. *J. Biol. Chem.* **273**:34551-34557.
602. **Tacke, R., Y. Chen, and J. L. Manley.** 1997. Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:1148-1153.
603. **Tacke, R. and J. L. Manley.** 1995. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J.* **14**:3540-3551.
604. **Tacke, R. and J. L. Manley.** 1999. Determinants of SR protein specificity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:358-362.
605. **Talerico, M. and S. M. Berget.** 1994. Intron definition in splicing of small Drosophila introns. *Mol. Cell Biol.* **14**:3434-3445.
606. **Tan, R., L. Chen, J. A. Buettner, D. Hudson, and A. D. Frankel.** 1993. RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* **73**:1031-1040.
607. **Tanaka, K., A. Watakabe, and Y. Shimura.** 1994. Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol. Cell Biol.* **14**:1347-1354.
608. **Tang, Z., N. F. Kaufer, and R. J. Lin.** 2002. Interactions between two fission yeast serine/arginine-rich proteins and their modulation by phosphorylation. *Biochem. J.* **368**:527-534.
609. **Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, and J. Kjems.** 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J.* **20**:5748-5758.
610. **Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, and J. Kjems.** 2001. The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J.* **20**:5748-5758.
611. **Tange, T. O., T. H. Jensen, and J. Kjems.** 1996. In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J. Biol. Chem.* **271**:10066-10072.
612. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1994. SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. *Genes Dev.* **8**:2704-2717.
613. **Teigelkamp, S., M. McGarvey, M. Plumpton, and J. D. Beggs.** 1994. The splicing factor PRP2, a putative RNA helicase, interacts directly with pre-mRNA. *EMBO J.* **13**:888-897.
614. **Teigelkamp, S., C. Mundt, T. Achsel, C. L. Will, and R. Luhrmann.** 1997. The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *RNA.* **3**:1313-1326.
615. **Teigelkamp, S., E. Whittaker, and J. D. Beggs.** 1995. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.* **23**:320-326.
616. **Temsamani, J. and T. Pederson.** 1996. The C-group heterogeneous nuclear ribonucleoprotein proteins bind to the 5' stem-loop of the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle. *J. Biol. Chem.* **271**:24922-24926.
617. **Teraoka, S. N., M. Telatar, S. Becker-Catania, T. Liang, S. Onengut, A. Tolun, L. Chessa, O. Sanal, E. Bernatowska, R. A. Gatti, and P. Concannon.** 1999. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am. J. Hum. Genet.* **64**:1617-1631.

618. **Thanaraj, T. A. and F. Clark.** 2001. Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res.* **29**:2581-2593.
619. **Thomas, S. L., M. Oft, H. Jaksche, G. Casari, P. Heger, M. Dobrovnik, D. Bevec, and J. Hauber.** 1998. Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J. Virol.* **72**:2935-2944.
620. **Tian, H. and R. Kole.** 1995. Selection of novel exon recognition elements from a pool of random sequences. *Mol. Cell Biol.* **15**:6291-6298.
621. **Tian, M. and T. Maniatis.** 1992. Positive control of pre-mRNA splicing in vitro. *Science* **256**:237-240.
622. **Tian, M. and T. Maniatis.** 1994. A splicing enhancer exhibits both constitutive and regulated activities. *Genes Dev.* **8**:1703-1712.
623. **Tiley, L. S., M. H. Malim, H. K. Tewary, P. G. Stockley, and B. R. Cullen.** 1992. Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Mar 1;89(5):1997]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:758-762.
624. **Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:184-187.
625. **Truant, R. and B. R. Cullen.** 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell Biol.* **19**:1210-1217.
626. **Tuerk, C. and L. Gold.** 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**:505-510.
627. **Ugolini, S., M. Moulard, I. Mondor, N. Barois, D. Demandolx, J. Hoxie, A. Brelot, M. Alizon, J. Davoust, and Q. J. Sattentau.** 1997. HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J. Immunol.* **159**:3000-3008.
628. **Umen, J. G. and C. Guthrie.** 1995. A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes Dev.* **9**:855-868.
629. **Umen, J. G. and C. Guthrie.** 1996. Mutagenesis of the yeast gene PRP8 reveals domains governing the specificity and fidelity of 3' splice site selection. *Genetics* **143**:723-739.
630. **Valadkhan, S. and J. L. Manley.** 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* **413**:701-707.
631. **Valadkhan, S. and J. L. Manley.** 2002. Intrinsic metal binding by a spliceosomal RNA. *Nat. Struct. Biol.* **9**:498-499.
632. **Valadkhan, S. and J. L. Manley.** 2003. Characterization of the catalytic activity of U2 and U6 snRNAs. *RNA.* **9**:892-904.
633. **Vellard, M., A. Sureau, J. Soret, C. Martinerie, and B. Perbal.** 1992. A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the trans-spliced c-myc exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:2511-2515.
634. **Venables, J. P., D. J. Elliott, O. V. Makarova, E. M. Makarov, H. J. Cooke, and I. C. Eperon.** 2000. RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum. Mol. Genet.* **9**:685-694.

635. Venkatesh, L. K. and G. Chinnadurai. 1990. Mutants in a conserved region near the carboxy-terminus of HIV-1 Rev identify functionally important residues and exhibit a dominant negative phenotype. *Virology* **178**:327-330.
636. Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, F. Di, V. P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, and M. Nodell. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.
637. Villa, T., J. A. Pleiss, and C. Guthrie. 2002. Spliceosomal snRNAs: Mg(2+)-dependent chemistry at the catalytic core? *Cell* **109**:149-152.
638. Wagner, E. and J. Lykke-Andersen. 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* **115**:3033-3038.
639. Wan, L., J. K. Kim, V. W. Pollard, and G. Dreyfuss. 2001. Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1. *J. Biol. Chem.* **276**:7681-7688.
640. Wang, H. Y., W. Lin, J. A. Dyck, J. M. Yeakley, Z. Songyang, L. C. Cantley, and X. D. Fu. 1998. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **140**:737-750.
641. Wang, Y. and R. R. Rando. 1995. Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem. Biol.* **2**:281-290.
642. Wang, Z., H. M. Hoffmann, and P. J. Grabowski. 1995. Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity. *RNA*. **1**:21-35.
643. Watakabe, A., K. Tanaka, and Y. Shimura. 1993. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* **7**:407-418.

644. **Weg-Remers, S., H. Ponta, P. Herrlich, and H. Konig.** 2001. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J.* **20**:4194-4203.
645. **Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones.** 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-462.
646. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 [see comments]. *Nature* **387**:426-430.
647. **Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor.** 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**:463-473.
648. **Wentz, M. P., B. E. Moore, M. W. Cloyd, S. M. Berget, and L. A. Donehower.** 1997. A naturally arising mutation of a potential silencer of exon splicing in human immunodeficiency virus type 1 induces dominant aberrant splicing and arrests virus production. *J. Virol.* **71**:8542-8551.
649. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 2001. Molecular biology. RNP remodeling with DEXH/D boxes. *Science* **291**:1916-1917.
650. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:290-301.
651. **Will, C. L., C. Schneider, A. M. MacMillan, N. F. Katopodis, G. Neubauer, M. Wilm, R. Luhrmann, and C. C. Query.** 2001. A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J.* **20**:4536-4546.
652. **Will, C. L., H. Urlaub, T. Achsel, M. Gentzel, M. Wilm, and R. Luhrmann.** 2002. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J.* **21**:4978-4988.
653. **Witvrouw, M., B. Van Maele, J. Vercammen, A. Hantson, Y. Engelborghs, E. De Clercq, C. Pannecouque, and Z. Debyser.** 2004. Novel inhibitors of HIV-1 integration. *Curr. Drug Metab* **5**:291-304.
654. **Wolff, B., J. J. Sanglier, and Y. Wang.** 1997. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**:139-147.
655. **Woppmann, A., T. Patschinsky, P. Bringmann, F. Godt, and R. Luhrmann.** 1990. Characterisation of human and murine snRNP proteins by two-dimensional gel electrophoresis and phosphopeptide analysis of U1-specific 70K protein variants. *Nucleic Acids Res.* **18**:4427-4438.
656. **Woppmann, A., C. L. Will, U. Kornstadt, P. Zuo, J. L. Manley, and R. Luhrmann.** 1993. Identification of an snRNP-associated kinase activity that phosphorylates arginine/serine rich domains typical of splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**:2815-2822.
657. **Wu, J. Y. and T. Maniatis.** 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**:1061-1070.
658. **Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:179-183.
659. **Wu, S., C. M. Romfo, T. W. Nilsen, and M. R. Green.** 1999. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**:832-835.
660. **Wyatt, J. R., E. J. Sontheimer, and J. A. Steitz.** 1992. Site-specific cross-linking of mammalian U5 snRNP to the 5' splice site before the first step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **6**:2542-2553.

661. **Xiao, S. H. and J. L. Manley.** 1997. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.* **11**:334-344.
662. **Xiao, S. H. and J. L. Manley.** 1998. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**:6359-6367.
663. **Xu, R., J. Teng, and T. A. Cooper.** 1993. The cardiac troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element. *Mol. Cell Biol.* **13**:3660-3674.
664. **Yang, X., M. R. Bani, S. J. Lu, S. Rowan, Y. Ben David, and B. Chabot.** 1994. The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:6924-6928.
665. **Yang, X., M. Farzan, R. Wyatt, and J. Sodroski.** 2000. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **74**:5716-5725.
666. **Yeakley, J. M., J. P. Morfin, M. G. Rosenfeld, and X. D. Fu.** 1996. A complex of nuclear proteins mediates SR protein binding to a purine-rich splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:7582-7587.
667. **Yeakley, J. M., H. Tronchere, J. Olesen, J. A. Dyck, H. Y. Wang, and X. D. Fu.** 1999. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Biol.* **145**:447-455.
668. **Yean, S. L., G. Wuenschell, J. Termini, and R. J. Lin.** 2000. Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature* **408**:881-884.
669. **Yoshida, T., Y. Makino, and T. Tamura.** 1999. Association of the rat heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein F with TATA-binding protein. *FEBS Lett.* **457**:251-254.
670. **Zahler, A. M., C. K. Damgaard, J. Kjems, and M. Caputi.** 2004. SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing. *J. Biol. Chem.* **279**:10077-10084.
671. **Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth.** 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* **6**:837-847.
672. **Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, W. S. Lane, and M. B. Roth.** 1993. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**:219-222.
673. **Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, J. A. Stolk, and M. B. Roth.** 1993. Human SR proteins and isolation of a cDNA encoding SRp75. *Mol. Cell Biol.* **13**:4023-4028.
674. **Zahler, A. M. and M. B. Roth.** 1995. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:2642-2646.
675. **Zapp, M. L. and M. R. Green.** 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-716.
676. **Zapp, M. L., T. J. Hope, T. G. Parslow, and M. R. Green.** 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7734-7738.
677. **Zemmel, R. W., A. C. Kelley, J. Karn, and P. J. Butler.** 1996. Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J. Mol. Biol.* **258**:763-777.
678. **Zhang, D. and M. Rosbash.** 1999. Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex. *Genes Dev.* **13**:581-592.

679. **Zhang, L. and C. M. Stoltzfus.** 1995. A suboptimal src 3' splice site is necessary for efficient replication of Rous sarcoma virus. *Virology* **206**:1099-1107.
680. **Zhang, M. Q. and T. G. Marr.** 1993. A weight array method for splicing signal analysis. *Comput. Appl. Biosci.* **9**:499-509.
681. **Zhang, W. J. and J. Y. Wu.** 1996. Functional properties of p54, a novel SR protein active in constitutive and alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **16**:5400-5408.
682. **Zhang, X. H. and L. A. Chasin.** 2004. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev.* **18**:1241-1250.
683. **Zheng, Z. M., M. Huynen, and C. C. Baker.** 1998. A pyrimidine-rich exonic splicing suppressor binds multiple RNA splicing factors and inhibits spliceosome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:14088-14093.
684. **Zhou, N., J. Fang, M. Mukhtar, E. Acheampong, and R. J. Pomerantz.** 2004. Inhibition of HIV-1 fusion with small interfering RNAs targeting the chemokine coreceptor CXCR4. *Gene Ther.*
685. **Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi, and R. Reed.** 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**:182-185.
686. **Zhou, Z., M. J. Luo, K. Straesser, J. Katahira, E. Hurt, and R. Reed.** 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**:401-405.
687. **Zhou, Z. and R. Reed.** 1998. Human homologs of yeast prp16 and prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**:2095-2106.
688. **Zhu, J., A. Mayeda, and A. R. Krainer.** 2001. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol. Cell* **8**:1351-1361.
689. **Zhu, Y., Pe, J. Peng, Y. Ramanathan, N. Marshall, T. Marshall, B. Amendt, M. B. Mathews, and D. H. Price.** 1997. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* **11**:2622-2632.
690. **Zhuang, Y. and A. M. Weiner.** 1986. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**:827-835.
691. **Zolotukhin, A. S. and B. K. Felber.** 1999. Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J. Virol.* **73**:120-127.
692. **Zuo, P. and T. Maniatis.** 1996. The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev.* **10**:1356-1368.

Publikationen

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in Fachzeitschriften publiziert.

Originalpublikationen:

Kammler, S., C. Leurs, M. Freund, J. Krummheuer, K. Seidel, T. O. Tange, M. K. Lund, J. Kjems, A. Scheid, and H. Schaal. 2001. The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA. *RNA*. **7**:421-434.

Koller, H., H. Schaal, M. Freund, S. R. Garrido, H. J. von Giesen, M. Ott, C. Rosenbaum, and G. Arendt. 2001. HIV-1 protein Tat reduces the glutamate-induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **14**:1793-1799.

Freund, M., C. Asang, S. Kammler, C. Konermann, J. Krummheuer, M. Hipp, I. Meyer, W. Gierling, S. Theiss, T. Preuss, D. Schindler, J. Kjems, and H. Schaal. 2003. A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res.* **31**:6963-6975.

Caputi, M., M. Freund, S. Kammler, C. Asang, and H. Schaal. 2004. A bidirectional SF2/ASF- and SRp40-dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression. *J. Virol.* **78**:6517-6526.

Freund, M., M. J. Hicks, C. Konermann, M. Hipp, K. J. Hertel and H. Schaal. Splicing efficiency is not limited through extended base-pairing interaction between U1 snRNA and the 5' splice site. (in Vorbereitung)

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits auf Tagungen vorgestellt.

Poster:

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, NY, 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

Kammler S., Stosik M., Freund M., Meyer I., Kjems J., Schaal H. Intrinsic differences in 5' and 3' splice site requirements for HIV-1 Rev response.

Retroviruses, Cold Spring Harbor, New York, NY, 21-26/05/2002

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

8th Annual Meeting of the RNA Society, Wien, 01-06/06/2003

Neveling K., Kammler S., Konermann C., Asang C., Freund M., Hipp M., Meyer I., Peabody D., Schaal H. Splice site networking: A dynamic model of exon recognition.

9th Annual Meeting of the RNA Society, Madison, WI, 01-06/06/2004

Lebenslauf

Marcel Freund

Dienstanschrift: Institut für Virologie
 Universitätsklinikum Düsseldorf
 Universitätsstr. 1
 40225 Düsseldorf
 Tel.: (0049)-211 81 12394
 e-mail: Marcel_Freund@yahoo.de
 Privatanschrift: Gartenstr. 43
 40479 Düsseldorf

Persönliche Daten:

Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 04.03.1973
Geburtsort: Düsseldorf

Ausbildung:

WS 1994 - SS 2000 **Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Vordiplom 15/10/1996
 Diplom 02/05/2000

Diplomthema: *Cis*-wirkende Sequenzelemente in der HIV-1 *env*-Expression
 ausgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie;
 AG Prof. Dr. Andreas Scheid.

WS 2000 - WS 2004 **Promotionsstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Promotionsthema: Die Funktion des U1 snRNPs in der HIV-1 *env*-Expression;
 ausgeführt am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf;
 AG (Prof. Dr. Andreas Scheid, †), Prof. Dr. Heiner Schaal

Berufliche Tätigkeiten:

01/2001-04/2001 **Kurzzeit-Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds**
 Gastaufenthalt an der Universität Aarhus, Dänemark,
 Institut für Molekulare Biologie, AG Prof. Dr. Jorgen Kjems

04/2001-04/2003 **Promotions-Stipendium der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation**

04/2003-07/2003 **Förderung durch die Heinz-Ansmann-Stiftung**

07/2003-2004 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie,
 Universitätsklinikum Düsseldorf im Rahmen der Promotionsarbeit**