Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://hdl.handle.net/11245/2.10535

File ID	uvapub:10535
Filename	CHAPTER 9 SAMENVATTING
Version	unknown

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	PhD thesis
Title	The HIV-1 RNA genome and regulation of reverse transcription and polyadenylation
Author(s)	B.I.F. Klasens
Faculty	AMC-UvA
Year	2000

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://hdl.handle.net/11245/1.173049

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content licence (like Creative Commons).

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)
(pagedate: 2014-11-15)

CHAPTER 9

SAMENVATTING

In dit proefschrift worden studies naar de structuur en functie van het RNA genoom van HIV-1 beschreven. Het genoom van een HIV-1 virusdeeltje bestaat uit twee identieke, enkelstrengs RNA molekulen. Het onderzoek betreft een bepaald stuk RNA dat als een repeterende sequentie ("repeat [R] region") zowel aan de 5' als 3' kant in beide nucleïnezuur-strengen aanwezig is. De R regio codeert niet voor virus eiwitten, maar vouwt twee interessante RNA structuren die een regulerende functie hebben in de replicatiecyclus van het virus. Deze structuren zijn twee haarspelden, TAR en polyA, die geconserveerd zijn in verschillende soorten van het immunodeficiëntie virus. De TAR haarspeld is de meest 5' gelegen RNA structuur waarvan de functie reeds bekend is. Het speelt een rol in de activatie van de virale promoter via interactie met het virale tat eiwit. Een functie voor de polyA haarspeld was nog niet beschreven op het moment dat ik aan m'n promotie-onderzoek begon. Het belangrijkste doel van dit onderzoek was dan ook het bepalen van de functie(s) van de polyA haarspeld.

De polyA haarspeld bevat verschillende sequenties die van belang zijn voor polyadenylering van het RNA genoom. Polyadenylering is een van de rijpings-processen van het pre-mRNA molekuul waarbij het originele 3' uiteinde wordt afgeknipt en vervolgens met 200 à 300 adenosine nucleotiden wordt verlengd. Deze reeks van adenosine molekulen, ook wel polyA staart genoemd, is van belang voor zowel de stabiliteit van het mRNA molekuul, de translatie en het transport vanuit de kern naar het cytoplasma. De belangrijkste signalen die polyadenylering activeren zijn het geconserveerde AAUAAA signaal, een GU-rijke sequentie die polyadenylering stimuleert (enhancer) en een CA knipplaats gelegen tussen het AAUAAA signaal en de 3' enhancer. Deze sequenties tezamen vormen het polyA signaal. Sommige pre-mRNA's, waaronder ook het HIV-1 RNA, bevatten tevens een 5'-enhancer element. Dit signaal wordt ook wel upstream stimulatory element (USE) genoemd.

Een regulier pre-mRNA molekuul heeft slechts één 3' gelegen polyA signaal. Echter, omdat het polyA signaal van het HIV-1 RNA in de repeterende sequentie is gelegen, is het aanwezig in zowel het 5' en 3' uiteinde. Voor een efficiente synthese van het volledige virale mRNA is het dus essentieel dat het 5' polyA signaal niet wordt gebruikt, en tevens dat het 3' polyA signaal efficient wordt gebruikt. Deze regulatie van het polyadenyleringsproces kan theoretisch ontstaan door ofwel selectieve remming van het 5' signaal, of selectieve versterking van het 3' signaal. Reeds aan het begin van mijn promotie-onderzoek hadden wij het vermoeden dat de polyA haarspeld betrokken is bij deze regulatie. Uit onderzoek, beschreven in de hoofdstukken 2 t/m 4, blijkt dat de polyA haarspeld dusdanig stabiel is dat polyadenylering aan zowel de 5' als 3' zijde gedeeltelijk wordt geremd. Door de vouwing van de polyA haarspeld wordt het polyA signaal, met name het AAUAAA motief, ontoegankelijk voor binding van de eiwitten die het polyadenyleringsproces verzorgen. De stabiliteit van de polyA haarspeld lijkt zodanig gebalanceerd dat het 5' polyA signaal volledig geremd kan worden door andere negatieve signalen die alleen aan de 5' zijde aanwezig zijn, terwijl het 3' polyA signaal selectief geactiveerd kan worden door het alleen daar aanwezige USE element.

Herhaling van de R regio in het HIV-1 RNA genoom is van belang voor de omzetting van het RNA genoom in een DNA vorm, het proces dat reverse transcriptie heet. Dit DNA genoom wordt vervolgens via het virale enzym integrase ingebouwd in het genoom van de gastheer cel tijdens het infectie proces. Reverse transcriptie is een complex mechanisme dat uit verschillende stappen bestaat waarbij de pasgevormde DNA streng tweemaal moet "verspringen"; tijdens de eerste sprong van het 5' uiteinde naar het 3' uiteinde van de RNA matrijs, en tijdens de tweede sprong van het 3' uiteinde naar het 5' uiteinde van de nieuwgevormde "minus-strand" DNA. Deze twee ongewone DNA-sprongen worden ook wel "strand transfer" genoemd. In de hoofdstukken 5 en 6 wordt beschreven welke rol de TAR en polyA haarspelden spelen in het reverse transcriptie proces. Allereerst blijkt het reverse transcriptase enzym moeite te hebben om de RNA matrijs af te lezen van mutanten met een polyA haarspeld die veel stabieler is dan die van het wild-type. Het RT enzym kan blijkbaar niet door deze stabiele haarspelden heen komen. Het is gebleken dat het effect van de RNA haarspelden op het strand transfer mechanisme heel moeilijk te onderzoeken is, omdat de mutaties in *in vitro* reverse transcriptie proeven verscheidene onbedoelde

bij-effecten opleveren. Desondanks wijzen de behaalde resultaten erop dat de polyA haarspeld geen wezenlijke rol speelt in de strand transfer reaktie. Daarentegen blijkt dat de TAR haarspeld het strand transfer proces stimuleert. Een nieuw molekulair mechanisme voor de strand transfer mechanisme wordt tenslotte gepresenteerd waarbij de DNA-kopie van het 5' TAR element een haarspeld structuur vormt die van belang is voor interactie met het 3' TAR RNA. Wij postuleren een eerste kontakt tussen de complementaire lussen van de DNA en de RNA haarspeld.