

Identifizierung von *cis*-wirkenden Sequenzen in den
alternativen HIV-1 Leaderexons und ihre funktionelle
Bedeutung für die Spleißregulation

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

zur

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

vorgelegt von

Marianne Otte

aus Oberhausen

Düsseldorf

2006

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

Referenten: Prof. Dr. H. Schaal
Prof. Dr. C. Hollenberg

Tag der mündl. Prüfung: 01.02.2006

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 06.01. 2006

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	VI
Abkürzungen	VIII
Einheiten	X
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)	1
1.1.1 Struktur des Virus.....	2
1.1.2 Replikationszyklus	4
1.1.3 Charakterisierung der HIV-1 Genexpression.....	5
1.1.3.1 Genomaufbau	5
1.1.3.2 Transaktivierung durch das Tat-Protein.....	5
1.1.3.3 Die posttranskriptionelle Regulation durch Rev	7
1.2 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNAs	8
1.2.1 Die Assemblierung des Spleißosoms	9
1.2.1.1 Die Erkennung der 5' und 3' Spleißstellen	11
1.2.1.2 Der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs und die Transester-Reaktionen.....	12
1.2.1.3 Der nukleocytoplasmatische Export.....	13
1.3 Spleißregulierende Sequenzen und <i>trans</i> -wirkende Faktoren.....	16
1.3.1 Die SR-Proteinfamilie und SR-ähnliche Proteine	16
1.3.2 Die hnRNP-Proteinfamilie	21
1.3.3 Identifizierung spleißregulierender Sequenzen.....	25
1.3.4 Spleißregulierende Elemente im HIV-1 Genom	28
1.4 Die Leaderexons 2 und 3 in den HIV-1 mRNAs	30
1.5 RNA-Stabilität.....	30
1.6 Zielsetzung	34
2 Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Chemikalien und Medien	37
2.1.2 Restriktionsendonukleasen.....	37
2.1.3 E.coli-Stämme	37
2.1.4 Zellkultur.....	37
2.1.5 Oligonukleotide.....	38
2.1.6 Rekombinante Plasmide.....	38
2.1.7 RNA-Expressionsvektoren.....	38
2.1.7.1 Ein-Intron Vektoren mit intronisierten Exonsequenzen.....	39
2.1.7.2 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2	39
2.1.7.3 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2	40
2.1.7.4 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 3	41
2.1.7.5 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 3	41
2.1.7.6 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 23	42
2.1.7.7 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2 und 3	42
2.1.7.8 Vier-Exon-drei-Intron Vektoren	42
2.1.8 <i>Env</i> -Expressionsvektoren.....	43
2.1.9 Plasmide zur Kotransfektion	44

2.1.10	Plasmide für die <i>in vitro</i> Transkription	45
2.1.11	Plasmide zur Kontrolle der Kern-/Cytoplasma Aufreinigung.....	45
2.1.12	Primer für die PCR.....	46
2.1.12.1	Primer für die Spleißreihenfolge	46
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Klonierung rekombinanter Plasmide.....	47
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
2.2.1.2	Restriktion und Aufreinigung von Plasmidfragmenten über Low melt Gelelektrophorese.....	47
2.2.1.3	Ligation	48
2.2.1.4	Nahtlose Ligation	48
2.2.1.5	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien mit Rubidium-Chlorid	49
2.2.1.6	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	49
2.2.2	Analytische Präparation von Plasmid-DNA	49
2.2.3	Präparative Plasmid-Isolierung	50
2.2.4	Zellkultur.....	50
2.2.5	Transfektion mittels nicht-liposomalem Transfektionsreagenz (FuGene TM 6). 50	
2.2.6	Proteinanalysen mittels Immunoblot.....	51
2.2.6.1	Proteinpräparation transfizierter Zellen	51
2.2.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	51
2.2.6.3	Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay	52
2.2.6.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.2.6.5	Reversible Zink-Imidazol-Färbung von SDS Polyacrylamidgelen.....	52
2.2.6.6	Western Blot.....	53
2.2.7	RNA-Analysen mittels RT-PCR	53
2.2.7.1	Präparation von Gesamt-RNA	53
2.2.7.2	Präparation von Kern- und Cytoplasma-RNA mit hypotonischem Lysispuffer	54
2.2.7.3	DNase Inkubation und cDNA-Synthese	55
2.2.7.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.2.8	Prokaryotische <i>in vitro</i> Transkription	56
2.2.9	Pull down.....	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Erstellung eines subgenomischen Minigenkonstruktes, dass bezüglich der nicht- kodierenden Leaderexons 2 und 3 ein adäquates Spleißmuster wie im genomischen Kontext zeigt	58
3.1.1	Analyse des Spleißmusters der Leaderexons von HIV-NL4.3 in PM1 Zellen	59
3.1.2	Aufbau des Minigenkonstruktes zur Untersuchung des Leaderexon- einschlusses und Vergleich des Spleißmusters mit HIV-NL4.3	60
3.1.3	Charakterisierung der flankierenden Spleißstellen der Exons 2 und 3	62
3.2	Analyse <i>cis</i> -wirkender Elemente im Exon 2	65
3.2.1	Die Erkennung des Exons 2 hängt von zwei Heptamer-Motiven ab	66
3.2.2	Beide Heptamersequenzen wirken positiv auf die Spleißakzeptorerkennung .	68
3.2.3	Die Heptatmersequenzen fördern die Erkennung des Spleißdonors durch Unterstützung der U1 snRNP-Bindung.....	69
3.2.4	Charakterisierung der Heptamersequenzen mit dem ESEfinder und dem Rescue-ESE.....	73
3.2.5	Analyse der Interaktion von Proteinen des Kernextraktes mit der Exon 2 Sequenz	76

3.2.6	Die ESE-Sequenzen sind innerhalb der HIV-1 Subtypen und im SIV konserviert.....	79
3.2.7	Stille Mutation der ASF/SF2-Bindungsstelle in der kodierenden <i>vif</i> -Region..	80
3.3	Analyse <i>cis</i> -wirkender Elemente im Exon 3	81
3.3.1	Das im Exon 3 beschriebene Silencer-Element führt zur RNA-Degradation..	82
3.3.2	Das Exon 3 beeinflusst die Stabilität der RNA bereits vor dem Spleißen	84
3.3.3	Das ESS-Element vermindert die Erkennung des SA3 ohne die RNA Stabilität zu beeinflussen.....	86
3.3.4	Die Mutation des hnRNP A1-Silencers ermöglicht die Env-Expression.....	88
3.3.5	Die Mutationen der hnRNP A1-Bindungsstellen beeinflussen die vom ESEfinder und Rescue-ESE beschriebenen Enhancer nur geringfügig	90
3.3.6	Das Exon 3 enthält mehrere Silencer und Enhancer-Sequenzen	92
3.3.7	Die <i>cis</i> -wirkenden-Sequenzen im Exon 3 sind innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert.....	95
3.4	Gegenseitige Beeinflussung der Leaderexons 2 und 3.....	96
3.4.1	Analyse des Zusammenspiels der neu identifizierten <i>cis</i> -wirkenden Elemente in einem Zwei-Intron Kontext.....	96
3.4.2	Die Kombination aus Silencern und Enhancern im Exon 3 beeinflusst die Erkennung des Spleißakzeptors 2	99
3.4.3	Der Enhancer im Exon 2 trägt zur Spleißdonorerkennung bei	101
3.4.4	Die Intronisierung der Exon 2/3-Sequenz führt zu einer Spleißinhibition.....	104
3.4.5	Die räumliche Nähe eines ESE und eines ESS kann kontextabhängig zu einer Spleißinhibition führen.....	107
3.5	Beeinflussung der Reihenfolge alternativer Spleißereignisse durch die identifizierten Silencer- und Enhancer-Elemente in den Leader-exons 2 und 3....	110
3.5.1	Reihenfolge der alternativen Spleißereignisse im subgenomischen Minigenkonstrukt	111
3.5.2	Die Mutation des Enhancers im Exon 2 führt nicht zur Veränderung der Spleißreihenfolge	114
3.5.3	Veränderung der Reihenfolge durch Mutation des Silencers im Exon 3	117
3.5.4	Das Genom des NL4.3 wird sequenziell prozessiert.....	118
4	Diskussion	121
4.1	Die Erstellung eines subgenomischen Minigenkonstruktes.....	121
4.2	Die Analyse des Exons 2.....	122
4.2.1	Die Heptamer-Enhancer im Exon 2	122
4.2.2	Jeweils ein Heptamer-Enhancer wird zur Definition des 5'-wärts gelegenen Introns und zur Nutzung des Spleißdonors benötigt	124
4.2.3	Die Enhancer im Exon 2 werden von drei Algorithmen als funktionell beschrieben und der 5'-wärts gelegene bindet ASF/SF2	125
4.2.4	Die Heptamer motive sind innerhalb der HIV-1 Subtypen und im SIV konserviert.....	127
4.3	Die Analyse des Exons 3.....	128
4.3.1	Die Spleißstellen	128
4.3.2	Das beschriebene Silencer-Element im Exon 3 destabilisiert die RNA bereits vor dem Spleißen und bindet vermutlich hnRNP D.....	129
4.3.3	Das hnRNP-Bindungsmotiv (TTAGG) beeinflusst neben der Stabilität auch das Spleißmuster	131
4.3.4	Die Exon 3-Sequenz enthält einen weiteren Silencer und zwei weitere Enhancer-Elemente	132

4.3.5	Die <i>cis</i> -wirkenden-Sequenzen im Exon 3 sind innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert.....	136
4.4	Gegenseitige Beeinflussung der Leaderexons 2 und 3.....	136
4.4.1	Sowohl die <i>cis</i> -regulatorischen Elemente des Exons 2, als auch die des Exons 3 tragen zur Definition des mittleren Exons 2/3 bei.....	136
4.4.2	Die Intronisierung der Exon 2/3-Sequenz führte zum vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit gespleißter RNA.....	139
4.5	Beeinflussung der Reihenfolge alternativer Spleißereignisse durch die identifizierten Silencer- und Enhancer-Elemente in den Leaderexons 2 und 3	140
5	Zusammenfassung.....	145
6	Literaturverzeichnis	147
7	Publikationen.....	177
L e b e n s l a u f.....		179

Danksagung

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

Danken möchte ich an dieser Stelle

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

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

PD. Dr. Ortwin Adams, Corinna Asang, Steffen Erkelenz, Franz-Josef Gosseloh, Marcel Freund, Susanne Kammler, Carolin Konermann, Jörg Krummheuer, Imke Meyer, Kornelia Neveling, Magdalena Stosik und Maria Thieme für die konstruktive Zusammenarbeit und dafür, dass man mit euch nicht nur gut arbeiten sondern auch gut feiern konnte.

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologie für die gute Zusammenarbeit.

meinem Mann und meiner Familie für ihre Unterstützung.

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
[α - ³² P]ATP	[α - ³² P] markiertes Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ASF/SF2	Alternative splicing factor/Splicing factor 2, ein SR-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPS	Verzweigungssequenz (branch point sequence)
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	copyDNA
CRS	<i>Cis</i> -acting repressive sequence
ddH ₂ O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DMDC	Dimethyldicarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	Exon junction complex
Env	HIV-1 Envelope-Protein, wird gespalten in gp120 und gp41
<i>env</i>	kodiert das HIV-1 Env Protein
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (FCS, fetal calf serum)
<i>gag</i>	Group specific antigen, kodiert für Strukturproteine des HIV-1
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
hGH	humanes Wachstumshormon
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer
LB	LB-Medium (Luria broth base medium)
LTR	Long terminal repeat
Luc	Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i>
mRNA	messenger RNA
NE	Kernextrakt (nuclear extract)

nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
pA	Polyadenylierungssignal
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	$-\log[H^+]$
POD	Peroxidase
<i>pol</i>	Vorläuferprotein, kodiert für die enzymatischen Proteine des HIV-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
PPT	Polypyrimidin-Trakt
Rev	HIV-1 Regulationsprotein (regulator of virion protein expression)
RRM	RNA-Bindedomäne (RNA recognition motif)
RRE	Rev-Bindestelle in HIV-1 Transkripten (Rev responsive element)
RT	Reverse Transkriptase bzw. Reverse Transkription
SA	Spleißakzeptor, 3'-Spleißstelle
SD	Spleißdonor, 5'-Spleißstelle
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
SRp	SR (Serin/Arginin-reiches)-Protein
Tat	HIV-1 Regulationsprotein (Trans-activator of transcription)
U2AF	U2 snRNP auxiliary factor
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
<i>vif</i>	kodiert das HIV-1 Vif Protein (Virion-Infektiositätsfaktor)
vgl.	vergleiche
<i>vpr</i>	kodiert das HIV-1 Vpr Protein (Virion-assoziiertes Protein R)
<i>vpu</i>	kodiert das HIV-1 Vif Protein (virales Protein U)
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

Buchstabenkode der Basen:

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

1 Einleitung

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

Das humanpathogene Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1) ist der Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom;24,150). Diese Krankheit führt nach einer mehrere Jahre andauernden symptomlosen Phase zu Defekten in der Immunantwort, die durch die Abnahme von CD4⁺ Zellen, wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten, gekennzeichnet ist. Die Unterdrückung der zellvermittelten Immunität führt zu einer zunehmenden Schwächung der Abwehr und damit zu einer Anhäufung opportunistischer Infektionen.

Nachdem Anfang der 80er Jahre in den USA die ersten AIDS Fälle beschrieben worden waren (163,284), konnte zwei Jahre später der Erreger isoliert werden (24,78,149,163). Aufgrund der Sequenzhomologie zum Visna-Virus wurde er den Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren, zugeordnet (85,136,161). Die Sequenzunterschiede innerhalb der verschiedenen Isolate des HIV führten zu einer Einteilung in die drei Subtypen M (major), mit den Genotypen A bis I, N (new) und O (outlier).

1986 wurde aus einem westafrikanischen Patienten ein zweiter HIV-Typ isoliert, dessen Genom sich um mehr als 50% vom HIV-1 unterschied und als HIV-2 klassifiziert wurde (92,93,177). Auch hier werden mehrere Genotypen unterschieden (A bis F).

Bis heute hat sich HIV zu einer Pandemie entwickelt. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahr 2005 weltweit 40,3 Mio Menschen mit dem HI-Virus infiziert, allein 4,9 Mio hiervon waren Neuinfektionen. Im selben Jahr starben 3,1 Mio Menschen an den Folgen dieser Infektion <http://www.unaids.org/Epi2005/doc/report.html>, Global Summary of the AIDS Epidemic, December 2005).

Trotz intensiver Bemühungen steht bis heute kein Impfstoff gegen HIV zur Verfügung, lediglich die Symptome von AIDS können behandelt werden. Hierzu wird derzeit eine Kombinationstherapie angewendet, die sich aus Inhibitoren der Reversen Transkriptase (NRTI: "nucleoside reverse-transcriptase inhibitors"; NNRTI: "non- nucleoside reverse-transcriptase inhibitors;131,140,386) und der Protease (90)

zusammensetzt und unter dem Begriff HAART („highly active antiretroviral therapy“) bekannt geworden ist (346).

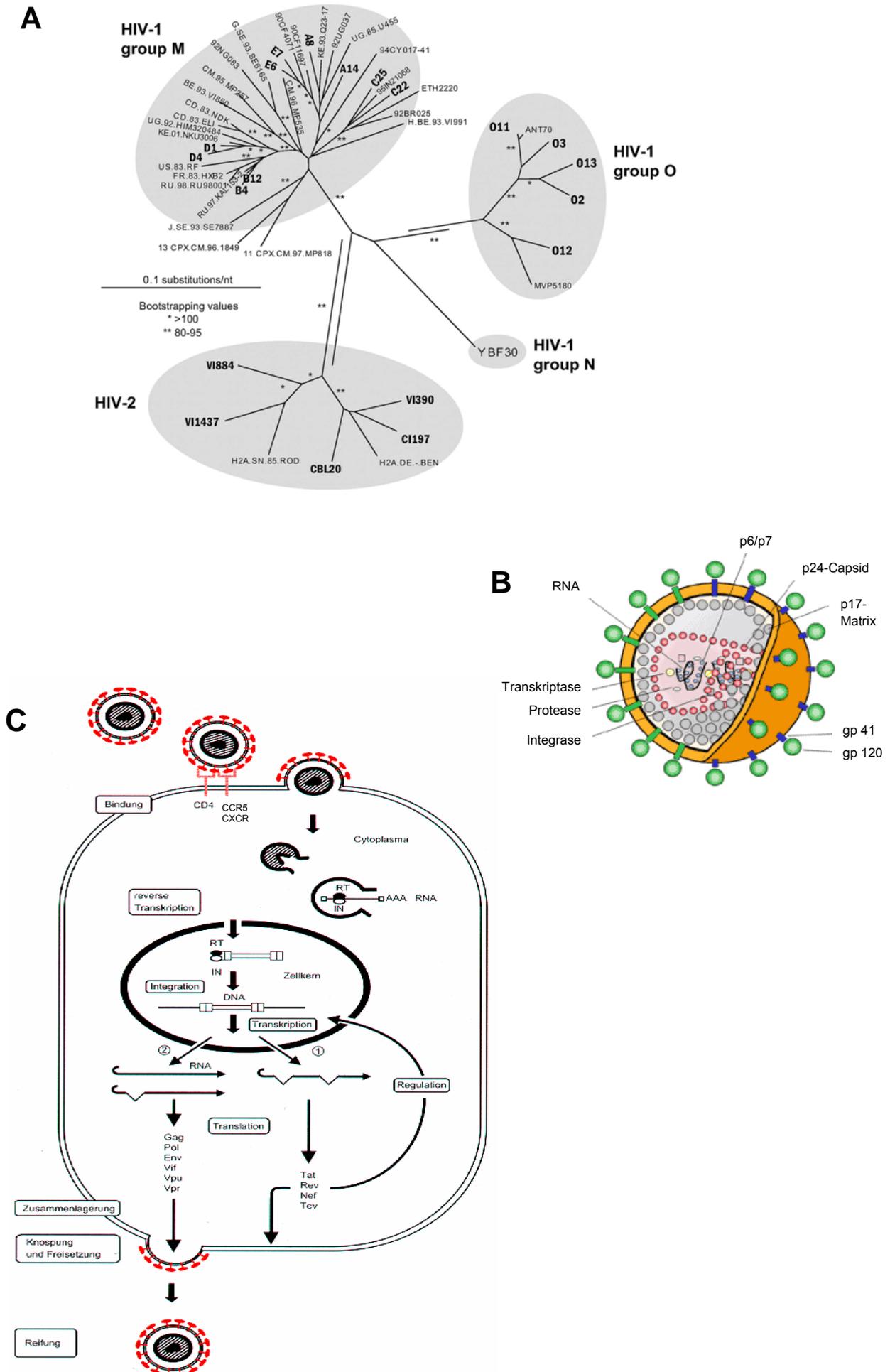
1.1.1 Struktur des Virus

Das konische Capsid des HIV-1 ist von einer Hüllmembran mit den viralen Glykoproteinen umgeben. Man unterscheidet das transmembrane Protein gp41 (TM) und das Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU), welches über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem TM assoziiert ist. Beide Proteine werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem gp160, gebildet und durch die zelluläre Protease Furin gespalten. Auf der Innenseite der Membran bildet das Matrixprotein p17 eine netzartige Struktur, die dem Virion eine isometrische Struktur verleiht. Das Linker-Protein p6 stellt die Verbindung zum Capsid dar. Innerhalb dieser Struktur befinden sich zwei

Abb. 1: A: Analyse der genotypischen Verwandtschaft unterschiedlicher HIV-Isolate durch die „neighbor-joining“ Methode (13). Durch den Vergleich von 400 Nukleotid-langen pol-Gen-Fragmenten wurde ein phylogenetischer Stammbaum erzeugt, der auf dem Vergleich von HIV-Referenz-Stämmen und 22 neuen Isolaten beruht. Die zugehörigen Accession Numbers sind unter (13) aufgeführt. Die Zweiglängen entsprechen der abgebildeten Skala, wobei die Skala 0,1 Ersetzung pro Nukleotid anzeigt. (** und * entsprechen Likelihood-Werten von 80 % bis 95 % bzw. von >95 %).

B: Schematische Darstellung des HI-Virus Typ 1. Das aus dem Capsidprotein (CA, rot) gebildete konische Capsid umschließt zwei Kopien der HIV-1 (+)RNA (schwarz) mit den an sie gebundenen Nucleocapsidproteinen (NC, blau) sowie den viralen Enzymen Integrase (IN, rosa), Reverse Transkriptase (RT, gelb) und Protease (PR, weiß). In die Virusmembran ist das virale Glykoprotein gp41 (TM, blau), das mit dem viralen Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU, grün) assoziiert vorliegt, eingelagert (http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/hiv/steckbrief_hiv.html).

C: Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus (modifiziert nach (302)). Die Bindung von HIV an die Wirtszelle erfolgt über die Adsorption des viralen Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor und einem der beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 auf T-Lymphocyten oder CCR5 auf Makrophagen. Strukturelle Umlagerungen der Virusoberflächenproteine bewirken die Verschmelzung der Virushüllmembran mit der Zellmembran. Das (+)-RNA Genom des Virus wird durch die eigene Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben und im Zellkern mittels viraler Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert. Die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert die provirale DNA in eine polycistronische prä-mRNA, die durch zelluläre Enzyme zunächst in mehrfach gespleißte mRNAs prozessiert wird (2). Die in das Cytoplasma exportierten Transkripte kodieren für die regulatorisch aktiven Proteine Tat, Rev, Nef und, je nach Isolat, Tev, die nach Transport in den Zellkern die Transkription verstärken und zur Bildung ungespleißter und gespleißter mRNAs der 4,2 kb-Klasse beitragen (3). Diese mRNAs dienen nach dem Transport in das Cytoplasma sowohl zur Translation der viralen Strukturproteine und der akzessorischen Polypeptide, als auch als Virusgenome, die sich an der Cytoplasmamembran mit den Proteinkomponenten zusammenlagern. Nach der Freisetzung der neuen Virione reifen diese durch die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease zu infektiösen Viren heran.



identische einzelsträngige (+)-RNAs, die mit den Nukleocapsidproteinen p7 komplexiert sind. Desweiteren sind im Capsid virale Enzyme zur Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom vorhanden: Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (Abb. 1 A).

1.1.2 Replikationszyklus

Die virale Replikation (Abb. 1B;302) beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Wirtszellmembran. Das virale Oberflächenprotein gp120 interagiert mit dem CD4-Rezeptor (275,290,291) auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten. Zusätzlich wird ein Chemokinrezeptor benötigt, der sich je nach Zelltyp unterscheidet. So wird für den Eintritt in T-Lymphozyten der CXCR4-Rezeptor verwendet, bei Monozyten und Makrophagen der CCR5 und verwandte Rezeptoren (7,21,86,116,119,340).

Aufgrund dieser Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung des viralen Glykoproteinkomplexes (302), wodurch die Virushülle mit der Wirtsmembran fusioniert und das Capsid in die Zelle gelangt. Nachdem die viruseigene Reverse Transkriptase (RT) die virale RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben hat, wird der sogenannte Präintegrationskomplex aktiv in den Zellkern transportiert (106,142) und dort als Provirus stabil in das Wirtsgenom integriert (53,102).

Die Expression der viralen Gene erfolgt durch den zellulären Transkriptions- und Translationsapparat. Die RNA-Transkripte werden zum Einen als mRNA für die Expression von Proteinen verwendet, zum Anderen werden nicht-prozessierte Transkripte als Genom für neue Virus-Partikel benötigt. Die Knospung der Virionen wird durch die Zusammenlagerung von viralen Strukturproteinen, Enzymvorläuferproteinen und zwei Vollängen-Transkripten an der Wirtszellmembran induziert. Erst nach der Abschnürung wird das Virus infektiös. Hierzu wird das Gag-Pol-Vorläuferprotein autokatalytisch gespalten und es erfolgt eine strukturelle Umlagerung unter Ausbildung des konischen Capsids.

1.1.3 Charakterisierung der HIV-1 Genexpression

1.1.3.1 Genomaufbau

Die integrierte provirale HIV-1 DNA wird von langen direkten Sequenzwiederholungen (*Long Terminal Repeats*, LTRs) begrenzt. Diese Sequenzen werden im 5' Bereich als Promotor für die RNA-Polymerase II genutzt, im 3' Bereich als Polyadenylierungssignal (15,227). Alle infektiösen Retroviren codieren für die Produkte *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (enzymatische Aktivitäten) und *env* (Glykoproteine). Die komplexen Retroviren, wie das HIV-1, besitzen weitere Gene für regulatorische und akzessorische Proteine: *tat* und *rev* bzw. *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef* (144). Sie bestehen aus mehreren Exons und werden von alternativ gespleißten RNAs translatiert. Die Leserahmen dieser Proteine überlagern zum Teil mit den Leserahmen der anderen. So werden aus dem nur 9,8 kb großen Genom über 40 mono- und bicistronische RNAs prozessiert (336,365).

Abb. 2 gibt einen Überblick über die Genomstruktur und die Proteine von HIV-1.

1.1.3.2 Transaktivierung durch das Tat-Protein

An der transkriptionellen Kontrolle der viralen Genexpression sind *cis*-regulatorische Elemente beteiligt, die sich im LTR und im 5' untranslatierten Leader befinden (392). Hieran binden sowohl zelluläre Faktoren, wie Sp1 (209) und NF- κ B (312), als auch das viruscodierte *Tat*-Protein (*transactivator of transcription*). Je nach Isolat hat dieses Protein eine Länge von 86 bis 104 Aminosäuren und wird von zwei Exons kodiert. Untersuchungen hatten allerdings gezeigt, dass für die Funktionalität von Tat schon das erste Exon ausreichend ist (207,443). Die Sequenz enthält neben der N-terminalen Aktivierungsdomäne eine basische Domäne zur Kernlokalisierung (186,356) und zur Bindung an die RNA (341,355,432). Die vom Tat-Protein erkannte Sekundärstruktur wird als TAR-Element (*trans-activation response*) bezeichnet.

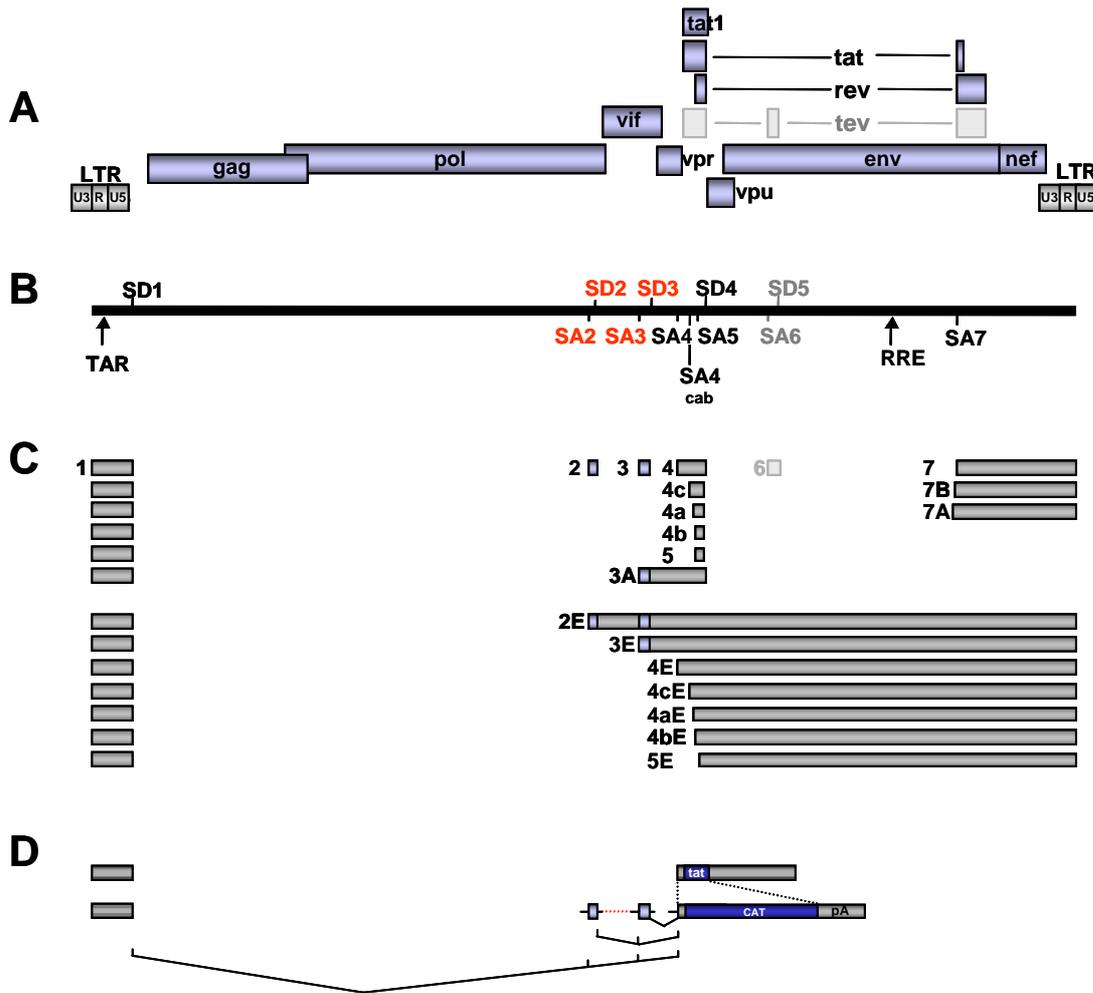


Abb. 2: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms (modifiziert nach 311). **A: Offene Leserahmen (ORFs, blau) im HIV-1 Genom:** gag (group specific antigen) kodiert den Vorläufer für die Strukturproteine des Viruskapsids (p17, p24 und p9/p7); pol (Polymerase) kodiert den Vorläufer für die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase; env (envelope, gp160) wird in das extrazelluläre Membranprotein (SU, gp120) und das Transmembranprotein (TM, gp41) gespalten; vif (virion infectivity factor), vpr, vpu (virusprotein R und U) und nef (negative factor) kodieren akzessorische Proteine; tat (siehe 1.1.3.2) und rev (siehe 1.1.3.3) kodieren die essenziellen Regulationsproteine. Der tev-ORF (grau) wird im HIV-1 Isolat NL4-3, das in dieser Arbeit verwendet wurde, nicht exprimiert. Das Genom wird am 5'- und 3'-Ende von LTRs (long terminal repeats) begrenzt, die bei der Reversen Transkription aus den Regionen U3, U5 (unique 3'/5') und R (repeat) entstehen. Der 5'-LTR enthält den HIV-Promotor, der 3'-LTR die Polyadenylierungssequenz. **B: Spleißstellen und RNA-Sekundärstrukturen der HIV-1 prä-mRNA.** SD: Spleißdonor (5'-Spleißstelle); SA: Spleißakzeptor (3'-Spleißstelle). Die Spleißstellen SD5 und SA6 (grau) werden in der NL4-3 Sequenz nicht genutzt. In der neueren Literatur wird parallel eine teilweise abweichende Nummerierung der Spleißakzeptoren verwendet. TAR (trans-activation response sequence) ist die Bindesequenz des viralen Transkriptionsaktivators Tat; RRE (rev responsive element) ist die Bindesequenz von Rev. **C: Die Nomenklatur der viralen Exons.** **D: Aufbau des Minigenkonstruktes zur Untersuchung der Leaderexons 2 und 3.** Neben den Exons 1, 2, 3 und 4 wurden auch direkt flankierende Sequenzen verwendet, um die zugehörigen Spleißstellen zu klonieren. Im Exon 4 wurde der env-Leserahmen durch einen CAT-Leserahmen ersetzt. Das Intron zwischen den Exons 2 und 3 (rot schraffiert) ist je nach Minigenkonstrukt vollständig oder gekürzt.

Sie ist in der R-Region des 5' LTR lokalisiert und konkurriert mit der Ausbildung eines „pause hairpins“ (328). Diese RNA-Sekundärstruktur verhindert den Übergang des Initiationskomplexes in den Elongationskomplex und führt zur Dissoziation der RNA-Polymerase II. Bei Anwesenheit von Tat wird eine einzelsträngige Region innerhalb des doppelsträngigen TAR-Stammes gebunden und es entsteht ein prozessiver Elongationskomplex (31,210,382,384). Je nach Zelltyp und Versuchssystem kann die virale Genexpression bis zum 300fachen ansteigen (143). Die Beobachtung, dass nur bestimmte Zelltypen stark stimuliert werden, führte zur Identifizierung des zellulären Cofaktors Cyclin T1, welches ebenfalls an die TAR-Region bindet (433). Cyclin T1 ist eine Untereinheit des Transkriptionselongationsfaktors b und liegt assoziiert mit der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (CDK 9) vor. Letztere wird durch die Interaktion mit Tat und TAR aktiviert und hyperphosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (91,153,457). Dieser Vorgang ist für die Umwandlung des Initiationkomplexes in einen prozessiven Elongationskomplex essentiell (228,324).

1.1.3.3 Die posttranskriptionelle Regulation durch Rev

Aufgrund der Genomstruktur, mit nur einem Promotor, aber neun teilweise überlappenden Leserahmen aufgeteilt in mehrere Exons, ist das HI-Virus auf verschiedene Möglichkeiten zur Generierung der unterschiedlichen mRNA-Spezies angewiesen. Zum Einen muss die Entstehung einer RNA an sich reguliert werden, zum Anderen auch der Zeitpunkt des Auftretens innerhalb des Replikationszyklus. Neben der Verschiebung des ribosomalen Leserahmens bei der Translation des Gag/Pol-Proteins und dem alternativen Spleißen der RNA exprimiert HIV-1 das Rev-Protein (*regulator of expression of virion proteins*). Dieses Protein ist unter Beteiligung zellulärer Proteine in der Lage intronhaltige RNAs aus dem Kern ins Cytoplasma zu transportieren. Die frühe Phase der Replikation ist durch die Klasse der 1,8 kb Transkripte gekennzeichnet. Diese sind mehrfach gespleißt, besitzen keine Intronsequenzen mehr und kodieren für die Proteine Tat, Rev und Nef. Die Anreicherung von Rev in den Nukleoli (107,277,332) führt zum Übergang in die späte Phase der Transkription. Zu diesem Zeitpunkt treten intronhaltige RNAs mit einer Größe von ca. 4,2 kb und die genomische 9,8 kb große RNA auf, die nur in Abhängigkeit von Rev ins Cytoplasma gelangen können (127,191).

Das Phosphoprotein Rev (94,185) wird ebenso wie Tat von zwei Exons codiert und weist eine Länge von 116 AS auf. Es können Domänen zur RNA-Bindung (46,108,181,226,280,451,452) und Oligomerisierung (96,277,332) unterschieden werden, sowie Signale zum Kernexport (NES;139,279,434) und zur Kernlokalisierung (NLS;96,277,414). Aufgrund des NES und NLS ist das Rev-Protein in der Lage zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln und auf diesem Weg andere RNAs ins Cytoplasma zu transportieren (139,292,434). Eine Voraussetzung hierfür ist die Interaktion mit dem RRE (*rev responsive element*), eine maximal 351 Nukleotid lange RNA-Sekundärstruktur. Das RRE liegt innerhalb des *env*-Gens und bildet einen doppelsträngigen Stamm der in vier Haarnadelschleifen endet (95,278). Die erste hochaffine Bindung findet am „stem-loop IIb“ statt (416), danach folgt eine Multimerisierung der Rev-Proteine entlang des doppelsträngigen Stamms (283,453). Da auch kleinere RNA-Sekundärstrukturen im heterologen Kontext Funktionalität zeigten, scheint die Multimerisierung entlang dieses doppelsträngigen Stamms nicht essentiell zu sein. Aufgrund der flankierenden Lage der Oligomerisierungsdomänen in Bezug auf das Kernlokalisierungssignal, wird letzteres durch die Komplexbildung unzugänglich (188,391). Der Export erfolgt durch Interaktion des RRE-Rev-Komplexes mit den zellulären Proteinen CRM1 (*chromosomal region maintenance gene*) und einer Ran-GTPase (141), die wiederum mit den Nukleoporinen interagieren können (462). Nach Translokation des Exportkomplexes in das Cytoplasma kommt es zur Dissoziation des Komplexes (128,345). Das Rev-Protein wird durch Bindung von Importin- β in Abhängigkeit von Ran/GDP zurück in den Kern transportiert (191).

1.2 Das Spleißen eukaryotischer und viraler prä-mRNAs

Obwohl das menschliche Genom insgesamt nur etwa 35.000 Gene besitzt, von denen lediglich 26.000 für Proteine kodieren, werden mehr als 90.000 Proteine exprimiert (183,248,422). Dieser Unterschied wird durch den Umstand erklärt, dass ungefähr 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden (248,282).

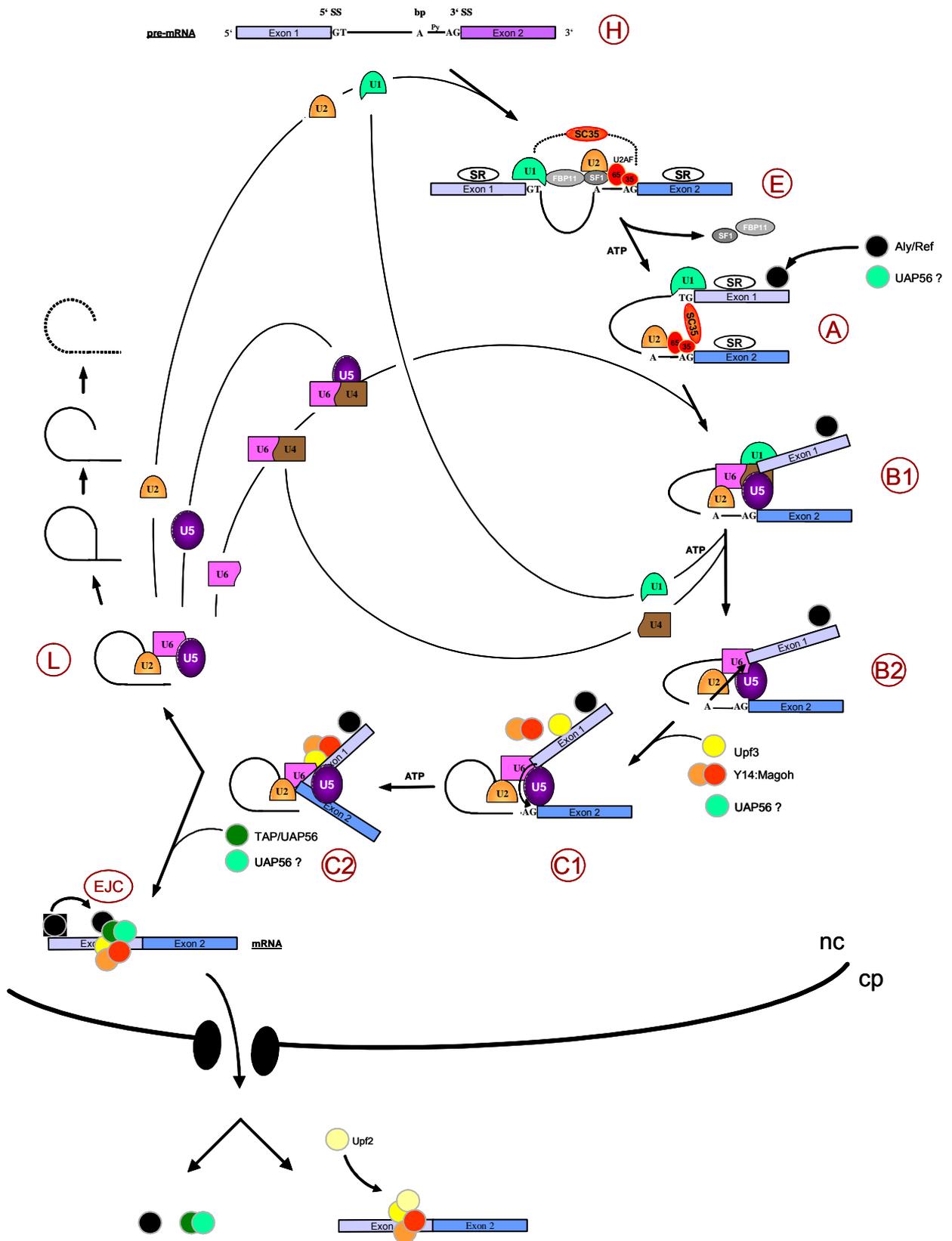
Während z.B. die Hefe *Sacharomyces cerevisiae* nur in ca. 4% der Gene einzelne kurze Introns enthält, können sie bei Vertebraten bis zu 90% der Transkriptlänge ausmachen und sind in nahezu jedem Gen zu finden. Um später eine korrekte Translation des Leserahmens zu erhalten, muss neben der nukleotidgenauen Definition der Exon- und Intronsequenzen auch eine Regulation der Spleißstellennutzung, sowie

die Organisation der zellulären Spleißmaschinerie gewährleistet sein. Das Herausschneiden der Intronssequenz erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Transester-Reaktionen. Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe eines Adenosins, das in der Verzweigungsstelle (BPS) lokalisiert ist, auf die 3'-5' Phosphordiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns (SD). Dadurch entsteht eine neue 2'-5'-Phosphordiesterbindung an der BPS und eine freie 3'-Hydroxylgruppe am 5'-Exon. Diese reagiert im zweiten Schritt nukleophil mit der 3'-5' Phosphordiesterbindung des 3'-Exons, wobei die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden werden und das verzweigte Intron (Lariat) freigesetzt wird (57,235).

1.2.1 Die Assemblierung des Spleißosoms

Das Spleißosom ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, der sich aus 5 nukleären Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNP) und einer Auswahl von mehr als 200 bekannten spleißosomalen Proteinen zusammensetzt (57,235,436). Jedes snRNP besteht aus einer kleinen uracilreichen RNA (U snRNA) und damit fest assoziierten Proteinen, die mit weiteren Proteinen interagieren können. Hierbei werden Proteine unterschieden, die in allen snRNPs vorkommen, wie die Sm-Proteine, und snRNP spezifische Proteine, wie z. B. das U1-70K, und Proteine die abhängig vom Spleißsubstrat nachzuweisen sind, wie z. B. SR-Proteine.

Zurzeit werden zwei Typen von Spleißosomen unterschieden: der hauptsächlich vorkommende U2-Typ und der U12-Typ (56,259). Die Spleißosomen des U2-Typs enthalten U1-, U2- und U4/U6*U5 tri-snRNAs, während beim U12-Typ mit Ausnahme der U5 snRNA, funktionelle Analoga Verwendung finden (409).



1.2.1.1 Die Erkennung der 5' und 3' Spleißstellen

Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Bildung des sogenannten E-Komplexes (294). Dieser in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zuerst aufgereinigte Komplex wird dort als „commitment complex“, in Säugern als „early“-Komplex bezeichnet (294,295).

Der initiale Schritt bei der Assemblierung des Spleißosoms ist die Bindung des U1 snRNPs an die 5' Spleißstelle. Hierbei wird durch Basenpaarung des einzelsträngigen 5'-Endes der U1 snRNA mit den 11 Nukleotiden des Spleißdonors ein RNA-Duplex ausgebildet (145,214,306,461). Dieser wird unter anderem durch die weiteren Proteinkomponenten des U1 snRNPs stabilisiert (121).

Zur Erkennung der 3'-Spleißstelle bindet zunächst der Spleißfaktor SF1/mBBP (Splice factor 1/ mammalian branch point binding protein) an die BPS (14,29,30) und rekrutiert durch kooperative Bindung die 65 kDa-Untereinheit des U2AF-Proteins („U2 auxiliary factor) an den Polypyrimidintrakt (22,29,369). Die Bindung der kleineren Untereinheit U2AF35 an die 3' Spleißstelle kann die Bindung von U2AF65 und SF1/BBP weiter stabilisieren (176). Obwohl das U2 snRNP erst im A-Komplex an die RNA bindet, liegt es gekoppelt an das SF1/BBP schon im E-Komplex vor (190).

Abb. 3: Spleißosomassemblierung (modifiziert nach 1,217,274,304,343,388,407,441). Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Bildung des E-Komplexes. SR-Proteine und Proteine des U1 snRNP-Komplexes vermitteln die Bindung der U1 snRNA an den Spleißdonor. Die Bindung des Spleißfaktors SF1/mBBP an die Verzweigungssequenz sowie die des Heterodimers U2AF65/35 an die Polypyrimidinsequenz und an das AG-Dinukleotid führen zur Erkennung der 3' Spleißstelle. Das U2 snRNP ist schwach mit dem E-Komplex assoziiert. SC35 vermittelt eine Interaktion zwischen dem U1 snRNP und der kleinen Untereinheit von U2AF, FBP11 ist der Interaktionspartner zwischen dem U1snRNP und dem SF1. Durch die Verdrängung von SF1/mBBP mittels U2 snRNP geht der Komplex in den A-Komplex über. Der inaktive B1-Komplex entsteht mit dem Eintritt des tri-snRNPs U4/U6.U5. Umlagerungen der RNA:RNA Hybride bewirkt die Verdrängung der U1 snRNA von der 5' Spleißstelle durch die U6 snRNA. Nachdem die U1 und die U4 snRNA das Spleißosom verlassen haben (B2) finden die beiden Transesterreaktionen statt (Komplex C1 bzw. C2). Die Exons werden miteinander verknüpft (Komplex C2) und das Intron-Lariat wird abgebaut (I). Die U snRNPs stehen für den nächsten Spleißzyklus zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Lariatbildung tritt das Upf 3 in den Spleißkomplex ein, ein Protein das zum Nonsense mediated decay (NMD) gezählt wird. Mit der zweiten katalytischen Umlagerung werden das Heterodimer Y14:Magoh und TAP angelagert, welches für die RNA-Lokalisation von Bedeutung ist, ebenso wie das schon früh beim Spleißosomenassambly vorhandene Protein Aly/REF. Die letztgenannten Proteine bilden den Exon-Junction-Complex (EJC). Im Cytoplasma dissoziieren die Transport-Proteine, während die Proteine des NMD bis zur ersten Runde der Translation an der RNA verbleiben.

Neben der Verbindung zum Spleißakzeptor bildet SF1/BBP auch eine Verbindung zum Spleißdonor aus. Es konnte eine Bindung an das Protein FBP11 nachgewiesen werden, welches wiederum mit dem U1 snRNP wechselwirkt (221). So entsteht bereits in diesem frühen Stadium der Assemblierung ein Kontakt zwischen dem Spleißdonor, der BPS und dem Spleißakzeptor. Unterstützt wird die Verbindung der beiden Spleißstellen durch einen weiteren Kontakt, der durch SR-Proteine hergestellt wird speziell des U1-70K und des U2AF (441).

Die Umwandlung des Spleißosoms zum A-Komplex geht mit der ATP-abhängigen Verdrängung des SF1/BBP durch das U2 snRNP einher (25,220,304,389). Ähnlich wie bei der U1 snRNA-Bindung lässt auch hier die Degeneration der Konsensussequenz in Metazoen bereits erkennen, dass die Bindung des U2 snRNPs durch Proteinfaktoren unterstützt wird. Hierbei handelt es sich um die essentiellen Spleißfaktoren SF3a und SF3b, die sowohl die 5'-, als auch die 3'-Sequenz und auch das Verzweigungsnukleotid selbst binden (164,236,438). Biochemische und massenspektroskopische Analysen verschiedener nativer A-Komplexe zeigten ein prä-Spleißosom auf, welches aus mehr als 70 Proteinen bestand (430). Neben den erwarteten Proteinen, wie snRNPs und deren assoziierte Faktoren und nicht snRNP-Spleißfaktoren, wurden auch Proteine aufgereinigt, die keine Funktion beim Spleißen ausüben. Hierzu gehören beispielsweise Export-Faktoren wie Aly und HuR, aber auch RNA-Helicasen wie DDX9 und p68 (151,265,459).

1.2.1.2 Der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs und die Transester-Reaktionen

Der Eintritt des U4/U6*U5 tri-snRNPs kennzeichnet den Übergang zum B-Komplex. Er enthält alle für das Spleißen notwendigen Komponenten, ist jedoch noch spleiß-inaktiv (45). Die Aktivierung des Spleißosoms erfolgt durch Umlagerung von RNA/RNA-Bindungen zwischen der U4 und der U6 snRNA. Im Folgenden bindet die U6 snRNA an die 5'-Spleißstelle und verdrängt das U1 snRNP aus dem Spleißosom. Das Lösen bestehender RNA-Duplexe erfolgt durch ATP-abhängige DExD/DExH (Asp-Glu-X-Asp/His)-box Helicasen (179,437). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Prp28, ein Homolog zur U5-snRNP assoziierten U5-100 kDa Helicase, an der Ablösung der U1 beteiligt ist, indem es ein U1 snRNP-assoziiertes Protein verdrängt (83,390).

Neben der Interaktion mit der 5'-Spleißstelle sind auch Wechselwirkungen des U6 snRNPs mit der U2 snRNA beschrieben, die anscheinend das katalytische Zentrum des Spleißosoms bilden (276,418).

Im C-Komplex erfolgen abschließend die Transveresterungen, die unter ATP-Hydrolyse zur Verknüpfung der Exons und Freisetzung des Lariats führen (310,389). Eine wichtige Rolle scheint hierbei dem U5 snRNP zuzukommen. Durch eine Interaktion mit dem 5' Exon stellt es eine räumliche Nähe zum 3' Exon her und übt vermutlich auch bei der Ligation der beiden Exons eine Funktion aus (322,326).

1.2.1.3 Der nukleocytoplasmatische Export

Da bei den Eukaryonten, im Gegensatz zu den Prokaryonten, die RNA-Sythese in einem anderen Kompartiment als die Proteinsynthese lokalisiert ist, müssen erstere permanent Makromoleküle zwischen Kern und Cytoplasma transportieren. Dies erfolgt durch den Kernporen-Komplex (NPC), welcher mit einer Größe von 125 MDa und 50 bis 80 unterschiedlichen Proteinen als wässriger Kanal die Kernmembran durchdringt. Der aktive Transport wird durch Signale der zu transportierenden Substrate (NES, NLS) direkt oder durch Adaptor-Proteine an die Transportrezeptoren vermittelt. Je nach Substrat werden unterschiedliche Kern-Export-Wege unterschieden, die jedoch zum Teil identische Komponenten verwenden können (105). So werden z. B. U snRNAs, ein Teil der 5S rRNAs und auch die späten HIV-RNAs durch den Export-Rezeptor CRM1 exportiert, wobei der interagierende Export-Faktor jeweils unterschiedlich ist. Das HI-Virus codiert für den Export-Faktor Rev, die 5S rRNAs verwenden den schon an der Transkription beteiligten Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA). Für die U snRNAs ist der Export-Faktor nicht bekannt, es wird jedoch angenommen, dass eine Wechselwirkung des NES-tragenden Adapters zum CAP-binding-complex (CBC) aufgebaut wird (105).

Die stark posttranskriptional veränderten t-RNAs werden im Gegensatz zu den anderen Substraten, direkt von einem Export-Rezeptor gebunden. Das humane Homolog Exp-t, des zuerst in *S. cerevisiae* identifizierten Proteins Los1 (192), bindet ausschließlich reife t-RNAs und verläßt als Komplex den Kern.

Am wenigsten ist über den Export der 28S, 18S und 5,8S rRNAs bekannt. Während die 28S und die 5,8S rRNAs in einem komplexen Vorgang mit 50 ribosomalen Proteinen die 60S-Untereinheit des Ribosoms ausbilden, assembliert die 18S rRNA mit 33

Proteinen zur 40S Untereinheit. In Hefen konnte bereits gezeigt werden, dass diese Komplexe in Abhängigkeit von der Ran-GTPase exportiert werden. Allerdings ist unklar, welche weiteren Faktoren von Bedeutung sind. Da alle bisher beschriebenen Transportwege Export-Rezeptoren der Importin- β /Karyopherin β 1-Familie verwenden, ist die Nutzung eines solchen in diesem Transportweg ebenfalls wahrscheinlich. Die Rezeptoren dieser Familie können sowohl mit dem Substrat (C-terminale Domäne), als auch mit Komponenten des NPCs und der GTPase Ran (N-terminale Domäne) interagieren. Letztere ist für die Richtungsabhängigkeit von Kernimport und -export von Bedeutung. Während im Cytoplasma die GTPase Aktivität (Ran-specific GTPase-activating protein) überwiegt, erfolgt im Kern der Austausch des gebundenen GDP gegen GTP (Ran-specific guanine nucleotide exchange factor).

Der Export von mRNAs erfolgt in Metazoen hauptsächlich über den TAP/NXF1:p15-abhängigen Transportweg als Ribonukleoprotein-Komplexe (mRNP). Hierzu wird das Protein UAP56 (in *S.cer.*: Sub2) benötigt, welches den Faktor Aly/Ref (in *S.cer.*: Yra1) an die mRNA rekrutiert (154,208,271), der wiederum mit dem Heterodimer TAP/NXF1:p15 (in *S.cer.*: Mex67/Mtr2) interagiert. Das letztgenannte Protein ist der eigentliche Export-Rezeptor, da es mit dem NPC wechselwirken kann (224,254,349,396,459). Die beschriebenen Proteine gehören als assoziierte Faktoren zum Exon-Junction-Komplex (EJC), der sich spleißabhängig 20-24 Nukleotide 5'-wärts der Exon-Exon-Grenze assembliert (255,256,455). Als weitere nukleär assoziierende Proteine sind der Spleißkoaktivator SRm160, der alterantive Spleißfaktor pinin und das Upf3b, welches zum Nonsense-mediated-decay (NMD) gehört, nachgewiesen worden (218,224,253-255,262,271,397). Diese Proteine dissoziieren größtenteils während oder kurz nach dem Export, spätestens aber nach der ersten Translation der mRNA (253,254). Das Upf2-Protein, welches ebenso wie das Upf3, als essentieller Faktor des NMDs charakterisiert wurde, bindet erst im Cytoplasma an den Komplex (154,224).

Zu den wenigen „Kern“-Proteinen des EJC werden neben Aly/Ref das Heterodimer Y14:Magoh und das eIF4AIII-Protein gezählt. Der Translations-Initiation-Faktor eIF4AIII gehört zu den DEAD-box-Helikasen und kann zwischen Kern und Cytoplasma pendeln. Eine große Bedeutung kommt ihm im Kern wahrscheinlich als sogenannter „anchoring factor“ zu, also einem der Proteine, die aufgrund ihrer RNA-bindenden Eigenschaften die Plattform zur Assemblierung des EJC bilden (372).

Dreyfuss konnte *in vitro* die Interaktion mit Y14:Magoh und die Bindung an die RNA an der Position des EJC zeigen, sowie durch die Verwendung von anti-eIF4AIII-Antikörpern oder RNAi Störungen des EJC-Aufbaus nachweisen (372). Zur Zeit gehört das Y14:Magoh zu den am besten charakterisierten Komponenten des EJCs. Das Heterodimer kann bereits in den Spleißosomen nachgewiesen werden (211), die den ersten katalytischen Schritt abgeschlossen haben, eine Assoziation mit der RNA findet aber erst nach der zweiten Transester-Reaktion statt (218,225,253,254). Beide Proteine sind sowohl durch ihre Funktion beim NMD, als auch bei der mRNA-Lokalisation charakterisiert (407).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Effizienz des RNA Exportes erheblich von der RNA-Prozessierung abhängt. So konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Cappen, als auch die Polyadenylierung den Export (124,180,206) fördern, das Spleißen aber den stärksten Effekt bewirkt (173,178). Dieser Wirkung geht wahrscheinlich unter anderem auf Proteine zurück, die an *cis*-regulatorischen Sequenzen gebunden sind und neben der Beeinflussung des Spleißens weitere spleißunabhängige Funktionen besitzen. Beispiele hierfür sind SR- und hnRNP-Proteine, die im Abschnitt 1.3 detaillierter beschrieben werden. Die hauptsächlich spleißfördernden SR-Proteine binden im hyperphosphorylierten Zustand an die mRNA und werden während des Spleißens dephosphoryliert. Bisher wurde davon ausgegangen, dass dies zu einer Verringerung der Bindeaffinität und zur Lösung der SR-Proteine von der mRNA führt. Neuere Ergebnisse lassen jedoch auf eine zusätzliche Funktion beim Export schließen. So konnte Steitz (193) zeigen, dass die hypophosphorylierten Formen von ASF/SF2 und 9G8 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine stark erhöhte Affinität zum TAP/NXF1:p15 aufweisen. Erst im Cytoplasma kommt es zu einer erneuten Phosphorylierung, die zur Trennung der SR-Proteine vom TAP/NXF1:p15 und der mRNA und im Folgenden zum Re-Import der SR-Proteine führt (242).

Neben den SR-Proteinen regulieren auch Proteine der hnRNP-Familien das Spleißen und den RNA-Export. So konnte z. B. für die Proteine hnRNP A1 und K gezeigt werden, dass sie an die RNA gebunden ins Cytoplasma gelangen und sich erst dort lösen, um wieder in den Kern re-importiert zu werden (202,285).

1.3 Spleißregulierende Sequenzen und *trans*-wirkende Faktoren

Neben den oben beschriebenen Spleißstellensequenzen können weitere *cis*-wirkende Elemente innerhalb der Exons oder des Introns die Spleißeffizienz modulieren und die Auswahl alternativer Spleißstellen beeinflussen. Hierbei können spleißfördernde ESEs oder ISEs (exonic/intronic splicing enhancer;101,187,301,403) von spleißinhibierenden ESS und ISS (exonic/intronic splicing silencer;32,75,159,215) Sequenzen unterschieden werden. Bei den *trans*-wirkenden Faktoren handelt es sich häufig um nicht-snRNP Spleißfaktoren aus den Familien der SR- oder hnRNP-Proteinen (383). Dabei zeigen SR-Proteine bevorzugt eine spleißfördernde Wirkung (42,165,166,400), während die Bindung von hnRNP-Proteinen meistens zu einer Inhibition des Spleißens führt (32,64,80,460). Innerhalb beider Proteinfamilien gibt es jedoch auch Ausnahmen (65,169,215,237,318).

1.3.1 Die SR-Proteinfamilie und SR-ähnliche Proteine

SR-Proteine (Ser-Arg-Proteine) bilden eine Familie hochkonservierter, mit dem Spleißen von RNA-Polymerase II-Transkripten assoziierter Proteine. Sie enthalten N-terminal ein oder zwei RNA-Bindedomänen (RRM) und C-terminal die namensgebende Arginin- und Serin-reiche Domäne (RS-Domäne). Die meisten Mitglieder dieser Familie wurden durch Verwendung des monoklonalen Antikörper mAb104 identifiziert, der spezifisch phosphorylierte Epitope der RS-Domäne detektiert.

Mitglieder wurden in allen bisher untersuchten Metazoen und Pflanzen identifiziert (160,252,267,268). Bei den Pilzen gibt es klassentypische Unterschiede. So konnten SR-Protein-Homologe in *Schizosaccharomyces pombe*, jedoch nicht in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (171,272,404). In Säugern werden 10 Proteine zu den sogenannten klassischen SR-Proteinen gezählt (165,450), wobei im Verlauf weiterer Untersuchungen neue Proteine mit einem vergleichbaren Aufbau und ähnlicher Funktion identifiziert wurden (23,373).

Die RS-Domäne der SR-Proteine vermittelt die Interaktion mit anderen RS-Domänen-tragenden Proteinen, die als SR-ähnliche Proteine (SRrps;43) bezeichnet werden. Hierzu gehören unter anderem snRNP-Komponenten (U1-70k und U5-100k), Spleißregulatoren (die Tra-Familie), Spleißkoaktivatoren (SRm160/300), RNA-Helikasen (hPRP16) und Proteinkinasen (Clk/Sty). Untersuchungen von Xiao und

A Klassische SR-Proteine

SRp20	[gi:4506900]	RRM RS
SC35 (SRp30b)	[gi:337925]	RRM RS
SRp46	[gi:15055542]	RRM RS
SRp54	[gi:20536364]	RRM RS
SRp30c	[gi:1049077]	RRM RRMH RS
SF2/ASF (SRp30a)	[gi:19923382]	RRM RRMH RS
SRp40	[gi:1049079]	RRM RRMH RS
SRp55	[gi:20127498]	RRM RRMH RS
SRp75	[gi:307437]	RRM RRMH RS
9G8	[gi:506401]	RRM Z RS

B SR-ähnliche Proteine

U2AF35	RRM RS
U2AF65	RS RRM RRM RRM
U170K	RRM RS RS
SRm160	RS RS
SRm300	// RS // RS //
hTra2 α/β (282 aa)	RS RRM RS

C Proteine der hnRNP-Familie

hnRNP A/B (320aa)	RRM1 RRM2 RGG M9
hnRNP D (Auf1)	var. RRM1 RRM2 Q var.
hnRNP I (PTB)	RRM1 RRM2 RRM3 RRM4
hnRNP U (806aa)	acidic Q NLS // RGG-Box

Abb. 4: Übersicht über den Aufbau einiger spleißregulierender Proteine. **A:** Klassische SR-Proteine (165); **B:** Beispiele für SR-ähnliche Proteine (165); **C:** Einige Proteine der hnRNP-Familie: hnRNP A/B: 33,64,198,303; Auf1: 338;PTB: 331;hnRNP U: 111;RS: Arginin/Serin-reiche Domänen; RRM: RNA-Recognition Motif; RRMH: RRM Homology; Z: Zinc knuckle; RGG: Arginin-Glycin Box; M9: Protein M9 target site (Import- und Exportsignal); var.: Durch alternatives Spleißen variable Region; Q: Glutaminreiche Region; acidic: Region saurer AS.

Manley (444) zeigten, dass obwohl RS-Domänen generelle Interaktionsdomänen sind, bestimmte Protein-Wechselwirkungen spezielle Anforderungen an die Sequenz stellen. Aufgrund des modularen Aufbaus der SR-Proteine konnte durch Austauschexperimente bezüglich der RS-Domäne gezeigt werden, dass die Funktionalität mit dem Auftreten von RSRS-Tetrapeptiden korreliert (168,442).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Serinreste innerhalb der RS-Domäne vielfach phosphoryliert werden können (298). *In vitro* wurden drei Kinase-Familien identifiziert, die hierzu in der Lage sind: die SR-Protein-Kinase-Familie (SRPK 1+2), die Clk/Sty-Familie und die DNA-Topoisomerasen (98,175,230,320,354,426). Der Phosphorylierungszustand beeinflusst sowohl die Aktivität der SR-Proteine (426,445) als auch deren subzelluläre Lokalisation (99,300,426,448).

Die Bindung der SR-Proteine an die prä-mRNA erfolgt sequenzspezifisch durch die RRM. Mit einer Länge von 80 AS wird eine dreidimensionale Struktur gebildet, die aus vier antiparallelen β -Faltblättern besteht, welche wiederum von α -Helices flankiert werden. Die Kontakte zur RNA erfolgen über Stapel-Wechselwirkungen (313). Obwohl die einzelnen SR-Proteine deutlich unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen, erscheinen die Konsensussequenzen stark degeneriert. In einigen Fällen können beschriebene Bindungsstellen von mehreren SR-Proteinen erkannt werden (264,399). Diese Unterschiede in der Spezifität könnten damit zusammenhängen, dass SR-Proteine sowohl redundante als auch spezifische Funktionen innerhalb des Spleißprozesses ausüben.

SR-Proteine akkumulieren überwiegend in nukleären Strukturen, die als „speckles“ oder auch Spleißfaktor-Kompartimente (SFCs) bezeichnet werden. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um Vorrats- und Recycling-Orte handelt. Obwohl die SR-Proteine ein Kernlokalisierungssignal besitzen, wird die subnukleäre Lokalisation durch die Phosphorylierung bestimmt (59). So konnten sowohl Duncan (122) als auch Wang (426) zeigen, dass eine verstärkte Phosphorylierung zur Freisetzung der Proteine ins Nukleoplasma führt, wodurch sie zu den Orten der Transkription gelangen können. Die Lösung des Spleißkomplexes von der prozessierten RNA setzt die Dephosphorylierung der SR-Proteine voraus. Diese gelangen nun entweder wieder in die „speckles“ oder werden zusammen mit der RNA ins Cytoplasma exportiert. Letztere Eigenschaft besitzen nur die SR-Proteine mit einem NES (nuclear export signal), wie z. B. ASF/SF2 und 9G8. Für diese beiden Proteine konnten auch Funkti-

onen unabhängig vom Spleißen beschrieben werden. So zeigte Caceres (358) eine Erhöhung der Translationseffizienz durch ASF/SF2 im Cytoplasma und Steitz (193) und Tarn (244) eine direkte Verbindung von beiden Proteinen zum Export.

Der Import der cytoplasmatischen SR-Proteine erfolgt wiederum abhängig vom Phosphorylierungszustand über zwei spezifische Import-Rezeptoren: Transportin 1 und 2 (TRN-SR1+2). Beide sind alternativ gespleißte Genprodukte und weisen eine Homologie zur Importin-beta/Transportin-Familie auf (216,242,243).

Zu den wahrscheinlich am besten charakterisierten Funktionen der SR-Proteine gehört die Erkennung der Spleißstellen und die Rekrutierung von Spleißfaktoren an die prä-mRNA (165). So zeigten die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen eine Stabilisierung der U1 snRNA-Bindung an die 5' Spleißstelle in Anwesenheit von SR-Proteinen (62,205,229,335), wobei *in vitro* eine starke Erhöhung der Konzentration sogar zu einer U1 snRNP-Unabhängigkeit des Spleißens führen kann (104,270). Im ersten Fall scheint die Aktivierung der 5' Spleißstelle über die direkte Bindung des SR-Proteins an die Spleißstelle und der Wechselwirkung mit den U1-spezifischen Proteinen U1-70K zu erfolgen (61,229,444), während die Umgehung der U1 snRNP-Bindung aus der direkten Rekrutierung des U6 snRNP resultiert (408). Dies korreliert mit Ergebnissen, dass SR-Proteine zu einem späteren Zeitpunkt der Spleißosomen-Assemblierung für die Anlagerung des U4/U6*U5 tri-snRNPs eine Rolle spielen (353).

Die Erkennung der 3' Spleißstelle durch ESE-gebundene SR-Proteine erfolgt entweder durch die Rekrutierung des U2AF65/35 Heterodimers (170,431,464) oder durch eine direkte Interaktion mit dem Branchpoint (167,371).

Neben der unterstützenden Rolle bei der Definition der Spleißstellen, sind SR-Proteine auch an der Definition der Intron- und Exonsequenzen beteiligt. Unterschieden werden hier das „Intron-“ und das „Exon-Definitions-Modell“. Kennzeichnend für beide Modelle ist die jeweilige Sequenz, die von den beiden betrachteten Spleißstellen flankiert wird: das Intron oder das Exon (28,347,351,402). In Genen mit erheblich längeren Intron- als Exonsequenzen, wird das Exon-Definitions-Modell als das wahrscheinlichere angenommen. Die SR-Proteine vermitteln hierbei die Interaktion zwischen U2AF35 an der 3' Spleißstelle und dem U1-70K an der 5' Spleißstelle (342). Die Definition von Intronsequenzen erfolgt entweder wie bei der Exondefinition direkt durch die SR-Proteine oder in Kombination mit dem SRm160/300-Komplex. Beide

SRm-Proteine besitzen zwei RS-Domänen, jedoch kein RNA-Erkennungsmotiv. Es konnte gezeigt werden, dass sie sowohl mit dem U1 snRNP, als auch mit den SR-Proteinen interagieren und durch gebundenes U2 snRNP stabilisiert werden (126,147,165).

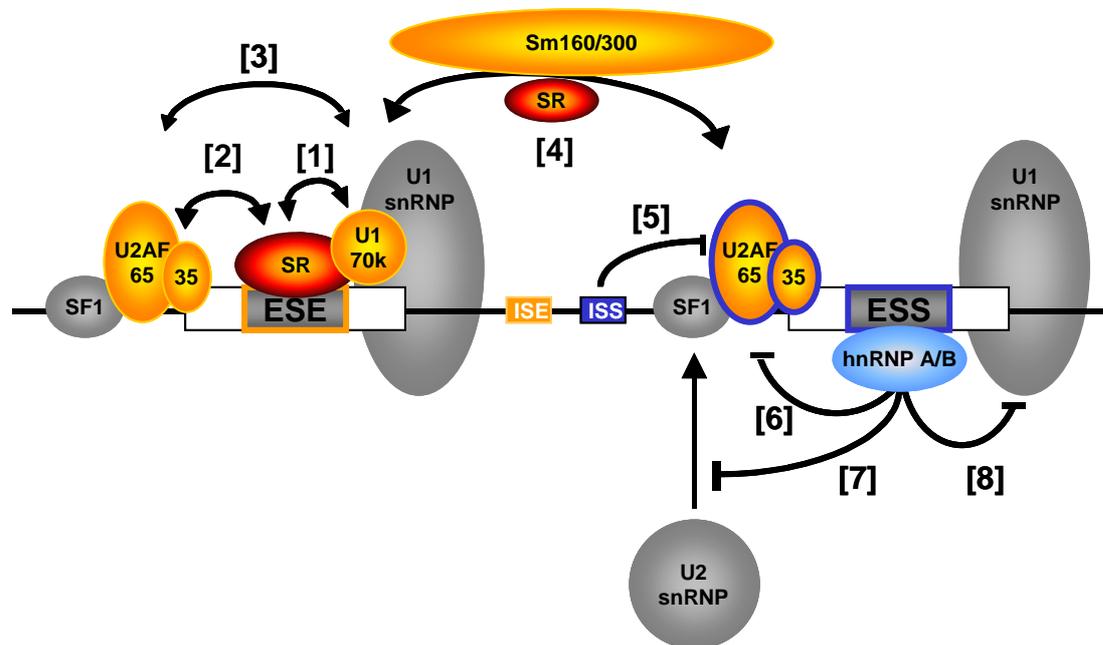


Abb. 5: SR- und SR-ähnliche Proteine sowie hnRNP-Proteine regulieren die Erkennung von Spleißstellen und die Definition von Intron- und Exonsequenzen (modifiziert nach 42,165,343). Im E-Komplex wird durch die Interaktion von SR-Proteinen (z.B. ASF/SF2) mit der SR-Domäne von U1-70K das U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle rekrutiert [1]. SR-Proteine können außerdem mit der SR-Domäne von U2AF35 interagieren [2], was die Assoziation von U2AF35, 65 und SF1/mBBP an die 3'-Spleißstelle und die Verzweigungssequenz fördert und die Voraussetzung für die Anlagerung des U2 snRNPs im A-Komplex ist. In internen Exons bilden SR-Proteine nach dem Exon-Definitions-Modell (28) eine exonübergreifende Interaktion zwischen der 3'- und 5'-Spleißstelle [3]. Hinweise gibt es auch auf die Überbrückung von Introns [4] durch die Interaktion zwischen U2AF35 und U1-70K über SR-Proteine (U2AF recruitment model, SC35) oder durch die Interaktion des SR-ähnlichen Proteins SRm160/300 mit SR-Proteinen an Spleißdonor, Spleißakzeptor und U2 snRNP (Coactivator model) (165). Zu einer negativen Regulation der Spleißstellenerkennung tragen die hnRNP-Proteine bei. Die Bindungsstellen können zum Einen im Intron (ISS) liegen [5] und mit der Bindung von U2AF65 an den PPT konkurrieren (405), zum größeren Teil liegen die Silencer jedoch innerhalb der Exonsequenz und unterbinden die Anlagerung des U2 snRNPs [7] (109) oder des U2AF-Komplexes [6] (118,377). Auch der downstream liegende Spleißdonor kann durch die Anwesenheit eines Silencers negativ beeinflusst werden [8] (109,129).

SR-Proteine sind nicht nur in konstitutiven Spleißprozessen involviert, sondern dienen auch der Regulation alternativen Spleißens. Durch die Bindung von SR-Proteinen an ISEs oder ESEs, kann eine schwache Spleißstelle aktiviert und das Exon eingeschlossen werden. Da die Aktivität bzw. die nukleäre Lokalisation der SR-Proteine durch deren Phosphorylierung moduliert wird, ist eine zelltyp- oder zellzykluspezifische Regulation der Menge an aktiven SR-Proteinen möglich (156,299).

Die Gruppe um Sreaton konnte zeigen, dass abhängig von der relativen Expression verschiedener SR-Proteinen dasselbe Exon eingeschlossen oder geskippt werden kann (411).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation bieten antagonisierende Proteine. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass einer positiven Regulation der SR-Proteine ASF/SF2 oder SC35 durch die Bindung von hnRNP A1 entgegengewirkt werden kann (129,182,286,287,449).

1.3.2 Die hnRNP-Proteinfamilie

Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) wurden zunächst als Chromatin-assoziierte RNA-Bindeproteine beschrieben, die kotranskriptionell naszierende Transkripte binden. Hierbei wird die RNA in 700 Nukleotide umfassende, nukleosomen-ähnliche Strukturen verpackt (26,120). Inzwischen sind weitere regulatorische Funktionen der Proteine bekannt. So beeinflussen sie neben der Transkription, dem Transport und der Translation der RNA auch das Spleißen und die RNA-Stabilität (237). Die mittlerweile mehr als 30 Mitglieder umfassende hnRNP-Familie splittet sich weiterhin durch mehrere Isoformen verschiedener Mitglieder auf, die durch alternatives Spleißen und posttranslationelle Modifikationen unterschiedliche Funktionen ausüben. Allen gemeinsam ist der modulare Aufbau aus einer oder mehreren RNA-Bindedomänen (RBD - RNA-binding-domain; RGG – Arg/Gly-rich box; KH – hnRNP K homology domain-typ) und einer häufig Glycin-reichen Domäne zur Protein-Interaktion (237,375). Im Folgenden werden einige hnRNP-Proteinfamilien beschreiben, für die unter anderem ein Einfluss auf das Spleißen oder die RNA-Stabilität nachgewiesen wurde.

Neben der Einteilung der Familien in strukturell ähnliche Gruppen, kann auch eine Einordnung nach Funktion oder Bindesequenz erfolgen. Die hnRNP-Familien A, D

und E unterscheiden sich sowohl im strukturellen Aufbau, als auch in ihrer Funktion, besitzen jedoch überraschenderweise eine nahezu identische Bindungsstelle. Die Sequenz **TTAGGG** wurde zuerst in den humanen Telomeren identifiziert und als DNA-Bindestelle mit eher geringer Affinität für diese drei Proteinfamilien charakterisiert (38,200). Als hochaffine Bindestelle gilt die RNA-Sequenz **TTAGG**, welche sowohl als Teil der 3' Spleißstelle, als auch als Exon-Sequenz erkannt wird (200). Aufgrund der übereinstimmenden Bindesequenz, jedoch der unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen bindenden Proteine, ergibt sich eine große Anzahl von Regulationsmöglichkeiten auf den unterschiedlichsten Ebenen der Expression.

Die hnRNP A/B-Familie umfasst die vier Isoformen A1, A1b, A2 und B, welche beim Spleißen ähnliche und teilweise redundante Funktionen besitzen (33,64,198,303). Als strukturelle Gemeinsamkeit weisen alle N-terminal zwei RNA-Bindedomänen (RRM) und C-terminal eine Arginin-Glycin-reiche Region (RGG-Box) zur Interaktion mit anderen hnRNPs (70) und snRNPs (58) auf. Ebenfalls C-terminal befindet sich die M9-Region. Hierbei handelt es sich um ein nicht-kanonisches Kernlokalisations-signal, welches für die hauptsächlich Kernlokalisierung des Proteins, aber auch für den nukleären Export essentiell ist (Abb. 4;201,202,293,315,316,381).

HnRNP A1 ist einer der Hauptfaktoren der negativen Regulation alternativer Spleißereignisse. So konnte in Bezug auf den Spleißdonor gezeigt werden, dass die Bindung von hnRNP A1 die Nutzung der distalen 5' Spleißstelle (ausgehend von der hnRNP A1 Bindungsstelle) stimuliert, indem die Bindung des U1 snRNPs an der proximalen Spleißstelle durch eine Konkurrenzreaktion reduziert wird (129), ohne jedoch die distale Bindungsstelle zu beeinflussen (75,109,198,287,288). Für den Spleißakzeptor konnte ebenfalls eine verringerte Nutzung der proximalen Spleißstelle nachgewiesen werden (20). Auch hier führte die Interaktion des hnRNP A1-Proteins mit der RNA zur direkten Verdrängung anderer Faktoren des Spleißosoms: so haben beispielsweise Untersuchungen an Silencern des HIV-1 gezeigt, dass sowohl das U2AF65 vom Polypyrimidintrakt (118,377), als auch das U2 snRNP vom Branchpoint (109) ferngehalten werden können. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Multimerisierung der hnRNP A1-Proteine. Ausgehend von den meist mehrfach vorhandenen Bindungsstellen kommt es zu einer kooperativen Bindung von Molekülen, die größere Bereiche der RNA abdecken (109,198,460) und so in Konkurrenz zu anderen Spleißfaktoren stehen.

Die Multimerisierung ist jedoch nicht nur bei der Wahl alternativer Spleißstellen von Bedeutung, es konnte auch gezeigt werden, dass das alternative ein- oder ausschliessen von Exons durch hnRNP A1 reguliert wird. Befinden sich Bindungsstellen für hnRNP A1 in den zwei Introns, die ein Exon flankieren, so kann letzteres durch Interaktion der gebundenen Proteine ausgeloopt werden. Die Spleißstellen des voranliegenden und folgenden Exons werden somit in eine „spleißbare“ Position gebracht (40,41,75,286).

Bisher weniger gut untersucht sind die Effekte der Bindung von hnRNP A1 an destabilisierende Elemente, wie sie von Black (36) und von Najera (314) nachgewiesen wurden. Letztere zeigten, dass der Rev-abhängige Kernexport davon abhängig ist, ob hnRNP A1 an das Instabilitätselement im p17 von HIV-1 bindet. Inwieweit ein Effekt auf die Stabilität auftrat, wurde hierbei allerdings nicht untersucht.

HnRNP D gehört zur Proteingruppe, die 2xRBD und 1x RGG-Bindemotiv tragen und das durch alternatives Spleißen in mindestens vier Isoformen auftritt. Diese haben eine Größe von 37, 40, 42 und 45 kDa und entstehen durch den wahlweisen Einschluss des N-terminalen Exons 2 (p40, p45) und des C-terminalen Exons 7 (p42, p45). Das bei den kleineren Isoformen vorhandene NLS (nuclear localisation signal) im C-Terminus wird durch den Einschluss des Exons 7 inaktiviert und durch ein NES (nuclear export signal) ersetzt. Damit besitzen je zwei Proteine ein Import- und Export-Signal. Durch Interaktionen und dadurch ausgelöste Konformationsänderungen sind alle vier Formen in der Lage zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln (251,359,423).

Aus der beschriebenen Variabilität ergibt sich wahrscheinlich die Vielfalt der Funktionen. Eversole beschrieb einen Zusammenhang zwischen hnRNP D und der Aufrechterhaltung der Telomere (132), Laroia konnte einen Einfluss auf die Translationsinitiation nachweisen (249) und Ling eine Aktivierung der Transkription (148,410). Obwohl auch eine Stabilisierung der mRNA beschrieben wurde (223,447), ist die Destabilisierung von RNAs am besten untersucht (51,114,249,266).

Neben der bereits oben beschriebenen **TTAGGG**-Bindungssequenz bindet hnRNP D auch hochaffin an AU-reiche Elemente (AREs) und führt Zelltyp-abhängig zu einer RNA Degradation. Widersprüchliche Befunde gibt es allerdings zum Einfluss der verschiedenen hnRNP D Isoformen. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass nur die Überexpression von p37 und p42 zur stärkeren RNA Degradation führt

(266,359), auf der anderen Seite wies Raineri durch RNAi-Experimente einen Einfluss lediglich von p40 und p45 nach (339). Die Ergebnisse weiterer Gruppen (360,447) führten bisher zu dem Ergebnis, dass wahrscheinlich die relativen Mengen der einzelnen stabilisierenden und destabilisierenden Proteine den Ausschlag geben. Für die beiden kleineren Isoformen konnte eine Kopplung an den Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweg nachgewiesen werden (250,439) und es wurde auch ein Zusammenhang mit dem RNA-Abbau durch das Exosom gezeigt (308).

HnRNP I oder auch PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) wird in drei Isoformen exprimiert, ist stark konserviert und hat eine Größe von etwa 62 kDa. Alle Isoformen weisen ein N-terminales Kernlokalisierungssignal (331) und vier RNA-Erkennungsmotive auf (158). Das erste RRM dient zur Dimerisierung, der Bildung der aktiven Proteinform (331), das zweite RRM mit den flankierenden Sequenzen ermöglicht die Oligomerisierung (325,331). Mit dem dritten RRM wird die RNA gebunden und für das vierte RRM wird die Bindung eines Ko-Repressors diskutiert (424). Identifiziert wurde das Protein aufgrund seiner Affinität zu U-reichen Polypyrimidin-Trakten verschiedener Introns. Die spleißinhibierende Wirkung des Proteins wurde zuerst von Mulligan am Beispiel des β -Tropomyosins nachgewiesen (309) und ist mit zahlreichen Beispielen aus Genen des α -Tropomyosins, c-src, α -actinin, fibronectin und anderen belegt (16,68,76,162,385). Im Gegensatz zu anderen Repressoren bindet PTB fast ausschließlich im Intron. Sowohl *in vitro*-Depletionsexperimente, als auch *in vivo*-Untersuchungen mittels RNAi haben gezeigt, dass die Verminderung der Proteinmenge zum verstärkten Einschluss eines Exons führt (79,89,425), während die Überexpression oder *in vitro* die Zugabe rekombinanten PTBs die Repression wieder herbeiführt. Obwohl PTB einen essentiellen Beitrag zur Repression beisteuert, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Repression nur in Abhängigkeit von Korepressoren wie hnRNP A1, oder „schwachen“ Spleißstellen auftritt (68,76,113,155,172).

Mechanistisch gibt es mehrere Möglichkeiten: Im einfachsten Fall überlappen die PTB-Bindungsstellen mit der Bindungsstelle für U2AF65 und die Inhibition wird durch eine Konkurrenz hervorgerufen (16,263,380,419). Da PTB ähnlich wie hnRNP A1 multimerisieren kann, werden auch für dieses Protein die Möglichkeiten des „Ausloopen“ eines Exons und die „Zone of Silencing“ diskutiert. Im ersten Fall befinden sich Proteinbinungsstellen in den flankierenden Introns des reprimierten Exons und die

daran gebundenen Proteine interagieren in der Art, dass eine Schlaufe entsteht, die eine Erkennung des Exons durch Komponenten des Spleißosoms unterbindet (89,325,331). Im zweiten Fall multimerisiert PTB entlang der RNA und maskiert das gesamte Exon (424).

Ausser der negativen Regulation des Spleißens konnten für PTB auch weitere Funktionen beschrieben werden. So wird die endonukleolytische Spaltung der RNA 3'-wärts der poly(A)-site (305), die cytoplasmatische RNA-Lokalisation (100) und eine Cap-unabhängige Translation beeinflusst (197,212).

Neben diesen intensiv untersuchten hnRNP-Proteinen, können auch noch für die Familien hnRNP C, G, H, (F), K, L und M spleißregulierende Eigenschaften angenommen werden, wobei jedoch häufig nur einer oder wenige Fälle beschrieben sind.

1.3.3 Identifizierung spleißregulierender Sequenzen

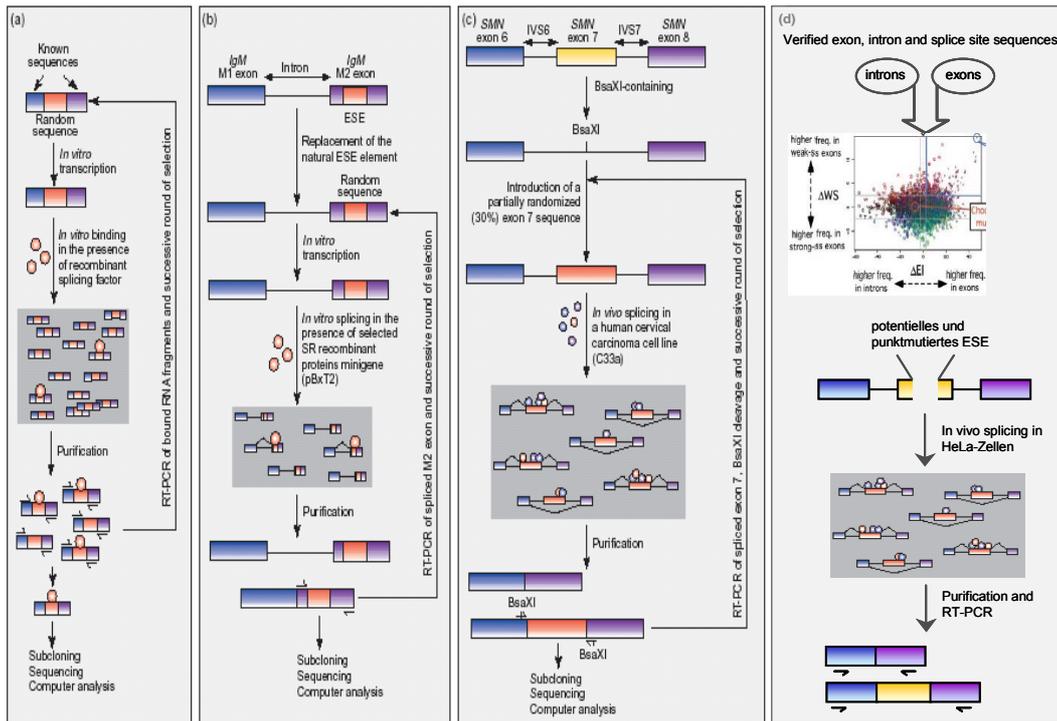
Die Zusammenfassung experimentell ermittelter individueller Bindungssequenzen verschiedener spleißregulierender Proteine zu entsprechenden sogenannten Konsensussequenzen, führt gleichzeitig zu einer Einschränkung der Verlässlichkeit ihrer Vorhersagemöglichkeit. Beim klassischen SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) wird eine Bibliothek kurzer DNA-Fragmente (z.B. 20-25 Nt) zwischen bekannte Sequenzen eingefügt und mit dem zu untersuchenden rekombinanten Protein inkubiert (Abb 6Aa). Die RNA-Protein-Komplexe werden isoliert und die gewonnene RNA durch RT-PCR amplifiziert. Nach mehreren Wiederholungen der Bindung und Isolierung kann eine hinreichend spezifische Bindungssequenz gewonnen werden. Basierend auf dieser Methode wurden viele Bindestellen für z. B. SR-Proteine (73,399), die humanen Tra2-Homologe (401), PTB (330) und hnRNP A1 (55) nachgewiesen. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die unter diesen Bedingungen gefundene Sequenzen *in vivo* nicht funktionell sein müssen. Auch ist durch den Versuchsaufbau eine Über- oder Unterrepräsentierung spezifischer Motive möglich.

Um eine bessere Korrelation zwischen Funktionalität und Proteinbindung herzustellen, wurde ein Versuchsaufbau mit einer *in vitro* transkribierten, spleißbaren Ein-Intron-prä-RNA entwickelt (Abb. 6Ab).

Das zweite Exon enthält einen natürlichen Enhancer, der durch zufällige 20-25 Nt lange Sequenzen ersetzt wird. Der so entstandene Pool an RNAs wird *in vitro* gespleißt, wobei entweder ein S100-Extrakt oder ein depletierter NE-Extrakt unter Zugabe von rekombinantem Protein verwendet wird. Nach jeder Selektionsrunde werden die gespleißten Produkte aufgereinigt, amplifiziert und in den Ausgangsvektor zurückklont. Nach 3-4 Runden kann mit dem Pool der Enhancer-Sequenzen eine Matrix erstellt werden, die in jeder zu untersuchenden RNA potentielle Proteinbindestellen identifiziert. Auf diese Weise wurde unter anderem die Sequenzspezifität von ASF/SF2, SRp40, SC35 und SRp55 unter Spleißbedingungen untersucht (264). Obwohl die ermittelten Konsensussequenzen der beiden SELEX-Arten Ähnlichkeiten aufweisen, z. B. eine purinreiche Binderegion für ASF/SF2, gibt es signifikante Unterschiede, die wahrscheinlich versuchsbedingt sind. So wird durch ein typischerweise durchgeführtes Depletionsexperiment üblicherweise nicht nur ein Protein gefällt und die Zugabe eines rekombinanten Proteins kann somit nicht die Funktion des ursprünglichen Gemisches von Proteinen wiederherstellen. Aufgrund der Ergebnisse dieses funktionellen SELEX-Experimentes konnte ein Algorithmus entwickelt werden, der innerhalb beliebiger RNA-Sequenzen potentielle SR-Bindemotive vorhersagt (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>;71,72). Ein SELEX-Versuchsaufbau zur Identifizierung neuer *cis*-wirkender Sequenzen wurde ebenfalls von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt (101,362,415,440). Hierbei wird ein Zwei-Intron-Konstrukt verwendet, bei dem das mittlere Exon schwache Spleißstellen enthält, die durch inserierte 19 Nt-Sequenzen aktiviert werden sollen (Abb. 6Ac). Der Spleißprozess kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Aus dem gespleißten Produkt mit Einschluss des mittleren Exons können neue spleißmodulierende Sequenzen isoliert werden.

Abb. 6: Identifizierung potentieller Proteinbindestellen. **A:** SELEX-basierte Untersuchungen zur Identifizierung proteinbindender Sequenzen mit spleißfördernder Wirkung. **a:** Diagramm der Durchführung des klassischen SELEX-Verfahrens zur Identifizierung von Proteinbindestellen. Eine Library kurzer DNA-Fragmente (20-25 Nt) wird zwischen bekannte Sequenzen kloniert und mit einem rekombinanten Spleißfaktor inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe werden isoliert und die gewonnene RNA kann durch RT-PCR angereichert werden. Nach mehreren Wiederholungen kann eine hinreichend spezifische Bindesequenz gewonnen werden. **b:** In dieser Versuchsanordnung wurde zusätzlich die

A



TRENDS in Molecular Medicine

B



Funktionalität der Proteinbindung untersucht. Ein natürlich auftretender Enhancer wird durch zufällige, 20 Nukleotide lange Sequenzen ersetzt. Von dieser DNA werden Transkripte hergestellt, die in S100 oder depletiertem NE unter Zugabe des zu untersuchenden rekombinanten Spleißfaktors *in vitro* gespleißt werden. Nach jeder Selektionsrunde werden die gespleißten Produkte aufgereinigt, amplifiziert und wieder in den Ausgangsvektor zurückkloniert. Nach 3-4 Runden kann mit dem Pool der Enhancer-Sequenzen eine Matrix erstellt werden, die in jeder zu untersuchenden RNA potentielle Proteinbindestellen identifiziert. **c:** Mit dieser dritten Anwendung können auch neue Enhancer-Sequenzen untersucht werden. In einem zwei Intron Konstrukt wird im mittleren Exon ein Teil der Sequenz ersetzt und mit diesen Vektoren werden Cervix-Karzinom-Zellen transfiziert. Aus dem gespleißten Produkt mit Einschluss des mittleren Exons können so neue enhancende Sequenzen isoliert werden (54). **d:** Eine noch stärkere Modifizierung stellt das dem Rescue-ESE zugrundeliegende SELEX-Verfahren dar. Das mittlere Exon enthält nur schwache Spleißstellen, die durch inserierte 19 Nukleotid-Sequenzen aktiviert werden sollen. Diese inserierten Sequenzen wurden durch Computeranalysen ermittelt und stellen Hexamere dar, die mit einer signifikant höheren Frequenz in Exons mit Nicht-Konsensus-Spleißstellen vorkommen, verglichen mit Introns und Exons mit starken Spleißstellen. Diese Durchführung führte zur Identifizierung von 238 potentiellen ESE-Sequenzen.

B: Proteinbindestellen von vier SR-Proteinen. Sie wurden mit Hilfe der unter 1.3.3 beschriebenen Methode ermittelt und sind im Internet als Vorhersageprogramm potentieller Proteinbindestellen zu finden: ESEfinder: (<http://exon.cshl.org/ESE/>).

Eine Modifikation des vorherigen SELEX-Aufbaus liegt dem Programm RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese>;135) zugrunde. Während der Versuchsaufbau identisch ist, wurden die potentiell spleißmodulierenden Sequenzen durch statistische Computeranalysen ermittelt. Es handelt sich um Hexamere, die mit einer signifikant höheren Frequenz in Exons mit Nicht-Konsensus-Spleißstellen vorkommen, verglichen mit Intron- und Exonsequenzen, die von starken Spleißstellen flankiert sind. Diese Durchführung führte zur Identifizierung von 238 potentiellen ESE-Sequenzen, ohne dabei eine Aussage über die *trans*-wirkenden Faktoren erlauben zu können.

Weiter Entwicklungen beschäftigen sich mit der Punktmutationsanalyse innerhalb ganzer Exons im kompletten Gen-Kontext, wobei ebenfalls wieder über SELEX-Verfahren, die regulierenden Sequenzen angereichert werden (379).

1.3.4 Spleißregulierende Elemente im HIV-1 Genom

Die Nutzung von Spleißstellen wird nicht nur durch die reine Spleißstellensequenz, sondern auch durch *cis*-regulatorische Sequenzen in deren Nachbarschaft bestimmt. Im HIV-Genom sind sowohl positiv als auch negativ wirkende Elemente beschrieben worden. Häufig treten beide in Kombination innerhalb eines Exons auf. So wird das Spleißen beider *tat*-Exons sowohl durch Silencer, als auch Enhancer reguliert. Im ersten Exon sind zwei Silencer (ESS2 und ESS2p) und ein Enhancer (ESE2) nachgewiesen worden (11,12,64,204,376), im zweiten Exon jeweils ein positiv und ein negativ regulierendes Element (ESS3 und ESE3;12,387) und ein weiteres im upstream liegenden Intron (ISS;406). Beide Enhancer binden ASF/SF2 und der flankierende Silencer und das ISS bindet das antagonistisch wirkende Protein hnRNP A1. ESS2p wird durch hnRNP H erkannt, welches je nach Kontext das Spleißen fördern oder inhibieren kann.

Ein weiteres zweiteiliges Element wurde im Exon 6 lokalisiert (435). Dieses Exon wird nur in einigen HIV-Isolaten inseriert und codiert eine *tev*-mRNA, die Teile des *tat*-*rev*- und *env*-Leserahmens beinhaltet. Ein Einschluss dieses Exons, aufgrund einer natürlichen Punktmutation, führt zur Abnahme der genannten Transkripte, was zu einer erheblichen Reduktion der Virusreplikation führt (65,435).

Für den Silencer im Exon 3 konnte eine hnRNP A1 Bindung nachgewiesen werden, die zu einer Reduktion des Exoneinschlusses führte (32). Im Rahmen der vorliegen-

den Arbeit konnte aber unter anderem gezeigt werden, dass auch dieser Silencer in Kombination mit mindestens einem Enhancer vorliegt.

Eine einzeln auftretende Enhancer-Sequenz konnten bisher nur im Exon 5 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen bidirektionalen Spleißenhancer, der sowohl den Spleißdonor, als auch den Spleißakzeptor unterstützt und neben ASF/SF2 auch SRp40 bindet (63).

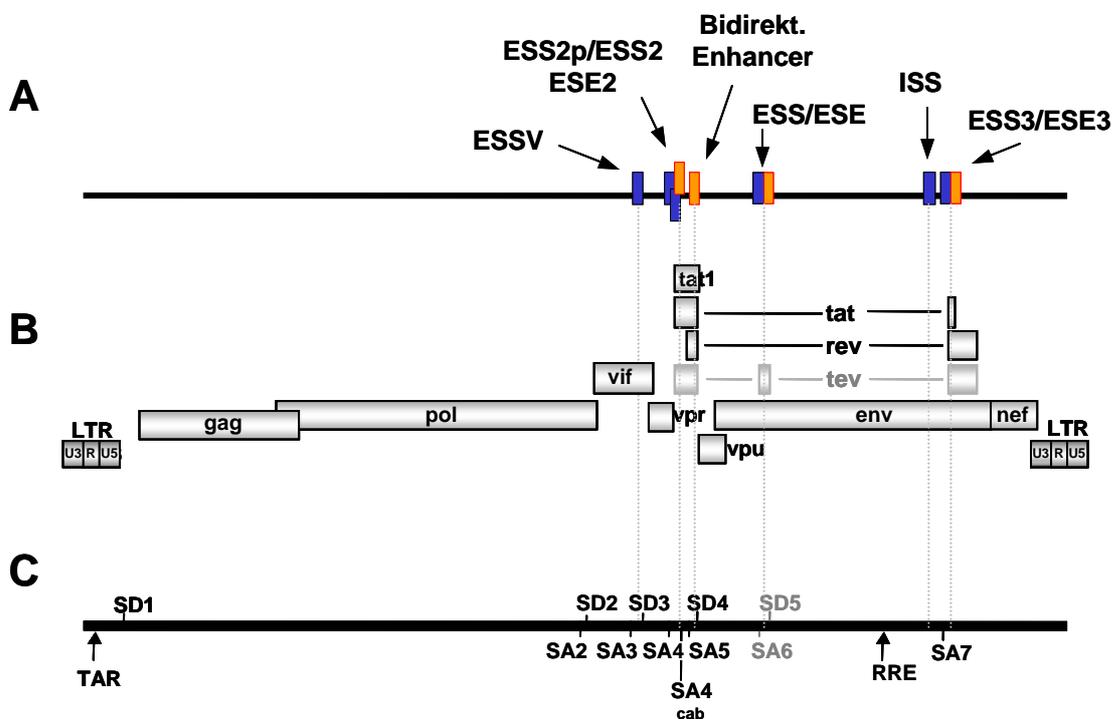


Abb. 7: Bekannte Silencer und Enhancer im HIV-1 Genom mit trans-wirkenden Faktoren.

A: Lokalisation der einzelnen cis-regulatorischen Elemente im Kontext der ORFs (**B**) und der Spleißstellen (**C**)

- Exon 3: ESSV – hnRNP A1 (32)
- Exon 4: ESS2p – hnRNP H (204); ESS2 – hnRNP A/B;
ESE2 – SF2/ASF (11,64,376,449)
- Exon 5: Bidirektionaler Spleißenhancer – SF2/ASF und SRp40 (63)
- Exon 6: ESS/ESE (65,435)
- Intron 5: ISS – hnRNP A1 (405)
- Exon 7: ESS3 – hnRNP A/B; ESE3 – SF2/ASF (12,387)

ESS: Exon splicing silencer (blau); ESE: Exon splicing enhancer (orange); ISS: Intron splicing silencer (blau)

1.4 Die Leaderexons 2 und 3 in den HIV-1 mRNAs

Beim Spleißen der HIV-1 mRNA führt die wahlweise Nutzung der Spleißdonoren 2 und 3, sowie der zugehörigen Spleißakzeptoren 2 und 3 zu vier unterschiedlichen Leadersequenzen. Neben dem Einschluss eines Exons, können auch beide gleichzeitig oder keines von beiden inseriert werden. Hierbei gibt es erhebliche Unterschiede bezüglich des nächsten verwendeten Spleißakzeptors und der Replikationsphase des Virus (Abb. 8;336). In der Klasse der 4 kb-Transkripte enthalten nur 13% der mRNAs überhaupt ein Leaderexon, wobei in den *tat*-mRNAs die Insertion des Exons 2 und in den *env*-mRNAs die Insertion des Exons 3 bevorzugt auftritt. In der frühen Phase der Replikation ist die Einbaurrate der Leaderexons erheblich höher. Während sie bei der *rev*-mRNA bei nur 20 % liegt, konnten in den *nef*-mRNAs 42% und in den *tat*-mRNAs 53% Leaderexonseinschluss nachgewiesen werden. Ähnlich wie in der späten Phase der Replikation wird nur bei den *tat*-mRNAs der Exon 2-Einschluss bevorzugt. Ein Zusammenhang mit den regulierenden Elementen des SA4 (ESS2, ESS2p, ESE2) ist nicht auszuschliessen.

Die Konservierung und die Häufigkeit des Auftretens in der frühen Replikationsphase, lässt eine regulatorische Funktion der nicht-kodierenden Sequenzen als wahrscheinlich erscheinen. Über ihre Funktion existieren jedoch widersprüchliche Befunde. Während Schwartz et al. keine relevanten Unterschiede bei der Expression beobachten konnten (365), zeigte Muesing einen Einfluss auf die Expression (307) und Lenz und Krummheuer wiesen wiederum einen Einfluss auf die nukleäre Stabilität nach (258).

1.5 RNA-Stabilität

Da für das Exon 3 ein RNA destabilisierender Einfluss nachgewiesen wurde (238), soll im folgenden Abschnitt die Regulation der Genexpression durch verschiedene destabilisierende Sequenzen und die nachfolgenden Schritte beim RNA Abbau beschrieben werden.

Viele der bisher in der Literatur beschriebenen destabilisierenden Sequenzen können der Gruppe der AU-reichen Elemente (ARE) zugeordnet werden. Sie wurden haupt-

Verteilung der Leader-Exons in der 1.8 kb Klasse

	Ohne	2,3,23	2	3	2+3	
Nef (56%)	54 %	42 %	11 %	24 %	7 %	57% aller Leader-RNAs enthalten nur das <u>Exon 3</u>
Rev (34%)	80 %	20 %	3 %	12 %	5 %	60% aller Leader-RNAs enthalten nur das <u>Exon 3</u>
Tat1 (9%)	48 %	53 %	28 %	16 %	9 %	52% aller Leader-RNAs enthalten nur das <u>Exon 2</u>
			30,5%		7 %	37,5% der frühen RNAs enthalten mindestens ein Leader-Exon

Verteilung der Leader-Exons in der 4 kb Klasse

	Ohne	2,3,23	2	3	2+3	
Tat2 (5%)	85 %	15 %	9 %	6 %	0 %	60% aller Leader-RNAs enthalten nur das <u>Exon 2</u>
Env (92%)	92 %	11 %	4 %	6 %	1 %	55% aller Leader-RNAs enthalten nur das <u>Exon 3</u>
			12,5%		0,5 %	13% der späten RNAs enthalten mindestens ein Leader-Exon

Abb. 8: Verteilung der Leaderexons innerhalb der 1,8 kb und 4 kb Klasse. Purcell und Mitarbeiter (336) isolierten RNA aus HeLa, die mit HIV-1 NL4.3 infiziert worden waren. Im oberen Teil sind die früh exprimierten RNAs dargestellt im unteren Teil die spät exprimierten. Die erste Spalte deklariert das jeweilige Protein, wobei in Klammern der Anteil an der Expression in der jeweiligen Phase angegeben ist. Die zweite Spalte zeigt in wie viel Prozent der Transkripte ein oder mehrere Leaderexons eingebaut werden, wobei die folgenden Spalten eine genauere Aufschlüsselung angeben. In der letzten Spalte ist ein Kommentar zum statistischen Ergebnis aufgeführt.

sächlich in den 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTRs) von Transkripten unterschiedlicher Proto-Onkogene, Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert und verkürzen die Halbwertszeit der Transkripte (374). Experimentell wurden drei verschiedene Typen unterteilt: Typ I (*c-fos*-Typ) und Typ II (GM-CSF-Typ) sind sensitiv für Actinomycin D und besitzen das Sequenzmotiv AUUUA, Typ III (*c-jun*-Typ) beschreibt motivunabhängige, uracilreiche Elemente. Im Gegensatz zur Typ II-AREs werden Typ I und Typ III-AREs schon während der Deadenylierung degradiert (82,329,446).

Zu den *trans*-wirkenden ARE-bindenden Proteinen zählen hnRNP D (AUF1;1.3.2), Tristetraprolin (39,246), wahrscheinlich das KH-Typ Spleißregulations-Protein (KSRP;269) und HuR (49,273). Letzteres gehört zur einzigen Protein-Familie von der zur Zeit bekannt ist, dass sie AREs stabilisieren können. Antisense-Experimente zeigten einen eindeutigen Rückgang der Halbwertszeit AU-reicher mRNAs durch die Entfernung endogenen HuRs (260,339,350,429). Zum Schutz vor dem Abbau wird ein Mechanismus vermutet, bei dem HuR zum Einen mit der RNA interagiert und zum Anderen durch seine Wechselwirkung mit Transportin 2 die AU-reiche RNA ins Cytoplasma eskortiert.

Die übrigen drei Proteine sind negative Regulatoren der Stabilität. KSRP wurde zusammen mit dem Exosom aufgereinigt und ist daher dem 3' – 5' RNA-Abbau zuzuordnen (81), Tristetraprolin interagiert mit der poly(A)-RNase (PARN) und führt zur Deadenylierung der mRNA (50,245). Die Isoformen des hnRNP D sind sowohl mit dem Ubiquitin-Proteasomen-Netzwerk (250), als auch mit dem Exosom (308) verbunden und führen hierdurch zum schnellen Abbau der RNA.

Neben dem destabilisierenden Einfluss auf posttranskriptioneller Ebene, konnte auch eine negative Regulation der Translation durch AU-reiche Elemente nachgewiesen werden. Hierzu ist eine Bindung der Proteine TIA-1 (T-cell internal antigen-1) und TIAR (TIA-1-related protein), die eng verwandt mit dem HuR-Protein sind, Voraussetzung (333).

Neben den kanonischen AREs gibt es noch weitere AU-reiche destabilisierende Sequenzen, wie sie beispielsweise in den kodierenden Bereichen der lentiviralen Proteine *gag* (364), *pol* (363) und *env* (319,463) identifiziert wurden. Die selektive Erhöhung des GC-Gehaltes dieser sogenannten INS/CRS-Elemente im HIV-1 führten zur Stabilisierung der mRNAs (115,234,363,364). Als *trans*-wirkende Proteine dieser AU-reichen Sequenzen konnten bisher unter anderem PTB/hnRNP I, hnRNP A1,

PABP1 und PSF nachgewiesen werden (3,4,36,37,314,366,463). Die Relevanz dieser lentiviralen destabilisierenden Sequenzen liegt wahrscheinlich in der Entfernung der nicht vollständig prozessierten RNAs aus dem Spleißweg. Die Markierung als instabile RNA ermöglicht den Zugang zu einem anderen Kern-Export-Weg. Im Falle von HIV-1 wird die Interaktion mit dem Rev-Protein und der Export über den CRM1/RanGTPase-Weg ermöglicht. Die im Cytoplasma angelangte RNA kann translatiert werden.

Eine weitere Möglichkeit der Destabilisierung stellen CA-Wiederholungen dar. Diese führen zu einer Markierung der direkt 5'-wärts gelegenen Sequenz als Spaltstelle für eine Endonuklease. Während das 5'-gelegene Spaltprodukt stabil ist, wird der 3' Bereich degradiert. In den meisten Fällen wird die CA-Sequenzwiederholung von hnRNP L hochaffin gebunden und dadurch maskiert (195). Durch die Bindung von hnRNP L tritt eine zweite Funktion dieser Elemente auf. Abhängig von der Lage der CA-Wiederholungen zum proximalen Spleißdonor können sie als Enhancer oder Silencer beim Spleißen wirken (194).

Durch neuere Untersuchungen werden immer wieder Proteinbindungsstellen identifiziert, die den bereits beschriebenen Gruppen nicht zuzuordnen sind, jedoch in Einzelfällen die Stabilität beeinflussen können. Ein Beispiel hierfür wäre das SR-Protein ASF/SF2. Eigentlich als Spleißregulator identifiziert, konnte Lafyatis (257) zeigen, dass sowohl die Inhibition von ASF/SF2, als auch die Mutation der Bindungsstelle die Halbwertszeit der PKCI-r mRNA (Proteinkinase C-Interaktionsprotein-ähnlich) um das 6,6 fache erhöht.

Zu unterscheiden ist dieser Effekt von der Stabilitätsregulation durch das SR-Protein SC35. In diesem Fall reguliert SC35 lediglich das alternative Spleißen seiner eigenen RNA. Eine Überexpression des Proteins führt zum Einschluss eines alternativen Exons, welches die RNA destabilisiert (398).

Für den Abbau cytoplasmatischer RNA gibt es zwei unterschiedliche Wege. Nach der vollständigen Prozessierung ist die mRNA am 5' Ende durch die Cap-Struktur und am 3' Ende durch den poly(A)-Schwanz vor dem Abbau geschützt (281,297,370). Der erste Schritt beider Abbauewege besteht in der Kürzung des poly(A)-Schwanzes durch sogenannte Deadenylasen. Bei Säugern handelt es sich um die Poly(A)-Ribonuclease (PARN;233), die abhängig von der CAP-Struktur die Deadenylierung und den RNA-Abbau stimuliert (112,152), bei Hefen sind die Proteine pan2p und pan3p identifiziert worden (44,52). Unabhängig von der An- oder Abwe-

senheit der CAP-Struktur kann nach diesem Vorgang die RNA durch einen Multi-enzymkomplex, dem Exosom, abgebaut werden. Hierbei handelt es sich um einen Proteinkomplex aus 10 oder mehr 3'-5' Exonucleasen. Das Exosom ist stark konserviert und sowohl im Kern (47), als auch im Cytoplasma (203) nachzuweisen. Neben dem mRNA-Abbau werden auch rRNAs (9), nukleäre und nekuleoläre RNAs (8) prozessiert. Einige Komponenten des humanen Exosoms sind bekannt: Ähnlich wie in der Hefe sind rRNA-prozessierende Proteine (hRrp4, 40, 41, 42, 43, 46, PM/Scf75, Mtr3) nachzuweisen und zusätzlich eine RNase D-like Untereinheit (PM/Scf100;10), eine putative Helicase (Kiaa0052) und das Protein mpp6, welches zellzyklusabhängig phosphoryliert werden kann.

Der genauere Mechanismus der Zuführung instabiler RNAs zum Exosom ist zur Zeit noch unklar. Für einige ARE-bindenenden Proteine konnte jedoch eine direkte Wechselwirkung mit dem Exosom nachgewiesen werden (81).

Ein zweiter, hauptsächlich in Hefen, selten bei Säugern verwendeter Abbauweg, setzt neben der Deadenylierung das Decapping der RNA voraus. Hierzu wird unter anderem ein Komplex aus den LSM-Proteine 1-7 benötigt (412) der die enzymatische Aktivität der Decapping-Enzyme Dcp1/Dcp2 stimuliert (123,241). Im Folgenden wird der RNA-Rumpf durch die Exonuclease Xrn1p in 5'-3' Richtung degradiert. In vielen Fällen sind die humanen Homologe bereits identifiziert.

1.6 Zielsetzung

Die Konservierung der HIV-1 Spleißstellen innerhalb der verschiedenen HIV-1 Isolate und die Häufigkeit des Auftretens der nicht-kodierenden HIV-1 Leaderexons in der frühen Infektionsphase, lässt eine regulatorische Funktion dieser Exons bei der viralen Genexpression als wahrscheinlich erscheinen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Spleißregulation der alternativen HIV-1 Leaderexons 2 und 3. Zum Einen wird in diesen beiden Exons nach neuen *cis*-wirkenden regulatorischen Sequenzen gesucht und es soll ihr Einfluss auf die Exon-Erkennung geprüft werden. Zum Anderen soll die Frage beantwortet werden, ob nach dem Herausspleißen des zwischen Exon 2 und 3 liegenden Introns die *cis*-wirkenden spleißregulatorischen Elemente, der beiden flankierenden Exons 2 und 3 als gemeinsames, *cis*-wirkendes Element mit neuen Eigenschaften das weitere Spleißen des Transkriptes beeinflussen können.

Bei der Analyse *cis*-wirkenden spleißregulatorischen Elemente im Mehr-Intron-Kontext, soll neben ihrem Einfluss auf das Spleißmuster auch ihr Einfluss auf die Reihenfolge der Intronentfernung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Serva und Roth verwendet. Die Zusammensetzung der Medien und Lösungen sind im jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder entstammen andernfalls den gängigen Laborhandbüchern (19,357).

2.1.2 Restriktionsendonukleasen

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

2.1.3 E.coli-Stämme

Für die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α F'IQ (Invitrogen Life technologies) verwendet.

2.1.4 Zellkultur

Die Expressionsstudien wurden mit der humanen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa-T4⁺ durchgeführt. Diese exprimiert aufgrund einer stabil integrierten Genkopie konstitutiv den membranständigen CD4-Rezeptor (275). Bei der Transfektion der Zellen mit Env-Expressionsvektoren interagiert das exprimierte Env-Glykoprotein (gp120) auf der Zelloberfläche mit dem CD4-Rezeptor der Nachbarzellen. Dies führt zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen durch eine Fusion der Plasmamembranen (Synzytium). Die Größe der gebildeten Fusionen, sowie die Anzahl der Kerne pro Synzytium erlauben Rückschlüsse auf die exprimierte Env-Glykoproteinmenge.

2.1.5 Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide wurde mit einem automatischen DNA-Synthesizer (Modell 381A, Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Abspaltung vom Träger (3 x 20 min) wurde NH_4OH verwendet, die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte über Nacht bei 55°C . Die Aufreinigung erfolgte mit NAP25-Säulen (Pharmacia) und die Elution mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm (Ultrospec II-4050, Pharmacia). Hierbei entspricht 1 OD_{260} : 50 μg ds DNA, 30 μg RNA bzw. 25 μg ss DNA.

2.1.6 Rekombinante Plasmide

Die verwendeten HIV-1 Sequenzen stammen vom Plasmid pNLA1 (395), einem cDNA-Derivat von HIV-NL4-3 (231). Diesem Klon fehlen durch ein vorausgegangenes Spleißereignis von SD1 auf SA2 die kodierenden Bereiche für Gag und Pol. Plasmide die zur RNA-Expression verwendet wurden, enthalten einen Replikationsursprung (*ori*) für die Replikation in *E.coli* unter relaxierter Kontrolle, das für β -Lactamase kodierende Ampicillinresistenzgen (*amp*) als prokaryotischen Selektionsmarker, den HIV-1 LTR (ohne seine ersten 110 Nukleotide) und die SV40early Polyadenylierungsstelle. Die Plasmide zur *env*-Expression enthalten anstelle des HIV-1 LTRs einen SV-Promotor und im 3' Bereich der Transkriptionseinheit das Simian Virus (SV40)t-Antigen Intron. Die verwendete Nummerierung der HIV Sequenzen bezieht sich auf die Ausgangssequenz des HIV-NL4-3 Isolates.

Der Sequenzabschnitt *Bss*III-*Eco*RI, der die alternativen Leaderexons 2 und 3 enthält, stammt aus einer cDNA-Sequenz, die von RNA aus HIV NL4-3 infizierten H9-Zellen revers transkribiert wurde (395). Das verwendete Nummerierungssystem bezieht sich auf die Ausgangssequenz HIV NL4-3 (311).

In diesem Teil nicht beschriebene Plasmide wurden bereits in der Diplomarbeit (189) beschrieben oder stammen aus unserem Labor und wurden daher bereits in anderen Diplom- bzw. Dissertationen beschrieben.

2.1.7 RNA-Expressionsvektoren

Alle verwendeten RNA-Expressionsvektoren enthalten den Promotor des HIV-1 LTRs (ab nt 110) und Sequenzen bis zum Ende des Exons 1. Der Intronbereich entspricht

der Sequenz des Introns 3'-wärts des SD4, der Bereich des Spleißakzeptors entstammt dem SA7, das 3'-wärts liegende Exon ist das Exon 4, wobei der *env*-Leserahmen durch das CAT-Gen (Chloramphenicolacetyltransferase) ersetzt wurde. Im 3'-Bereich wurde das RRE (Rev responsive element) eingefügt, um eine Rev-Reaktion testen zu können.

2.1.7.1 Ein-Intron Vektoren mit intronisierten Exonsequenzen

Das Plasmid **LTRSD SA7atCAT RRE pA** wurde von Dr. Jörg Krummheuer zur Verfügung gestellt, die Vektoren mit Einschluss der Exon 2,3 bzw. 23 und 23inv Sequenz wurden bereits während der eigenen Diplomarbeit hergestellt. Die Insertion der Mutationen $\Delta M1$ im Exon 2 erfolgte durch Restriktion des Plasmids mit *EcoRI* und *AvaI* und Insertion des Linkers (#1096/#1097). Die Mutation des ESS-Elementes erfolgte durch Insertion des Linkers (#1777/#1778) zwischen die Schnittstellen *StuI* und *PstI*.

LTRSD4SA7	LTRSD4Ex23SA7
LTRSD4Ex2SA7	LTRSD4Ex23SA7 $\Delta M1$
LTRSD4Ex2SA7 $\Delta M1$	LTRSD4Ex23SA7 ESS-
LTRSD4Ex3SA7	LTRSD4Ex23SA7 $\Delta M1$ ESS-
LTRSD4Ex3SA7 ESS-	LTRSD4Ex23invSA7

#1777: CCTTATTCTGACACATAGTTCTCCCTCTGTGTGAATATCAAGCAGGA
CATAACAAGCGCTGCA

#1778: GCGCTTGTTATGTCCTGCTTGATATTCACACAGAGGGAGAACTATGT
GTCAGAATAAGG

#1096: AATTCGGACAGCAGAGATCCACTTTGCTATC

#1097: GTCGATAGCAAAGTGGATCTCTGCGTTCCG

2.1.7.2 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2

(formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukte mit zwei alternativen Spleißakzeptoren oder –donoren)

Diesen Plasmiden wurde der vor dem Exon 2 liegende Spleißakzeptor oder der hinter dem Exon 2 liegende Spleißdonor hinzugefügt. Im ersten Fall wurde mit den

Primern (#1182;#1183) ein *EcoRI*/*Avall* Fragment erzeugt, im zweiten Fall mit den Primern (#1910;#1911) ein *Avall*/*PstI* Fragment. Die Mutation $\Delta M2$ wurde nachträglich durch eine PCR mit den Primern (#1249;#1252) am Plasmid LTRSD4SA2Ex2SA7 $\Delta M1$ eingefügt.

LTRSD4SA2Ex2SA7 LTRSD4Ex2SD2SA7
LTRSD4SA2Ex2SA7 $\Delta M1$ LTRSD4Ex2SD2SA7 $\Delta M1$
LTRSD4SA2Ex2SA7 $\Delta M1\Delta M2$

#1182: TGCTGGTCCTTTCCAAAGTGGATCTCTGCTGTCC

#1183: CTAGAATTCAGCAACAGACATACA

#1910: GACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATAC
AAGATAATAGTGACATAAAAGTACTGCA

#1911: GTACTTTTATGTCACTATTATCTTGTATTACTACTGCCCTTCACCT
TTCCAGAGGAGCTTTGCTG

#1249: GATCGGACCAGCAAAGCTCCTCTGCTATCACTCTGCTATAA

#1252: GATCCCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAATAAGGCCTTTCTTATAGCAGA

2.1.7.3 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2

Plasmide dieser Reihe enthalten sowohl den Spleißdonor SD2 als auch den Spleißakzeptor SA2. Die Spleißstellen wurden wie oben (2.1.7.2) beschriebenen eingefügt. Die Mutationen $\Delta M1$ SF2-, $\Delta M2$ SF2-, wurden mittels Linker (#2033; #2035 bzw. #2055; #2056) nachträglich eingefügt, die Mutation $\Delta M1$ pNL mittels PCR am Vektor LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 (#1814; #2116).

LTRSD4SA2Ex2SD2SA7
LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 $\Delta M1$
LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 $\Delta M2$
LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 $\Delta M1$ SF2-
LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 $\Delta M2$ SF2-
LTRSD4SA2Ex2SD2SA7 $\Delta M1$ pNL

#1814: GCGCGCACGGCAAGA

#2033: GTCTTTACCAA

#2035: CACTTTGGTAAA

#2055: TTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGAAAGGACTAGCA
AAGCTCCTCTGGGAAGGTGAAGGGGCAGTAG

#2056: TATTCTGCAGTACTTTTATGTCACTATTATCTTGTATTA
CTACTGCCCTTCAC

#2116: AGCTGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGAAGGGACCAGCAAAGCTC

2.1.7.4 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 3

(formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukte mit zwei alternativen Spleißakzeptoren oder –donoren)

Diesen Plasmiden wurde der vor dem Exon 3 liegende Spleißakzeptor oder der hinter dem Exon 3 liegende Spleißdonor hinzugefügt. Im ersten Fall wurde mit den Primern (#1908;#1909) ein *EcoRI/StuI* Fragment erzeugt, im zweiten Fall mit den Primern (#1188;#1189) ein *AvrII/PstI* Fragment.

LTRSD4SA3Ex3SA7

LTRSD4Ex3SD3SA7

LTRSD4SA3Ex3SA7 ESS-

LTRSD4Ex3SD3SA7 ESS-

#1188: CTACTGCAGGGTTTTATTAATGCTGC

#1189: CTACCTAGGTGTGAATATCAAGCA

#1908: GATCGAATTTCGATATAGCACACAAG

#1909: GATCAGGCCTTTCTTATAGCAGAGTCTGAAA

2.1.7.5 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 3

Plasmide dieser Reihe enthalten sowohl den Spleißdonor SD3, als auch den Spleißakzeptor SA3, welche in der oben (2.1.7.4) beschriebenen Art eingefügt wurden. Die Mutation SRp55 wurde nachträglich durch eine PCR mit den Primern (#2034;#1817) am Plasmid LTRSD4SA3Ex3SD3SA7 ESS- eingefügt.

LTRSD4SA3Ex3SD3SA7

LTRSD4SA3Ex3SD3SA7 ESS-

LTRSD4SA3Ex3SD3SA7 ESS- SRp55-

#1817: CTTTACGATGCCATTGGGA

#2034: GATCAGGCCTTATTCTGACACATAGTTCTCCCTCTGTGTAAATATCAAGC
AGGACATAAC

2.1.7.6 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 23

(formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukte mit zwei alternativen Spleißakzeptoren oder –donoren)

Diesen Plasmiden wurde der vor dem Exon 2 liegende Spleißakzeptor oder der hinter dem Exon 3 liegende Spleißdonor hinzugefügt. Im ersten Fall wurde mit den Primern (2.1.7.2) ein *EcoRI*/*AvaI* Fragment erzeugt, im zweiten Fall mit den Primern (2.1.7.4) ein *AvrII*/*PstI* Fragment.

LTRSD4SA2Ex23SA7	LTRSD4Ex23SD3SA7
LTRSD4SA2Ex23SA7 ΔM1	LTRSD4Ex23SD3SA7 ΔM1
LTRSD4SA2Ex23SA7 ESS-	LTRSD4Ex23SD3SA7 ESS-
LTRSD4SA2Ex23SA7 ΔM1 ESS-	LTRSD4Ex23SD3SA7 ΔM1 ESS-

2.1.7.7 Drei-Exon-zwei-Intron Vektoren mit Exon 2 und 3

Plasmide dieser Reihe enthalten sowohl den Spleißdonor SD3 als auch den Spleißakzeptor SA2 welche in der oben (2.1.7.4 und 2.1.7.2) beschriebenen Art eingefügt wurden.

LTRSD4SA2Ex23SD3SA7
LTRSD4SA2Ex23SD3SA7 ΔM1
LTRSD4SA2Ex23SD3SA7 ESS-
LTRSD4SA2Ex23SD3SA7 ΔM1 ESS-

2.1.7.8 Vier-Exon-drei-Intron Vektoren

Die Vektoren dieser Reihe enthalten Sequenzen des Plasmids pNL 4-3. Der Abschnitt zwischen dem ersten Spleißdonor (nt 629) und dem terminalen Spleißakzeptor (nt 1105 bzw. nt 1341) wurde mit den Primern (#1814; #1817) amplifiziert und als *EcoRI*/*PstI* Fragment in den Vektor LTRSDSA kloniert. Die Mutationen in den Exons 2 und 3 wurden durch nahtlose Ligation mittels der Primerpaare (#1814/#2147 und #2150/#1817) eingefügt. Das gekürzte mittlere Intron entstand durch direkte Ligation der SD2 Sequenz mit der SA3 Sequenz.

LTR SD SA2Ex2SD2 komplett SA3Ex3SD3 SA7 alles gpt (dsEx2dsEx3 kompl.)

LTR SD SA2Ex2SD2 kurz SA3Ex3SD3 SA7 (dsEx2dsEx3 kurz)

LTR SD SA2Ex2SD2 komplett SA3Ex3SD3 SA7 Δ M1 alles gpt (dsEx2dsEx3 kompl. Δ M1)

LTR SD SA2Ex2SD2 komplett SA3Ex3SD3 SA7 ESS- alles gpt (dsEx2dsEx3 kompl. ESS-)

LTR SD SA2Ex2SD2 komplett SA3Ex3SD3 SA7 Δ M1 ESS- alles gpt (dsEx2dsEx3 kompl. Δ M1 ESS-)

#1814 : GCGCGCACGGCAAGA

#1817 : CTTTACGATGCCATTGGGA

#2147: GATCGAAGACAAATAGCAAAGTGGATCTCTG

#2150: GATCGAAGACAACACTATCGACCAGCAAAGCTCCT

2.1.8 Env-Expressionsvektoren

SVsd_xSD4 Δ vp_{uenv} : Das Plasmid SVGARSD4 Δ vp_{uenv} wurde von Dr. Marcel Freund zur Verfügung gestellt. Die zu untersuchenden Exonsequenzen wurden an die Stelle des GAR-Fragmentes kloniert, welches von einer *Eco*RI und *Sac*I Restriktionsschnittstelle flankiert wird. Wenn nicht anders erwähnt wurden die Sequenzen als Linker eingefügt.

SV sd2 SD4	Zur Verfügung gestellt von Dr. Marcel Freund.
SV sd2 SD4 Δ M1	#1904: AATTCGGACAGCAGAGATCCACTTTGGTAAAG ACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGAGCT
	#1905: CCTTTCCAGAGGAGCTTTGCTGGTCTTTACC AAAGTGGATCTCTGCTGTCCG
SV sd3 SD4	Zur Verfügung gestellt von Dr. Marcel Freund.
SV sd3 SD4 ESS-	#1906: GATCGAATTCACTCTGCTATAAGAA #1907: GATCGAGCTCCTTGTTATGTCCTGC
SV sd3 SD4 ESS-SF2-	#922: GAGCGAATTCACTCTGCTATAAGAAAGGCCT #2066: GATCGAGCTCGTTATGTCCTGGTTGATATTCA CACAG
SV sd3 SD4 5' Bereich	#1958: AATTCACTCTGCTATAAGAAAGGCCTTATGAGCT #1959: CATAAGGCCTTTCTTATAGCAGAGTG
SV sd3 SD4 mittlerer Bereich	#1960: AATTCTTTAGGACACATAGTTAGCCCTAGGGA GCT

	#1961: CCCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAAAG
SV sd3 SD4 mittlerer Bereich ESS-	#1962: AATTCTTTCTGACACATAGTTCTCCCTCTGTGAGCT
	#1963: CACAGAGGGAGAACTATGTGTCAGAAAG
SV sd3 SD4 3' Bereich	#1964: AATTCTTGTGAATATCAAGCAGGACATAACGAGCT
	#1965: CGTTATGTCCTGCTTGATATTCACAAG
SV sd3 SD4 3' Bereich SF2-	#1968: AATTCTTGTGAATATCAACCAGGACATAACGAGCT
	#1969: CGTTATGTCCTGGTTGATATTCACAAG
SV sd3 SD4 3' Bereich SRp55-	#1966: AATTCTTGTAAATATCAAGCAGGACATAACGAGCT
	#1967: CGTTATGTCCTGCTTGATATTTACAAG
SV sd23 SD4	#923: GAGCGAATTCGGACAGCAGAGATCC
	#1534: GATCGAGCTCCTTGTTATGTCCT
SV sd23 SD4 Δ M1	#1904: AATTCGGACAGCAGAGATCCACTTTGGTAAAGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGAGCT
	#1905: CCTTTCCAGAGGAGCTTTGCTGGTCTTTACCA AAGTGGATCTCTGCTGTCCG
SV sd23 SD4 Δ M1 Δ M2	#2184: GTACAGGCCTTTCTTATAGCAGAGTGATAGCA GAGGAGGCTTTGCTGGTCG
	#2187: GTACGAATTCGGACAGCAGAGATCCACTTTGC TATCGACCAGCAAAGCTC
SV sd23 SD4 ESS-	#1777: CCTTATTCTGACACATAGTTCTCCCTCTGTGTG AATATCAAGCAGGACATAACAAGCGCTGCA
	#1778: GCGCTTGTTATGTCCTGCTTGATATTCACACAG AGGGAGAACTATGTGTCAGAATAAGG

2.1.9 Plasmide zur Kotransfektion

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

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

pGL3control (Promega) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in Protein-Präparationen verwendet. Es exprimiert das *Luciferase*-Gen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) unter der Kontrolle des SV40early-Promotors (6).

pXGH5 (368) wurde als Reporterplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz in RNA-Präparationen verwendet. Es exprimiert das menschliche Wachstumshormon (hGH) unter der Kontrolle des Maus-Metallothionein-1 Promotors (mMT1). Normalerweise wird das Gen nur in den Zellen des Hypophysen-Vorderlappens exprimiert.

pSVT7 (35) wurde bei Transfektionsexperimenten zur Protein-Analyse als Negativkontrolle und zum Ausgleich der DNA-Mengen verwendet.

2.1.10 Plasmide für die *in vitro* Transkription

Die Plasmide **pSVT7Exon2** und **pSVT7Exon3** wurden über eine *EcoRI-PstI* Restriktion, Isolation der entsprechenden Intronfragmente der Plasmide der LTRSD X SATatCAT RRE pA-Serie und der Ligation dieser Fragmente in den *EcoRI-PstI* geöffneten Vektor SVcrev kloniert.

2.1.11 Plasmide zur Kontrolle der Kern-/Cytoplasma Aufreinigung

pT7cytCoxII (239) enthält die Nukleotide 7576-8102 der humanen mitochondrialen Cytochrom C Oxidase II (Genbank Acc. No. 001807) die als *EcoRI/XhoI* Fragment in pSP73 inseriert worden waren. Mittels der RT-PCR Primer #789 und #788 konnte ein 557 Nt langes DNA-Fragment amplifiziert werden, welches zur Überprüfung der Kern-RNA auf Verunreinigung mit Cytoplasma-RNA verwendet wurde.

p β -actin intron (239) enthält die Nukleotide 1729-2050 des Intron C des humanen β -Aktins (Genbank Acc. No. E00829). Es war als *EcoRI/XhoI*-Fragment in pSP73 inseriert worden. Mittels der RT-PCR Primer #822 und #823 konnte ein 338 Nt langes DNA-Fragment amplifiziert werden, welches zur Überprüfung der Cytoplasma-RNA auf Verunreinigung mit Kern-RNA verwendet wurde.

2.1.12 Primer für die PCR

Probe

#481/1814: 5'- GCGCGCACGGCAAGA

#559/1817: 5'- CTTTACGATGCCATTGGGA

hGH

#1070: 5'- GATGCGGAGCAGCTCTAGGTTGGATTT

#1071: 5'- TTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAG

Cytochrom C

#789: 5'-GATGAATTCATATATCTTAATGGCACATGC

#788: 5'- GGCCTCGAGCTGTTTTTAAGCCTAATGTG

β-Actin

#822: 5'-TCTAGAATTCTCTCTTCTGCCGTT

#823: 5'-AGCGCTCGAGGGACAGCCAGGCCA

2.1.12.1 Primer für die Spleißreihenfolge

E1 (=1814): 5'- GCGCGCACGGCAAGA

E2 (=2142): 5'- GCTCTCCTCTGTCGAGTAACGCC

E3 (=2123): 5'-CTTTCCAGAGGAGCTTTGCT

E4 (=2142): 5'-GGACAGCAGAGATCCAGTTTG

E5 (=2142): 5'-CTTGTTATGTCCTGCTTGATATTC

I1 (=2141): 5'-CAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACAG

I2 (=2113): 5'-TTAATGCTGCTAGTGCCAAG

I3 (=2122): 5'-CTAATTCTCCCCGCTTAAT

I4 (=2142): 5'-GTAGACCCTGACCTAGCAGACC

I5 (=2142): 5'-GGTCAGGGTCTACTTGTGTGC

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktionsanalyse und Auftrennung von DNA durch Agarosegele (1%) und Low melt Gele (0,8%), Ligation von DNA und Transformation kompetenter Zellen wurden den Laborhandbüchern Molecular Cloning (357) und Current Protocols in Molecular Biology (19) entnommen.

2.2.1 Klonierung rekombinanter Plasmide

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der für die Klonierungen benötigten DNA-Fragmente wurden in 50 μ l Volumen mit 1,25 U Pwo-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 0,1 Volumen 10 x PCR-Puffer + $MgSO_4$ (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 x 30 sec 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C; Extension: 1 x 10 min 72°C). Die PCR-Produkte wurden Phenol/Chloroform (24:1) extrahiert, in 2,5 Vol EtOH und 1/10 Vol 4 M LiCl präzipitiert und in 25 μ l Tris-EDTA (TE) resuspendiert.

2.2.1.2 Restriktion und Aufreinigung von Plasmidfragmenten über Low melt Gelelektrophorese

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

2.2.1.3 Ligation

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

2.2.1.4 Nahtlose Ligation

Zur Klonierung von Punktmutationen in Abwesenheit adäquater Restriktionsschnittstellen wurden zwei-Insert-Klonierungen über zwei PCR-Reaktionen vorgenommen (Abb. 8). Einer der inneren Primer trug dabei die zu setzenden Mutationen sowie an seinem 5'-Ende eine Erkennungsstelle für ein TypII Restriktionsenzym wie beispielsweise *BbsI* oder *Esp3I*. Der zweite, innere Primer trug ebenfalls eine Erkennungsstelle für ein TypIIs Restriktionsenzym. Ein Restriktionsdauer beider PCR-Produkte mit diesem TypIIs Enzym entfernt die Erkennungssequenz und führt gleichzeitig zu kompatiblen, ligierbaren Überhängen innerhalb der Ursprungssequenz. So kann eine Mutation ohne Naht bzw. Restriktionsstelle in die zu mutierende DNA-Sequenz eingefügt werden (327).

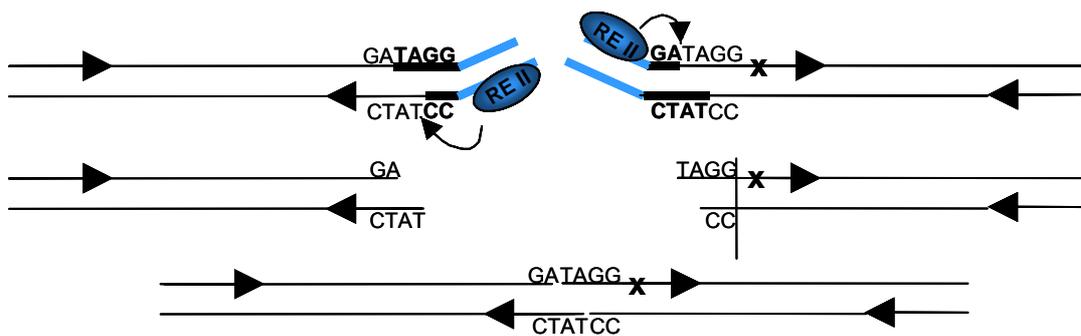


Abb. 8: Schematische Darstellung der nahtlosen Ligation. Um an einem bestimmten Punkt (X) eine Mutation einzufügen, obwohl in deren unmittelbarer Nähe keine Restriktionsschnittstelle vorhanden ist und zudem keine neue Schnittstelle eingefügt werden soll, werden die entsprechenden inneren Primer für eine Zwei-Insert-PCR-Klonierung über nahtlose Ligation designt. Dabei wird am 5'-Ende der Primer eine Erkennungsstelle für ein Typ II-s-Restriktionsenzym integriert. Das hier bindende Enzym schneidet sequenzunabhängig in definiertem Abstand weiter 3'-wärts in der authentischen Template-Sequenz (Schwarz dargestellt). Die PCR-Produkte besitzen nach der Restriktion komplementäre, überhängende Enden innerhalb der Template-Sequenzen einschließlich der eingefügten Mutation (X). Die zu inserierenden Fragmente können so ohne Restriktionsschnittstelle nahtlos ligiert werden. Die Restriktion und Ligation an den äußeren Primern erfolgt parallel konventionell.

2.2.1.5 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien mit Rubidium-Chlorid

E.colis DH5 α F'IQTM (GIBCO BRL) wurden aus einem Glycerin-Stock auf LB-Kanamycinagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml LB-Medium (25 μ g Kanamycin/ml) wurden mit einer Kolonie beimpft, 1 h bei 37°C inkubiert, in eine 200 ml Kultur überführt und bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 15 min mit 600 x g bei 4°C zentrifugiert und die Präzipitate in je 20 ml TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4 H₂O, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂·2 H₂O, 15% Glycerol, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, steril filtriert) resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 600 x g, 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in je 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, pH 6,8 mit NaOH eingestellt, autoklaviert) resuspendiert, zu je 50 μ l Aliquots in vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in einem Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.1.6 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Für eine Transformation wurden ein Aliquot (50 μ l) der kompetenten *E.coli* Bakterien kurz aufgetaut, 10 min auf Eis gekühlt und, nach Zugabe von 5 μ l des Ligationsansatzes, weitere 20 min auf Eis gehalten. Nach einem 90 Sekunden dauernden Hitzeschock bei 42°C wurde die Reaktion kurz auf Eis abgekühlt, in 800 μ l SOC aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (220rpm) inkubiert. 400 μ l der Bakterien-suspension wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigem (100 μ g/ml, Roche Molecular Biochemicals) LB-Agar (Gibco BRL, Luria Broth Base) ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Bei Klonierungen mit mehreren Fragmenten wurden die Reste des Ligations- und Transformationsansatzes über Nacht bei Raumtemperatur für eine eventuelle Wiederholung der Transformation aufbewahrt.

2.2.2 Analytische Präparation von Plasmid-DNA

Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 3 ml Luria Broth Base-Medium, supplementiert mit Ampicillin (100 μ g/ml; Boehringer Mannheim), mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach dem "QIAscreen Mini preparation"-Protokoll (QIAGEN) isoliert. Die Kontrolle der präparierten Plasmid-

DNA erfolgte durch Restriktionsanalyse mit geeigneten Enzymen und analytischer Gelelektrophorese.

2.2.3 Präparative Plasmid-Isolierung

Zur präparativen Plasmidisolierung wurden 150 ml Luria Broth Base-Medium, supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml; Boehringer Mannheim), mit 50 µl Kultur eines positiven Klons angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach dem "Qiagen Maxi preparation"-Protokoll (QIAGEN) isoliert. Die Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsanalyse mit geeigneten Enzymen und analytischer Gelelektrophorese. Positive Klone wurden zusätzlich am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ansequenziert.

2.2.4 Zellkultur

Die Expressionsstudien wurden in HeLa-T4⁺ Zellen transient, unter nichtreplikativen Bedingungen ausgeführt. 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) und bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert. Für die Transfektion wurden subkonfluente Zell-Monolayer durch zweimaliges 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) und 8 minütiger Inkubation mit 2,5 ml ATV (0,025% (w/v) N-acetyliertes Trypsin; 0,05 % (w/v) EDTA in PBS_{def}) bei 37°C abgelöst.

2.2.5 Transfektion mittels nicht-liposomalem Transfektionsreagenz (FuGene™6)

Es handelt sich um ein transientes Transfektions-Protokoll, bei dem die transfizierte DNA nicht stabil in das Genom integriert und nicht repliziert wird. Die Transfektionsmethode wurde für Western Blot-Analysen und RT-PCR verwendet.

Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin wurde die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Ausschlußfärbung (0,5 % w/v Trypanblau) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 2,5 x 10⁵ Zellen wurden in 6-well-Platten (Nunc) mit 3 ml DMEM supplementiert mit 10% FKS ausplattiert. Die Transfektion wurde nach 24 h mit FuGene™6 Transfektio-

onsreagenz (Roche Molecular Biochemicals) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für Western Blot-Analysen erfolgte 24 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel und nach 48 h wurden die Proteine präpariert. Transfizierte Zellen für die RT-PCR wurden nach 30 h geerntet.

2.2.6 Proteinanalysen mittels Immunoblot

2.2.6.1 Proteinpräparation transfizierter Zellen

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

2.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode bestimmt. Sie beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm nach 595 nm aufgrund der Bindung von Proteinen (48). Die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Probe in zwei Verdünnungen (1:20, 1:40) und in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 50 µl verdünnten Zellextrakt und 200 µl Bradford-Reagenz (Protein-Assay, Bio-Rad, 1:5 verdünnt). Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte in Mikrotiterplatten (Nunc) in einem ELISA-Reader (SLT Rainbow, SLT Labinstruments) gegen einen BSA (Rinderserum-albumin)-Standard von 0-20 µg Protein.

2.2.6.3 Normierung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Assay

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

2.2.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nachdem die Proben auf gleiche RLU-Werte normiert und die Proteinmengen mit mock-transfiziertem Zellextrakt (pSVT7) angeglichen wurden, erfolgte die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einer vertikalen Flachbett-Elektrophorese in diskontinuierlichen 0,1 % SDS/ 7 % Polyacrylamid-Gelen (Roth, Rotiphorese Gel 30) bei 50 V in ca. 14 h. Als Laufpuffer wurde 1 x SDS-Puffer (0,8 % SDS, 0,2 M Tris-Base, 1,9 M Glycin) und als Molekulargewichtsstandard der „prestained proteinmarker low range“ (BioRad) verwendet.

2.2.6.5 Reversible Zink-Imidazol-Färbung von SDS Polyacrylamidgelen

Das SDS Polyacrylamidgel wurde kurz in ddH₂O gewaschen und dann für 5 Minuten in einer Natriumcarbonatlösung (1 %) inkubiert. Danach wurde das Gel 15 Minuten in einer Imidazol-SDS Lösung (0,2 M Imidazol; 0,1 % SDS) inkubiert und 10 Sekunden mit Wasser gespült. Es folgte eine Inkubation mit einer Zinksulfat Lösung (ZnSO₄ 0,2 M) bis die Banden deutlich zu sehen waren (30 sek bis 5 min) und zweimaliges Spülen des Gels für 10 Sekunden in ddH₂O. Anschließend wurde das Gel erneut zweimal für 5 Minuten in ddH₂O gespült. Die Lagerung der gefärbten Gele erfolgte in Natriumkarbonat (Na₂CO₃, 1 %), die Entfärbung vor dem Blotten durch Inkubation mit 100 mM EDTA (137,138).

2.2.6.6 Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel erfolgte durch einen Elektroblot in Transferpuffer (200 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20% Methanol) für eine Stunde unter Durchflusskühlung bei 70 V auf eine PVDF-Membran (Millipore, Immobilon-P). Beim Nachweis exprimierter Glykoproteine wurde die Membran 15 min mit Milchpulver-Blockierung (10 % (w/v) Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween) inkubiert. Die Erstantikörper-Inkubation erfolgte für 1 h mit einem monoklonalen Maus-anti-gp120-Antikörper (87-133/026, Dade Behring; 1:5000 verdünnt in PBS mit 5 % Milchpulver, 0,1 % Tween). Nach 3-maligem Waschen für 10 min mit PBS folgte die Zweitantikörper-Inkubation (POD-gekoppelte Schaf-anti-Maus-F(ab')₂-Fragmente, NA9310, Amersham; 1:1000 verdünnt in PBS mit 10 % Milchpulver, 0,1 % Tween) und 5-maliges Waschen für je 10 min in PBS.

Alternativ zu diesem Protokoll wurden Membranen mit SR- oder hnRNP-Proteinen über Nacht in Blockierlösung (PBS; 10% Tween-20; 10% BSA) inkubiert. Vor, zwischen und nach der 1-stündigen Antikörperinkubation wurde die Membran jeweils für 1 x 15 min und 2 x 5 min in Waschpuffer (PBS; 1% Tween-20; 1% BSA) gewaschen. Als Erstantikörper diente ein polyklonaler anti-ASF/SF2-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, anti-goat 1:2000 verdünnt in Waschpuffer) bzw. ein polyklonaler anti-hnRNP A1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology ; anti-goat, 1:2000 verdünnt in Waschpuffer) und als Zweitantikörper wurden mit Meerrettich-Peroxidase (POD)-gekoppelte Schaf-anti-mouse-F(ab')₂-Fragmente (NA9310, Amersham; 1:1000 verdünnt in Waschpuffer) verwendet.

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

2.2.7 RNA-Analysen mittels RT-PCR

2.2.7.1 Präparation von Gesamt-RNA

(nach einem modifizierten Protokoll von 87).

30 h nach der Transfektion wurden die transfizierten HeLa-T4⁺ oder –Bristol Zellen eines Wells einer 6-well Platte zweimal mit PBS gewaschen und danach mit einem Zellschaber in 500 µl 1x SolD (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Acetat pH

7; 0,5 % N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β -Mercaptoethanol) gekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Es folgte die Ansäuerung der Fraktion mit 60 μ l 4M Na-Acetat pH 4 und die Zugabe von 600 μ l wassergesättigtes Phenol. Der Zugabe von 100 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und Inkubation für 20 Minuten auf Eis folgte die Zentrifugation (20 min, 4°C, 8.500 x g) zur Phasentrennung. Die RNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt, präzipitiert (4°C, 10.300 x g, 20 min), 2-mal mit je 150 μ l 70% DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 16 μ l DMDC-ddH₂O resuspendiert.

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

(nach einem modifizierten Protokoll von 87).

Es wurde ein Natriumdeoxycholat-haltiger, hypotonischer Lysispuffer verwendet, der neben der freien RNA auch die membrangebundene cytoplasmatischen RNA freisetzen soll (34,421). HeLa-T4⁺-Zellen wurden 30 h nach der Transfektion mit eiskaltem PBS sowie mit hypotonischem Waschpuffer (1,5 mM KCL; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM Tris HCl; pH 7,4) gewaschen und mit 2 ml eiskaltem hypotonischem Lysispuffer (1 % Na-Deoxycholat; 1 % Triton-X-100; 1,5 mM KCL; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM Tris HCl; pH 7,4) für 10 Minuten auf Eis lysiert (413). Unlösliche Bestandteile sowie Verunreinigungen der cytoplasmatischen Fraktion durch Zellkerne wurden durch 5 minütige Zentrifugation (500xg; 4°C) sedimentiert und der Überstand mit gleichem Volumen heißer (80°C), doppelt konzentrierter Solution D (8 M Guanidinium-Isothiocyanat; 50 mM Na-Citrat pH 7; 1 % N-Laurylsarkosin; 0,2 M β -Mercaptoethanol) versetzt. Die Zellkerne wurden in 500 μ l hypotonischem Waschpuffer geschabt, zentrifugiert (500x g; 0°C) und in 200 μ l Solution D (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM Na-Citrat pH 7; 0,5 % N-Laurylsarkosin; 0,1 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Es folgt die Ansäuerung der Fraktionen mit 0,1 Volumen Na-Acetat (2 M; pH 4). Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol und 0,1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1), gründlichem Mischen und Inkubation auf Eis (15 Minuten) folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (20 Minuten; 9200 x g; 4°C). Die wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und die RNA über Nacht bei 4°C gefällt. Die cytoplasmatische RNA wurde mit 500 μ l 70 % DMDC-Ethanol gewaschen, getrocknet und in 16 μ l DMDC-H₂O gelöst, während die nukleäre RNA mit 100 μ l 70 % DMDC-Ethanol gewaschen und in 8 μ l DMDC-H₂O resuspendiert wurde. Konzentrationen und Ausbeu-

te wurden durch spektralphotometrische Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm bestimmt. Zur Qualitätskontrolle der Kern- und Cytoplasma-RNA-Fractionen wurde innerhalb des RT-PCR-Nachweises auch RNA der cytoplasmaspezifischen mitochondriale Cytochrom C Oxidase Untereinheit II (pT7CCII) und des kernspezifischen humanen β -Actin Intron C (p β -actin intron) nachgewiesen.

2.2.7.3 DNase Inkubation und cDNA-Synthese

Jeweils 4 μ g RNA (8 μ l der Cytoplasma- und Gesamt-RNA-Ausbeute, die gesamte RNA der Kern-Präparation) wurden mit 1 μ l DNase Puffer (50 mM Tris; 10 mM $MgCl_2$) und 1 μ l DNase (20 U; Boehringer Mannheim) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Minuten bei 80 °C inaktiviert. Die Konzentration der RNA wurde durch spektralphotometrische Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt. 1-2 μ g der RNA wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt (je 875 μ M Deoxynucleosidtriphosphate [Perkin-Elmer]; je 375 nM dT₍₁₅₎-Primer [Boehringer Mannheim]; 10 mM DTT; 20 U rekombinanter RNase-Inhibitor [Perkin-Elmer]; 200 U RT-MMLV-RT [Promega]; 1x First Strand Buffer [Gibco BRL]; 30 min; 37°C).

2.2.7.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation erfolgte mit 1/10 Volumen des cDNA-Ansatzes und in einem Volumen von 50 μ l (420 nM 5'-Primer und 3'-Primer; 0.1 Volumen 10x PCR-Puffer [Perkin-Elmer]; 8 U AmpliTaq [Perkin-Elmer]; 550 μ M Deoxynucleosidtriphosphate [Perkin-Elmer]) im Robocycler Gradient 96 (Stratagene). Die PCR-Reaktion zur Detektion der gespleißten hGH-RNA erfolgte mit den Primern #1070 und #1071 (2.1.12), die Detektion der RNA der Exon 2/3 Konstrukte mit den Primern #481 und #559 (2.1.12) gemäß folgendem Protokoll: Denaturierung 1 x 94°C, 3 min; Amplifikation: 28 x (94°C, 30 sec; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min); Extension: 1x 72°C, 10 min. Der lineare Bereich der PCR wurde vorher durch Probenentnahme nach jedem Zyklus und Auswertung der Amplifikatmenge ermittelt.

Die Auftrennung der PCR-Produkte zur Detektion des Spleißmusters erfolgte auf einem 3 % Metaphorgel. Banden, die ansequenziert werden sollten, wurden auf einem PAA-Gel aufgetrennt, herausgeschnitten und über Nacht in 300 μ l ppt-Puffer (0,3 M

NaAc, 1 mM EDTA) inkubiert. Der Acrylamid-freie Überstand wurde mit dem Qia-gen Purification Kit gereinigt und aufkonzentriert.

2.2.8 Prokaryotische *in vitro* Transkription

Die **T7 *in vitro* Transkriptionskonstrukte** wurden mit *Eco47III* linearisiert, Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumenteilen EtOH präzipitiert, mit 70 % EtOH gewaschen und in TE resuspendiert. Zur Transkription wurde der T7-Megashortsript Ansatz von Ambion gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.9 Pull down

1000 pmol RNA wurden mit 1M NaOAc-Lösung pH 5 und 0,1 M Na-m-Periodat-Lösung für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert und danach mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Über Nacht wurde die iodierter RNA an die gereinigten Dihydrazid-Agarose-Beads in 0,1 M NaOAc bei 4°C gebunden. Der Entfernung ungebundener RNA folgte die 30 minütige Inkubation in 500 µl Hela Kernextrakt (Dignam) in Puffer D. Nach mehrmaligem Waschen der Beads bzw. der gebundenen RNA wurde das letzte Präzipitat in 100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen, für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und 75 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3 Ergebnisse

Sowohl transkriptionelle als auch ko- und posttranskriptionelle Mechanismen wie Capping, Spleißen und Polyadenylierung tragen zur Regulation der HIV-1 Expression bei. Dabei werden durch das Spleißen zum Einen die entsprechenden Transkripte für die jeweiligen HIV-1 Protein bereitgestellt, zum Anderen durch den alternativen Einschluss nicht-kodierender Exons, diese in ihrer Menge reguliert, da die nicht-kodierenden Exons die Stabilität der mRNAs variieren können (239). Somit trägt das alternative Spleißen in zweierlei Hinsicht zur HIV-1 Genregulation bei. Untersuchungen des HIV-1 Genoms zeigten, dass die Verwendung von alternativen Spleißstellen meistens durch sogenannte „splicing enhancer“ oder „splicing silencer“ reguliert wird, die sowohl im Exon (ESS/ESE) als auch im Intron (ISS/ISE) liegen können (s. S. 34, Abb. 7; 319,363,364,366). Im Folgenden sollte der molekulare Mechanismus untersucht werden, der zum Einschluss bzw. Ausschluss der beiden nicht-kodierenden HIV-1 Leaderexons führt. Es sollte analysiert werden, welche *cis*-wirkenden Sequenzen und welche Proteine für das alternative Spleißen dieser beiden nicht-kodierenden Exons verantwortlich gemacht werden können.

3.1 Erstellung eines subgenomischen Minigenkonstruktes, dass bezüglich der nicht-kodierenden Leaderexons 2 und 3 ein adäquates Spleißmuster wie im genomischen Kontext zeigt

Um die molekularen Untersuchungen nicht unter S3 Bedingungen durchführen zu müssen, wurde zunächst ein subgenomisches, nicht-infektiöses Minigenkonstrukt hergestellt, dessen Spleißmuster bezüglich der nicht-kodierenden Leaderexons 2 und 3, dem des HIV-Isolates NL4.3 gleichen sollte.



Abb. 9: Analyse der Leaderexpression im pNL4-3. **A:** Schematische Darstellung von pNL 4-3 mit Angabe der Primer für den spezifischen RNA-Nachweis. **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. PM1-Zellen wurden mit pNL4-3 infiziert, nach 30 Stunden geerntet und die RNA aufgereinigt. 2 µg der isolierten RNA wurden mit einem spezifischen Primer (E2, s. M&M 2.1.12.1, S. 51) revers transkribiert und in der folgenden PCR mit den Primerpaar E1/E2 (s. M&M 2.1.12.1, S. 51) amplifiziert. Den auf dem 3% Metaphor-Gel sichtbaren Banden wurden die rechts abgebildeten gespleißten Transkripte zugeordnet.

3.1.1 Analyse des Spleißmusters der Leaderexons von HIV-NL4.3 in PM1 Zellen

Für die Analyse des HIV-1 Spleißmusters wurde RNA verwendet, die nach der Infektion von PM1 Zellen mit HIV-NL4.3 isoliert worden war und freundlicherweise von Prof. Hauber, Hamburg, zur Verfügung gestellt worden war. Die Primer wurden so gewählt, dass aus dem Pool der revers transkribierten cDNAs spezifisch eine *tat*-mRNA amplifiziert werden konnte, welche neben den Exons 1 und 4 auch wahlweise die Leaderexons 2 und/oder 3 enthalten konnte (Abb. 9 A). Die Analyse des Spleißmusters zeigte einen starken Einschluss von Exon 3 (39 %) und einen deutlich schwächeren von Exon 2 (24 %). Der Einschluss bzw. Ausschluss beider Exons lag bei lediglich 17 % bzw. 19 %. Ein Vergleich dieser Daten mit denen von Purcell und Martin (336), bei denen das retrovirale Spleißmuster von HIV-NL4-3 infizierten HeLa Zellen untersucht worden war, zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit den Spleißmustern der Leaderexons in der frühen Infektionsphase (Abb. 8 oben und Abb.

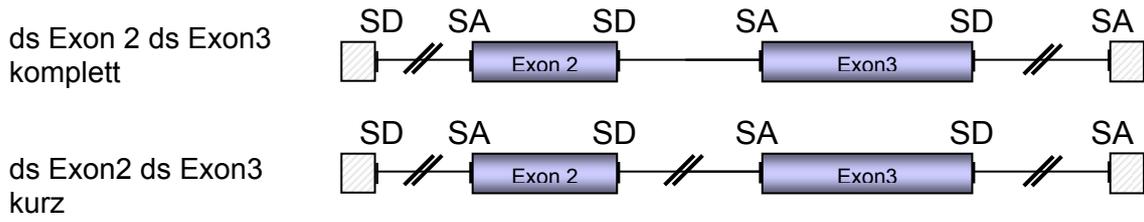
10 D, grün). Lediglich die Expression der RNA ohne Leaderexons war etwa sechsfach geringer (Abb. 10 D). Aus diesem Vergleich der Exonerkenkung ließen sich zwei Erkenntnisse ableiten: Zum Einen war der qualitative Einschluss der Leaderexons unabhängig davon, ob PM1-Zellen oder HeLa-Zellen verwendet wurden, zum Anderen beeinflusste offensichtlich der Zelltyp die quantitative Menge der Exonerkenkung, also die Menge an RNA, die ohne Leaderexon nachgewiesen wurde.

3.1.2 Aufbau des Minigenkonstruktes zur Untersuchung des Leaderexoneinschlusses und Vergleich des Spleißmusters mit HIV-NL4.3

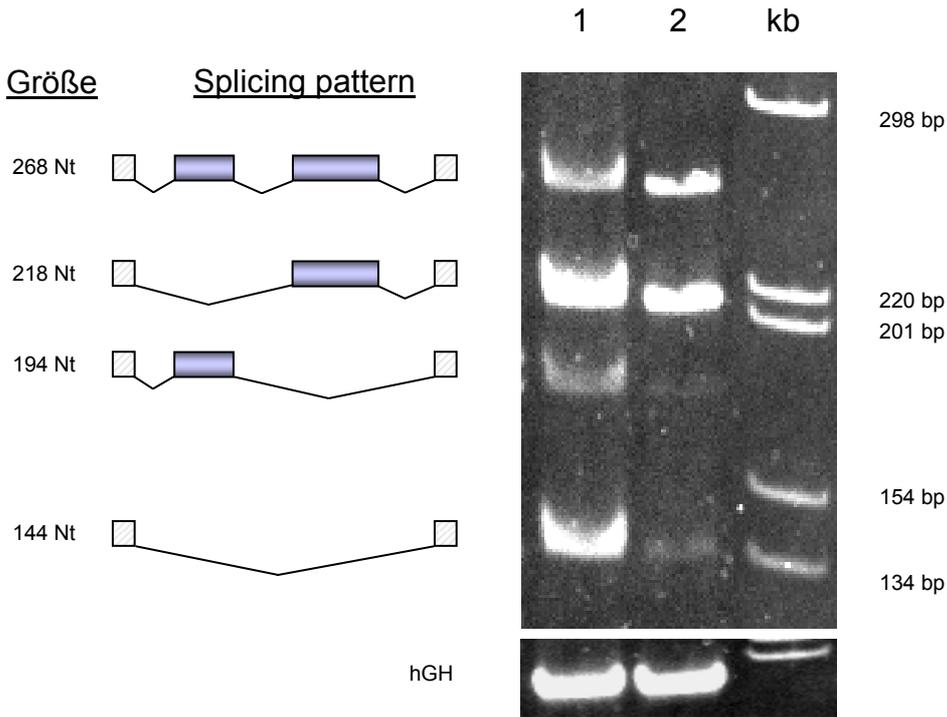
Um eine möglichst hohe Übereinstimmung des Spleißmusters zwischen HIV-NL4.3 und dem Minigenkonstrukt zu erreichen, wurden subgenomische HIV-NL4.3 Bereiche wie in Abb. 2 D (S. 7) dargestellt, zusammengefügt (Plasmidbezeichnung: dsEx2 dsEx3 komplett/kurz). Darüberhinaus wurde geprüft, ob auch die Länge der Intronsequenz gekürzt werden konnte, ohne das Spleißmuster zu ändern (Abb. 2 D und Abb. 10 A). Verglichen mit dem Spleißmuster der HIV-NL4.3 RNA konnte nach Transfektion von HeLa-T4⁺ mit jeweils einem der beiden Vektoren ebenfalls gespleißte RNA nachgewiesen werden, die bevorzugt das Exon 3 eingeschlossen hatte. Dagegen konnte deutlich weniger von der Spleißvariante nachgewiesen werden, die kein

Abb. 10: Analyse der Leaderexon-Expression in Vier-Exon-drei-Intron-Vektoren. **A:** Schematische Darstellung der Vier-Exon-drei-Intron-Minigenkonstrukte mit vollständigem mittleren Intron (oben) oder gekürzter Form (unten). Die Vektoren enthalten die Sequenz des LTRs bis zum Ende des Exons 1, das folgende Intron wurde gekürzt. Die Sequenz ab 77 Nt vor dem Spleißakzeptor 2 ist bis 60 Nucleotide hinter dem Spleißdonor 3 ungekürzt und schließt die Exons 2 und 3 ein. Das Intron zum Exon 4 weist wieder eine Kürzung auf, wobei das Exon 4 selbst bis zum Beginn des *tat*-Leserahmens unverändert ist. Der *tat*-Leserahmen wurde durch die Insertion eines CAT-Leserahmens ersetzt. **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. 2,5 x 10⁵ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je 2 µg der Vier-Exon-drei-Intron-Vektoren, 1 µg SVcat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR ds2 ds3 komplett; Spur 2: LTR ds2 ds3 kurz. **C:** Weitere theoretisch nachweisbare Zwischenprodukte. **D:** Schematische Auswertung des Einschlusses von Exon 2, 3 und 2+3, sowie dem Anteil an RNA ohne Leaderexon. Zum Vergleich wurden Werte aus der Arbeit von Purcell und Martin ((336); grün), sowie des HIV-NL43 (rot) hinzugezogen.

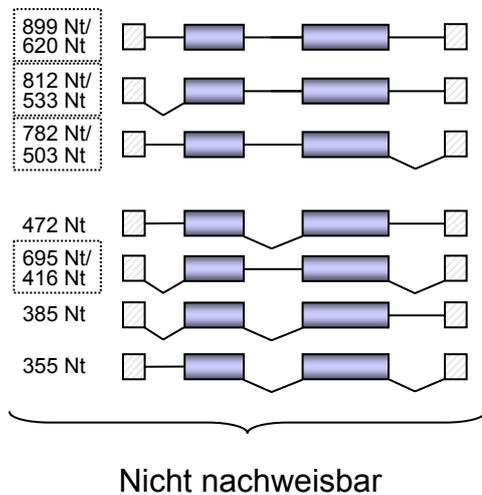
A



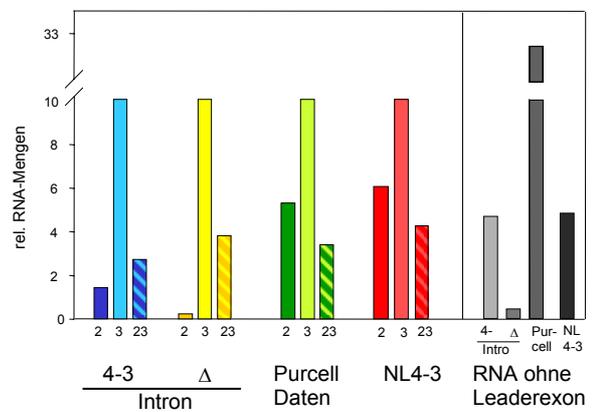
B



C



D



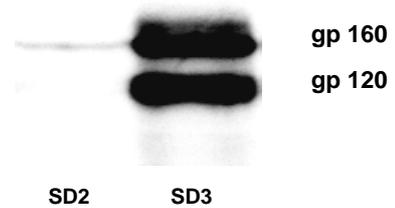
Leaderexon enthielt. Auffallend war der geringe Exon 2 Einschluss, der intronabhängig zu sein schien. Während in Gegenwart des verkürzten mittleren Introns die Spleißvariante mit Exon 2 kaum nachweisbar war, so war die Menge dieser Spleißvariante in Gegenwart des vollständigen Introns deutlich erhöht, wenngleich sie nur halb so hoch war, wie nach der HIV-1 Infektion (Abb. 10 B/D). Der gleichzeitige Einschluss beider Leaderexons erfolgte gleich häufig wie nach der Infektion und war nicht intronbeeinflusst.

Aufgrund der qualitativen Übereinstimmung des Spleißmusters der Minigenkonstrukte und der größeren quantitativen Vergleichbarkeit der Spleißvarianten vom Minigenkonstrukt mit ungekürztem Intron, wurde dieses für die nachfolgenden Untersuchungen im Drei-Intron-Kontext verwendet.

3.1.3 Charakterisierung der flankierenden Spleißstellen der Exons 2 und 3

Die Erkennung einer Exonsequenz wird wesentlich durch die Stärke der flankierenden Spleißstellen beeinflusst. Zur Untersuchung der Spleißdonorstärke wurde ein Vektorsystem gewählt, bei dem die gebildete Glykoproteinmenge mit der Effizienz der U1 snRNA Bindung an der HIV-1 Spleißdonorstelle #4 korreliert (SVsd1SDx Δ vpuenv;63,145,214). Dabei kann die Effizienz der U1 snRNA Bindung durch die Komplementarität zwischen dem 5' Ende der U1 snRNA und der 5' Spleißstellensequenz beschrieben werden. Je höher die Komplementarität, desto mehr Protein kann gebildet werden und umso stärker ist der Spleißdonor einzuordnen. Abbildung 11 A zeigt rechts neben dem Vektoraufbau, die Western Blot Analyse von transient transfizierten HeLa T4⁺ Zellen mit Vektoren, die entweder den Spleißdonor 2 (Exon 2) oder den Spleißdonor 3 (Exon 3) vor dem *env*-Leserahmen enthalten. Für die inserierte Sequenz des SD3s konnte eine deutliche *env*-Expression nachgewiesen werden, während der Nachweis in Abhängigkeit vom SD2 nur gering war. Damit wurde der Spleißdonor des Exons 3 als deutlich effizienter eingestuft, als der des Exons 2.

Basierend auf einer umfangreichen Mutationsanalyse der 5' Spleißstelle #4 (SD4) in dem oben beschriebenen U1 snRNP-abhängigen *env*-Expressions-Vektor wurde ein computergestütztes Analyseprogramm entwickelt (Splicefinder: www.splicefinder.net; 145,214), welches die Stärke der Spleißdonor-Sequenzen bewertet.

ASVsd1SDx Δ vpuenv

SD	HBB-Muster ((145))	Bewertung		Nutzung im Genom	
		splicefinder	MaxEntScale	1,8 kb Klasse	4 kb Klasse
SD2	10 2	w LC	5,7	16	5
SD3	12 3	w HC	9,4	25	7

B

SA	Effizienz		Branchsequenz U2: AUGAUG	Nutzung im Genom	
	Kammler	MaxEntScale		1,8 kb Klasse	4 kb Klasse
SA2	1	6,4	TACaAAC	16	6
SA3	4	9,4	aGCaGAC	26	9

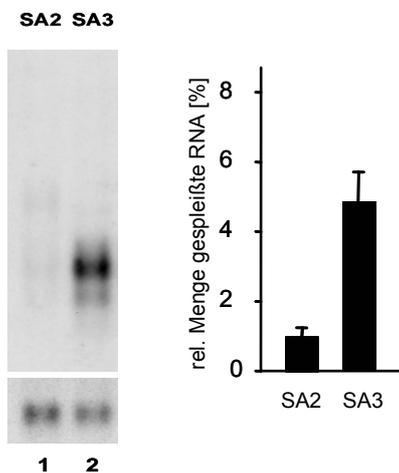


Abb.11: Charakterisierung der Spleißdonorsequenzen SD2 und SD3 sowie der Spleißakzeptorsequenzen SA2 und SA3. **A:** Schematische Darstellung des Vektors zur Untersuchung der SD-Stärke, rechts ein Western Blot dieses Vektors mit den inserierten Spleißdonorsequenzen SD2 bzw. SD3. Die Tabelle zeigt das Wasserstoffbrückenmuster (HBB; Spalte 2), wobei Längsstriche jeweils eine Fehlbasenpaarung darstellen. Die Spalten 3 und 4 zeigen die Bewertung der Stärke anhand des Splicefinders (www.splicefinder.net) und des MaxEntScore (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html; w: weak; HC: High Complementarity; LC: Low Complementarity). Die letzten beiden Spalten geben Auskunft über die Nutzung der Donorsequenzen abhängig von der Replikationsphase des Virus (336). **B:** Die Tabelle zeigt neben der Nutzung der Spleißakzeptorsequenzen in Abhängigkeit von der Replikationsphase des Virus (Spalte 5 und 6), die Komplementarität der Verzweigungsstelle mit der U2 snRNA (Spalte 4) und die Einordnung der Effizienz der Akzeptoren (Spalte 2 und 3; (134,213); http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html). Hierzu sind auch der Northern Blot und die statistische Auswertung abgebildet (entnommen aus 213).

Spleißdonoren, die nur eine geringe Komplementarität zur U1 snRNA aufweisen und im oben beschriebenen Vektorsystem nicht zur *env*-Bildung führen, werden mit LC – Low Complementarity – bezeichnet, Spleißdonoren, die zur *env*-Expression führen, als HC – High Complementarity. Liegt die Komplementarität einer Spleißdonorsequenz nahe dem Schwellenwert des für die Erkennung durch das U1 snRNP notwendigen Wasserstoffbrückenmusters, wird sie zusätzlich mit einem w (weak) markiert. Letzteres traf für beide untersuchten Spleißdonoren zu, wobei der SD2 unterhalb und der SD3 geringfügig oberhalb des Schwellenwertes lag (Abb. 11 A). Obwohl der SD2 nicht zum *env*-Nachweis führte, also nur eine geringe Komplementarität zur U1 snRNA aufwies, wird er in der frühen Phase der HIV-1 Replikation in 16 % aller Transkripte verwendet (Abb. 11 B, Spalte 5 und 6;336). Dies deutete auf eine zusätzliche positive Regulation der Spleißdonorsequenz durch *cis*-regulatorische Elemente hin.

Die Ergebnisse des Splicefinders wurden mit einem zweiten Programm: MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html;134) verglichen. Im Gegensatz zum Splicefinder beruhen die ermittelten Werte auf dem Prinzip der maximalen Entropie-Bestimmung (MEP). Die maximale Entropie weist dabei einen Wert von 0 auf, also keinen Informationsgehalt. Bei einer Konsensussequenz würde dies einer Position entsprechen, an der alle Nukleotide mit gleicher Häufigkeit vorkommen. Die Untersuchung einer beliebigen Spleißdonorsequenz beruht auf dem Vergleich mit einer spezifischen Untergruppe einer Konsensus-Spleißdonorsequenz, bei der der relative Informationsgehalt (relative Entropie) und die Frequenz der Basen an jeder Position bestimmt wurden. Aus diesen beiden Werten läßt sich ein Vergleichswert ableiten. Je größer dieser Wert ist, desto höher ist die Übereinstimmung mit dieser spezifischen Konsensussequenz, und umso effizienter ist der Spleißdonor einzuordnen. Für die Bildung der Untergruppen der Konsensus-Spleißdonorsequenz wurden Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Nukleotiden der Spleißdonorsequenz berücksichtigt.

Die Untersuchung der Spleißdonoren 2 und 3 ergab Werte von 5,73 bzw. 9,45 (Abb. 11 B, Spalte 4). Damit konnte die relative Stärke der Spleißdonoren bestätigt werden. Aufgrund ihrer geringeren Aussagekraft wurden andere Analyseprogramme wie z. B. NNSPLICE, SpliceView, GeneID-3 und NetGene2 nicht verwendet.

Die experimentelle Bestimmung der Effizienz der Spleißakzeptorsequenzen beruhte auf der RNA Analyse transient transfizierter HeLa-T4⁺ Zellen mit Ein-Intron-Vektoren, bei denen jeweils nur die 3' Spleißstelle ausgetauscht worden war (213). Wie schon für die Spleißdonoren beobachtet, zeigte die Spleißakzeptor-Sequenz des Exons 2 eine geringere intrinsische Effizienz, als die des Exons 3. Erwartungsgemäß fiel auch die Nutzung der untersuchten Spleißakzeptoren im HIV-Genom aus: 16% der Transkripte wurden unter Nutzung des SA2s gespleißt, 26% unter Nutzung des SA3s.

Für die Einordnung der Stärke der Spleißakzeptor-Sequenzen gibt es ebenfalls einen Algorithmus (MaxEntScan-Programm), der die Exon-Intron-Grenze und einen Teil des Polypyrimidintraktes (-20 bis +3) bewertet. Der Vergleich der Spleißakzeptoren #2 und #3 zeigte für den Spleißakzeptor #3 eine deutlich höhere Effizienz: 9,43 zu 6,41.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen, dass nämlich das Exon 3 häufiger als das Exon 2 eingeschlossen wurde, beide flankierenden Spleißstellen des Exons 2 deutlich schwächer bewertet wurden, als die des Exons 3.

3.2 Analyse *cis*-wirkender Elemente im Exon 2

Da das Exon 2 real häufiger eingeschlossen wurde als aufgrund seiner schwachen Spleißstellen zu erwarten gewesen wäre, legte dies die Vermutung nahe, dass das Exon 2 positive spleißregulierende Sequenzen enthalten könnte (vgl. 247). Um diese identifizieren zu können, wurde ein Minigenkonstrukt hergestellt, welches neben dem Exon 2 und den flankierenden Spleißstellen SA2 und SD2, die Exons 1 und 4, wie unter Abb. 10 beschrieben, enthielt (Abb. 12 A; ds Ex2). Die transiente Transfektion von HeLa-T4⁺ -Zellen mit diesem Plasmid zeigte zwar, dass nahezu die gesamte nachweisbare RNA-Menge gespleißt wurde (>95 %) (Abb. 12 B, Spur 1 und C links), der Exoneinschluss aber lediglich bei 34 % lag. Der größte Anteil konnte einem Zwischenprodukt zugeordnet werden, dass lediglich den ersten Spleißdonor und den SA2 genutzt hatte (46 %). Damit lag die Erkennung des SA2 bei insgesamt 80%.

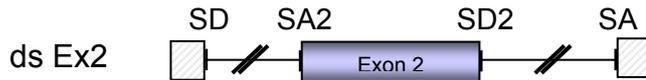
Erstaunlicherweise konnte fast nur das Zwischenprodukt nachgewiesen werden, bei dem das erste Intron entfernt worden war, während die Spleißvariante, welche nur das zweite Intron herausgespleißt hatte, so gut wie gar nicht detektiert wurde.

Diese Akkumulation der bereits einfach gespleißten RNA ließ darauf schließen, dass das zweite Spleißereignis, vom SD2 auf den terminalen Spleißakzeptor, der zeitlich limitierende Schritt für den Einschluss des Exons darstellte. Dies stimmt mit der Charakterisierung der flankierenden Spleißstellen des Exons 2 dahingehend überein, dass der Spleißakzeptor zwar schwach, aber nutzbar war, der Spleißdonor hingegen in eine Kategorie fiel, welche die U1 snRNP-Bindung nur unzureichend unterstützte (Abb. 11 A). Damit konnte für diese RNA auf eine Spleißreihenfolge geschlossen werden, die auf der zeitlich verzögerten Erkennung des Spleißdonors und der effizienten Erkennung eines intrinsisch schwachen Spleißakzeptors beruhte.

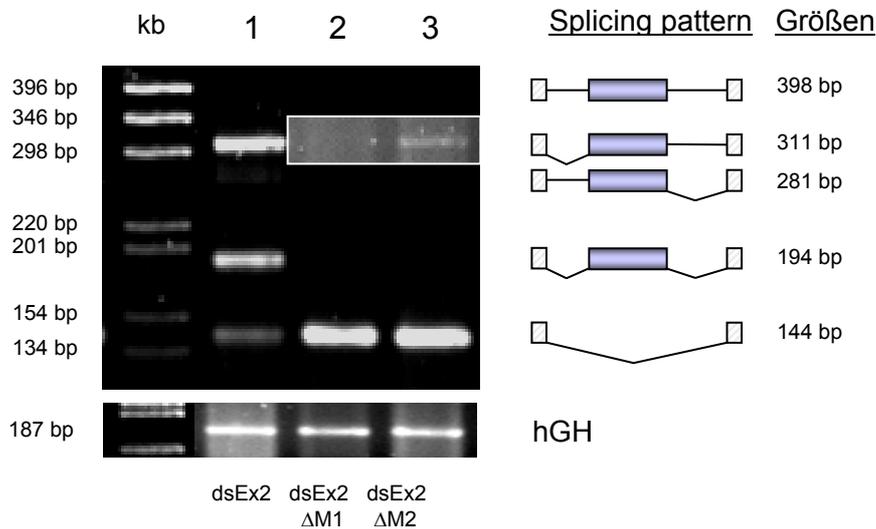
3.2.1 Die Erkennung des Exons 2 hängt von zwei Heptamer-Motiven ab

Obwohl der SA2 intrinsisch schwach ist, wurde er dennoch bei 80% der RNAs zum Spleißen verwendet. Die Überprüfung der Exon 2 Sequenz auf potentielle *cis*-regulatorische Elemente, führte zur Identifizierung von zwei identischen purinreichen Heptamer-motiven mit der Sequenz **TGGAAAG** (Abb. 13, pNLA1). Beide Elemente, nachfolgend als M1 und M2 bezeichnet, wurden einzeln durch Punktmutationen verändert (Abb. 13, Δ M1 und Δ M2) und deren Einfluss auf den Exon-Einschluss untersucht. Die RNA-Analyse ergab für beide Motive einen essentiellen Anteil an der Definition des Exons 2 beim Spleißen (Abb. 12 B, Spur 2, 3; Abb.12 C). Die Mutation des ersten Heptamer-motivs führte zum vollständigen Verlust der SA2 Nutzung, die Mutation des zweiten Motivs verringerte seine Nutzung auf weniger als 6 %. Da mit diesem Experiment gezeigt worden war, dass beide Motive für den Exoneinschluss von herausragender Bedeutung waren, konnte es sich hier sowohl um einen Enhancer mit zwei Bindungsstellen handeln, als auch um zwei Enhancer mit unterschiedlicher Ausrichtung, die in diesem Kontext jedoch beide benötigt wurden.

A



B



C

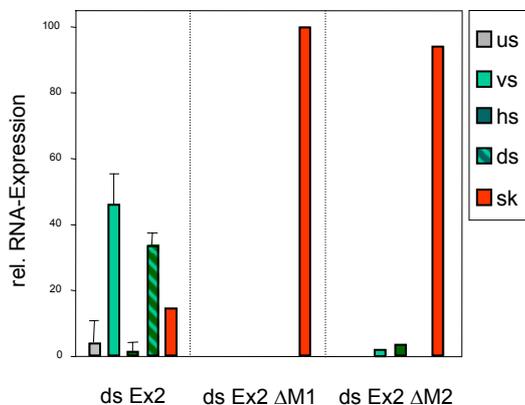


Abb 12: Expressionsanalyse des Exon 2 Minigenkonstruktes. **A:** Schematische Darstellung des Zwei-Intron-Minigenkonstruktes mit Exon 2 und den flankierenden Spleißstellen (LTR ds Ex2). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je $2\mu\text{g}$ der Zwei-Intron Vektoren, $1\mu\text{g}$ SVctat und $1\mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT₁₆ Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Die Banden „nur vorne gespleißt“ sind für die Spuren 2 und 3 mit verlängerter Belichtung abgebildet (weißes Kästchen). Rechts des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR ds Ex22; Spur 2: LTR ds Ex2 ΔM1; Spur 3: LTR ds Ex2 ΔM2. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur vorne gespleißte (vs), nur hinten gespleißte (hs), sowohl vorne als auch hinten gespleißte (ds) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen. Die RNA-Menge jedes Vektors wurde auf 100 normiert.

Sequenz Exon 2

Ohne Mutation: GGACAGCAGAGATCCACTT **TGGAAAG** GACCAGCAAAGCTCCTC **TGGAAAG**
ΔM1 : GGACAGCAGAGATCCACTT **TGCTATC** GACCAGCAAAGCTCCTC **TGGAAAG**
ΔM2 : GGACAGCAGAGATCCACTT **TGGAAAG** GACCAGCAAAGCTCCTC **TGCTATC**
ΔM1 SF2-: GGACAGCAGAGATCCACTT **TGGTAA**A GACCAGCAAAGCTCCTC **TGGAAAG**
ΔM2 SF2-: GGACAGCAGAGATCCACTT **TGGAAAG** GACT TAGCAAAGCTCCTC **TGGAAAG**
ΔM1 pNL43: GGACAGCAGAGATCCACTT **TGGAAAG** GG GACTAGCAAAGCTCCTC **TGGAAAG**
AS-Sequenz: Arg Asp Ser Arg Asp Pro Val Trp Lys Gly Pro Als Lys Leu Leu Trp Lys Gly

Abb. 13: Sequenz des Exons 2 und mutierte Sequenzen. In rot und grün sind die Heptamer motive dargestellt, in blau die jeweils eingefügten Mutationen. Die Mutationen zur spezifischen Inaktivierung der ASF/SF2-Bindungsstelle enthalten jeweils eine weitere Mutation (schwarz, unterstrichen), die keinen Einfluss auf das Proteinbindungsmuster zeigte (ohne Abbildung), jedoch zur Identifizierung positiver Klone benutzt wurde. Bei der Mutation $\Delta M1$ pNL43 handelt es sich bezüglich der überlagernden kodierenden Sequenz des Proteins *pol*, um eine stille Mutation, also ohne Einfluss auf die AS-Sequenz, die in der untersten Zeile abgebildet ist.

3.2.2 Beide Heptamersequenzen wirken positiv auf die Spleißakzeptorerkennung

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Motive unabhängig voneinander auf den Akzeptor wirken, wurde zunächst der Spleißdonor des Exons 2 deletiert (Abb. 14 A; SA2 Ex2). Innerhalb dieser Ein-Intron-Transkriptionseinheit mit alternativen Spleißakzeptoren wurde dann ein oder wahlweise beide Heptamer motive mutiert. HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit diesen Vektoren und einem *tat*-exprimierenden Vektor zur Aktivierung des LTR-Promotors cotransfiziert. Die RNA-Analyse zeigte, dass die Mutation des ersten Heptamer motivs eine Abnahme der Nutzung des SA2 von 83 % auf 51 % (Abb. 14; Spur 1 und 2) herbeiführte. Die zusätzliche Mutation des zweiten Motivs führte zu einem fast vollständigem Verlust der SA2-Erkennung (4 %) (Abb. 14 B; Spur 3). Dieser Rückgang führte gleichzeitig zu einer verstärkten Nutzung des terminalen Spleißakzeptors. Bei Anwesenheit der unveränderten Heptamer motive wurden nur 10 % der RNAs auf den letzten Spleißakzeptor gespleißt, skippten also das Exon 2. Die Mutation beider Heptamer motive führte zu einem Anstieg auf 96 %. Diese Ergebnisse zeigten, dass beide Motive als *cis*-wirkende Elemente angesehen werden können, die im Sinne eines exonischen Spleißenhancers zur Aktivierung des Spleißakzeptors beitragen. Nur die gleichzeitige Deletion des Spleißdonors und der Heptamer motive führten zum nahezu vollständigem Verlust der Spleißakzeptor-

Erkennung. Da frühere Experimente gezeigt hatten, dass bereits nur die Deletion des Spleißdonors schon den Verlust der Exonerkenkung herbeiführte, führten demnach die Heptamermotive zu einer Spleißdonor-unabhängigen Aktivierung des Spleißakzeptors.

3.2.3 Die Heptamersequenzen fördern die Erkennung des Spleißdonors durch Unterstützung der U1 snRNP-Bindung

Da beide Heptamermotive zur Spleißakzeptornutzung beitragen, stellte sich die Frage, ob bei fehlendem Spleißakzeptor beide Elemente, im Sinne eines bidirektionalen Enhancers, auch die Nutzung des Spleißdonors unterstützen könnten. Hierzu wurde ein dem oben beschriebenen Vektor (3.2.3) äquivalentes Konstrukt hergestellt, welches den Spleißdonor, aber nicht den Spleißakzeptor enthielt (Abb. 15 A; Ex2 SD2 formal: Ein-Intron-Konstrukt mit zwei alternativen Spleißdonoren). Die gesamte RNA wurde unter Auslassung des Exons 2 gespleißt, d.h. es wurde ausschließlich der Cap-proximale Spleißdonor genutzt. Die Enhancer-Elemente waren demnach nicht in der Lage den Spleißdonor 2 unabhängig vom Spleißakzeptor zu aktivieren (Abb. 15 B), wie es im vorigen Abschnitt für den Spleißakzeptor gezeigt werden konnte.

Aus diesem Grund wurde der Untersuchungskontext dahingehend verändert, dass das Exon 2 mit seinem Spleißdonor anstelle des GAR Enhancers und des Spleißdonors SD4 kloniert wurde und auf seine Fähigkeit getestet wurde die U1 snRNA Bindung am Spleißdonor SD2 zu unterstützen. Dieser Austausch erfolgte in einem Glykoprotein-Expressionsvektor, bei dem die gebildete Glykoproteinmenge mit der Effizienz der U1 snRNA Bindung an der HIV-1 Spleißdonorstelle #4 korreliert (63,145,214). Abb 16 A zeigt den Aufbau dieses Vektors (SV(leader)SD4 Δ vp ν env; Leader => Ex2). HeLa-T4⁺ Zellen wurden transfiziert und die *env*-Expression im Western Blot nachgewiesen. Erste Ergebnisse zeigten, dass diese Kombination nicht zur Bildung von *env*-Protein führte (Abb. 16 B; Spur 2). Da der SD2 nur eine geringe Komplementarität zur U1 snRNA aufwies, wurden die effizienteren HIV-1 Spleißdonoren in diesen Vektor kloniert. Die Western Blot Analyse zeigte einen deutlichen Unterschied beim Nachweis des Glykoproteins: Die Spleißdonoren #1 und #4 wiesen bei einer Komplementarität von 16 bzw. 18 kontinuierlichen HBB zur U1 snRNA eine starke *env*-Expression auf (Abb. 16 B; Spuren 1 und 4), während der SD2 keine

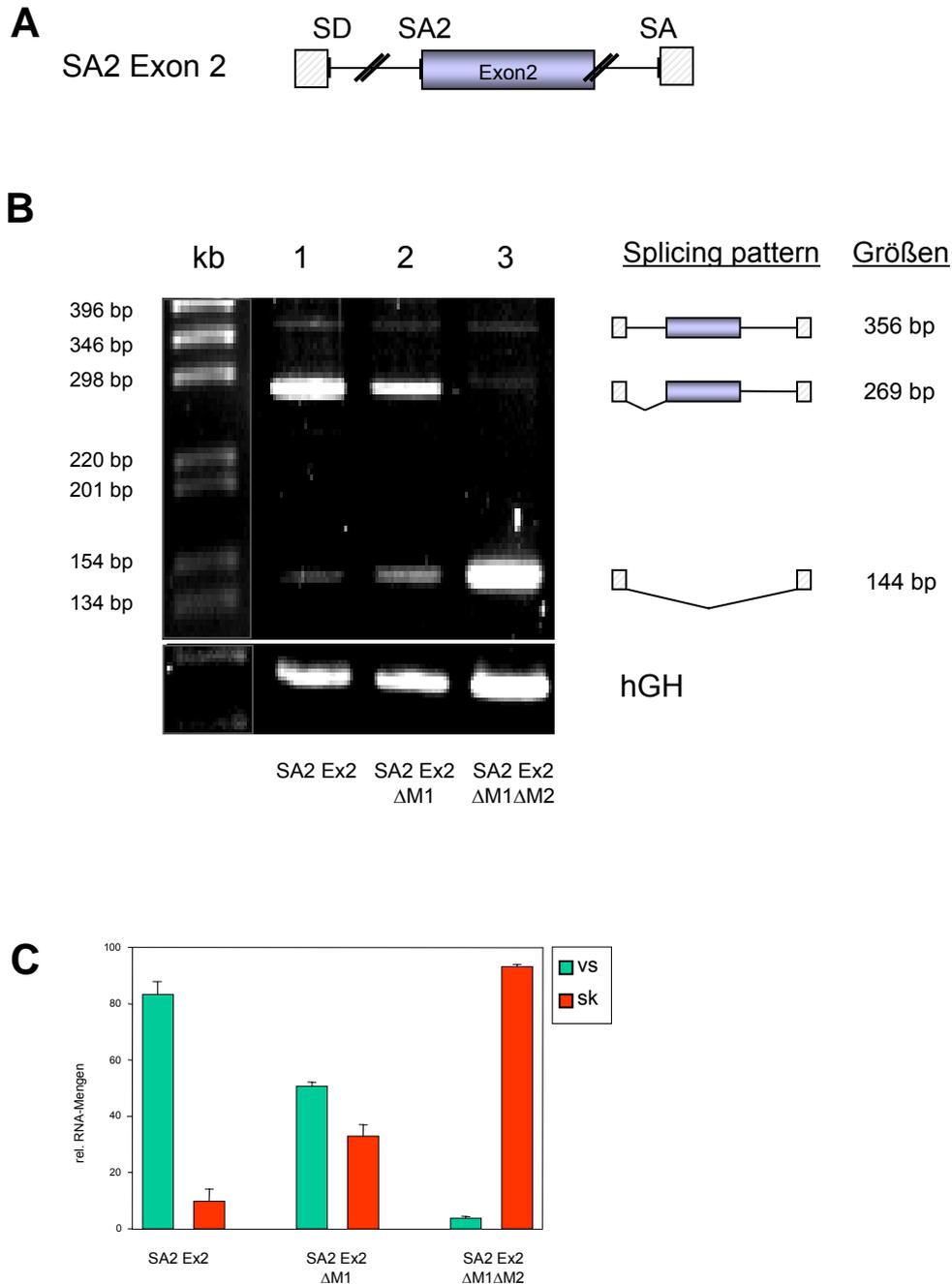


Abb. 14: Einfluss des Heptamer motifs auf den Spleißakzeptor. **A:** Schematische Darstellung des Drei-Exon-Zwei-Intron-Minigenkonstrukts (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißakzeptoren) mit Exon 2, wobei der Spleißdonor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR SA2 ex2). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. 2,5 x 10⁵ Hela-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der Drei-Exon-Zwei-Intron Vektoren, 1 µg SVctat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR SA2 Ex2; Spur 2: LTR SA2 Ex2 ΔM1; Spur 3: LTR SA2 Ex2 ΔM1ΔM2. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in nur vorne gespleißte (vs, grün) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk, rot) vorgenommen.

(Spur 2) und der SD3 nur einen geringen Nachweis (Spur 3) zuließen. Da die Enhancer-Funktion der *cis*-wirkenden Sequenzen im Exon 2 untersucht werden sollte, wurden die Heptamer-motive analog zu den Mutationen in Abschnitt 3.2.3 mutiert und in Verbindung mit dem effizienteren Spleißdonor SD4 getestet. Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesen Plasmiden wurde die *env*-Expression auf Protein-Ebene analysiert. Während die unveränderte Exon 2-Sequenz den Nachweis

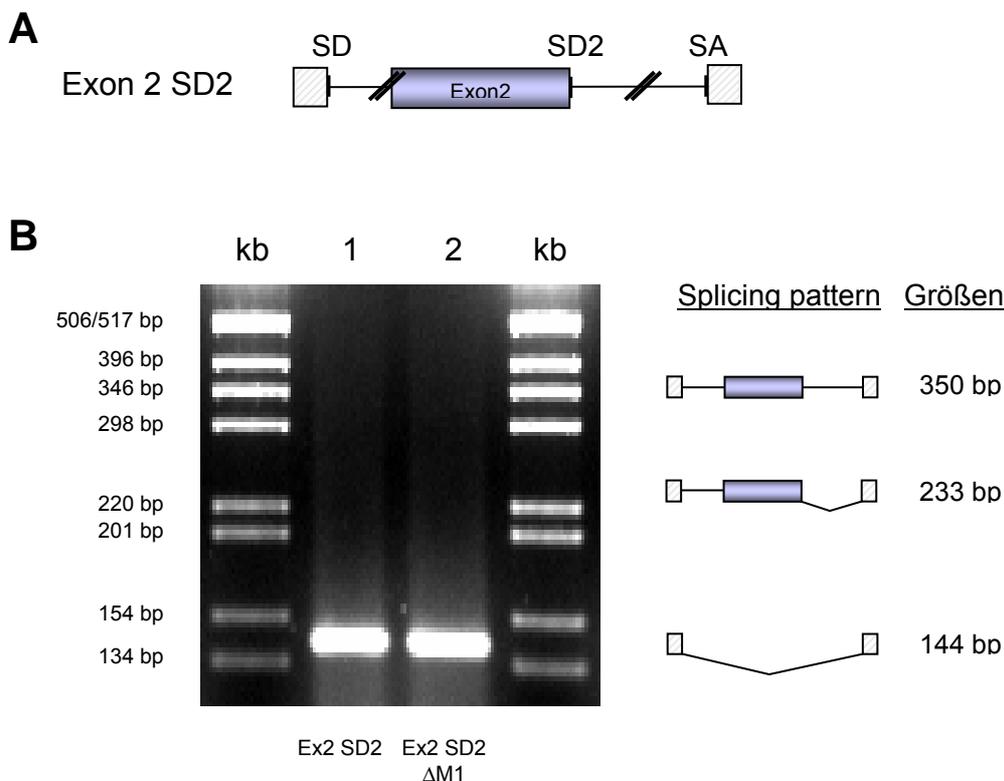


Abb.15: Einfluss des Heptamer-motivs auf den Spleißdonor. **A:** Schematische Darstellung des Drei-Exon-Zwei-Intron-Minigenkonstrukts (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißdonoren) mit Exon 2, wobei der Spleißakzeptor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR Ex2 SD2). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. 2,5 x 10⁵ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der Zwei-Intron-Vektoren, 1 µg SVcat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Rechts des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Spur 1: LTR Ex2 SD2; Spur 2: LTR Ex2 SD2 ΔM1.

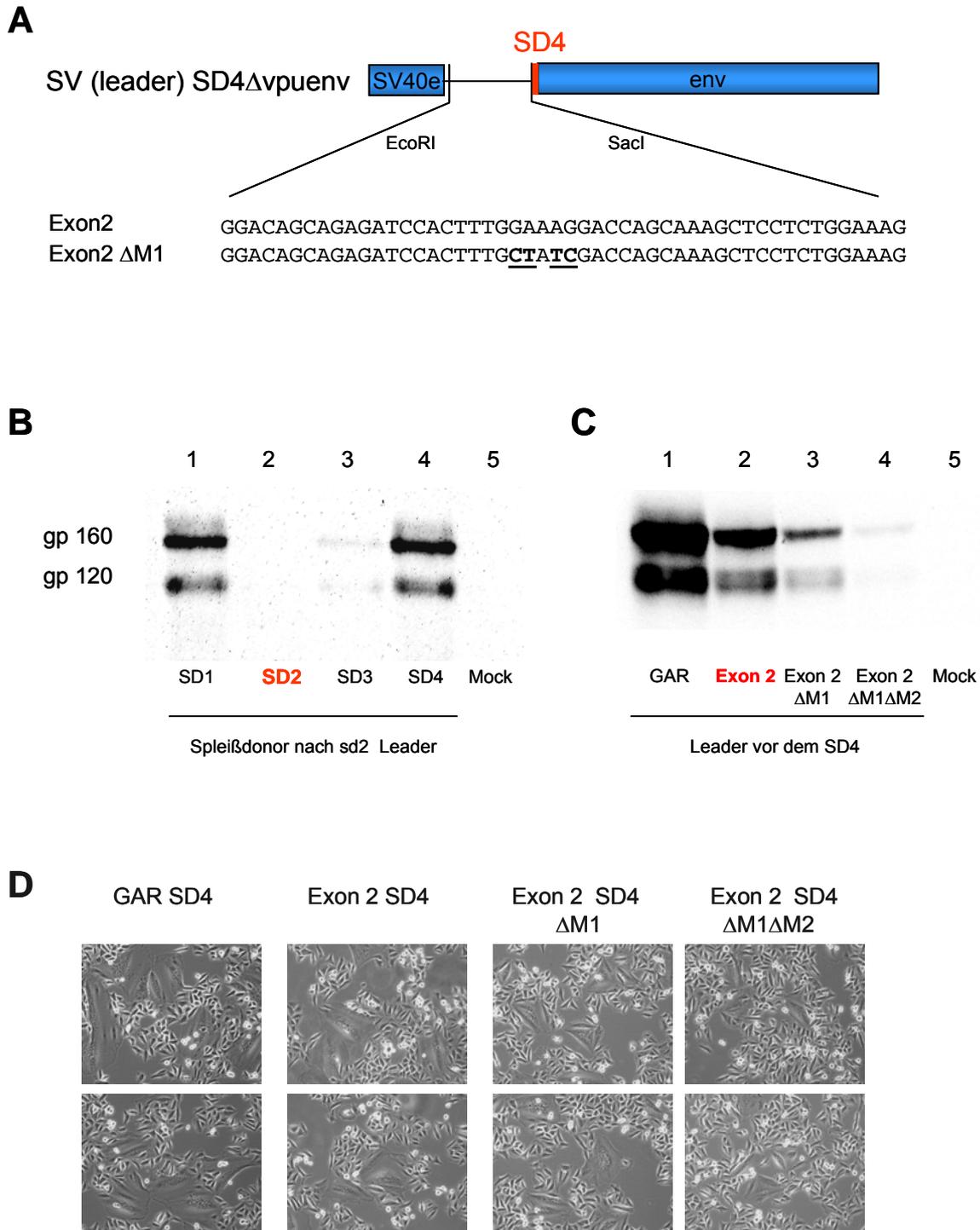


Abb.16: Einfluss des Heptamer motifs auf die U1 snRNP Bindung an den Spleißdonor.

A: Schematische Darstellung des *env*-Expressionsvektors zur Untersuchung des Einflusses von Leadersequenzen auf die Nutzung des Spleißdonors durch das U1 snRNP. Unterhalb befinden sich die beiden inserierten Leadersequenzen (Ex2 und Ex2 ΔM1. **B/C:** *Env* Glykoprotein-Nachweis im Western Blot. $2,5 \times 10^5$ Hela-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2µg der *env*-exprimierenden Vektoren, 1 µg SVcrev und 1µg pGL3 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine präpariert und nach Normierung auf die Gesamtproteinmenge und Transfektionseffizienz auf einem 7% SDS-Gel aufgetrennt und geblottet.

von *env*-Glykoprotein ermöglichte, führte die Mutation des ersten Heptamermotivs zu einer starken Abnahme, die Mutation des ersten und zweiten Motivs zum nahezu vollständigen Verlust der Glykoprotein-Expression (Abb. 16 C/D). Ähnlich wie bei der Untersuchung des Einflusses der Heptamer-Sequenzen auf den Spleißakzeptor, zeigten auch hier beide Enhancer-Elemente einen Einfluss auf den Spleißdonor. Nur die gleichzeitige Mutation beider Heptamere führte zum Verlust der U1 snRNP-Bindung an den Spleißdonor und damit zum Verlust der *env*-Expression.

Der Vergleich mit einem ESE-Element im Exon 5 von HIV-1 (GAR;(63); Abb. 16 C, Spur 1) ermöglichte die Einordnung der relativen Stärke des im Exon 2 identifizierten Enhancer-Elementes. Mehrere Durchführungen des Experimentes zur Bestimmung der ESE-Stärke zeigten einen Rückgang der *env*-Expression um etwa die Hälfte bei Verwendung des Exon 2-Enhancers im Vergleich zum GAR Enhancer. Damit war die regulatorische Wirkung des Exon 2-Enhancers in diesem Kontext deutlich geringer. Zusammenfassend ließ sich sagen, dass beide Heptamer motive sowohl den Spleißakzeptor als auch den Spleißdonor positiv regulieren konnten. In Abwesenheit einer Spleißstelle war die Mutation des ersten Heptamers nicht ausreichend, um die Expression zu unterbinden. Waren beide Spleißstellen vorhanden, wurden auch beide Heptamere für den Spleißvorgang benötigt.

3.2.4 Charakterisierung der Heptamersequenzen mit dem ESEfinder und dem Rescue-ESE

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen lag eine sequenzspezifische Bindung nukleärer Proteine an die Leaderexonsequenz nahe, welche die positiv-regulierende Wirkung der Heptamer motive vermitteln. SR-Proteine werden sowohl als Proteine des konstitutiven als auch des alternativen Spleißens beschrieben und

Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp120 (Boehringer), einem POD-gekoppelten Zweitantikörper und Chemilumineszenznachweis im F1-Lumi-Imager (Roche). **B:** Einfluss des Leaderexons 2 auf die vier HIV-1 Spleißdonoren. Spur 1: sd2SD1; Spur 2: SD2SD2; Spur 3: sd2SD3; Spur 4: sd2SD4. **C:** Einfluss der Mutation des Heptamer motivs auf die *env*-Expression im Kontext des SD4. Spur 1: GARSD4; Spur 2: sd2SD4; Spur 3: sd2SD4 Δ M1; Spur 4: sd2SD4 Δ M1 Δ M2; Spur 5: Mock. **D:** Synzytienbildung der unter C beschriebenen Vektoren. Hierbei verschmelzen die Zellmembranen der *env*-exprimierenden Zellen mit denen der CD4-Rezeptor tragenden Zellen und bilden abhängig von der Menge oberflächen-ständigen *env*-Glykoproteins vielkernige Riesenzellen aus.

können positionsabhängig eine Inhibition, wie auch eine Verstärkung des Spleißens bedingen (383). Für vier der ~10 identifizierten klassischen SR-Proteine war im Laufe der hier vorgelegten Arbeit ein Algorithmus entwickelt worden, der potentielle SR-Bindungsstellen vorhersagt (71,72; release 2.0). Mit Hilfe dieses Programms wurden daraufhin die Heptamermotive (M1 und M2) bzw. ihre Mutationen analysiert (Abb. 17; obere Hälfte). Beide Heptamermotive waren jeweils Teil einer möglichen ASF/SF2 Bindungsstelle und in beiden Fällen wurden diese Bindungsstellen durch die Mutation des Heptamers deletiert.

Gleichzeitig entstand bei der Mutation des ersten Heptamers eine potentielle SRp40 Bindestelle und die Mutation des zweiten Heptamers führte zu einer Abwertung einer überlappenden potentiellen SRp40 Bindungsstelle. Um zu klären, ob auch spezifische Änderungen im vorhergesagten SR-Proteinbindungsmuster den experimentell identifizierten ESE inaktivierten, wurden Mutationen ausgewählt, die lediglich die potentiellen ASF/SF2-Bindungsstellen inaktivieren sollten (Abb. 13; Abb. 17 oben). Diese wurden mit einem weiteren Programm, dem Rescue-ESE (134) analysiert, welches bereits bekannte Enhancer-Sequenzen mit der zu untersuchenden Sequenz vergleicht (Abb. 17 unten). Dieses Programm zeigte an der Position des ersten Heptamermotivs eine Anhäufung schon identifizierter Hexamer-Enhancer (5), an der Stelle des zweiten Heptamers einen bekannten Hexamer-Enhancer. Sowohl die oben untersuchten Mutationen der Heptamermotive, als auch die Mutationen zur Inaktivierung der theoretischen ASF/SF2-Bindungsstellen, führten zum Verlust der vom Rescue-ESE vorhergesagten Hexamer-Enhancer. Zur experimentellen Überprüfung dieser theoretischen Vorhersagen wurden die Mutationen der potentiellen ASF/SF2-Bindestellen in den Vektor mit der Exon 2-Sequenz und den beiden flankierenden Spleißstellen (Abb.18 A) eingefügt. Die RNA-Analyse zeigte sowohl für die Mutation der ersten, als auch für die Mutation der zweiten potentiellen ASF/SF2-Bindestelle (ds Ex2 Δ M1; ds Ex2 Δ M1 Δ M2) einen Verlust der Exonererkennung. Nahezu die gesamte RNA wurde unter Ausschluss des Exons 2 gespleißt. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass die Regulation zur Erkennung des Exons 2 durch zwei Heptamermotive bewirkt wurde, welche mit potentiellen ASF/SF2-Bindestellen überlagerten und deren Mutation ebenfalls zum Verlust der Exonererkennung führte.

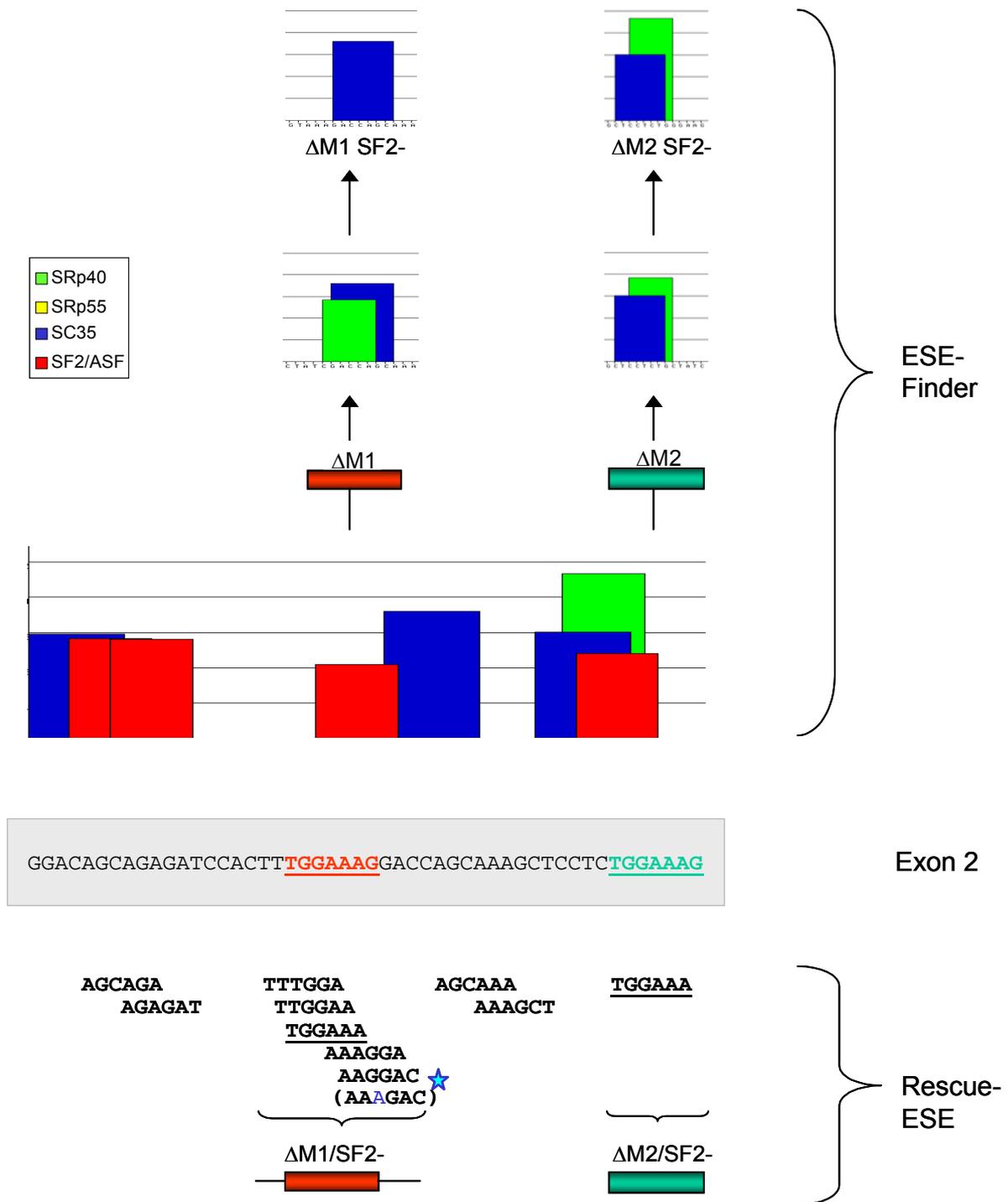


Abb. 17: Darstellung potentieller *cis*-regulatorischer Elemente im Exon 2. Direkt oberhalb der Exon 2 Sequenz sind die mit dem ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) vorhergesagten potentiellen Bindestellen der Proteine SF2/ASF (rot), SRp40 (grün), SC35 (blau) und SRp55 (gelb) dargestellt. Darüber befindet sich das veränderte Bindungsmuster bei Mutation der Heptamer motive, noch einmal darüber die Mutation der potentiellen SF2/ASF Bindestelle, ohne Beeinflussung der anderen vorhergesagten Bindestellen. Unterhalb der Exon 2 Sequenz sind die Bindemotive dargestellt, die vom Rescue-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) identifiziert werden. Hierbei wird keine Bindesequenz für ein bestimmtes Protein vorhergesagt. Die mit Klammern eingefassten Bindestellen fallen sowohl bei Mutation des Heptamer motifs als auch bei Mutation der potentiellen SF2/ASF Bindestelle weg, mit Ausnahme der markierten Sequenz (blauer Stern; in Klammern darunter die neue ESE-Sequenz).

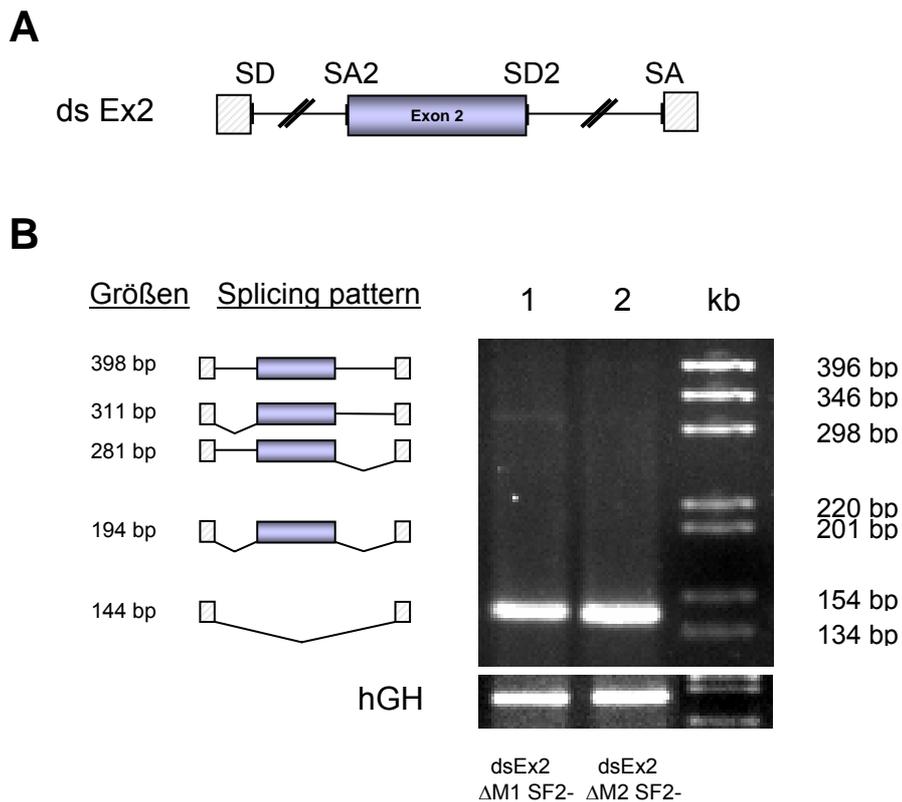


Abb. 18: Unterbindung der Exonererkennung durch Mutation der potentiellen SF2/ASF Bindestellen. **A:** Schematische Darstellung des Zwei-Intron-Minigenkonstruktes mit Exon 2 und den flankierenden Spleißstellen (LTR ds Ex2). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ Hela-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je $2\mu\text{g}$ der Zwei-Intron Vektoren, $1\mu\text{g}$ SVctat und $1\mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Zwischen den Gelen ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR ds Ex2 $\Delta\text{M1SF2-}$; Spur 2: LTR ds Ex2 $\Delta\text{M2 SF2-}$.

3.2.5 Analyse der Interaktion von Proteinen des Kernextraktes mit der Exon 2 Sequenz

Aufgrund der vorangegangenen Versuche lag eine sequenzspezifische Bindung nukleärer Proteine, speziell von ASF/SF2, an die Exon 2 Sequenz nahe. Zum Nachweis differentieller Proteinbindungsmuster wurde ein „Pull-Down“ Experiment durchgeführt. Hierzu wurden mit Iod markierte und an Adipindäure-Beads gekoppelte *in vitro*-Transkripte mit Kernextrakt inkubiert. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden nach Reinigung durch stringente Waschschrte mit Gelladepuffer von der RNA eluiert und im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Mittels einer reversiblen Zink-Färbung wurde das Proteinbindungsmuster dargestellt (Abb. 19 A/C).

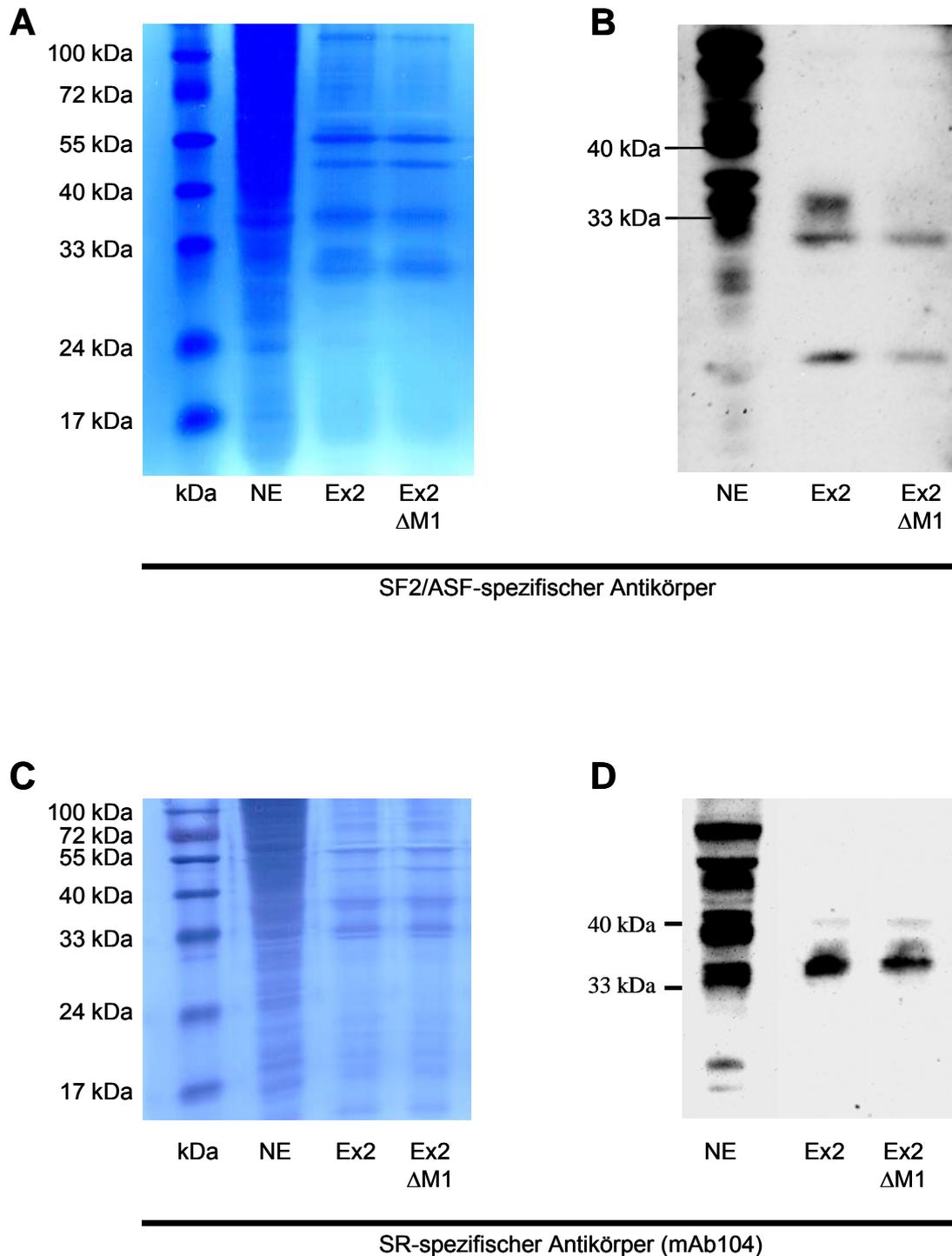


Abb. 19: Protein-Bindungs-Nachweis mittels Pull-Down Experimenten. *In vitro* transkribierte T7-haltige RNA wurde 1h mit Na-Perjodat markiert und über Nacht zur Bindung mit Adipinsäure-Beads inkubiert. Nach Inkubation der Bead-RNA-Komplexe mit Hela Kern-Extrakt wurden die spezifisch gebundenen Proteine in Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle der Proteinmenge wurden die Gele reversibel mit Zink gefärbt (**A** und **C**), anschließend geblottet und mit monoklonalen Antikörpern gegen SF2/ASF (**B**) bzw. gegen die RS-Domäne von SR-Proteinen (mAb104) (**D**) inkubiert. Die Detektion erfolgte einem POD-gekoppelten Zweitantikörper und Chemilumineszenznachweis im F1-Lumi-Imager (Roche). **A/C**: Spur 1: kDa-Leiter; Spur 2: Kernextrakt; Spur 3: T7Ex2; Spur 4: T7Ex2 ΔM1. **B/D**: Spur 1: Kernextrakt; Spur 2: T7Ex2; Spur 3: T7Ex2 ΔM1.

Zur Analyse wurden Transkripte der Exon 2-Sequenz mit und ohne Mutation des Motivs 1 verwendet. Beide Zink-gefärbten Gele wiesen ein ähnliches Proteinbindungsmuster auf. Es konnten Banden bei etwa 50 kDa und 55 kDa, sowie bei 30 kDa und 36 kDa deutlich nachgewiesen werden. In keinem der Versuche konnte allein durch die Proteinfärbung ein sequenzspezifisches Proteinmuster nachgewiesen werden. Die Laufhöhe des Proteins ASF/SF2 wird im phosphorylierten Zustand bei 36 kDa angegeben, die Laufhöhe im nicht-phosphorylierten Zustand bei etwa 30 kDa. Problematisch bei der Untersuchung gebundener SR-Proteine ist die fast identische Größe verschiedener SR-Proteine wie z. B. 9G8, ASF/SF2, SC35 und SRp30c. Sollte die Mutation des Heptamermotivs zur Aufhebung der Bindung eines Proteins führen und gleichzeitig die Bindung eines anderen, gleichgroßen Proteins ermöglichen, wäre im gefärbten SDS-Gel kein Unterschied detektierbar. Um unabhängig von der Proteinfärbung spezifische Unterschiede bei der Proteinbindung der verschiedenen Transkripte nachweisen zu können, wurden die Affinitätspräzipitations-Ansätze mittels Immunoblot auf die Interaktion mit Proteinen untersucht, die bereits oben beschrieben wurden (ASF/SF2) bzw. für die die Beeinflussung der Regulation von Spleißstellen schon beschrieben worden sind (SR-Proteine). Die Verwendung des monoklonalen ASF/SF2-Antikörpers als Erstantikörper führte zur Detektion von 3 Banden auf den Höhen von 36 kDa, 30 kDa und 24 kDa (Abb. 19 B). Für die beiden kleineren Proteine konnte eine etwa gleichstarke Abnahme der Intensität festgestellt werden, die unabhängig von der Mutation des Heptamermotivs war und die wahrscheinlich auf eine etwas geringere Auftragsmenge in der zweiten Spur zurückzuführen war. Bei der Proteinbande von 30 kDa handelte es sich um den Nachweis nur gering- oder unphosphorylierten ASF/SF2s; die Identität des Proteins mit einer Größe von 24 kDa blieb offen.

Das Protein mit einer Größe von 36 kDa zeigte eine stärkere Abnahme der Intensität durch die Mutation des Motivs als die beiden anderen, wobei noch eine schwache Bande detektierbar war. Von der Laufhöhe abgeleitet, handelte es sich um phosphoryliertes ASF/SF2. Sowohl eine zu starke, als auch eine zu geringe Phosphorylierung des Proteins führt zu seiner Inaktivierung (426,445).

Lediglich ein bestimmtes Muster an gebundenen Phosphaten, welches zu einem apparenten Laufverhalten von etwa 36 kDa führt, katalysiert die *trans*-wirkenden Eigenschaften des ASF/SF2s. Im Fall des Exons 2 konnte damit gezeigt werden,

dass die Mutation des Heptamermotivs, die zur Aufhebung der Exonererkennung führte, gleichzeitig die Bindung von ASF/SF2 stark reduzierte.

Um die Bindung weiterer SR-Proteine nachzuweisen, für die kein monoklonaler Antikörper käuflich erhältlich war, wurde ein Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die phosphorylierten RS-Domänen mehrerer SR-Proteine (mAb104) inkubiert. Die beiden detektierten Proteine wiesen apparente Laufhöhen von 36 kDa und 40 kDa auf (Abb. 19 D). Während bei der oberen Proteinbande durch die Mutation des Heptamermotivs eher eine geringe Zunahme zu sehen war, nahm die Intensität der 36 kDa Bande ab. Im Gegensatz zum Nachweis mit dem spezifischen ASF/SF2 Antikörper blieb bei Verwendung des Phospho-Antikörpers eine deutliche Bande sichtbar. Diese stammte entweder von der Bindung weiteren ASF/SF2's an das zweite Motiv oder es handelte sich um ein anderes SR-Protein mit gleicher Laufhöhe, da im oberen Blot nahezu kein verbleibendes ASF/SF2 nach Mutation des ersten Heptamers nachgewiesen werden konnte. Diese Frage blieb auch im weiteren Verlauf der Arbeit offen.

3.2.6 Die ESE-Sequenzen sind innerhalb der HIV-1 Subtypen und im SIV konserviert

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Heptamermotive oder die ASF/SF2-Bindestellen innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert sind, wurden die jeweiligen Exon 2-Konsensus-Sequenzen miteinander verglichen (Abb. 20). Auffällig war die generell hohe Konservierung der Exon 2 Sequenz. Lediglich 4 Positionen (13, 17, 37 und 40) zeigten eine Variabilität um mehr als ein Nukleotid, wobei die Position 13 durch ein Pyrimidin und die Position 37 durch ein Purin bestimmt war. An Position 17 kam bevorzugt ein Purin vor (A, selten G), während die Position 40 des Exons scheinbar keine Präferenz zeigte. Sowohl die Heptamermotive (lila Balken unterhalb), wie auch die ASF/SF2 Bindestellen (rote Balken unterhalb) waren innerhalb der untersuchten HIV-1 Stämme konserviert. Dies ließ auf eine einheitliche Regulation des Exons 2 innerhalb der HIV-1 Subtypen schließen und unterstreicht die Bedeutung der Exonsequenz bei der Regulation der Genexpression.

Ein Vergleich der HIV-1 Exon 2 Sequenz mit dem Exon 2 des SIV zeigte lediglich eine Konservierung des zweiten Heptamermotivs. Ein genauerer Sequenzvergleich deutete auf eine Verschiebung des Motivs um 2 Nukleotide hin, wodurch die Sequenz von **TGGAAG** nach **TGTGGAA** verändert wurde. Bei Verwendung des

Rescue-ESE (134) konnten ESE-Elemente innerhalb der verschobenen Heptatmer-motive identifiziert werden, die positionell denen im HIV-1 entsprechen und die daher die *cis*-regulatorischen Elemente des SIV-Exons 2 darstellen könnten.

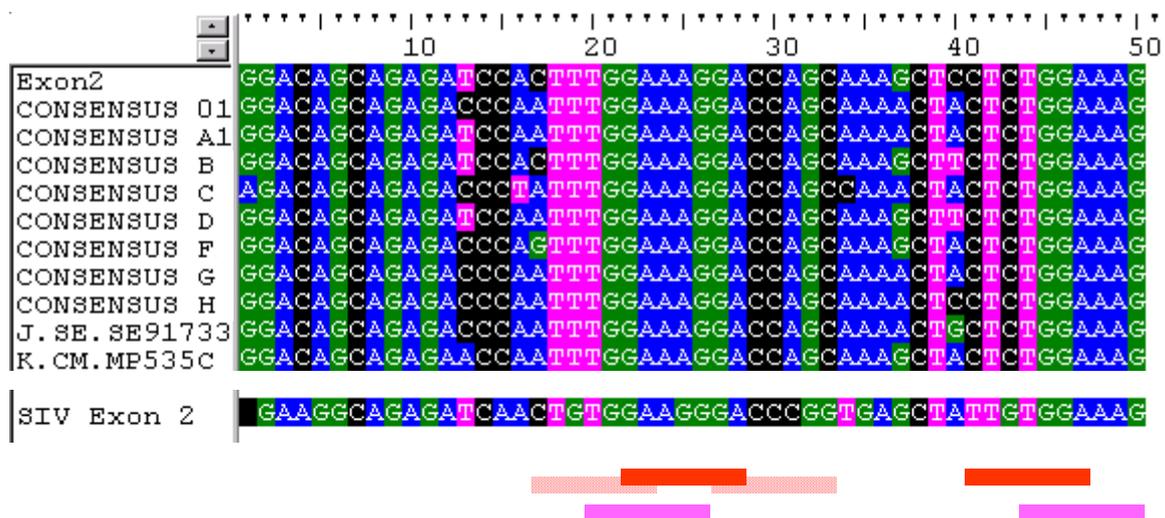


Abb. 20: Konservierung der *cis*-wirkenden Sequenzen im Exon 2 innerhalb der HIV-Stämme und im Vergleich zum SIV. In lila sind die konservierten Heptamer-Sequenzen dargestellt, in rot die potentiellen SF2/ASF-Bindestellen, die rot gerasterten Balken zeigen benachbarte potentielle ASF/SF2 Bindestellen im SIV.

3.2.7 Stille Mutation der ASF/SF2-Bindungsstelle in der kodierenden *vif*-Region

Die vorangegangenen Ergebnisse hatten gezeigt, dass die zwei identifizierten Heptatmer-motive zusammen für die Erkennung des Exons 2 essentiell waren, da die Mutation eines Motivs zum Verlust des Einschusses vom Exon 2 führte. Aufgrund der Konservierung der *cis*-regulatorischen Elemente des Exons 2 innerhalb der HIV-1 Subtypen wurde eine weitere Mutation des ersten Heptatmer-motivs untersucht, die im kodierenden Kontext des Pol-Proteins keinen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz haben sollte („stille Mutation“) und so die Untersuchung des Einflusses des ESEs auf die virale Replikation erlauben sollte. Die Transsition des dritten A's innerhalb des Heptamers (Abb. 13) führte unter Erhalt eines Lysin-Codons zum nahezu vollständigen Verlust der Exonerkenkung (Abb. 21) im Minigenkonstrukt (Abb. 12 A). Es konnte nur eine geringe Mengen von RNA detektiert werden, deren erstes Intron gespleißt

wurde bzw. die ein korrekt gespleißtes Exon 2 beinhaltetete. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Motiv-Mutationen, wurde der größte Anteil der RNA ungespleißt retardiert und nicht unter Ausschluss des Exons 2 gespleißt. Da keine weitere stille Mutation gleichzeitig die ASF/SF2 Proteinbindestelle betraf, sollte diese Mutation in HIV-NL4.3 kloniert werden, um die Auswirkung auf die Replikation infektiöser HIV-1 Viren zu untersuchen. Diese Experimente sollen, mangels eigenem S3-Labor, im Labor von Prof. Hauber in Hamburg durchgeführt werden, waren jedoch bis zum Abschluss der Arbeit noch nicht beendet.

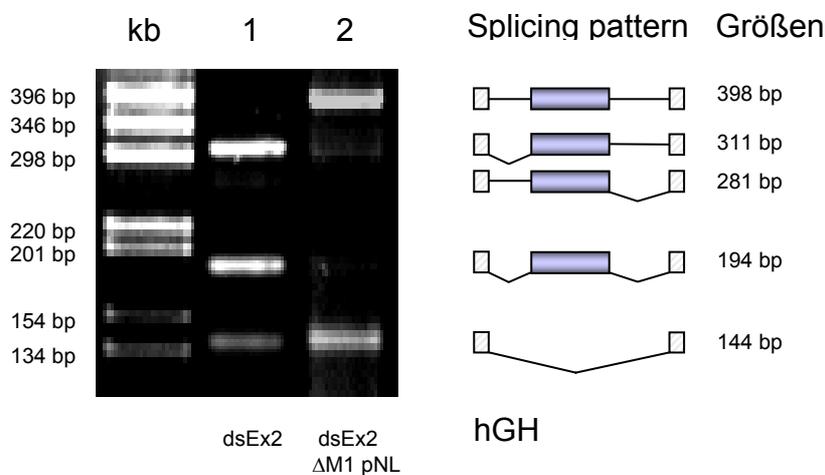


Abb. 21: Verringerung der Exonererkennung durch eine stille Mutation in einer SF2/ASF Bindestelle. RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je $2\mu\text{g}$ der Zwei-Intron Vektoren, $1\mu\text{g}$ SVctat und $1\mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Rechts neben dem Gel ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Spur 1: LTR ds Ex2; Spur 2: LTR ds Ex2 Δ M1pNL.

3.3 Analyse *cis*-wirkender Elemente im Exon 3

Die Untersuchungen der Spleißstellen des Exons 3 (3.1.3) hatten gezeigt, dass zum Einen der Spleißdonor #3 die Bindung der U1 snRNA ermöglicht und im entsprechenden Kontext damit zum Nachweis von Env-Protein führt, also funktionell war, und zum Anderen, dass der Spleißakzeptor #3 trotz einer schlechteren Verzweigungsstelle, fünfmal effizienter war, als der Spleißakzeptor #2 (Abb. 11 B). Diese

Ergebnisse standen im Einklang mit dem verstärkten Auftreten der Spleißvariante mit inserierter Exon 3-Sequenz nach Infektion von PM-1 Zellen mit HIV-NL4.3.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen wurde ein Minigenkonstrukt hergestellt, das wie die Vektoren im Abschnitt 3.2, die Exons 1 und 4 enthielt, sowie das Exon 3 mit flankierenden Spleißstellen als mittleres Exon (ds Ex3; Abb. 22 A). Die transiente Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen führte nur zu einem geringen Nachweis sowohl von prozessierter, als auch von unprozessierter RNA (Abb. 22 B; Spur 1). Die Analyse des Spleißmusters zeigte, dass die Spleißvariante mit Exon 3 Einschluss 84% ausmachte. Da neben diesem Spleißprodukt auch Spleißvarianten mit nur einem prozessierten Intron nachgewiesen werden konnten, fand insgesamt eine Erkennung des alternativ gespleißten Exons an dem wenigstens einer der beiden Exon 3 Spleißstellen beteiligt waren in 92 % statt. In nur 2 % wurde das Exon 3 völlig ausgeschlossen.

Da der Spleißdonor zwar effizienter als der des Exons 2 war, jedoch nicht als „starker“ Spleißdonor eingestuft wurde (63), führte dieses Ergebnis zu der Annahme, dass ähnlich wie im Exon 2 eine positive Regulation des Spleißens durch *cis*-wirkende Elemente vorliegen könnte.

3.3.1 Das im Exon 3 beschriebene Silencer-Element führt zur RNA-Degradation

Bereits 2001 beschrieben Bilodeau et al. (32) im Exon 3 drei hnRNP A1-Bindungsstellen, die als Silencer des SA3s wirken sollten. Dieses Ergebnis konnte im vorangegangenen Versuch jedoch nicht bestätigt werden, da in 90 % die Spleißvarianten nachgewiesen wurden, die den SA3 erkannten.

Um den Effekt des hnRNP A1-Silencer-Elementes zu untersuchen, wurden die von Bilodeau beschriebenen Mutationen der Bindungsstellen in den oben beschriebenen Vektor eingebracht (Abb. 26 A) und ihr Einfluss auf die Exonerkenung nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen analysiert. Erstaunlicherweise führte die Mutation des „Silencers“ (ds Ex3 ESS-) zum Anstieg der Gesamt-RNA-Menge (Abb. 22 B; vgl. Spur 1 und 2). Dieser Anstieg war allerdings spezifisch auf die Menge der Spleißvariante mit Einschluss des Exons 3 zurückzuführen (4,7 facher Anstieg), ohne dass deswegen der Akzeptor effizienter genutzt worden wäre (1.1 facher Anstieg).

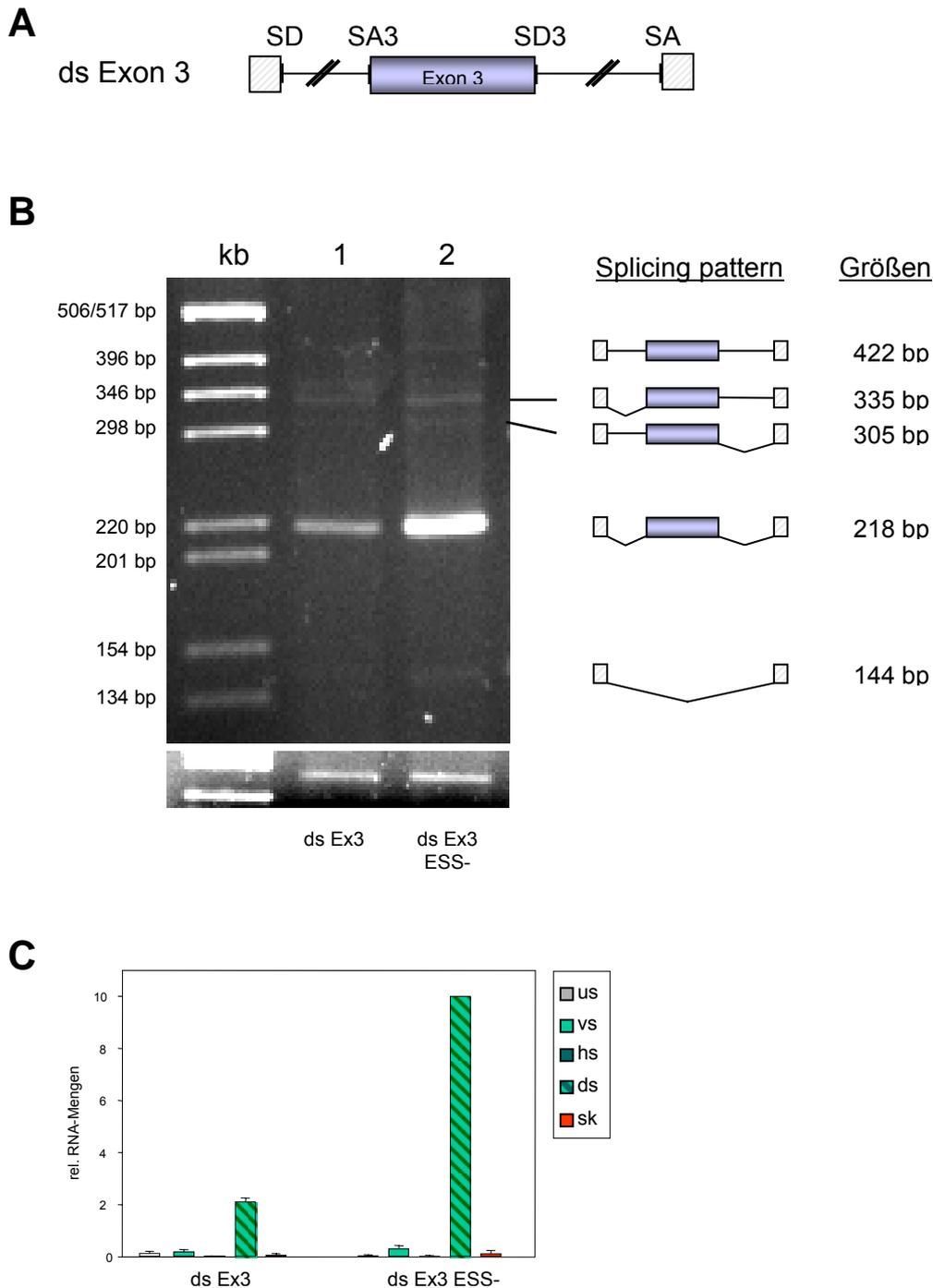


Abb. 22: Expressionsanalyse des Exon 3 Minigenkonstruktes mit und ohne ESS-Element. **A:** Schematische Darstellung des Drei-Exon-Zwei-Intron-Minigenkonstruktes mit Exon 3 und den flankierenden Spleißstellen SA3 und SD3 (LTR ds Ex3). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je $2 \mu\text{g}$ der zwei-Intron Vektoren, $1 \mu\text{g}$ SVctat und $1 \mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Rechts des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR ds Ex3; Spur 2: LTR ds Ex3 ESS-.

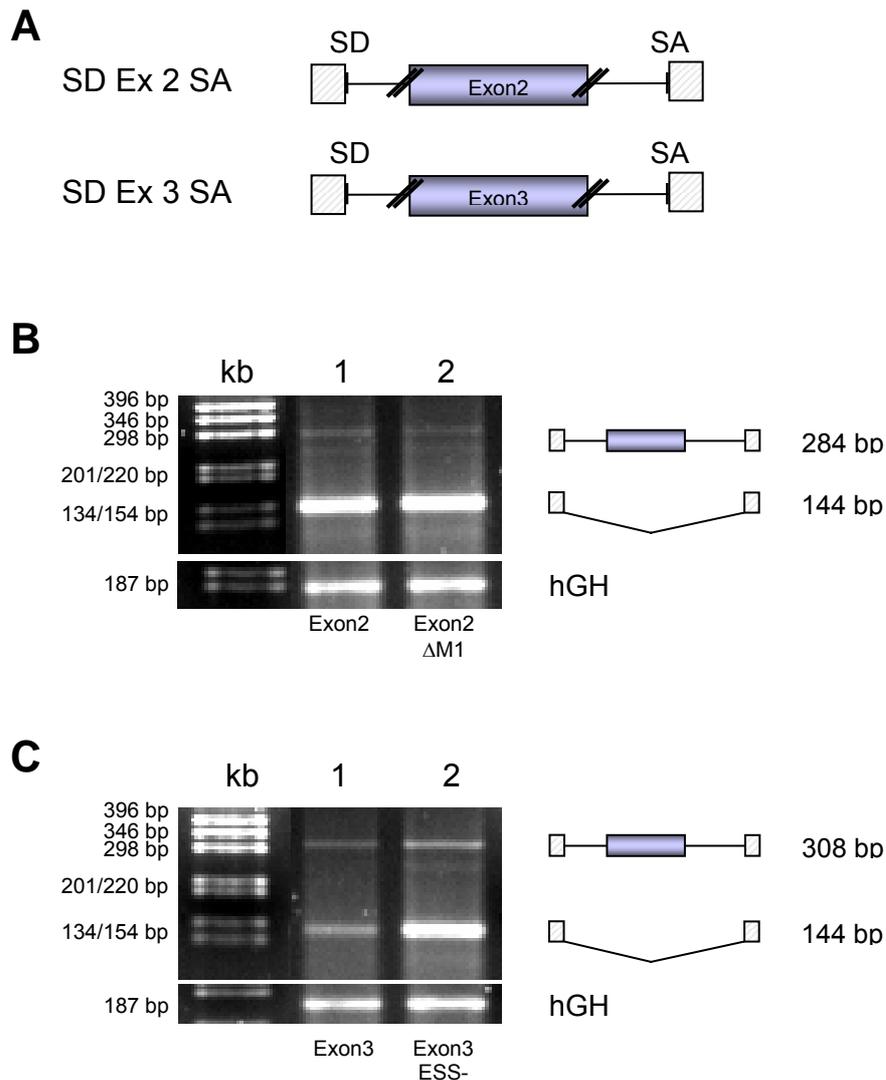
Diese Untersuchungen zeigten, dass der hnRNP A1-Silencer in diesem Kontext die Stabilität der Exon 3 enthaltenden RNA deutlich negativ beeinflusst, ohne dabei das Spleißmuster als solches zu verändern.

3.3.2 Das Exon 3 beeinflusst die Stabilität der RNA bereits vor dem Spleißen

Um untersuchen zu können, ob die Beeinflussung der Stabilität durch die Exon 3-Sequenz zeitlich vor oder nach dem Spleißen erfolgte, wurde diese Sequenz und zur Kontrolle die Exon 2-Sequenz, ohne ihre Spleißstellen als ein Teil des Introns kloniert (Intronisierung der Exonsequenzen, Abb. 23 A; SD Ex2 SA und SD Ex3 SA). Hierdurch konnte eine sequenzspezifische Beeinflussung der RNA-Stabilität nach dem Spleißen ausgeschlossen werden. Das Exon 2 bzw. die Mutationen der Heptamer-motive hatten in allen vorangegangenen Versuchen keinen Einfluss auf die Stabilität erkennen lassen und zeigten, dass die nachweisbare Gesamtmenge an RNA hierdurch nicht verändert wurde (Abb. 23 B). Die für das ESS-Element bereits gezeigte Destabilisierung der RNA (3.3.1;239) konnte in diesem Kontext ebenfalls nachgewiesen werden. Sie war jedoch nur gut halb so groß, wie bei Anwesenheit beider Spleißstellen.

Daraus ließ sich schließen, dass die Sequenz des Exons 3, bereits vor dem Spleißen, zu einer teilweisen Herabsetzung der RNA-Menge führte. Inwiefern der geringere Einfluss auf die Stabilität auf die Deletion der Spleißstellen zurückzuführen war, wurde im Folgenden ebenfalls untersucht.

In einem zweiten Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Krummheuer (238) ein Konstrukt verwendet, welches die Sequenzen der Exons 1, 3 und 4 als cDNA enthielt. Durch diese Versuchsanordnung sollte bestimmt werden, ob das Spleißen des Exons 3 eine Voraussetzung für die RNA-Degradation darstellt. Da auch hier eine Verminderung der RNA-Menge (46 %) nachzuweisen war, konnte die Instabilität als spleißunabhängig beschrieben werden.



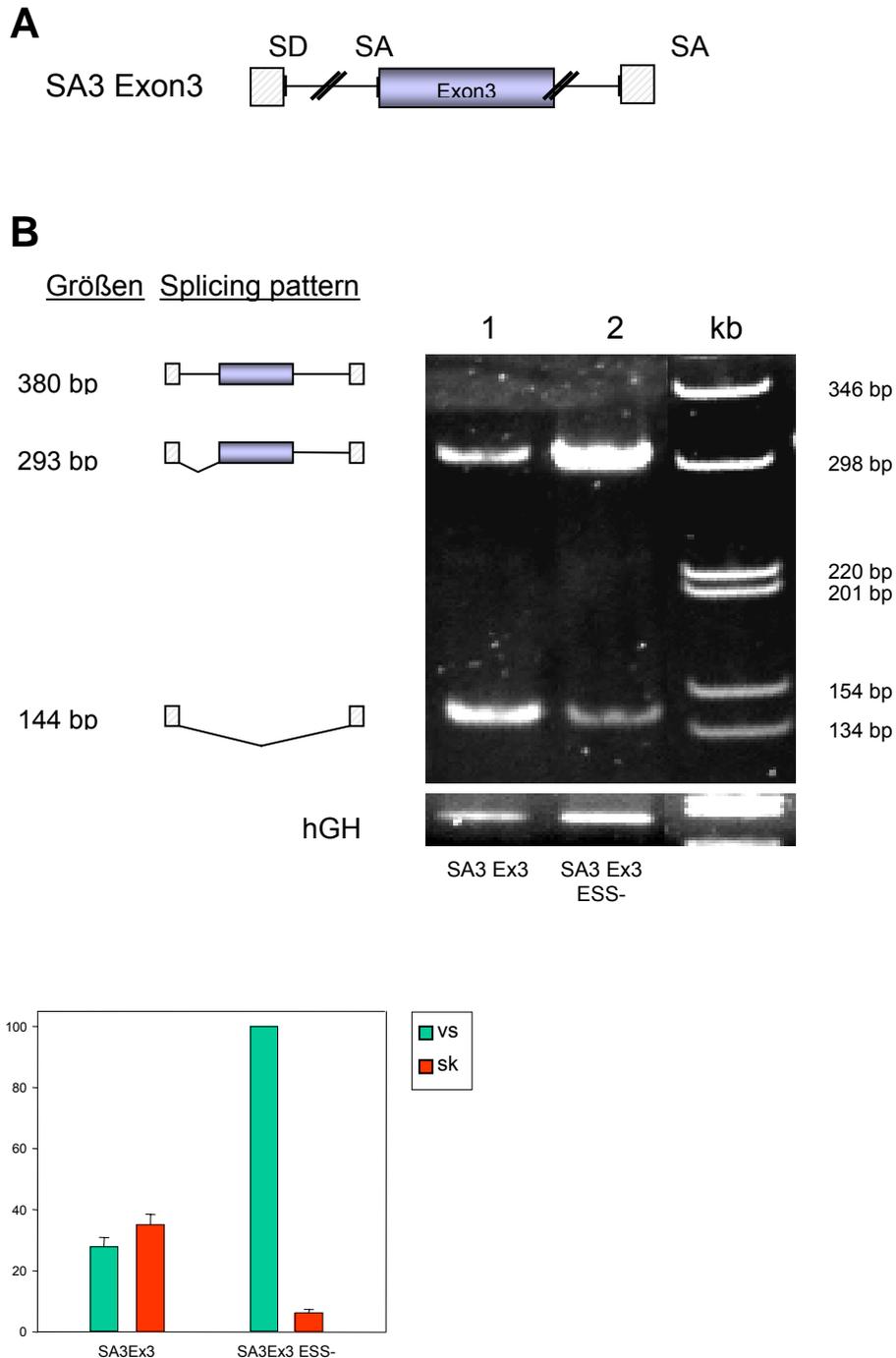
Stabilisierung ESS+ : ESS- a) im Intron: 2,7 (hier)
b) im ds-Kontext: 4,6 (Abb. 22 C)

Abb. 23: Einfluss der *cis*-regulatorischen Elemente in den Exons 2 und 3 auf die ungespleißte RNA. **A:** Schematische Darstellung der Ein-Intron-Minigenkonstrukte mit den Exonsequenzen 2 oder 3 im Intron ohne die flankierenden Spleißstellen. **B/C:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. 2,5 x 10⁵ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der Ein-Intron Vektoren, 1 µg SVctat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Rechts der Gele ist die Zuordnung der gespleißten und ungespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das obere Gel (**B**) zeigt die Expression des Vektors SD Ex2 SA (Spur 1) und SD Ex2 SA ΔM1 (Spur 2), das untere Gel (**C**) den Nachweis gespleißter und ungespleißter RNA von SD Ex3 SA (Spur 1) und SD Ex3 SA ESS- (ESS-). Unterhalb des Gels ist der Faktor der Stabilisierung durch Mutation des ESS angegeben.

3.3.3 Das ESS-Element vermindert die Erkennung des SA3 ohne die RNA Stabilität zu beeinflussen

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass der hnRNP A1-Silencer als destabilisierendes Element wirkt, wenn das Exon entweder beide oder keine flankierenden Spleißstellen besaß. Im Gegensatz zum bisher verwendeten Exon 3 Minigen-Konstrukt enthielt der Vektor von Bilodeau et al. (32) nur den Spleißakzeptor #3 und nicht den Spleißdonor #3, wodurch eine *vpr*-mRNA kodiert wurde. Um die Abhängigkeit des beschriebenen Degradations-Effektes von der Anwesenheit nur einer Spleißstelle zu untersuchen, wurde in dem Exon 3 Minigen-Konstrukt zunächst ebenfalls nur der Spleißdonor #3 deletiert (Abb. 24 A; SA3 Ex3). Nach Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen und anschließender RNA-Analyse zeigte diese überraschenderweise, dass der hnRNP A1-Silencer jetzt nur noch einen geringen Einfluss auf die RNA Stabilität ausübte. Die Mutation des ESS-Elements führte zu einer Zunahme der nachweisbaren RNA-Menge um den Faktor 1,7. Damit war die Steigerung erheblich geringer, als bei zusätzlicher Anwesenheit des Spleißdonors #3 (4,7 fach; ds Ex3), dem hierdurch eine entscheidende Rolle für die RNA Instabilität zukam. Einhergehend mit dem geringeren Einfluss des ESSs auf die RNA-Stabilität trat auch eine veränderte Spleißstellen-Nutzung auf. Die Mutation des ESS-Elementes (SA3 Ex3 ESS-) führte zu einem stärkeren Auftreten der Spleißvariante, die den SA3 nutzte (Abb. 24). Während bei intaktem Silencer nur 46% der RNAs den SA3 erkannten, verdoppelte sich dieser Wert (94 %) bei dem mutierten Silencer. Damit konnte gezeigt werden, dass ohne die 5' Spleißstelle zum Einen die hnRNP A1-Bindungsstellen als Silencer wirkten und zum Anderen, dass das Instabilitäts-element bei Anwesenheit nur der 3' Spleißstelle lediglich eine geringe Auswirkung auf die RNA Stabilität zeigte.

Abb. 24: Einfluss des ESS-Elementes auf die Stabilität und die Nutzung des Spleißakzeptors 3. **A:** Schematische Darstellung des Drei-ExonZwei-Intron-Minigenkonstrukts mit Exon 3 (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißakzeptoren), wobei der Spleißdonor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR SA3 Ex3). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. 2,5 x 10⁵ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2µg der Zwei-Intron Vektoren, 1 µg SVctat und 1µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte



mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR SA3 Ex3; Spur 2: LTR SA3 Ex3 ESS-. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in nur vorne gespleißte (vs) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen.

C: Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur vorne gespleißte (vs), nur hinten gespleißte (hs), sowohl vorne wie auch hinten gespleißte (ds) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen. Die Änderung der nachweisbaren RNA-Menge ergibt sich durch Summation aller Spleißvarianten jeweils eines Vektors und Vergleich der Werte der beiden untersuchten Vektoren. Die Effizienz der Spleißakzeptornutzung kann durch den prozentualen Anteil der Spleißvarianten mit prozessiertem ersten Intron beschrieben werden (vs und ds).

3.3.4 Die Mutation des hnRNP A1-Silencers ermöglicht die Env-Expression

Offensichtlich beeinflusst der hnRNP A1-Silencer in An- und Abwesenheit beider flankierender Spleißstellen in hohem Maße die RNA-Stabilität, während die Anwesenheit nur des Spleißakzeptors, zwar dessen eigene Nutzung, jedoch nicht die RNA Stabilität reguliert.

Um zu untersuchen, ob auch nur der Verlust des Spleißakzeptors #3 zum Verlust der RNA Instabilität führt, wurde im Folgenden nur die 3' Spleißstelle deletiert (Abb. 25 A; Ex3 SD3). Dies führte, wie schon im vergleichbar aufgebauten Vektor mit der Exon 2-Sequenz (vgl. 3.2.3, Abb. 15), zum vollständigen Verlust der Exonerkenung. Die gesamte RNA wurde unter Auslassung des Exons 3 gespleißt (Abb. 25 B/C). Aufgrund des fehlenden Spleißereignisses vom SD3 auf den terminalen Spleißakzeptor konnte in diesem Kontext keine Aussage über die Beeinflussung der Nutzung des SD3 durch die Mutation der hnRNP A1-Bindungsstellen gemacht werden.

Da die Mutation des ESS-Elementes jedoch keinen Einfluss auf die Gesamt-RNA-Menge hatte, konnte abgeleitet werden, dass der RNA-destabilisierende Einfluss des Exons 3 den Spleißakzeptor voraussetzte. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA Instabilität die gleichzeitige Anwesenheit beider Spleißstellen erfordert. Um in Abwesenheit des flankierenden Spleißakzeptors #3 den Einfluss des ESS-Elementes auf den Spleißdonor dennoch untersuchen zu können, wurde der bereits zuvor beschriebene Leader-abhängige *env*-Expressionvektor (3.2.3; Abb. 27 A) verwendet. Dieser ermöglicht den Nachweis von Glykoprotein in Abhängigkeit von *cis*-regulatorischen Elementen upstream des Spleißdonors.

Die unveränderte Exon 3-Sequenz (SV Ex3 SD4 Δ vpuenv) führte nicht zur Bildung von *env*-Glykoprotein. Inwieweit dieser Effekt auf eine Inhibition des Spleißereignisses durch die Multimerisierung von hnRNP A1 oder auf die Instabilität zurückzuführen ist, kann somit auch in dieser Versuchsanordnung nicht geklärt werden. Allerdings konnte nach Mutation des ESS-Elementes eine deutliche Glykoprotein-Expression nachgewiesen werden (Abb. 27 B vgl. Spur 1 mit 2). Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass im Exon 3 neben den hnRNP A1-Bindungsstellen weitere Proteinbindungsstellen für positiv-regulierende Proteine sein müssten, da Arbeiten im eigenen Labor gezeigt hatten, dass ein funktioneller Spleißdonor positiv-*cis*-regulatorische Elemente im Leader voraussetzt.

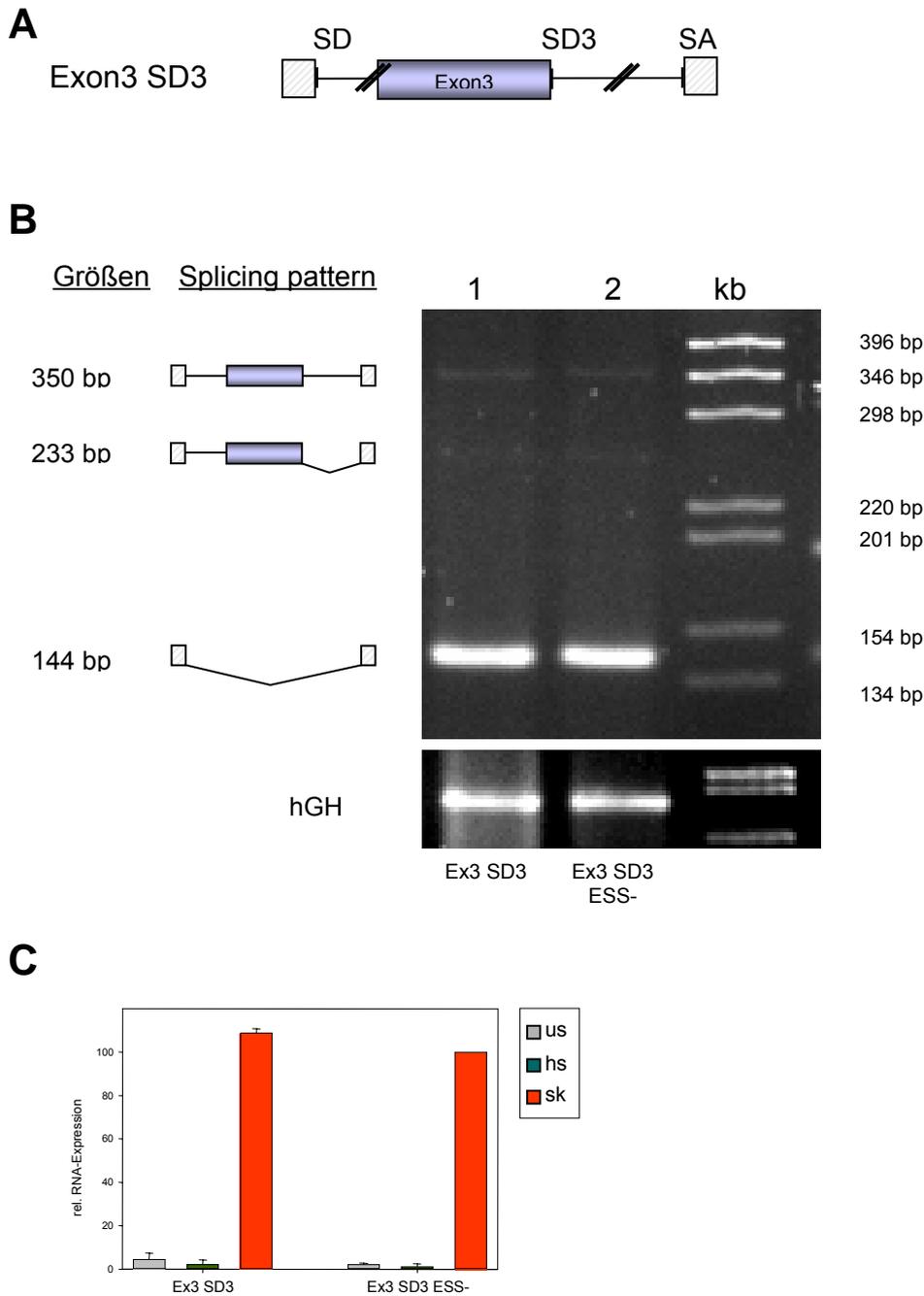


Abb. 25: Einfluss des ESS-Elementes auf den Spleißdonor 3. **A:** Schematische Darstellung des Drei-ExonZwei-Intron-Minigenkonstrukts mit Exon 3 (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißdonoren), wobei der Spleißakzeptor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR Ex3 SD3). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGeneTM6 transient mit je $2\mu\text{g}$ der Zwei-Intron Vektoren, $1\mu\text{g}$ SVcat und $1\mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT_{16} Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Spur 1: LTR Ex3 SD3; Spur 2: LTR Ex3 SD3 ESS-. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur vorne gespleißte (vs) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen.

3.3.5 Die Mutationen der hnRNP A1-Bindungsstellen beeinflussen die vom ESEfinder und Rescue-ESE beschriebenen Enhancer nur geringfügig

Um zu untersuchen, ob neue SR-Proteinbindungsstellen bzw. Enhancer durch die Mutation des Silencers, also der drei hnRNP A1-Bindungsstellen, entstehen, wurde die Exon 3 Sequenz mittels der Analyse-Programme ESEfinder und Rescue-ESE geprüft.

Beide Programme unterscheiden sich in der Art der identifizierten „Enhancer“. Mittels ESEfinder werden Proteinbindungsstellen von vier unterschiedlichen SR-Proteinen vorausgesagt. Da für SR-Proteine eine stark kontextabhängige Wirkung bekannt ist (215), kann grundsätzlich keine Aussage darüber gemacht werden, ob die beschriebenen Proteinbindungsstellen zu einer positiven oder negativen Regulation führen. Im Gegensatz hierzu, identifiziert das Rescue-ESE-Programm bekannte positiv spleißregulierende Sequenzen, jedoch ohne Angabe darüber, um welches RNA-bindende Protein es sich handeln könnte.

Abb. 26 B zeigt in der Mitte die Exon 3 Sequenz und darunter die Auswirkung der hnRNP A1-Bindungsstellen-Mutation nach dem Rescue-ESE. Keine der drei Dinukleotid-Mutationen führte zur Entstehung eines neuen Enhancer-Elementes, welches die Steigerung der SA3-Erkennung beeinflusst haben könnte.

Ähnliche Ergebnisse konnten mit der Analyse durch den ESEfinder erzielt werden. Zwei der drei hnRNP A1-Bindungsstellen lagen in einem Sequenzabschnitt, in dem keine potentiellen SR-Proteinbindungsstellen vorausgesagt wurden. Die Mutationen dieser beiden Bindungsstellen führten lediglich zur Verdopplung einer potentiellen SRp55 Bindestelle. Durch die Mutation der ersten hnRNP A1-Proteinbindungsstelle entstanden dagegen keine neuen SR-Bindungsstellen.

Neben den Elementen, die von den hnRNP A1 Bindungsstellen überlagert wurden, identifizierten sowohl der ESEfinder, als auch der Rescue-ESE weitere spleißregulierende Elemente. Der 5' Bereich des Exons 3 (23 Nt) enthielt laut ESEfinder vier SRp40 Bindungsstellen, laut Rescue-ESE zwei Enhancer. Im Sequenzbereich 3'-wärts der dritten hnRNP A1 Bindungsstelle befanden sich laut dem ESEfinder eine potentielle SRp55 und eine potentielle ASF/SF2 Proteinbindungsstelle. Dem Rescue-ESE zufolge überlagerten diese drei positiv spleißregulierenden Sequenz-Elementen.

A

Sequenz Exon 3

Ohne Mutation: ACTCTGCTATAAGAAAGGCCTTA **TTAG**GACACATAG **TTAG**CCC **TAGG**TGTGAAT
ATCAAGCAGGACATAAC

ESS-: ACTCTGCTATAAGAAAGGCCTTA **TTCT**GACACATAG **TTCT**CCC **TCTG**TGTGAAT
ATCAAGCAGGACATAAC

B

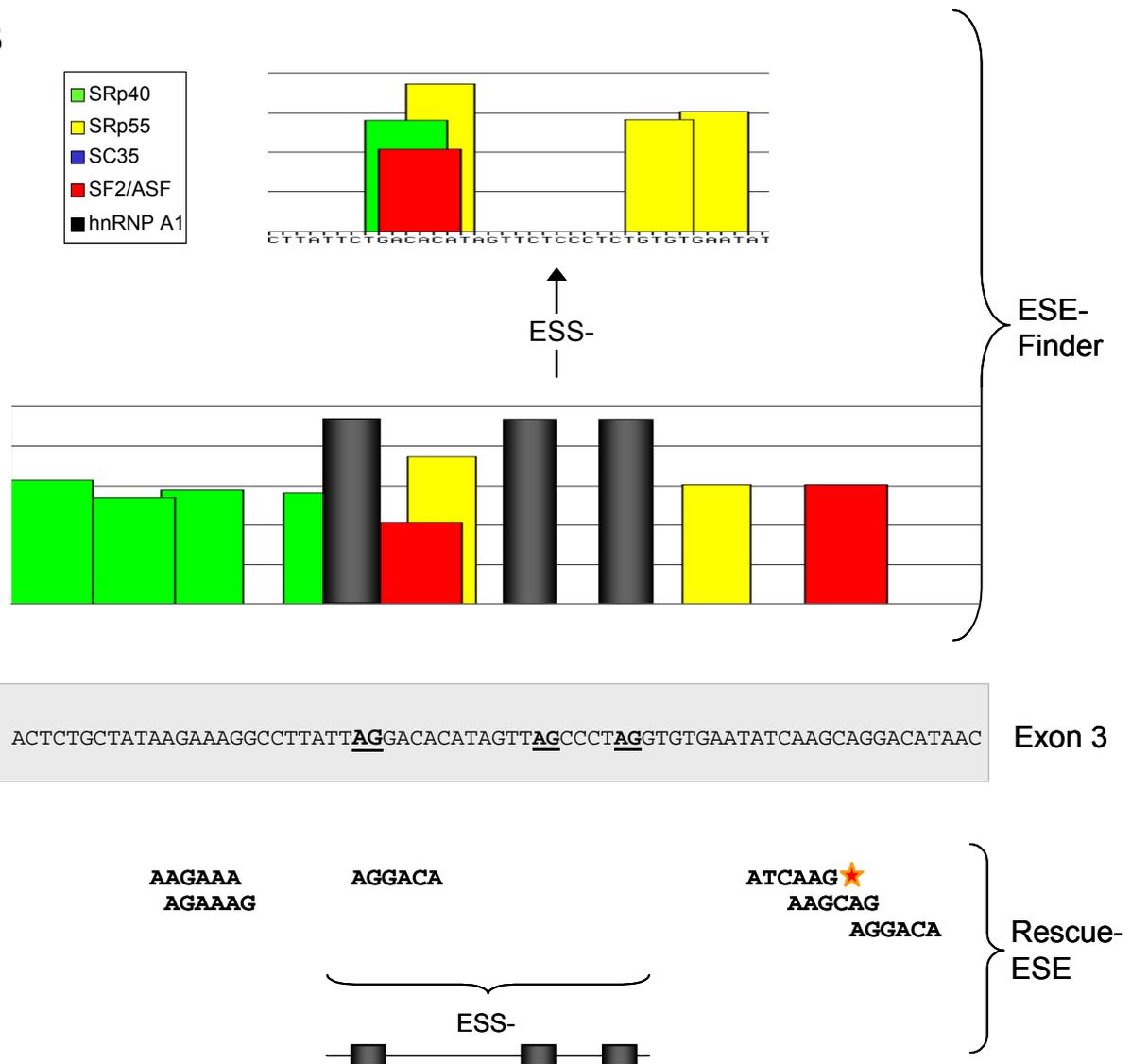


Abb. 26: Darstellung potentieller *cis*-regulatorischer Elemente im Exon 3. A: Sequenz des Exons 3 und mutierte Sequenzen. In fetter Schrift sind die hnRNP A1 Bindestellen dargestellt und in rot die jeweils eingefügten Mutationen. B: Darstellung potentieller *cis*-regulatorischer Elemente im Exon 3. Direkt oberhalb der Exon 3 Sequenz sind die mit dem ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) vorhergesagten potentiellen Bindestellen der Proteine SF2/ASF (rot), SRp40 (grün), SC35 (blau) und SRp55 (gelb) dargestellt, die hnRNP A1 Bindestellen sind als schwarze Balken wiedergegeben. Darüber befindet sich das veränderte Bindungsmuster bei Mutation des ESS (3 hnRNP A1 Bindestellen). Unterhalb der Exon 3 Sequenz sind die Bindemotive dargestellt, die vom Rescue-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) definiert werden. Hierbei wird keine Bindesequenz für ein definiertes Protein vorhergesagt. Die innerhalb der geschweiften Klammer vorhergesagte Bindestelle fällt bei den Mutationen der hnRNP A1 Bindestellen weg. Die Mutation der vom ESEfinder vorhergesagten potentiellen SRp55 Bindestelle führt zu keiner Änderung von Bindestellen des Rescue-ESEs, die Mutation der potentiellen SF2/ASF Bindestelle entfernt eine Bindestelle (roter Stern).

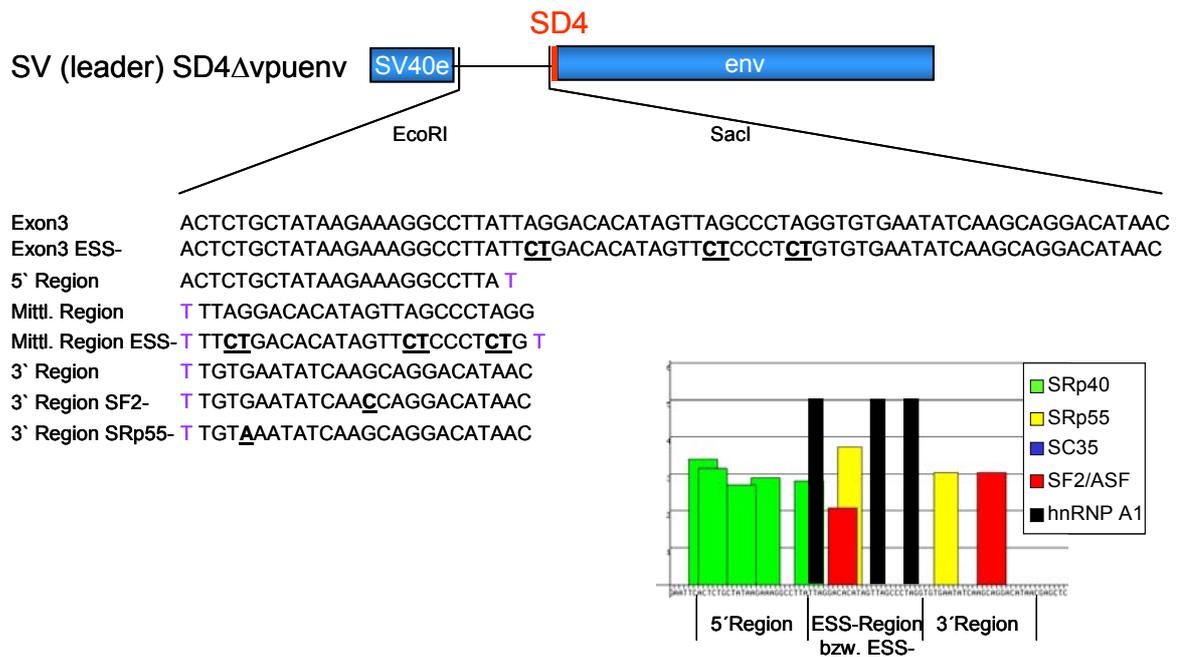
3.3.6 Das Exon 3 enthält mehrere Silencer und Enhancer-Sequenzen

Aufgrund der theoretischen Ausführungen des letzten Abschnitts, wurden Vektoren hergestellt, mittels derer der Einfluss der vorhergesagten Enhancer-Elemente bzw. der potentiellen Proteinbindungsstellen überprüft werden konnte. Der Ausgangsvektor entsprach dem im Abschnitt 3.2.3 beschriebene Vektor (Abb. 27 A; SV (Leader) SD4 Δ vpuenv). Bei den untersuchten Leadersequenzen handelt es sich um Teilssequenzen des Exons 3: die 5'-, die mittlere und die 3'-liegende Region (Abb. 27 A; Einschub). Der mittlere Sequenzabschnitt enthielt die hnRNP A1-Bindungsstellen und wurde daher auch mit den oben analysierten Mutationen getestet. Zusätzlich wurden die in der 3' Region beschriebenen potentiellen SRp55 und ASF/SF2-Bindungsstellen durch Punktmutationen inaktiviert. HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit diesen Vektoren transient transfiziert. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem *rev*-exprimierenden Vektor (SVcrev) cotransfiziert. Die Untersuchung der Teilabschnitte des Exons 3 mittels Western Blot Analyse bestätigte nur zu einem Teil die von den Computerprogrammen vorausgesagten Enhancer-Elemente.

Sowohl die 5' Region des Exons (Abb. 27 B; Spur 3) als auch die 3' Region (Spur 6) waren in der Lage die U1 snRNP-Bindung zu unterstützen und führten zum Nachweis von Glykoprotein. Hierbei wies der 3' Bereich des Exons eine deutlich stärkere *env*-Expression auf, als der 5' Bereich. Die Insertion des mittleren Sequenzabschnittes führte weder ohne noch mit Mutation zum deutlichen *env*-Nachweis (Spuren 4 und 5). Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Mutationen der hnRNP A1-Bindungsstellen nicht zur Entstehung starker Enhancer-Elemente führten, die den Exon-Einschluss positiv beeinflussten. Daher mussten die weiteren *cis*-regulatorischen Elemente 5'- oder 3'-wärts von den hnRNP A1-Bindungsstellen für den Anstieg der Glykoprotein-Expression verantwortlich sein (Abb. 27 B; Spur 1 und 2).

Erstaunlicherweise führten weder der 5' noch der 3' Bereich des Exons für sich alleine zu einer vergleichbar hohen Proteinexpression, wie die, die mit dem Exon 3 und seiner mutierten Silencer-Sequenz erzielt werden konnte. Dies könnte zum Einen mit einem synergistischen Effekt der Enhancer-Elemente erklärt werden, zum Anderen könnte aber auch ein weiterer Silencer innerhalb einer der Teilssequenzen vorhanden sein, der die Expression verringerte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die potentiellen SRp55 und ASF/SF2-Bindungsstellen im 3' Bereich des Exons einzeln mutiert und der Effekt dieser Mutationen auf die Proteinexpression untersucht.

A



B

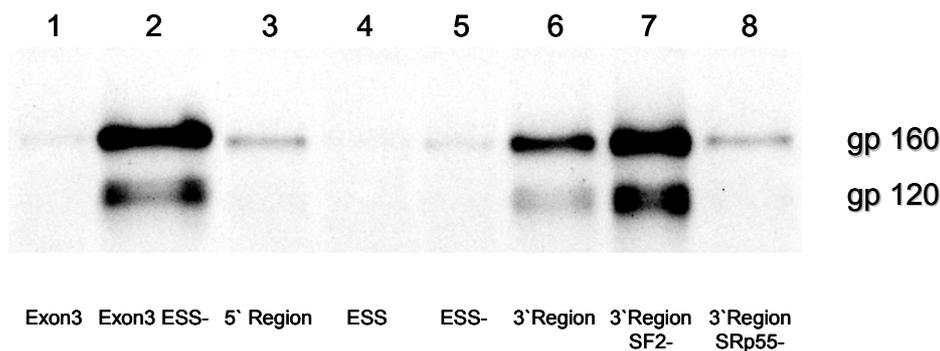
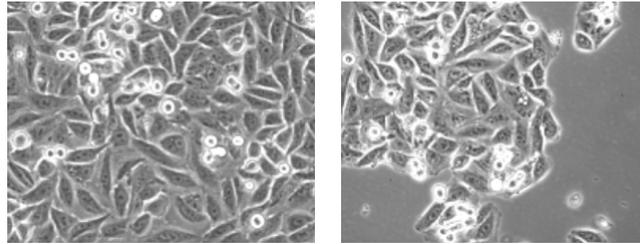
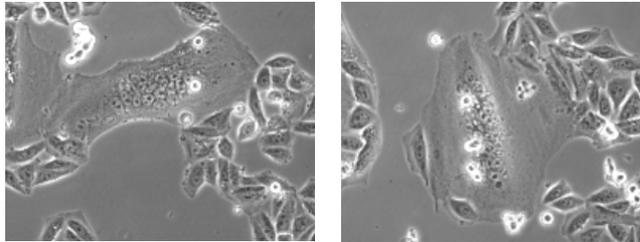


Abb. 27: Einfluss des ESS-Elementes auf die Bindung des U1 snRNPs an den Spleißdonor. A: Schematische Darstellung des *env*-Expressionsvektors zur Untersuchung des Einflusses von Leadersequenzen auf die Nutzung des Spleißdonors durch das U1 snRNP. Unterhalb befinden sich die inserierten (Teil-) Leadersequenzen und zugehörige Mutationen. **B:** *Env* Glykoprotein-Nachweis im Western Blot. $2,5 \times 10^5$ Hela-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENETM 6 transient mit je 2 µg der *env*-exprimierenden Vektoren, 1 µg SVcrev und 1 µg pGL3 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine präpariert und nach Normierung auf die Gesamtproteinmenge und Transfektionseffizienz auf einem 7 % SDS-Gel aufgetrennt und gebロットet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp120 (Boehringer), einem POD-gekoppelten Zweitantikörper und Chemilumineszenznachweis mit dem F1-Lumi-Imager (Roche). Einfluß des Leaderexons 3 und Mutationen bzw. Deletionen auf die *env*-Glykoprotein-Expression. Spur 1: sd3SD4; Spur 2: sd3SD4 ESS-; Spur 3: sd3SD4 5' Region; Spur 4: sd3SD4 Bereich des ESS; Spur 5: sd3SD4 Bereich des ESS mit Mutation ESS-; Spur 6: sd3SD4 3' Region; Spur 7: sd3SD4 3' Region mit Mutation der potentiellen SF2/ASF Bindestelle; Spur 8: 3' Region mit Mutation der potentiellen SRp55 bzw. ESE-Rescue Bindestelle.

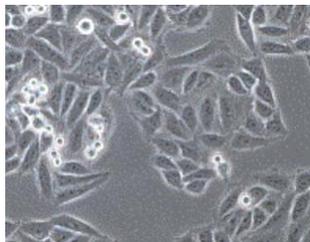
Leader Ex3



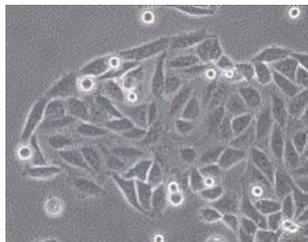
Leader Ex3 ESS-



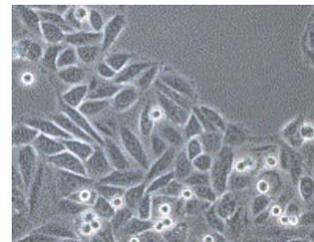
Leader Ex3 5` Bereich



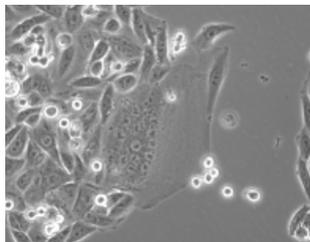
Leader Ex3 ESS-Bereich



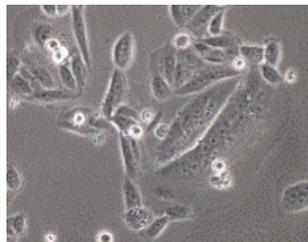
Leader Ex3 ESS-Bereich mutiert



Leader Ex3 3` Bereich



Leader Ex3 5` Bereich SF2-



Leader Ex3 5` Bereich SRp55-

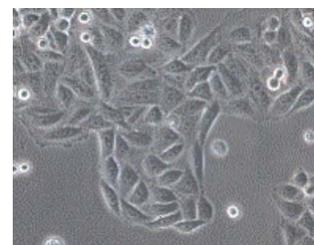
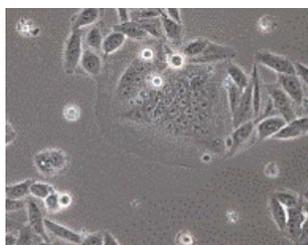
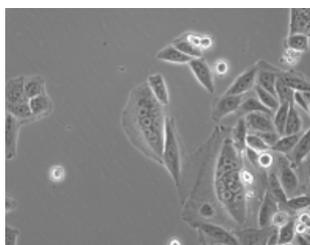
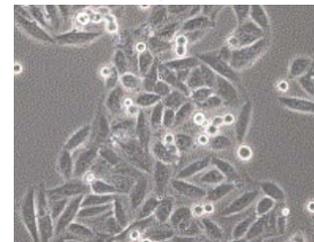


Abb. 28: Synzytienbildung von HeLa-T4⁺ Zellen, die mit den unter Abb.26 B beschriebenen Vektoren transfiziert worden waren. Hierbei verschmelzen die Plasmamembranen der *env*-exprimierenden Zellen mit CD4-Rezeptor tragenden Zellen und bilden abhängig von der Menge oberflächen-ständigen *env*-Glykoproteins vielkernige Riesenzellen aus.

Obwohl ASF/SF2-Bindungsstellen bevorzugt als Enhancer beschrieben wurden, zeigte die potentielle Bindestelle bzw. der durch den Rescue-ESE beschriebene Hexamer-Enhancer einen negativen Effekt. Der Nachweis von Env-Protein im Western-Blot stieg durch die Mutation der ASF/SF2 Bindungsstelle deutlich an und erreichte ein dem Exon 3 mit Mutation des ESS-Elementes vergleichbares Niveau (Abb. 27 B; vgl. Spur 2 und 7). Diese vorhergesagte ASF/SF2 Bindungsstelle stellte also funktionell einen Silencer dar.

Ein gegenteiliger Effekt konnte durch die Mutation der SRp55 Bindungsstelle erreicht werden. Die Mutation dieser Sequenz führte zu einer deutlichen Verringerung der nachweisbaren Glykoproteinmenge (Abb. 27 B; vgl. Spur 2 und 8), obwohl das Rescue-ESE Programm für diese Position keinen Enhancer beschrieben hatte.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass das Leaderexon 3 neben dem Instabilitäts- und Silencer-Element mindestens zwei weitere Enhancer, einen im 5' und einen im 3' Bereich des Exons, und einen weiteren Silencer in der 3' Region besaß. Die Interaktion und die Gewichtung dieser weiteren Elemente führt zur Aufhebung des negativen Einflusses des Exons 3 auf die Bildung von Glykoprotein, wenn der hnRNP A1-Silencer mutiert wurde.

3.3.7 Die *cis*-wirkenden-Sequenzen im Exon 3 sind innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Silencer und Enhancer-Elemente des Exons 3 innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert sind, wurden die jeweiligen Konsensus-Sequenzen miteinander verglichen (Abb. 29). Im Vergleich mit dem Exon 2 war hier eine deutlich höhere Varianz innerhalb der Exonsequenz nachzuweisen. In den meisten Fällen handelte es sich um Transsitionen. Die Positionen der hnRNP A1-Bindungsstellen waren nur in einem einzigen Fall betroffen, womit die Konservierung bei 95 % lag. Die regulatorischen Elemente im 3' Bereich der Sequenz waren ebenfalls konserviert. Die durch Mutation bestätigte ASF/SF2 Bindestelle zeigte nahezu keine Änderung der Sequenz, während die SRp55 Bindestelle in 44 % eine Transversion an Position 53 des Exons aufwies. Die vom Rescue-ESE identifizierten Hexamer-Enhancer zeigten zwar geringe Änderungen in der Sequenz, diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der *cis*-regulatorischen Elemente.

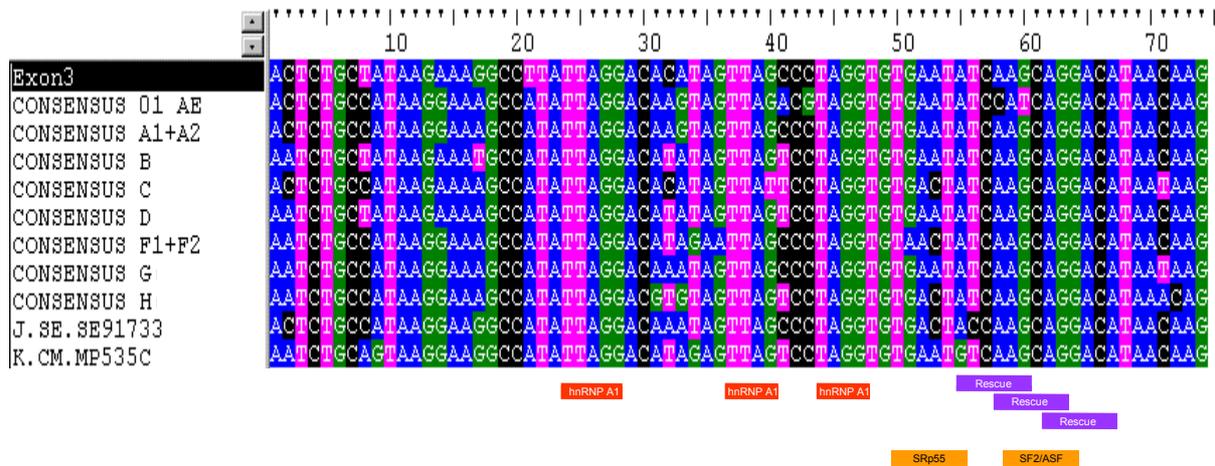


Abb. 29: Konservierung der beschriebenen hnRNP A1 Bindestellen im Exon 3 innerhalb der HIV-Stämme (rote Balken), der vom Rescue-ESE vorhergesagten Bindestellen (lila) und die vom ESEfinder aufgezeigten SF2/ASF und SRp55 Bindestellen (orange).

3.4 Gegenseitige Beeinflussung der Leaderexons 2 und 3

Die Untersuchung der *cis*-regulatorischen Elemente in den Leaderexons 2 und 3 hatte gezeigt, dass es eine gegenseitige Beeinflussung von Enhancern und Silencern gab, wenn diese innerhalb desselben Exons lagen. Um herauszufinden, ob dieser Effekt auch nach dem Zusammenspleißen zweier Exons auftreten kann, wurden die Leaderexons 2 und 3 als eine cDNA zusammengefügt (Abb. 30 A). Es sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die bereits identifizierten Elemente zu diesem Zeitpunkt noch ausüben.

3.4.1 Analyse des Zusammenspiels der neu identifizierten *cis*-wirkenden Elemente in einem Zwei-Intron Kontext

Aufgrund des klonierungsbedingten erzwungenen Spleißereignisses vom SD2 auf den SA3 enthielt das mittlere Exon den Spleißakzeptor #2 und den Spleißdonor #3. Das mittlere Exon 2/3 wurde von zwei funktionellen Spleißstellen flankiert (ds Ex23). Dies könnte ein Intermediat der HIV-1 Transkripte widerspiegeln, die das Exon 2 und 3 tragen. Nach transienter Transfektion von HeLa-T4⁺ Zellen mit diesem Vektor wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Das Spleißmuster (Abb. 30 B;

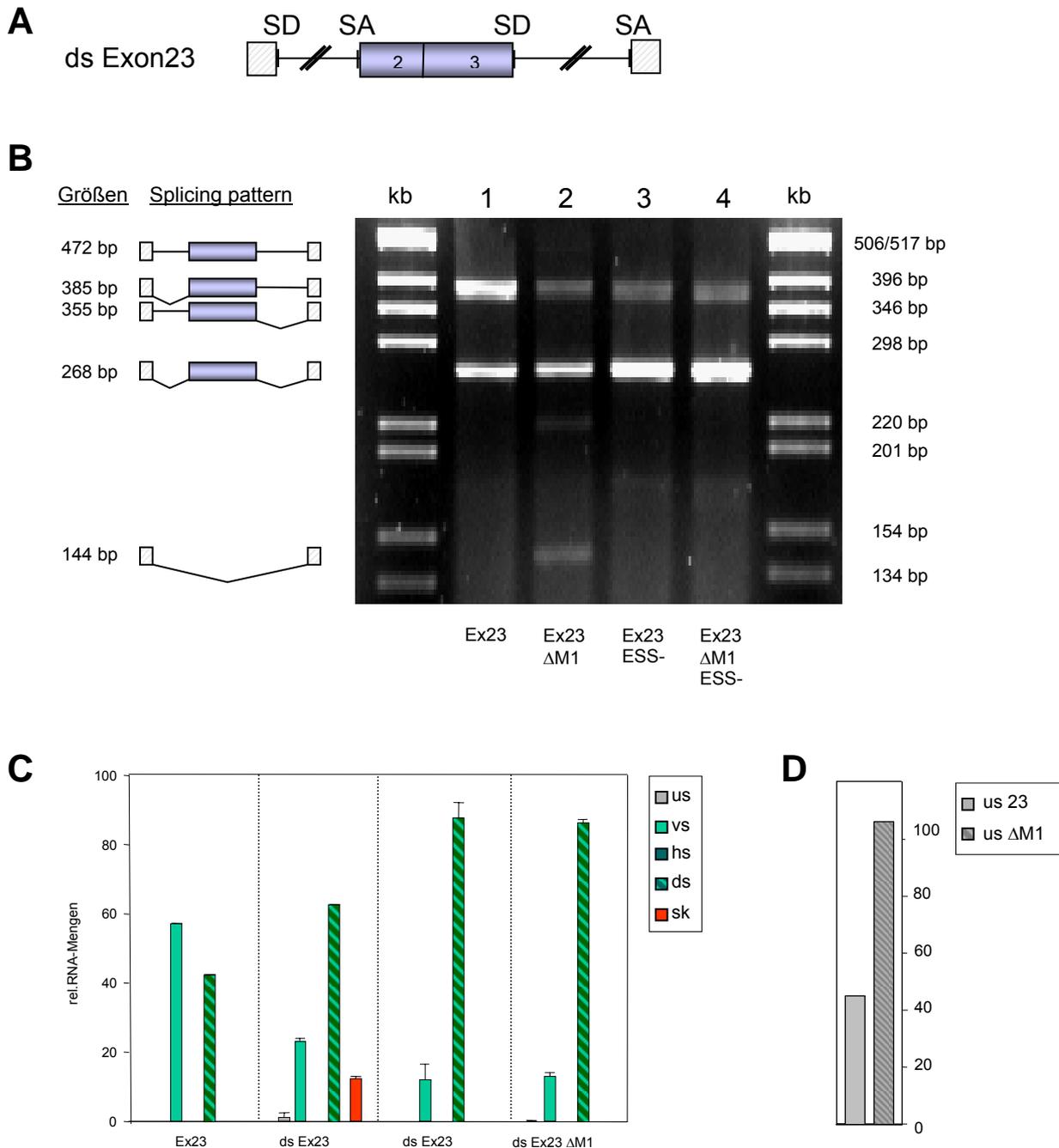


Abb. 30: Expressionsanalyse des Drei-Exon-Zwei-Intron Konstruktes mit beiden Leaderexons als cDNA verknüpft. **A:** Schematische Darstellung des Zwei-Intron-Minigenkonstruktes mit den Exons 2 und 3 als cDNA und den flankierenden Spleißstellen (LTR ds Ex23). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 μ g der Zwei-Intron Vektoren, 1 μ g SVctat und 1 μ g pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3 % Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Spur 1: LTR Ex23, Spur 2: LTR Ex23 Δ M1, Spur 3: LTR Ex23 ESS-, Spur 4: LTR Ex23 Δ M1 ESS-. **C:** Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur vorne gespleißte (vs), nur hinten gespleißte (hs), komplett gespleißte (ds) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen. **D:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler der separat isolierten ungespleißten Kern-RNA.

Spur 1) zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit demjenigen, das nach einer entsprechenden Transfektion mit dem nur Exon 2-enthaltenden Vektor (ds Ex2) detektiert werden konnte (Abb. 12 B; Spur 1). Das Zwischenprodukt, bei dem nur das vordere Intron entfernt worden war, zeigte die stärkste Bande (57 %). Die einzige andere nachweisbare Bande wurde durch Größenbestimmung als Spleißvariante identifiziert, bei der das mittlere Exon eingeschlossen worden war (43 %). Damit lag die Nutzung des SA2 bei 100 %, also deutlich oberhalb des Wertes, der nur mit der Sequenz des Exons 2 als mittleres Exon erreicht wurde (80 %; ds Ex2).

Durch die Insertion des Exons 3 und des Spleißdonors 3 downstream des Exons 2 wurde die Nutzung des SA2 soweit erhöht, dass es zu einem konstitutiven Spleißereignis kam. Dieses konnte durch die Mutation der ASF/SF2 Bindungsstelle im Exon 2 wieder aufgehoben werden (Abb. 30 B; Spur 2; ds Ex23 Δ M1). Die Mutation des Enhancers, der die Erkennung des SA2 unterstützte, führte zu einer Abnahme des Spleißzwischenproduktes, dessen vorderes Intron bereits prozessiert worden war. Von den vorher nachgewiesenen 57 % dieser Transkript-Isoform waren nach der Mutation nur noch 23 % detektierbar. Um anderen konnte gleichzeitig mit der Reduktion der SA2-Erkennung um 15 %, eine Zunahme der gespleißten RNA ohne mittleres Exon (13 %) und der RNA mit Exon 3-Einschluss nachgewiesen werden. Da die Erhöhung des Exoneinschlusses nicht auf die Mutation des Heptamer-Enhancers zurückzuführen sein dürfte, kann auch hier eine Interaktion der Enhancer über die Exongrenze hinweg postuliert werden. Obwohl das Exon 3 einen Silencer enthält, der die Nutzung der flankierenden Spleißstellen negativ beeinflusste, insbesondere den Spleißdonor #3, wurde bei 43 % der RNAs die Exon 2/3-Sequenz eingeschlossen. Die Mutation des Silencers (ds Ex23 ESS-) führte zu einer mengenmäßigen Verdopplung des Exoneinschlusses (88 %) und einem gleichzeitigen Rückgang des Zwischenproduktes mit gespleißtem ersten Intron um 44 % (Abb. 30 B; Spur 3). Die zusätzliche Mutation des Enhancers im Exon 2 hatte keinen weiteren Einfluss auf dieses Spleißmuster (Abb. 30 B; Spur 4; ds Ex23 Δ M1 ESS-).

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass der Enhancer im Exon 2 die Nutzung des stromaufwärts liegenden Spleißakzeptors weiterhin positiv regulierte, während gleichzeitig das hnRNP-Bindungsmotiv im Exon 3 den Exoneinschluss verminderte.

Ein Zusammenspiel der positiv regulierenden Elemente kann aufgrund zweier Ergebnisse gezeigt werden: Zum Einen führt das Zusammenfügen der beiden Exonsequenzen dazu, dass das Exon2/3 konstitutiv gespleißt wird. Dies war mit der Exon

2-Sequenz alleine nicht möglich. Zum Anderen führt die Mutation des ersten Heptamer-Enhancers nicht zum Verlust der SA2-Nutzung.

3.4.2 Die Kombination aus Silencern und Enhancern im Exon 3 beeinflusst die Erkennung des Spleißakzeptors 2

Wie in 3.4.1 gezeigt wurde, beeinflussten die regulatorischen Elemente im Exon 3 beim Spleißen des kombinierten mittleren Exons 2/3 nicht nur den folgenden Spleißdonor, sondern auch den upstream-liegenden Spleißakzeptor. Um genauer zu untersuchen, welche Wirkung das Exon 3, bzw. dessen Enhancer und Silencer auf die Nutzung des SA2 hatten, wurde im Folgenden der downstream-liegende Spleißdonor deletiert (Abb. 31 A; SA2 Ex23).

Das Spleißmuster war in Bezug auf die Nutzung des SA2, dem Spleißmuster der RNA mit beiden Spleißstellen sehr ähnlich. Die Nutzung des Spleißakzeptors lag auch hier bei über 95 % (Abb. 31 B; Spur1) und korrelierend mit den früheren Ergebnissen, führte die Mutation des ASF/SF2-Enhancers im Exon 2 zu einem starken Rückgang der SA2-Nutzung (Spur 2; SA2 Ex23 Δ M1). Erstaunlicherweise hatte die Mutation des Silencers im Exon 3 keinen Einfluss auf das Spleißmuster (Spur 3; SA2 Ex23 ESS-). Die Spleißvariante ohne Leaderexon war nur mit etwa 5 % nachzuweisen, die Variante mit prozessiertem ersten Intron lag bei 95 %. Der geringe positiv-regulierende Einfluss des Exons 3 konnte nur bei Mutation sowohl des Enhancers in der Exon 2-Sequenz, als auch des Silencers in der Exon 3-Sequenz nachgewiesen werden. Die Spleißvariante mit prozessiertem ersten Intron konnte mit 42 % nachgewiesen werden und liegt damit 16 % oberhalb des Wertes ohne mutiertem Exon 2 Silencer-Element.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass die Elemente des Exons 3 nahezu keinen Einfluss auf den Spleißakzeptor 2 ausübten, obwohl sie den Spleißakzeptor 3 regulieren konnten. Damit scheint sowohl der Silencer, als auch die Enhancer dieser Exonsequenz räumlich in ihrer Wirkung stark eingeschränkt zu sein.

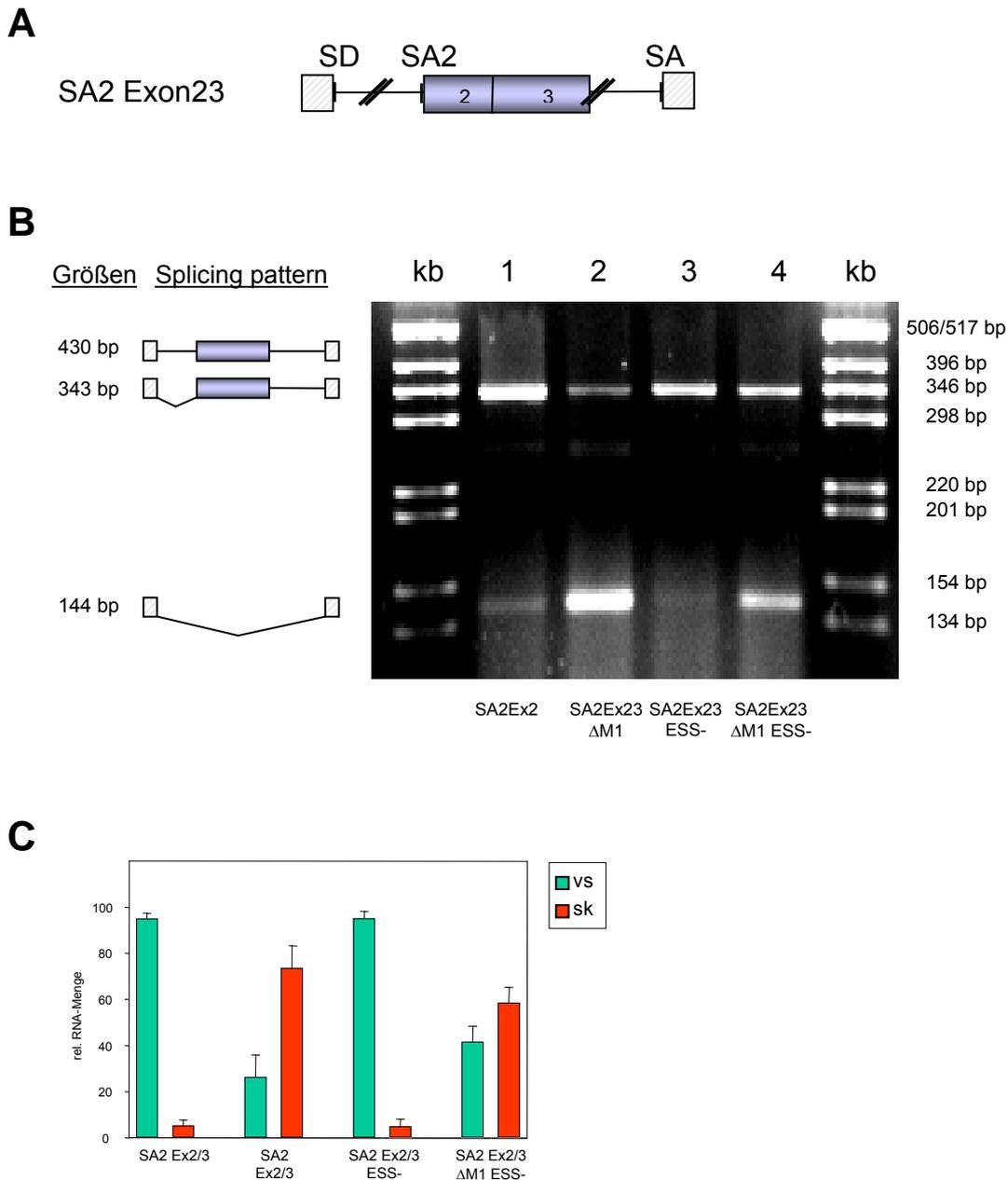


Abb. 31: Einfluss der *cis*-regulatorischen Elemente des Exons 2 und 3 auf den Spleißakzeptor 2. **A:** Schematische Darstellung des Drei-Exon-Zwei-Intron-Minigenkonstrukts mit den Exons 2 und 3 als cDNA (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißakzeptoren), wobei der Spleißdonor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR SA2 ex23). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der Zwei-Intron Vektoren, 1 µg SVctat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Links des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Das untere kleinere Gel zeigt die Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR SA2 Ex23; Spur 2: LTR SA2 Ex23 ΔM1; Spur 3: LTR SA2 Ex23 ESS-; Spur 4: LTR SA2 Ex23 ΔM1 ESS-. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in nur vorne gespleißte (vs) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen. Das untere kleinere Gel zeigt die

3.4.3 Der Enhancer im Exon 2 trägt zur Spleißdonorererkennung bei

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Spleißregulatorischen Elemente im Exon 3 innerhalb eines putativen Transkriptintermediates (wenn das Intron zwischen Exon 2 und 3 vor den flankierenden Introns entfernt wurde; ds Ex23) die Nutzung des upstream liegenden SA2 nicht beeinflussten.

Um zu untersuchen, ob dies auch für den Enhancer im Exon 2 galt, also, ob der Enhancer keinen Einfluss auf die Nutzung des Spleißdonors 3 ausübt, wurde der Spleißakzeptor upstream des Exons 2 deletiert (Abb. 32 A; Ex23 SD3).

Wie zuvor in den Abschnitten 3.2.3 und 3.3.4 gezeigt wurde, konnte in den Zwei-Intron-Konstrukten mit der Exon 2 (Ex2 SD2) bzw. 3-Sequenz (Ex3 SD3) das 3'-Intron ohne den upstream liegenden Spleißakzeptor nicht herausgespleißt werden. Dies war aber überraschenderweise in dem Vergleichskonstrukt mit der zusammengeführten Exon 2 und Exon 3-Sequenz (Ex2/3 SD3) wieder möglich, nachdem der Silencer im Exon 3 Bereich mutiert worden war (16 %; Abb. 32; Spur 3; Ex23 SD3 ESS-). Um den Einfluss der Exons 2-Sequenz auf diesen Effekt nachzuweisen, wurde zusätzlich der ASF/SF2-Enhancer mutiert (Ex23 Δ M1 ESS-). Dieses führte wieder zum Verlust der Prozessierbarkeit des downstream-liegenden Introns.

Damit konnte gezeigt werden, dass unter diesen experimentellen Bedingungen der Enhancer im Exon 2 die Nutzung des Spleißdonors 3 beeinflusste. Allgemein zeigt dies, dass in Prozessierungsintermediaten frühe Spleißereignisse nachfolgende beeinflussen können.

Da bei drei der vier untersuchten Vektoren keine Exonererkennung stattgefunden hatte und damit auch keine Aussage über die Beeinflussung der Spleißstellen durch die anderen Enhancer oder Silencer getroffen werden konnte, wurde der Untersuchungskontext, wie bereits oben beschrieben (3.2.3 und 3.3.4), verändert. Die Verwendung des Leader-abhängigen *env*-Expressionvektors (3.2.3; Abb. 27 A) ermöglichte den Nachweis von Glykoprotein in Abhängigkeit von *cis*-regulatorischen Elementen upstream des Spleißdonors, also innerhalb der inserierten Exon 2/3-Sequenz

Kontrolle der Transfektionseffizienz (hGH). Spur 1: LTR ds Ex23; Spur 2: LTR ds Ex23 Δ M1; Spur 3: LTR ds Ex23 ESS-; Spur 4: LTR ds Ex23 Δ M1 ESS-. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur vorne gespleißte (vs), nur hinten gespleißte (hs), sowohl vorne wie auch hinten gespleißte (ds) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen. Der RNA-Nachweis wurde für jeden Vektor auf 100 normiert. **D:** Vergleich der Mengen ungespleißter RNA im Kern der Vektoren LTR ds Ex23 und LTR ds Ex23 Δ M1.

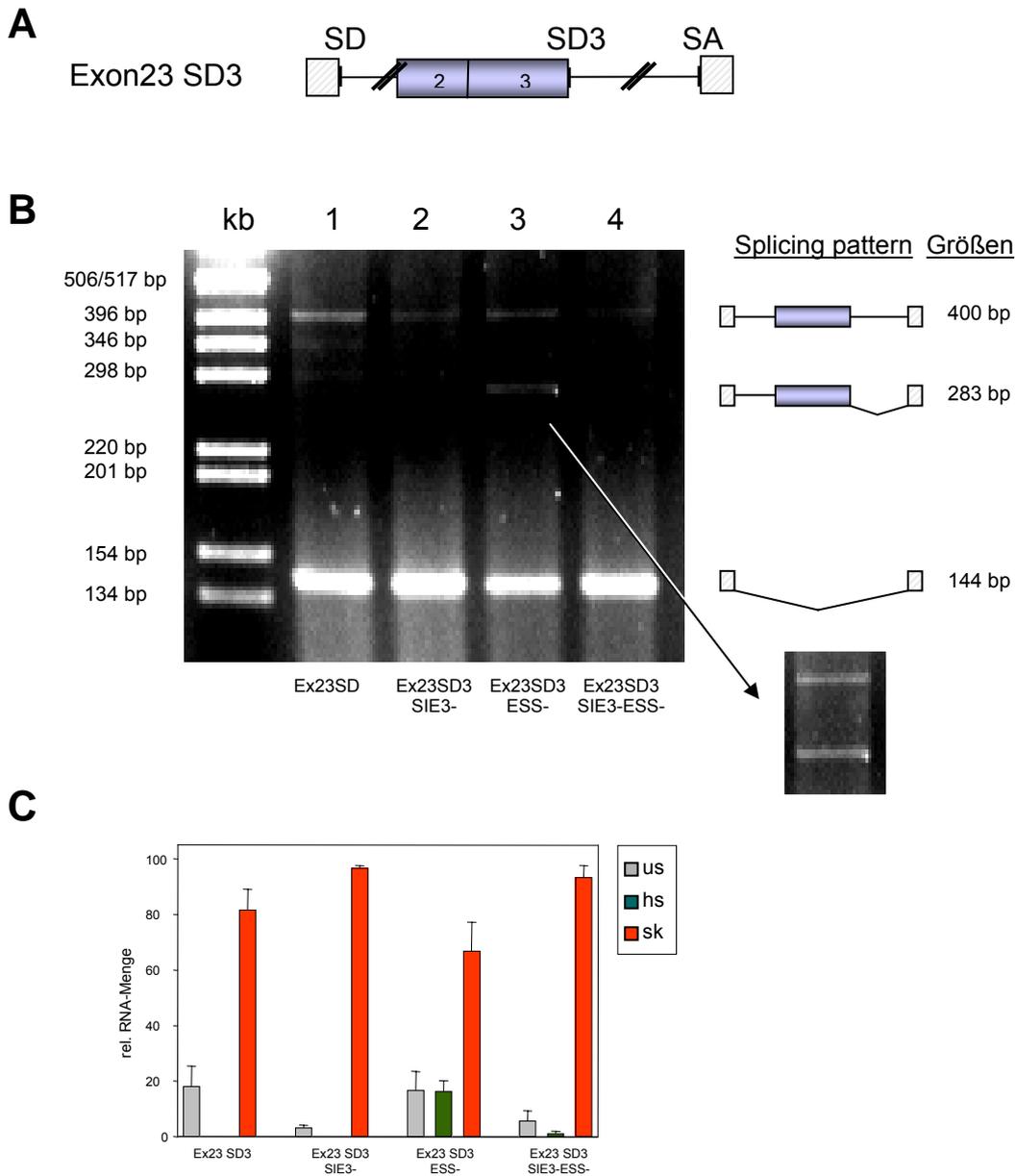


Abb. 32: Einfluss der *cis*-regulatorischen Elemente des Exons 2 und 3 auf den Spleißdonor 3.
A: Schematische Darstellung des Drei-Exon-Zwei-Intron-Minigenkonstrukts mit den Exons 2 und 3 als cDNA (formal: Ein-Intron-Minigenkonstrukt mit zwei alternativen Spleißdonoren), wobei der Spleißakzeptor als flankierende Spleißstelle deletiert wurde (LTR Ex23 SD3). **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4 Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je $2 \mu\text{g}$ der Zwei-Intron Vektoren, $1 \mu\text{g}$ SVctat und $1 \mu\text{g}$ pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3 % Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Rechts des Gels ist die Zuordnung der gespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. Spur 1: LTR Ex23 SD3; Spur 2: LTR Ex23 Δ M1; Spur 3: LTR Ex23 SD3 ESS-; Spur 4: LTR Ex23 SD3 Δ M1 ESS-. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Es wurde eine Einteilung in ungespleißte (us), nur hinten gespleißte (hs) und RNA ohne Einschluss eines Leaderexons (sk) vorgenommen.

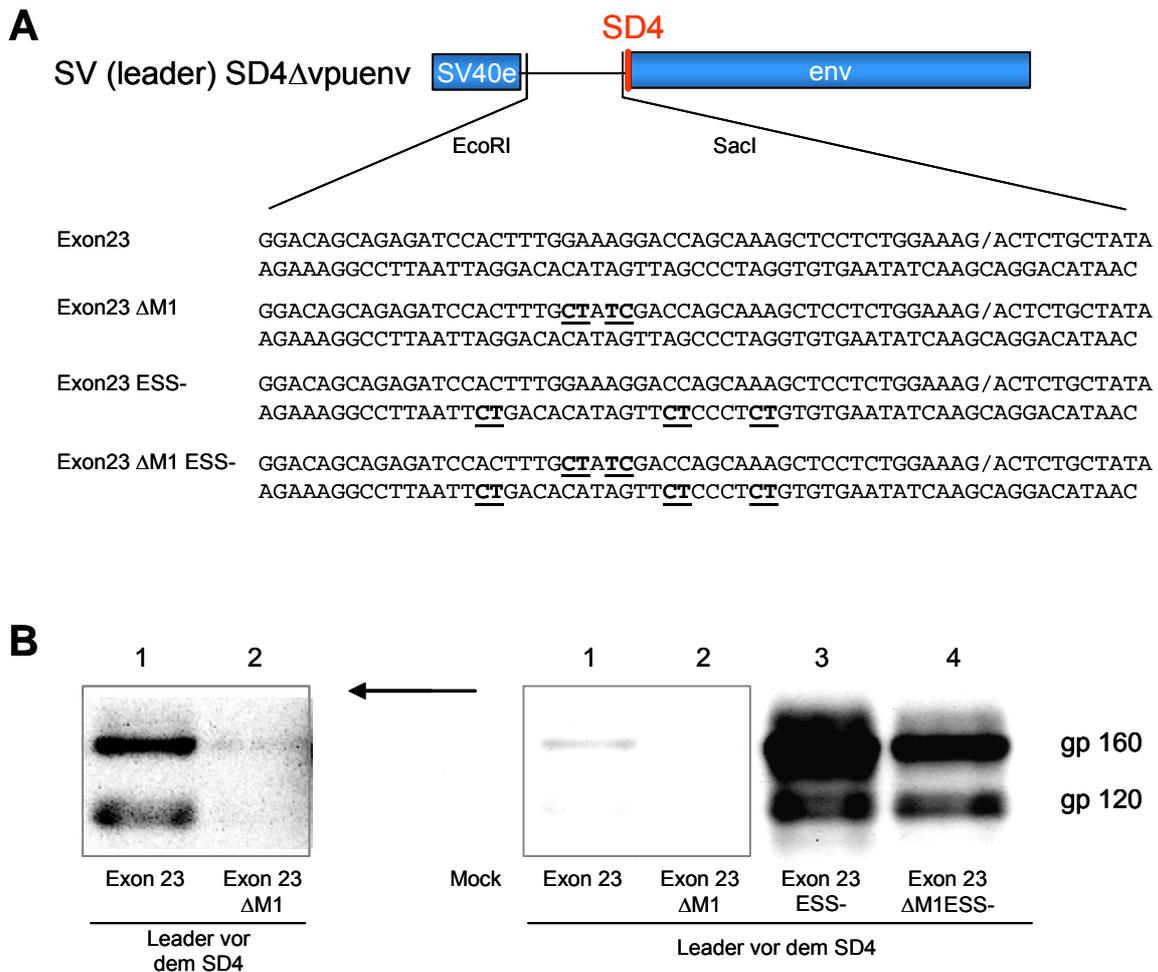


Abb. 33: Einfluss der *cis*-regulatorischen Elemente des Exons 2 und 3 auf die Bindung des U1 snRNPs an den Spleißdonor. **A:** Schematische Darstellung des *env*-Expressionsvektors zur Untersuchung des Einflusses von Leadersequenzen auf die Nutzung des Spleißdonors durch das U1 snRNP. Unterhalb befinden sich die beiden inserierten Leadersequenzen mit zugehörigen Mutationen der SF2-Bindestelle und des ESS-Elementes. **B:** *env*-Glykoprotein-Nachweis im Western Blot. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der *env*-exprimierenden Vektoren, 1 µg SVcrev und 1 µg pGL3 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine präpariert und nach Normierung auf die Gesamtproteinmenge und Transfektionseffizienz auf einem 7 % SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte über einen Erstantikörper gegen gp120 (Boehringer), einem POD-gekoppelten Zweitantikörper und Chemilumineszenznachweis im F1-Lumi-Imager (Roche).; Linker Blot: Spur 1: sd23SD4; Spur 2: sd23SD4 ΔM1; Rechter Blot: Spur 1: sd23SD4; Spur 2: sd23SD4 ΔM1; Spur3: sd23SD4 ESS-; Spur 4: sd23SD4 ΔM1 ESS-.

(SV Ex23 SD4 Δvpuenv). Während die intakte Leadersequenz nur einen geringen *env*-Nachweis erlaubte, stieg dieser durch die Mutation des ESS-Elementes deutlich an (Abb. 33 B rechts; Spur 1 und 3). Damit war dieses Ergebnis trotz der Exon 2-Sequenz, vergleichbar mit dem des alleinigen Exon 3-Leaders (SV Ex3 SD4 Δvpuenv).

Um die auf der RNA-Ebene beobachtete Beeinflussung des Spleißdonors 3 durch den Exon 2-Enhancer überprüfen zu können, wurde das ESE im Exon 2 sowohl einzeln, als auch in Kombination mit dem ESS mutiert. In beiden Fällen konnte ein deutlicher Rückgang der *env*-Expression nachgewiesen werden (vgl. Spur 1 und 2 sowie 3 und 4).

Damit war der Enhancer im Exon 2, unabhängig von den *cis*-regulatorischen Elementen im Exon 3, in der Lage, die Nutzung des Spleißdonors 3 zu unterstützen, obwohl sich die Entfernung zum Spleißdonor mehr als verdoppelt hatte.

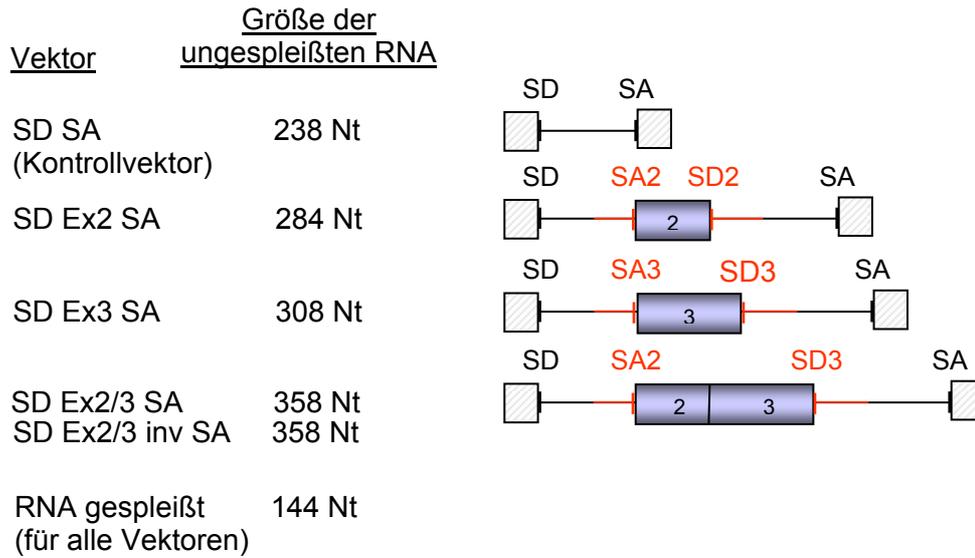
3.4.4 Die Intronisierung der Exon 2/3-Sequenz führt zu einer Spleißinhibition

Die Analyse der Exons 3-Sequenz hatte gezeigt, dass das hnRNP-Bindungsmotiv kontextabhängig zu einer RNA-Destabilisierung vor dem Spleißen führen konnte. Um zu prüfen, ob dieser Degradationseffekt auch bei dem gemeinsamen Vorkommen der Leaderexons 2 und 3 als cDNA auftrat, wurde eine Transkriptionseinheit ohne die flankierenden Spleißstellen des mittleren Exons kloniert (Abb. 34 A; SD Ex23 SA). Auf diese Weise konnten Mengenänderungen, die durch die Exonsequenzen vor dem Spleißen verursacht wurden, nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden die bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutierten Vektoren mit den einzelnen Leaderexonsequenzen (SD Ex2 SA und SD Ex3 SA), sowie ein Kontrollvektor ohne Leaderexons (SD SA) verwendet.

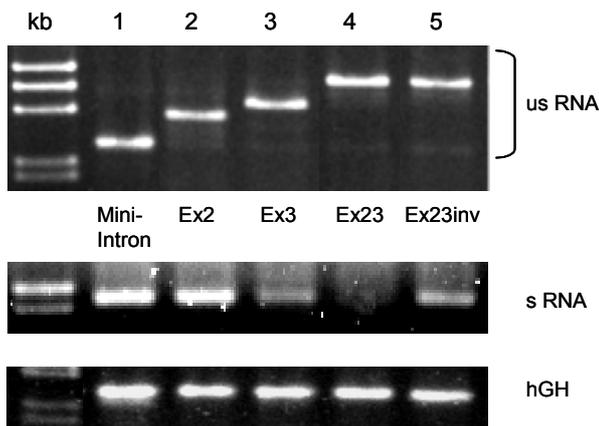
Analysiert wurden die Mengen an ungespleißter RNA im Kern (Abb. 34 B oben) und an prozessierter RNA im Cytoplasma (Abb. 34 B unten). Die RNA-Mengen des Kon-

Abb. 34: Einfluss der Leaderexons auf die gespleißte und ungespleißte RNA. **A:** Schematische Darstellung der Ein-Intron-Minigenkonstrukte mit den Exonsequenzen 2,3 und 23 im Intron ohne die flankierenden Spleißstellen (rot). Links der Vektoren ist die Zuordnung der gespleißten und ungespleißten Produkte und deren theoretische Größe angegeben. **B:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENE™ 6 transient mit je 2 µg der Ein-Intron Vektoren, 1 µg SVctat und 1 µg pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3% Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Das obere Gel zeigt die ungespleißte RNA im Kern, das untere Gel den Nachweis gespleißter RNA im Cytoplasma. Spur 1: LTR SD SA; Spur 2: LTR SD Ex2 SA; Spur 3: LTR SD Ex3 SA; Spur 4: LTR SD Ex23 SA; Spur 5: LTR SD Ex23inv SA. **C:** Statistische Auswertung von mindestens drei Transfektionen mit Standardfehler. Das Balkendiagramm zeigt ein Vergleich der Expression von ungespleißter RNA im Kern (schwarz) und gespleißter RNA im Cytoplasma (grau). Das Auftragsschema entspricht B. **D:** Real-Time PCR zur Bestimmung der Expression gespleißter RNA des Vektors SD Ex23 SA. Links ist ein Bild der TaqMan-PCR abgebildet, rechts daneben die Auswertungstabelle. Unterhalb ist der Durchschnittswert zu sehen.

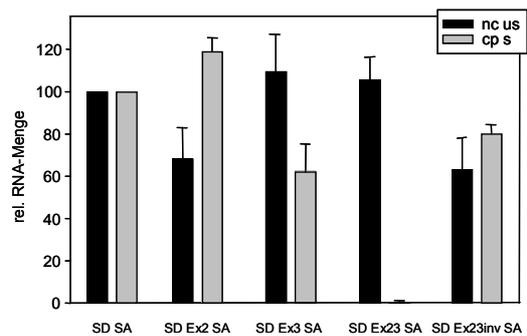
A



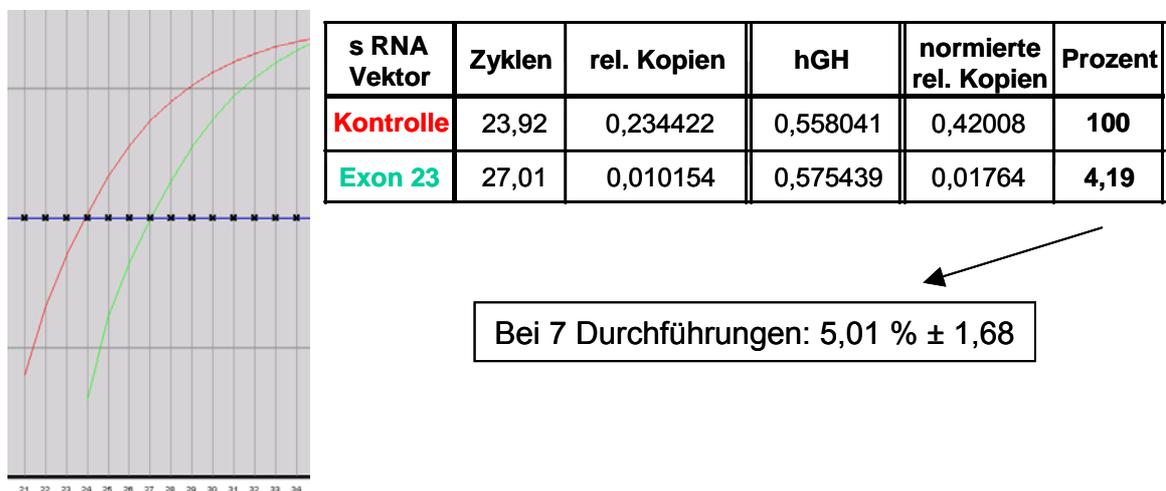
B



C



D



trollvektors (SD SA) wurden in beiden Fällen als 100 % festgelegt (Abb. 34 C). Für die Exon 2-Sequenz konnte bei mehreren experimentellen Durchführungen eine Erhöhung der Menge an prozessierter RNA nachgewiesen werden (+19 %, Abb. 34 C), was im Vergleich zum Kontrollvektor auf einen RNA stabilisierenden Einfluss deutete. Da dieser Effekt durch die Mutation des Enhancers nicht beeinflusst wurde (Abschnitt 3.3.2), sind hierfür wahrscheinlich andere Sequenzen und Proteine, als der identifizierte ASF/SF2-Enhancer verantwortlich. Die für die Exon 3-Sequenz bereits gezeigte RNA Destabilisierung (3.3.2) konnte in diesem Versuchsaufbau ebenfalls, wenn auch nur für die gespleißte RNA, nachgewiesen werden (Abb. 34 B; Spur 1 und 3, s RNA). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Untersuchungen, konnte im Cytoplasma, unabhängig vom Spleißen des Exons 3, weniger RNA nachgewiesen werden (61 %). Erstaunlicherweise war jedoch die nachweisbare Menge an prä-mRNA im Kern nicht reduziert. Damit ist die durch den Silencer ausgelöste Degradation spleißunabhängig, tritt jedoch zeitlich erst nach der Transkription auf.

Erstaunlicherweise konnte nach der Intronisierung der zusammengeführten Leadere-Exons, weder im Kern noch im Cytoplasma gespleißte RNA detektiert werden (Abb. 34 B; Spur 4 und Abb. 35 B; SD Ex23 SA; 189), obwohl eine dem Kontrollvektor vergleichbare Menge pre-mRNA nachzuweisen war. Da der fehlende Nachweis gespleißter RNA im Kern einen Exportdefekt ausschloss und der Rückgang der RNA-Menge des Vektors mit beiden Exons stärker war, als aufgrund der Destabilisierung durch die Exon 3-Sequenz zu erwarten gewesen wäre (~40 %), wurde die Möglichkeit einer sequenzbedingten Spleißinhibition untersucht.

Um im Umkehrschluss die Notwendigkeit des Spleißens für diese Degradation zu zeigen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Krummheuer ein Konstrukt hergestellt, welches die Exons 1 bis 4 als cDNA enthielt (LTR 1.2.3.4). Eine Degradation, die auf eine Spleißinhibition zurückzuführen ist, sollte in diesem Kontext nicht mehr nachzuweisen sein. Die Analyse der nukleären RNA-Menge mit den zusammengeführten Exonsequenzen zeigte einen Rückgang um lediglich 29 %, der damit geringer war, als die nachweisbare RNA Degradation der nur Exon 3-haltigen RNA (46 %; LTR 1.3.4). Damit konnte in diesem nicht-spleißbaren Kontext lediglich der abgeschwächte destabilisierende Einfluss des Exons 3 nachgewiesen werden, jedoch kein Effekt, der den vollständigen Verlust von prozessierter RNA zur Folge hätte.

Schlussfolgernd ergibt sich daraus für den Vektor mit intronisierter Exon 2/3 Sequenz, dass ein spleißbarer Kontext eine Voraussetzung für die beobachtete RNA

Degradation ist. Ob eines oder mehrere der bereits identifizierten *cis*-regulatorischen Elemente beteiligt sind, wurde im folgenden Kapitel untersucht.

Um den Grad der Spleißinhibition näher eingrenzen zu können, wurde die cytoplasmatische RNA mit der intronisierten Exon 2/3-Sequenz in einer Real-Time PCR, die sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet, untersucht (Abb. 34 D). Hierbei wird von der Analyse-Software der PCR-Zyklus ermittelt, bei dem die gebildete PCR-Produkt-Menge den selbstbestimmten Schwellenwert überschreitet. Der Schwellenwert wiederum kann so gewählt werden, dass ihn die Amplifikate aller Proben im linearen Amplifikationsbereich überschreiten. Aufgrund der exponentiellen Zunahme der Amplifikate im linearen Bereich, kann aus der Differenz der Zyklenzahlen (Abb. 34, Spur 2) eine relative Kopienzahl (Abb. 34, Spur 3) ermittelt werden. Die quantitative Analyse der gespleißten RNA des Kontrollvektors (SD SA, rot) und des Vektors mit der intronisierten Exon 2/3-Sequenz (SD Ex23 SA, grün), zeigte eine nahezu vollständige Spleißinhibition. Die Festlegung der RNA-Menge des Kontrollvektors auf 100 % (Abb. 34 D, Spalte 6) führte für den das Exon 2/3-enthaltenden Vektor zu einem relativen Nachweis von 5 % Transkriptformen ohne das Intron. Da die Untersuchung der ungespleißten Kern-RNA dieses Vektors eine dem Kontrollvektor vergleichbare Menge aufzeigte, wurden mehr als 95 % der Transkripte des Vektors mit intronisierter Exon 2/3-Sequenz degradiert.

3.4.5 Die räumliche Nähe eines ESE und eines ESS kann kontextabhängig zu einer Spleißinhibition führen

Um zu analysieren, ob die bereits identifizierten *cis*-regulatorischen Elemente in den Exonsequenzen 2 und 3 bei Abwesenheit ihrer flankierenden Spleißstellen für das Auftreten der beschriebenen Spleißinhibition verantwortlich waren, wurden die bereits oben verwendeten Mutationen des ASF/SF2-Enhancers und des hnRNP A1-Silencers sowohl einzeln, als auch in Kombination, untersucht. Die RNA wurde nach transienter Transfektion in Kern- und Cytoplasma-Fraktion separiert und aufgereinigt. Abb. 35 C zeigt in den Spuren 1 bis 4 (links) die RNA-Analyse des Cytoplasmas und in den Spuren 5 bis 8 (rechts) die des Kerns, wobei aus der Bande mit einer Größe von 180 Nt. (hGH) auf die Transfektionseffizienz geschlossen werden konnte.

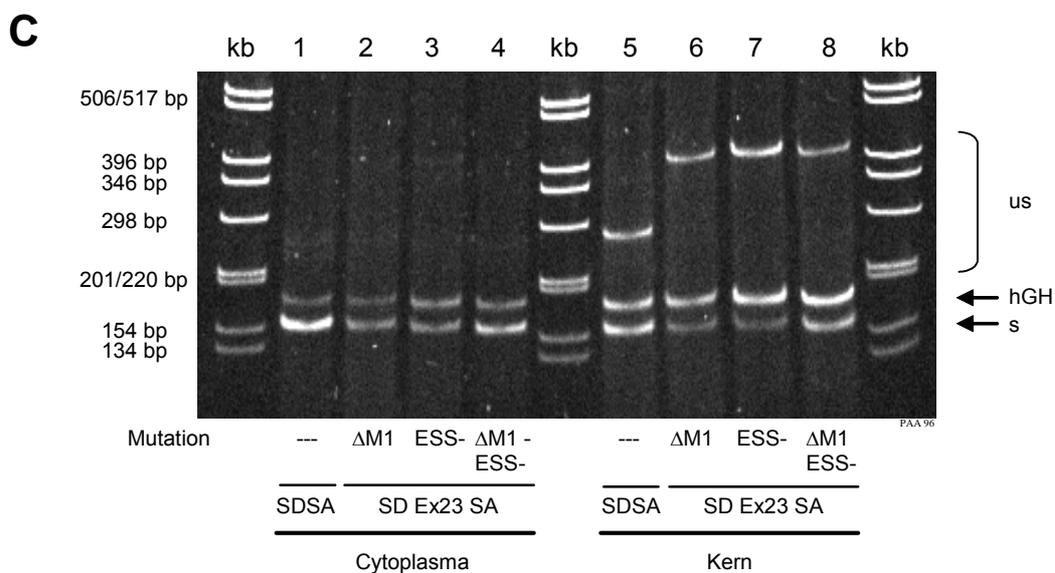
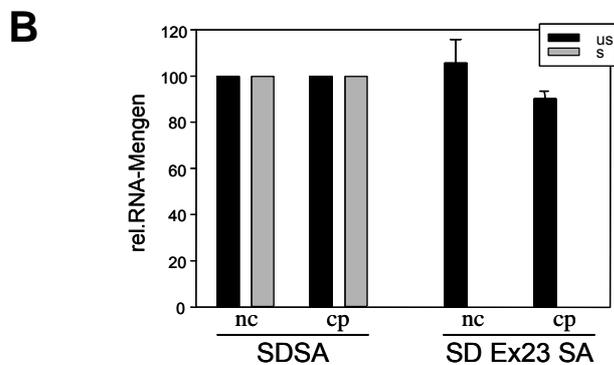
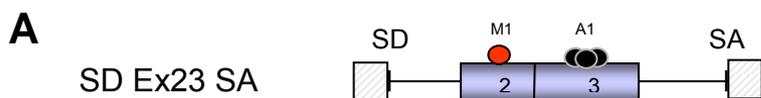
Im Gegensatz zur RNA mit der intronisierten Exon 2/3-Sequenz konnte für die Kontroll-RNA, die im Intron keine Leadersequenz enthielt, eine deutliche Bande

gespleißter RNA im Cytoplasma (Spur 1; SD SA) nachgewiesen werden. Die Mutationen entweder des Enhancers in der Exon 2 Sequenz (SD Ex23 Δ M1) oder die des Silencers in der Exon 3 Sequenz (SD Ex23 ESS-) führte ebenfalls wieder zur Nachweisbarkeit geringer Mengen gespleißter RNA (Abb. 35 C; Spuren 2 und 3). Durch die gleichzeitige Mutation beider Elemente konnte ein weiterer Anstieg der gespleißten RNA-Menge bewirkt werden (Spur 4; SD Ex23 Δ M1 ESS-), der jedoch nicht den Ausgangswert des Kontrollvektors erreichte.

Im Kern konnte für die gespleißte RNA ein quantitativ vergleichbares Bild nachgewiesen werden, allerdings zeigte die nun detektierbare prä-mRNA deutliche Mengenunterschiede. Während die Mutation des Exon 2-Enhancers alleine (SD Ex23 Δ M1) und die Mutation beider Elemente (SD Ex23 Δ M1 ESS-) im Vergleich zum Kontrollvektor zu einem Rückgang der prä-mRNA führte (Vgl. Spur 5 mit 6 und 8), stieg diese durch die Mutation des Silencers im Exon 3 (SD Ex23 ESS-) an. Diese Steigerung ist wahrscheinlich auf die bereits beschriebene Stabilisierung der RNA durch die Mutationen der hnRNP A1-Bindungsstellen zurückzuführen.

Um ein Maß für die Spleißeffizienz der einzelnen RNAs zu erhalten, wurde der Quotient aus der detektierten Menge gespleißter RNA (entweder im Kern oder im Cytoplasma) und der ungespleißten RNA gebildet. Je größer der ermittelte Wert war, desto höher war die Effizienz des Spleißereignisses. Obwohl bereits in Abschnitt 3.4.4 ein Transportdefekt ausgeschlossen worden war, wurde die Effizienz des Spleißens auch durch Quotientenbildung über die Kompartimentgrenze hinweg

Abb. 35: Aufhebung der Leaderexon-vermittelten Spleißinhibition. **A:** Schematische Darstellung des Ein-Intron-Minigenkonstrukts mit den Exonsequenzen 2 und 3 als cDNA im Intron ohne die flankierenden Spleißstellen. **B:** Balkendiagramm der Expression ungespleißter und gespleißter RNA im Kern und Cytoplasma. Links ist die Expression des Kontrollvektors SD SA abgebildet, rechts daneben die des Vektors SD Ex23 SA; 189). **C:** RNA-Nachweis mittels RT-PCR. $2,5 \times 10^5$ HeLa-T4⁺ Zellen wurden mit FuGENETM 6 transient mit je 2 μ g der Ein-Intron Vektoren, 1 μ g SVctat und 1 μ g pXGH5 (Bestimmung der Transfektionseffizienz) cotransfiziert. Nach 30 Stunden wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die Hälfte der isolierten RNA wurde mit DNase I inkubiert und anschließend mittels dT16 Primer und M-MLV revers transkribiert. Der Nachweis erfolgte durch Auftrennung der im linearen Bereich amplifizierten Produkte auf einem 3 % Metaphor-Agarosegel. Die Auswertung erfolgte mit einem F1 Lumi-Imager der Firma Roche. Der linke Teil des Gels zeigt die gespleißte RNA im Cytoplasma, die rechte Hälfte den Nachweis ungespleißter und gespleißter RNA im Kern. Spur 1/5: LTR SD SA; Spur 2/6: LTR SD Ex23 SA Δ M1; Spur 3/7: LTR SD Ex23 SA ESS-; Spur 4/8: LTR SD Ex23 SA Δ M1 ESS-. **D:** Tabellarische Darstellung der Spleißeffizienz der in **C** beschriebenen Vektoren. Es wurde zum Einen die Spleißeffizienz innerhalb des Kerns bestimmt, zum Anderen wurde der Quotient zwischen ungespleißter Kern-RNA und gespleißter Cytoplasma-RNA ermittelt, der neben der Spleißeffizienz auch den Einfluss von Transportdefekten berücksichtigt.



D

Intron	s/us nur Kern	s/us cp/nc
Minimal	1,24	4,5
Ex23	0	0
Ex23 Δ M1	0,63	2,5
Ex23 ESS-	0,33	1,1
Ex23 Δ M1 ESS-	1,4	4,7

bestimmt. Durch den Vergleich des ermittelten Wertes mit dem Wert, der alleine durch den Quotienten der Kern-RNA gebildet wurde, kann ein Einfluss der Sequenzen auf den Transport erneut nachgeprüft werden.

Für den Kontrollvektor konnte eine Spleißeffizienz von 1,24 ermittelt werden, die die Effizienz des Ausgangsvektors ohne Beeinflussung durch die Leadersequenzen darstellte. Da die Insertion der Exon 2/3 Sequenz ohne flankierende Spleißstellen zum Verlust der gespleißten RNA führte, lag der Wert bei 0. Die einzelnen Mutationen des ASF/SF2-Enhancers oder des hnRNP A1-Silencers, führten zu Spleißeffizienzen von 0,63 bzw. 0,33. Damit waren diese Effizienzen deutlich geringer, als die des Kontrollvektors, die Spleißinhibition konnte jedoch in beiden Fällen teilweise aufgehoben werden. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass beide *cis*-wirkende Elemente an der der Spleißinhibition beteiligt waren.

Da die gleichzeitige Mutation beider regulatorischer Elemente das Verhältnis der ungespleißten RNA-Menge zugunsten der gespleißten RNA Menge verschob, stieg die Spleißeffizienz auf 1,4. Dieser Wert lag geringfügig oberhalb der Effizienz des Kontrollvektors, wodurch gezeigt werden konnte, dass die hier beobachtete Spleißinhibition auf einer direkten Wechselwirkung des ASF/SF2-Enhancers und des hnRNP A1-Silencers basierte. Ein Vergleich der ermittelten Quotienten innerhalb des Kerns mit denen zwischen Kern und Cytoplasma zeigte keinen Unterschied der Spleißeffizienz, wodurch der bereits negierte Transportdefekt bestätigt werden konnte.

3.5 Beeinflussung der Reihenfolge alternativer Spleißereignisse durch die identifizierten Silencer- und Enhancer-Elemente in den Leader-exons 2 und 3

Obwohl das Verständnis des chemischen Ablaufs des Spleißens weit fortgeschritten ist, gibt es noch offene Fragen bezüglich der korrekten Paarung von Spleißstellen und wie in Transkripten mit mehreren Introns gewährleistet wird, dass kein Exon ausgeschlossen wird. In der Literatur werden mehrere Modelle zur Spleißstellen-Selektion diskutiert: Neben dem einfachen „Scanning-Modell“, bei dem Spleißstellen in linearer Abfolge von 5' nach 3' erkannt werden (344), gibt es auch das „First-come-first-serve-Modell“, bei dem der Spleißosomen-Aufbau zwar kotranskriptionell beginnt, das Spleißen selbst aber erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt (2) oder

das „Exon-Definitions-Modell“, das vorschlägt, dass die Exons durch die Bindung von Faktoren am 5'- und 3'-Ende des Exons definiert werden (28,347,394,454). Den Gegensatz zum „Exon-Definitions-Modell“ bildet das „Intron-Definitions-Modell“, bei dem in einem ersten Schritt das 5' und 3'-Ende des Introns definiert wird (347,394). Ein anderer Mechanismus der die Spleißstellen-Selektion beeinflussen könnte, ist die Reihenfolge des Spleißens. Die Entfernung eines Introns könnte das Spleißen eines folgenden beeinflussen, sei es z. B. durch gebundene Proteine oder Änderungen in der Sekundärstruktur. Ein bevorzugtes Spleißereignis, eventuell herbeigeführt durch *cis*-wirkende Sequenzen, könnte damit den Einschluss eines Exons garantieren. Innerhalb dieses Kapitels sollte die Reihenfolge untersucht werden, in der die Introns aus der HIV-1 NL4.3 *tat* prä-mRNA und aus der vom Vier-Exon-Drei-Intron-Minigenkonstrukt synthetisierten RNA herausgeschnitten werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Einfluss die identifizierten *cis*-regulatorischen Elemente hierauf haben.

3.5.1 Reihenfolge der alternativen Spleißereignisse im subgenomischen Minigenkonstrukt

Um die Reihenfolge der Entfernung der Introns in einer Drei-Intron-RNA zu bestimmen, wurden zuerst das Herausspleißen je zwei aufeinanderfolgender Introns untersucht. Zur Ermittlung des zuerst gespleißten Introns wurden zwei Primerpaare verwendet. Vom ersten Paar befindet sich ein Primer im ersten Exon und einer im zweiten Intron, beim zweiten Paar befindet sich ein Primer im ersten Intron und einer im dritten Exon (Abb. 36 oben).

Anhand der entstehenden PCR-Produkte kann die Reihenfolge in der diese Introns entfernt werden, abgeleitet werden (vgl. 222). Würde das vordere Intron zuerst entfernt (Abb. 36 unten A), könnte mit dem Primerpaar P1 und P2 sowohl eine ungespleißte, als auch eine im ersten Intron gespleißte RNA nachgewiesen werden. Da der Primer P3 der zweiten PCR im ersten Intron bindet, welches jedoch zuerst entfernt wurde, kann nur die ungespleißte RNA detektiert werden. Würde das hintere Intron zuerst entfernt werden (Abb. 36 unten B), könnte mit dem ersten Primerpaar nur die ungespleißte RNA detektiert werden, mit dem zweiten jedoch sowohl die prozessierte, als auch die ungespleißte RNA (17,222,367).

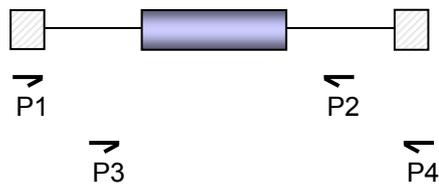


Abb. 36: Das Prinzip der Ermittlung der Spleißreihenfolge. Es wird mit zwei Primerpaaren gearbeitet, wobei jeweils eines im Exon und das andere im übernächsten Intron liegt bzw. der erste Primer liegt im ersten Intron und der zweite im übernächsten Exon. Wird das vordere Intron zuerst gespleißt, können mit dem Primerpaar P1 und P2 zwei Produkte detektiert werden, mit dem Primerpaar P3 und P4 nur eines. Umgekehrt verhält es sich, wenn das hintere Intron zuerst gespleißt wird.

A: Das vordere Intron wird zuerst gespleißt:

P1 und P2 ergeben die Produkte: 

P3 und P4 ergeben die Produkte: 

B: Das hintere Intron wird zuerst gespleißt:

P1 und P2 ergeben die Produkte: 

P3 und P4 ergeben die Produkte: 

Enthält eine prä-RNA mehr als zwei Introns, wird zunächst die Reihenfolge der ersten beiden Introns bestimmt, dann die des Introns 2 und 3 und dann die Folgenden. Abb. 37 zeigt den Versuchsaufbau für eine RNA mit drei Introns. Zuerst wurden alle auftretenden Produkte mit einem Primerpaar, bei dem jeder der beiden Primer in einem der terminalen Exons bindet, bestimmt (E1 und E2). Im folgenden wurde die Reihenfolge der Prozessierung der ersten beiden Introns festgestellt (E1/I5 und I1/E5) und durch verschieben der Primerbindestellen um ein Exon die Reihenfolge des zweiten und dritten Introns (E4/I2 und I4/E2).

Das Gel in Abbildung 38 A zeigt das Ergebnis dieser PCRs, die schematische Darstellung rechts vom Gel zeigt die nachgewiesenen Spleißprodukte. Die Überprüfung aller entstehenden Spleißprodukte durch die terminal-bindenden Primer (Abb. 37 A;

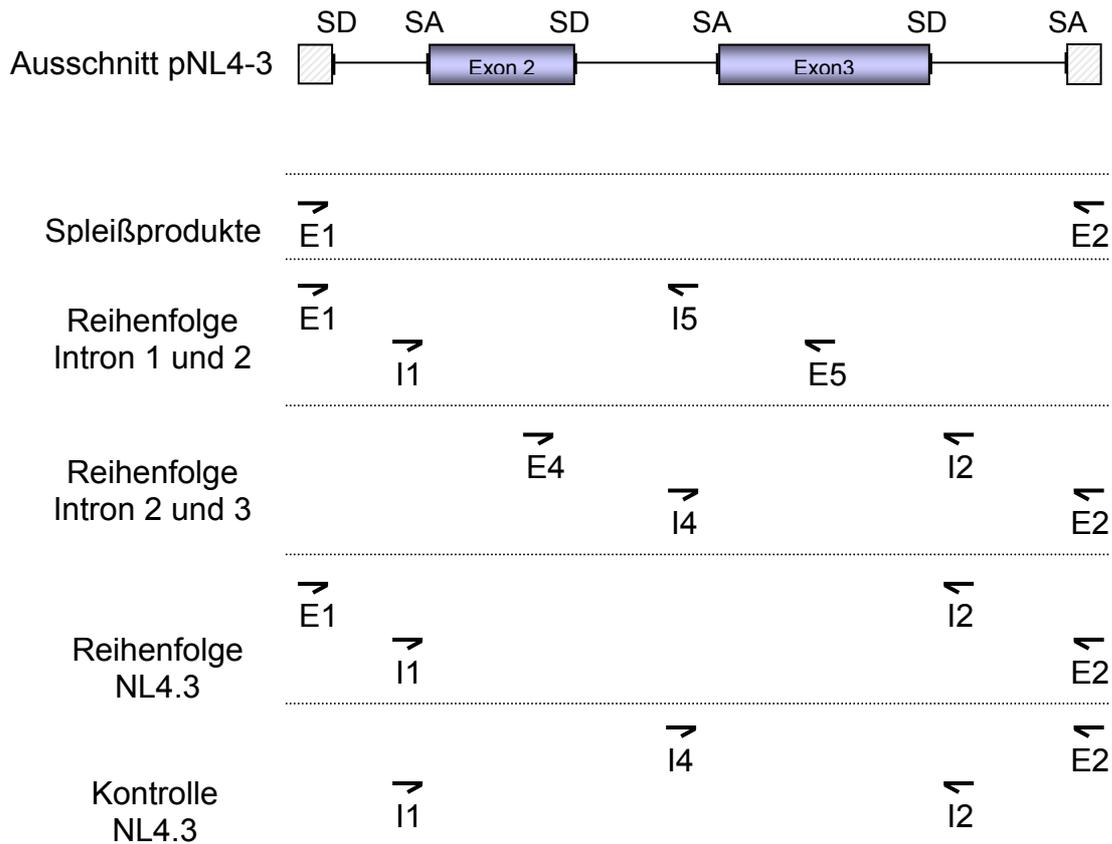


Abb. 37: Position der Primer zur Ermittlung der Spleißreihenfolge in einem Vektor mit vier Exons und drei Introns. Oben ist der schematische Aufbau des Vektors abgebildet. Darunter ein Primerpaar zur Ermittlung der entstehenden Spleißprodukte. Die folgenden vier PCRs dienen der Bestimmung der Reihenfolge der Spleißereignisse zur Entfernung der drei Introns. Im subgenomischen Fragment wurden die Primer jeweils über zwei Introns verteilt im HIV-NL4.3 über drei Introns. Das letzte Primerpaar dient der Kontrolle der Reihenfolge.

Spur 1) zeigte, wie schon früher für diesen Vektor beschrieben (Abb. 10; ds Ex2 ds Ex3), vier Spleißvarianten.

Neben der Spleißvariante ohne Exoneinschluss, konnten auch die Varianten mit Exon 2 oder 3 bzw. mit Exon 2 und 3 Einschluss nachgewiesen werden. In den Spuren 2 und 3 sind die PCRs zur Bestimmung der Reihenfolge der ersten beiden abgebildet. Mit dem ersten Primerpaar konnten zwei Produkte nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer Größe der ungespleißten und der prozessierten RNA entsprechen. Das zweite Primerpaar, dessen 5' Primer im ersten Intron lag, führte nur zum Nachweis ungespleißter RNA. Damit entsprach das Spleißmuster einer Reihenfolge, bei der das erste Intron zeitlich vor dem zweiten entfernt wurde (Abb. 36

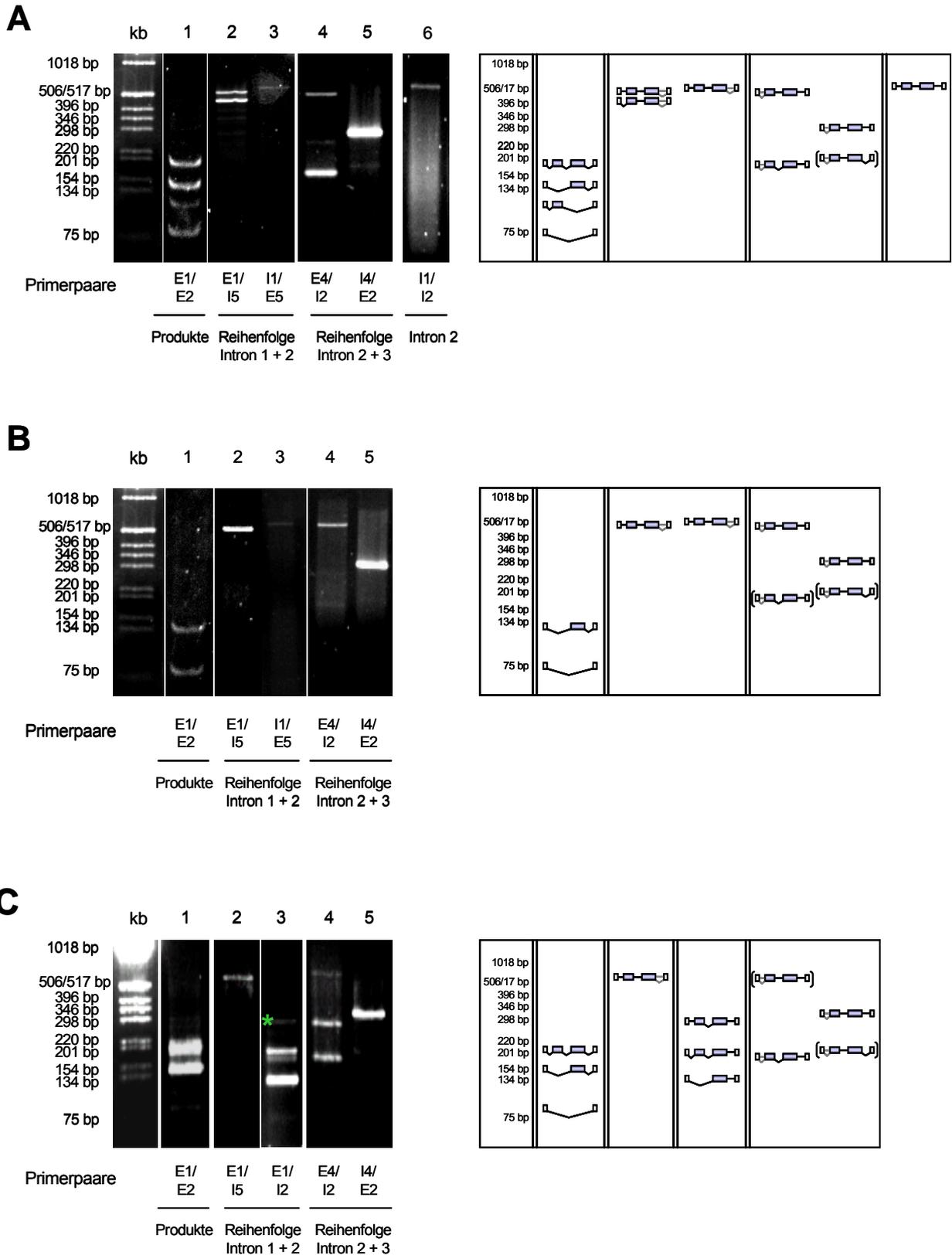
A). Die Reihenfolge der Entfernung des zweiten und dritten Introns entsprach ebenfalls ihrer Lage von 5' nach 3'. In Spur 4 konnte sowohl die ungespleißte, als auch die gespleißte RNA nachgewiesen werden, während in Spur 5 fast ausschließlich die ungespleißte RNA detektierbar war. Die letzte Spur diente der Kontrolle der Spleißreihenfolge. Es wurden Primer verwendet, die im ersten und im letzten Intron banden. Die Detektion eines gespleißten Produktes würde bedeuten, dass das mittlere Exon zuerst prozessiert worden wäre. Da jedoch nur die ungespleißte RNA nachweisbar war, konnte die Reihenfolge für diesen Vektor als sequenziell beschrieben werden. Erst nachdem das 5' Intron entfernt wurde, kann das folgende gespleißt werden.

3.5.2 Die Mutation des Enhancers im Exon 2 führt nicht zur Veränderung der Spleißreihenfolge

Wie schon bereits ab Abschnitt 3.2.1 beschrieben, führte die Mutation bereits eines Enhancer-Elementes im Exon 2 zum Verlust der Exonerkenkung (ds Ex2 Δ M1). Da dieses auch einen Einfluss auf die Prozessierung bzw. Definition des 5' Introns hatte, wurde auch für dieses Transkript die Spleißreihenfolge untersucht. Die Analyse aller prozessierten RNAs (Abb. 38 B; Spur 1) zeigte, dass auch hier die Erkennung des Exons 2 durch die Mutation verhindert wurde.

Es konnte keine Spleißvariante nachgewiesen werden, die das Exon 2 beinhaltete. Aus diesem Grund zeigten beide PCRs zur Bestimmung der Reihenfolge der ersten beiden Introns nur ungespleißte RNA. Die Verschiebung der Primerbindestellen um ein Exon, zur Bestimmung der Reihenfolge des zweiten und dritten Introns, führte dazu, dass der 5' Exon-bindende Primer im nicht erkannten Exon 2 band. Aus diesem Grund konnte in Spur 4 ebenfalls nur ungespleißte RNA nachgewiesen werden.

Abb. 38: Reihenfolge der Intronentfernung in Abhängigkeit vom Enhancer im Exon 2 und Silencer im Exon 3. A/B/C: Die 3% Metaphor-Gele auf der linken Seite zeigen jeweils die RT-PCRs zur Bestimmung der Reihenfolge der Intronentfernung. Der linke Gelabschnitt zeigt die kb-Leiter, der nächste die entstehenden Produkte mit Primern im ersten und letzten Exon. Die beiden folgenden Gele zeigen die Bestimmung der Reihenfolge der Intronentfernung bezüglich zwei aufeinanderfolgender Introns mit den darunter aufgeführten Primerpaaren. Die schematische Darstellung der Gele auf der rechten Seite zeigt die Spleißprodukte, die aufgrund der Größe den Banden zugeordnet werden



konnten. In eckigen Klammern eingefasste Spleißprodukte zeigten nur einen geringen Nachweis im Gel. **A:** Reihenfolge des subgenomischen Fragmentes ohne Mutation (ds Ex2 ds Ex3). **B:** Reihenfolge des subgenomischen Fragmentes mit Mutation des Enhancers im Exon 2 (ds Ex2 Δ M1 ds Ex3). **C:** Reihenfolge des subgenomischen Fragmentes mit Mutation des Silencers im Exon 3 (ds Ex2 ds Ex3 ESS-). Der grüne Stern markiert die Bande, die eine RNA mit nur mittleren prozessierten Intron darstellt.

E1 / E2	E1 / I5	I1 / E5	E4 / I2	I4 / E2	I1/I2	I1/E2	E1/I2	Splicing pattern
826 Nt 5104 Nt	525 Nt	582 Nt	588 Nt	297 Nt 493 Nt	683 Nt 619 Nt	943 Nt	708 Nt 4790 Nt	
709 Nt 4791 Nt	525 Nt	155 Nt	161 Nt	180 Nt 177 Nt	211 Nt 189 Nt	627 Nt	281 Nt 4360 Nt	
399 Nt 4677 Nt	438 Nt					513 Nt		
739 Nt 935 Nt	438 Nt		588 Nt	297 Nt 493 Nt			621 Nt 618 Nt	
282 Nt 4364 Nt	438 Nt	155 Nt	161 Nt	180 Nt 177 Nt		197 Nt	194 Nt 188 Nt	
622 Nt								
312 Nt 508 Nt								
195 Nt								
262 Nt 458 Nt							144 Nt 138 Nt	
145 Nt								
208 Nt 4290 Nt						123 Nt		
121 Nt								
71 Nt								

Abb. 39: Tabellarische Darstellung der Größe aller theoretischen Spleißprodukte des pNL43 und des klonierten Minigenkonstruktes mit gekürzten Intron 1 (fett). Rechts neben der Tabelle sind die verschiedenen Spleißprodukte abgebildet, innerhalb der Tabelle sind die zu erwartenden Größen bei Nutzung des oben angegebenen Primerpaares dargestellt. Mit dem ersten Primerpaar werden die auftretenden Endprodukte und deren Mengen bestimmt. Die folgenden zwei Primerpaare dienen zur Bestimmung der Spleißreihenfolge des ersten und zweiten Introns bzw. des zweiten und dritten Introns. Das fünfte Primerpaar dient der Überprüfung der Reihenfolge des mittleren Introns bezüglich des ersten und dritten Introns. Die letzten beiden Primerpaare wurden nur bei der RNA des pNL4.3 verwendet. Da hier andere Introngrößen vorhanden sind, mussten andere Primerpaare wie für das subgenomische Fragment verwendet werden.

Die drei letzten PCRs zeigten deutlich, dass die Sequenz des ersten und zweiten Introns zusammen mit dem Exon 2, als eine Introneinheit zu definieren waren. Spur 5 zeigte die letzte PCR, mit deren Hilfe die Reihenfolge festgelegt werden konnte. Da der 5' Primer im zweiten Intron lag und der 3' Primer im terminalen Exon band, definiert das Auftreten nur ungespleißter RNA eine Reihenfolge, bei der, wie bereits oben, das 5' Intron vor dem folgenden entfernt worden sein musste.

3.5.3 Veränderung der Reihenfolge durch Mutation des Silencers im Exon 3

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Aufhebung der Exonerken-
nung eines alternativ zu spleißenden Exons, die Reihenfolge der Intronentfernung
nicht änderte. Ob hingegen die Erhöhung des Exoneinschlusses durch Mutation
eines Silencers und Aktivierung von Enhancern die Reihenfolge ebenfalls unbeein-
flusst läßt (ds Ex2 ds Ex3 ESS-), wurde im folgenden untersucht. Die Untersuchung
der entstandenen Spleißprodukte (Abb. 38 C; Spur 1) durch Verwendung der termi-
nalen Primerbindestellen (E1/E2), zeigte zum Einen einen starken Rückgang der
Spleißvariante ohne Exoneinschluss und einen Verlust der Spleißvariante mit Exon 2
Einschluss. Zum Anderen nahmen die beiden Spleißvarianten mit Exon 3 Einschluss
um fast 30 % auf 95 % zu. Die gesamte RNA, die bisher nur das Exon 2 enthalten
hatte, enthielt nun zusätzlich auch das Exon 3.

Die Analyse der Spleißreihenfolge des zweiten und dritten Introns (Spur 4 und 5)
zeigte ein dem unmutierten Exon 3 ähnliches Bild. Für das erste Primerpaar konnte
sowohl ungespleißte, als auch prozessierte RNA nachgewiesen werden, für das
zweite Paar nur ungespleißte. Damit wurde auch in diesem Fall das Intron 3 erst
nach dem Intron 2 entfernt.

Erstaunlicherweise konnte mit dem ersten Primerpaar zur Bestimmung der Reihen-
folge der ersten beiden Introns (Spur 2; E1/I5) nur ungespleißte RNA detektiert
werden. Dieses Ergebnis kann nur damit erklärt werden, dass das zweite Intron vor
dem ersten entfernt wird.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde die Reihenfolge mit einem weiteren
Primerpaar kontrolliert. Wie im vorigen Experiment lag die Primerbindestelle des
ersten Primers im ersten Exon, der 3' Primer band jedoch erst im letzten Intron. Im
Grundsatz diente diese PCR zum Ausschluss der Möglichkeit, dass das letzte Intron
vor dem ersten oder zweiten entfernt worden war. Gleichzeitig konnte jedoch durch

das Fehlen oder Vorhandensein bestimmter Zwischenprodukte auf die Reihenfolge geschlossen werden. Abbildung 38 C zeigt in Spur 3 die entstandenen PCR-Banden. Die oberste Bande, bei 297 Nt, konnte aufgrund der Größe einer RNA mit gespleißtem mittleren Intron zugeordnet werden. Das 5' liegende Intron war noch nicht prozessiert. Der Nachweis dieser Bande in Kombination mit dem Fehlen einer RNA, bei der nur das erste Intron prozessiert ist, unterstützt die Annahme einer Änderung der Reihenfolge zugunsten des mittleren Introns. Die Banden mit Größen unterhalb von 200 Nt. zeigen RNAs, bei denen lediglich das letzte Intron nicht gespleißt wurde. Aufgrund dieser PCR-Ergebnisse konnte eindeutig eine Änderung der Reihenfolge der Intronentfernung nachgewiesen werden. Die Enhancer im Exon 3, bzw. das Fehlen des Silencers führt zu einer Verstärkung der SA3-Nutzung, die neben einer konstitutiven Nutzung dieser Spleißstelle auch das sequenzielle Spleißen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass das upstream des SA3 liegende (mittlere) Intron vor dem ersten Intron prozessiert wurde. Diese Ergebnisse sind gleichbedeutend damit, dass durch die endogene Konzentration der SR-Proteine bzw. hnRNP A1 Proteine die Reihenfolge des Entfernens der Introns variiert werden kann und somit Exon-übergreifende *cis*-wirkende Sequenzen in Prozessierungsintermediaten nachfolgende Spleißereignisse beeinflussen können.

3.5.4 Das Genom des NL4.3 wird sequenziell prozessiert

Um die an dem Minigenkonstrukt gewonnenen Ergebnisse mit denen der viralen RNA vergleichen zu können, wurde RNA aus infizierten PM1 Zellen verwendet, die freundlicherweise von Prof. Hauber, Hamburg, zur Verfügung gestellt worden war. Aufgrund der anderen Größenverhältnisse, speziell des ersten Introns, im HIV-NL4.3, mussten die PCRs zur Ermittlung der Spleißreihenfolge teilweise verändert werden. Mit einer Größe von mehr als 4100 Nt. wies das erste Intron eine Größe auf, die mit der Standard-PCR nicht zu amplifizieren war. Da bei allen nachweisbaren PCR-Produkte das erste Intron bereits gespleißt sein würden, wurden die Primerbindestellen der Reihenfolgen-PCRs drei Introns, anstelle der vorher zwei Introns, voneinander entfernt positioniert (Abb. 37, unten).

Die Überprüfung sowohl der Produkte, wie auch der Mengenverhältnisse der einzelnen Spleißvarianten (Abb. 40; Spur 1) entsprach der Beschreibung in Abschnitt 3.1.1. Den quantitativ größten Anteil hatte die Spleißvariante mit Exon 3 Einschluss.

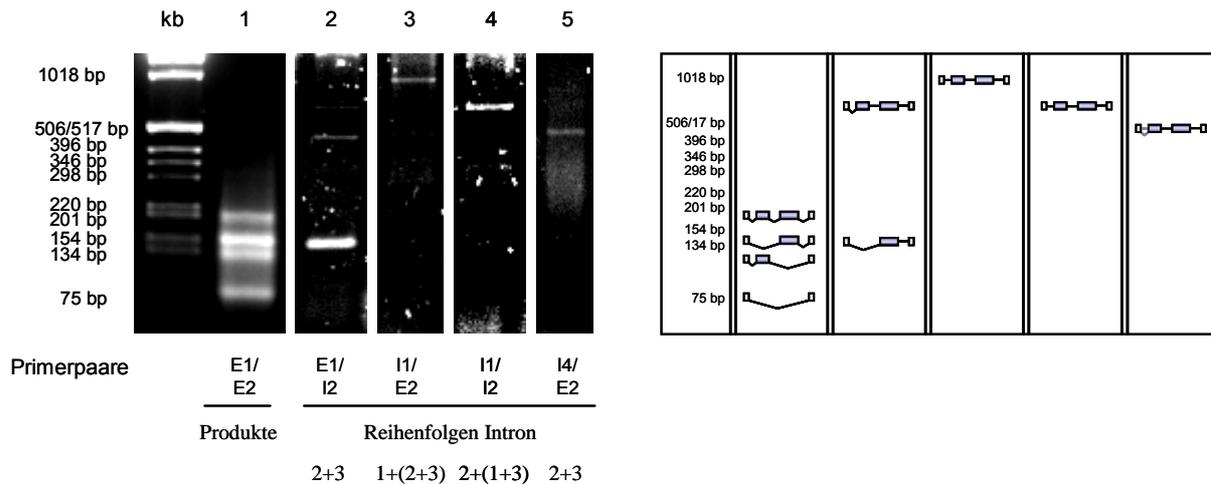


Abb. 40: Reihenfolge der Intronentfernung der pNL4.3 *tat*-prä-mRNA. Das 3% Metaphor-Gel auf der linken Seite zeigt die RT-PCR zur Bestimmung der Reihenfolge der Intronentfernung. Der linke Gelabschnitt zeigt die kb-Leiter, der nächste die entstehenden Produkte mit Primern im ersten und letzten Exon. Die folgenden Gele zeigen die Bestimmung der Reihenfolge der Intronentfernung bezüglich drei (Spur 2,3) oder zwei (Spur 4,5) aufeinanderfolgender Introns mit den darunter aufgeführten Primerpaaren. Die schematische Darstellung des Gels auf der rechten Seite zeigt die Spleißprodukte die aufgrund der Größe den Banden zugeordnet werden konnten.

Weniger RNA konnte für die Varianten ohne Exoneinschluss, sowie mit Exon 2 und Exon 23 Einschluss nachgewiesen werden.

Aufgrund der Prämisse, dass nur Produkte mit prozessiertem ersten Intron nachzuweisen waren, führten die ersten beiden PCRs zu einer Feststellung der Reihenfolge der Introns 2 und 3. Die PCR mit dem ersten Primerpaar stellt durch die Bindestelle des 3' Primers im letzten Intron sicher, dass dieses nicht prozessiert vorliegt. Die nachzuweisenden Spleißereignisse (Spur 2) liegen zeitlich also vor der Prozessierung des letzten Introns. Durch die Verschiebung der Primerbindestellen 3'-wärts (I1/E2) kann in der PCR keine RNA detektiert werden, deren erstes Intron herausgespleißt wurde. Da die PCR nur die vollständig ungespleißte RNA detektierte, können folgende Aussagen abgeleitet werden: Zum Einen werden die Introns 2 und 3 erst nach der Prozessierung des ersten Introns entfernt und zum Anderen zeigte das vorletzte Experiment, dass das Intron 3 zuletzt entfernt wurde. Damit erfolgt die Entfernung der Introns der genomischen RNA sequenziell.

Um diese Aussage zu festigen, wurden noch zwei weitere PCRs durchgeführt. Das Produkt in Spur 4 der Abb. 40 stellt die ungespleißte RNA dar, amplifiziert mit Primern in den Introns 1 und 3. Es sollte die Frage geklärt werden, ob das Intron 2

gespleißt werden konnte, wenn die Spleißereignisse der beiden anderen Introns unterbunden sind. Da dies nicht der Fall war, konnte das Intron 2 nur gespleißt werden, wenn mindestens eines der beiden anderen prozessiert war. Aus Spur 2 konnte abgeleitet werden, dass hierfür das erste Intron gespleißt sein musste.

Die zweite Kontroll-PCR war ein Äquivalent für Spur 3, nur hier erstreckt sich die PCR wieder über zwei Introns und definiert die Reihenfolge der Introns 2 und 3. Das Ergebnis der Spur 3, sequenzielles Spleißen, konnte bestätigt werden.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass sowohl das subgenomische Fragment, wie auch HIV-NL4.3 sequenziell spleißen. Die Mutation eines Enhancers, der zum Verlust der Exonerkenkung führt, beeinflusste die Reihenfolge nicht, wohingegen die Mutation eines Silencers bzw. die Aktivierung von Enhancern zur konstitutiven Nutzung einer Spleißstelle und zu einer Änderung der Spleißreihenfolge führte.

4 Diskussion

Die starke Konservierung der nicht-kodierenden HIV-1 Leaderexons 2 und 3 und die Häufigkeit ihres Einschlusses in die mRNAs der frühen Replikationsphase, lässt eine regulatorische Funktion als wahrscheinlich erscheinen. Die in der Literatur kontrovers geführte Diskussion bezüglich einer solchen regulatorischen Funktion (258,307,365) war in der vorliegenden Arbeit der Anlass die Regulation des Spleißens dieser Leaderexons durch *cis*-regulatorische Exon-Sequenzen zu entschlüsseln. Die Nutzung von Spleißstellen und damit der Einschluss der Exons ist häufig kontextabhängig und könnte daher ebenfalls kontextabhängig zu unterschiedlichen Funktionen der Exons führen.

4.1 Die Erstellung eines subgenomischen Minigenkonstruktes

Um nicht alle molekularen Untersuchungen unter S3 Bedingungen durchführen zu müssen, wurden zunächst zwei nicht-infektiöse subgenomische Minigenkonstrukte mit den Leaderexons 2 und 3 hergestellt und ihr Spleißmuster mit dem des HIV-Isolates NL4.3 verglichen.

Die Analyse des Spleißmusters nach Kürzung der terminalen Introns (zwischen SD1 und SA2 bzw. SD3 und SA4), zeigte bis auf die Transkriptvarianten mit Exon 2 Einschluss eine weitgehende Übereinstimmung. Dies könnte auf *cis*-regulierende Elemente im ersten Intron deuten. Insbesondere bei kurzen Exons wie dem Exon 2, das zu den sogenannten Microexons zählt (< 51 Nt, 67), soll es zu einer sterischen Interferenz der simultan an die 5' und 3' Spleißstellen bindenden snRNPs und anderer Spleißfaktoren kommen (66,67,393), so dass Spleißfaktoren, die den Aufbau des Spleißosoms unterstützen, nur in den flankierenden Introns Platz fänden.

Eine positive Regulation der Spleißstellen-Nutzung durch ISEs ist allerdings aufgrund der geringeren Anzahl solcher Elemente, weniger gut charakterisiert, als bei ESE-Sequenzen. Häufig handelt es sich um G-reiche Motive (z. B. GGGGCTG) oder sehr G-reiche Sequenzabschnitte in der direkten Umgebung der regulierten Spleißstelle (66,187,289). So schlägt die Arbeitsgruppe um Berget ein Modell vor (289), bei dem ein hoher Guanin-Anteil im flankierenden Intron-Bereich des Spleißdonors die Definition der Exon-Introngrenze positiv unterstützt. Mit einem Anteil von über 40 % Guani-

nen innerhalb der ersten 80 Nt des Introns 1 könnte dieses Modell daher eine Erklärung für die Definition der Exon-Introngrenze des SD1 des HIV-NL4.3 liefern und die Guanine könnten damit Teil eines der gesuchten ISEs innerhalb des Introns 1 darstellen. Da aber weder die 5'-wärts, noch die 3'-wärts des Exons 2 gelegenen Sequenzen einen erhöhten Guanin-Anteil aufweisen, müsste es sich bei den hier vermuteten Enhancern um andere Sequenzmotive handeln. Als Effektor-Proteine, die an solche ISE-Elemente binden könnten, wurden beispielsweise Mitglieder der hnRNP-Familie, wie z. B. hnRNP K (133), hnRNP F und hnRNP H (88), auch KSRP (88,296), C/EBP (337) und SF1 (66) beschrieben.

Eine zusätzliche Kürzung der mittleren Intronsequenz (zwischen dem Exon 2 und 3) erhöhte den generellen Einschluss der Leaderexons, mit einer Zunahme der Spleißvariante, die beide Leaderexons enthielt. Damit scheint auch zwischen den beiden Leaderexons ein weiteres, in diesem Fall aber negativ regulierendes Element vorzuliegen, welches den Einschluss beider Exons vermindert.

Da beide Leaderexons trotz negativer Regulation, hervorgehend aus dem mittleren Intron, und fehlender positiver Verstärkung, durch Deletion des vermutlich ISE im ersten Intron, in die mRNAs eingeschlossen wurden, stand die Identifizierung *cis*-wirkender exonischer Enhancer im Vordergrund dieser Arbeit.

4.2 Die Analyse des Exons 2

4.2.1 Die Heptamer-Enhancer im Exon 2

Im dem untersuchten Minigenkonstrukt mit der Exon 2-Sequenz als mittleres Exon (Exon 2-Minigenkonstrukt; ds Exon 2) ließen die extrem geringen intrinsischen Stärken sowohl des Spleißdonors 2, als auch des Spleißakzeptors 2, ein Spleißmuster erwarten, bei dem die Exon 2-Erkennung nur schwach ausgeprägt sein sollte. Der hier nachgewiesene Einschluss dieses Exons in ungefähr jede dritte Transkriptvariante (34 %) deutete jedoch auf eine zusätzliche positive Regulation hin, die die Exonerkenkung ermöglicht. In der Tat konnten in dieser Arbeit innerhalb des nur 50 nt langen Exons 2 sogar zwei *cis*-regulatorische Sequenzen identifiziert werden, die den Exoneinschluss ermöglichen. Aufgrund der Lage dieser Sequenzen innerhalb

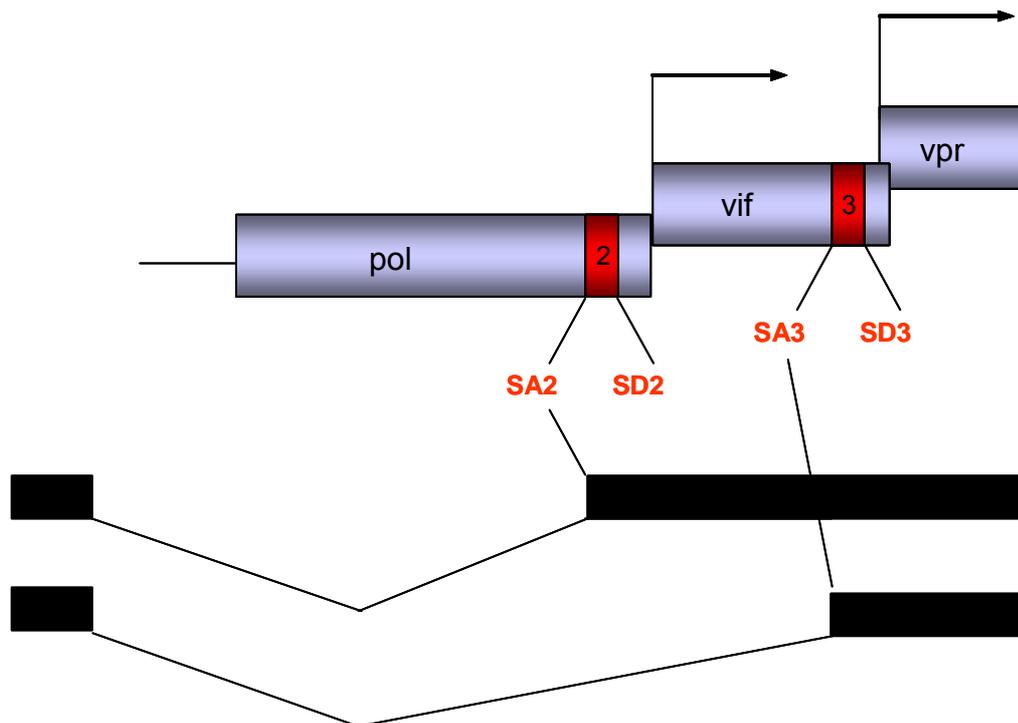


Abb. 41: Die Nutzung der Spleißstellen SA2 bzw. SA3 zur Generierung der Transkripte für Vif und Vpr. Im oberen Teil der Abbildung sind die kodierenden Bereiche der Gene Pol, Vif und Vpr mit den Spleißstellen, die die alternativen Leaderexons 2 und 3 flankieren, dargestellt. Im unteren Teil sind die zu spleißenden Exons schematisch abgebildet. Zur Herstellung einer Vif-mRNA muß der SA2 benutzt werden bei gleichzeitiger Nicht-Nutzung des folgenden SD2. Vergleichbares gilt für die Herstellung einer Vpr-mRNA, nur dass hier der SA3 genutzt und der SD3 nicht genutzt wird. Eine Vpr-mRNA kann das Exon 2 als Leader enthalten. Die Pfeile oberhalb der kodierenden Bereiche stellen die ORFs der Proteine Vif und Vpr dar, die schwarzen Balken unterhalb das Spleißmuster der Transkripte.

des Exons scheint die für Microexons beschriebene sterische Interferenz beim Aufbau des Spleißosoms für das Exon 2 hier nicht vorzuliegen. Offensichtlich können neben den Spleißfaktoren sogar noch weitere Proteine innerhalb des Exons binden. Damit ergeben sich zwei unterschiedliche Schlussfolgerungen: Entweder gibt es auch Microexons, die vergleichbar längeren Exons gespleißt werden oder die sterische Interferenz ist derartig groß, dass keine exonüberspannende Interaktionen aufgebaut werden können. In einem solchen Fall könnte das Spleißosom über das Intron hinweg etabliert werden.

Die Analyse des Spleißmusters des Exons 2-Minigenkonstrukts, zeigte neben dem Exoneinschluss (34 %) eine starke Akkumulation eines Zwischenproduktes mit nur

herausgespleißtem ersten Intron (46 %). Die hiermit verbundene verzögerte Entfernung des zweiten Introns ist für die HIV-Replikation in nicht-permissiven T-Zellen, wie z.B. CEM oder H9 Zellen von essentieller Bedeutung, da auf diese Weise eine RNA bereitgestellt wird, die für das Protein Vif kodiert (Abb. 41). Dessen Verlust führt in diesen CEM15/APOBEC3G exprimierenden Zellen zu einem Replikationsdefekt. Für die Replikation in nicht-permissiven Zellen ist es daher absolut notwendig, dass der Spleißakzeptor des Exons 2 stärker genutzt wird als sein Spleißdonor.

4.2.2 Jeweils ein Heptamer-Enhancer wird zur Definition des 5'-wärts gelegenen Introns und zur Nutzung des Spleißdonors benötigt

Zur Trennung der Effekte der beiden Heptamer-Enhancer auf den Spleißakzeptor bzw. -donor, wurde jeweils eine der Spleißstellen im Exon 2-Minigenkonstrukt deletiert. Die Deletion des Spleißdonors 2 führte dabei hauptsächlich zur Nutzung des SA2 und dokumentiert damit die Ausbildung des Spleißosoms über das erste Intron hinweg. Nach dem Exon-Definitionsmodell hätte dies zu Problemen bei der paarweisen Erkennung der Spleißstellen führen müssen, da der initiale Schritt, die konzentrierte Erkennung der 5' und 3' Spleißstellen über das Exon hinweg, nicht ausgeführt werden konnte. Somit hätte die Mutation des SD2 zur ausschließlichen Nutzung des downstream gelegenen Spleißakzeptors führen müssen. In Abwesenheit des Spleißdonors spricht das beobachtete Spleißmuster des Minigenkonstruktes damit einer Definition des 5'-wärts gelegenen Introns. Dieses für niedere Eukaryoten, wie z. B. *S. pombe*, *C. Elegans* und *D. Melanogaster* (394) beschriebene Introndefinitionsmodell, wurde bei höheren Eukaryoten bisher nur *in vitro* (347) beschrieben. Eine Grundvoraussetzung für die Definition von Intronsequenzen soll deren Länge im Vergleich zu den flankierenden Exons darstellen. Mit Intronlängen von 87 Nt. bzw. 117 Nt und terminalen Exons von 292 Nt bzw. über 1 kb Länge wäre diese Voraussetzung für das hier untersuchte Exon 2-Minigenkonstrukt erfüllt. *In vivo* konnte für höheren Eukaryonten bereits gezeigt werden, dass Enhancer-gebundene SR-Proteine das Skippen eines Exons verhindern können, indem die Nutzung des proximalen Spleißakzeptors stark erhöht wurde.

Vergleichbar wird auch hier im Exon 2-Minigenkonstrukt ohne Spleißdonor der proximale Spleißakzeptor durch zwei Enhancer reguliert, von denen einer für dessen Nutzung hinreichend ist, während der andere seine Nutzung deutlich verstärkt. Da

die zusätzliche Anwesenheit des SD2 keinen Einfluss auf die Nutzung des SA2 hatte, scheinen also primär die Heptamersequenzen und nicht der Spleißdonor für die Erkennung des Spleißstellenpaares, dass das erste Intron begrenzt, verantwortlich zu sein.

Die Untersuchung des Einflusses der Heptamer-Enhancer auf den SD2 ohne einen upstream gelegenen Spleißakzeptor, zeigte im heterologen Kontext (SV (leader) SD4 Δ vpu env) eine dem SA2 vergleichbare Regulation: Ein Enhancer war zur Aktivierung des SD2 hinreichend, der zweite verstärkte seine Nutzung. Und obwohl der SD2 im heterologen Kontext durch die Heptamer-Enhancer reguliert werden kann und im Exon 2-Minigenkonstrukt die Länge des 3'-Introns sehr kurz ist, konnte im Zwei-Intron-Kontext keine Transkriptvariante nachgewiesen werden, bei der nur das 3'-Intron herausgespleißt worden war. Die gesamte RNA wurde unter Auslassung des Exons 2 gespleißt und das Spleißmuster könnte damit durch das Exondefinitionsmodell erklärt werden, bei dem ein Exon ohne konzertierte Erkennung der 5' und 3' Spleißstelle geskippt wird.

Vergleicht man also die Wirkung der Enhancer bezüglich der beiden Intronsequenzen, scheint die Möglichkeit das Spleißen eines flankierenden Introns zu unterstützen, in diesem Kontext auf das 5'-wärts gelegene Intron begrenzt zu sein. Diese Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Funktion von Enhancer-Elementen nicht nur durch die räumliche Nähe zu einer Spleißstelle definiert wird (66,168), sondern dass es anscheinend unabhängig hiervon eine Polarität (in diesem Fall upstream) mit festem Bezug (in diesem Fall die SA-Nutzung) geben kann.

Für das Exon 2 bedeutet dies: Beide Enhancer-Sequenzen können abhängig vom entsprechenden Kontext (SV (leader) SD4 Δ vpu env bzw. Exon 2-Minigenkonstrukt) beide Spleißstellen regulieren, können also prinzipiell bidirektional wirken, im Zwei-Intron-Konstrukt scheinen sie jedoch präferenziell auf den Spleißakzeptor ausgerichtet zu sein.

4.2.3 Die Enhancer im Exon 2 werden von drei Algorithmen als funktionell beschrieben und der 5'-wärts gelegene bindet ASF/SF2

Die hier dargestellten Untersuchungen des ESE-Elementes im Exon 2 bezüglich ihrer Funktion und Regulation, ließen eine Bindung von SR-Proteinen als Effektor-Proteine wahrscheinlich erscheinen. Durch die Wechselwirkung der RS-Domänen von SR-

Proteinen mit U2AF35 (170,431,441,464), dem Branchpoint (167,371) und dem U1 70K (61,229,441,444) wäre eine Regulation sowohl des Spleißdonors, als auch des Spleißakzeptors plausibel.

Zur Identifizierung potentieller Enhancer bzw. gebundener SR-Proteine, können derzeit im Internet drei allgemein zugängliche Algorithmen verwendet werden, die sich vor allem in der Art und Weise unterscheiden, wie die putativen SR-Bindungsstellen ermittelt wurden (s. hierzu 1.3.3). Die Analyse der Exon 2 Sequenz wies bei einer Projektion dieser drei Algorithmen, ESE-finder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>), Rescue-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) und PESX (<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx>), eine erstaunliche Vielzahl von Enhancern auf. Lediglich 1 Dinukleotid innerhalb des gesamten Exons ist nicht Teil eines vorhergesagten Enhancers (Abb. 42). Weniger überraschend war dementsprechend die Übereinstimmung der beiden im Exon 2 identifizierten Heptamer-Enhancer mit vorhergesagten Enhancern der Analyse-Programme. Als Ausgangspunkt einer Analyse sind die Vorhersage-Programme daher eher ungeeignet. Eine Häufung von potentiellen Enhancern kann zwar als Indiz für eine Regulation angesehen werden, sagt aber letztendlich nichts über deren Funktionalität aus. Im Umkehrschluss kann jedoch eine Mutation eines funktionelle Enhancers, die mit der Vorhersage des ESE-finders übereinstimmt durchaus für die Identifizierung des bindenden SR-Proteins bzw. der Lokalisation der SR-Proteinbindestelle hilfreich sein.

Die im Exon 2-Minigenkonstrukt verwendeten Enhancer-Mutationen inaktivierten unter anderem jeweils eine potentielle ASF/SF2-Bindestelle, von denen die 5'-wärts gelegene im Pull-down Experiment bestätigt werden konnte.

Neben ASF/SF2 konnten weitere an die Exon 2-Sequenz bindende SR-Proteine nachgewiesen werden, deren Laufhöhen im Polyacrylamidgel den vom ESEfinder auch postulierten SR-Proteinen entsprachen. Eine Bestätigung der Bindung dieser Proteine durch massenspektrometrische Analysen oder spezifische Antikörper steht allerdings aus.

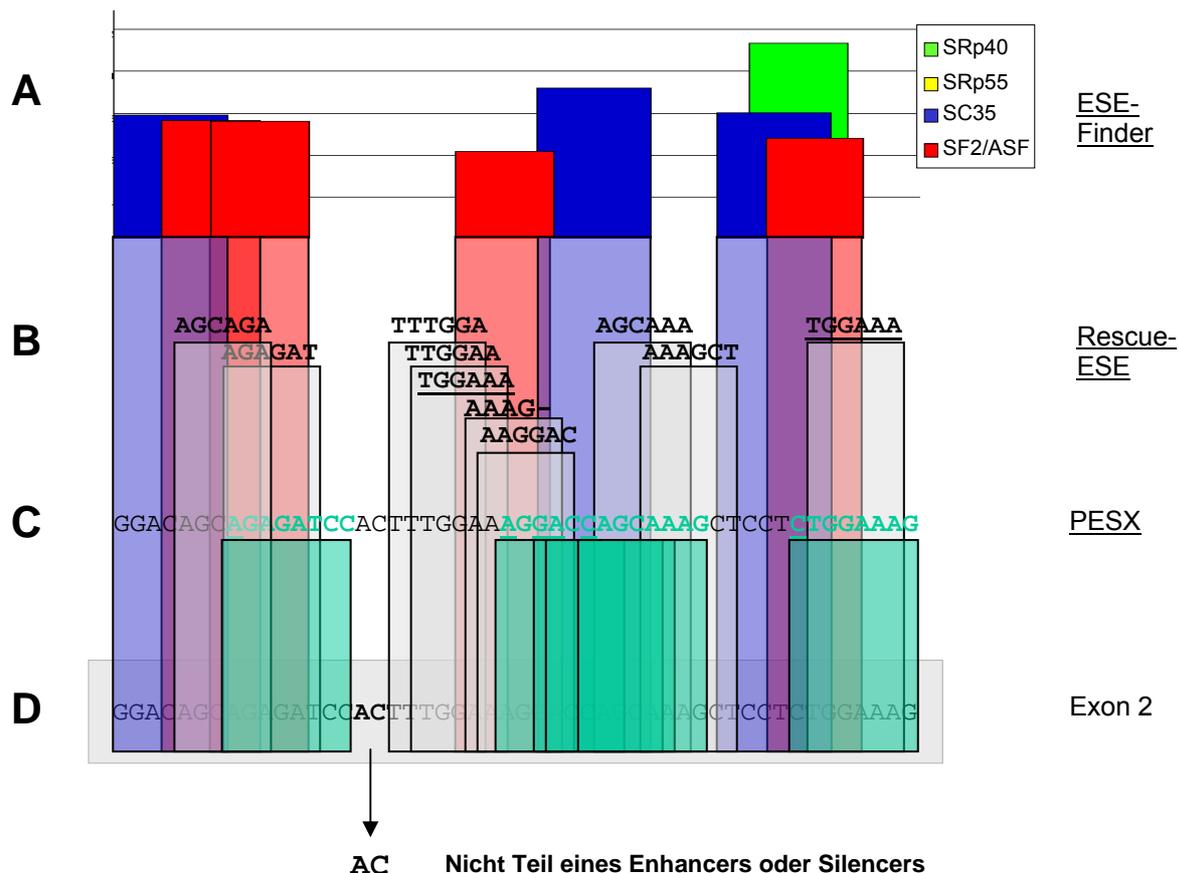


Abb. 42: Darstellung potentieller *cis*-regulatorischer Elemente im Exon 2. (A) In der obersten Reihe sind die mit dem ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) vorhergesagten potentiellen Bindestellen der Proteine SF2/ASF (rot), SRp40 (grün), SC35 (blau) und SRp55 (gelb) dargestellt. (B) Darunter befinden sich diejenigen Bindemotive, die vom Rescue-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) definiert werden. Hierbei wird keine Bindesequenz für ein bestimmtes Protein vorhergesagt. (C) Letzteres gilt auch für den Algorithmus von der Arbeitsgruppe von Lawrence A. Chasin: PESX: Putative Exonic Splicing Enhancers/Silencers, der sowohl Enhancer als auch Silencer vorhersagt (<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx>). (D) Alle vorhergesagten Enhancer-Sequenzen wurden auf die Exon 2 Sequenz abgebildet.

4.2.4 Die Heptamermotive sind innerhalb der HIV-1 Subtypen und im SIV konserviert

Der Vergleich von Konsensus-Sequenzen des Exons 2 verschiedener HIV-1 Subtypen (Abb. 20), zeigte eine generell hohe Konservierung der gesamten Sequenz, wobei die Variabilitäten in keinem Fall eines der beiden Heptamermotive oder die überlagernden ASF/SF2-Bindestellen betrafen. Diese 100 %ige Konservierung ließ auf eine einheitliche Regulation des Exons 2 innerhalb der HIV-1 Subtypen schließen

und unterstreicht die Bedeutung der identifizierten Enhancer für die Regulation der Genexpression.

Ein ebenfalls zweifach auftretendes, um nur 2 Nukleotide verschobenes, sequenz-ähnliches Motiv im SIV Exon 2 unterstreicht neben der Verwandtschaft der Viren, auch eine mögliche Bedeutung des Exons und seiner Regulation für die Bereitstellung der nur teilweise gespleißten Vif-RNA (Abb. 41).

4.3 Die Analyse des Exons 3

4.3.1 Die Spleißstellen

Die experimentelle Überprüfung der Stärken des SA3 und SD3 in dem hier untersuchten Minigenkonstrukt mit der Exon 3-Sequenz als mittleres Exon (Exon 3-Minigenkonstrukt, ds Exon 3) ließ einen deutlichen, allerdings nicht konstitutiven Exoneinschluss erwarten. Tatsächlich konnte bei 84 % der mRNAs ein Exoneinschluss nachgewiesen werden. Dies steht in deutlichem Gegensatz zum Exoneinschluss im Minigenkonstrukt mit beiden Leaderexons (39 %), den in der Literatur beschriebenen Werten (~18 %, (336)) und den nach Infektion von PM-1 infizierten Zellen (~50 %) ermittelten Werten.

Der deutlich häufigere Exon 3-Einschluss in diesem Minigenkonstrukt ist wahrscheinlich auf die fehlende Möglichkeit des alternativen Spleißereignisses vom ersten Spleißdonor auf den Spleißakzeptor 2 zurückzuführen, da hierdurch die maximale Anzahl unterschiedlicher Transkriptvarianten verringert ist. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen des Exon 2-Minigenkonstruktes. Auch hier konnten im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Werten bzw. im Vergleich zu den Werten PM-1 infizierter Zellen ein deutlich höherer Exoneinschluss nachgewiesen werden. Das Verhältnis der Transkriptformen innerhalb des jeweiligen Spleißmusters, lässt für den ersten Spleißdonor eine Nutzung vermuten, die weitestgehend unabhängig von den 3'-wärts gelegenen Sequenzen ist. Dies stünde im Einklang damit, dass die Erkennung des ersten Spleißdonors einer mRNA Cap-abhängig sein soll und somit nicht der paarweisen Erkennung von Spleißstellen unterliegt (28,347,351,402). Der Spleißdonor besäße damit eine definierte „Spleißrate“, und die Mengen der entstehenden Transkriptvarianten hing ausschließlich von der Anzahl der downstream liegenden Spleißakzeptoren und ihrer Effizienz ab.

4.3.2 Das beschriebene Silencer-Element im Exon 3 destabilisiert die RNA bereits vor dem Spleißen und bindet vermutlich hnRNP D

Bereits 2001 beschrieben Bilodeau et al. (32) im Exon 3 drei hnRNP A1-Bindungsstellen, die als Silencer des SA3 wirken sollten. Weder die Untersuchung der Exon 3-Sequenz im Minigenkonstrukt, noch die Analyse der RNA von infizierten PM-1 Zellen unterstützten dieses Ergebnis. In beiden Fällen war trotz Anwesenheit des Silencers ein starker Exoneinschluss nachweisbar. Damit konnte in diesem Zusammenhang zwar der spleißregulierende Effekt der hnRNP A1-Bindungsstellen nicht bestätigt werden, dafür zeigte sich aber für das Exon 3-Minigenkonstrukt eine auf die hnRNP A1-Bindungsstellen zurückzuführende RNA-Degradation (Abb. 22 B/C). Diese trat unabhängig vom Spleißen auf (Abb. 23 C) und setzte bei zu spleißenden Transkripten bereits vor dem Spleißen ein (Abb. 43, links). Eine nukleäre RNA-Degradation dient häufig der Regulation der translatierbaren RNA-Menge und wurde bereits für die gewebsspezifische Expression der Folat-Rezeptor α -Sequenz (456) und des Dihydrofolatreduktase-Transkriptes (261), sowie weiterer Gene (5,97,125,317,334,417,420) beschrieben. Obwohl in der Literatur auch zu finden ist, dass hnRNP A1 an destabilisierende Elemente (CRS vom-HIV-1 und HTLVII,(36) und p17 Ins vom HIV-1, (314)) bindet, konnte bisher nur ein Einfluss auf den Transport, jedoch nicht auf die Stabilität nachgewiesen werden. Da hnRNP A1 zu den gut charakterisierten Proteinen zählt, legt dies die Vermutung nahe, dass ein anderes Protein mit gleicher oder zumindestens überlappender Bindungsstelle für die Instabilität verantwortlich sein könnte. Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben, besitzen schon innerhalb der hnRNP-Proteinfamilie die drei Familien A, D und E eine fast identische Bindungsstelle, jedoch völlig unterschiedliche Funktionen. hnRNP D bindet neben der **TTAGG**-Sequenz auch AU-reiche Elemente, wodurch es Zelltyp-abhängig zu einer RNA-Degradation kommen kann. Untersuchungen im eigenen Labor (238) deuten darauf hin, dass die Exon 3 Sequenz hnRNP D (Auf 1) binden könnte und eine generelle Erhöhung des GC-Gehaltes der Exonsequenz, einhergehend mit der Mutation der Bindungsstelle, wahrscheinlich zum Verlust dieser Bindung führt. Damit könnte auch eine Bindung des destabilisierenden hnRNP D-Proteins an die von Bilodeau et al. beschriebenen hnRNP A1 Bindungsstellen (32) für die Instabilität des Exons 3 verantwortlich sein (Abb. 43).

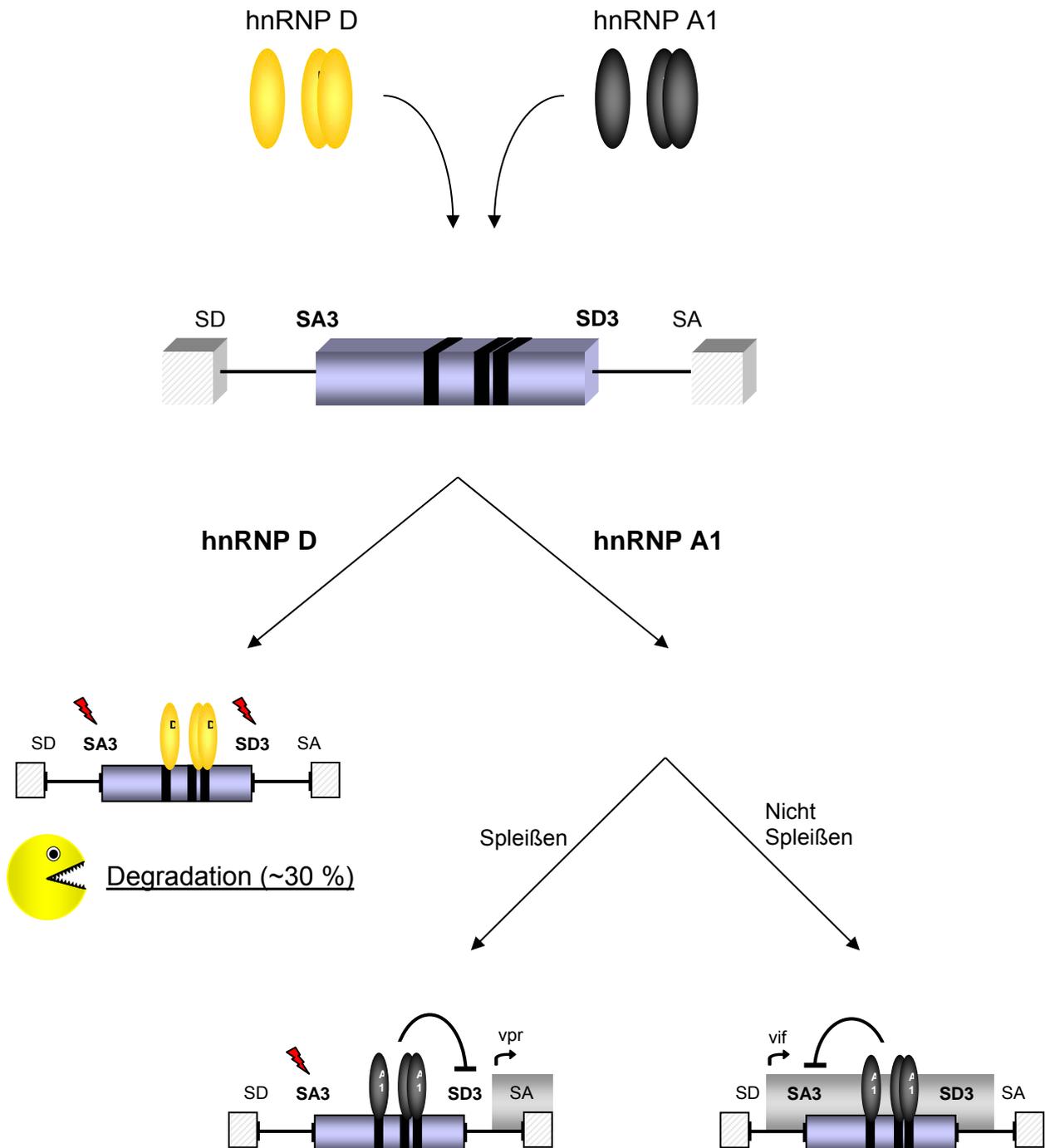


Abb. 43: Modell zum Einfluss der Proteinbindung und der Spleißstellen-Nutzung auf die RNA-Degradation und das Silencen von Spleißstellen. An das hnRNP-Bindungsmotiv können sowohl hnRNP D, als auch hnRNP A1 binden. Die Bindung von hnRNP D und die Zugänglichkeit beider Spleißstellen kann zum Einschluss der Exon 3 Sequenz in den Leader einer RNA führen. Der hierdurch entstehende Leader bewirkt eine RNA-Degradation. Die Bindung von hnRNP A1 an das hnRNP-Bindungsmotiv führt zum Silencen einer der beiden Spleißstellen des Exons 3. Die Nutzung des SA3, bei gleichzeitigem silencen des SD3 generiert eine Vpr-mRNA, bei der das Exon 3 ein Teil des davorliegenden Leaders ist. Durch die Unterdrückung der SA3-Nutzung wird das Exon 3 Teil der kodierenden Sequenz von Vif.

4.3.3 Das hnRNP-Bindungsmotiv (TTAGG) beeinflusst neben der Stabilität auch das Spleißmuster

Um die Kontextabhängigkeit der beiden Funktionen des Exons 3, die hier beobachtete Instabilität (Minigenkonstrukt) und die in der Literatur beschriebene Spleißstellen-Regulation (Vpr-exprimierender Vektor, (32)) zu untersuchen wurde das Exon 3-Minigenkonstrukt durch Deletion des Spleißdonors 3, zunächst dem Vektor von Bilodeau (32) angeglichen. Die RNA-Analyse zeigte, dass ohne den Spleißdonor 3 nur noch ein geringer Effekt der drei von Bilodeau beschriebenen hnRNP A1-Bindungsstellen (hnRNP-Bindungsmotiv) auf die Stabilität nachzuweisen war. Andererseits stieg die Nutzung des SA3, bei Abwesenheit des ESS-Elementes deutlich an. Damit stimmten diese Ergebnisse mit den Untersuchungen von Bilodeau dahingehend überein, dass das hnRNP-Bindungsmotiv in einem bestimmten Kontext die Nutzung des SA3 negativ regulieren kann (Abb. 43, rechts).

Ein bifunktionelles Sequenzelement, das sowohl das Spleißen reguliert, als auch die Stabilität der RNA beeinflusst, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es könnte sich hierbei um ein Element handeln, das die Expression bestimmter stabiler RNAs nur unter definierten Bedingungen erlaubt.

Vergleichbar mit der Exon 2-Sequenz (4.2.3), fand auch im Exon 3-Minigenkonstrukt ohne Spleißdonor eine Erkennung des SA3 statt, während eine Spleißakzeptor-unabhängige Erkennung des SD3 nicht möglich war (vgl. Abb. 18 und 25). Diese Beobachtungen ließen, analog zum Exon 2, eine gerichtete positive Regulation der SA3-Nutzung vermuten (siehe auch 4.3.4). Im Gegensatz zur Nutzbarkeit des Akzeptors SA3 (46 % Nutzung trotz Gegenwart des hnRNP-Bindungsmotivs), zeigten die Untersuchungen des Spleißdonors SD3 im heterologen Kontext, eine Dominanz des negativ spleißregulierenden hnRNP-Bindungsmotivs mit der Folge, dass die U1 snRNA-vermittelte RNA-Stabilisierung des *env*-Transkriptes ausblieb. Erst die Mutation des hnRNP-Bindungsmotivs führte wieder zum Nachweis einer deutlichen *env*-Expression (Abb. 27 B, Spur 1 und 2).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass der destabilisierende Einfluss des Exons 3 im Minigenkonstrukt von der Anzahl und Erkennung der Spleißstellen abhängig war. Die Anwesenheit bzw. Zugänglichkeit nur einer Spleißstelle, gleichgültig ob Spleißdonor oder –akzeptor, führt zu stabilen Transkripten mit einer Regulation der Spleißstellen-Nutzung, wahrscheinlich durch hnRNP A1 (für den SD gezeigt in (32)),

während die Zugänglichkeit beider Spleißstellen oder eine Intronisierung der Exonsequenz zur Degradation führte (Abb. 43).

Aus diesen Ergebnissen ließ sich ein Mechanismus sowohl zur Entstehung stabiler *vpr*-, als auch stabiler *vif*-mRNAs postulieren: Im ersten Fall ermöglicht das hnRNP-Bindungsmotiv die Bindung und Multimerisierung von hnRNP A1-Proteinen, die die Erkennung des SD3 durch Komponenten des Spleißosoms verhindern. Durch die vom distalen SD3 unabhängige Aktivierung des Akzeptors wird der SA3 genutzt und die Exon 3-Sequenz wird Bestandteil der Leadersequenz vor dem *vpr*-Leserahmen (Abb. 43, mitte) bei gleichzeitig stabilen, *Vpr*-kodierenden Transkripten. Zur Generierung stabiler *vif*-mRNAs hingegen, wird die Erkennung der SA3-Sequenz verhindert. Da der SD3 nicht unabhängig von der Erkennung des SA3 genutzt werden kann, wird das Exon als solches nicht erkannt und auch nicht gespleißt. Die direkte Folge ist die Lage der Exonsequenz und damit auch der kodierenden Region von *Vif* innerhalb einer Intronsequenz. Da dieses jedoch 5'-wärts vom Exon 2, bzw. vom nur unzureichend nutzbaren SD2 begrenzt wird, erfolgt das Spleißereignis, welches zum Entfernen der „*Vif*-Intronsequenz“ führt, eher selten. Das entstehende Spleißintermediat stellt eine stabile, *vif*-kodierende RNA dar.

Andere Transkripte, wie z. B. die, die für *Nef* kodieren, enthalten in fast einem Drittel der nachweisbaren mRNAs der frühen Phase das Exon 3. Nach den vorliegenden Ergebnissen müsste davon ausgegangen werden, dass dieser Leader zu einer Exon 3-vermittelten RNA-Degradation der *nef*-Transkripte führt. Bei Degradationsraten von 50 % bis zu 80 %, je nach Kontext (3.3.3), könnten also die von Purcell (336) nachgewiesenen Mengen an Exon 3-enthaltenden Transkripten deutlich unterhalb der real transkribierten Mengen liegen. Da jedoch eine Überexpression bestimmter Transkripte zu Replikationsdefekten führen kann, könnte der Exon 3-vermittelten RNA-Degradation eine Schlüsselfunktion bei der Austarierung der richtigen Transkriptmengen zukommen.

4.3.4 Die Exon 3-Sequenz enthält einen weiteren Silencer und zwei weitere Enhancer-Elemente

Sowohl die vom distalen SD3 unabhängige Aktivierung des SA3 (vergleichbar mit dem Exon 2), als auch die Nutzbarkeit des Spleißdonors im *env*-Expressionsvektor, hatten auf das Vorhandensein weiterer positiv-regulatorischer Elemente innerhalb

der Exon 3-Sequenz schließen lassen. Die abschnittsweise Untersuchung des gesamten Exons hatte lediglich zur Identifizierung von zwei schwachen Enhancern geführt, die separat zu keiner vergleichbar hohe Expression führten, wie die gesamte Exon 3-Sequenz bei mutiertem hnRNP-Bindungsmotiv (Abb. 27 B, vgl Spur 2 mit Spur 3 und 6).

Damit scheinen die beiden Enhancer im 5' und 3' Bereich der Exonsequenz synergistisch zu wirken und einen funktionellen Enhancer bilden zu können, der wahrscheinlich für die bereits oben beschriebene SD3-unabhängige Aktivierung des SA3 verantwortlich sein könnte. Die Beobachtung, dass sich mehrere regulative Elemente in Kombination verstärken können, stimmt mit den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen überein, die Vergleichbares sowohl für negative (16,32), als auch positive *cis*-regulatorische Elemente (66,117,196) zeigen konnten. Wenngleich es sich in den beschriebenen Fällen stets um identische Elemente handelte. Obwohl das hier beschriebenen Exon 3 zwei unterschiedliche Sequenzelemente beinhaltet, könnte es sich aufgrund der nahen Verwandtschaft der bindenden Proteine (beides SR-Proteine) trotzdem um einen vergleichbaren Mechanismus handeln.

Der zusätzlich im 3' Bereich identifizierte potentielle ASF/SF2-bindende Silencer ist nur dann von Bedeutung, wenn keine Interaktion zwischen den beiden Enhancer-Elementen zustande kommt. Die Funktion einer ASF/SF2-Bindungsstelle als Silencer innerhalb einer Exonsequenz ist bisher zwar nicht beschrieben, die Gruppe um Manley (427) konnte aber zeigen, dass durch die Depletion von ASF/SF2 das Spleißen bestimmter Transkripte ermöglicht wurde. Hierzu gehörte auch ein Zwei-Exon-Konstrukt mit dem *tat*-ORF. Ob die Inhibition durch Exon- oder Intron-gebundenes ASF/SF2 ausgelöst wurde, wurde jedoch nicht untersucht (427). Die durch Intron-gebundenes ASF/SF2 bedingte Spleißinhibition ist dagegen mehrfach untersucht. So konnte die Arbeitsgruppe um Akusjärvi beispielsweise zeigen, dass die Bindung von ASF/SF2 an eine bestimmte purinreiche Region im IIIa-Intron des Adenovirus L1-Transkriptes das Spleißen reprimiert. Die Insertion derselben Sequenz innerhalb eines Exons dagegen, führte zu einem verstärktem Spleißen (215). Diese Kontextabhängigkeit der Funktion konnte später auf ein Motiv innerhalb der RBD2 zurückgeführt werden, welches bei Bindung an die RNA zur RS-Domänen-unabhängigen Repression führte (110).

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass das Exon 3 bezüglich der Regulation der Spleißstellen komplex reguliert wird (Abb. 44). Neben der dominant-negativen Regu-

lation des Spleißdonors durch die Bindung von hnRNP A1, gibt es eine weitere positive Regulationsebene, die wahrscheinlich für die Aktivierung des Spleißakzeptors bei Anwesenheit des hnRNP-Bindungsmotivs verantwortlich ist.

Bezüglich der Vorhersageprogramme potentieller Enhancer-Sequenzen und der daran bindenden Proteine bedeuten die bisherigen Beobachtungen, dass zum Ersten nicht alle potentiellen Enhancer wirklich funktionell sein müssen (Abb. 42/45), zum Zweiten können funktionelle Proteinbindestellen von untergeordneter Bedeutung sein (Abb. 44) und als Letztes kann die Funktion eines gebundenen Proteins, abhängig vom Kontext, variieren. So wurde die reprimierende ASF/SF2-Bindungsstelle von drei Programmen als Enhancer klassifiziert. Auffallend bei allen drei Vorhersageprogrammen ist, dass innerhalb der Teilsequenz, die das hnRNP-Bindungsmotiv beinhaltet, wird von keinem Programm ein Enhancer

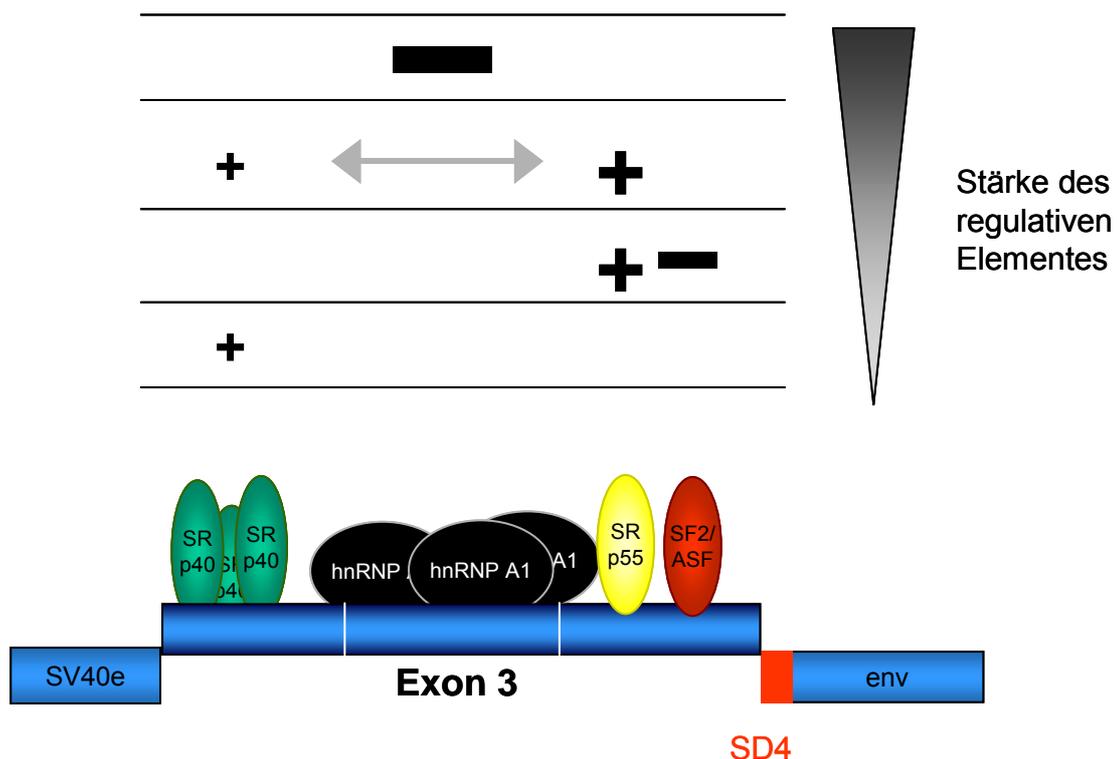


Abb. 44: Einfluss der cis-wirkenden, spleißregulierenden Elemente des Exons 3 auf den das Exon 3 begrenzenden Spleißdonor. Das stärkste regulatorische Element ist das hnRNP-Bindungsmotiv, welches mittig innerhalb der Exon-Sequenz liegt, negativ auf den Spleißdonor wirkt und wahrscheinlich in diesem Kontext hnRNP A1 bindet. Eine Mutation dieses Elementes führt zum Nachweis eines positiv regulierenden Elementes, das aus einer Kombination des sehr schwachen 5'-liegenden SRp40-Enhancers und der potentiellen SRp55-Bindungsstelle bestehen. Die potentielle ASF/SF2-Bindungsstelle in der 3'-Region des Exons wirkt als Silencer.

4.3.5 Die *cis*-wirkenden-Sequenzen im Exon 3 sind innerhalb der HIV-1 Subtypen konserviert

Trotz der im Vergleich zum Exon 2 deutlich höheren Varianz der Exon 3-Sequenz, ist das hnRNP-Bindungsmotiv, bzw. die drei hnRNP A1/D-Bindungsstellen, innerhalb der HIV-1 Subtypen hoch konserviert (95 %). Gleiches gilt auch für die vom Rescue-ESE postulierten Hexamer-Enhancer im 3'-Bereich der Exonsequenz und die durch Mutation bestätigte ASF/SF2-Bindungsstelle. Damit scheint das Exon 3 innerhalb der Subtypen eine gleichgeartete Regulation zu erfahren, wodurch in allen Fällen eine balancierte Expression von instabilen Exon 3 enthaltenden Transkripten und stabilen *vpr*-kodierenden Transkripten erzielt werden könnte.

4.4 Gegenseitige Beeinflussung der Leaderexons 2 und 3

Die Untersuchung der *cis*-regulatorischen Elemente im Leaderexon 3 hatte gezeigt, dass es eine gegenseitige Beeinflussung von Enhancern und Silencern geben kann, wenn diese innerhalb desselben Exons liegen. Um herauszufinden, ob dieser Effekt auch nach dem Zusammenspleißen zweier Exons auftreten kann, wurden die Leaderexons 2 und 3, so wie sie als Spleißintermediat auftreten könnte, als eine cDNA zusammengefügt (Abb. 30 A, Exon 23-Minigenkonstrukt; ds Exon 23).

4.4.1 Sowohl die *cis*-regulatorischen Elemente des Exons 2, als auch die des Exons 3 tragen zur Definition des mittleren Exons 2/3 bei

Der für das Exon 3 beobachtete additive Effekt der *cis*-regulatorischen Elemente, konnte auch im Exon 2/3-Minigenkonstrukt nachgewiesen werden und bezog nun auch die regulatorischen Elemente des Exons 2 mit ein (Abb. 46). Gezeigt wurde dies zum Einen durch die im Vergleich zum Exon 2-Minigenkonstrukt konstitutive Nutzung des SA2, trotz Anwesenheit eines Silencers im Exon, und zum Anderen führte die Mutation des ersten Heptamer-Motivs nicht zum Verlust der Exonerken- nung, sondern nur zu einem geringen Rückgang des Exoneinschlusses. Eine derart geringe Änderung im Spleißmuster nach einer Mutation ist nur dann plausibel, wenn weitere Elemente vorhanden sind, die den Verlust eines Enhancer-Elementes ausgleichen können. Dies spricht für einen modularen Aufbau von regulativen Elementen, der auch über die Exongrenze hinweg etabliert werden könnte. Dies

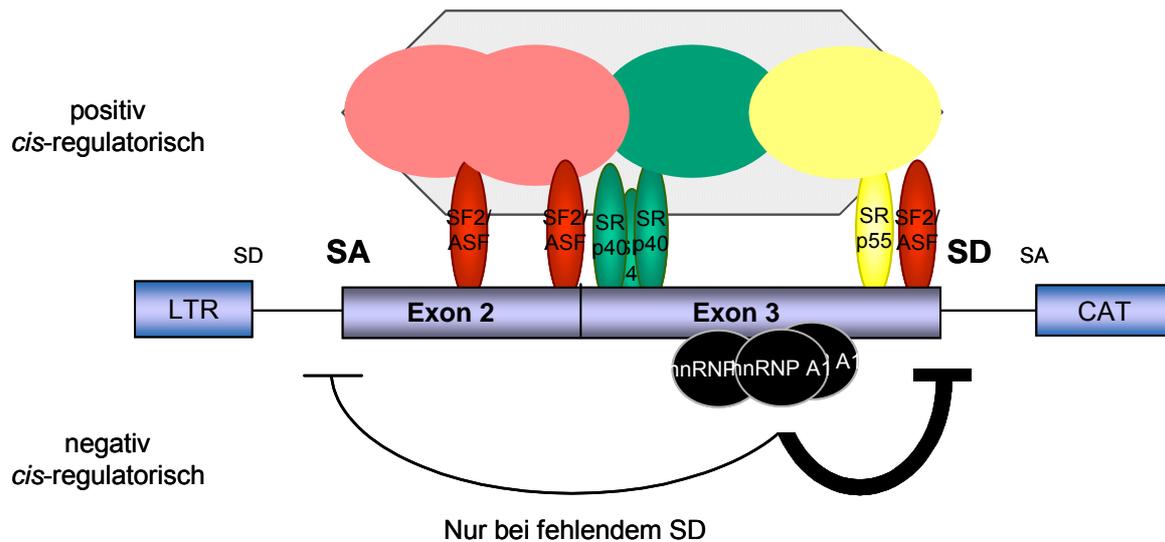


Abb. 46: Modell zum Einflussbereich der cis-regulatorischer Elemente der Exon 2/3-Sequenz im putativen Spleißintermediat. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Exon 2/3-Minigenkonstruktes und den bereits identifizierten cis-regulatorischen Elementen. Das hnRNP-Bindungsmotiv kann den 3'-wärts gelegenen Spleißdonor negativ beeinflussen, den weiter 5'-gelegenen Spleißakzeptor jedoch nur, wenn der SD3 deletiert wurde. Die positiv-regulatorischen Elemente der Exons 2 und 3 bilden ein additives Enhancer-Element, dass sowohl den Spleißakzeptor, als auch den Spleißdonor beeinflussen kann.

würde z. B. für die Spleißreihenfolge von entscheidender Bedeutung sein. Die frühe Entfernung eines mittleren Introns könnte demnach zur Generierung von additiv wirkenden Enhancer-Elementen führen, die wiederum für den Einschluss des neu entstandenen Doppel-Exons von Bedeutung sein könnten.

Die Zusammenführung der Exons 2 und 3 hatte neben dem positiven Einfluss auf den SA3 auch einen positiven Effekt auf die Nutzung des SD3. Der im heterologen Kontext (SV (leader) SD4 Δ vpuenv) dominant-negative Einfluss des hnRNP-Bindungsmotivs auf die Nutzung des SD3 wurde durch die zusätzliche Anwesenheit der Enhancer des Exons 2 abgeschwächt und zeigt damit, dass in einem Spleißintermediat ein negativ-wirkendes Element durch ein positiv-wirkendes Element eines Nachbarexons ausgeglichen werden kann. Da allerdings der SA2 konstitutiv genutzt wird, würde es nach dem Zusammenspleißen der Exons 2 und 3 in dem Intermediat lediglich zu einer Vermischung der Einflüsse von positiv- und negativ-wirkenden Elementen auf den SD3 kommen (Abb. 46). Während die Exon 3-Sequenz im hetero-

logen Kontext selber keine U1 snRNP Rekrutierung unterstützt, führt die zusätzliche Anwesenheit der Enhancer im Exon 2 zu einer U1 snRNP-vermittelten *env*-Expression (62,145,214), also einer Abschwächung des silencenden Effektes des hnRNP-Bindungsmotivs.

Für den SA2 kann nur dann ein negativer Effekt durch das hnRNP-Bindungsmotiv nachgewiesen werden, wenn zum Einen der SD3 deletiert wurde und zum Anderen das additive Enhancer-Element durch Mutation mindestens eines Enhancer abgeschwächt wurde.

Offensichtlich kommt es also zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Enhancern und Silencern nicht nur innerhalb des gleichen Exons, sondern auch zwischen verschiedenen Exons, wenn diese zusammengespleißt wurden und die regulativen Elemente weiterhin zugänglich sind. Für die Trennung solcher aktiver Sequenzelemente könnte z. B. der EJC von großer Bedeutung sein, da er aufgrund seiner Lage, ~25 Nt upstream der Exonjunction eine Barriere zwischen den *cis*-wirkenden spleiß-regulatorischen Elementen auf den beiden Exons bilden könnte.

Eine andere Möglichkeit *cis*-wirkende Sequenzen nach ihrer einmaligen Nutzung „stillzulegen“, bietet die Maskierung dieser Sequenz. Befindet sich noch ein Protein an der Bindungsstelle, welches eventuell nun inaktiv ist oder eine andere Funktion ausübt, könnte die Sequenz das Spleißen nicht erneut beeinflussen. Beschrieben ist ein solcher Fall für die SR-Proteine ASF/SF2 und 9G8. Beide binden in ihrem aktiven, phosphorylierten Zustand an Enhancer-Sequenzen und werden während des Spleißens dephosphoryliert. Dies führt jedoch nicht zu einer Dissoziation der Proteine von der RNA, sondern zur Änderung ihrer Funktion. Während der Enhancer während der weiteren Prozessierung inaktiv verbleibt, fördern die gebundenen Proteine den Kern-Export (193).

Die Kombination von Silencer- und Enhancer-Elementen zur Regulation derselben Spleißstelle ist weit verbreitet. Je nach Proteinzusammensetzung der Zelle, abhängig vom Zelltyp, dem physiologischen Zustand der Zelle oder der Differenzierungsstufe, kann unterschiedlich gespleißt werden, wodurch eine Anpassung der Proteinexpression an die aktuelle Umgebung erreicht wird. Einhergehend hiermit ist die große Anzahl von Genen mit alternativ gespleißten Exons zu erklären (60%). Ein Protein mit leicht veränderter Funktion muß demnach nicht in einem zweiten Gen kodiert sein, sondern enthält z. B. alternativ gespleißte Exons desselben Gens.

4.4.2 Die Intronisierung der Exon 2/3-Sequenz führte zum vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit gespleißter RNA

Zusätzlich zu der spleißunabhängigen RNA Degradation, die durch das Exon 3 vermittelt wird (~ 30 %, Abschnitt 3.3.2), konnte in dieser Arbeit auch eine RNA-Degradation nachgewiesen werden, die abhängig von der Intronlage der Exon 2/3-Sequenz auftrat (Abschnitt 3.4.5). Die Kombination beider RNA-Degradationen führte nach Intronisierung der Exon 2/3 Sequenz zum vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit gespleißter RNA im Kern und Cytoplasma. Die Notwendigkeit eines spleißbaren Kontextes zur Ausprägung der Degradation und die fehlende Akkumulation ungespleißter RNA lassen auf eine Störung des Spleißvorgangs mit nachfolgender RNA-Degradation schließen. Zurückzuführen war dieser Effekt auf die Kombination des hnRNP-Bindungsmotiv im Exon 3 mit den Heptamer-Enhancern des Exons 2 im Intron. Die ausschließliche Mutation eines Heptamer-Enhancers oder des hnRNP-Bindungsmotivs schwächten die Spleißinhibition ab, die gleichzeitige Mutation hob die RNA-Degradation sogar vollständig auf.

Obwohl die Kombination eines ASF/SF2-bindenden Enhancers und eines hnRNP A1-bindenden Silencers innerhalb von Exonsequenzen häufig auftritt (60,129,286,287,352,460), wurde bisher keine Spleißinhibition oder RNA-Degradation beobachtet. Die Auswirkungen der gleichzeitigen Bindung beider Proteine innerhalb einer Intronsequenz sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Für hnRNP A1 scheint die inhibierende Funktion auf das Spleißen unabhängig von der Lokalisation der Bindungsstelle zu sein (1.3.2, Die hnRNP-Familie), allerdings wurde bisher weder im Intron noch im Exon ein Einfluss auf die Stabilität beobachtet. Da hnRNP D jedoch eine identische Bindungssequenz besitzt und zudem destabilisierend wirkt, sollte in diesem Fall eine Bindung in Betracht gezogen werden. Damit würde nicht die Kombination von hnRNP A1 und ASF/SF2 die Spleißinhibition auslösen, sondern die Bindung von hnRNP D und ASF/SF2.

Die Bindung von hnRNP D könnte noch vor dem Spleißen die Stabilität, den cDNA-Daten folgend, um ungefähr 30 % reduzieren. Diese Schlussfolgerung ließ sich dadurch untermauern, dass nach der Mutation des hnRNP-Bindungsmotivs die Menge an ungespleißter Kern-RNA zunahm. Die Bindung von ASF/SF2 kann kontextabhängig zu einer Spleißinhibition führen, setzt aber eine mehrfache Bindung voraus (215), die hier prinzipiell durch die Kombination der beiden Exonsequenzen erreicht werden könnte (insgesamt 3 potentielle Bindungsstellen). Ebenso könnte

diese Mehrfachbindung zu einem destabilisierenden RNA Effekt führen (257), was aber aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche eher unwahrscheinlich erscheint. Wie die Bindung von hnRNP D zur Spleißinhibition beiträgt, ist zur Zeit noch unklar, jedoch führt die alleinige Mutation der ASF/SF2-Bindungsstelle nicht zur vollständigen Aufhebung der Spleißinhibition, sondern nur gemeinsam mit dem hnRNP-Bindungsmotiv.

Da es sich bei dem untersuchten Exon 2/3-Minigenkonstrukt um ein mögliches Spleißintermediat handelt, könnte die beobachtete Spleißinhibition in sofern sinnvoll sein, da hierdurch das Exon-Skipping schon zusammengespleißter Exons verhindert würde. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn die lineare Reihenfolge der Intronentfernung nicht gegeben ist. Bestimmte Kombinationen von gebundenen Proteinen könnten also eine Art Markierung bilden, die das Herausspleißen dieser Sequenz verhindert. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Maniatis, die zeigen konnten, dass die Bindung von SR-Proteinen an mehrere ESE-Sequenzen, das Entfernen dieser Sequenz aus dem Transkript verhindert (199).

4.5 Beeinflussung der Reihenfolge alternativer Spleißereignisse durch die identifizierten Silencer- und Enhancer-Elemente in den Leader-exons 2 und 3

Die Reihenfolge der Entfernung von Intronsequenzen wird im Wesentlichen von zwei Faktoren beeinflusst. Zum Einen ist die Stärke der beteiligten Spleißstellen von entscheidender Bedeutung und zum Anderen die Kopplung des Spleißens an die Transkription (232). Verknüpft sind beide Faktoren durch die Elongationsgeschwindigkeit der Pol II (84,348). Eine schnelle Transkription bringt bei nahe beieinander liegenden Spleißstellen die notwendigen Spleißfaktoren nahezu gleichzeitig zu mehreren Spleißstellen, deren Nutzung dann auf der jeweiligen intrinsischen Stärke beruht, während eine geringe Elongationsrate die Transkription und das Hinbringen von Spleißfaktoren zu den weiter distal liegenden Spleißstellen verzögert, so dass diese noch nicht genutzt werden können. Einhergehend hiermit gehen die meisten Spleißmodelle von einer übergeordneten 5'-3'-Reihenfolge der Intronentfernung aus (27,103,232,321,323,348), wobei jedoch innerhalb bestimmter Transkriptabschnitte

nicht immer ein sequenzielles Entfernen der Intronsequenzen beobachtet wurde (17,157,174,222,367,428).

Die in dieser Arbeit beobachtete Reihenfolge der Intronentfernung konnte sowohl für die *tat*-RNA des HIV-1 NL4.3, als auch für das klonierte Exon 2/3-Minigenkonstrukt als sequenziell beschreiben werden und entspricht damit, bei vollständig intakter Regulation und permissiven Zellen, dem gängigen Modell des co-transkriptionellen Spleißens.

Dass in bestimmten Transkriptabschnitten die Spleißreihenfolge durch die Stärke der Spleißstellen reguliert werden kann, konnte innerhalb dieser Arbeit durch die Mutation des hnRNP-Bindungsmotivs gezeigt werden. Die Mutation führte zu einem verstärkten Einschluss des Exons 3. Gleichzeitig zeigte die Analyse der Spleißreihenfolge eine deutlich verstärkte und in der Reihenfolge bevorzugte Nutzung des SA3. Das 5'-flankierende Intron des Exons 3 wurde vor allen anderen Introns entfernt. Damit wird auch die Spleißreihenfolge der HIV-1 Transkripte durch *trans*-wirkende Spleißfaktoren beeinflusst.

Eine Grundvoraussetzung hierfür ist jedoch die nahezu zeitgleiche Nutzbarkeit mehrerer Spleißstellen. Dies setzt aufgrund der Co-Transkriptionalität des Spleißens eine hohen Transkriptionsgeschwindigkeit voraus. Der Ein- bzw. Ausschluss von Exonsequenzen wird dann im Folgenden hauptsächlich durch die Stärke der einzelnen Spleißstellen reguliert. So bleibt der relative Einschluss des Exons 2 nahezu konstant, während der SA3 deutlich stärker auf den SD1 und den SD2 spleißt.

Die in dieser Arbeit bezüglich der Spleißreihenfolge gemachten Beobachtungen bilden ein Zwischenglied im Modell von Kornbliht (232), der als Grundvoraussetzung für das alternative Spleißen eine schwache und eine starke 3' Spleißstelle angibt (Abb. 47). Sind die Spleißstellen wie im hier verwendeten Minigenkonstrukt jedoch gleich stark, gibt es nach dem Modell nur die Option des konstitutiven Spleißens, was in diesem Fall nicht zutrifft. Durch die Veränderung der Spleißreihenfolge im Minigenkonstrukt konnte auf einen Mechanismus für das alternative Spleißen zurückgeschlossen werden, der eine hohe Elongationsrate und eine daraus resultierende Konkurrenz der 3' Spleißstellen voraussetzt. Es kann sowohl zum Exoneinschluss, als auch zum Exon-Skipping kommen.

Alternative Splicing

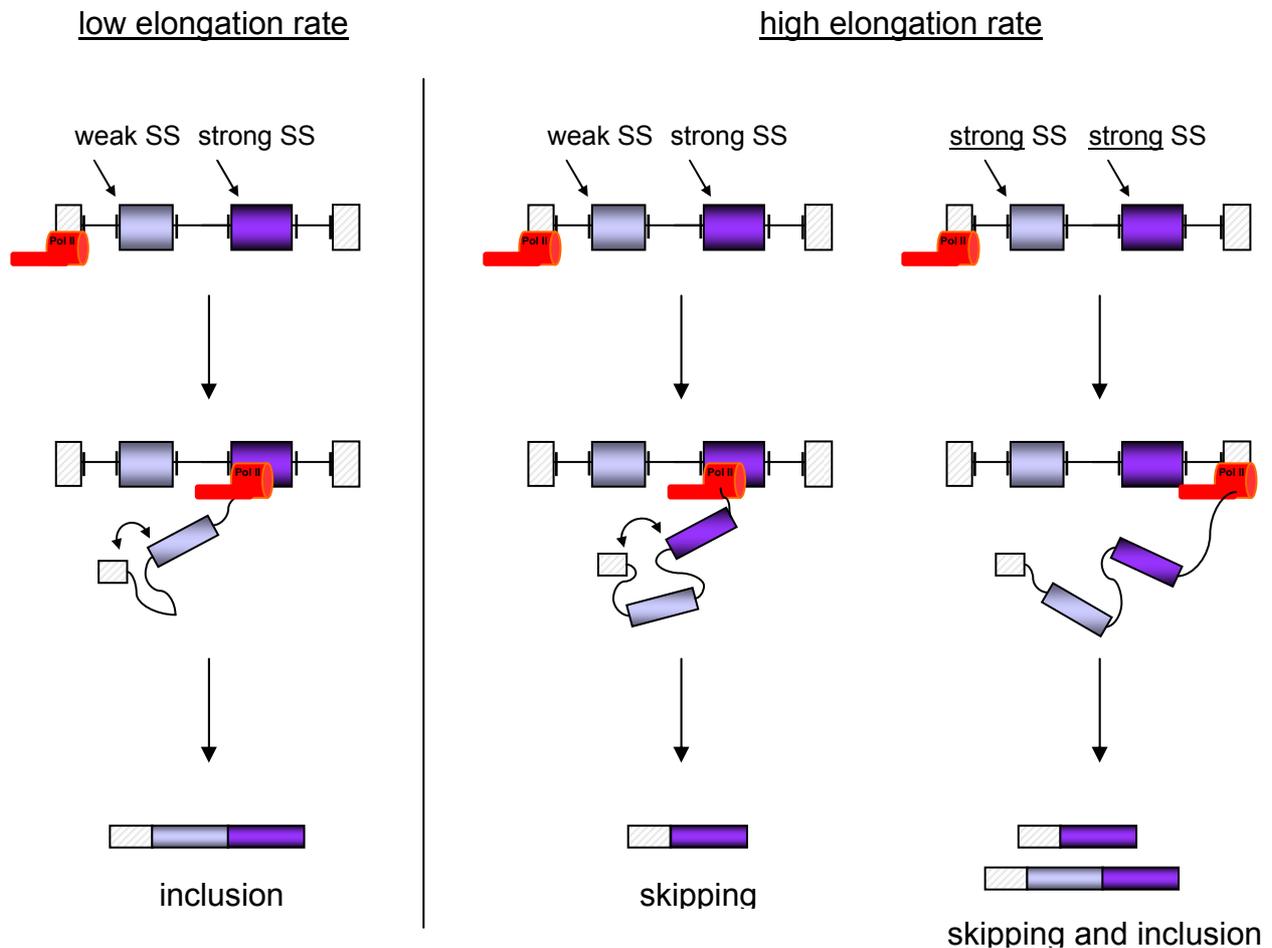


Abb. 47: Einfluss der RNA-Polymerase II Elongationsrate auf das alternative Spleißen. Ist die 3' Spleißstelle eines alternativen Exons schwächer als diejenige des downstream liegenden Exons, führt eine schnelle Elongation der Polymerase II zum Skippen des Exons (links), während eine langsame Elongationsrate zum Einschluss des alternativen Exons führt (rechts). Wird das fragliche Exon konstitutiv gespleißt, ist die Elongationsrate der Polymerase von untergeordneter Bedeutung (232). Das Auftreten etwa gleichstarker 3' Spleißstellen bei gleichzeitigem alternativen Spleißen und hoher Elongationsrate führt zu einer Konkurrenz der Spleißstellen und einen Exoneinschluss, der auf der Stärke der Spleißstellen beruht.

Die Abweichung der Entfernung eines Introns aus der vorgegebenen Spleißreihenfolge, ist ein auch in der Literatur beschriebenes Phänomen. Häufig sind Mutationen die dieses herbeiführen, Auslöser von Krankheiten. So konnte die Arbeitsgruppe um Attanasio (17) zeigen, dass die vier Introns des Fibrinogen-alpha-Gens in der Reihenfolge 3-2-4-1 entfernt werden. Eine häufige Mutation im Intron vier führt zur

Änderung dieser Reihenfolge und zur Ausprägung der Afibrinogenemia. Zwei Beispiele, bei denen ebenso wie im hier untersuchten Beispiel, ein Intron bevorzugt gespleißt wird, sind das β -Globin Intron 2 (18) und das Intron 17 des Cytoskeletale Proteins 4.1R (157).

Neben der Bevorzugung eines Spleißereignisses gibt es auch die Notwendigkeit definierte Spleißereignisse erst zu einem späteren Zeitpunkt auszuführen. So kann durch die verzögerte Entfernung ein zeitliches Fenster entstehen, welches z. B. zur Redefinition von Spleißstellen (184) oder dem Editing von RNA-Sequenzen (219) genutzt werden kann.

Für den Replikationszyklus von HIV-1 ist die Regulation der alternativen Spleißprozesse essenziell. Ein Verständnis der Mechanismen und die Kenntnis der zellulären Faktoren, welche an der Regulation der viralen mRNA Prozessierung beteiligt sind, könnten daher genutzt werden, um in diese Regulationsmechanismen einzugreifen. Die in dieser Arbeit vorgestellten cis-wirkenden Sequenzelemente stellen aufgrund ihrer Konservierung in den HIV-1 Unterstämmen ein mögliches Ziel in der Entwicklung neuer antiretroviraler Wirkstoffe dar. So konnte im Exon 2 eine Mutation identifiziert werden, die zum Skippen der Sequenz führte, was sich im infektiösen Virus durch den Verlust des Transkriptes für Vif-Proteins widerspiegeln könnte. Die Inaktivierung eines negativen Elementes im Exon 3 führte zum verstärkten Einschluss eines destabilisierenden Elementes, wodurch die Gesamt-RNA-Menge des Virus beeinflusst würde. Für beide Sequenzen wäre eine spezifische Blockierung der Bindungsstellen denkbar. Die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden sowohl ohne (74,130,378) als auch mit Modifizierung (146,240,458) oder Kopplung von Proteindomänen (69,77) erscheint hierbei eine vielversprechende Technik zur Umsetzung dieser Inhibition.

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 (69,77).

5 Zusammenfassung

Die Konservierung der HIV-1 Spleißstellen der Exons 2 und 3 innerhalb der verschiedenen HIV-1 Isolate und die Häufigkeit des Auftretens der nicht-kodierenden HIV-1 Leaderexons in der frühen Infektionsphase, lässt eine regulatorische Funktion dieser Exons bei der viralen Genexpression als wahrscheinlich erscheinen.

Das Exon 2 wird von intrinsisch schwachen Spleißstellen flankiert, die nur durch die Anwesenheit von zwei, innerhalb der Exonsequenz liegenden, Heptamer-Sequenzen genutzt werden konnten. Diese als bidirektionale Enhancer wirkenden Sequenzen banden *in vitro* ASF/SF2 und traten innerhalb aller Genotypen des HIV-1 M-Subtyps auf. Da auch im SIV Exon 2 dieses Motiv zweimal identifiziert werden konnten, das im Vergleich zur Position im HIV-1 Exon 2 lediglich um -2 Nt verschoben war, kann ein spezieübergreifender Regulationsmechanismus vermutet werden. Im Gegensatz zu dieser rein positiven Spleißstellen-Regulation, unterliegen die Spleißstellen des HIV-1 Exon 3 einer komplexeren Regulation. Während die neu identifizierten schwächeren *cis*-wirkenden Elemente anscheinend kontextunabhängig die Spleißstellen-Regulation beeinflussten, konnte für den dominanten Silencer eine Abhängigkeit von der Nutzbarkeit beider flankierenden Spleißstellen gezeigt werden. Die Verwendung beider oder keiner Spleißstelle führte zur Degradation der Transkripte während die anderen untersuchten Spleißkontexte eine negative Regulation der Spleißstellen-Nutzung zeigten.

Sowohl innerhalb der Exon 3-Sequenz, als auch nach Zusammenfügung der Exonsequenzen 2 und 3 als cDNA, konnte eine gegenseitige Beeinflussung der *cis*-wirkenden Elemente nachgewiesen werden. Im Fall der Exon 2/3-Sequenz entstand ein neues exonübergreifendes Enhancer-Element, welches die Funktion des Silencers aufhob. Hierbei könnte es sich um einen Mechanismus handeln, der z. B. die Spleißreihenfolge beeinflusst. Das Zusammenspleißen von Exonsequenzen führt zur Entstehung neuer *cis*-wirkender Elemente, wodurch darauf folgende Spleißereignisse verändert bzw. ermöglicht werden. Die Untersuchung der Reihenfolge der Intronentfernung innerhalb einer *tat*-RNA mit beiden Leaderexons, ergab eine sequentielle Entfernung der Introns, die jedoch wahrscheinlich von der intrazellulären Proteinkonzentration abhängt. Die Nutzung der Enhancer-Sequenzen im Exon 3, hervorgerufen durch eine Mutation des Silencers, führte zum konstitutiven Herausspleißen des Introns 2 als initiales Spleißereignis. Für die hierdurch entstandene Exonkombination konnte ebenfalls eine konstitutive Nutzung des 5'-wärts gelegenen Spleißakzeptors gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abovich, N. and M. Rosbash.** 1997. Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* **89**:403-412.
2. **Aebi, M. and C. Weissmann.** 1987. Precision and Orderliness in Splicing. *Trends in Genetics* **3**:102-107.
3. **Afonina, E., M. Neumann, and G. N. Pavlakis.** 1997. Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J.Biol.Chem.* **272**:2307-2311.
4. **Afonina, E., R. Stauber, and G. N. Pavlakis.** 1998. The human Poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J.Biol.Chem.* **273**:13015-13021.
5. **Akahane, K. and D. H. Pluznik.** 1992. Interleukin-4 inhibits interleukin-1 alpha-induced granulocyte- macrophage colony-stimulating factor gene expression in a murine B- lymphocyte cell line via downregulation of RNA precursor. *Blood* **79**:3188.
6. **Alam, J. and J. L. Cook.** 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal.Biochem.* **188**:245-254.
7. **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.
8. **Allmang, C., J. Kufel, G. Chanfreau, P. Mitchell, E. Petfalski, and D. Tollervey.** 1999. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**:5399-5410.
9. **Allmang, C., P. Mitchell, E. Petfalski, and D. Tollervey.** 2000. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucl.Acids.Res.* **28**:1684-1691.
10. **Allmang, C., E. Petfalski, A. Podtelejnikov, M. Mann, D. Tollervey, and P. Mitchell.** 1999. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**:2148-2158.
11. **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.
12. **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.
13. **Arien, K. K., A. Abraha, M. E. Quinones-Mateu, L. Kestens, G. Vanham, and E. J. Arts.** 2005. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *Journal of Virology* **79**:8979-8990.
14. **Arning, S., P. Gruter, G. Bilbe, and A. Kramer.** 1996. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *Rna-A Publication of the Rna Society* **2**:794-810.
15. **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.
16. **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-A Publication of the Rna Society* **3**:996-1015.

17. **Attanasio, C., A. David, and M. Neerman-Arbez.** 2003. Outcome of donor splice site mutations accounting for congenital afibrinogenemia reflects order of intron removal in the fibrinogen alpha gene (FGA). *Blood* **101**:1851-1856.
18. **Audibert, A., D. Weil, and F. Dautry.** 2002. In vivo kinetics of mRNA splicing and transport in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* **22**:6706-6718.
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. **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.
21. **Bandres, J. C., Q. F. Wang, J. O'Leary, F. Baleaux, A. Amara, J. A. Hoxie, S. Zolla-Pazner, and M. K. Gorny.** 1998. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation [In Process Citation]. *J.Virol.* **72**:2500-2504.
22. **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-A Publication of the Rna Society* **10**:240-253.
23. **Barnard, D. C. and J. G. Patton.** 2000. Identification and characterization of a novel serine-arginine-rich splicing regulatory protein. *Mol.Cell Biol.* **20**:3049-3057.
24. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 2004. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev.Invest Clin.* **56**:126-129.
25. **Bennett, M., S. Michaud, J. Kingston, and R. Reed.** 1992. Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev.* **6**:1986-2000.
26. **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.
27. **Bentley, D.** 1999. Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:347-351.
28. **Berget, S. M.** 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J.Biol.Chem.* **270**:2411-2414.
29. **Berglund, J. A., N. Abovich, and M. Rosbash.** 1998. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes & Development* **12**:858-867.
30. **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.
31. **Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang.** 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**:273-282.
32. **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.
33. **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.

34. **Birckbichler, P. J. and I. F. Pryme.** 1973. Fractionation of membrane-bound polysomes, free polysomes, and nuclei from tissue-cultured cells. *Eur.J.Biochem.* **33**:368-373.
35. **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.
36. **Black, A. C., J. Luo, S. Chun, A. Bakker, J. K. Fraser, and J. D. Rosenblatt.** 1996. Specific binding of polypyrimidine tract binding protein and hnRNP A1 to HIV-1 CRS elements. *Virus Genes* **12**:275-285.
37. **Black, A. C., J. Luo, C. Watanabe, S. Chun, A. Bakker, J. K. Fraser, J. P. Morgan, and J. D. Rosenblatt.** 1995. Polypyrimidine Tract-Binding Protein and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Bind to Human T-Cell Leukemia-Virus Type-2 Rna Regulatory Elements. *Journal of Virology* **69**:6852-6858.
38. **Blackburn, E. H.** 1991. Structure and Function of Telomeres. *Nature* **350**:569-573.
39. **Blackshear, P. J.** 2002. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem.Soc.Trans.* **30**:945-952.
40. **Blanchette, M. and B. Chabot.** 1997. A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *Rna-A Publication of the Rna Society* **3**:405-419.
41. **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.
42. **Blencowe, B. J.** 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem.Sci.* **25**:106-110.
43. **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.
44. **Boeck, R., S. Tarun, Jr., M. Rieger, J. A. Deardorff, S. Muller-Auer, and A. B. Sachs.** 1996. The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J.Biol.Chem.* **271**:432-438.
45. **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 B. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**:463-468.
46. **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.
47. **Bousquet-Antonelli, C., C. Presutti, and D. Tollervey.** 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**:765-775.
48. **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.
49. **Brennan, C. M. and J. A. Steitz.** 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol.Life Sci.* **58**:266-277.
50. **Brewer, B. Y., J. Malicka, P. J. Blackshear, and G. M. Wilson.** 2004. RNA sequence elements required for high affinity binding by the zinc finger domain of tristetraprolin - Conformational changes coupled to the bipartite nature of AU-rich mRNA-destabilizing motifs. *J.Biol.Chem.* **279**:27870-27877.

51. **Brewer, G.** 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol.Cell Biol.* **11**:2460-2466.
52. **Brown, C. E., S. Z. Tarun, Jr., R. Boeck, and A. B. Sachs.** 1996. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:5744-5753.
53. **Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**:2525-2529.
54. **Buratti, E. and F. E. Baralle.** 2005. Another step forward for SELEXive splicing. *Trends in Molecular Medicine* **11**:5-9.
55. **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.
56. **Burge, C. B., R. A. Padgett, and P. A. Sharp.** 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol.Cell* **2**:773-785.
57. **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 (ed.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
58. **Buvoli, M., F. Cobianchi, and S. Riva.** 1992. Interaction of Hnmp-A1 with Snrnps and Pre-Messenger-Rnas - Evidence for A Possible Role of A1-Rna Annealing Activity in the 1St Steps of Spliceosome Assembly. *Nucl.Acids.Res.* **20**:5017-5025.
59. **Caceres, J. F., T. Misteli, G. R. Screaton, 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.
60. **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.
61. **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.
62. **Caputi, M., M. Freund, S. Kammler, C. Asang, and H. Schaal.** 2004. A bidirectional SF2/ASF, SRp40 dependent splicing enhancer regulates HIV-1 rev, env, vpu and nef gene expression. *J.Virol.* **in press**.
63. **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.
64. **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.
65. **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.
66. **Carlo, T., R. Sierra, and S. M. Berget.** 2000. A 5' splice site-proximal enhancer binds SF1 and activates exon bridging of a microexon. *Mol.Cell Biol.* **20**:3988-3995.
67. **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.
68. **Carstens, R. P., W. L. McKeehan, and M. A. Garcia-Blanco.** 1998. An intronic sequence element mediates both activation and repression of rat fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA splicing. *Mol.Cell Biol.* **18**:2205-2217.

69. **Cartegni, L. and A. R. Krainer.** 2003. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat.Struct.Biol.* **10**:120-125.
70. **Cartegni, L., M. Maconi, E. Morandi, F. Cobianchi, S. Riva, and G. Biamonti.** 1996. hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* **259**:337-348.
71. **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.
72. Cartegni, L., Z. Zhu, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer. ESEfinder web interface (1.2), <http://exon.cshl.edu/ESE/>. 2003.
73. **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.
74. **Celotto, A. M. and B. R. Graveley.** 2002. Exon-specific RNAi: A tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *Rna-A Publication of the Rna Society* **8**:718-724.
75. **Chabot, B., M. Blanchette, I. Lapierre, and H. LaBranche.** 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.
76. **Chan, R. C. 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.
77. **Chao, H. J., S. G. Mansfield, R. C. Bartel, S. Hiriyan, L. G. Mitchell, M. Garcia-Blanco, and C. E. Walsh.** 2003. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nature Medicine* **9**:1015-1019.
78. **Chapman, B. S., R. M. Thayer, K. A. Vincent, and N. L. Haigwood.** 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic.Acids.Res.* **19**:3979-3986.
79. **Charlet, B., P. Logan, G. Singh, and T. A. Cooper.** 2002. Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Molecular Cell* **9**:649-658.
80. **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.
81. **Chen, C. Y., R. Gherzi, S. E. Ong, E. L. Chan, R. Raijmakers, G. J. Pruijn, G. Stoecklin, C. Moroni, M. Mann, and M. Karin.** 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**:451-464.
82. **Chen, C. Y., N. Xu, and A. B. Shyu.** 1995. mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol.Cell.Biol.* **15**:5777-5788.
83. **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.
84. **Chen, Y., D. Chafin, D. H. Price, and A. L. Greenleaf.** 1996. Drosophila RNA polymerase II mutants that affect transcription elongation. *J.Biol.Chem.* **271**:5993-5999.
85. **Chiu, I. M., A. Yaniv, J. E. Dahlberg, A. Gazit, S. F. Skuntz, S. R. Tronick, and S. A. Aaronson.** 1985. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* **317**:366-368.

86. **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.
87. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
88. **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.
89. **Chou, M. Y., J. G. Underwood, J. Nikolic, M. H. T. 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. *Molecular Cell* **5**:949-957.
90. **Chrusciel, R. A. and J. W. Strohbach.** 2004. Non-peptidic HIV protease inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **4**:1097-1114.
91. **Chun, R. F. and K. T. Jeang.** 1996. Requirements for RNA polymerase II carboxyl-terminal domain for activated transcription of human retroviruses human T-cell lymphotropic virus I and HIV-1. *J.Biol.Chem.* **271**:27888-27894.
92. **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.
93. **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.
94. **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.
95. **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.
96. **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.
97. **Cohen, R. B., T. R. Boal, and B. Safer.** 1990. Increased eIF-2 alpha expression in mitogen-activated primary T lymphocytes. *EMBO J.* **9**:3831.
98. **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.
99. **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.
100. **Cote, C. A., D. Gautreau, J. M. Denegre, T. L. Kress, N. A. Terry, and K. L. Mowry.** 1999. A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Molecular Cell* **4**:431-437.
101. **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.

102. **Craigie, R.** 2001. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J.Biol.Chem.* **276**:23213-23216.
103. **Cramer, P., A. Srebrow, S. Kadener, S. Werbach, M. M. de la, G. Melen, G. Nogues, and A. R. Kornblihtt.** 2001. Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett.* **498**:179-182.
104. **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.
105. **Cullen, B. R.** 2000. Nuclear RNA export pathways. *Mol.Cell Biol.* **20**:4181-4187.
106. **Cullen, B. R.** 2001. Journey to the center of the cell. *Cell* **105**:697-700.
107. **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.
108. **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.
109. **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.
110. **Dauksaite, V. and G. Akusjarvi.** 2002. Human splicing factor ASF/SF2 encodes for a repressor domain required for its inhibitory activity on pre-mRNA splicing. *J.Biol.Chem.* **277**:12579-12586.
111. **Davis, M., A. Hatzubai, J. S. Andersen, E. Ben Shushan, G. Z. Fisher, A. Yaron, A. Bauskin, F. Mercurio, M. Mann, and Y. Ben Neriah.** 2002. Pseudosubstrate regulation of the SCF beta-TrCP ubiquitin ligase by hnRNP-U. *Genes & Development* **16**:439-451.
112. **Dehlin, E., M. Wormington, C. G. Korner, and E. Wahle.** 2000. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* **19**:1079-1086.
113. **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.
114. **DeMaria, C. T. and G. Brewer.** 1996. AUF1 Binding Affinity to A+U-rich Elements Correlates with Rapid mRNA Degradation. *J.Biol.Chem.* **271**:12179.
115. **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.
116. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmor, 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.
117. **Dirksen, W. P., X. Li, A. Mayeda, A. R. Krainer, and F. M. Rottman.** 2000. Mapping the SF2/ASF binding sites in the bovine growth hormone exonic splicing enhancer. *J.Biol.Chem.* **275**:29170-29177.

118. **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.
119. **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.
120. **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.
121. **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.
122. **Duncan, P. I., D. F. Stojdl, R. M. Marius, K. H. Scheit, and J. C. Bell.** 1998. The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Experimental Cell Research* **241**:300-308.
123. **Dunckley, T. and R. Parker.** 1999. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* **18**:5411-5422.
124. **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.
125. **El Meskini, R., F. Boudouresque, and L. Ouafik.** 1997. Estrogen regulation of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase messenger ribonucleic acid levels by a nuclear post-transcriptional event. *Endocrinology* **138**:5256-5265.
126. **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.
127. **Emerman, M. and M. H. Malim.** 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**:1880-1884.
128. **Englmeier, L., J. C. Olivo, and I. W. Mattaj.** 1999. Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr.Biol.* **9**:30-41.
129. **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.
130. **Epstein, P. M.** 1998. Antisense inhibition of phosphodiesterase expression. *Methods* **14**:21-33.
131. **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.
132. **Eversole, A. and N. Maizels.** 2000. In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol.Cell.Biol.* **20**:5425-5432.
133. **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.
134. **Fairbrother, W. G., R. F. Yeh, P. A. Sharp, and C. B. Burge.** 2002. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**:1007-1013.

135. **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. *Nucl.Acids.Res.* **32**:W187-W190.
136. **Felber, B. K., C. M. Drysdale, and G. N. Pavlakis.** 1990. Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J.Virol.* **64**:3734-3741.
137. **Fernandez-Patron, C., L. Castellanos-Serra, and P. Rodriguez.** 1992. Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *Biotechniques* **12**:564-573.
138. **Ferreras, M., J. G. Gavilanes, and J. M. Garcia-Segura.** 1993. A permanent Zn²⁺ reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* **213**:206-212.
139. **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.
140. **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.
141. **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.
142. **Fouchier, R. A. and M. H. Malim.** 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv.Virus Res.* **52**:275-299.
143. **Frankel, A. D.** 1992. Activation of HIV transcription by Tat. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **2**:293-298.
144. **Frankel, A. D. and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:1-25:1-25.
145. **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.
146. **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.
147. **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.
148. **Fuentes-Panana, E. M., R. S. Peng, G. Brewer, J. Tan, and P. D. Ling.** 2000. Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *Journal of Virology* **74**:8166-8175.
149. **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.
150. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.

151. **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.
152. **Gao, M., D. T. Fritz, L. P. Ford, and J. Wilusz.** 2000. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol.Cell* **5**:479-488.
153. **Garber, M. E., T. P. Mayall, E. M. Suess, J. Meisenhelder, N. E. Thompson, and K. A. Jones.** 2000. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol.Cell Biol.* **20**:6958-6969.
154. **Gatfield, D., H. Le Hir, C. Schmitt, I. C. Braun, T. Kocher, M. Wilm, and E. Izaurralde.** 2001. The DEXH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr.Biol.* **11**:1716-1721.
155. **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.
156. **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.
157. **Gee, S. L., K. Aoyagi, R. Lersch, V. Hou, M. Wu, and J. G. Conboy.** 2000. Alternative splicing of protein 4.1R exon 16: ordered excision of flanking introns ensures proper splice site choice. *Blood* **95**:692-699.
158. **Gil, A., P. A. Sharp, S. F. Jamison, and M. A. Garciablanco.** 1991. Characterization of Cdnas Encoding the Polypyrimidine Tract-Binding Protein. *Genes & Development* **5**:1224-1236.
159. **Gilbert, E., F. Delgatto, P. Championarnaud, 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 Premessenger Rna. *Mol.Cell.Biol.* **13**:5461-5468.
160. **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.
161. **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.
162. **Gooding, C., G. C. Roberts, and C. W. J. Smith.** 1998. Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *Rna-A Publication of the Rna Society* **4**:85-100.
163. **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.
164. **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.
165. **Graveley, B. R.** 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* **6**:1197-1211.
166. **Graveley, B. R.** 2002. Sex, AGility, and the regulation of alternative splicing. *Cell* **109**:409-412.
167. **Graveley, B. R.** 2004. A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome. *Molecular Cell* **13**:302-304.

168. **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.
169. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 1999. SR proteins are 'locators' of the RNA splicing machinery. *Curr.Biol.* **9**:R6-R7.
170. **Graveley, B. R., K. J. Hertel, and T. Maniatis.** 2001. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA* **7**:806-818.
171. **Gross, T., K. Richert, C. Mierke, M. Lutzelberger, and N. F. Kaufer.** 1998. Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **26**:505-511.
172. **Grossman, J. S., M. I. Meyer, Y. C. Wang, G. J. Mulligan, R. Kobayashi, and D. M. Helfman.** 1998. The use of antibodies to the polypyrimidine tract binding protein (PTB) to analyze the protein components that assemble on alternatively spliced pre-mRNAs that use distant branch points. *Rna-A Publication of the Rna Society* **4**:613-625.
173. **Gruss, P., C. J. Lai, R. Dhar, and G. Houry.** 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.
174. **Gudas, J. M., G. B. Knight, and A. B. Pardee.** 1990. Ordered Splicing of Thymidine Kinase Pre-Messenger-Rna During the S-Phase of the Cell-Cycle. *Mol.Cell.Biol.* **10**:5591-5595.
175. **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.
176. **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.
177. **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.
178. **Hamer, D. H. and P. Leder.** 1979. Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**:1299-1302.
179. **Hamm, J. and A. I. Lamond.** 1998. Spliceosome assembly: the unwinding role of DEAD-box proteins. *Curr.Biol.* **8**:R532-R534.
180. **Hamm, J. and I. W. Mattaj.** 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* **63**:109-118.
181. **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.
182. **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.
183. **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. *Nucl.Acids.Res.* **30**:1083-1090.
184. **Hatton, A. R., V. Subramaniam, and A. J. Lopez.** 1998. Generation of alternative Ultrabithorax isoforms and stepwise removal of a large intron by resplicing at exon-exon junctions. *Mol.Cell* **2**:787-796.
185. **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.

186. **Hauber, J., M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J.Virol.* **63**:1181-1187.
187. **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.
188. **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.
189. **Hipp, M.** Untersuchung des Einflusses alternativ gespleißter HIV-1 Leader-Sequenzen auf die Genexpression. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2000.
190. **Hong, W., M. Bennett, Y. Xiao, K. R. Feld, C. Wang, and R. Reed.** 1997. Association of U2 snRNP with the spliceosomal complex E. *Nucleic Acids Res.* **25**:354-361.
191. **Hope, T. J.** 1999. The ins and outs of HIV Rev. *Arch.Biochem.Biophys.* **365**:186-191.
192. **Hopper, A. K., L. D. Schultz, and R. A. Shapiro.** 1980. Processing of Intervening Sequences - New Yeast Mutant Which Fails to Excise Intervening Sequences from Precursor Transfer-Rnas. *Cell* **19**:741-751.
193. **Huang, Y. Q., T. A. Yario, and J. A. Steitz.** 2004. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:9666-9670.
194. **Hui, J. Y., L. H. Hung, M. Heiner, S. Schreiner, N. Neumuller, G. Reither, S. A. Haas, and A. Bindereif.** 2005. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *Embo Journal* **24**:1988-1998.
195. **Hui, J. Y., G. Reither, and A. Bindereif.** 2003. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *Rna-A Publication of the Rna Society* **9**:931-936.
196. **Humphrey, M. B., J. Bryan, T. A. Cooper, and S. M. Berget.** 1995. A 32-nucleotide exon-splicing enhancer regulates usage of competing 5' splice sites in a differential internal exon. *Mol.Cell Biol.* **15**:3979-3988.
197. **Hunt, S. L., J. J. Hsuan, N. Totty, and R. J. Jackson.** 1999. unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes & Development* **13**:437-448.
198. **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.
199. **Ibrahim, E. C., T. D. Schaal, K. J. Hertel, R. Reed, and T. Maniatis.** 2005. Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:5002-5007.
200. **Ishikawa, F., M. J. Matunis, G. Dreyfuss, and T. R. Cech.** 1993. Nuclear Proteins That Bind the Premessenger Rna 3' Splice-Site Sequence R(Uuag/G) and the Human Telomeric Dna-Sequence D(Ttaggg)N. *Mol.Cell.Biol.* **13**:4301-4310.
201. **Izaurrealde, E. and S. Adam.** 1998. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Rna-A Publication of the Rna Society* **4**:351-364.
202. **Izaurrealde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I. W. Mattaj, G. Dreyfuss, and U. Fischer.** 1997. A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J.Cell Biol.* **137**:27-35.

203. **Jacobs, J. S., A. R. Anderson, and R. P. Parker.** 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**:1497-1506.
204. **Jacquetet, 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.* **276**:40464-40475.
205. **Jamison, S. F., Z. Pasman, J. Wang, C. Will, R. Luhrmann, J. L. Manley, and M. A. Garcia-Blanco.** 1995. U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic Acids Res.* **23**:3260-3267.
206. **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.
207. **Jeang, K. T., H. Xiao, and E. A. Rich.** 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J.Biol.Chem.* **274**:28837-28840.
208. **Jensen, T. H., J. Boulay, M. Rosbash, and D. Libri.** 2001. The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Current Biology* **11**:1711-1715.
209. **Jones, K. A., J. T. Kadonaga, P. A. Luciw, and R. Tjian.** 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**:755-759.
210. **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.
211. **Jurica, M. S., L. J. Licklider, S. P. Gygi, N. Grigorieff, and M. J. Moore.** 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *Rna-A Publication of the Rna Society* **8**:426-439.
212. **Kaminski, A., S. L. Hunt, J. G. Patton, and R. J. Jackson.** 1995. Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA* **1**:924-938.
213. **Kammler, S.** 2004. Der Einfluss von Spleißstellen auf die Rev-abhängige HIV-1 *env*-Expression
Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
214. **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.
215. **Kanopka, A., O. Muhlemann, and G. Akusjarvi.** 1996. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**:535-538.
216. **Kataoka, N., J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss.** 1999. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *Journal of Cell Biology* **145**:1145-1152.
217. **Kataoka, N. and G. Dreyfuss.** 2004. A simple whole cell lysate system for in vitro splicing reveals a stepwise assembly of the exon-exon junction complex. *J.Biol.Chem.* **279**:7009-7013.
218. **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.
219. **Keegan, L. P., A. Gallo, and M. A. O'Connell.** 2001. The many roles of an RNA editor. *Nature Reviews Genetics* **2**:869-878.

220. **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.
221. **Kent, O. A., D. B. Ritchie, and A. M. MacMillan.** 2005. Characterization of a U2AF-independent commitment complex (E') in the mammalian spliceosome assembly pathway. *Mol.Cell.Biol.* **25**:233-240.
222. **Kessler, O., Y. Jiang, and L. A. Chasin.** 1993. Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. *Mol.Cell Biol.* **13**:6211-6222.
223. **Kiledjian, M., C. T. DeMaria, G. Brewer, and K. Novick.** 1997. Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol.Cell Biol.* **17**:4870-4876.
224. **Kim, V. N., N. Kataoka, and G. Dreyfuss.** 2001. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* **293**:1832-1836.
225. **Kim, V. N., J. Yong, N. Kataoka, L. Abel, M. D. Diem, and G. Dreyfuss.** 2001. The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J.* **20**:2062-2068.
226. **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.
227. **Klaver, B. and B. Berkhout.** 1994. Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J.Virol.* **68**:3830-3840.
228. **Kobor, M. S. and J. Greenblatt.** 2002. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim.Biophys.Acta* **1577**:261-275.
229. **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.
230. **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.
231. **Korber, B. T. M., G. Learn, J. I. Mullins, B. H. Hahn, and S. Wolinsky.** 1995. Protecting Hiv Databases. *Nature* **378**:242-243.
232. **Kornblihtt, A. R., M. De la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz, and G. Nogues.** 2004. Multiple links between transcription and splicing. *Rna-A Publication of the Rna Society* **10**:1489-1498.
233. **Korner, C. G. and E. Wahle.** 1997. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J.Biol.Chem.* **272**:10448-10456.
234. **Kotsopoulou, E., V. N. Kim, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman, and K. A. Mitrophanous.** 2000. A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Based Vector That Exploits a Codon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene. *J.Virol.* **74**:4839-4852.
235. **Kramer, A.** 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu.Rev.Biochem.* **65**:367-409:367-409.
236. **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.
237. **Krecic, A. M. and M. S. Swanson.** 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:363-371.

238. **Krummheuer, J.** Der Einfluss unterschiedlicher Leadersequenzen auf die HIV-1 Genexpression. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2004.
239. **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.
240. **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.
241. **LaGrandeur, T. E. and R. Parker.** 1998. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* **17**:1487-1496.
242. **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.
243. **Lai, M. C., R. I. Lin, and W. Y. Tarn.** 2001. Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:10154-10159.
244. **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.
245. **Lai, W. S., E. A. Kennington, and P. J. Blackshear.** 2003. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol.Cell.Biol.* **23**:3798-3812.
246. **Lai, W. S., E. Carballo, J. R. Strum, E. A. Kennington, R. S. Phillips, and P. J. Blackshear.** 1999. Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Mol.Cell.Biol.* **19**:4311-4323.
247. **Lam, B. J. and K. J. Hertel.** 2002. A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA.* **8**:1233-1241.
248. **Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, 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, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. M. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Y. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Z. 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. Q. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R.**

- Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, 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. R. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. H. 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. R. Schultz, G. Slater, A. F. A. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, 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, and M. J. Morgan. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921.
249. **Laroia, G., R. Cuesta, G. Brewer, and R. J. Schneider.** 1999. Control of mRNA Decay by Heat Shock-Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Science* **284**:499-502.
250. **Laroia, G., B. Sarkar, and R. J. Schneider.** 2002. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *PNAS* **99**:1842-1846.
251. **Laroia, G. and R. J. Schneider.** 2002. Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucl.Acids.Res.* **30**:3052-3058.
252. **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.
253. **Le Hir, H., D. Gatfield, I. C. Braun, D. Forler, and E. Izaurralde.** 2001. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* **2**:1119-1124.
254. **Le Hir, H., D. Gatfield, E. Izaurralde, and M. J. Moore.** 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **20**:4987-4997.
255. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **19**:6860-6869.
256. **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.
257. **Lemaire, R., J. Prasad, T. Kashima, J. Gustafson, J. L. Manley, and R. Lafyatis.** 2002. Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev.* **16**:594-607.
258. **Lenz, C., A. Scheid, and H. Schaal.** 1997. Exon 1 leader sequences downstream of U5 are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J.Virol.* **71**:2757-2764.
259. **Levine, A. and R. Durbin.** 2001. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* **29**:4006-4013.
260. **Levy, N. S., S. Chung, H. Furneaux, and A. P. Levy.** 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol.Chem.* **273**:6417-6423.
261. **Leys, E. J., G. F. Crouse, and R. E. Kellems.** 1984. Dihydrofolate reductase gene expression in cultured mouse cells is regulated by transcript stabilization in the nucleus. *J.Cell Biol.* **99**:180-187.

262. **Li, C., R. I. Lin, M. C. Lai, P. Ouyang, and W. Y. Tarn.** 2003. Nuclear Pnn/DRS protein binds to spliced mRNPs and participates in mRNA processing and export via interaction with RNPS1. *Mol.Cell.Biol.* **23**:7363-7376.
263. **Lin, C. H. and J. G. Patton.** 1995. Regulation of Alternative 3'-Splice-Site Selection by Constitutive Splicing Factors. *Rna-A Publication of the Rna Society* **1**:234-245.
264. **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.
265. **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.
266. **Loflin, P., C. Y. Chen, and A. B. Shyu.** 1999. Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* **13**:1884-1897.
267. **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.
268. **Lopato, S., A. Mayeda, A. R. Krainer, and A. Barta.** 1996. Pre-mRNA splicing in plants: Characterization of Ser Arg splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:3074-3079.
269. **Lu, J. Y. and R. J. Schneider.** 2004. Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *J Biol.Chem.* **279**:12974-12979.
270. **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.
271. **Luo, M. J., Z. L. Zhou, K. Magni, C. Christoforides, J. Rappsilber, M. Mann, and R. Reed.** 2001. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* **413**:644-647.
272. **Lutzberger, 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.
273. **Ma, W. J., S. Chung, and H. Furneaux.** 1997. The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucl.Acids.Res.* **25**:3564-3569.
274. **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.
275. **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.
276. **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.
277. **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.
278. **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.

279. **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.
280. **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.
281. **Maniatis, T. and R. Reed.** 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**:499-506.
282. **Maniatis, T. and B. Tasic.** 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**:236-243.
283. **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.
284. **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.
285. **Mattaj, I. W. and L. Englmeier.** 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:265-306.
286. **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.
287. **Mayeda, A. and A. R. Krainer.** 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**:365-375.
288. **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 Journal* **13**:5483-5495.
289. **McCullough, A. J. and S. M. Berget.** 1997. G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Mol.Cell Biol.* **17**:4562-4571.
290. **McDougal, J. S., M. S. Kennedy, J. M. Sligh, S. P. Cort, A. Mawle, and J. K. Nicholson.** 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**:382-385.
291. **McDougal, J. S., J. K. Nicholson, G. D. Cross, S. P. Cort, M. S. Kennedy, and A. C. Mawle.** 1986. Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J.Immunol.* **137**:2937-2944.
292. **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.
293. **Michael, W. M., M. Choi, and G. Dreyfuss.** 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**:415-422.
294. **Michaud, S. and R. Reed.** 1991. An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev.* **5**:2534-2546.

295. **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.
296. **Min, H. S., C. W. Turck, J. M. Nikolic, and D. L. Black.** 1997. A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes & Development* **11**:1023-1036.
297. **Minvielle-Sebastia, L. and W. Keller.** 1999. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:352-357.
298. **Misteli, T.** 1999. RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr.Biol.* **9**:R198-R200.
299. **Misteli, T.** 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science* **113**:1841-1849.
300. **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.
301. **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.
302. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie.* Spektrum Verlag.
303. **Monroe, S. H., A. Mayeda, and A. R. Krainer.** 1994. Role of Hnmp A1 Structural Domains in Messenger-Rna Splicing and Rna-Rna Annealing. *Journal of Cellular Biochemistry* **116**.
304. **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 (ed.), *The RNA World.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
305. **Moreira, A., Y. Takagaki, S. Brackenridge, M. Wollerton, J. L. Manley, and N. J. Proudfoot.** 1998. The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms [In Process Citation]. *Genes Dev.* **12**:2522-2534.
306. **Mount, S. M., I. Pettersson, M. Hinterberger, A. Karmas, and J. A. Steitz.** 1983. The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell* **33**:509-518.
307. **Muesing, M. A., D. H. Smith, and D. J. Capon.** 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* **48**:691-701.
308. **Mukherjee, D., M. Gao, J. P. O'Connor, R. Raijmakers, G. Pruijn, C. S. Lutz, and J. Wilusz.** 2002. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* **21**:165-174.
309. **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 Premessenger Rna. *J.Biol.Chem.* **267**:25480-25487.
310. **Murray, H. L. and K. A. Jarrell.** 1999. Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell* **96**:599-602.
311. **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.

312. **Nabel, G. and D. Baltimore.** 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells [published erratum appears in Nature 1990 Mar 8;344(6262):178]. *Nature* **326**:711-713.
313. **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.
314. **Najera, I., M. Krieg, and J. Karn.** 1999. Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J.Mol.Biol.* **285**:1951-1964.
315. **Nakielny, S. and G. Dreyfuss.** 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* **99**:677-690.
316. **Nakielny, S., M. C. Siomi, H. Siomi, W. M. Michael, V. Pollard, and G. Dreyfuss.** 1996. Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway. *Exp.Cell Res.* **229**:261-266.
317. **Narayan, P. and H. C. Towle.** 1985. Stabilization of a specific nuclear mRNA precursor by thyroid hormone. *Mol.Cell Biol.* **5**:2642-2646.
318. **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.
319. **Nasioulas, G., A. S. Zolotukhin, C. Tabernero, L. Solomin, C. P. Cunningham, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber.** 1994. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J.Virol.* **68**:2986-2993.
320. **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.
321. **Neugebauer, K. M.** 2002. On the importance of being co-transcriptional. *J.Cell Sci.* **115**:3865-3871.
322. **Newman, A. J. and C. Norman.** 1992. U5 snRNA interacts with exon sequences at 5' and 3' splice sites. *Cell* **68**:743-754.
323. **Nogues, G., S. Kadener, P. Cramer, M. M. de la, J. P. Fededa, M. Blaustein, A. Srebrow, and A. R. Kornblihtt.** 2003. Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB.Life* **55**:235-241.
324. **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.
325. **Oh, Y. L., B. Hahm, Y. K. Kim, H. K. Lee, J. W. Lee, O. K. Song, K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara, A. Nomoto, and S. K. Jang.** 1998. Determination of functional domains in polypyrimidine-tract-binding protein. *Biochemical Journal* **331**:169-175.
326. **Okeefe, 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.
327. **Padgett, K. A. and J. A. Sorge.** 1996. Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* **168**:31-35.
328. **Palangat, M., T. I. Meier, R. G. Keene, and R. Landick.** 1998. Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol.Cell* **1**:1033-1042.

329. **Peng, S. S., C. Y. Chen, and A. B. Shyu.** 1996. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c- jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol.Cell Biol.* **16**:1490-1499.
330. **Perez, I., C. H. Lin, J. G. McAfee, and J. G. Patton.** 1997. Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *Rna-A Publication of the Rna Society* **3**:764-778.
331. **Perez, I., J. G. McAfee, and J. G. Patton.** 1997. Multiple RRM s contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry* **36**:11881-11890.
332. **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.
333. **Piecyk, M., S. Wax, A. R. Beck, N. Kedersha, M. Gupta, B. Maritim, S. Chen, C. Gueydan, V. Kruys, M. Streuli, and P. Anderson.** 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* **19**:4154-4163.
334. **Prendergast, G. C. and M. D. Cole.** 1989. Posttranscriptional regulation of cellular gene expression by the c-myc oncogene. *Mol.Cell Biol.* **9**:124-134.
335. **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.
336. **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.
337. **Qiao, L., P. S. Maclean, J. Schaack, D. J. Orlicky, C. Darimont, M. Pagliassotti, J. E. Friedman, and J. Shao.** 2005. C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. *Diabetes* **54**:1744-1754.
338. **Raineri, I., D. Wegmueller, B. Gross, U. Certa, and C. Moroni.** 2004. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucl.Acids.Res.* **32**:1279-1288.
339. **Raineri, I., D. Wegmueller, B. Gross, U. Certa, and C. Moroni.** 2004. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucl.Acids.Res.* **32**:1279-1288.
340. **Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J. G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier, and R. G. Collman.** 1997. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J.Virol.* **71**:3219-3227.
341. **Rana, T. M. and K. T. Jeang.** 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch.Biochem.Biophys.* **365**:175-185.
342. **Reed, R.** 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **6**:215-220.
343. **Reed, R.** 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**:340-345.
344. **Reed, R. and T. Maniatis.** 1986. A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection. *Cell* **46**:681-690.

345. **Ribbeck, K., U. Kutay, E. Paraskeva, and D. Gorlich.** 1999. The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr.Biol.* **9**:47-50.
346. **Richman, D. D.** 2001. Antiretroviral activity of emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antiviral Therapy* **6**:83-88.
347. **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.
348. **Roberts, G. C., C. Gooding, H. Y. Mak, N. J. Proudfoot, and C. W. Smith.** 1998. Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res.* **26**:5568-5572.
349. **Rodrigues, J. P., M. Rode, D. Gatfield, B. J. Blencowe, M. Carmo-Fonseca, and E. Izaurralde.** 2001. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:1030-1035.
350. **Rodriguez-Pascual, F., M. Hausding, I. Ihrig-Biedert, H. Furneaux, A. P. Levy, U. Fortermann, and H. Kleinert.** 2000. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene - Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J.Biol.Chem.* **275**:26040-26049.
351. **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.
352. **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.
353. **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.
354. **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.
355. **Roy, S., U. Delling, C. H. Chen, C. A. Rosen, and N. Sonenberg.** 1990. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* **4**:1365-1373.
356. **Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J.Virol.* **63**:1-8.
357. **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.
358. **Sanford, J. R., N. K. Gray, K. Beckmann, and J. F. Caceres.** 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes & Development* **18**:755-768.
359. **Sarkar, B., J. Y. Lu, and R. J. Schneider.** 2003. Nuclear Import and Export Functions in the Different Isoforms of the AUF1/Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Protein Family. *J.Biol.Chem.* **278**:20700-20707.
360. **Sarkar, B., Q. Xi, C. He, and R. J. Schneider.** 2003. Selective Degradation of AU-Rich mRNAs Promoted by the p37 AUF1 Protein Isoform. *Mol.Cell.Biol.* **23**:6685-6693.

361. **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.
362. **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.
363. **Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* **71**:4892-4903.
364. **Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J. Virol.* **66**:7176-7182.
365. **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.
366. **Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1992. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol.* **66**:150-159.
367. **Schwarze, U., B. J. Starman, and P. H. Byers.** 1999. Redefinition of exon 7 in the COL1A1 gene of type I collagen by an intron 8 splice-donor-site mutation in a form of osteogenesis imperfecta: Influence of intron splice order on outcome of splice-site mutation. *American Journal of Human Genetics* **65**:336-344.
368. **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.
369. **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 U2AF(65) and SF1/mBBP. *Molecular Cell* **11**:965-976.
370. **Shatkin, A. J. and J. L. Manley.** 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* **7**:838-842.
371. **Shen, H. H., J. L. C. Kan, and M. R. Green.** 2004. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular Cell* **13**:367-376.
372. **Shibuya, T., T. O. Tange, N. Sonenberg, and M. J. Moore.** 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**:346-351.
373. **Shin, C. and J. L. Manley.** 2002. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* **111**:407-417.
374. **Shyu, A. B., J. G. Belasco, and M. E. Greenberg.** 1991. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.* **5**:221-231.
375. **Shyu, A. B. and M. F. Wilkinson.** 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* **102**:135-138.
376. **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.

377. **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.
378. **Sierakowska, H., L. Gorman, S. H. Kang, and R. Kole.** 2000. Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing. *Antisense Technology, Pt A* **313**:506-521.
379. **Singh, N. N., E. J. Androphy, and R. N. Singh.** 2004. In vivo selection reveals combinatorial controls that define a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *Rna-A Publication of the Rna Society* **10**:1291-1305.
380. **Singh, R., J. Valcarcel, and M. R. Green.** 1995. Distinct Binding Specificities and Functions of Higher Eukaryotic Polypyrimidine Tract-Binding Proteins. *Science* **268**:1173-1176.
381. **Siomi, H. and G. Dreyfuss.** 1995. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* **129**:551-560.
382. **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.
383. **Smith, C. W. and J. Valcarcel.** 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**:381-388.
384. **Sodroski, J., R. Patarca, C. Rosen, F. Wong Staal, and W. Haseltine.** 1985. Location of the trans-activating region on the genome of human T- cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**:74-77.
385. **Southby, J., C. Gooding, and C. W. J. 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.
386. **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.
387. **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.
388. **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.
389. **Staley, J. P. and C. Guthrie.** 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**:315-326.
390. **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.
391. **Stauber, R. H., K. Horie, P. Carney, E. A. Hudson, N. I. Tarasova, G. A. Gaitanaris, and G. N. Pavlakis.** 1998. Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* **24**:462-471.
392. **Steffy, K. and F. Wong Staal.** 1991. Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microbiol. Rev.* **55**:193-205.
393. **Sterner, D. A. and S. M. Berget.** 1993. In vivo recognition of a vertebrate mini-exon as an exon-intron-exon unit. *Mol. Cell Biol.* **13**:2677-2687.
394. **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.

395. **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.
396. **Stutz, F., A. Bachi, T. Doerks, I. C. Braun, B. Seraphin, M. Wilm, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2000. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA*. **6**:638-650.
397. **Stutz, F. and E. Izaurralde.** 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends in Cell Biology* **13**:319-327.
398. **Sureau, A., R. Gattoni, Y. Dooghe, J. Stevenin, and J. Soret.** 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo Journal* **20**:1785-1796.
399. **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.
400. **Tacke, R. and J. L. Manley.** 1999. Determinants of SR protein specificity. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:358-362.
401. **Tacke, R., M. Tohyama, S. Ogawa, and J. L. Manley.** 1998. Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell* **93**:139-148.
402. **Talerico, M. and S. M. Berget.** 1994. Intron definition in splicing of small Drosophila introns. *Mol.Cell Biol.* **14**:3434-3445.
403. **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.
404. **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.
405. **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.
406. **Tange, T. O. and J. Kjems.** 2001. SF2/ASF binds to a splicing enhancer in the third HIV-1 tat exon and stimulates U2AF binding independently of the RS domain. *J.Mol.Biol.* **312**:649-662.
407. **Tange, T. O., A. Nott, and M. J. Moore.** 2004. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Current Opinion in Cell Biology* **16**:279-284.
408. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1995. Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:2504-2508.
409. **Tarn, W. Y. and J. A. Steitz.** 1996. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* **84**:801-811.
410. **Tay, N., S. H. Chan, and E. C. Ren.** 1992. Identification and Cloning of A Novel Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C-Like Protein That Functions As A Transcriptional Activator of the Hepatitis-B Virus Enhancer-II. *Journal of Virology* **66**:6841-6848.
411. **ten Dam, G. B., C. F. Zilch, D. Wallace, B. Wieringa, P. C. L. Beverley, L. G. Poels, and G. R. Screaton.** 2000. Regulation of alternative splicing of CD45 by antagonistic effects of SR protein splicing factors. *Journal of Immunology* **164**:5287-5295.
412. **Tharun, S., W. He, A. E. Mayes, P. Lennertz, J. D. Beggs, and R. Parker.** 2000. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**:515-518.

413. **Thomas, G., M. Siegmann, P. D. Bowman, and J. Gordon.** 1977. The isolation and analysis of polysomes and ribosomal RNA from cells growing in monolayer culture. *Exp.Cell Res.* **108**:253-258.
414. **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.
415. **Tian, H. and R. Kole.** 2001. Strong RNA splicing enhancers identified by a modified method of cycled selection interact with SR protein. *J.Biol.Chem.* **276**:33833-33839.
416. **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.
417. **Vaessen, R. T., A. Houweling, and A. J. van der Eb.** 1987. Post-transcriptional control of class I MHC mRNA expression in adenovirus 12-transformed cells. *Science* **235**:1486-1488.
418. **Valadkhan, S. and J. L. Manley.** 2003. Characterization of the catalytic activity of U2 and U6 snRNAs. *Rna-A Publication of the Rna Society* **9**:892-904.
419. **Valcarcel, J., R. Singh, P. D. Zamore, and M. R. Green.** 1993. The Protein Sex-Lethal Antagonizes the Splicing Factor U2A_f to Regulate Alternative Splicing of Transformer Premessenger Rna. *Nature* **362**:171-175.
420. **Vannice, J. L., J. M. Taylor, and G. M. Ringold.** 1984. Glucocorticoid-mediated induction of alpha 1-acid glycoprotein: evidence for hormone-regulated RNA processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**:4241-4245.
421. **Vedeler, A., I. F. Pryme, and J. E. Hesketh.** 1991. The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krebs II ascites and 3T3 cells. *Mol.Cell Biochem.* **100**:183-193.
422. **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. Q. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. H. Zhang, G. L. G. Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, C. 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. M. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. M. Ge, F. C. Gong, Z. P. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. X. Ke, K. A. Ketchum, Z. W. Lai, Y. D. Lei, Z. Y. Li, J. Y. Li, Y. Liang, X. Y. 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. X. Shue, J. T. Sun, Z. Y. Wang, A. H. Wang, X. Wang, J. Wang, M. H. Wei, R. Wides, C. L. Xiao, C. H. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Q. Zhang, H. Y. Zhang, Q. Zhao, L. S. Zheng, F. Zhong, W. Y. Zhong, S. P. C. Zhu, S. Y. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. J. 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. Y. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Nare-**

- chania, 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. D. 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. J. 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-+.
423. **Wagner, B. J., C. T. DeMaria, Y. Sun, G. M. Wilson, and G. Brewer.** 1998. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* **48**:195-202.
424. **Wagner, E. J. and M. A. Garcia-Blanco.** 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol.Cell Biol.* **21**:3281-3288.
425. **Wagner, E. J. and M. A. Garcia-Blanco.** 2002. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Molecular Cell* **10**:943-949.
426. **Wang, H. Y., W. Lin, J. A. Dyck, J. M. Yeakley, S. Y. Zhou, 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. *Journal of Cell Biology* **140**:737-750.
427. **Wang, J., S. H. Xiao, and J. L. Manley.** 1998. Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev.* **12**:2222-2233.
428. **Wang, J. H., L. P. Shen, H. Najafi, J. Kolberg, F. M. Matschinsky, M. Urdea, and M. German.** 1997. Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:4360-4365.
429. **Wang, W., H. Furneaux, H. Cheng, M. C. Caldwell, D. Hutter, Y. Liu, N. Holbrook, and M. Gorospe.** 2000. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol.Cell Biol.* **20**:760-769.
430. **Wang, Y. and R. R. Rando.** 1995. Specific Binding of Aminoglycoside Antibiotics to Rna. *Chemistry & Biology* **2**:281-290.
431. **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.
432. **Weeks, K. M., C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Steitz, and D. M. Crothers.** 1990. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* **249**:1281-1285.
433. **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.
434. **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.
435. **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.
436. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 1997. Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**:320-328.
437. **Will, C. L. and R. Luhrmann.** 2001. Molecular biology. RNP remodeling with DEXH/D boxes. *Science* **291**:1916-1917.

438. **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.
439. **Wilson, G. M., K. Sutphen, K. y. Chuang, and G. Brewer.** 2001. Folding of A+U-rich RNA Elements Modulates AUF1 Binding. POTENTIAL ROLES IN REGULATION OF mRNA TURNOVER. *J.Biol.Chem.* **276**:8695.
440. **Woerfel, G. and A. Bindereif.** 2001. In vitro selection of exonic splicing enhancer sequences: identification of novel CD44 enhancers. *Nucl.Acids.Res.* **29**:3204-3211.
441. **Wu, J. Y. and T. Maniatis.** 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**:1061-1070.
442. **Wu, Y. B., R. J. Reece, and M. Ptashne.** 1996. Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *Embo Journal* **15**:3951-3963.
443. **Xiao, H., C. Neuveut, M. Benkirane, and K. T. Jeang.** 1998. Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **244**:384-389.
444. **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.
445. **Xiao, S. H. and J. L. Manley.** 1998. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**:6359-6367.
446. **Xu, N., C. Y. Chen, and A. B. Shyu.** 1997. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol.Cell.Biol.* **17**:4611-4621.
447. **Xu, N., C. Y. Chen, and A. B. Shyu.** 2001. Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol.Cell Biol.* **21**:6960-6971.
448. **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. *Journal of Cell Biology* **145**:447-455.
449. **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.
450. **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.
451. **Zapp, M. L. and M. R. Green.** 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-716.
452. **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.
453. **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.
454. **Zeng, C. and S. M. Berget.** 2000. Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol.Cell Biol.* **20**:8290-8301.
455. **Zenkhusen, D. and F. Stutz.** 2001. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* **498**:150-156.

456. **Zheng, X., K. Kelley, H. Elnakat, W. Yan, T. Dorn, and M. Ratnam.** 2003. mRNA Instability in the Nucleus Due to a Novel Open Reading Frame Element Is a Major Determinant of the Narrow Tissue Specificity of Folate Receptor {alpha}. *Mol.Cell.Biol.* **23**:2202.
457. **Zhou, M., M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price, and J. N. Brady.** 2000. Tat modifies the activity of CDK9 To phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription [In Process Citation]. *Mol.Cell Biol.* **20**:5077-5086.
458. **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.* **11**:1703-1712.
459. **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.
460. **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.
461. **Zhuang, Y. and A. M. Weiner.** 1986. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**:827-835.
462. **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.
463. **Zolotukhin, A. S., D. Michalowski, J. Bear, S. V. Smulevitch, A. M. Traish, R. Peng, J. Patton, I. N. Shatsky, and B. K. Felber.** 2003. PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol.Cell.Biol.* **23**:6618-6630.
464. **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.

7 Publikationen

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

Originalpublikationen:

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

Freund M., Hicks M., Konermann C., Otte M., Hertel C., Schaal H.
Extended Base Pair Complementary between U1 snRNA and the 5' Splice Site does not inhibit Splicing in Higher Eukaryotes, but rather Increases 5' Splice Site Recognition;
Nucleic Acids Res. 2005 33: 5112-5119

Kammler S., Otte M., Kjems J., Schaal H.;
The Strength of the 3' Splice Sites and their Interplay with Rev Function
(submitted)

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, 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

Hipp, M., Schaal H.
HIV-1 leader exon 3 – context dependency of hnRNP A1 binding sites
Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16-19/03/2005

Lebenslauf

Marianne Otte

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

Tel.:(0049)-211 81 12398

Privatanschrift: Hüttenstr. 144
40227 Düsseldorf
E-Mail:mahipp@web.de

Persönliche Daten:

Familienstand: verheiratet (geb. Hipp)

Geburtsdatum: 07.11.1973

Geburtsort: Duisburg

Ausbildung:

10/1994-08/2000: Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vordiplom am 03/07/1997

Diplom am 14/08/2000

Diplomthema: Untersuchung des Einflusses alternativ gespleißter HIV-1 Leader-Sequenzen auf die Genexpression;
ausgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie;
AG Prof. Dr. A. Scheid.

10/2000-2005 Promotionsstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Promotionsthema: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von cis-wirkenden Sequenzen und Proteinbindestellen beim Spleißen alternativer HIV-1 Leaderexons;
ausgeführt am Institut für Virologie des Universitäts-Klinikums Düsseldorf;
AG Prof. Dr. H. Schaal

10/2000-10/2002 Grund-Studium Physik

Berufliche Tätigkeiten:

2001-2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie, Universitäts-Klinikum Düsseldorf im Rahmen der Promotionsarbeit

Sonstiges:

10/05-02/06 Betreuung des Studentenkurses Mikrobiologie, Immunologie, Bakteriologie und Virologie für Mediziner und Pharmazeuten