

Potente HIV-gerichtete RNA-Interferenz
mittels Selektion einer randomisierten lentiviralen
shRNA-Bibliothek

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Carola Pongratz
aus Siegen
Köln 2008

Berichtersteller: Prof. Dr. Jens Brüning

Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klassifizierung und Charakterisierung des Humanen Immundefizienz Virus Typ-1	1
1.2	Der Infektionszyklus von HIV-1	3
1.3	Die Genomorganisation von HIV-1 und die Expression viraler Proteine.....	4
1.4	Antiretrovirale Therapie zu Behandlung von HIV-1 Infektionen.....	7
1.5	Gentherapie	8
1.6	Gentherapie als neuer Therapieansatz bei HIV-1 Infektionen	9
1.7	RNA-Interferenz	11
1.8	RNA Interferenz in der Gentherapie.....	15
1.9	RNA Interferenz und ihre Bedeutung in der Gentherapie von HIV-1 Infektionen	17
2	Ziele der Arbeit.....	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Zellkulturmaterial.....	21
3.2	Chemikalien	21
3.3	Medien und Puffer	21
3.4	Kits und Enzyme.....	23
3.5	Antikörper	24
3.6	Oligonukleotide	24
3.7	Escherichia coli Stämme	27
3.8	Methoden zur Präparation, Propagation und Analyse von DNA	27
3.9	Klonierung	33
3.10	Arbeiten mit RNA.....	37
3.11	Proteinbiochemische Methoden	39
3.12	Zellkultur und Transfektion	40
3.13	Herstellung stabiler Zelllinien über lentivirale Transduktion	42
3.14	FACS Analyse zur Bestimmung von Transfektions- und Transduktionseffizienz.....	44
3.15	Puromycin- und Ganciclovirbehandlung der transduzierten HeLa Selektionszelllinien	44
3.16	Quantitative Messmethoden zur Erfassung von zellulären Aktivitäten.....	44
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Etablierung von Zelllinien zur Selektion HIV-1 gerichteter shRNAs	48
4.2	Konstruktion einer randomisierten HIV-1 gerichteten shRNA-Bibliothek	51
4.3	Selektion der shRNA-Bibliothek.....	56
4.4	Validierung PCR-amplifizierter shRNA-Expressionskassetten mittels HIV-1 spezifischem Luziferase-Assay	59
4.5	Sequenzanalysen und Validierung potenter shRNA-Spezies.....	61
4.6	Analyse synthetischer siRNA-Derivate	67
4.7	Funktioneller Vergleich von shRNAs und miRNAs	68

4.8	Stabile shRNA-Expression als potenter Inhibitor der HIV-Infektion	70
5	<i>Diskussion</i>	73
5.1	Konstruktion der randomisierten shRNA-Bibliothek	74
5.2	Selektion potenter HIV-gerichteter shRNAs	75
5.3	Sequenzanalysen der selektierten shRNAs	77
5.4	Konvertibilität der inhibitorischen Sequenzen	78
5.5	Das Potential RNAi-basierter Therapien.....	80
5.6	RNAi in der Gentherapie von HIV-1.....	81
6	<i>Zusammenfassung</i>	85
7	<i>Summary</i>	87
8	<i>Referenzen</i>	88
8.1	Erklärung.....	101
8.2	Lebenslauf	102
8.3	Danksagung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

AP1	<i>transcription activator protein 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>basepair</i>
CCR5	<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CDK9	<i>cyclin-dependent kinase 9</i>
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
nt	<i>nucleotide</i>
NRTI	<i>nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
NNRTI	<i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PARP-1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1
PI	<i>protease inhibitor</i>
Piwi	<i>P-element induced wimpy testis</i>
p.T.	<i>post transfection</i>
SP1	<i>transcription factor specific protein 1</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
Staf	<i>selenocysteine tRNA gene transcription activating factor</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
wt	Wildtyp
YT	<i>yeast extract tryptone rich</i>

1 Einleitung

Das Humane Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1) wurde erstmals Anfang der achtziger Jahre als Erreger des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) beschrieben (Barre-Sinoussi *et al.* 1983; Gallo *et al.* 1984; Levy *et al.* 1984). Die mit HIV-1 verbundene Erkrankung wurde jedoch schon ca. 25 Jahre vor der Identifizierung des Erregers bei einigen Patienten beobachtet. Sie manifestiert sich nach einer mehrjährig andauernden symptomfreien Phase durch Defekte im Immunsystem, die bedingt durch die Abnahme von CD4⁺ Zellen wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten zu einer Anhäufung opportunistischer Erkrankungen führen. Innerhalb der letzten 20 Jahre hat sich die HIV-1 Infektion zu einer der bedeutendsten pandemischen Infektionskrankheiten entwickelt. Im Laufe des Jahres 2007 wurden weltweit ca. 2,5 Million Neuinfektionen erfasst und es waren 33,2 Million Menschen erkrankt, von denen über 60% in den subsaharischen Ländern Afrikas leben (AIDS epidemic update, UNAIDS/WHO, 2008). Dort stellt die Epidemie durch die Bedrohung der wirtschaftlichen, sozialen und politischen Stabilität ein erhebliches Entwicklungshemmnis dar.

1.1 Klassifizierung und Charakterisierung des Humanen Immundefizienz Virus Typ-1

HIV gehört zur Familie der Retroviren, die sich durch ein RNA-Genom auszeichnen, das vor der Integration in das Wirtsgenom von einer Virus kodierten Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Retroviren kommen überwiegend in Wirbeltieren vor und können verschiedene Krankheitsbilder verursachen, die von harmlosen sekundären Infektionen über Tumorerkrankungen bis hin zu immunologischen und neurologischen Defekten reichen. Retroviren lassen sich in drei Unterfamilien einteilen: Onkoviren, Spumaviren und Lentiviren. HIV zählt zu den Lentiviren (Modrow 1997). Lentiviren sind exogene, nicht-onkogene Viren, die mit dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem assoziiert sind und sich durch

eine lange Latenzzeit im Wirt auszeichnen. Neben HIV sind auch Immundefizienzviren des Affen (SIV) (Fultz and Anderson 1989), der Katze (FIV) (Sparger *et al.* 1989) und des Rindes (BIV) (Gonda *et al.* 1994) bekannt.

Das HIV-1 Virion besteht aus dem aus Kapsidprotein p24 (CA) aufgebauten konischen Nukleokapsid und einer vom Zytoplasma abgeleiteten Lipiddoppelmembran mit deren Glykoproteinen gp41(TM = *transmembrane*) und gp120 (SU = *surface*) (Abb. 1A). Innerhalb der Kapsidhülle befinden sich zwei identische einzelsträngige (+)-RNA Moleküle, die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR), sowie die Proteine *vpu* (virales Protein U), *vif* (viraler Infektiösitätsfaktor) und *nef* (negativer Faktor) und einige Wirtszellfaktoren.

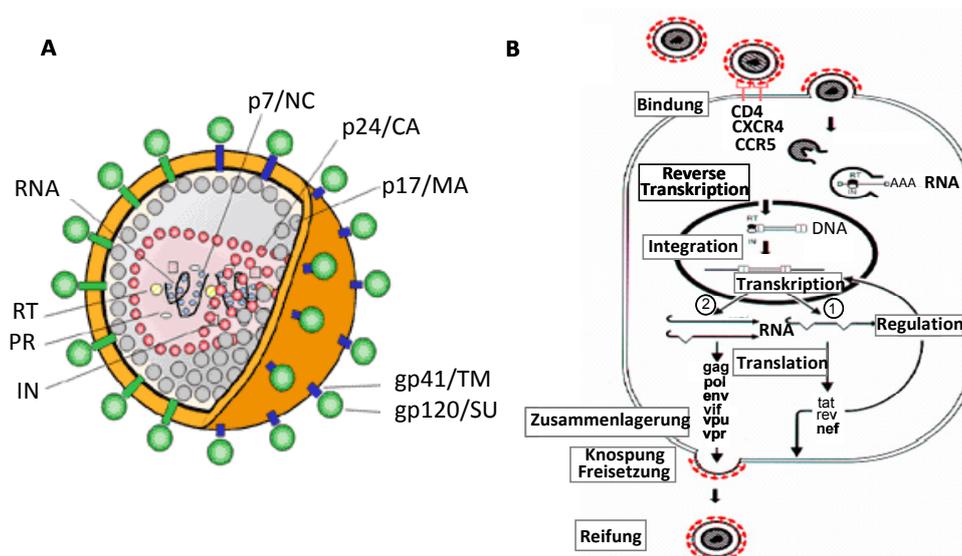


Abb. 1 A) Aufbau des HIV-1 Virions. Das HIV-1 Virion setzt sich aus einem konischen Capsid, bestehend aus p24/MA, und einer Hüllmembran, in die die beiden viralen Proteine gp41/TM und gp120/SU verankert sind, zusammen. Das Matrixprotein p17/MA verleiht dem Capsid seine Struktur. Innerhalb des Capsids befinden sich sowohl 2 Kopien des viralen Genoms in Form von einzelsträngigen (+)-RNA-Molekülen, die mit Nukleocapsidproteinen p7/NC komplexiert sind, als auch die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN) (B.Reimund). B) Replikationszyklus von HIV-1. Die Bindung von HIV an die Wirtszelle erfolgt über die Adsorption des Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor und einen der beiden Chemokinrezeptoren; CXCR4 oder CCR5. Strukturelle Umlagerungen der Virusoberflächenproteine bewirken die Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran. Das virale (+)-RNA Genom wird durch die virale Reverse Transkriptase 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 (1). Die in das Zytoplasma exportierten Transkripte kodieren für die regulatorischen Proteine *tat*, *rev* und *nef*, die nach dem Transport in den Zellkern die virale Transkription verstärken und zur Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs beitragen (2). 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 Zytoplasmamembran mit den Proteinkomponenten zusammenlagern. Es kommt zur Knospung und Freisetzung unreifer Viruspartikel. Die Reifung zu infektiösen Partikeln erfolgt über die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease. (modifiziert nach Modrow, S.)

1.2 Der Infektionszyklus von HIV-1

Die HIV-1 Infektion beginnt mit der Bindung des viralen gp120 Hüllproteins an den CD4-Rezeptor von T-Zellen, Monozyten oder Makrophagen (Maddon *et al.* 1986) und bedarf zusätzlicher Interaktion mit einem Chemokinrezeptor, der sich je nach infiziertem Zelltyp unterscheidet. Für den Eintritt in T-Lymphozyten wird der CXCR4-Rezeptor verwendet, bei Monozyten und Makrophagen der CCR5-Rezeptor (Feng *et al.* 1996; Wu *et al.* 1996) (Abb. 1B). Aufgrund dieser Interaktionen kommt es zu einer Konformationsänderung des viralen Glykoproteinkomplexes, wodurch die freigelegte fuseogene Domäne des Transmembranproteins (gp41) die Fusion von Virushülle und Wirtszellmembran ermöglicht und das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wird. Durch die Dissoziation von p24 wird das Kapsid für Nukleotide durchlässig und es entstehen subvirale Partikel, die als reverse Transkriptionskomplexe (RTC) bezeichnet werden (Fitzon *et al.* 2000; Fassati and Goff 2001; Nisole and Saib 2004; Dismuke and Aiken 2006). Im RTC erfolgt die reverse Transkription der einzelsträngigen viralen RNA in doppelsträngige DNA. Die dabei benötigte Reverse Transkriptase ist ein multifunktionales Enzym, das sowohl eine DNA Polymerase Domäne zur Synthese viraler DNA von DNA- und RNA-Templates, als auch eine RNase H Domäne besitzt, die die RNA in DNA/RNA-Hybriden hydrolysiert (Goldschmidt *et al.* 2003; Schultz and Champoux 2008). Die entstandene provirale DNA wird von im Verlauf der reversen Transkription generierten regulatorischen repetitiven Kontrollsequenzen, LTRs (*long terminal repeat*), sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende flankiert und ist im so genannten Präinitiationskomplex (PIC) gebunden. Der PIC transloziert entlang des Mikrotubuli-Netzwerks zum Zellkern (Miller *et al.* 1997). Der Prozess des anschließenden Eintritts in den Nukleus und die daran beteiligten viralen Proteine, sind bisher nicht eindeutig geklärt (Bukrinsky 2004). Im Zellkern wird das virale DNA-Genom als Provirus mit Hilfe der viralen Integrase sequenz-unabhängig in das Wirtszellgenom integriert (Fouchier and Malim 1999). Dabei wird der Provirus bevorzugt in RNA-Polymerase II gesteuerte Gene integriert, die stark transkribiert werden (Schroder *et al.* 2002). Die anschließende Transkription der proviralen DNA erzeugt sowohl Transkripte von voller Länge, die als Genom für neue Viruspartikel dienen, als auch einfach oder mehrfach gespleißte subgenomische RNAs für die Expression viraler

Proteine. Die Replikation von HIV-1 wird zeitlich reguliert und in eine frühe (ca. 2 kb RNA Klasse) und eine späte (ca. 4 – 5 kb RNA Klasse) Spleißphase unterteilt. Dabei regulieren die Proteine der frühen Phase sowohl die Menge als auch die mRNA Spezies der späten Phase. Auf die Expression der viralen Proteine wird im nächsten Kapitel näher eingegangen. Die erzeugten Transkripte werden in das Zytoplasma geschleust und die viralen Proteine exprimiert. Die Knospung neuer Virionen wird durch die Zusammenlagerung von viralen Strukturproteinen, Enzymvorläuferproteinen und zwei genomischen (+)-RNA-Transkripten an der Wirtszellmembran induziert. Erst nach der Abschnürung der Virionen entstehen infektiöse Viren, indem das Gag-Pol-Vorläuferprotein von der viralen Protease autokatalytisch gespalten wird und eine strukturelle Umlagerung zur Ausbildung des konischen Capsids erfolgt.

1.3 Die Genomorganisation von HIV-1 und die Expression viraler Proteine

Das HIV-1 Genom besteht aus zwei identischen, ca. 9,2 kb großen einzelsträngigen RNA Molekülen, die für 15 Proteine kodieren. Die RNA weist mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Das RNA-Genom enthält insgesamt 9 offene Leserahmen (*open reading frames* = ORFs), die neben den viralen Enzymen (RT, IN, PR) und Strukturproteinen (gag) auch regulatorische (rev, tat) und akzessorische Proteine (vif, vpr, nef) kodieren (Frankel, 1998). Dabei überlappen einige der Leserahmen der aus mehreren Exons bestehenden Proteine, so dass aus dem nur ca. 9,2 kb großen Genom über 40 mono- und bicistronische RNAs prozessiert werden (Schwartz *et al.* 1990b; Purcell and Martin 1993). Die bei der reversen Transkription entstehenden, DNA-flankierenden LTRs bilden die regulatorischen Kontrollsequenzen für die Expression viraler Proteine (Klaver and Berkhout 1994) (Abb. 2A). Diese terminalen Sequenzwiederholungen sind in gleicher Orientierung aus den Regionen U3 (*unique 3*), R (*redundant*) und U5 (*unique 5*) aufgebaut und obwohl die 5'- und die 3'-LTR-Sequenzen identisch sind, üben sie unterschiedliche Funktionen aus. In der infizierten Zelle kontrolliert das 5'LTR die Transkription der viralen Gene und fungiert

somit als Enhancer-/Promotor-Region der viralen Genexpression. Das 3'LTR dagegen dient als Polyadenylierungssignal und kontrolliert die Prozessierung und Polyadenylierung der viralen Transkripte (Cherrington and Ganem 1992; Klaver and Berkhout 1994; Ashe *et al.* 1997). In der U3-Region und im Übergang zur R-Region sind die für die Transkription essentiellen Enhancer-/Promotor-Elemente enthalten: der Kernpromotor (core), bestehend aus der TATAA-Box und drei SP1-Bindungsstellen; die Enhancer-Region, bestehend aus Bindungsstellen für den T-Zell-spezifischen, aktivierenden Transkriptionsfaktor NFκB; außerdem stromaufwärts und stromabwärts lokalisierte regulatorische Elemente (Kawakami *et al.* 1988; Kamine *et al.* 1991). Sobald die provirale DNA integriert ist, findet die erste Runde proviraler Transkription durch die zelluläre Polymerase II und Bindung von zellulären Faktoren wie NF-κB, SP1 und AP1 statt, und es werden basale Mengen an Tat, Rev und Nef produziert (Gaynor 1992; Jordan *et al.* 2001). Das regulatorische 14 kDa Protein Tat ist dabei essentiell für die Aktivierung der viralen Transkription. Tat bindet an die in der R-Region des 5'LTR gelegene, transkribierte RNA Haarnadelschleife TAR (*transactivating response element*) (Harrich *et al.* 1996) und rekrutiert weitere zelluläre Faktoren, wie z.B. den Komplex Cyclin T1/CDK9 (Isel and Karn 1999). Eine durch CDK9 vermittelte Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II erhöht die Prozessivität des Transkriptionskomplexes und gewährleistet somit eine effiziente Elongation der viralen Transkription (Karn 1999). Beim Transport der generierten mRNA Transkripte von voller Länge als auch von einfach oder mehrfach gespleißter subgenomischer RNA bindet Rev an die RRE (*rev response element*)-Sequenz, die im Bereich des *env*-Gens in allen einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNA Molekülen lokalisiert ist, und bewirkt damit den Export dieser mRNA-Spezies, unabhängig von ihrem Spleißzustand. Rev blockiert zudem die Zusammenlagerung des Spleißapparates am primären Spleißdonor (MSD = *major splice donor*) und wirkt somit weiteren Spleißprozessen entgegen (Kingsman and Kingsman 1996).

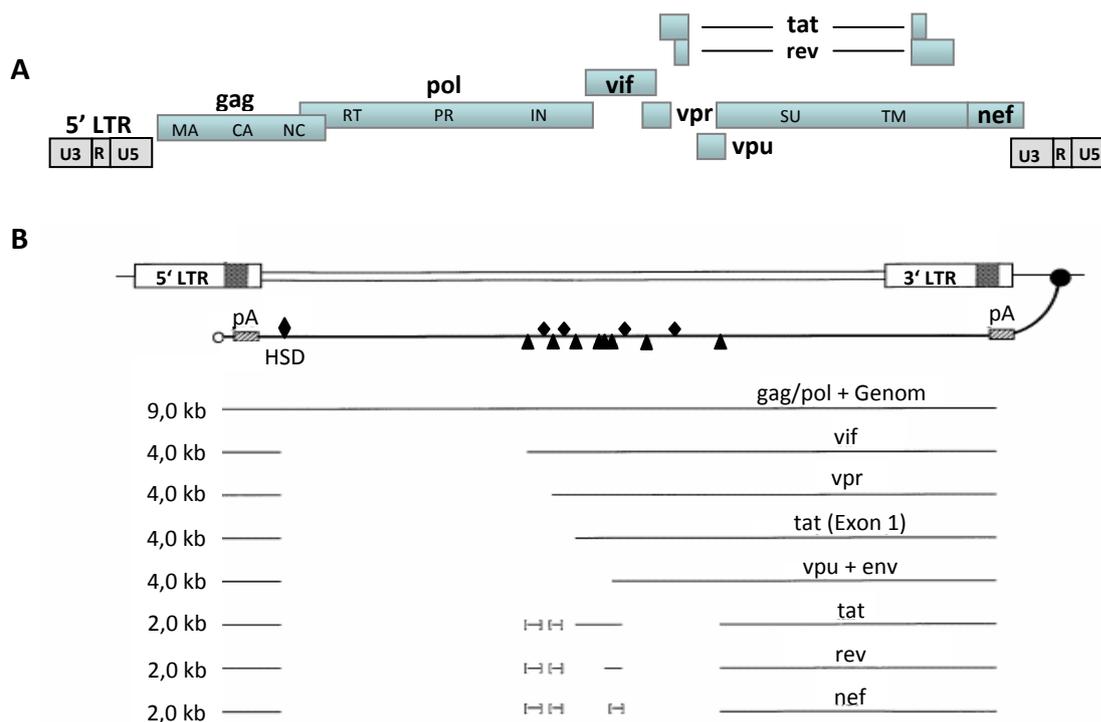


Abb. 2 A) Das HIV-1 Genom. Die offenen Leserahmen (ORF, blau) von HIV-1 werden durch die 5' und 3' LTRs (*long terminal repeats*) flankiert. *Gag* (*group specific antigen*) kodiert den Vorläufer für die Strukturproteine des Viruscapsids (p17/MA, p24/CA und p7/N); *pol* (Polymerase) den Vorläufer für die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Protease (P) und Integrase (IN); *env* (*envelope*, gp120) wird in das extrazelluläre Membranprotein (SU, gp120) und das Transmembranprotein (TM, gp41) prozessiert; *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr*, *vpu* und *enf* (*negativ factor*) kodieren akzessorische Proteine; *tat* (*transactivator of transcription*) und *rev* (*regulator of expression of virion proteins*), die aus jeweils zwei Exons bestehen, regulatorische Proteine. B) Spleißstellen für alternatives Spleißen und resultierende mRNA Klassen von HIV-1. Das HIV-1 Genom besitzt einen Hauptspleißdonor (HSD, \blacklozenge) und 4 weitere Spleißdonoren sowie 8 Spleißakzeptoren (\blacktriangle). Die resultierenden ungespleißten, einfach und mehrfach gespleißten mRNA Spezies werden in 3 Klassen unterteilt: volle Länge mRNAs (9 kb), intermediäre mRNAs (4 kb) und kleine mRNAs (2 kb).

Im Gegensatz zu den alternativen Spleißvorgängen bei der Prozessierung eukaryotischer monocystronischer mRNAs, die zur Erhöhung der Proteinviefalt führen, wird durch das alternative Spleißen polycystronischer mRNAs von HIV-1 gewährleistet, dass die Proteine effizient zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden können. Während der Transkription der viralen Gene wird eine polycystronische prä-mRNA generiert, die mindestens vier 5'-Spleißstellen (Spleißdonoren D1 – D4) und acht 3'-Spleißstellen (Spleißakzeptoren A1 – A3, 4a – 4c, 5 und 7) enthält. Durch alternatives Spleißen produziert HIV-1 drei Klassen von mRNAs: volle Länge mRNAs (ca. 9kb), intermediäre mRNAs (ca. 4-5 kb) und kleine

mehrfach gespleißte mRNAs (ca. 2 kb) (Schwartz *et al.* 1990a; Kammler *et al.* 2006) (Abb. 2B). Letzte besteht aus mehr als zwölf unterschiedlich gespleißten mRNA Spezies, die die regulatorischen Proteine *tat*, *rev* und *nef* produzieren (Robert-Guroff *et al.* 1990). Obwohl die *tat* mRNAs alle drei ORFs für *tat*, *rev* und *nef* enthalten, wird nur der *tat* ORF effizient exprimiert. Der *rev* ORF hingegen beinhaltet sowohl den *rev* als auch den *nef* ORF und dient der Expression beider Proteine. Die Klasse der intermediären mRNAs besteht auch aus einer heterogenen Population an mRNAs, die entweder bicistronisch *vpu* und *env* oder monocistronisch das funktionelle Exon 1 von *tat* exprimieren (Schwartz *et al.* 1990b). Die volle Länge mRNAs kodieren für die bei Retroviren konservierten Gene *gag* und *pol*. Diese werden als Proteinvorläufer translatiert und durch die virale Protease, die im Kapsid reifer Viruspartikel enthalten ist, enzymatisch prozessiert. Dabei ergeben sich aus *gag* die vier strukturellen Komponenten des Virions, das p17/MA, das p24/CA, das p7/NC und das p6/LI. *Env* kodiert für das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41, die im Golgi-Apparat aus dem Vorläuferprotein gp160 prozessiert werden (McCune *et al.* 1988). *Pol* kodiert für die enzymatischen Komponenten des Virus: die Reverse Transkriptase, die Protease und die Integrase.

1.4 Antiretrovirale Therapie zu Behandlung von HIV-1 Infektionen

Trotz intensiver Bemühungen steht bis heute kein Impfstoff gegen HIV zur Verfügung. Es können lediglich die Symptome von AIDS behandelt werden und der Übergang von der symptomfreien Phase einer HIV-Infektion zu AIDS verzögert werden. Zur Reduktion der Viruslast werden seit 1987 überwiegend Inhibitoren der beiden viralen Enzyme Reverse Transkriptase (NRTI, NNRTI) und Protease (PI) eingesetzt (Esnouf *et al.* 1995; Spence *et al.* 1995). Diese Medikamente werden im Rahmen einer Kombinationschemotherapie, **Highly Active Antiretroviral Therapy** (HAART), verabreicht. Seit kurzem ist der erste Fusionsinhibitor (FI) Enfuvirtid (Fuzeon[®], Hoffmann-La Roche), und somit die dritte Klasse antiretroviraler Therapeutika zur Behandlung von Patienten zugelassen. Durch die antiretrovirale Therapie fällt die Viruslast im Plasma der Patienten im Laufe von 2 bis 4 Monaten auf

ein nichtdetektierbares Niveau ab, obwohl es zu keiner Zeit zu einer kompletten Eliminierung des Virus kommt. Der Grund für dieses Phänomen sind infizierte Gedächtnis $CD4^+$ T-Lymphozyten, die dem Virus als Reservoir dienen und in denen weiterhin nicht detektierbare Mengen viraler Replikationsprodukte produziert werden. Aufgrund dessen kann eine Unterbrechung der Therapie jederzeit zu einer erneuten Produktion infektiöser Virionen und damit zu einer erhöhten Viruslast führen (Chun *et al.* 1997; Finzi *et al.* 1997). Daraus folgt die Notwendigkeit einer lebenslangen Medikation mit den damit einhergehenden Nebenwirkungen (Esser *et al.* 2007; Subbaraman *et al.* 2007). Zusätzlich können durch den dauerhaften therapeutischen Selektionsdruck und die hohe Mutationsrate des Virus (Mansky and Temin 1995) therapieresistente Varianten des Virus entstehen (Gulick *et al.* 2000). Neben der Weiterentwicklung bestehender HAART-Komponenten, bieten sich für die Entwicklung neuer HAART Komponenten theoretisch alle Schritte im viralen Lebenszyklus als Ziele an. Potentielle Medikamente stellen unter anderem Komponenten dar, die mit tat/TAR interagieren, um die virale Replikation zu unterdrücken, aber auch Reifungsinhibitoren und Inhibitoren, die die gp120/CD4 Interaktion verhindern (Barbaro *et al.* 2005).

Neben den oben aufgeführten Problemen, die bei HAART auftreten, spielen vor allem in den Entwicklungsländern die immer noch immensen Kosten der Therapie eine nicht minder große Rolle. Nicht zuletzt aus diesem Grund liegt momentan das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung neuer kostengünstiger anti-HIV Therapien und prophylaktischer Impfstrategien (Yamamoto and Tsunetsugu-Yokota 2008).

1.5 Gentherapie

Der Grundstein für die Entwicklung humaner gentherapeutischer Methoden wurde in den frühen 80er Jahren gelegt, als sowohl Techniken für die Klonierung von Säugetiergenen in prokaryotische Plasmide und Bakteriophagen entwickelt wurden als auch die Erforschung muriner Onko-Retroviren zur Entwicklung retroviraler Vektoren führte (Flotte *et al.* 2007). Zu den viralen Vektoren, die zurzeit in präklinischen und klinischen Gentherapie-Studien Verwendung finden, zählen Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Lentiviren (Vasileva and Jessberger 2005;

Levine *et al.* 2006; Campos and Barry 2007). Adenoviren wurden 1993 erstmals zur Behandlung der cystischen Fibrose verwendet (Engelhardt *et al.* 1993). Heute werden sowohl Adeno- als auch Adeno-assoziierte Viren zum Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt, ihr großer Nachteil für die humane Gentherapie liegt allerdings in der nur transienten Expression des Transgens und ihrer Immunogenität.

HIV-1 basierte replikationsdefiziente lentivirale Vektoren wurden Mitte der 90er Jahre entwickelt und seitdem, in Bezug auf ihre Effizienz und Sicherheit bei der Verwendung in der humanen Gentherapie stetig verbessert (Wiznerowicz and Trono 2005). Zu den herausragenden Eigenschaften von Lentiviren gehört ihre geringe Immunogenität und ihre Fähigkeit, nicht nur proliferierende sondern auch ruhende Zellen transduzieren zu können, was eine stabile Expression des Transgens ermöglicht (Follenzi *et al.* 2007). Außerdem kann durch die Verwendung unterschiedlicher Hüllproteine der Tropismus der Vektoren variiert und ein spezifischer Gentransfer in eine Vielzahl verschiedener Zielzellen erreicht werden.

1.6 Gentherapie als neuer Therapieansatz bei HIV-1 Infektionen

In den letzten 15 Jahren wurden verschiedene Gentherapieansätze zur Behandlung von HIV-Infektionen in hämatopoetischen Zellen getestet, die sich prinzipiell in zwei Kategorien einteilen lassen: Protein-basierte und RNA-basierte Ansätze (Rossi *et al.* 2007). Bei Protein-basierten Ansätzen handelt es sich um dominant-negative Proteine, Fusions-Inhibitoren und „*single-chain*“ *Intrabodies* (intrazelluläre Einzelstrangantikörper), die nach lentiviraler Transduktion stabil in den Zielzellen exprimiert werden. Ein Beispiel für dominant-negative Proteine ist das Protein M10, das zu gentherapeutischen Versuchszwecken genutzt wurde. M10 ist eine mutante Form des rev Proteins, das in transduzierten HIV-infizierten CD4⁺ T-Zellen zu einer erhöhten Überlebensrate führt. Dazu wurden isolierte, angereicherte CD4⁺ T-Zellen HIV-1 positiver Patienten mit M10-Expressionsvektoren *ex vivo* transfiziert und dann in die Patienten retransplantiert. Anschließend wurde die Toxizität, die M10-Expression und die Überlebensrate genetisch modifizierter CD4⁺ T-Zellen bestimmt.

M10 wurde als einziger Protein-basierter Ansatz in klinischen Versuchen verwendet, und zeigt auch bei HIV-1 Patienten eine verlängerten T-Zell Überlebensrate (Woffendin *et al.* 1996). Ein bereits unter HAART verwendeter Fusionsinhibitor ist das Enfuvirtid (Fuzeon, s.o.). Enfuvirtid verhindert die HIV-1 Infektion, indem es die Fusion von HIV-1 mit der Wirtszelle unterbindet. Es bindet an das virale Transmembranprotein gp41 und verhindert damit dessen Konformationsänderung, die durch die Anlagerung des viralen Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor und einen der beiden Korezeptoren hervorgerufen wird. Aufgrund seiner starken Effizienz und seiner guten Verträglichkeit könnte Enfuvirtid in zukünftigen gentherapeutischen Studien Verwendung finden. Bei „*single-chain*“ *Intrabodies* handelt es sich um intrazellulär exprimierte einkettige Antikörper, die aus den variablen Regionen der leichten und schweren Kette eines Immunglobulins bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation von HIV-1 durch intrazellulär exprimierte „*single-chain*“ *Intrabodies*, die gegen virale Proteine wie das *tat* Protein gerichtet waren, inhibiert werden konnte (Marasco *et al.* 1999; Theisen *et al.* 2006).

Zu den RNA-basierten Ansätzen zählen Ribozyme, *antisense* RNA, Aptamere und siRNAs. Dabei stellt die Auslösung der RNA Interferenz durch siRNAs einen viel versprechenden neuen Ansatz zur gentherapeutischen Behandlung von HIV-1 dar und soll im folgenden Kapitel näher beschrieben werden. Ribozyme bestehen aus weniger als 100 Nukleotiden und sind in der Lage, mRNA gezielt zu binden und enzymatisch zu schneiden. Ihre Sekundärstruktur scheint für ihre Funktion entscheidend zu sein. Ribozyme werden in verschiedene Klassen eingeteilt, wobei die Klasse der „*hammerhead*“ –Ribozyme eingehend untersucht wurde. Nachdem erstmals gezeigt wurde, dass diese Klasse der Ribozyme die HIV-1 Replikation inhibieren können (Sarver *et al.* 1990), wurden retrovirale Vektoren zur Expression von Ribozymen gegen *tat*- und *rev*-mRNA und die virale U5 Region in primären humanen Zellen entwickelt. Die retroviralen Vektoren wurden schließlich auch in klinischen Studien getestet, dort zeigten sie jedoch keine signifikante Effizienz gegen HIV-1 (Bauer *et al.* 1997; Ngok *et al.* 2004). *Antisense* RNAs sind regulatorische endogen nicht-translatierte RNA-Sequenzen. Chaterjee *et al.* konnten zeigen, dass *antisense* RNAs, die mit der TAR-Sequenz, die in allen mRNA Spezies von HIV-1 vorhanden ist, nichtfunktionelle Duplexe bilden, die virale Replikation blockieren

können (Chatterjee *et al.* 1992). McGregor *et al.* zeigten in einem gentherapeutischen Ansatz im Rahmen einer klinischen Studie, dass die lentivirale Expression einer *antisense* RNA gegen das *env* Transkript die Replikation von HIV-1 effizient inhibieren konnte (MacGregor 2001). Der genaue Mechanismus, mit dem *antisense* RNAs die virale Replikation inhibiert ist jedoch unklar. Ähnlich wie die Ribozyme sind *Antisense* RNAs außerdem durch eine sehr geringe Stabilität gekennzeichnet und die Gefahr, dass sie durch zelluläre Nukleasen abgebaut werden, ist sehr hoch. Aptamere sind kurze RNA- oder auch DNA-Einzelstränge, die *in vitro* effizient ihre Zielstruktur über ihre 3D-Struktur binden können und im Falle von HIV-1, antivirales Potential besitzen (Held *et al.* 2006). Ein potentielles Problem bei einer Applikation *in vivo* liegt jedoch in der fehlenden Ausbildung der Aptamer-Tertiärstruktur, wodurch eine effiziente Bindung an die Zielstruktur verhindert wird.

1.7 RNA-Interferenz

Unter RNA Interferenz (RNAi) versteht man die post-transkriptionelle Inhibition der Genexpression, basierend auf einer durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle induzierte sequenzspezifische Inaktivierung von mRNA. Dieses Phänomen gehört vermutlich zu den ältesten Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen (Voinnet 2001) und Transposons (Ketting *et al.* 1999) und wurde zuerst bei der Pflanze *Petunia* als *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) beschrieben (Napoli *et al.* 1990; Vaucheret *et al.* 2001). Spätere Arbeiten zeigten, dass RNAi auch in Pilzen (Romano, 1992), *Drosophila melanogaster* (Gura 2000), *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998) sowie Säugetieren hoch konserviert ist (Caplen *et al.* 2001; Agrawal *et al.* 2003).

Der Mechanismus der RNA Interferenz wurde in den letzten Jahren vor allem durch genetische und biochemische Studien an *C.elegans* und an Zellextrakten von *D. melanogaster* in vielen Punkten aufgeklärt (Abb.3). Der Effektor der RNA Interferenz ist ein 19-21 nt langes doppelsträngiges (ds) RNA Molekül, das durch 2 nt Überhänge an den 3'Enden und einer Phosphatgruppe am 5'Ende charakterisiert ist und als short interfering RNA (siRNA) bezeichnet wird (Elbashir *et al.* 2001a; Meister and Tuschl 2004). siRNAs entstehen bei der Prozessierung langer dsRNA durch

Dicer, einer ATP-abhängigen Ribonuklease Typ III (Bernstein *et al.* 2001; Myers *et al.* 2003; Bagasra and Prilliman 2004). Dicer bildet zusammen mit seinem Interaktionspartner TRBP (*human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*) den *RISC loading complex* RLC (Chendrimada *et al.* 2005), der die siRNAs in den Komplex siRISC inkorporiert und sie in einem ATP-abhängigen Prozess entwindet. Der sogenannte *passenger* Strang wird dabei degradiert und der *guide* Strang bleibt im RLC gebunden. Zur Bildung des *RNA induced silencing complex* (siRISC) rekrutiert der RLC das Argonaut-Protein Ago-2 und eine *DEAD-Box* Helikase (Carmell *et al.* 2002). Ago2 gehört wie Dicer zur Familie der Argonaut-Proteine, die durch eine N-terminale PAZ Domäne und eine C-terminale Piwi Domäne gekennzeichnet sind. Die PAZ Domäne erkennt und bindet einzelsträngige 3'Überhänge von Nucleinsäuren (Ma *et al.* 2004), während die Piwi Domäne als Endonuklease fungiert.

SiRISC bindet die Ziel-mRNA aufgrund komplementärer Sequenzen, die durch die siRNA vorgegeben werden und schneidet die gebundene mRNA. Die Schnittstelle wird dabei durch das 5' Ende der siRNA bestimmt, die 5'-Phosphatgruppe wirkt dabei als so genannter Referenzpunkt für die Schnittstelle (Elbashir *et al.* 2001b). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung des 5'Endes der siRNA in einem ATP-abhängigen Prozess überprüft und erneuert wird, um die siRNA für mehrere RNAi Ereignisse zur Verfügung zu stellen (Nykanen *et al.* 2001).

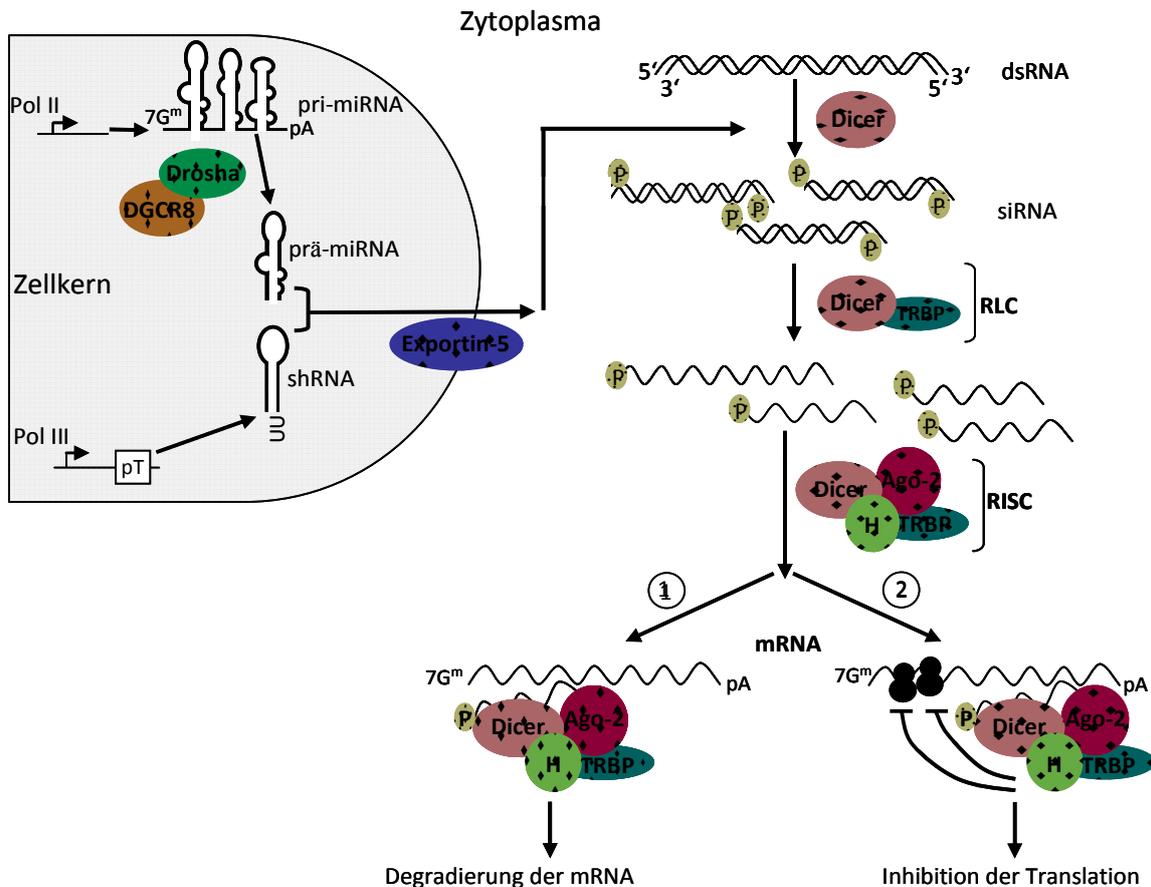


Abb.3) RNA Interferenz. DsRNA wird von Dicer in 19-21 nt lange siRNAs prozessiert. Zusammen mit TRBP bildet Dicer den *RISC-loading complex* RLC, der die siRNA in den RISC lädt und sie in einem ATP-abhängigen Prozess entwindet. Dabei wird der *passenger*-Strang der siRNA degradiert, der *guide*-Strang bleibt im RLC gebunden. Durch die Rekrutierung von Ago-2 und einer *DEAD-Box* Helikase (H) wird der RISC gebildet. RISC bindet die Ziel-mRNA aufgrund komplementärer Sequenzen und schneidet die gebundene mRNA. Eine weitere Klasse nicht-kodierender RNAs sind die miRNAs. Sie werden endogen von RNA Polymerase II Promotoren zunächst als längere primäre Transkripte (prä-miRNAs) exprimiert und anschließend durch Drosha und seinem Kofaktor DGCR8 in ca. 70 nt große prä-miRNAs prozessiert. siRNAs können endogen von shRNA-Expressionskassetten, die einen RNA-Polymerase III Promotor enthalten, exprimiert werden. Sowohl prä-miRNAs als auch shRNAs werden mit Hilfe von Exportin-5 in das Zytoplasma der Zelle geschleust, wo beide von Dicer prozessiert werden, indem die Haarnadelschleife entfernt wird. RNAi führt im Falle von siRNAs zur Inhibition der Translation durch eine Degradation der Ziel-mRNA (1). Im Falle von miRNAs können zwei verschiedene Mechanismen zur Inhibition der Translation führen. Bei einer vollständigen Übereinstimmung der Ziel-mRNA mit der miRNA kommt es wie bei siRNAs zur Degradierung der Ziel-mRNA (1). Die meisten tierischen miRNAs besitzen aufgrund von Mutationen und Sekundärstrukturen keine vollständige Übereinstimmung mit ihrer Ziel-mRNA und es kommt zu einer Inhibition der Translation durch die Repression der Ribosomen (2).

Im Gegensatz zu siRNAs, die in Vertebraten nur als molekulares Werkzeug zur Genanalyse eingesetzt werden und eine bestimmte Ziel-mRNA spezifisch inhibieren können, werden microRNAs (miRNAs) endogen exprimiert und können mehrere Ziel-mRNAs inhibieren (Shivdasani 2006). Sie bilden damit eine weitere Gruppe nicht-kodierender, RNA Interferenz vermittelnder RNAs. Die erste miRNA wurde 1993 von Lee et al in *C. elegans* identifiziert (Lee et al. 1993) und konnte bis heute in allen höheren Eukaryoten nachgewiesen werden (Lim et al. 2003). Beim Menschen wurden bisher mehr als 470 miRNAs identifiziert (Ford and Cheng 2008). Sie machen im menschlichen Genom mehr als 3% der gesamten Gene aus und es wird angenommen, dass etwa 30% der Gene durch miRNAs reguliert werden (Farh et al. 2005). Die Expression vieler miRNAs erfolgt dabei Gewebe-spezifisch oder in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium einer Zelle. Diese regulierte Expression spiegelt sich in einer Vielzahl verschiedenster Prozesse, wie Entwicklung, Neurogenese, Hämatopoese, Stammzellendifferenzierung oder Apoptose wieder (Houbaviy et al. 2003; Bartel 2004; Mattick and Makunin 2005; Zhao et al. 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das miRNA-Expressionsmuster während der Entwicklung verschiedener Erkrankungen wie z.B. Krebs verändert ist (Calin and Croce 2006). MiRNAs werden endogen zunächst als lange primäre Transkripte (pri-miRNAs) von RNA Polymerase II Promotoren exprimiert (Lee et al. 2004a) (Abb.3). Anschließend werden durch das nukleäre Enzym Drosha und seinem Kofaktor DGCR8 ca. 70 nt große prä-miRNAs aus der pri-miRNA herausgeschnitten, die durch Exportin-5 in das Zytoplasma der Zelle transportiert werden (Lund et al. 2004). Im Zytoplasma wird die prä-miRNA von Dicer erkannt und prozessiert, indem die Haarnadelschleife entfernt wird. Im Gegensatz zu siRNAs, die ihre Ziel-mRNA im siRISC degradieren, wurden bei den miRNAs zwei verschiedene Mechanismen zur Inhibition der Ziel-mRNA identifiziert. Zunächst wird die miRNA vom Komplex miRISC gebunden, der außerdem die Ziel-mRNA erkennt und sie in der 3' nicht-translatierten Region (3'UTR; 3' *untranslated region*) bindet. MiRNAs, die wie siRNAs zu ihrer Ziel-mRNA vollständig komplementär sind degradieren die gebundene mRNA (Palatnik et al. 2003; Xie et al. 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mehrzahl der bis heute identifizierten tierischen miRNAs aufgrund von Mutationen und ihrer Struktur nicht vollständig komplementär zu ihrer Zielsequenz sind und dadurch die Degradation der Ziel-mRNA verhindert wird (Rana 2007).

Durch die unvollständige Bindung bewirken sie vielmehr eine temporäre Inaktivierung der Genexpression durch eine Repression der Ribosomen während der Translation (Zeng *et al.* 2002). Der Aufbau des miRISC, der dem des siRISC sehr ähnlich zu sein scheint, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden (Ding *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007).

1.8 RNA Interferenz in der Gentherapie

Seit der Entdeckung der RNA Interferenz wurden mehrfach Versuche unternommen, diese Technik in eukaryotische Zellen zu übertragen. Das zunehmende Verständnis der molekularen Mechanismen der RNA Interferenz ermöglicht ihre Entwicklung zu einem Instrument für genomische Genanalysen und therapeutische Ansätze.

Erste Versuche mit langer dsRNA in Säugetier-Zellen schlugen jedoch fehl – es wurde eine Interferonantwort ausgelöst, die zu einer generellen Unterdrückung der Proteinexpression und schließlich zum Zelltod führte (Gantier and Williams 2007), (Reynolds *et al.* 2004). Die Aktivierung des Interferonsystems ist eine Antwort des Immunsystems, die u.a. durch das Eindringen von dsRNA (z.B. virale dsRNA) in Säugetierzellen induziert wird. Dabei kommt es zu einer unspezifischen Degradation viraler und zellulärer mRNA, was schließlich zu einer generellen, unspezifischen Inhibition der Proteinbiosynthese führt (Williams 1997; Sledz and Williams 2004). Zusätzlich kann eine erhöhte Produktion von Interferonen und eine Hochregulierung von Interferon-induzierten Genen mit antiviraler, antiproliferativer oder proapoptotischer Aktivität initiiert werden (Kumar *et al.* 1994). Um den therapeutischen Einsatz von siRNAs zu ermöglichen ist es erforderlich, die Interferonantwort zu umgehen. 2001 konnten Tuschl *et al.* zeigen, dass dies durch die Verwendung von dsRNA Molekülen, die zwischen 20–23 bp groß sind und damit die Produkte der Dicer-vermittelten Reaktion imitieren, möglich ist (Elbashir *et al.* 2001c). Die Möglichkeit, effiziente siRNAs *in vitro* transkribieren oder chemisch synthetisieren zu können, machten sie zu einem weit verbreiteten molekularen Werkzeug funktioneller Genanalysen (Kittler *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004) aber auch zu einem möglichen Ansatz für Therapiestrategien gegen Tumorerkrankungen

(Fuchs and Borkhardt 2007) und virale Infektionen (van Rij and Andino 2006).

Obwohl der therapeutische Nutzen von siRNAs unbestritten ist, dauert die Suche nach einem geeigneten Vehikel für deren Verabreichung an. SiRNAs können *in vitro* transfiziert werden, sind jedoch bedingt durch ihre Kurzlebigkeit und der Verdünnung durch die Zellteilungsrate nur etwa 3-7 Tage aktiv. Für eine therapeutische Strategie ist die Wirkungskdauer von siRNAs nach Transfektion zu kurz. Deshalb wurden Expressionskonstrukte entwickelt, die die siRNAs als shRNAs (*short hairpin* RNAs) unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III Promoters exprimieren (Ill and Chiou 2005). Short hairpin RNAs (shRNAs) sind invertierte Repeats, bestehend aus der *sense* und *antisense* Sequenz einer siRNA, die durch eine Haarnadelschleife miteinander verbunden sind und dadurch eine *stem-loop* Struktur ausbilden (Abb.3). Für ihre Expression in eukaryotischen Zellen werden shRNAs als so genannte Expressionskassetten transfiziert. Diese Expressionskassetten bestehen aus einem RNA-Polymerase III Promotor, der shRNA und einer polyT-Sequenz und ermöglichen sowohl eine hohe transiente Expression und, vor allem in Kombination mit einem lentiviralen Vektor, eine stabile Expression in proliferierenden und ruhenden Zellen (Fewell and Schmitt 2006). In höheren Eukaryoten exprimieren RNA Polymerase III Promotoren einer Vielzahl kurzer nukleärer und zytoplasmatischer nicht-kodierender RNA (Paule and White 2000). Ein bekannter RNA Polymerase III Promotor ist der H1 Promotor, der für die Expression der H1 RNA, der RNA-Komponente der humanen nukleären Rnase P, verantwortlich ist (Baer *et al.* 1990). Myslinski *et al.* konnten anhand von *in vitro* und *in vivo* Transkriptionsstudien zeigen, dass der H1 Promotor aus einer kompakten Struktur von nur 100 bp aufgebaut ist. Innerhalb dieser Struktur liegen die für die Transkription von RNA Polymerase III Promotoren notwendigen *cis*-wirkenden Sequenz-Elemente: das PSE (*proximal sequence element*) und das DSE (*dorsal sequence element*) mit je einem Oktamer-Motiv ATTTGCAT, eine TATA-Box und eine Staf Bindestelle. Die Besonderheit dabei ist die aneinander grenzende Anordnung der Elemente, die eine kooperative Interaktion der an die Elemente gebundenen Proteine des basalen Transkriptionskomplexes vermuten lassen. Durch eine Transfektion der beschriebenen shRNA-Expressionskassetten in die gewünschte Zielzelle werden sie im Zellkern exprimiert und in dem Exportin-5 und RanGTP vermittelten Transport in das Zytoplasma transportiert. Dort werden sie als Substrat von Dicer erkannt und

prozessiert, wobei die Haarnadelschleife entfernt wird und die funktionelle siRNA entsteht (Yi *et al.* 2003) (Abb. 3).

1.9 RNA Interferenz und ihre Bedeutung in der Gentherapie von HIV-1 Infektionen

2002 konnten verschiedene Arbeitsgruppen erstmals zeigen, dass synthetische siRNAs, gerichtet gegen die beiden regulatorischen Proteine tat und rev, die Infektiositätsfaktoren vif und nef, und das Strukturprotein gag, die HIV-1 Replikation und damit die Produktion von Virusnachkommen sowohl in humanen Zelllinien (HEK 293T und Jurkat-Zellen) als auch in primären humanen Zellen (PBMCs = *human peripheral blood mononuclear cells*) inhibieren können (Coburn and Cullen 2002; Jacque *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Novina *et al.* 2002; Boden *et al.* 2004). Neben der Herunterregulierung viraler Proteine wurden auch zelluläre Proteine, wie die HIV-1 Korezeptoren CXCR4 und CCR5, PARP-1 oder Cyclin T1, die für den HIV-1 Lebenszyklus essentiell sind, inhibiert (Chiu *et al.* 2004; Kameoka *et al.* 2004). Diese Ergebnisse beruhten auf einer durch transiente Transfektion synthetischer siRNAs oder vektorbasierter shRNAs hervorgerufene Inhibition der ausgewählten Proteine.

Um die Inhibition der Virusreplikation in einem Langzeitexperiment zu beobachten, etablierten Das *et al.* eine transgene SupT1 Zelllinie mit stabiler shRNA-Expression gegen einen Bereich der nef mRNA (SupT1^{nef}). Drei Wochen nach der HIV-1 Infektion traten hier jedoch virale *escape* Mutanten auf, die sich durch die nef-shRNA nicht mehr inhibieren ließen. PCR-Analysen der HIV-1 Mutanten wiesen neben Nukleotidsubstitutionen auch einem kompletten oder einem Teilverlust der nef Zielsequenz auf (Das *et al.* 2004). Boden *et al.* machten bei der Verwendung einer shRNA gegen tat Protein ähnliche Beobachtungen (Boden *et al.* 2003). Zusätzlich kann es neben derartigen Veränderungen der Primärstruktur durch den Selektionsdruck einer shRNA auch zu Veränderungen der Sekundärstruktur der RNA kommen, wodurch die Zielsequenz vor einem Angriff durch den siRISC-Komplex verdeckt wird (Westerhout *et al.* 2005).

Die dargestellten Beobachtungen verdeutlichen die Notwendigkeit optimierter

Strategien für die Verwendung von shRNAs zu therapeutischen Zwecken. In den letzten Jahren wurden zu diesem Zweck verschiedene Ansätze experimentell untersucht. Insbesondere scheint es Erfolg versprechend zu sein, mehrerer shRNAs gegen verschiedene hochkonservierte Bereiche viraler Proteine zu richten, um so die Etablierung von *escape* Mutanten zu minimieren oder herauszuzögern (von Eije *et al.* 2008). Dazu werden entweder mehrere shRNA Expressionskassetten von einem lentiviralen Vektor (ter Brake *et al.* 2006) oder mehrere shRNAs von einem polycistronischen miRNA Transkript durch nur einen RNA-Polymerase II Promoter exprimiert (Liu *et al.* 2008).

Um effiziente shRNAs zu identifizieren, besteht sowohl die Möglichkeit, siRNAs mit speziellen Algorithmen zu entwerfen (Holen 2006; Shah *et al.* 2007) aber auch shRNA-Bibliotheken zu verwenden. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Computer-Programmen zum automatisierten Design von siRNAs entwickelt (Henschel *et al.* 2004; Wang and Mu 2004; Yuan *et al.* 2004; Santoyo *et al.* 2005; Naito *et al.* 2006). Um die Effizienz einer siRNA vorherzusagen, analysieren die verwendeten Algorithmen sowohl charakteristische Sequenzmerkmale innerhalb der siRNA und die mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen des *sense* und *antisense* Stranges der siRNA als auch die Sekundärstruktur der Ziel-mRNA und das Auftreten möglicher *off-target* Effekte. Dabei wird angenommen, dass die Effizienz einer siRNA hauptsächlich durch die siRNA Sequenz selbst bestimmt wird. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Regeln zum Entwurf einer effizienten siRNA Sequenz aufgestellt, die auf experimentellen Daten verschiedener Arbeitsgruppen beruhen (Reynolds *et al.* 2004; Jagla *et al.* 2005). Die Validierung der so entstandenen siRNAs, zeigte jedoch, dass nur bei etwa 30–50% der siRNAs die Effizienz korrekt vorhergesagt wurde. Diese Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlicher RNAi-Effizienz ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Gewichtung der aufgestellten Regeln für die Bestimmung der siRNA-Sequenz nicht berücksichtigt wird und die Regeln in gleichem Maße in die Erstellung der Sequenz einfließen (Li and Cha 2007). Problematisch bei der Verwendung dieser Design-Programme bleibt außerdem, dass mögliche effiziente siRNAs als ineffizient beurteilt werden können.

Bei der Verwendung von si- und shRNA-Bibliotheken werden alle theoretisch

möglichen siRNA-Sequenzen gegen die gewünschte Ziel-mRNA synthetisiert und anschließend experimentell validiert. Die Validierung erfolgt im Optimalfall nach einer geeigneten Selektion und Anreicherung potenter siRNA-Sequenzen. Die Herstellung solcher Bibliotheken aus synthetischen Oligonukleotiden ist jedoch langsam und sehr kostenintensiv. Daher werden zunehmend molekularbiologische Techniken entwickelt, mit denen Bibliotheken schnell und kostengünstig produziert und validiert werden können (Luo *et al.* 2004; Sen *et al.* 2004; Shirane *et al.* 2004).

2 Ziele der Arbeit

Bisher wurden siRNAs bzw. shRNAs gegen HIV mittels spezieller öffentlicher Algorithmen entworfen. Im Hinblick auf einen etwaigen Einsatz in gentherapeutischen Studien muss die Effizienz und mögliche toxische Effekte solcher Sequenzen eingehend untersucht werden. Auch das Auftreten von viralen *escape*-Varianten gegen einzelne si- bzw. shRNA-Spezies spricht für die Notwendigkeit von mehreren hochkonservierten und effizienten inhibitorischen Sequenzen. Aufgrund der kostenintensiven Produktion und Evaluierung einer synthetisch hergestellten siRNA-Bibliothek und ihren limitierten Eigenschaften für eine nachhaltige Strategie zur HIV-Therapie, sollten in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal potente shRNAs gegen HIV-1 aus einer randomisierten shRNA-Bibliothek selektiert werden. Zu diesem Zweck sollte eine randomisierte shRNA-Bibliothek auf der Basis von pNL4.3 konstruiert werden. Für die Selektion potenter shRNAs sollten außerdem HIV-1 spezifische Selektionszelllinien etabliert werden, die eine Fusions-mRNA aus der Thymidinkinase von Herpes-Simplex Virus und cDNA-Fragmenten von HIV-1 exprimieren würden und eine Positivselektion potenter shRNAs nach Ganciclovirbehandlung ermöglichen sollten. Zur Validierung der selektierten shRNAs sollten HIV-1 spezifische Luziferase-Assays durchgeführt werden. Die anschließende Charakterisierung der selektierten und validierten shRNAs würde anhand struktureller als auch funktioneller Analysen durchgeführt werden. Um die Konvertibilität der shRNA-Bibliothek zu überprüfen, sollte das inhibitorische Potential der RNA Polymerase III gesteuerten shRNAs mit dem von synthetischen siRNA-Derivaten oder shRNA-Derivaten in einer miRNA-Umgebung gegenüber gestellt werden. Im Hinblick auf einen möglichen gentherapeutischen Einsatz sollten mittels lentiviralem shRNA-Transfer stabil transduzierte HIV-1 permissive HeLa-P4-Zelllinien etabliert werden, um eine mögliche Inhibition der Infektion mit HIV *in vitro* überprüfen zu können.

3 *Material und Methoden*

3.1 Zellkulturmaterial

Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze wurden von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Plastikware für die Zellkultur wurde von TPP (Trasadingen, Schweiz), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder BD Biosciences (Falcon™; Franklin Lakes, USA) bezogen.

3.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entweder von Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Agarose wurde von Peqlab (Erlangen, Deutschland) bezogen.

3.3 Medien und Puffer

Blockierungspuffer (Western Blots)	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 % Magermilch, 2 % BSA, 0,1 % Tween-20, (pH 7,4 – 7,6)
DNA Probenpuffer	20% Ficoll-400, 0,025% Xylencyanol, 0,025% Bromphenolblau (kann 1% SDS enthalten)
dYT (1l)	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7, autoklavieren
Inoue- Transformationspuffer	10 mM PIPES (pH 6,7), 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl; 0,2 µm filtern und bei -20°C lagern
2 x HeBS Puffer	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,05)
Kochsalzpuffer (Isolierung von DNA)	0,5 M NaCl, 1 mM EDTA

Kristallviolett (Lenti)	2% Kristallviolett in 3% Formaldehyd und 10% Ethanol
LB (1l)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (pH 7), autoklavieren
LB Agar	LB mit 15 g/l Agar, autoklavieren und bei 55°C mit entsprechenden Antibiotika versetzt in Platten gießen
20 x S-PBS (2l)	14 g NaCl, 2,76 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 3,12 g NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O, 10,88 g K ₂ HPO ₄ , (pH 7,6)
Oligonukleotid Annealingpuffer	30 mM Hepes (pH 7,4), 100 mM Kac, 2 mM MgAc, 1 mM EDTA
5 x Proteinprobenpuffer	mM Tris (pH 6,8), 20% Glycerol, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 65 frisch: 5% β-Mercaptoethanol
Puffer A	50 mM PIPES, pH 7, 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM EGTA, protease complete ocktail (Roche)
2 x RNA Ladepuffer	95% Formamid, 0.025% SDS, 0.025% Bromophenolblau, 0.025% Xylencyanol, 0.025% Ethidiumbromid, 0.5 mM EDTA
10 x SDS Laufpuffer (SDS-PAGE)	0.25 M Tris; 2 M Glycin; 1 % SDS
SOB (1l)	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl (pH 7,0), autoklavieren, frisch: 10 mM steriles MgCl ₂
SOC	wie SOB, jedoch zusätzlich mit 20 mM Glukose (frisch)
20 x SSC Puffer	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat (pH 7)
Transferpuffer (Western Blots)	25 mM Tris (pH 8,3), 150 mM NaCl, 20% Methanol
50 x TAE Puffer (1l)	242 g TrisBase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Tail Lysis Buffer	100 mM Tris (pH 8,5), 200 mM NaCl, 0,2% SDS, 5 mM EDTA, frisch: 0,2 – 2 mg/ml Proteinase K
10 x TBE Puffer	108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TE Puffer	10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA
10 x MOPS Puffer	0,4 M MOPS (2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; pH 7), 0,1 M NaAc, 10 mM EDTA; mit DEPC Wasser ansetzen, steril filtern, kühl und dunkel lagern

3.4 Kits und Enzyme

Sequenzierung	BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit dGTP BigDye [®] Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems; Massachusetts, USA)
DNA Präparation	NucleoSpin Plasmid, NucleoSpin Multi-96 Plus Plasmid, NucleoBond PC 500 Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RNA Präparationen	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Gelextraktion PCR clean-up	NucleoSpinExtractII Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
mRNA Präparation	NucleoTrap mRNA Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Luziferase Assay	Luciferase Assay Reporter Kit Promega (Mannheim, Deutschland)
p24 Antigen-ELISA	INNOTEST [®] HIV Antigen mAB INNOGENETICS (Gent, Belgien)
Restriktions- endonukleasen	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland) New England Biolabs (NEB, Ipswich, England)
Klenow-Fragment	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
LR Clonase [®] II Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Mung Bean Nuclease	NEB (Ipswich, England)
φ 29 Polymerase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
Proteinase K	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
Phosphatasen	Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, England)
anorganische Pyrophosphatase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
T4 DNA Polymerase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
T4 DNA Ligase	<i>Rapid ligation kit</i> (Fermentas; Leon-Roth, Deutschland)

thermophile
DNA Polymerasen

Taq DNA Polymerase
(Fermentas, Leon-Roth, Deutschland),
PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads
(GE Healthcare; Piscataway, USA),
Pfu DNA Polymerase (Promega, Madison, USA)
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich,
England)

3.5 Antikörper

Antigen	Isotyp	Firma	Verdünnung
HSV-TK	polyklonal Hase	Prof. W.C. Summers Yale University	1:5000
Hsp70	monoklonal Maus	BD Pharmingen	1:1000
Maus IgG	polyklonal Ziege	Sigma	1:3000
Hase IgG	polyklonal Ziege	Sigma	1:3000

3.6 Oligonukleotide

3.6.1 Primer

RCA-Primer

RCA1 5' ACTGGTAA 3'
RCA2 5' GCCGTCGT 3'

Klonierungsprimer

5' TK-Sal I 5' GATCGTCGACCAAGTGTGGTTTTGCAAGAGG 3'
3' TK-Sal I 5' GATCGTCGACTCAGTTAGCCTCCCCCATC 3'

5' TKpA-BamH I	5' GATCGGATCCAACACGGAAGGAGACAATACC 3'
3' TKpA-Xba I	5' GATCTCTAGAGGGACCCCGTCCCTAACC 3'
5' HIV-1.1- Xho I	5' GATCCTCGAGTGGAAGGGCTAATTTGGTCC 3'
3' HIV-1.1-BamH I	5' GATCGGATCCAGAAAATTCCCTGGCCTTCC 3'
5' HIV-1.2- Xho I	5' GATCCTCGAGGGCCAGGGAATTTTCTTCAG 3'
3' HIV-1.2-BamH I	5' GATCGGATCCTAACTTCACTAAGGGAGGGG 3'
5' HIV-1.3- Xho I	5' GATCCTCGAGATACCCCTCCCTTAGTGAAG 3'
3' HIV-1.3-BamH I	5' GATCGGATCCTTGTTCCATCTGTCCTCTG 3'
5' puro-Xma I	5' GATCCCCGGGATGACCGAGTACAAGCCC 3'
3' puro-Bpu 1102 I	5' GATCGCTTAGCTCAGGCACCGGGCTTGCG 3'
TA-sense	5'GATCTCCAGTTCTGAATTGGCCAGTACACAAATGGA 3'
TA-antisense	5' AGCTTCCATTTGTGTACTGGCCAATTCAGAACTGGA 3'

**Sequenzierprimer
pENTR-Derivate**

3'Entr all	5' GGTGCTAGCGAGCTATTT 3'
5'Entr 2	5' CTAGCGAGCTATTTCTAGAAC 3'
DTOPO_H1	5' CACCAATATTTGCATGTGCGCTATGTG 3'
DTOPO_super3'	5' CACCAGGTCGACGGTATCGATAAG 3'

**Sequenzierprimer
pLenti-Vektoren**

3'Lenti	5' GGTTAGGGATAGGCTTACC 3'
5'Lenti	5' GGTGGAATTCTGCAGATATC 3'

**Sequenzierprimer
shRNA-Vektoren**

H1 min	5' AATATTTGCATGTGCGCTATGTGTTCTG 3'
super3'	5' AGGTCGACGGTATCGATAAG 3'

Nested PCR-Primer

H1 forward	5' AATTCGAACGCTGACGTCATCAAC 3'
H1 reverse	5' GAGCTATTTAAATCGATTGGTACCG 3'
H1-1	5' AATATTTGCATGTGCGCTATGTG 3'
super3'	5' AGGTCGACGGTATCGATAAG 3'

**Klonierung
der Bibliothek**

3' loop	5' GTTGAATCCCGGTTCAAGAGACCGGGATCCAAC 3'
---------	---

5' loop 5' GGAGAGACTCACTGGCCGTCGTTTTACCAGTGAAGAT
CTCCN[N~Q] 3'

**miRNA-
Expressionskassetten
(ohne
„Nukleotidblasen“)**

gag/pol6-sense 5' TGCTGCTGCTTCTGAGAGGGAGTTGTGTTTTGGCCAC
TGACTGACACAACCTCCCTCTCAGAAGCAG 3'

gag/pol6-antisense 5' CCTGCTGCTTCTGAGAGGGAGTTGTGTCAGTCAGTGG
CCAAAACACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGC 3'

gag/pol10-sense 5' TGCTGCACTAAGGGAGGGGTATTGACGTTTTGGCCAC
TGACTGACGTCAATACCCCCCCTTAGTG 3'

gag/pol10-antisense 5' CCTGCACTAAGGGGGGGTATTGACGTCAGTCAGTGG
CCAAAACGTCAATACCCCTCCCTTAGTGC 3'

gag/pol20-sense 5' TGCTGATTGTGACGAGGGGTGCTGCGTTTTGGCCAC
TGACTGACGCAGCGACCCCGTCACAAT 3'

gag/pol20-antisense 5' CCTGATTGTGACGGGGGGTTCGCTGCGTCAGTCAGTG
GCCAAAACGCAGCGACCCCTCGTCACAATC 3'

scr-DD-top 5' TGCTGTTACGCTTCTTAAATACTCCTGTTTTGGCCAC
TGACTGACAGGAGTATTTTTGAAGCGTAA 3'

scr-DD-bot 5' CCTGTTACGCTTCAAAAATACTCCTGTCAGTCAGTGG
CCAAAACAGGAGTATTTAAGAAGCGTAAC 3'

**miRNA-
Expressionskassetten
(mit
„Nukleotidblasen“)**

gag/pol6-top 5' TGCTGCTGCTTCTGAGAGGGAGTTGTGTTTTGGCCAC
TGACTGACACAACCTCCCTCAGAAGCAG 3'

gag/pol6-bot 5' CCTGCTGCTTCTGAGGGAGTTGTGTCAGTCAGTGGCC
AAAACACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGC 3'

gag/pol10-top 5' TGCTGCACTAAGGGAGGGGTATTGACGTTTTGGCCAC
TGACTGACGTCAATACCCCCCCTTAGTG 3'

gag /pol10-bot 5' CCTGCACTAAGGGGGGTATTGACGTCAGTCAGTGGCC
AAAACGTCAATACCCCTCCCTTAGTGC 3'

gag/pol20-top 5' TGCTGATTGTGACGAGGGGTGCTGCGTTTTGGCCAC
TGACTGACGCAGCGACCCCGTCACAAT 3'

gag/pol20-bot 5' CCTGATTGTGACGGGGTTCGCTGCGTCAGTCAGTGGC
CAAACGCAGCGACCCCTCGTCACAATC 3'

scr-DD-top 5' TGCTGTTACGCTTCTTAAATACTCCTGTTTTGGCCAC
TGACTGACAGGAGTATTTGAAGCGTAA 3'

scr-DD-bot

5' CCTGTTACGCTTCAAATACTCCTGTCAGTCAGTGGCC
 AAAACAGGAGTATTTAAGAAGCGTAAC 3'

3.6.2 Synthetische siRNAs

Synthetische siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) als einzelsträngige RNA-Oligonukleotide bezogen. Die *sense* und *antisense*-Stränge wurden wie beschrieben annealed.

3.7 Escherichia coli Stämme

XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

DB3.1™: F⁻ gyrA462 endA Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl5 λ⁻ leu mtl1

Stbl3™: F⁻ mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl5 λ⁻ leu mtl1

3.8 Methoden zur Präparation, Propagation und Analyse von DNA

3.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach Inoue

Ultrakompetente Bakterien wurden nach der Methode von Inoue (Sambrook and Russell 2000) hergestellt. Dafür wurde zunächst eine klonale Starterkultur vom gewünschten Stamm in SOB inokuliert und 6–8 h bei 37°C geschüttelt (225 rpm). Jeweils 10, 4 oder 2 ml der Starterkultur wurden in 250 ml SOB Medium überführt und ÜN bei 18°C geschüttelt. Bei OD₆₀₀ = 0,55 wurde die ÜN Kultur auf Eis 10' inkubiert und (10', 2500 g, 4°C) pelletiert. Die Pellets wurden von allen Medienresten

befreit, vorsichtig in 80 ml Inoue Transformationspuffer (4°C) resuspendiert und erneut pelletiert. Pellets wurden wieder von allen Mediumresten befreit und in 10 ml Inoue Transformationspuffer (4°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,75 ml DMSO wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Durch diese Methode wurde eine Transformationseffizienz von $2 \times 10^7 - 10^8$ Kolonien/µg pUC18 DNA erzielt.

3.8.2 Plasmid DNA Präparation

Plasmid DNA wurde in *E. coli* transformiert. *High-copy* Plasmide wurden in LB Medium und *low-copy* Plasmide in dYT Medium ÜN propagiert. Die Selektion erfolgte mit entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Ampicillin: 150 µg/ml

Kanamycin: 30 µg/ml

Spectinomycin: 30 µg/ml

Transformation von Plasmid DNA: 1 ng Plasmid DNA wurde bei 4°C, für 20' mit 100 µl kompetenten Bakterien inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90". Danach wurden die Bakterien 3' auf Eis inkubiert. Die Expression des Resistenzmarkers erfolgte mit 500 µl SOC Medium bei 250 rpm, 37°C für 1 h. Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C ÜN inkubiert.

Isolation von Plasmid DNA: Plasmid DNA wurde aus klonalen ÜN Kulturen isoliert. Für die Analyse von Klonierungsreaktionen wurde Plasmid DNA aus jeweils 1 ml der ÜN Kultur mit Silicagel Präparationssäulen nach alkalischer Lyse der Bakterien isoliert. Für die Analyse von Klonierungsreaktionen der shRNA-Expressionskassetten in pENTR/TA wurde Plasmid DNA aus jeweils 1,5 ml der ÜN Kultur im 96 well Format wie oben beschrieben isoliert. Plasmid DNA, die in eukaryotische Zellen transfiziert werden sollte, wurde über Ionenaustauschsäulen isoliert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

3.8.3 *Präparation genomischer DNA*

Eukaryotische DNA wurde nach Lyse von Zellen in *Tail Lysis Buffer* mit 0,5 – 2 mg/ml Proteinase K bei 56°C mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Für das Screening effizienter shRNA-Expressionskassetten wurden die Zellen in 96 well Mirotiterplatten lysiert (50 µl) und die DNA mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert und pelletiert (60', 3000 g, 4°C). Nach Inversion der Platten über einen Filterpapierstapel wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen (60', 3000 g, RT) und ca. zwei Stunden an der Luft getrocknet. Getrocknete genomische DNA wurde in 35 µl vorgewärmten TE-Puffer (37°C) resuspendiert..

3.8.4 *Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentration DNA haltiger Lösungen wurde nach Verdünnung in TE spektrophotometrisch bei 260 nm nach folgender Formel berechnet:

$$C = OD_{260} \times 50 \text{ mg/ml}$$

Der Koeffizient OD_{260}/OD_{280} sollte mindestens 1,8 betragen damit eine Kontamination durch Proteine ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wurde die Konzentration visuell gegenüber eines Leiter Standards mit bekannten DNA Mengen bestimmt.

3.8.5 *Trennung und Visualisierung von DNA*

Native Polyacrylamid Gelelektrophorese: DNA Moleküle unter einer Größe von 100 bp (annealed Oligonukleotide, Zwischenprodukte der Konstruktion der shRNA-Bibliothek) wurden über 20% Polyacrylamid in TBE über vertikale Gelelektrophorese bei 200 V aufgetrennt. Die Extraktion gewünschter Banden erfolgte nach Elution aus dem entsprechenden Gelfragment in (Kochsalzpuffer (0,5 M NaCl, 1 mM EDTA) schüttelnd für 1 h bei 50°C. Danach konnte die DNA aus dem Eluat alkoholisch gefällt werden.

Agarose Gelelektrophorese: Die Trennung der DNA erfolgte entweder mit TAE (5

V/cm) bei Routineläufen oder mit TBE (1 V/cm, ÜN) für Southern Blots. Gele wurden mit 100 ng/ml Ethidiumbromid vorgefärbt.

UV-vermittelte Visualisierung von DNA: Ethidiumbromid interkalierende DNA konnte mit UV Licht (305 nm) visualisiert werden. Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera gemacht. Zur Exzision DNA haltiger Banden wurde das Gel bei 365 nm exponiert, um mögliches *cross-linking* zu minimieren.

3.8.6 Restriktionsendonucleolytische Spaltung von DNA

Restriktionsendonucleolytische Spaltung von Plasmid DNA: 1 µg DNA wurde in 50 µl Gesamtvolumen mit dem zehnfachen Überschuss am gewünschten Enzym (10 U/µg) 1 – 2 h bei der optimalen Temperatur mit dem vorgesehenen Puffer inkubiert.

Partielle endonucleolytische Spaltung von Plasmid DNA: Vier Ansätze mit je 3 µg DNA und einer 1:5er Verdünnungsreihe des gewünschten Enzyms – beginnend bei 10 U im ersten Ansatz – wurden 10' bei der optimalen Temperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA Probenpuffer mit 1% SDS gestoppt und die gewünschte Bande über Gelextraktion aufgereinigt.

Fragmentierung der cDNA von HIV-1: 5 µg cDNA wurde in 20 µl mit 1×10^{-3} U DNase I fragmentiert (10', 37°C). Die Reaktion wurde durch vortexen (30'') und Hitze (10', 65°C) gestoppt. Zur Isolierung der gewünschten Fragmentgrößen wurde die Reaktion auf TBE-Gelen aufgetrennt und isoliert.

3.8.7 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte nach der Sanger Methode (Sanger *et al.* 1977) mit differentiell fluoreszenzmarkierten, zu Kettenabbrüchen führenden 2'-3'-Dideoxyribonukleotiden. Die Einzelstrang PCR Reaktionen wurden in 10 µl Totalvolumen angesetzt. Standard Einzelstrang PCRs für die Sequenzierung von Plasmid-DNA enthielten 100 – 250 ng Template-DNA sowie 3,3 pmol Sequenzierprimer und 1 µl BigDye EnzymMix in 1 x Reaktionspuffer und wurden mit einer fünfminütigen Denaturierung (5', 94°C) initiiert. Es folgten 30 Zyklen mit

Denaturierung (30", 94°C), Primerhybridisierung und Elongation (2'10", 60°C).

Für die Sequenzierung der shRNA-Expressionskassetten im Vektorhintergrund pENTR/TA wurde ein optimierter Einzelstrang PCR Ansatz angewendet. Es wurden das *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* und das *dGTP BigDye[®] Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kits* (applied biosystems) in einem Verhältnis von 3:1 und zusätzlich 0,83 M Betaine eingesetzt. Die Reaktionen enthielten in einem 10 µl Totalvolumen weiterhin 300 ng Plasmid-DNA sowie 3,3 pmol Sequenzierprimer. Als PCR Programm wurde eine TouchDown PCR angewendet. Im initialen Denaturierungsschritt (5', 98°C) enthielt der Reaktionsansatz lediglich Plasmid-DNA und Sequenzierprimer. Für die darauf folgenden 30 Zyklen mit Denaturierung (10", 98°C) sowie Primerhybridisierung und Elongation bei sinkenden Temperaturen (30", 75°C; 30", 70°C; 60", 65°C; 60", 60°C; 60", 55°C) wurden die übrigen oben genannten Komponenten hinzugefügt. Durch die sinkenden Temperaturen während der Primerbindung und der Elongation sollte eine spezifische Primerbindung unterstützt werden.

Die Sequenzen wurden im Sequenzierlabor des *Center of Genomics cologne* gelesen. Die Analyse erfolgte mit Chromas Software Version 2,33 (Technelysium, Tewantin, Australia).

3.8.8 Spezifischer Nachweis und Ampifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR: *polymerase chain reaction*) wurden nach der 1987 beschriebenen Methode (Mullis and Faloona 1987) routinemäßig mit 5 ng Plasmid DNA oder 50 – 500 ng genomischer DNA als Template angesetzt. Die *sense* und *anti-sense* Primer wurden so gewählt, dass sie hochkonservierte 18 – 25 nt lange Sequenzen enthielten, bei ca. 60°C hybridisieren konnten, keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten und wenn möglich mit den Basen Cytosin oder Guanosin am 3' Ende ausgestattet waren. Die Reaktionen wurden nach Bedarf in 10 – 50 µl Totalvolumen nach Herstellerangaben (bei den Kits) mit je 10 pmol der jeweiligen Primer, 200 µM dNTPs und dem mitgelieferten Puffer auf Eis angesetzt und sofort auf die entsprechende Denaturierungstemperatur eingestellt (Hotstart).Die

PCR Reaktion began standartmäßig mit einer zweiminütigen initialen Denaturierung (2', 94°C, 98°C bei Phusion™) gefolgt von 20 – 60 Zyklen von kurzen Denaturierungen (10'' – 20''), Primerhybridisierungen (20'' – 30'', $T_m+3^\circ\text{C}$ bei Phusion™,) und Elongationen (1'/kb bei Taq Polymerase, 2'/kb bei *proof-reading* Polymerasen sowie 30''/kb bei Phusion™) bei 68°C (*proof-reading* Polymerasen) oder 72°C (Taq und Phusion™). Die Reaktionen wurden nach einer finalen fünfminütigen Elongation (5', 72°C) beendet.

3.8.9 PCR-Anwendungen

Kolonie PCR: Diese Methode wurde angewandt, um eine Vorauswahl zu pickender Kolonien bei komplizierten Klonierungsreaktionen mit vielen falschpositiven Kolonien zu treffen. Als Template diente hierbei Material einer Kolonie in der Größe etwa einer Stecknadelspitze. Die initiale Denaturierung genügte, um auch die Bakterien zu lysieren und deren DNA freizusetzen. Die PCR bestand aus 20 – 25 Zyklen.

Temperaturgradienten PCR: Die Gradienten PCR wurde zur Bestimmung der optimalen Annealing- und Elongationstemperaturen angewendet. Die PCR wurde wie oben für die Taq-Polymerase beschrieben angesetzt. Für die Optimierung der Annealingtemperatur wurde ein Temperaturgradient im Bereich von 56°C – 68°C gewählt, für die Optimierung der Elongationstemperatur ein Temperaturgradient im Bereich von 64°C – 78°C. Die Reaktionen wurden nach der PCR auf Agarosegelen analysiert.

Nested PCR: Diese Methode wurde angewandt, um die shRNA-Expressionskassetten aus der genomischen DNA der Selektionszelllinien stärker amplifizieren zu können. Dafür wurde in einer ersten PCR mit Hilfe der Taq-Polymerase ein Fragment von 350 bp amplifiziert (30 Zyklen), das das endgültige Produkt beinhaltet. Das Amplikon der ersten Reaktion wurde dann als Template für die zweite Taq-Polymerase gesteuerte PCR verwendet, die ein PCR-Produkt von 175 bp generiert und aus 30 Zyklen bestand.

Rolling circle amplification (RCA): Für die Synthese des komplementären Stranges der shRNAs während der Konstruktion der shRNA-Bibliothek wurde die RCA eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestehend aus Template-DNA, 50 pmol RCA-

Primern (RCA 1 und 2), 0,01 U Pyrophosphatase, 10 U ϕ 29 Polymerase und 200 μ M dNTPs wurde in 20 μ l Totalvolumen angesetzt. Für die Amplifikation waren keine Zyklen bei verschiedenen Temperaturen notwendig. Die Reaktion wurde ü.N. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die ϕ 29 Polymerase inaktiviert (10', 65°C). Das entstandene DNA-Konkatermer wurden für anschließende endonukleolytische Spaltungen alkoholisch gefällt.

3.9 Klonierung

3.9.1 Manipulation kohäsiver DNA-Enden

Manipulation 5' oder 3' vorstehender DNA Enden: 1 μ g Plasmid DNA wurde mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten und anschließend im selben Ansatz 30' mit 5 U T4 DNA Polymerase sowie 10 U Klenow Fragment und 200 μ M der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) inkubiert. Das Enzym besitzt eine 3'→5' Exonukleaseaktivität und generiert *blunt ends* aus 3' Überhängen. Die hohe Prozessivität bei ihrer 5'→3' Polymeraseaktivität kann darüber hinaus zum Auffüllen von 5' Überhängen genutzt werden. Die Reaktion wurde anschließend Hitze inaktiviert (10', 70°C).

Generierung von *blunt ends* aus 5' überhängenden DNA Enden: 1 μ g geschnittene Plasmid DNA wurde 30' bei 30°C mit 1 U Mung Bean Nuclease in 1 x Mung Bean Nuclease Puffer inkubiert, um den 5' Überhang abzubauen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA Probenpuffer mit 1% SDS gestoppt.

3.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Vektor DNA wurde nach endonukleolytischer Spaltung für *blunt end* Ligationen an den 5' Enden dephosphoryliert, um Selbstligation zu verhindern. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 1 μ g Plasmid DNA mit 1 x Antarctic Phosphatase Puffer aufgefüllt und 15' mit 5 U Antarctic Phosphatase bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 5' bei 65°C denaturiert.

3.9.3 Ligation

50 ng Vektor DNA wurde mit einem molaren Verhältnis von 1:3 zum entsprechenden Insert in 20 µl Totalvolumen und 5 U T4 DNA Ligase in 1 x *rapid ligation buffer* 5' – 30' bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation von *annealed* Oligonukleotiden und Vektor wurden 80 ng Insert und 50 ng Vektor 30' ligiert.

3.9.4 Ligation von 3' loop und 5' loop an DNA-Fragment

Für die Ligation von *3' loop* und *5' loop* an die fragmentierte cDNA, wurden zunächst die *3' loop*- und *5' loop*-Oligonukleotide in Oligonukleotid-Annealingpuffer intramolekular hybridisiert (1', 90°C; 60', 37°C), wobei sie aufgrund komplementärer Nukleotide eine Haarnadelschleife ausbilden. *3' loop* und *5' loop* wurden in einem Verhältnis von 1: 3 an die framgentierte cDNA ligiert (1h, RT, *Rapid ligation kit*).

3.9.5 Klonierung des Selektionsvektors pENTR/HSV-TK/HIV-1/pA

Zur Herstellung von HeLa-Selektionszelllinien zur Positivselektion der HIV-1 spezifischen shRNA-Bibliothek wurde der Vektor pENTR/HSV-TK/HIV-1/pA konstruiert. Dieser beinhaltet eine Kassetten zur Expression einer Fusions-mRNA, bestehend aus dem Thymidinkinase-Gen (HSV-TK + P) und der polyA Sequenz von Herpes Simplex Virus Typ 1 und einem Fragment von pNL4.3, einem molekularen Klon von HIV-1. Zunächst wurde der Vektor pENTR/HSV-TK/pA konstruiert. Dazu wurde der Vektor pENTR/siRNAH1 mit *Xho I* geschnitten und dephosphoryliert. HSV-TK + P sowie die polyA-Sequenz wurden mit Pfu Polymerase mittels PCR aus dem Vektor pRAPIDflirt PCR amplifiziert. Im nächsten Schritt wurde HSV-TK + P über die von den Primern eingeführten *Sal I* Schnittstellen in den *Xho I* geschnittenen pENTR/siRNAH1 kloniert. Die richtige Orientierung von HSV-TK + P wurde nach Amplifikation in XL-1 Blue *E.coli* und Isolierung des generierten Vektors pENTR/HSV-TK/ pA durch eine endonukleolytische Spaltung mit *SnaB I* und *Xba I* überprüft. Anschließend wurde eine ausgewählter positiver Klon zur Ligation der polyA Sequenz mit *Xba I* und *BamH I* geschnitten und das polyA PCR-Produkt über die von den Primern eingeführten Schnittstellen kloniert. Der entstandene Vektor

pENTR/HSV-TK/pA wurde in XL-1 Blue amplifiziert. Nach einer analytischen endonukleolytischen Spaltung wurden mehrerer Klone sequenziert.

Einer der positiv sequenzierten Klone wurde für die Klonierung der HIV-1 Fragmente mit *BamH I* und *Sal I* geschnitten. Die drei HIV-1 Fragmente HIV-1.1, HIV-1.2 und HIV-1.3 wurden von der Pfu Polymerase mittels PCR aus dem Vektor pNL4.3 amplifiziert. Anschließend wurden das PCR-Produkt über die von den Primern eingeführten *BamH I* und *Xho I* Schnittstellen in den *BamH I* und *Sal I* geschnittenen pENTR/HSV-TK/pA kloniert. Die resultierenden Vektoren wurden nach Amplifikation in XL-1 Blue sequenziert.

3.9.6 Klonierung der miRNA- Expressionsvektoren

Die miRNA-Expressionsvektoren erfolgte nach Herstellerangaben, die im *Manual ViraPower™ Lentiviral Expression System* (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) beschrieben sind. Für die Expression der miRNAs wurde der Vektor pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR verwendet.

Zu Klonierung der shRNA Expressionskassetten wurden für jede shRNA zwei 63 nt DNA Oligonukleotide bestellt und intermolekularer Hybridisierung. Darüber hinaus für wurden jede miRNA zwei verschiedene Versionen hergestellt. Version 1 wurde nach der im *Manual* beschriebenen Struktur designed und enthielt nach der intermolekularen Hybridisierung die für eine miRNA typischen „Nukleotidblasen“. Version 2 enthielt die ursprünglich identifizierte shRNA-Sequenz. Die Oligonukleotide beinhalteten außerdem ungepaarte Enden für die gerichtete Klonierung in den linearisierten Expressionsvektor. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden anschließend mit T4 DNA Ligase in Vektor pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR kloniert (*Rapid Ligation Kit*; Fermentas, Düren, Deutschland).

3.9.7 Konstruktion lentiviraler Vektoren

3.9.7.1 pENTR[®] Vektoren und Derivate

pENTR/siLib: Der Vektor pEntr/siLib ist ein in dieser Arbeit hergestelltes linearisiertes Derivat von pENTR/siH1/mDD-Stuffer (B.Yazdnapanah). Dazu wurde pENTR/siH1/mDD-Stuffer zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Bbs I* geschnitten und der resultierende 5' [T]₄ Überhang mit dATPs und T4 DNA Polymerase aufgefüllt. Danach wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease *Bgl II* geschnitten. pENTR/siLib stellt den Vektorintergrund für die Konstruktion der shRNA-Bibliothek dar.

pENTR/TA: Der Vektor pENTR/TA ist ein in dieser Arbeit hergestelltes Derivat von pENTR/siH1/mDD-Stuffer und beinhaltet zwei invertierte *XcmI* Schnittstellen, die so designed wurden, dass nach entsprechendem Verdau ein linearisierter Vektor mit je einem einfachen 3' Thymidin Überhang an den Enden generiert und damit TA-cloning ermöglicht wird. Die benötigte Sequenz wurde über Hybridisierung von 36 nt Oligonukleotiden (TA-sense und TA-antisense) hergestellt, die 5' einen *BamHI* und 3' einen *Hind III* Überhang ergaben, kloniert. Der Vektor wurde für die Subklonierung von zu sequenzierenden genomischen shRNA-Expressionskassetten eingesetzt.

3.9.7.2 DESTINATION[®] Vektoren und die Konstruktion der Derivate

pL: Der Vektor pL (B. Yazdanpanah) wurde für die lentivirale Expression des Selektionsmarkergens, das zuvor in pENTR/siRNAH1 (Dr. A. Untergasser) kloniert und über LR Rekombination in pL rekombiniert wurde, verwendet.

pLP/EGFP: pL ist ein in dieser Arbeit hergestelltes Derivat von pL. Für die Selektion eukaryotischer Zellen mit Puromycin, wurde das Gen für den Selektionsmarker Blastocidin gegen das Gen für den Selektionsmarker Puromycin ausgetauscht. Dafür wurde der Vektor pL mit *Sma I* und *Bpu 1102 I* geschnitten und das Puromycin-Gen aus dem Vektor pPGK-puro (Prof. Rajewski, Boston, USA) mit Pfu Polymerase amplifiziert. Anschließend wurden das PCR-Produkt über die von den Primern eingeführten *Xma I* und *Bpu 1102 I* Schnittstellen in den *Sma I* und *Bpu 1102 I* geschnittenen pL kloniert. Um die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmen zu können wurde zusätzlich der Selektionsmarker

EGFP in den Vektor pL/Pac eingefügt. Dazu wurde der Vektor pL/Pac mit *Xba I* und *Sac II* geschnitten und anschließend die *Xba I*-Schnittstelle mit T4 DNA Polymerase *gebluntended*. Die EGFP-Expressionskassette wurde mittels Restriktion mit *Afl III* und *Sac II* und anschließendem *blunt-enden* der *Afl III*-Schnittstelle aus dem Vektor pEGFP-C1 (Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich) gewonnen und in den Vektor pLP ligiert. Der Vektor wurde für die lentivirale Expression von shRNA-Bibliothek genutzt, die zuvor in pENTR/siLib kloniert und über LR Rekombination in pLP/EGFP rekombiniert wurde.

3.9.8 GATEWAY® Klonierung

Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte wurden über GATEWAY® Klonierung hergestellt. Die zunächst in pENTR® Derivate klonierten Expressionskassetten wurden über gerichtete attL/attR Rekombination mit Hilfe des Kits LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) in die entsprechenden DESTINATION® Vektoren rekombiniert. Dabei ersetzt das zwischen den attL-Erkennungssequenzen des pENTR-Vektors gelegene Fragment ein für wt-*E. coli* toxisches, von attR-Erkennungssequenzen flankiertes Fragment auf dem lentiviralen DESTINATION® Vektor. Die Reaktionen wurden zwar nach Herstellerangaben allerdings in einem kleineren Gesamtvolumen (5µl total) und ÜN angesetzt. Die angegebenen Mengen wurden dementsprechend angepasst.

3.10 Arbeiten mit RNA

3.10.1 Aufreinigung von RNA

Aufreinigung von RNA durch TRIZOL® Fällung: Die RNA Aufreinigung mit TRIZOL® basiert auf dem Zellaufschluss mit dem chaotropischen Salz Guanidiniumthiocyanat, das auch in den Lysispuffern der Kit Hersteller Verwendung findet, und einer phenolischen Extraktion von denaturierten Proteinen. Dafür wurde ein Zellpellet mit 600 µl TRIZOL® homogenisiert und 10' auf Eis äquilibriert. Dann wurde 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) bei Raumtemperatur hinzugegeben, gevortext und

5' inkubiert. Debris wurde pelletiert (5', 20.000g). Die wässrige Phase enthielt die RNA und wurde mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert (10', 20000 g). Das RNA Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (10', 20000 g) und dann 5' – 15' luftgetrocknet. Das Pellet wurde schließlich mit DEPC (2 ml/l ÜN schütteln; autoklavieren) behandeltem Wasser resuspendiert.

Anreicherung von mRNA: Zur Anreicherung der mRNA aus TRIZOL[®] Fällungen von Gesamt-RNA wurde das NucleoTrap mRNA Kit (Macherey-Nagel; Düren, Deutschland) verwendet.

3.10.2 Spezifischer Nachweis von RNA mittels Northern Analyse

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA: 1% Agarose wurde in 72 ml DEPC Wasser gekocht und bei 60°C äquilibriert. Dann wurde 18 ml 12,3 M (= 37%) Formaldehyd (Endkonz.: 2,2 M) und 10 ml MOPS RNA Laufpuffer hinzugefügt und das Gel unter einem Abzug gegossen. RNA wurde mit 2 x RNA Loading Dye gemischt, 10' bei 70°C denaturiert und 5' auf Eis gequenchet. Die Trennung erfolgte bei 2 – 4 V/cm für 2 – 4 h.

Northern Analyse von RNA: RNA wurde aus dem Gel mit 10 x SSC ÜN mittels *downward capillary transfer* (Chomczynski 1992) auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert und mit 150 mJoule/cm² UVC *cross-linked*. Die Blots wurden mit Rapid Hybridization buffer 30' bei 65°C prähybridisiert und 90' mit 2 x 10⁶ cpm/ml radioaktiver Sonde hybridisiert. Zum Waschen wurden wie beim Southern Blot Waschpuffer mit steigender Stringenz benutzt. Ungebundene Nukleotide wurden mit mildem zweimaligem Waschen mit 2 x SSC/0,1% SDS bei 65°C entfernt. Danach wurde 15' mit 1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde mindestens einmal stringent (0,1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C) gewaschen, bis die Radioaktivität auf dem Blot annähernd Hintergrundlevel erreicht hatte. Danach wurden die Blots mit 2 x SSC in Folien eingeschweißt und für mehrere Stunden bis Tage auf autoradiographischen Filmen bei -70°C oder auf Phosphoimager Screens bei Raumtemperatur exponiert.

3.10.3 Annealing von einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden

Lyophilisierte, einzelsträngige RNA-Oligonukleotide wurden in *siRNA Resuspension buffer* (Qiagen, Hilden, Deutschland) als 20 µM Stock-Lösungen angesetzt. Zum Annealing der *sense* und *antisense* RNA-Oligonukleotide wurden sie zunächst 1' bei 90°C und anschließend 1h bei 37°C inkubiert.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Größentrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde im Tris Glycin Puffersystem durchgeführt (1 x Laufpuffer). Die Proben wurden zunächst im reduzierenden 1 x Probenpuffer aufgekocht (5') und über ein 4% Sammelgel und ein 12 – 14%iges Trenngel getrennt. Die Trennung erfolgte bei 120 V im vertikalen Minigelsystem von Bio-Rad (München, Deutschland).

4% Sammelgel (10 ml): 2,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 6,4 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 1 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat), 15 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)

12% Trenngel (10 ml): 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4,5 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 3 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS, 15 µl TEMED

14% Trenngel (10 ml): 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 3,5 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS, 15 µl TEMED

3.11.2 Zellysate

Zytosolische Extrakte: Für zytosolische Extrakte wurden im Wesentlichen wie beschrieben durchgeführt. Zellen wurden pelletiert (5', 300 g) und mit hypotonischem Puffer A inkubiert (20', 4°C). Danach wurden die Zellen durch eine 27G Nadel homogenisiert pelletiert (20', 20000 g, 4°C). Anschließend wurde die Proteinkonzentration des resultierenden Überstandes (zytosolischer Extrakt)

mittels BCA assay bestimmt. Proben wurden in 1 x Proteinladepuffer gekocht (5', 95°C) und pelletiert (1', 20000 g). Angegebene Proteinmengen wurden auf SDS Gele aufgetragen.

3.11.3 Spezifischer Nachweis von Proteinen über Western Blot

Blot: Proteine wurden auf PVDF Membranen von Schleicher & Schuell (Whatman®; Dassel, Deutschland) geblottet. Für das Blotten wurde die Mini Blot Kammer von Bio-Rad (München, Deutschland) benutzt. Es wurde bei 300 mA 60' in 1 x Transferpuffer geblottet. Der Transfer wurde mit der reversiblen Färbung durch Ponceau evaluiert.

Blocken: Die Membranen wurden zwecks Blockierung unspezifischer Antikörperinteraktionen 30' in Blockierungspuffer inkubiert.

Bindung spezifischer Erstantikörper: Die verwendeten Erstantikörper wurden in den vom Hersteller angegebenen Verdünnungen in Blockierungspuffer verdünnt und entweder 1 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4°C mit der Membran bei schüttelnd (45 rpm) inkubiert.

Nachweis des Erstantikörpers mittels HRP konjugierter Zweitantikörper: Zum immunhistochemischen Nachweis der Proteine wurden HRP (*horseradish peroxidase*) konjugierte Zweitantikörper verwendet, die spezifisch am Erstantikörper gebunden, nach Umsatz des ECL® Reagenz (Pierce; Fischer Scientific; Schwerte, Deutschland) Licht emittieren.

Visualisierung: Die Detektion des Lichtsignals erfolgte über autoradiographische Filme von AP Biotech (GE Healthcare; Piscataway, USA). Die Entwicklung der Filme erfolgte über den automatischen Entwickler von von Kodak.

3.12 Zellkultur und Transfektion

3.12.1 Erhaltung von Zellen

HeLa Zellen und HT1080 Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS (fötales

Kälberserum) und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert (DMEM-10). Das Medium für stabil transduzierte HeLa Zellen und HeLa P4-Zellen wurde zusätzlich mit 3µg/ml Blastidicin (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Das Medium für stabil transduzierte HeLa P4-Zellen wurde zusätzlich mit 1 µg/ml Puromycin (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. HEK-293 FT Zellen (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) erhielten 400 µg/ml G418 in DMEM-10 (Genitacin, Biochrom; Berlin, Deutschland). Alle genannten Zellen wurden in Inkubatoren mit 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C gehalten..

3.12.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen ($10^6 - 5 \times 10^6$) wurden in 1 ml Cryomedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in Cryoröhrchen (Saarstedt; Nümbrecht, Deutschland) für einige Tage bei -70°C eingefroren. Für längere Perioden wurden sie auf flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 50 ml Erhaltungsmedium gewaschen (5', 300 g) und in Medium ohne Antibiotika ausplattiert. Gegebenenfalls wurde das benötigte Antibiotikum nach 48 h hinzugegeben.

3.12.3 Transiente Transfektion

3.12.3.1 Kalziumphosphat vermittelte Transfektion von Plasmid DNA

1 – 2 µg DNA/6-Well bzw. 5 – 10 µg/10 cm Schale oder 0,1 µg/96-Well wurde mit dieser Methode in HEK-293 FT Zellen transfiziert. Routinemäßig wurde eine Transfektionseffizienzen von bis zu 80% erzielt (mit FACS anhand von GFP Fluoreszenz bestimmt). Die DNA wurde hierfür in 250 mM CaCl₂ (Stock; 2,5 M) verdünnt (100 µl für 6-Well oder 500 µl für 10 cm Schale) und mit dem gleichen Volumen 2 x HeBS Puffer versetzt, gevortext und nach 1' auf die Zellsuspension in Erhaltungsmedium (1,8 ml für 6-Well und 9 ml für 10 cm Schale) gegeben. Die adhärierenden Zellen lagern beim Herabsinken die Kalziumphosphat-DNA-Präzipitate an ihre Oberflächen und können diese während einer ÜN Inkubation endozytieren. Die Expression der Transgene ist nach der ÜN Inkubation detektierbar, erhöht sich aber bei weiterer Inkubation für bis zu 72 h. Es wurden 2×10^5 Zellen im

6-Well bzw. 2×10^6 Zellen in 10 cm Schalen oder $3,6 \times 10^4$ in 96-wells transfiziert.

3.12.3.2 Kalziumphosphat vermittelte Transfektion von Plasmid DNA und synthetischen siRNAs

0,3 µg Plasmid DNA und jeweils 5 nM, 20 nM oder 100 nM siRNA wurden wie oben beschrieben im 6-Well Format transfiziert

3.12.3.3 Transfektion von DNA und siRNA mittels kationischen Lipiden

Lipofectamine 2000[®] vermittelte Transfektion von Plasmid DNA: Die Formulierung mit kationischen Lipiden wurde verwendet, um HEK-293 FT Zellen für die Produktionen von Lentiviren zu transfizieren. Die Transfektionen erfolgten in DMEM-10 ohne Pen/Strep Zusatz.

Transfiziert wurden 1×10^6 Zellen mit 2 µg DNA im 6-Well oder 6×10^6 Zellen mit 12 µg DNA in 10 cm Schalen. Die zu transfizierende DNA wurden in 170 µl (für 6-Well) oder 1 ml (für 10 cm Schalen) Opti-MEM (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. 6 µl Lipofectamine 2000[®] für 6-Well in 170 µl bzw. 36 µl in 1 ml für 10 cm Schalen wurden ebenfalls in Opti-MEM aufgenommen. Nach 5' Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Komponenten für 20' vereinigt und zu den Zellen gegeben.

3.13 Herstellung stabiler Zelllinien über lentivirale Transduktion

3.13.1 Herstellung viraler Partikel

Die Produktion lentiviraler Partikel erfolgte nach Herstellerangaben, die im Manual ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) ausführlich beschrieben werden.

6×10^6 HEK-293 FT Zellen wurden ÜN mit 12 µg Plasmid DNA Mix – bestehend aus je 3 µg der Verpackungsplasmide (pLP1, pLP2 und pLP/VSV-G) sowie 3 µg lentiviraler Vektor – mit Lipofectamine[®] 2000 transfiziert Alternativ wurden 10 µg

einer Mischung von den 3 Verpackungsplasmiden zusammen mit 5 µg lentiviralem Vektor via Kalziumphosphat transfiziert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch Komplettmedium ersetzt und der erste Virusüberstand nach 24 h geerntet. Nach weiteren 24 h erfolgte die zweite Ernte. Gegebenenfalls wurde 72 h *p. T.* ein weiterer Virusüberstand gesammelt. Auf diese Weise konnte ein Titer von $10^5 - 5 \times 10^5$ TU (*transduction units*) pro Milliliter Überstand erreicht werden. Wurden grössere Titer benötigt, mussten die Überstände entweder über Größenausschlußsäulen eingeeengt (100 kDa *cut-off* mit regenerierter Cellulose von Millipore; Billerica, USA) werden oder virale Partikel über Ultrazentrifugation (90', 60000 g, SS34 Rotor von Beckman) pelletiert und im kleinen Volumen (PBS oder Medium) aufgenommen werden. Beide Methoden konnten auch sequenziell kombiniert werden. Durch beide Methoden wurde die gesamte TU der Überstände um ca. 50% reduziert.

Lentivirale Transduktion zur Titerbestimmung: 2×10^5 zu transduzierende Zellen oder HT1080 Fibroblasten wurden mit einer fünffachen seriellen 10er Verdünnung von viraler Suspension im 6-Well Format (2 ml Medium/Well) in Anwesenheit von 6 µg/ml Polybrene[®] (Sigma-Aldrich; Buchs, Schweiz) ÜN transduziert. Danach wurde das Medium durch Komplettmedium für 30 – 32 h ersetzt. 48 h nach Transduktion erfolgte die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen mit 10 µg/ml Blastocidin für 5 Tage (Medium wurde alle 2 – 3 Tage wechseln) und gegebenenfalls für weitere 3 – 5 Tage mit 3 µg/ml Blastocidin. Anschließend wurden die adhärennten Kolonien dreimal mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett (Lenti) gefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch extensives Waschen mit ddH₂O entfernt. Der Titer wurde mit TU/ml angegeben und als die Anzahl angefärbter Kolonien, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ermittelt.

3.13.2 Etablierung stabiler Zelllinien

2×10^5 Zellen wurden wie oben beschrieben mit einer MOI von 0,1 transduziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 8 ml Komplettmedium mit 3 µg/ml Blastocidin aufgenommen und auf die 12 horizontalen Wells von drei 96-Well Platten verteilt (200 µl/Well). In alle übrigen Wells wurden 100 µl Komplettmedium mit 3 µg/ml Blastocidin vorgelegt und die Zellsuspension in einer siebenfachen seriellen 3er Verdünnung vertikal verdünnt. Das Medium wurde für zehn Tage alle 2 Tage

gewechselt, bis einzelne Kolonien in den Wells identifiziert werden konnten. Mehrere einzelne Kolonien wurden gepickt, klonal expandiert und anschließend analysiert.

3.14 FACS Analyse zur Bestimmung von Transfektions- und Transduktionseffizienz

Die Effizienz von Transfektionen bzw. Transduktionen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS; *fluorescence activated cell scanning*) bestimmt werden, wenn die Konstrukte GFP koexprimierten. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Mindestens 2×10^5 lebendige Zellen wurden mit FACSCalibur (BD Biosciences; Franklin Lakes, USA) analysiert. Dazu wurde der blaue Laser (488 +/- 20 nm) des Gerätes verwendet und die Fluoreszenz mit dem 530 nm FITC Filter gescannt. Die Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz wurde als der Anteil fluoreszierender Zellen zur Gesamtzellzahl in Prozent angegeben.

3.15 Puromycin- und Ganciclovirbehandlung der transduzierten HeLa Selektionszelllinien

Nach der Transduktion der HeLa Selektionszelllinien mit den shRNA-Bibliotheken wurden diese zunächst einmalig mit 1 µg/ml Puromycin und anschließend für fünf Tage mit 2×10^{-6} M Ganciclovir behandelt. Das Selektionsmedium wurde dabei täglich gewechselt

3.16 Quantitative Messmethoden zur Erfassung von zellulären Aktivitäten

3.16.1 Kristallviolett färbung zum Nachweis vom Zelltod

10^5 Zellen/well einer 6well Platte wurden ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für sieben Tage mit 2×10^{-6} M Ganciclovir behandelt. Adhärente

Zellen wurden 10' mit Kristallviolett gefärbt. Überschüssige Farbe wurde nach intensivem Waschen mit ddH₂O entfernt und die Platten getrocknet. Gebundener Farbstoff wurde mit 100 µl 0,2% Natriumcitrat/ 50% Ethanol gelöst und die OD bei 595 nm gemessen. Je 8 Wells pro Behandlung wurden gemittelt und gegen unbehandelte Kontrollen normalisiert.

3.16.2 Luziferase-Assay

Für die Analyse des durch die HIV-1 spezifischen shRNA-Expressionskassetten in eukaryotischen Zellen induzierten Phänotyps wurden Luziferase-Assays (Glühwürmchen-Luziferase) durchgeführt. Die Glühwürmchen-Luziferase wird durch das Gen *luc* kodiert und wurde in das *nef*- Gen des HIV-1 spezifischen Reporterplasmid pNL4.3Luc.R-E- inseriert (NIH). Die sauerstoffabhängige Biolumineszenzreaktion beruht auf dem Energietransfer von ATP zum Substrat D-Luziferin, unter Bildung von Oxyluziferin, AMP, Kohlenstoffdioxid und Licht einer Wellenlänge von 562 nm. Der Licht-*output* dieser Reaktion ist proportional zur Menge des funktionellen Luziferase-Enzyms. Die Lichtemission wurde bei 562 nm im LuminoScan gemessen. Die ermittelten Werte sind keine Absolutwerte, sondern *relative light units (RLUs)*.

Es wurden entweder $3,6 \times 10^4$ HEK 293 FT Zellen mit 50 ng PCR-amplifizierten shRNA-Expressionskassetten oder 50 ng shRNA-Expressionskassetten im Vektorhintergrund pENTR/TA mit 50 ng HIV-1 spezifischen Luziferase Reporterplasmid pNL4.3Luc.R-E- kotransfiziert oder HeLa P4 Zellen nach der Etablierung einer stabilen shRNA Expression mit dem 100 ng Luziferase Reporterplasmid pNL4.3Luc.R-E- transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert (3', 500 g). Anschließend wurden die Zellen durch einen „Gefrier-Auftau-Zyklus“ in 20 µl *Cell lysis buffer* (Luciferase Assay Reporter KitPromega; Mannheim, Deutschland) lysiert. 10 µl der lysierten Zellen wurden mit 100 µl *Luciferase-assay Reagent* im 96 well Format (weiße polysorb 96well Platte) versetzt. Die entstehende Lichtreaktion wurde im LuminoScan bei 562 nm gemessen und ausgewertet. Zur Normalisierung der gemessenen Lichtmenge (RLU) wurden Proteinbestimmungen mit Hilfe des BCA Assays durchgeführt.

3.16.3 p24 Antigen ELISA

Um überprüfen zu können, ob die stabil exprimierenden HeLa P4 Zellen die Produktion von HIV-1 Virusnachkommen reduzieren können, wurden p24 Antigen ELISAs durchgeführt. Dazu wurden 5×10^3 shRNA-exprimierende HeLa P4 Zellen im 96 well Format mit dem HIV-1 Virus pNL4.3 infiziert. Die Infektionen wurden unter S3 Bedingungen im Institut für Virologie der Universitätskliniken Heidelberg unter Anleitung von Dr. Maik Lehmann durchgeführt. 42 h nach der Infektion wurde der Überstand der Zellen für die Quantifizierung der Virusmenge verwendet. Für die Quantifizierung wurde ein p24 Antigen ELISA (INNOGENETICS; Gent, Belgien) verwendet, dessen 96 well Platte mit humanem polyklonalem Antikörper gegen HIV-1 p24 beschichtet ist. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Extinktion der Proben im LuminoScan bei 450 nm gemessen und ausgewertet. Zur Normalisierung der gemessenen Lichtmenge (RLU) wurden Proteinbestimmungen mit Hilfe des BCA Assays durchgeführt.

4 Ergebnisse

Um verschiedene potente shRNAs als Inhibitoren der HIV-1 Infektionen zu identifizieren und ihren Nutzen für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz zu überprüfen, wurde eine randomisierte shRNA-Bibliothek gegen HIV-1 zur Anreicherung potenter shRNAs mit Selektionszelllinien selektiert.

Die Methode ist schematisch in Abb. 4 wiedergegeben. Zunächst wurden HIV-1 spezifische Selektionszelllinien etabliert und eine randomisierte, gegen HIV-1 gerichtete shRNA-Bibliothek konstruiert. Anschließend wurden in Selektionszelllinien potente shRNA-Sequenzen durch die Fusion des HSV-TK Gens mit der viralen Ziel-mRNA mit Ganciclovir selektiert. Nach Charakterisierung der Sequenzen wurde das inhibitorische Potential der shRNAs *in vitro* im Reportergen Assay validiert und ihre Fähigkeit die HIV-1 Replikation in HeLa P4 Zellen zu unterbinden funktionell analysiert.

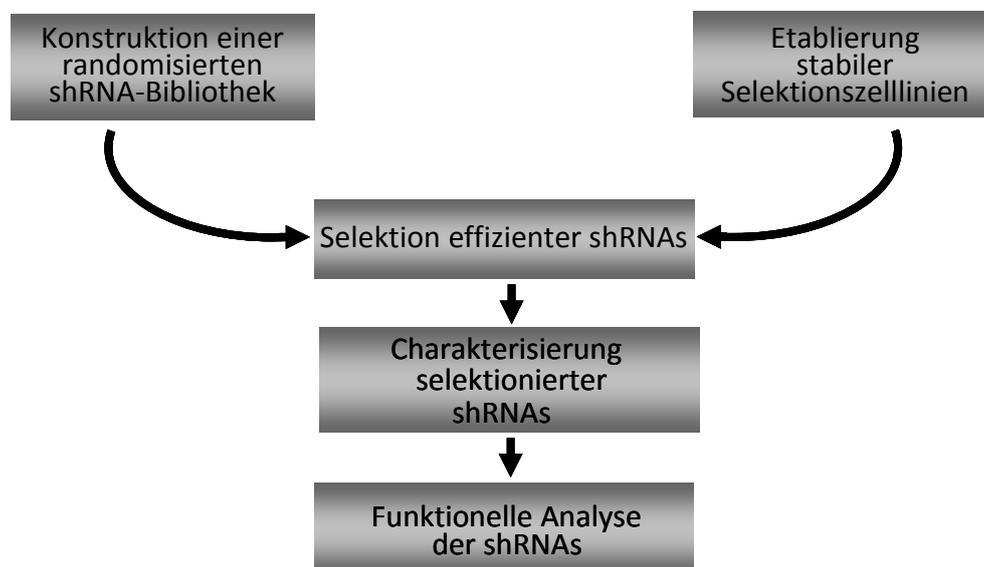


Abb. 4) Experimentelle Vorgehensweise. Zur Identifikation effizienter HIV-1 spezifischer shRNA-Sequenzen wurde zunächst eine randomisierte shRNA-Bibliothek konstruiert. Zur Selektion potenter shRNAs wurden HeLa Selektionszelllinien etabliert. Selektierte shRNAs wurden anschließend charakterisiert und funktionell analysiert.

4.1 Etablierung von Zelllinien zur Selektion HIV-1 gerichteter shRNAs

Ein wesentlicher Schritt zur Identifikation effizienter shRNAs gegen HIV-1 ist die Selektion geeigneter Klone aus einer randomisierten shRNA Bibliothek. Das in dieser Arbeit verwendete Selektionssystem erlaubt die Positivselektion effizienter shRNAs unter Verwendung eines Selektionsmarker-Gens. Dieses Marker-Gen besteht aus zwei Abschnitten, die als Fusions-mRNA exprimiert werden. Die Fusions-mRNA kodiert für ein zytotoxisches Genprodukt, die Thymidinkinase von Herpes Simplex Virus Typ 1 und enthält stromabwärts einen essentiellen Abschnitt des HIV-1 Genoms, der als Ziel-mRNA für die shRNA fungiert. Ein Translationsstopp zwischen den beiden Abschnitten ermöglicht zwar die Expression der Thymidinkinase, verhindert aber die Translation der HIV-1 mRNA (Abb. 5A). Zellen, die diese Fusions-mRNA und damit die Thymidinkinase exprimieren, sterben nach Ganciclovir-Behandlung aufgrund einer intrazellulären Akkumulation eines toxischen Derivats von Ganciclovir. Im Gegensatz dazu kommt es in Zellen nach Kotransfektion mit einer potenten gegen HIV-1 gerichteten shRNA zur Herunterregulierung der Fusions-mRNA, wodurch die Expression der HSV-TK unter einen Schwellenwert sinkt und das Überleben der Selektionszelllinien nach Ganciclovir-Behandlung ermöglicht.

Zur Herstellung stabiler HeLa Selektionszelllinien, die die Fusions-mRNA exprimieren, wurde zunächst der Vektor pENTR/HSV-TK/pA konstruiert, der auf dem GATEWAY[®] kompatiblen Vektor pENTR/siRNAH1 basiert. Er beinhaltet die 1770 bp große Expressionskassette für die Expression der Thymidinkinase von Herpes Simplex Virus Typ 1, die aus Promotor, Thymidinkinase und polyA Sequenz besteht. In einem zweiten Schritt wurde zwischen Thymidinkinase- und polyA-Sequenz eines von drei cDNA-Fragmenten des Genoms von HIV-1 kloniert. Dabei wurde die Unterteilung des HIV-1 Genoms zu Zwecken der biologischen Sicherheit vorgenommen und verhindert die Produktion infektiöser Viruspartikel in den mit dem Selektionsvektor transfizierten Zellen. Die PCR-amplifizierten Fragmente von HIV-1 wurden als drei überlappende Fragmente mit einer Größe von 2,2 kb für HIV-1.1, 2,5 kb für HIV-1.2 und 2,8 kb für HIV-1.3 in den Vektor pENTR/HSV-TK/pA als

pENTR/HSV-TK/HIV1.1/pA, pENTR/HSV-TK/HIV1.2/pA und pENTR/HSV-TK/HIV1.3/pA kloniert (Abb. 5E). Für die lentivirale Expression wurden die Expressionskassetten der Fusions-mRNA-Spezies aus dem GATEWAY® kompatiblen pENTR Derivat in den lentiviralen Vektor pL subkloniert (B.Yazdanpanah). Für die Etablierung stabil exprimierender HeLa Zelllinien wurden in HEK293 FT Zellen lentivirale Partikel mit den Vektoren pL/HSV-TK/HIV1.1/pA, pL/HSV-TK/HIV1.2/pA und pL/HSV-TK/HIV1.3/pA hergestellt. Nach stabiler Transduktion der HeLa Parentalzelllinie wurden jeweils mehrere Klone der drei generierten Zelllinien auf die Expression des HSV-TK Selektionsmarkers untersucht. Western Blot Analysen mit einem HSV-TK spezifischen Antikörper zeigten eine effiziente Expression der HSV-TK in allen hier dargestellten Klonen der drei Zelllinien (Abb. 5B). Eine funktionelle Analyse zeigte, dass eine in der HeLa Parentalzelllinie nicht toxische Konzentration an Ganciclovir in den Selektionszelllinien zum Zelltod führt, was durch Kristalviolettffärbung lebendiger Zellen verdeutlicht wird (Abb. 5C). Northern Blot Analysen der für die Selektion der shRNA-Bibliothek verwendeten Klone mit einer HSV-TK spezifischen Sonde zeigen, dass die Fusions-mRNA in den drei verschiedenen Zelllinien exprimiert wird (Abb. 5D).

Zusammen bestätigen diese Daten die Funktionalität der Fusions-mRNA exprimierenden Selektionszelllinien.

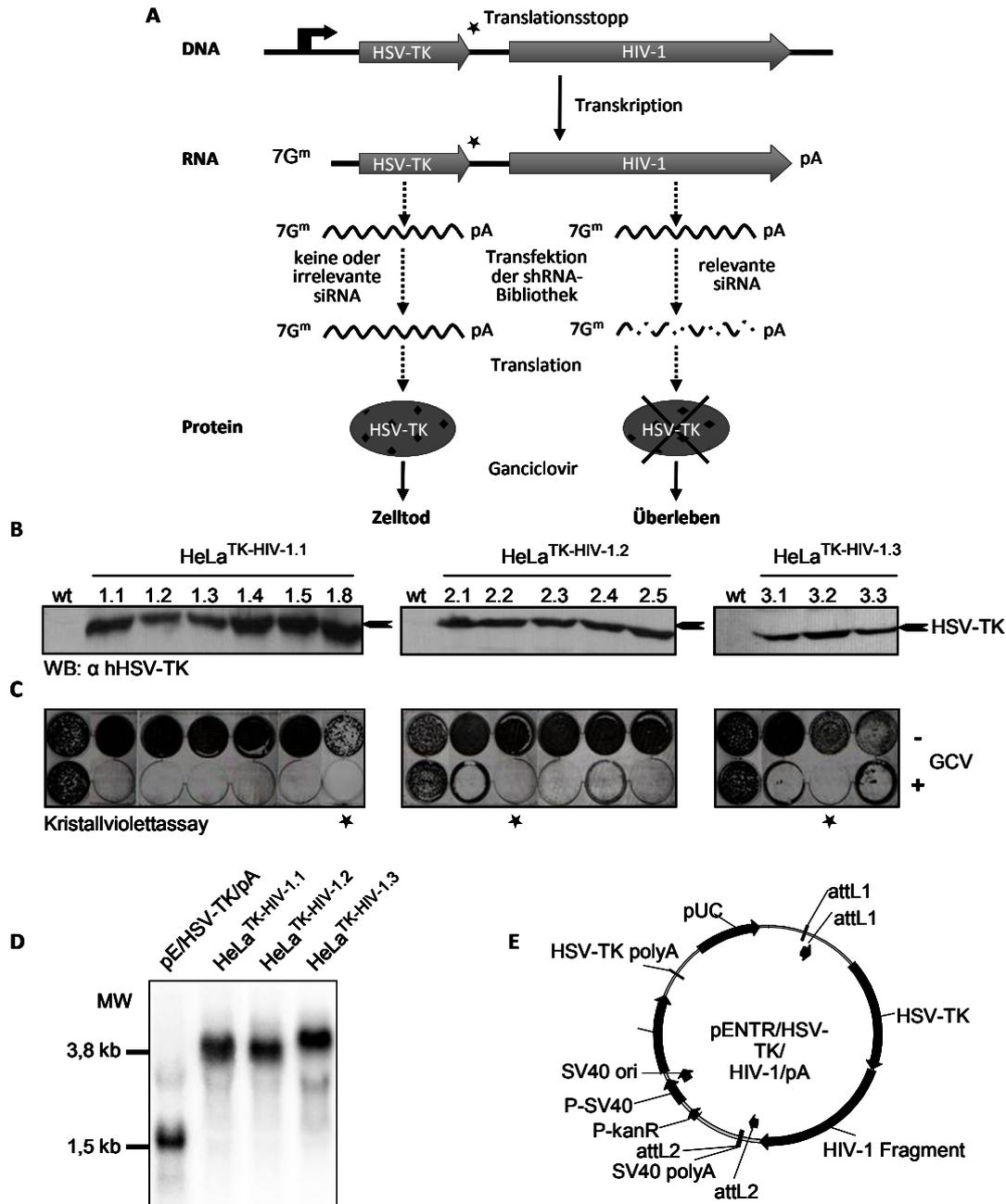


Abb. 5) Etablierung stabiler HeLa-Selektionszelllinien. A) HeLa Selektionszelllinien exprimieren stabil eine Fusions-mRNA aus Herpes Simplex Virus Typ I Thymidinkinase (HSV-TK) und einem Fragment des HIV-1 Genoms. Ein Translationsstopp zwischen HSV-TK und HIV-1 Fragment erlaubt die Expression der HSV-TK, verhindert aber die Translation der HIV-1 mRNA. Nicht transfizierte Zellen oder Zellen, die mit einer irrelevanten siRNA transfiziert wurden, exprimieren die HSV-TK und sterben in der Gegenwart von Ganciclovir. Zellen, die mit einer relevanten gegen HIV-1 gerichteten siRNA transfiziert wurden, exprimieren die HSV-TK aufgrund der Degradierung der Fusions-mRNA nicht, und überleben. B) Immunblotanalyse mit HSV-TK spezifischem Antikörper von 300 µg Protein der stabil transduzierten HeLa Selektionszelllinien. C) Zur funktionellen Analyse wurden transduzierte HeLa Selektionszelllinien und HeLa Parentalzellen für sechs Tage mit 2×10^{-5} M Ganciclovir behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die überlebenden Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Die mit * gekennzeichneten Klone wurden für die Selektion der shRNA-Bibliothek verwendet. D) Nachweis der Fusions-mRNA der in dieser Arbeit verwendeten Klone der Selektionszelllinien mittels Northern Blot. Je 20 µg polyA angereicherte RNA aus HeLa Selektionszelllinien wurde auf positiv geladene Nylonmembranen geblottet und mit HSV-spezifischer TK Sonde hybridisiert. E) GATEWAY® kompatibler Vektor pENTR/HSV-TK/HIV-1/pA zur Expression der Fusions-mRNA.

4.2 Konstruktion einer randomisierten HIV-1 gerichteten shRNA-Bibliothek

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Herstellung einer randomisierten shRNA-Bibliothek basiert auf der von Sen *et al.* veröffentlichten Technologie, bei der eine beliebige doppelsträngige cDNA eines Gens oder eines kompletten Genoms mit Hilfe von Endonukleasen zunächst fragmentiert und anschließend die Fragmentgröße auf 21 bp limitiert wird. Von diesen Fragmenten werden mit Hilfe von Haarnadelschleifen und isothermaler *rolling circle amplification* (RCA) palindromische, invertierte DNA-Strukturen generiert, die schließlich in Expressionsvektoren kloniert werden (Sen *et al.* 2004). Abbildung 6 verdeutlicht den technischen Ablauf schematisch, während Abbildung 7 die einzelnen Schritte detailliert wiedergibt.

Im ersten Schritt wurde die cDNA des HIV-1 Klon pNL4.3 (*AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*) in drei Fragmente unterteilt, die mit den HIV-1-Fragmenten der Fusions-mRNAs der Selektionszelllinien übereinstimmten. Nach *DNaseI*-Verdau wurden die DNA-Fragmente über native Polyacrylamid-Gele aufgetrennt (Abb. 6; Abb. 7A) und DNA-Fragmente zwischen 30 und 300 bp wurden aus dem Gel eluiert. Anschließend wurden die DNA-Enden mit T4 DNA Polymerase und Klenow-Fragment repariert. Die DNA-Fragmente wurden danach mit einem Oligonukleotid ligiert, das aufgrund komplementärer Basen eine Haarnadelschleife bilden kann. Diese Haarnadelschleife wird im Folgenden als *3' loop* bezeichnet (Abb. 6). Der *3' loop* kodiert in der endgültigen Bibliothek die Schleife der shRNA und ermöglicht nach Ligation mit den DNA-Fragmenten von HIV-1 die Synthese von *sense* und *antisense* Strang.

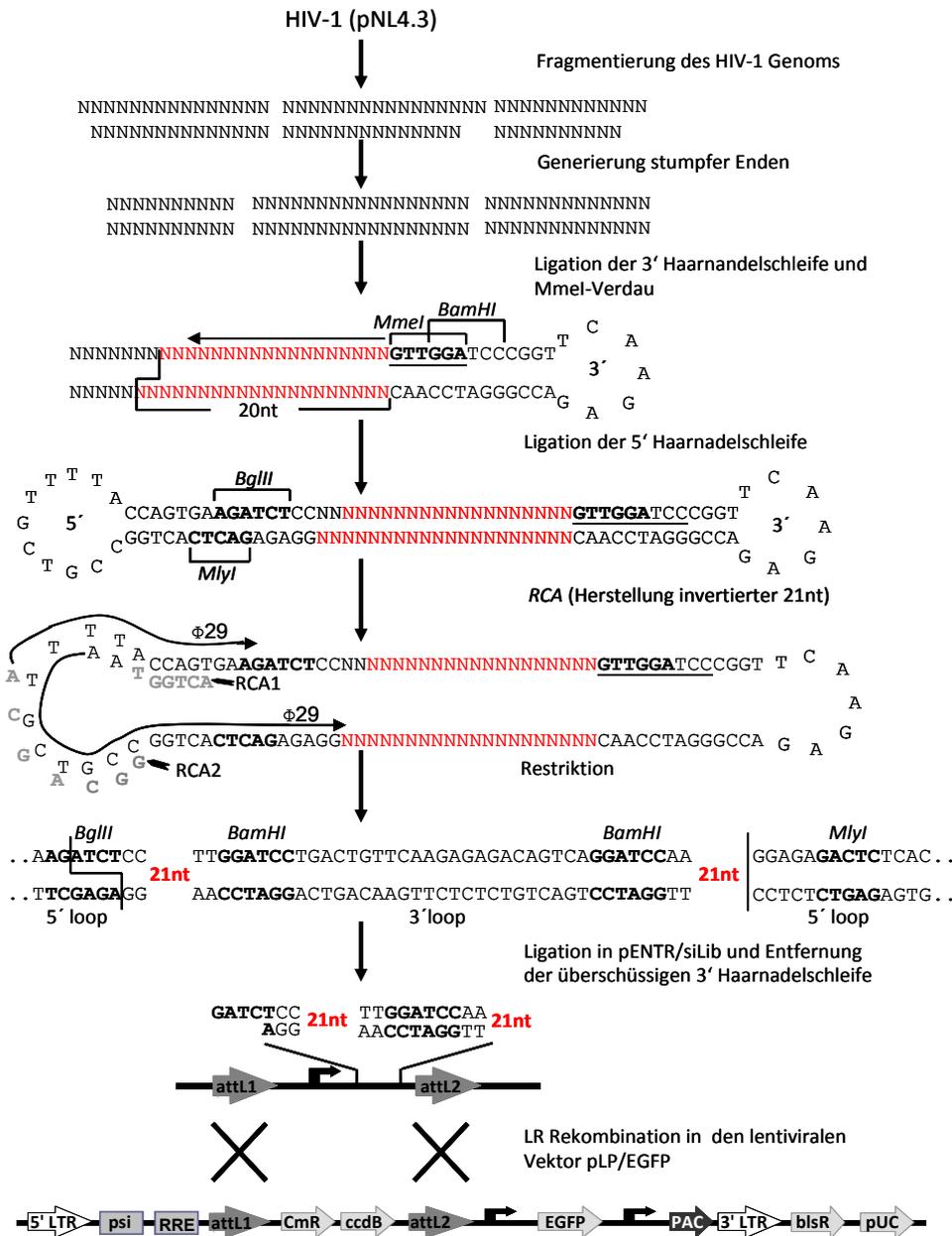


Abb. 6) Konstruktion der randomisierten shRNA-Bibliothek gegen HIV-1. pNL4.3 wurde mit *DNase I* fragmentiert und sowohl 3' als auch 5' glatte Enden generiert. Die Fragmente wurden an ein Haarnadelschleife-bildendes Oligonukleotid (*3' loop*) ligiert, um *sense* und *antisense* Strang zu verbinden und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Mme I*, das exakt 20 nt stromabwärts von seiner Erkennungssequenz schneidet und 2 nt 5' Überhänge generiert, geschnitten. Die anschließende Ligation an ein weiteres Haarnadelschleife-bildendes Oligonukleotid (*5' loop*) generiert eine einzelsträngige zirkuläre Struktur, die die Synthese des komplementären Stranges mittels *rolling circle amplification* (RCA) und ϕ 29 DNA Polymerase mit den Primern RCA1 und RCA2 ermöglicht. Das entstehende DNA Konkatermer aus palindromischen, invertierten Wiederholungen der aus *3' loop*, HIV-1 spezifischen DNA und *5' loop* bestehenden Fragmenten wurde mit den Restriktionsenzyme *Bgl II* und *Mly I* geschnitten. Die resultierenden 50 nt großen shRNA-Sequenzen wurden in den Vektor pENTR/siLib kloniert und überschüssiger *3' loop* wurde entfernt. Im letzten Schritt wurde die shRNA-Bibliothek in den lentiviralen Vektor pL/P/EGFP subkloniert.

Um eine funktionstüchtige shRNA-Bibliothek mit nichtimmunogenen shRNA-Sequenzen herzustellen musste gewährleistet werden, dass nur DNA-Fragmente mit einer Länge von 21 bp für die Konstruktion der shRNAs verwendet werden. Aus diesem Grund wurde in den *3' loop* eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Mme I* eingefügt (Boyd, 1986). *Mme I* schneidet genau 20 nt stromabwärts von seiner nichtpalindromischen Erkennungssequenz und generiert DNA-Fragmente mit 2 nt 3'-Überhängen (siehe Abb. 6). Durch Ligation des *3' loops* und Restriktion mit *Mme I* wurden sowohl 37 nt große DNA-Fragmente produziert, die aus dem 17 nt großen *3' loop* und der 20 nt großen, fragmentierten cDNA bestehen als auch 34 nt große zirkuläre Strukturen, die durch Selbstligation des *3' loop* entstanden. Die Ligationsprodukte wurden über native Polyacrylamid-Gele aufgetrennt und das gewünschte, 34 nt große DNA-Fragment isoliert (Abb. 6 und Abb. 7B).

Zur Synthese eines doppelsträngigen DNA-Moleküls mit invertierten *repeats*, die den *sense* und *antisense* Strang der shRNA kodieren, wurden die *Mme I* geschnittenen DNA-Fragmente an einen *5' loop* ligiert. Die resultierenden ringförmigen Einzelstrang-Fragmente wurden als Matrizen für die *rolling circle* Amplifikation des komplementären Stranges genutzt (Abb. 6). Da die Restriktion mit *Mme I* kohäsive Enden mit 2 nt 3'-Überhängen unbekannter Nukleotide produzierte, wurden die *5' loop* Oligonukleotide mit zwei randomisierten Nukleotiden am 5' Ende synthetisiert. Wie in Abb. 7C dargestellt ist, ligiert der *5' loop* sowohl mit sich selbst (46 bp) als auch mit dem gewünschte DNA-Fragment (60 bp) und bildet dadurch quasi zirkuläre Strukturen. Das gewünschte zirkuläre DNA-Fragment wurde Gel extrahiert, um es anschließend als Matrize für die Synthese des komplementären Stranges mittels *rolling circle amplification* (RCA) einsetzen zu können.

Die RCA produziert ein langes doppelsträngiges DNA-Konkatemer, das sich aus palindromischen, invertierten Repeats der aus *3' loop*, HIV-1 cDNA und *5' loop* bestehenden Fragmente zusammensetzt. Durch die Synthese des komplementären DNA-Stranges wurden im *5' loop* zwei Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BgIII* und *MlyI* komplettiert (siehe Abb.6). Der Verdau mit diesen beiden Restriktionsenzymen produzierte 50 bp große klonierbare *inverted repeats*, die aus dem Gel extrahiert wurden (Abb. 6 und Abb. 7D).

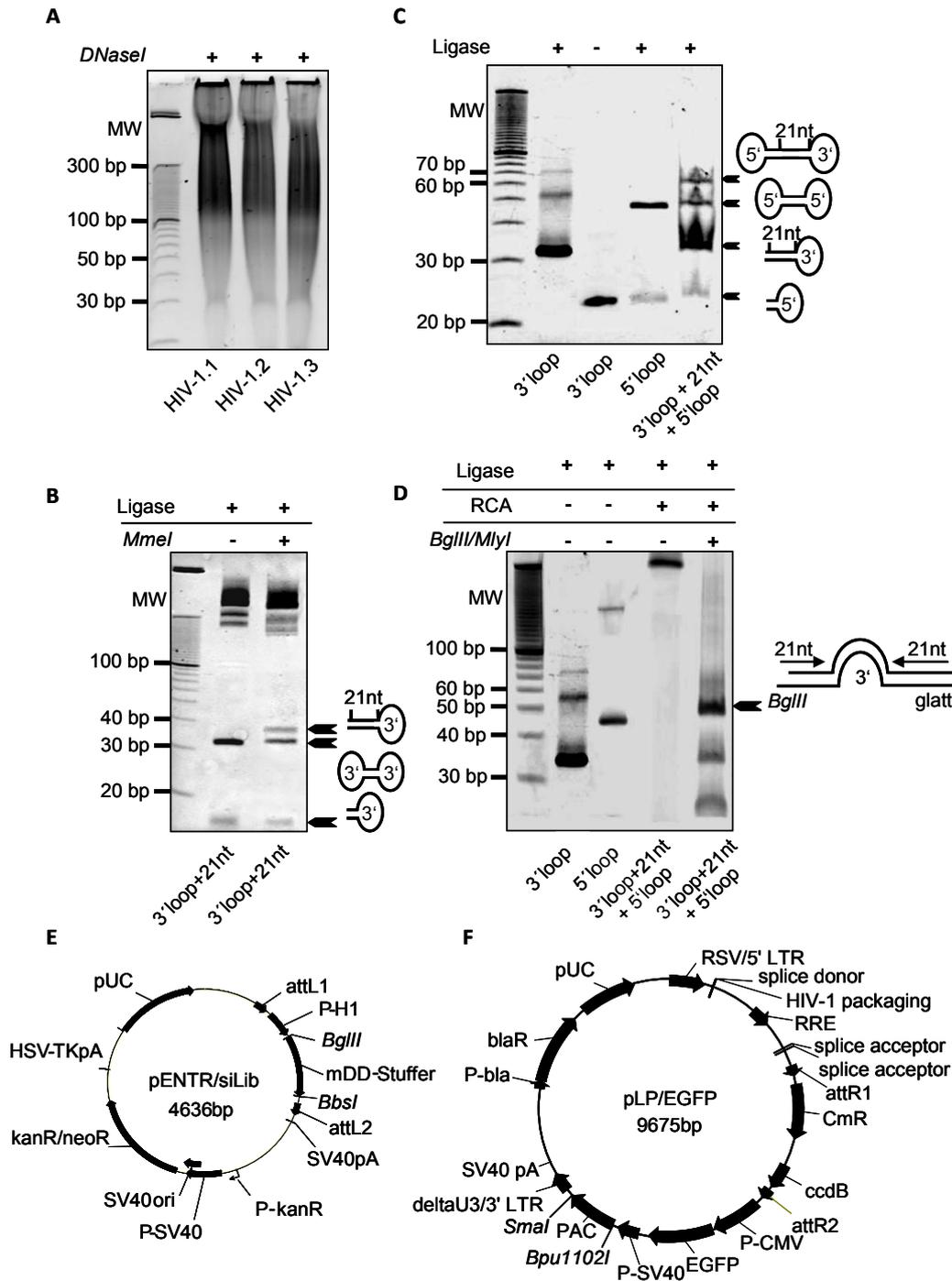


Abb. 7) Zwischenprodukte der shRNA-Bibliothek werden über native Polyacrylamidgelle aufgereinigt. A) Jeweils 5 µg der drei cDNA-Fragmente (HIV-1.1 - HIV-1.3) wurden mit 1×10^{-3} U *DNase I* fragmentiert und über 20 % Polyacrylamid in TBE aufgetrennt. DNA-Fragmente zwischen 30 und 300 bp wurden mittels Diffusion in einen Kochsalzpuffer bei 50°C für 2 h eluiert. Anschließend wurden sowohl 5' als auch 3' stumpfe Enden generiert. B) Die DNA-Fragmente wurden an einen 3' loop ligiert. Die Hälfte der an den 3' loop ligierten Fragmente wurde mit dem Restriktionsenzym *Mme I* geschnitten und aus 20 % Polyacrylamid in TBE isoliert. C) Die Ligation des 5' loops an die DNA-Fragmente generiert eine einzelsträngige zirkuläre DNA-Struktur, die als Matrize für eine *rolling circle amplification* (RCA) verwendet wurde, um den komplementären Strang herzustellen. D) Die resultierenden doppelsträngigen DNA-Konkatemere aus palindromischen, invertierten Wiederholungen aus 3' loop, HIV-1 spezifischer DNA und 5' loop wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl II* und *Mly I* geschnitten und die resultierenden shRNA-Sequenzen wurden in den GATEWAY® kompatiblen Expressionsvektor E) pENTR/siLib kloniert. F) pLP/Pac/EGFP. Lentiviraler Expressionsvektor der shRNA-Bibliothek.

Die *inverted repeats* wurden in den GATEWAY® kompatiblen linearisierten Vektor pENTR/siLib (Abb. 7E) nach Restriktion mit den beiden Restriktionsenzymen *BglII* und *BbsI* stromabwärts des H1-Promoters und stromaufwärts der Stoppkassette (polyA) kloniert. Die so generierten shRNA Expressionsplasmide wurden bakteriell amplifiziert. Durch eine im 3' loop vorhandene *BamHI* Schnittstelle konnte der überschüssige 3' loop entfernt und die Expressionsplasmide nach Religation erneut bakteriell amplifiziert werden. Im letzten Schritt wurde die shRNA-Expressionskassette aus dem Vektor pENTR/siLib in den lentiviralen Vektor pLP/EGFP subkloniert (Abb. 6 und Abb. 7E und F). Der lentivirale Vektor pLP/EGFP ist ein Derivat des lentiviralen Vektors pL (B.Yazdanpanah) und beinhaltet eine Puromycinresistenzkassette und EGFP stromabwärts der attR2 Erkennungssequenz.

Um die Diversität bzw. die Komplexität der ursprünglichen Bibliothek (mit überschüssigem 3' loop) zu erhalten, wurde eine klonale Vervielfältigung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl der Bakterienklone der jeweiligen Klonierungsschritte dokumentiert (Tabelle 1). Die Diversität der ursprünglichen Bibliothek betrug $3,4 \times 10^3$ (Bibliothek 1); $4,5 \times 10^3$ (Bibliothek 2) bzw. 6×10^3 Klone (Bibliothek 3), die der zweiten Bibliothek (ohne überschüssigem 3' loop) $1,6 \times 10^4$; $1,4 \times 10^4$ bzw. $1,5 \times 10^4$ und die der in den lentiviralen Vektor subklonierten Bibliothek jeweils mehr als 10^5 . Eine Auswahl von 20 individuellen Klonen wurde jeweils sequenziert, um die Qualität der Sequenzen beurteilen zu können (Daten nicht gezeigt).

Tab. 1) Die Diversität der shRNA-Bibliothek bleibt erhalten. Die shRNA-Sequenzen wurden zunächst den linearisierten Vektor pENTR/Lib kloniert. Überschüssiger 3' loop wurde entfernt und die Vektoren religiert. Schließlich wurde die shRNA-Bibliothek in den lentiviralen Vektor pL/Pac/EGFP subkloniert. Um Aussagen über die Diversität der shRNA-Bibliothek machen zu können wurde die Anzahl der Bakterienkolonien jedes Transformationsschrittes dokumentiert. Um die Diversität der shRNA-Bibliothek aufrecht zu erhalten, wurde die Anzahl der Bakterienkolonien bei jedem Transformationsschritt mindestens verdoppelt.

	pENTR/siLib mit ursprünglicher Haarnadelschleife	pENTR/siLib mit <i>BamHI</i> geschnittener Haarnadelschleife	pLenti/PAC/EGFP
Bibliothek 1	$4,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$> 10^5$
Bibliothek 2	$3,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$> 10^5$
Bibliothek 3	6×10^3	$1,5 \times 10^4$	$> 10^5$

Die Daten aus Tabelle 1 und die Sequenzierung individueller Klone zeigen eindeutig, dass mit der beschriebenen Technologie eine kostengünstige und HIV-1 spezifische shRNA-Bibliothek konstruiert werden konnte, die sich durch eine hohe Diversität auszeichnet.

4.3 Selektion der shRNA-Bibliothek

Der durch eine Ganciclovir-Behandlung ausgelöste Selektionsdruck kann zu Mutationen in der Expressionskassette der Fusions-mRNA oder zu einer teilweisen oder sogar kompletten Eliminierung der Expressionskassette führen. Diese Zellklone würden eine Ganciclovir-Behandlung nicht aufgrund einer potenten shRNA überleben sondern aufgrund der fehlenden Expression der Thymidinkinase. Um eine Anhäufung falsch positiver Klone zu verringern, wurden die Selektionszelllinien nach der Transduktion der shRNA-Bibliothek mit Puromycin behandelt und damit nicht transduzierte Zellen negativ selektiert.

Für die Bestimmung der optimalen Ganciclovirkonzentration wurden die Selektionszelllinien jeweils mit ihrer relevanten shRNA Bibliothek und einer irrelevanten Bibliothek transfiziert und anschließend mit unterschiedlichen Ganciclovirkonzentrationen behandelt. Dabei sollte der ausgelöste Selektionsdruck in

nicht transfizierten Zellen der Selektionszelllinien und in Zellen, die eine ineffiziente shRNA exprimieren, Zelltod auslösen können. Die Stärke dieses Selektionsdruckes musste jedoch gleichzeitig gewährleisten, dass die Zellen der Selektionszelllinien, die eine effiziente shRNA exprimieren, klonal expandieren konnten. Nach fünftägiger Ganciclovir-Behandlung wurde sowohl die Anzahl der Klone als auch ihre Größe (Anzahl Zellen pro Klon) mikroskopisch beurteilt (Abb. 8A). Dabei zeigte sich, dass eine Behandlung mit 2×10^{-5} M Ganciclovir in der mit der irrelevanten Bibliothek transfizierten Selektionszelllinie zwar Zelltod auslöste, gleichzeitig aber die klonale Expansion der mit der relevanten shRNAs transfizierten Zellen verhinderte. So konnten lediglich Klone mit zwei bis vier Zellen beobachtet werden. Durch die Selektion mit 2×10^{-6} M Ganciclovir hingegen war es möglich, sowohl Zelltod auszulösen als auch eine klonale Expansion der mit der relevanten Bibliothek transduzierten Selektionszelllinien zuzulassen. Eine Konzentration von 2×10^{-7} M Ganciclovir konnte in keiner der transduzierten Selektionszelllinien Zelltod auslösen (Daten nicht gezeigt). Abb. 8A zeigt die Quantifizierung der Zellklone nach Transduktion der relevanten und der irrelevanten shRNA-Bibliothek in die Selektionszelllinie HSV-TK/HIV-1.2.

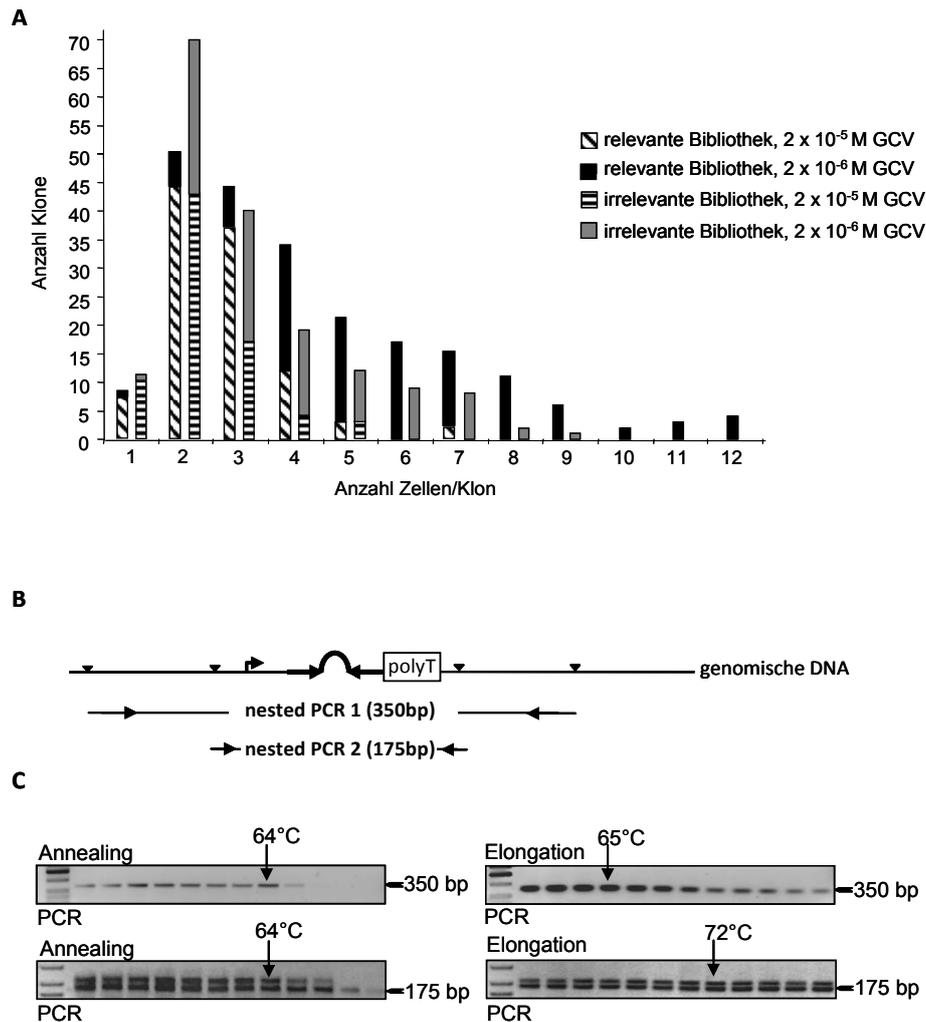


Abb. 8) Optimierung der Parameter für eine effiziente Selektion der shRNA-Bibliothek. A) Bestimmung der optimalen Ganciclovirkonzentration. Die Selektionszelllinie HeLa/HSV-TK/HIV-1.2 wurde mit ihrer relevanten oder einer irrelevanten shRNA-Bibliothek transfiziert und fünf Tage mit 2×10^{-5} M und 2×10^{-6} M Ganciclovir behandelt. Anschließend wurden die Anzahl und die Größe der Klone (Zellen pro Klon) mikroskopisch beurteilt. Die Selektion mit 2×10^{-6} M Ganciclovir ermöglicht die Induktion der Apoptose in Zellen, die die irrelevante shRNA-Bibliothek exprimieren und erlaubt gleichzeitig die klonale Expansion der Zellen, die die relevante shRNA-Bibliothek exprimieren. Die Selektion mit 2×10^{-5} M Ganciclovir löst zwar Apoptose aus, lässt aber keine klonale Expansion zu. B) und C) Optimierung der *Annealing*- und der *Elongation*-Temperatur für die zweistufige *nested* PCR. B) Um die shRNA-Expressionskassetten aus der genomischen DNA der Selektionszelllinien amplifizieren zu können wurde ein zweistufiges *nested* PCR System angewendet. Dabei wurde das 350 bp große PCR-Produkt der ersten PCR (*nested* PCR 1) in eine zweite PCR (*nested* PCR 2) eingesetzt. Das Primerpaar der zweiten PCR liegt dabei zwischen den Primern für die erste PCR und generiert 175 bp große DNA-Fragmente. C) Zur Identifikation der optimalen *Annealing*- und der *Elongation*-Temperatur der *nested* PCR 1 und 2 wurden Gradienten-PCRs durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die optimale *Annealing*-Temperatur der *nested* PCR 1 und 2 wurden auf jeweils 64°C festgelegt. Die optimale *Elongation*-Temperatur der *nested* PCR 1 wurde auf 65°C festgelegt, die der *nested* PCR 2 auf 72°C .

Um die shRNA-Expressionskassetten aus den selektierten Zellklonen isolieren zu können, wurde die genomische DNA isoliert und die shRNA-Expressionskassetten mittels zwei-stufiger *nested* PCR amplifiziert. Die optimalen *Annealing*- und Elongations-Temperaturen wurden für beide PCRs mittels Gradienten-PCR ermittelt (Abb. 8B). Für die erste Stufe wurde eine *Annealing* -Temperatur von 64°C und eine Elongations-Temperatur von 65°C gewählt, für die zweite Stufe eine *Annealing*-Temperatur von 64°C und eine Elongations-Temperatur von 72°C. Die auf diese Weise amplifizierten shRNA-Expressionskassetten wurden über Agarosegele aufgetrennt und isoliert (Abb. 8C).

Mit Hilfe der ermittelten Parameter wurden die drei shRNA-Bibliotheken in den jeweils relevanten Selektionszelllinien selektiert. Dazu wurden die shRNA-Bibliotheken mit einer MOI von 0,1 transduziert, um eine Transduktion einzelner shRNA-Expressionskassette pro Zelle gewährleisten zu können. Die Transduktions-Effizienz wurde nach 48 Stunden anhand GFP-exprimierender Zellen ermittelt und betrug 10%. Nach einmaliger Puromycinbehandlung und anschließender fünftägiger Ganciclovir-Behandlung erfolgte eine einwöchige Expansion der selektierten Zellklone. Mit Hilfe des *nested* PCR Systems konnten schließlich 500 individuelle shRNA-Expressionskassetten isoliert werden.

4.4 Validierung PCR-amplifizierter shRNA-Expressionskassetten mittels HIV-1 spezifischem Luziferase-Assay

Um das inhibitorische Potential der shRNA-Expressionskassetten validieren zu können, wurden HIV-1 spezifische Luziferase-Reporter-Assays mit dem Reporterplasmid pNL4.3.Luc.R-E- (Abb.9A) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Klon von HIV-1, der in transfizierten Zellen aufgrund zweier *frameshifts* im *env*- und im *rev*-Gen zwar einmalig replizieren, jedoch keine Virus-Nachkommen produzieren kann. Zusätzlich wurde in das *nef*-Gen das Reporter-gen für Luziferase inseriert.

HEK293 FT Zellen wurden mit dem Reporterplasmid und jeweils einer individuellen shRNA-Expressionskassette transient kotransfiziert. Als Positivkontrolle wurden *scrambled* shRNA-Expressionskassetten mit dem Reporterplasmid kotransfiziert.

Mit Hilfe des *Luciferase Assay Reporter Kits* (Promega) wurde die relative Menge an aktivem Luziferase-Enzym anhand des emittierenden Lichtes ermittelt. Die relative Luziferase-Aktivität korreliert dabei reziprok mit der Effizienz der shRNA, die HIV-1 Replikation zu inhibieren. Abb. 9B zeigt das inhibitorische Potential der shRNA-Expressionskassetten relativ zur Positivkontrolle und in Bezug auf die Gesamtproteinmenge der Zellysate.

Die ermittelten Daten des Luziferase-Assays zeigen, dass über die Hälfte der selektierten shRNAs die Reporterogenaktivität um mehr als 70% inhibieren kann.

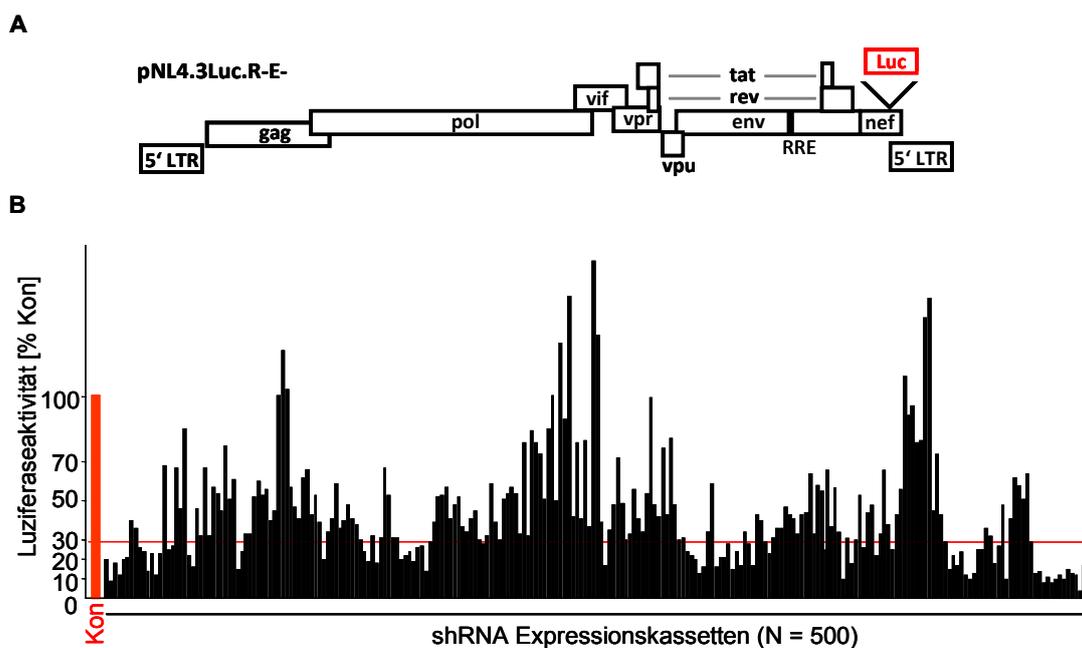


Abb. 9) Validierung der selektionierten shRNA-Expressionskassetten mittels HIV-1 spezifischem Luziferase-Assay. 500 shRNA-Expressionskassetten wurden aus selektionierten Zellklonen mittels PCR isoliert und mit dem A) Reporterkonstrukt pNL4-3Luc-R-E- in $3,6 \times 10^4$ HEK293 FT Zellen kotransfiziert (CaPO, je 50 ng shRNA-Expressionskassette und Reporterkonstrukt). B) 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das inhibitorische Potential der shRNA-Expresionskassetten mit einem Luziferase-Assay bestimmt und ausgewertet. Eine verbleibende Luziferase-Aktivität von $\leq 30\%$ (rot) in Bezug auf die Positivkontrolle (Kon) deutet auf eine potente shRNA gegen HIV-1 hin.

4.5 Sequenzanalysen und Validierung potenter shRNA-Spezies

Anfängliche Versuche, die PCR-amplifizierten shRNA-Expressionskassetten durch einen kommerziellen Anbieter sequenzieren zu lassen, schlugen fehl (Firma Qiagen; Hilden, Deutschland). Weitere Versuche zur Sequenzierung wurden vom Sequenzierlabor des *Center of Genomics Cologne* durchgeführt. Dort wurde der Versuch unternommen PCR-amplifizierte, aufgereinigte shRNA-Expressionskassetten unter Verwendung eines für Plasmide standartisierten Programms zu sequenzieren. Abb. 10B zeigt ein repräsentatives Elektropherogramm, das den Abbruch der Sequenzierreaktion unmittelbar nach dem Start darstellt und so keine Identifikation der shRNA-Sequenz zuließ.

Da sich eine Vektor-basierte Sequenzierung oft als viel versprechender erweist als die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten, wurden die shRNA-Expressionskassetten effizienter shRNAs für die Erzeugung optimaler Sequenzierergergebnisse zunächst in den GATEWAY[®] kompatiblen *TA-cloning* Vektor pENTR/TA kloniert, der auf dem Vektor pENTR/siH1/mDD-Stuffer (B.Yazdanpanah) basiert (Abb. 10A). Dabei wurde statt des H1-Promotors und der *mDD-Stuffer* Sequenz ein doppelsträngiges Oligomer zwischen attL1 und attL2 kloniert, das zwei alternierende *XcmI*-Schnittstellen enthält. Durch die Restriktion mit *XcmI* konnte ein Vektorhintergrund erzeugt werden, der sowohl 5' als auch 3' Thymidin-Überhänge aufweist (Abb. 10A). Die in der *nested* PCR eingesetzte Taq-Polymerase produziert ihrerseits sowohl 5' als auch 3' Adenin-Überhänge, die zu den Thymidin-Überhängen des Vektorhintergrundes komplementär sind und die Klonierung der shRNA-Expressionskassetten vereinfacht. Die auf diese Weise generierten shRNA-Expressionsplasmide wurden in eine in vorliegender Arbeit optimierte PCR für die Sequenzierreaktion eingesetzt. Zu den optimierten Bedingungen zählt die Verwendung des *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits* zusammen mit dem *dGTP BigDye[®] Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit* (applied biosystems) in einem Verhältnis von 3:1 und der Einsatz von 0,83 M Betaine. Des Weiteren wurde ein PCR-System verwendet, dass als *TouchDown-PCR* bezeichnet wird (Don *et al.* 1991). Das Elektropherogramm in Abb. 10C zeigt das Ergebnis der Sequenzierung

einer shRNA-Expressionskassette im Vektorhintergrund pENTR/TA, die unter optimierten Bedingungen durchgeführt wurde.

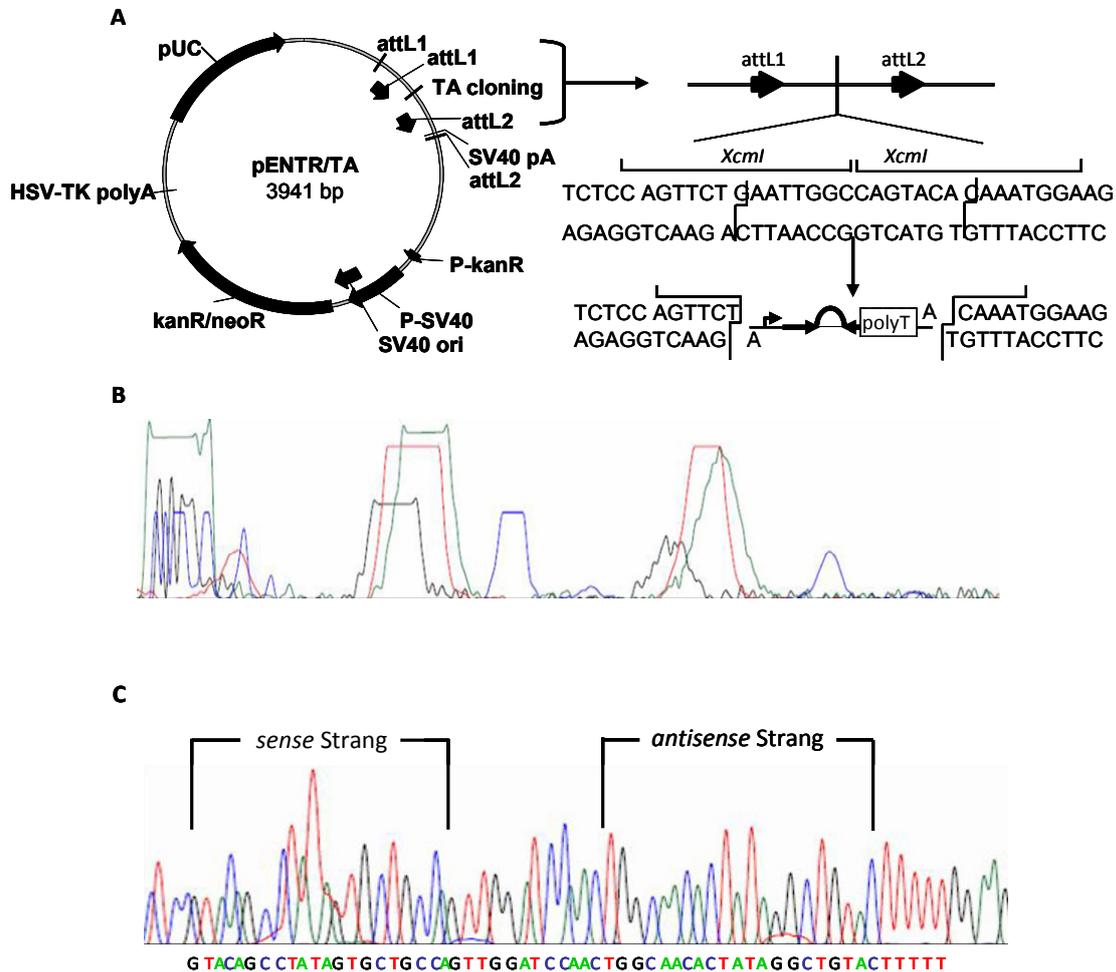


Abb. 10) Effiziente shRNA-Expressionskassetten werden zur Sequenzierung in den Vektor pENTR/TA kloniert und mit Hilfe einer optimierten Einzelstrang-PCR sequenziert. Validierte shRNA-Expressionskassetten wurden in den A) TA-cloning Vektor pENTR/TA kloniert. pENTR/TA ermöglicht eine vereinfachte Klonierung der Taq DNA Polymerase amplifizierten shRNA-Expressionskassetten durch benachbarte, invertierte *XcmI* – Schnittstellen, die 3' und 5' Thymidin-Überhänge generieren. B) Die Sequenzierung von shRNA-Expressionskassetten als PCR-Produkte mit einer Standard Einzelstrang PCR ergaben keine lesbaren Elektropherogramme. C) Die Sequenzierung von shRNA-Expressionskassetten im Vektorhintergrund pENTR/TA mit einer optimierten Einzelstrang PCR produziert lesbare Elektropherogramme, mit denen *sense* und *antisense* Strang der shRNA identifiziert werden konnten.

Durch die Etablierung der oben beschriebenen Sequenziermethode konnten 31 shRNAs identifiziert werden. Die Abbildung 11A zeigt die Lokalisation der shRNA-Zielsequenz im HIV-1 Genom und Tabelle 2 die viralen Ziel-Sequenzen der shRNAs. Um beurteilen zu können, wie häufig die Zielsequenzen unter den bekannten HIV-1

Isolaten vertreten ist, wurden Homologievergleiche mit dem Blast Algorithmus der HIV-Sequenz-Datenbank des *Los Alamos National Laboratory* durchgeführt. Die Datenbank enthält ca. 200.000 Sequenzen aller weltweit bekannten HIV-1 Isolate (*HIV Sequence Compendium 2008*, <http://www.hiv.lanl.gov>). Für die durchgeführte Blast-Suche wurden nur Sequenzen kompletter Genome herangezogen (Tab. 2).

Für weiterführende Experimente und die Etablierung stabiler shRNA exprimierender Zelllinien wurde das spezifische inhibitorische Potential einer Auswahl der in den Vektorhintergrund pENTR/TA klonierten und sequenzierten shRNA-Expressionskassetten validiert. Zum Auswahlkriterium gehörte neben dem inhibitorischen Potential der shRNAs auch, wie häufig die Zielsequenz unter den bekannten HIV-1 Isolaten konserviert war (siehe Tab. 2)

Tab. 2) Identifizierte shRNA-Sequenzen sind spezifisch gegen HIV-1 gerichtet und sind innerhalb der bekannten Isolate vertreten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die HIV-1 Ziel-Sequenz der identifizierten shRNAs und die Anzahl der bekannten HIV-1 Isolate, die diese Zielsequenz exprimieren. gag/pol 1 – 25 shRNAs sind gegen Sequenzen in der gag/pol-kodierenden Region gerichtet, vif 1 + 2 gegen Sequenzen in der vif - kodierenden Region, RevE1 gegen eine Sequenz im Exon 1 von rev und env 1 gegen Sequenzen in der env-kodierenden Region. 5' LTR und 3' LTR sind gegen Sequenzen in den LTR-Bereichen gerichtet.

Bezeichnung	Ziel-Sequenz (pNL4.3)	Los Alamos Blast N=Anzahl molekularer Klone von HIV-1
gag/pol 1	gagtattggcaagccacctg	3985
gag/pol 2	ccaccagaagagagcttcag	9767
gag/pol 3	gagacaacaactccctctca	35180
gag/pol 4	gacaacaactccctctcaga	10211
gag/pol 5	tctgagagggagttggtgtc	3583
gag/pol 6	acaactccctctcagaagca	10267
gag/pol 7	gcagcgacccctcgtcacia	65399
gag/pol 8	tacaggagcagatgatacag	66211
gag/pol 9	gtacagcctatagtgtgctgcc	43997
gag/pol 10	gtcaatgacatacagaaatt	35518
gag/pol 11	acagctggactgtcaatgac	34735
gag/pol 12	ggcaagtcagatttatgcag	33484
gag/pol 13	gaagcagagctagaactggc	27153
gag/pol 14	agagtattggcaagccacct	3986
gag/pol 15	acagagtattggcaagcaac	60013
gag/pol 16	tcagagcagaccagagccaa	8767
gag/pol 17	gagtgggagtttgtcaatac	3579
gag/pol 18	gtcaatacccctcccttagt	3456
gag/pol 19	actttctatgtagatggggc	2931
gag/pol 20	aaagttgtccccctaacgga	25962
gag/pol 21	ccagcacacaaaggaatt	2825
gag/pol 22	ggacaagtagactgtagccc	2554
gag/pol 23	agtactacagttaaggccgc	30137
gag/pol 24	gtcaaggagtaatagaatct	3121
gag/pol 25	agctaccataatgatacaga	7288
vif 1	tggttttatagacatcacta	3034
vif 2	gaacaagccccagaagacca	4591
rev E1	gagctcatcagaacagtcag	4545
env 1	tccaggcaagaatcctggct	12141
5' LTR	gacgtaggcctcatgatgtg	71551
3 LTR	tccagggagggcgtggcctgg	1946

Zur Validierung wurden die shRNA-Expressionskassetten exprimierenden Vektoren mit dem HIV-1 spezifischen Luziferase-Reporter-Konstrukt pNL4.3Luc.R-E- in HEK 293 FT Zellen kotransfiziert und im Luziferase Assay untersucht. Als Kontrolle für eine HIV-1 spezifische Herunterregulierung der Expression der Luziferase wurde der Vektor pENTR/H1siScr (B.Yazdanpanah) verwendet, der eine shRNA exprimiert, die keine Homologie zum Genom von HIV-1 besitzt. Das Ergebnis des Luziferase-Reporter-Assays zeigt, dass nur die HIV-1 spezifischen shRNAs der selektierten shRNA-Bibliothek, nicht aber die Kontroll-shRNA (siScr), in der Lage sind, die Expression der Luziferase zu inhibieren (Abb. 11B).

Mit Hilfe der optimierten Bedingungen konnten 31 verschiedene shRNA-Sequenzen identifiziert werden. Jede der identifizierten Sequenzen war vollständig komplementär zu einer spezifischen Sequenz von HIV-1 pNL4.3 und war unter den Sequenzen der bekannten HIV-1 Isolate konserviert. Die Expression der shRNAs von dem GATEWAY® kompatiblen Vektor pENTR/TA bestätigt deren inhibitorisches Potential im HIV-1 spezifischen Luziferase-Assay.

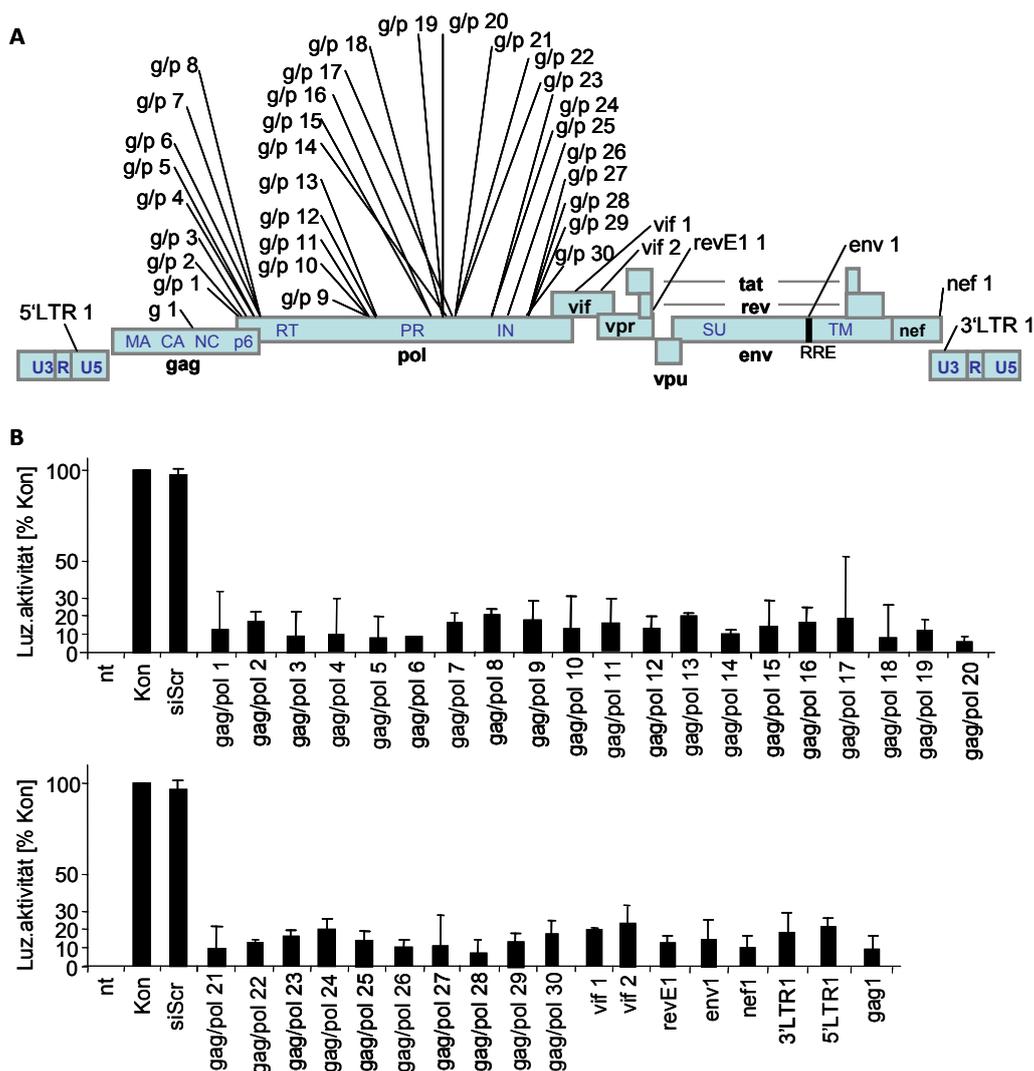


Abb. 11) Die Expression der shRNAs vom Vektorhintergrund pENTR/TA resultiert in einer spezifischen Herunterregulierung der Luziferase-Aktivität. A) Zu den Zielregionen der identifizierten shRNAs gehören die gag/pol-kodierende Region, die vif-kodierende Region, das ExonE1 von rev und die enf-kodierende Region. 5'LTR und 3'LTR sind gegen Sequenzen der regulatorischen LTR-Regionen gerichtet. B) Die in den Vektor pENTR/TA klonierten shRNA-Expressions-kassetten wurden mit dem Reporterplasmid pNL4.3.Luc.R-E- in $3,6 \times 10^4$ HEK293 FT Zellen kotransfiziert (CaPO; je 50 ng Plasmid) und 48 h später mit Hilfe des Luziferase-Assays die Herunterregulierung der Luziferase-Aktivität gemessen. Alle HIV-1 spezifischen shRNAs sind potente Inhibitoren der Luziferase-Aktivität im Vergleich zur irrelevanten Kontroll-shRNA siScr.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die randomisierte shRNA-Bibliothek eine Vielzahl potenter shRNAs gegen verschiedene Regionen des HIV-1 Genoms enthält und dass die Positivselektion mit Ganciclovir zu einer Anreicherung potenter Inhibitoren der Replikation von HIV-1 geführt hat.

4.6 Analyse synthetischer siRNA-Derivate

ShRNAs, die im Zellkern eukaryotischer Zellen exprimiert werden, werden mit Hilfe von Exportin-5 in das Zytoplasma geschleust (Yi, R, 2003). Im Zytoplasma werden sie anschließend von Dicer in funktionelle siRNAs prozessiert, indem die Haarnadelschleife entfernt wird (Mikuma, T, 2004). Um herauszufinden, ob exogen applizierte synthetische siRNAs eine vergleichbare inhibitorische Effizienz aufweisen wie die von Plasmiden exprimierten shRNA-Expressionskassetten, wurden auf der Basis von 11 verschiedenen shRNAs korrespondierende siRNAs synthetisiert. Die synthetischen siRNAs wurden mit den entsprechenden Selektionsplasmiden in HEK 293 FT Zellen kotransfiziert und die Expression der von der Fusions-mRNA exprimierten HSV-TK 48 Stunden nach Transfektion im Western Blot getestet. Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische siRNA (*Allstar neg.*) verwendet. Die Western Blot Analyse der Zelllysate in Abbildung 12 zeigt, dass 80% der synthetischen siRNAs in der Lage sind, die Expression der Thymidinkinase von der Fusions-mRNA konzentrationsabhängig zu inhibieren.

Die Daten zeigen, dass die Effizienz synthetischer siRNA-Derivate mit der validierter shRNA-Konstrukte vergleichbar ist.

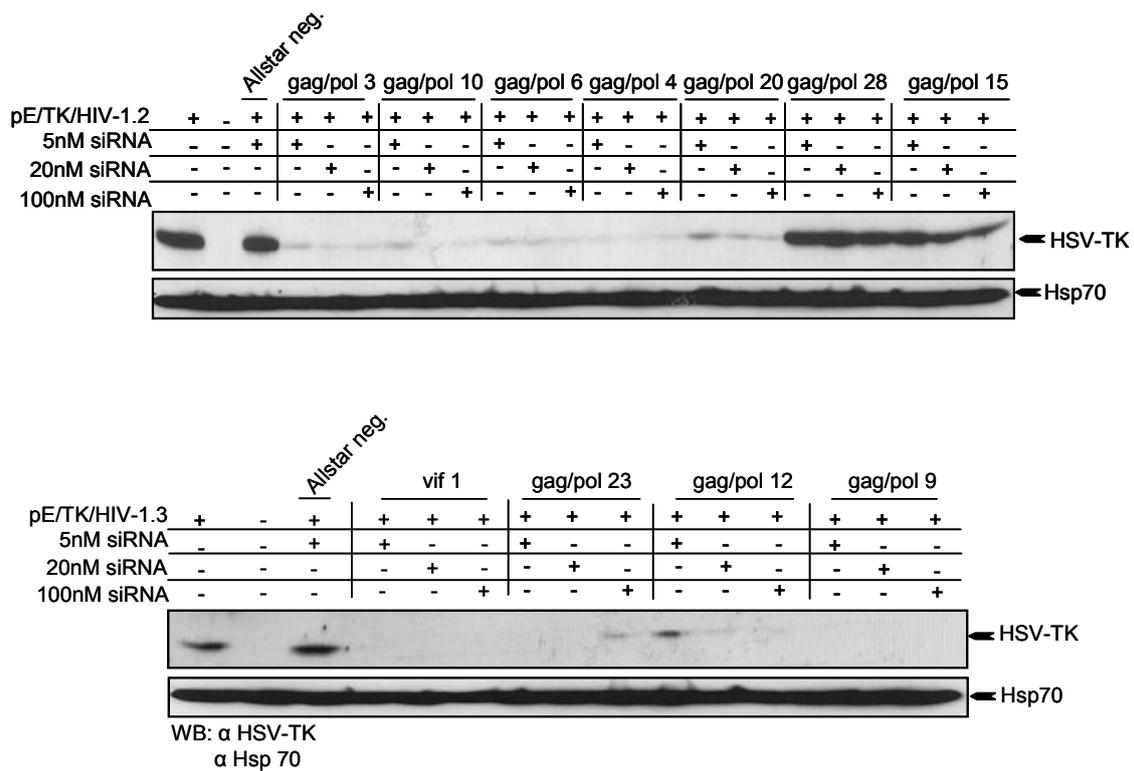


Abb. 12) Synthetische siRNA-Derivate und validierte shRNAs inhibieren die Replikation von HIV-1 mit vergleichbarer Effizienz. 11 verschiedene shRNAs wurden chemisch synthetisiert und jeweils 5 nM, 20 nM und 100 nM der synthetischen siRNAs wurden mit den entsprechenden Selektionskonstrukten in 2×10^5 HEK293 FT Zellen kotransfiziert (CaPO, 300 ng Vektor). Immunblotanalysen mit HSV-TK spezifischem Antikörper 48 h nach Transfektion zeigen, dass die Mehrheit der siRNAs die Expression der HSV-TK in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibieren können. Allstar neg. = Kontroll-siRNA.

4.7 Funktioneller Vergleich von shRNAs und miRNAs

Endogen exprimierte miRNAs werden von RNA Polymerase II Promotoren im Zellkern polycistionisch exprimiert und liegen vor ihrer Prozessierung als lange pri-miRNAs vor. Drosha erkennt diese Strukturen und prozessiert die pri-miRNA in 60 – 70 nt miRNA-Vorläufer, die prä-miRNAs. Die prä-miRNAs werden anschließend durch den Exportin-5/Ran Komplex in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Im Vergleich zu shRNA und siRNAs, die zu ihrer Zielsequenz vollständig komplementär sein müssen, bilden miRNAs aufgrund von Nukleotidsubstitutionen charakteristische Nukleotidblasen (ungepaarte Nukleotide), die eine vollständig komplementäre Bindung an ihre Ziel-mRNAs verhindern. So wird die Ziel-mRNA nach der miRNA-

Bindung nicht degradiert sondern ihre Translation unterdrückt. Ein bedeutsamer Vorteil von RNA Polymerase II Promotoren besteht in der polycistronischen Genexpression und in der induzierbaren zellspezifischen Aktivierung von miRNAs. Daher wurde die Möglichkeit geprüft, die RNA Polymerase III abhängige shRNA-Bibliothek in einem RNA Polymerase II kontrollierten miRNA Hintergrund zu überführen. Zu diesem Zweck wurde ein kommerzielles miRNA-Expressionssystem verwendet, das auf der murinen miR-155 basiert und die Expression der miRNA von einem CMV-Promoter steuert (Lagos-Quintana *et al.* 2002).

ShRNA-Sequenzen von drei effizienten shRNA-Expressionskassetten wurden als Oligonukleotide mit der für die miR-155 charakteristischen Haarnadelschleife synthetisiert und in den kommerziellen Vektor kloniert. Es wurden sowohl Oligonukleotide mit dem für miRNAs charakteristischen Nukleotid-Blasen durch Einfügen von Nukleotiden synthetisiert als auch Oligonukleotide, die die ursprüngliche shRNA-Sequenz kodieren.

Die miRNA Expressions-Plasmide wurden mit dem entsprechenden Selektionsplasmid (pENTR/HSV-TK/HIV-1.2) in HEK 293 FT Zellen kotransfiziert und die Expression der Thymidinkinase im Western Blot 48 Stunden nach Transfektion getestet. Als Positivkontrolle wurden die drei entsprechenden shRNA-Expressionsplasmide verwendet. Wie Abbildung 13 zeigt, sind nur die shRNA-Expressionsplasmide in der Lage die Thymidinkinase-Expression effizient herunterzuregulieren. Die miRNA-Expressionsplasmide, mit oder ohne Nukleotid-Blasen zeigen nur eine geringfügige Herunterregulierung der Thymidinkinase-Expression.

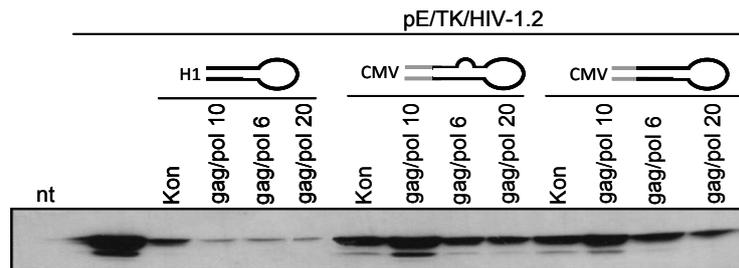


Abb 13) Validierten shRNAs, die von einem RNA Polymerase II Promoter exprimiert werden weisen kein inhibitorisches Potential auf. Drei validierte shRNAs wurden in ein kommerzielles Vektorsystem mit RNA Polymerase II Promoter kloniert. Dabei wurden shRNAs mit ursprünglicher Sequenz als auch shRNAs mit den für miRNAs charakteristischen Nukleotidblasen kloniert. Um das inhibitorische Potential der von den RNA Polymerase II exprimierten shRNA-Derivate zu testen und mit dem ursprünglichen RNA Polymerase III gesteuerten shRNAs zu vergleichen, wurden die Expressionsplasmide mit dem relevanten Fusions-mRNA Selektionsplasmid in 2×10^5 HEK293 FT Zellen kotransfiziert (CaPO, je 0,5 μ g Plasmid). Immunblotanalysen mit HSV-TK spezifischem Antikörper 48 h nach Transfektion zeigen, dass die shRNA-Derivate, die von einem RNA Polymerase II Promoter (CMV) exprimiert werden, die Expression der HSV-TK nur minimal herunterregulieren. Im Gegensatz zu den RNA Polymerase III Promoter (H1) exprimierten shRNAs, die eine starke Herunterregulierung der HSV-TK induzieren. (grau = miRNA-Hintergrund der murinen miR-155)

4.8 Stabile shRNA-Expression als potenter Inhibitor der HIV-Infektion

Um den inhibitorischen Effekt der shRNAs auf eine HIV-1 Infektion untersuchen zu können wurden stabil exprimierende HeLa-P4-shRNA Zelllinien etabliert. Die parentale Zelllinie HeLa-P4 (Prof. Kräusslich, Universitätskliniken Heidelberg) exprimiert sowohl den humanen primären HIV-1 Rezeptor (CD4) als auch beide HIV-1 Korezeptoren (CXCR4 und CCR5) und ist somit für HIV-1 permissiv (Charneau *et al.* 1992).

Für die Etablierung stabiler HeLa-P4-Zellen wurden die shRNA-Expressions-kassetten aus dem GATEWAY[®] kompatiblen Vektor pENTR/TA in den lentiviralen Vektor pL (B. Yazdanpanah) subkloniert (Abb. 14A). Anschließend wurden in HEK293 FT Zellen lentivirale Partikel hergestellt. Für jede shRNAs-Spezies wurden mehrere Klone der HeLa-P4-Zelllinie generiert. Die Integration der shRNA-Expressions-kassetten wurde durch PCR-Analysen überprüft (Daten nicht

gezeigt). Eine Vorauswahl effizienter Zellklone wurde nach einem transienten Test getroffen. Dazu wurden die Zellklone mit dem Reporterkonstrukt pNL4.3.Luc.R-E transfiziert und Luziferase-Assays durchgeführt. Abbildung 14B zeigt, dass die Mehrzahl der etablierten Zelllinien in der Lage sind, die Expression der Luziferase im Vergleich zur scrambled HeLa-P4-Zelllinie scrX herunterzuregulieren.

Für die Infektionsversuche wurden die ausgewählten stabilen HeLa-P4-Klone mit dem HIV-1 Klon pNL4.3 infiziert. 42 Stunden nach Infektion wurde im Überstand der Zellen das virale Kapsidprotein p24 mittels p24-Antigen-ELISA bestimmt. Der p24-Antigen Nachweis dient der Quantifizierung der HI-Viruspartikel in einer Kultur, da die Menge der Viren in einer Viruskultur proportional zur Menge des Kapsidproteins p24 ist (p24-Antigen Äquivalent). Die Auswertung des ELISAs zeigt, dass alle shRNA-exprimierenden HeLa-P4-Klone in der Lage sind, die Produktion neuer Viruspartikel um 60 bis 80% herunterzuregulieren (Abb. 14C). Im Vergleich dazu inhibiert die HIV-1 unspezifische Kontrollzelllinie HeLa P4 scrX die Virusproduktion um maximal 10%.

Diese Daten zeigen eindeutig, dass die durch die Selektion der randomisierten shRNA-Bibliothek angereicherten shRNAs nicht nur im Modellsystem sondern auch während einer HIV-1 Infektion die Virus Replikation herunterregulieren können.

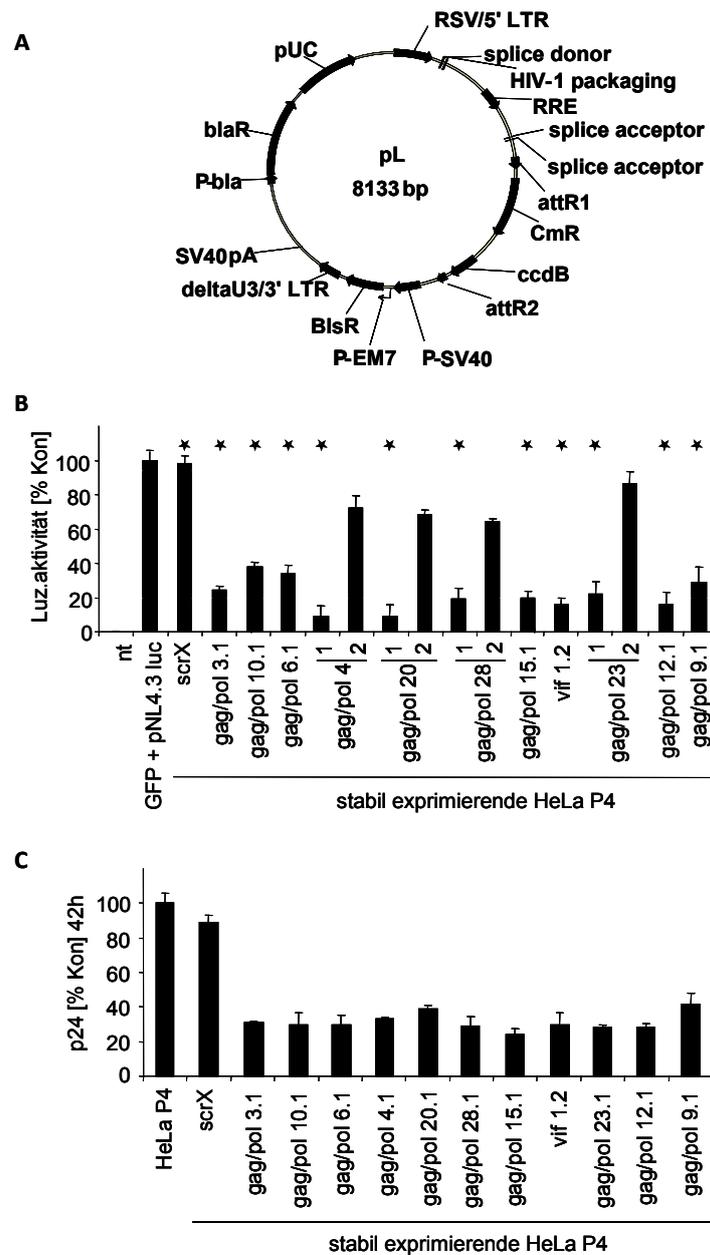


Abb. 14) Stabile shRNA-Expression inhibiert HIV-1 Infektionen in HeLa-P4-Zellen. Für die stabile Expression der ausgewählten shRNAs wurden die shRNA-Expressionskassetten aus dem pENTR/TA über LR Rekombination in den A) lentiviralen Vektor pL subkloniert. Anschließend wurden virale Partikel mit pL/shRNA hergestellt und für die Etablierung stabiler HeLa-P4-Zellen (Prof. Kräusslich, Heidelberg) verwendet. B) Für jede shRNA wurden verschiedene HeLa-P4-Klone im HIV-1 spezifischen Luciferase-Assay auf ihr inhibitorisches Potential getestet. Dazu wurden $3,4 \times 10^4$ Zellen der stabilen HeLa-P4-Klone mit pNL4.3.Luc.R-E- transfiziert (CaPO; 50ng) und 48h pT Luciferase-assays durchgeführt. C) Die in B) mit * gekennzeichneten HeLa P4 Klone wurden mit HIV-1 pNL4.3 infiziert und 42 h danach die Produktion von Virus Nachkommen mittels p24 Antigen ELISA (INNOGENETICS; Gent, Heidelberg) gemessen. Alle shRNAs sind im Vergleich zur irrelevanten Kontrolle-Zelllinie HeLa-P4 scrX in der Lage die Produktion von Virus Nachkommen zu inhibieren.

5 *Diskussion*

Die zur Behandlung von HIV-1 infizierten Patienten herkömmlich eingesetzte antiretrovirale Therapie (HAART) ist Protein-basiert und vereinigt Inhibitoren der Reversen Transkriptase und der Protease sowie einen Fusionsinhibitor. Mit HAART kann die Viruslast mittlerweile im besten Fall für ca. 40 Jahre auf ein nicht detektierbares Niveau inhibiert werden. HAART bleibt jedoch vor allem bedingt durch starke Nebenwirkungen und die Produktion geringster Mengen viraler Transkripte in Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen, aus denen durch den therapeutischen Selektionsdruck resistente HIV-1 Varianten hervorgehen können, für eine effiziente Medikation unzulänglich. Auf der Suche nach neuen Ansätzen gewannen neben der Weiterentwicklung Protein-basierter Therapieansätze die RNA-basierten Ansätze an Bedeutung. Von ihnen stellt die RNA Interferenz mittels siRNAs und shRNAs einen viel versprechenden Ansatz dar, der gentherapeutisch zur „intrazellulären Immunisierung“ eingesetzt werden kann.

Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit shRNAs identifiziert werden, die als potente Inhibitoren der HIV-1 Replikation fungieren können. Die Identifikation dieser shRNAs erfolgte über die Selektion einer randomisiert konstruierten HIV-1 spezifischen shRNA-Bibliothek in zu diesem Zweck generierten HeLa Selektionszelllinien. Die Validierung der selektierten shRNA-Expressionskassetten zeigte, dass mehr als die Hälfte der shRNAs die Replikation von HIV-1 um mehr als 70% herunterregulieren konnten und somit als potente shRNA gelten. Die anschließende Sequenzierung der shRNAs belegte die HIV-1 Spezifität, da der *antisense* Strang der shRNAs vollständig komplementär zum kodierenden Strang der provialen DNA von HIV-1 war. Eine Auswahl der shRNAs wurde für weitere funktionelle Analysen herangezogen. Um die Konvertibilität der shRNA-Bibliothek zu überprüfen, wurden ausgewählte shRNAs sowohl als synthetische siRNAs als auch als miRNAs auf ihr inhibitorisches Potential hin überprüft. Dabei waren 80% der synthetischen siRNAs in der Lage, die Translation der Fusions-mRNA effizient herunterzuregulieren. Die Expression der shRNAs von einem RNA Polymerase II

Promoter in einer natürlichen miRNA Umgebung konnte hingegen keine effiziente Inhibition der Translation der Fusions-mRNA erzielen. Schließlich wurde die Produktion von Virus-Nachkommen in HIV-1 permissiven HeLa P4 Zellklonen, die eine stabile Expression jeweils einer validierten shRNA aufwiesen, getestet. Die Versuche bestätigten anhand einer verminderten Virusreplikation, dass die identifizierten shRNAs potente Inhibitoren von HIV-1 darstellen, was sie für einen gentherapeutischen Ansatz interessant macht.

5.1 Konstruktion der randomisierten shRNA-Bibliothek

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine randomisierte shRNA-Bibliothek gegen HIV-1 konstruiert. Die Konstruktion basiert auf einer von Sen *et al.* abgeleiteten Technologie (Sen *et al.* 2004). Ihr liegt ein Klon von HIV-1 (Laborstamm pNL4.3) zugrunde, der jedoch nicht wie von Sen *et al.* beschrieben mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in kleinere Fragmente geschnitten, sondern mittels DNase I fragmentiert wurde. Die so beschriebene Fragmentierung der proviralen DNA hat den Vorteil, dass überlappende Fragmente hergestellt werden und damit die Komplexität bzw. Diversität der shRNA-Bibliothek gesteigert wird (Anderson 1981). DNase I ist durch eine sehr geringe Sequenzspezifität gekennzeichnet (Ehrlich *et al.* 1973). Um jedoch eine völlig Sequenz-unabhängige Fragmentierung der cDNA durchführen zu können, wurde außerdem der Versuch unternommen, eine mechanische Fragmentierung mittels Ultraschall durchzuführen. Die anschließende Ligation der fragmentierten cDNA mit dem 3'loop oder mit sich selbst schlugen jedoch fehl, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass durch das hydrodynamische Scheren die DNA vollständig degradiert worden war oder unligierbare Enden produziert wurden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Funktionalität der hier angewandten shRNA-Bibliothek ist die Limitierung der Länge der resultierenden shRNAs auf 19 – 21 Nukleotide mit 2 nt 3' Überhängen, um eine Interferonantwort zu verhindern (Gantier and Williams 2007). Die Interferonantwort bildet einen essentiellen Teil der angeborenen Immunität einer Zelle und wird u. a. als Abwehrmechanismus gegen kurze RNA-Stränge im Rahmen der Virusabwehr initiiert. Sie induziert eine generelle

Unterdrückung der Proteinexpression in infizierten Zellen und führt letztlich zum Zelltod (Grandvaux *et al.* 2002). Um die Größe der resultierenden shRNAs kontrollieren zu können, wurde der 3' *loop*, der die Haarnadelschleife der shRNA enthält, mit einer Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Mme I* versehen. Durch die 20 nt versetzte Schnittstelle des Restriktionsenzym konnten HIV-1 Fragmente mit einer Länge von mehr als 21 nt aus der Konstruktion der shRNA-Bibliothek ausgeschlossen werden. Um die für eine shRNA charakteristische invertierte Struktur aus *sense* und *antisense* Strang und verbindender Haarnadelschleife generieren zu können, wurde der komplementäre Strang des einzesträngigen DNA Ringes, der durch die Ligation des 5' *loop* generiert wurde, mittels *rolling circle amplification* (RCA) mit der ϕ 29 DNA Polymerase synthetisiert. Die ϕ 29 DNA Polymerase eignet sich durch ihre außerordentlich hohe Prozessivität und Genauigkeit besonders zur Synthese der invertierten Strukturen (Blanco and Salas 1984; Blanco *et al.* 1989; Garmendia *et al.* 1992). Die Bibliothek der shRNA-Sequenzen wurde nach der Klonierung in den GATEWAY[®]-kompatiblen shRNA-Expressionsvektor pENTR/siLib, der es ermöglicht die shRNA-Sequenz zwischen den RNA-Polymerase III Promoter H1 und eine polyA-Sequenz einzufügen, in den lentiviralen Vektor pLP/EGFP subkloniert. Der lentivirale Vektor erlaubte die stabile Expression der shRNA nach Integration in das Genom der Selektionszelllinien und damit eine Selektion potenter shRNAs. Außerdem ermöglichte das Markergen EGFP eine kontrollierte Transduktion der Selektionszelllinien, um einmalige Integrationsereignisse gewährleisten zu können.

5.2 Selektion potenter HIV-gerichteter shRNAs

Für die Anreicherung potenter shRNAs aus der randomisierten shRNA-Bibliothek, wurden Selektionszelllinien etabliert, die eine Fusions-mRNA aus Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) und einem Abschnitt des HIV-1 Genoms exprimieren. Die Fragmentierung des HIV-1 Genoms in drei Abschnitte erfolgte aufgrund der biologischen Sicherheit, um die Entstehung von infektiösen Viruspartikeln bei der lentiviralen Transduktion der shRNA-Bibliothek zu verhindern.

Die Expression der Thymidinkinase selbst ist nicht toxisch für die stabil

exprimierenden Zellen. Erst eine gezielte Ganciclovir-Behandlung führt zur Akkumulation des toxischen Derivats und konsequenterweise zum Tod der Zellen. Die Expression einer potenten shRNA in der entsprechenden Selektionszelllinie führt zur effizienten Degradation der Fusions-mRNA, wodurch die Expression der HSV-TK unter ein kritisches Niveau herabsinkt, was zum Überleben der Zellen in Anwesenheit von Ganciclovir führt. Dadurch konnten Zellen, die eine effiziente shRNA exprimieren angehäuft werden.

Durch die Etablierung eines zweistufigen *nested* PCR-Systems konnten die shRNAs als shRNA-Expressionskassetten direkt aus den positiv selektierten Zellklonen amplifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die shRNA-Expressionskassetten als effizientes Expressionssystem für die Validierung des inhibitorischen Potentials der shRNAs verwendet werden konnten. Die Funktionalität der 175 bp großen PCR-Fragmente steht im Einklang mit experimentellen Analysen anderer Arbeitsgruppen (Scherer *et al.* 2004). Die Validierung der selektierten shRNA-Expressionskassetten zeigte, dass mehr als die Hälfte der shRNAs die HIV-1 Replikation um mehr als 70% inhibieren konnten.

Im Gegensatz dazu identifizierten Shirane *et al.* in einer vergleichbaren shRNA-Bibliothek gegen GFP nur 30% shRNA Klone mit mehr als 70% inhibitorischem Potential (Shirane *et al.* 2004). Die effizientere Anhäufung potenter gegen HIV-1 gerichteter shRNAs erklärt sich vor allem durch die Optimierung der Selektionsschritte. Erstens konnten durch die Optimierung der Ganciclovirkonzentration in den mit einer irrelevanten und einer relevanten shRNA-Bibliothek transduzierten Selektionszelllinie stringenter Selektionsbedingungen etabliert werden. Zweitens wurde die Anhäufung falsch-positiver Zellklone unterdrückt, indem die transduzierten Selektionszelllinien mit Puromycin behandelt wurden. Auf diese Weise wurden Zellen, die keine shRNA exprimierten eliminiert. Drittens ermöglichte die lentivirale Koexpression von EGFP eine weitere Reduktion falsch-positiver Klone.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier angewandte Methode zur Konstruktion und Selektion von shRNA-Sequenzen eine kostengünstige und effiziente Methode zur Validierung potenter shRNAs darstellt. Theoretisch könnte diese Methode für jedes beliebige Gen oder Genom angewendet werden. Ein

weiteres Einsatzgebiet für das hier beschriebene Selektionssystem könnte in der Selektion anderer RNA-basierter Therapeutika, wie Ribozyme, *antisense* RNA oder Aptamere bestehen.

5.3 Sequenzanalysen der selektierten shRNAs

Für eine Sequenzierung der shRNAs wurden verschiedene Parameter optimiert. So konnten die Verwendung von zwei verschiedenen Versionen einer Sequenzierformulierung zur Sequenzierung G/C-reicher aber auch Sekundärstruktur-reicher DNA und der Einsatz von Betaine zu besseren Sequenzierungsergebnissen führen. Bei Betaine handelt es sich um eine Ammoniumverbindung, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen reduziert und so die Amplifikation von DNA unterstützt (Haqqi 2002). Außerdem wurde eine als *TouchDown* bezeichnete PCR-Strategie angewandt, die die Spezifität der Primer-Bindung durch eine zyklische Annäherung der Annealing-Temperatur an die zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers erhöht. (Don *et al.* 1991).

Zur Sequenzierung wurden die PCR-amplifizierten shRNA-Expressionskassetten in den GATEWAY®-kompatiblen Vektor pENTR/TA kloniert, der eine effiziente Klonierung von TA-Überhängen (Zhou *et al.* 1995) ermöglichte. Die subklonierten shRNA-Expressionskassetten wurden auf ihre Nukleotidzusammensetzung hin überprüft. Dabei bildet Guanodin die 21. Base der shRNA *sense*-Stränge, die durch das Einfügen der *Mme I*-Schnittstelle in den *3'loop* generiert wurde. Das Enzym Dicer prozessiert shRNAs vorzugsweise in 21 – 23 nt lange siRNAs mit einem komplementären Stamm von 19 – 21 nt und 2 nt 3' Überhängen (Zhang *et al.* 2002; Myers *et al.* 2003; Ji 2008). Daher wäre es möglich, dass das Guanodin im 3' Überhang des *sense*-Stranges und damit nicht im entscheidenden *antisense* Strang liegt. Es wurde gezeigt, dass Substitutionen von 1 – 2 nt an beiden Enden der siRNAs im Gegensatz zu Mutationen in der Mitte des Stammes keinen, oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Effizienz der siRNAs ausüben (Czauderna *et al.* 2003). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das mögliche Cytosin im *antisense*-Strang das Auftreten von *off-target* Effekten erhöhen könnte.

Darüber hinaus wurden die ermittelten Sequenzen Vergleichsanalysen mit öffentlichen siRNA-Algorithmen (Reynolds *et al.* 2004; Jagla *et al.* 2005) unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die meisten der experimentell als potent selektierten shRNAs die Parameter der Algorithmen nicht erfüllen konnten. Auch andere Autoren stellten fest, dass die anhand von Algorithmen vorhergesagte Effizienz einer shRNA nicht immer mit der experimentell ermittelten übereinstimmte (Zhao *et al.* 2005; Buchholz *et al.* 2006). Li *et al.* erklärten diese Diskrepanz durch die fehlende Gewichtung der Parameter der Algorithmen und die Vernachlässigung der Sekundärstrukturen sowohl des *antisense* Stranges der shRNA als auch der Ziel-mRNA (Luo and Chang 2004; Patzel *et al.* 2005; Li and Cha 2007). Aus den beschriebenen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass weitere Analysen erforderlich sind, um zuverlässige Algorithmen aufstellen zu können. Dabei kann die Sequenzanalyse der aus randomisierten shRNA-Bibliotheken selektierten shRNAs bei der Verbesserung der entscheidenden Parameter eine wichtige Rolle spielen, da sie aufgrund ihrer Effizienz und nicht ihrer Sequenz selektiert werden.

5.4 Konvertibilität der inhibitorischen Sequenzen

Ein entscheidender Vorteil von RNA Polymerase III Promotoren (Pol III) liegt darin, dass die shRNA konstitutiv und ubiquitär exprimiert werden kann. Außerdem sind solche shRNA-Expressionskassetten durch ihren kompakten Aufbau leicht in virale Vektoren zu klonieren. Die Effizienz der in dieser Arbeit konstruierten Pol III shRNA-Vektoren konnte in Luziferaseuntersuchungen und in einem wt-HIV-Infektionsmodell bestätigt werden. Für Transgenese oder gentherapeutische Ansätze wäre auch eine zell- bzw. gewebespezifische Expression mittels RNA Polymerase II Promotoren (Pol II) wünschenswert. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz von synthetischen siRNAs bei gentherapeutischen Ansätzen wäre auch ein Vergleich validierter shRNA-Sequenzen mit synthetischen siRNA-Derivaten von Interesse.

Um die Konvertibilität der identifizierten shRNAs zu überprüfen, wurden eine Auswahl hochaktiver selektierter shRNA-Sequenzen entweder als siRNAs synthetisch hergestellt oder in einer miRNA-Umgebung mit dem RNA Polymerase II

Promoter von CMV (*Cytomegalievirus*) exprimiert.

Versuche mit synthetischen siRNA-Derivaten zeigten ein vergleichbar hohes inhibitorisches Potential zu den validierten shRNAs-Expressionskassetten. Schon mit geringsten Konzentrationen konnte eine signifikante Inhibition erzielt werden. Darüber hinaus konnte das inhibitorische Potential der siRNA-Derivate dosisabhängig erhöht werden. Es zeigte sich jedoch, dass zwei der synthetischen siRNAs keine Herunterregulierung induzieren konnten. Ein Grund dafür könnte in der mangelnden Stabilität dieser siRNAs liegen. Es wurde gezeigt, dass der Abbau synthetischer siRNAs auf die enzymatische Aktivität von Enzymen der RNase A-Familie im Serum zurückzuführen ist und die Halbwertszeit einer siRNA von ihrer Sequenz und der Anwesenheit 3' überhängender Basen abhängt (Turner *et al.* 2007). Um die Stabilität synthetischer siRNAs zu erhöhen wurden verschiedene terminale und interne chemische Modifikationen untersucht. Diese führten zwar zu einer Stabilisierung der siRNA, hatten jedoch manchmal eine negative Auswirkung auf die Effizienz der RNAi (Czauderna *et al.* 2003). Zum Zwecke eines gentherapeutischen Einsatzes von siRNAs konnte gezeigt werden, dass durch die Konjugation einer siRNA mit einem CD7 *single-chain* Antikörper eine effiziente und spezifische Transduktion von CD7⁺-Zellen, den Zielzellen von HIV-1, ermöglicht werden konnte. Durch diese zell-spezifische Transduktion der betroffenen Gewebe könnte ein möglicher toxischer Effekt eingegrenzt werden (Kumar *et al.* 2008).

Vor dem Hintergrund einer zell- bzw. gewebespezifischen Expression von shRNAs, sollten die ausgewählten shRNA-Sequenzen in einer miRNA-Umgebung (miR-155) exprimiert werden. Es wurden sowohl die originalen shRNA-Sequenzen verwendet als auch miRNA-Sequenzen generiert, die durch Insertionen von 2 nt im *sense* Strang miRNA-typische Sekundärstrukturen aufweisen sollten. Im Vergleich zur Pol III gesteuerten Expression konnte jedoch keine signifikante Herunterregulierung der Fusions-mRNA beobachtet werden. Weitere Optimierungen dieses Expressionssystems scheinen notwendig zu sein, um effiziente miRNA-Sequenzen herstellen zu können. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die gleichen Sequenzen in verschiedenen miRNA-Umgebungen unterschiedliche inhibitorische Potentiale aufwiesen und dass die polycistronische miRNA-Expression die Effizienz einzelner

miRNAs erhöhte (Liu *et al.* 2008).

Die vorgestellten experimentellen Daten lassen vermuten, dass die Pol III gesteuerte Expression der shRNAs das zurzeit effizienteste der gebräuchlichen Systeme zur Herunterregulierung der HIV-1 Replikation und Infektion ist. Die beschriebenen Veröffentlichungen zeigen jedoch auch, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete RNA Pol II Expressionsystem sich möglicherweise verbessern ließe, indem zum einen Strukturveränderungen vorgenommen und zum anderen mehrere miRNA-Derivate polycistronisch exprimiert würden.

5.5 Das Potential RNAi-basierter Therapien

Mit der Entdeckung der RNA Interferenz (RNAi) und ihrer Bedeutung als molekulares Werkzeug in der biologischen Forschung rückte sie in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus klinischer Anwendungen. Mittlerweile wird die RNAi-basierte Therapie zur Behandlung verschiedener genetisch bedingter Erkrankungen oder Infektionskrankheiten erprobt. Gegenwärtig befinden sich drei RNAi Therapeutika in klinischen Phase III Studien, die auf der Injektion bzw. der Inhalation chemisch synthetisierter siRNAs beruhen. Patienten, die an Retinitis oder altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) erkrankt sind, werden durch die direkte Injektion synthetischer siRNAs gegen VEGF (*vascular epidermal growth factor*) in den Glaskörperhohlraum des Auges behandelt. (Jabs and Griffiths 2002; Gragoudas *et al.* 2004). Bei der Behandlung von *Respiratory-Syncytical-Virus* (RSV)-Infektionen mittels synthetischer siRNAs inhalieren die Patienten siRNAs gegen das virale Nukleokapsid, um auf diese Weise direkt das Lungenepithel zu erreichen. Alle drei RNAi-basierte Therapien nutzen die Tatsache aus, dass sowohl im Glaskörper des Auges als auch in den Zellen des Lungenepithels vergleichsweise geringe Mengen an Nukleasen vorhanden sind, die eine Verwendung unmodifizierter siRNAs ermöglicht. Dabei reduziert die direkte Applikation die Medikamentendosis und minimiert das Risiko systemischer Nebenwirkungen (Bitko *et al.* 2005). Eine Reihe ähnlicher siRNA-basierter Ansätze befindet sich zur Zeit in der präklinischen Erprobung (Hepatitis C, Leberkrebs und Parkinson-Krankheit) oder in klinischen Phase I Studien (Asthma, Hepatitis B, mit AIDS verbundene Lymphome)

(Shrivastava and Srivastava 2008).

Im Gegensatz zu den siRNA-basierten Ansätzen können Vektor basierte shRNA Strategien zu einer dauerhaften Inhibition führen (Yamamoto *et al.* 2006). Retro- bzw. lentivirale Vektoren scheinen dafür die geeigneten Werkzeuge zu sein, da sie über die Integration ins Genom eine stabile Expression des Transgens ermöglichen. Retrovirale Gentherapie von hämatopoetischen Zellen (CD34⁺) wurde schon erfolgreich in kleinen (Pawliuk *et al.* 2001) und großen Tiermodellen (Neff *et al.* 2003) und aufgrund der Ausbildung von Leukämien mit eher mäßigem Erfolg in menschlichen Patienten mit einer X-linked SCID (Kaiser 2003) durchgeführt.

In vorliegender Arbeit sollte überprüft werden ob sich potente shRNAs gegen HIV-1, die aus einer randomisierten shRNA-Bibliothek selektiert wurden und mittels lentiviraler Vektoren stabil in Zielzellen integriert wurden, für einen gentherapeutischen Ansatz gegen HIV-1 eignen würden.

5.6 RNAi in der Gentherapie von HIV-1

Ein möglicher gentherapeutischer Ansatz gegen HIV-1 Infektionen ist die lentivirale Transduktion von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs = hematopoietic stem cells). Tatsächlich befindet sich ein kombinatorischer Ansatz mit Pol III gefeuerter shRNA-Expression bereits in einer klinischen Phase I Studie. Zuvor konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass diese *ex vivo* transduzierten HSCs die HIV-1 Replikation stark inhibieren konnten (Anderson *et al.* 2007). Um zu überprüfen, ob die identifizierten shRNAs die Infektion mit HIV-1 inhibieren können, wurden permissive HeLa-P4-Zellen mit einer stabilen Expression jeweils einer shRNA etabliert. Nach Infektion konnte die Produktion von Virusnachkommen in den stabilen HeLa-P4-Zellen um ca. 80% inhibiert werden. Aufgrund der hier angewandten hohen Viruskonzentration wäre es möglich, dass das inhibitorische Potential individueller shRNAs unter physiologischen Bedingungen größer sein könnte. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten verschiedener Autoren, die in stabilen Zelllinien aber auch in transduzierten primären Zellen eine Inhibition der HIV-1 Replikation initiieren konnten (Banerjea *et al.* 2003; Nishitsuji *et al.* 2004; Yamamoto *et al.* 2006). Neben einer

effizienten Inhibition des Zielgens beobachteten jedoch einige Wissenschaftler außerdem, dass die starke Expression der shRNAs von einem RNA Polymerase III Promoter sowohl zu einer Induktion der Interferon-induzierten Gene 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS-1) und IFN- β führte als auch zu einer Anhäufung von pri-miR21 (Stewart *et al.* 2008). Die Aktivierung von OAS-1 führt zu einer generellen, unspezifischen Inhibition der Proteinbiosynthese und konsequenterweise zum Zelltod (Sledz, *ca.*, 2004). Die Anhäufung von miRNA-Vorläufern weist wiederum darauf hin, dass endogene miRNAs und shRNAs um den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle konkurrieren und durch die starke Expression der shRNA der nukleäre Transporter von pri-miRNAs und shRNAs, Exportin-5, gesättigt zu sein scheint (Yi *et al.* 2005; Grimm *et al.* 2006). Da die hier validierten shRNA-Expressionskassetten in Zellen selektioniert und in permissiven HeLa-P4-Zellen reevaluiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass ihre Zytotoxizität sehr gering sein muss. Die Induktion einer geringen Interferonantwort in den etablierten Zelllinien müsste jedoch noch experimentell untersucht werden. Um zusätzlich die Gefahr von Insertionsmutationen möglichst gering zu halten, wurde die Transduktion von Selektionszelllinien mit Hilfe des Markergens EGFP kontrolliert. Dadurch war es möglich die Zellen mit einer MOI von 0,1 zu transduzieren, um einmalige Integrationsereignisse zu gewährleisten. Auch die permissiven HeLa-P4-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 etabliert. Somit kann vermutet werden, dass geringe Kopien der hier selektierten shRNA-Expressionskassetten für eine effektive Inhibition bei gleichzeitig geringer Toxizität ausreichend sind.

Das beschriebene System kann auf unterschiedliche Weisen optimiert werden. Z.B. könnte die shRNA-Expression induziert werden. Es existieren zurzeit mehrere Pol III Expressionssysteme, die induzierbar sind. Dazu gehören Cre- (Kasim *et al.* 2003), IPTG- (Wu *et al.* 2007) bzw. tet-induzierbare (Szulc *et al.* 2006) Pol III Promotoren. Eine derartige konditionale Expression der shRNAs könnte die Toxizität solcher Sequenzen und die Möglichkeit von anderen *off-target* Effekten minimieren, da eine Überexpression der shRNAs und konsequenterweise eine Sättigung der RNAi-Signalkaskade verhindert werden könnte. Ein Ansatz um der hohen Mutagenität von HIV-1 zu begegnen und eine lang anhaltende Inhibition der Replikation zu gewährleisten, könnte in der gleichzeitigen Applikation mehrerer verschiedener shRNAs liegen. Zu diesem Zweck könnte z.B. die Kombination der siRNAs vif1

oder vif2 (vif, tat, rev und nef mRNA; gi328453) mit den gag/pol siRNAs alle alternativ gespleißten mRNAs treffen und somit alle essentiellen Genprodukte von HIV-1 herunterregulieren. Weiterhin wäre es denkbar, die Expression verschiedener shRNA-Expressionskassetten mittels induzierbarer Promotoren zeitlich zu staffeln, was eine wirksame Strategie gegen das Entstehen von viralen *escape* Mutanten sein könnte. Eine weitere Strategie bestünde in der Auswahl hochkonservierter mRNA-Sequenzen von HIV-1. Es wurde gezeigt, dass die Entstehung von *escape* Mutanten auf Mutationen innerhalb der Ziel-mRNA zurückzuführen sind und dass HIV-1 nur an wenigen Positionen innerhalb hochkonservierter mRNA-Sequenzen Mutationen toleriert, die die Replikationsfähigkeit nicht negativ beeinflussen (von Eije *et al.* 2008). Um die durch den Selektionsdruck entstehenden Virusvarianten zu inhibieren, wäre die Verwendung so genannter *second generation* shRNAs denkbar, die nicht den wt Virus sondern die entstehenden *escape* Virusvarianten vollständig komplementär binden und konsequenterweise inhibieren könnten (ter Brake 2005).

In einem lentiviralen gentherapeutischen Ansatz steht vor allem auch die Sicherheit im Vordergrund. Z.B. könnte durch eine Limitierung des Tropismus der viralen Partikel eine zell-spezifische Transduktion der betroffenen Gewebe erzielt und ein möglicher toxischer Effekt eingegrenzt werden. Yang *et al.* beschrieben eine Strategie, bei der lentivirale Partikel mit dem B-Zell spezifischen Antikörper anti-CD20 ausgestattet und in einem mit humanem PBMC transplantierten Maus Modell analysiert wurden. FACS-Analysen isolierter Blutzellen zeigten, dass nach spezifischer Transduktion bis zu 50% der CD20⁺ humanen B-Zellen das Transgen exprimierten, wohingegen in anderen Blutzellen, wie T-Zellen, kein Transgen nachweisbar war (Yang *et al.* 2006). Eine T-Zell spezifische Transduktion im Bezug auf einen gentherapeutischen Ansatz gegen HIV-1 muss jedoch noch etabliert werden. Weitere Sicherheitsbedenken bestehen in möglichen Rekombinationsereignissen innerhalb lentiviraler Insertionen, die zur Entwicklung Replikations-kompetenter Lentiviren (replication competent lentivirus = RCL) führen könnten aber auch in der Möglichkeit zu insertioneller Onkogenese, die durch die Vektorintegration hervorgerufen werden könnte. Verschiedene klinische Studien zeigten nach lentiviralen gentherapeutischen Ansätzen in HSCs die Entwicklung von Lymphomen und Leukämien in einigen Patienten bei gleichzeitiger Verbesserung der Symptome bei nichtbetroffenen Patienten (Verma 2002; Hacein-Bey-Abina *et al.*

2003). Es wäre daher von grossem Vorteil, wenn in zukünftigen Studien die transduzierten Zellen vor einer Retransplantation besser untersucht würden. Genomsequenzierungen könnten den genauen Insertionsort der Transgene identifizieren und so Insertionen innerhalb von Proto-Onkogenen ausschließen. Außerdem könnten phänotypische Untersuchungen und *microarray* Analysen geeignete Werkzeuge zur Auswahl gesunder Stammzellen oder Stammzellklone darstellen.

6 Zusammenfassung

Um neue potente shRNA-Sequenzen gegen HIV-1 zu identifizieren, wurde zum ersten Mal eine randomisierte lentivirale shRNA-Bibliothek konstruiert. Die Expression der shRNAs wurde dabei von einem RNA Polymerase III Promoter (Pol III) gesteuert. Die Selektion potenter shRNA-Sequenzen erfolgte über zu diesem Zweck etablierten Zelllinien. Sowohl die Konstruktion als auch das Selektionssystem basierten auf etablierten Technologien, die jedoch in einigen Punkten zwecks erhöhter Diversität der Bibliothek und optimierter Selektionsbedingungen modifiziert wurden. Die Validierung der selektierten shRNA-Sequenzen zeigte, dass mehr als die Hälfte der shRNAs ein inhibitorisches Potential von über 70% aufwies. Sequenzanalysen subklonierter shRNA-Expressionskassetten demonstrierten ihre HIV-1 Spezifität. Außerdem zeigten Vergleichsanalysen mit öffentlichen siRNA-Algorithmen, dass die meisten der hier selektierten shRNAs die Parameter der Algorithmen nicht erfüllen konnten. Daraus resultiert, dass die selektierten shRNA-Sequenzen zusammen mit anderen selektierten Bibliotheken einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der entscheidenden Parameter der siRNA-Algorithmen leisten könnten, weil sie aufgrund ihrer Effizienz und möglicher Toxizität und nicht ihrer Sequenz selektiert wurden.

Um die Konvertibilität der inhibitorischen Sequenzen zu überprüfen, wurde das Pol III System mit synthetischen siRNAs und RNA Polymerase II gesteuerten miRNAs verglichen. Dabei stellte sich das Pol III System als das effizienteste heraus. Synthetische siRNA-Derivate ausgewählter hochpotenter shRNA-Sequenzen wiesen zwar ein vergleichbar starkes inhibitorisches Potential auf, die transiente Wirkdauer und die geringe Stabilität einiger siRNA-Sequenzen in Serum limitiert jedoch ihren Einsatz in klinischen Studien. Die Expression der shRNAs in einer miRNA-Umgebung offenbarte wiederum nur eine geringe inhibitorische Wirkung und erfordert weitere Optimierungen dieses Expressionssystems.

Die stabile lentivirale Expression von shRNAs in HIV permissiven HeLa-P4-Zellen zeigte eine effiziente Inhibition der Virusreplikation nach Infektion mit HIV-1. Da die

inserterten shRNAs in Zelllinien selektiert und reevaluiert wurden, kann außerdem von einer geringen Zytotoxizität ausgegangen werden. Dies macht sie für einen etwaigen Einsatz in gentherapeutischen Ansätzen interessant.

7 *Summary*

To identify novel potent shRNA-sequences against HIV-1 a randomized lentiviral RNA Polymerase III promoter (Pol III) driven shRNA-library has been engineered. The selection of potent shRNA-sequences was performed in HIV-1 specific stable celllines. Both the construction of the shRNA-library and the selection system are based on established technologies but were modified to increase the diversity of the shRNA-library as well as to optimize the selection conditions. The validation of the selected shRNA-sequences revealed that more than 50% of the shRNAs exhibited an inhibitory potential of over 70%. Sequence analysis of subcloned shRNA-expression cassettes demonstrated HIV-1 specificity. Furthermore, the analysis of public siRNA-algorithms showed that most of the experimentally selected shRNAs did not fit in the parameters of known algorithms. The evaluation of such siRNA libraries could have a great impact on the optimization of the critical parameters of siRNA-algorithms, because they were selected due to their potency and possible toxicity and not to their sequence.

In order to assess the convertibility of the inhibitory sequences, the pol III system was compared with synthetic siRNAs and Pol II expressed miRNAs. The Pol III system appeared to be the most efficient. Although, the majority of the corresponding synthetic siRNA sequences exhibited a comparable inhibitory potential, their use in clinical trials is limited due to their transient effect and their low stability in serum. The expression of selected shRNA sequences in a miRNA environment revealed a minor potency and the need for optimization of this system.

The stable lentiviral expression of the pol III shRNAs in the permissive HeLa P4 cell line exhibited a significant inhibition of virus replication in an HIV-1 infection model. Additionally, these shRNA sequences seem to possess only small if any toxicity based on their selection and reevaluation in cell lines, which may turn them into candidates for gene therapy studies.

8 Referenzen

Agrawal, N., *et al.* (2003). "RNA interference: biology, mechanism, and applications." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 657-85.

Anderson, J., *et al.* (2007). "Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes--CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy--in SCID-hu mouse-derived T cells." Mol Ther **15**(6): 1182-8.

Anderson, S. (1981). "Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments." Nucleic Acids Res **9**(13): 3015-27.

Ashe, M. P., *et al.* (1997). "The HIV-1 5' LTR poly(A) site is inactivated by U1 snRNP interaction with the downstream major splice donor site." Embo J **16**(18): 5752-63.

Baer, M., *et al.* (1990). "Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P." Nucleic Acids Res **18**(1): 97-103.

Bagasra, O. and K. R. Prilliman (2004). "RNA interference: the molecular immune system." J Mol Histol **35**(6): 545-53.

Banerjea, A., *et al.* (2003). "Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages." Mol Ther **8**(1): 62-71.

Barbaro, G., *et al.* (2005). "Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome." Curr Pharm Des **11**(14): 1805-43.

Barre-Sinoussi, F., *et al.* (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.

Bauer, G., *et al.* (1997). "Inhibition of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) replication after transduction of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34+ cells from HIV-1-infected donors using retroviral vectors containing anti-HIV-1 genes." Blood **89**(7): 2259-67.

Bernstein, E., *et al.* (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-6.

Bitko, V., *et al.* (2005). "Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA." Nat Med **11**(1): 50-5.

- Blanco, L., *et al.* (1989). "Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication." J Biol Chem **264**(15): 8935-40.
- Blanco, L. and M. Salas (1984). "Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(17): 5325-9.
- Boden, D., *et al.* (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference." J Virol **77**(21): 11531-5.
- Boden, D., *et al.* (2004). "HIV-1-specific RNA interference." Curr Opin Mol Ther **6**(4): 373-80.
- Buchholz, F., *et al.* (2006). "Enzymatically prepared RNAi libraries." Nat Methods **3**(9): 696-700.
- Bukrinsky, M. (2004). "A hard way to the nucleus." Mol Med **10**(1-6): 1-5.
- Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." Nat Rev Cancer **6**(11): 857-66.
- Campos, S. K. and M. A. Barry (2007). "Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting." Curr Gene Ther **7**(3): 189-204.
- Caplen, N. J., *et al.* (2001). "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9742-7.
- Carmell, M. A., *et al.* (2002). "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis." Genes Dev **16**(21): 2733-42.
- Charneau, P., *et al.* (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." J Virol **66**(5): 2814-20.
- Chatterjee, S., *et al.* (1992). "Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector." Science **258**(5087): 1485-8.
- Chen, Y. T. and A. Bradley (2000). "A new positive/negative selectable marker, puDeltatk, for use in embryonic stem cells." Genesis **28**(1): 31-5.
- Chendrimada, T. P., *et al.* (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-4.
- Cherrington, J. and D. Ganem (1992). "Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences." Embo J **11**(4): 1513-24.
- Chiu, Y. L., *et al.* (2004). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1)." J Virol **78**(5): 2517-29.

- Chomczynski, P. (1992). "One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA." Anal Biochem **201**(1): 134-9.
- Chun, T. W., *et al.* (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." Nature **387**(6629): 183-8.
- Coburn, G. A. and B. R. Cullen (2002). "Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference." J Virol **76**(18): 9225-31.
- Czaderna, F., *et al.* (2003). "Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells." Nucleic Acids Res **31**(11): 2705-16.
- Das, A. T., *et al.* (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition." J Virol **78**(5): 2601-5.
- Ding, L., *et al.* (2005). "The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*." Mol Cell **19**(4): 437-47.
- Dismuke, D. J. and C. Aiken (2006). "Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex." J Virol **80**(8): 3712-20.
- Don, R. H., *et al.* (1991). "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." Nucleic Acids Res **19**(14): 4008.
- Ehrlich, S. D., *et al.* (1973). "The specificity of pancreatic deoxyribonuclease." Eur J Biochem **40**(1): 143-7.
- Elbashir, S. M., *et al.* (2001c). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elbashir, S. M., *et al.* (2001a). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., *et al.* (2001b). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo J **20**(23): 6877-88.
- Engelhardt, J. F., *et al.* (1993). "Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study." Hum Gene Ther **4**(6): 759-69.
- Esnouf, R., *et al.* (1995). "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors." Nat Struct Biol **2**(4): 303-8.
- Esser, S., *et al.* (2007). "Side effects of HIV therapy." J Dtsch Dermatol Ges **5**(9): 745-54.
- Farh, K. K., *et al.* (2005). "The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution." Science **310**(5755): 1817-21.
- Fassati, A. and S. P. Goff (2001). "Characterization of intracellular reverse

transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **75**(8): 3626-35.

Feng, Y., *et al.* (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.

Fewell, G. D. and K. Schmitt (2006). "Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens." Drug Discov Today **11**(21-22): 975-82.

Finzi, D., *et al.* (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." Science **278**(5341): 1295-300.

Fire, A., *et al.* (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.

Fitzon, T., *et al.* (2000). "Proline residues in the HIV-1 NH₂-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication." Virology **268**(2): 294-307.

Flotte, T. R., *et al.* (2007). "Viral vector-mediated and cell-based therapies for treatment of cystic fibrosis." Mol Ther **15**(2): 229-41.

Follenzi, A., *et al.* (2007). "Immune responses to lentiviral vectors." Curr Gene Ther **7**(5): 306-15.

Ford, L. P. and A. Cheng (2008). "Using synthetic precursor and inhibitor miRNAs to understand miRNA function." Methods Mol Biol **419**: 289-301.

Fouchier, R. A. and M. H. Malim (1999). "Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes." Adv Virus Res **52**: 275-99.

Fuchs, U. and A. Borkhardt (2007). "The application of siRNA technology to cancer biology discovery." Adv Cancer Res **96**: 75-102.

Fultz, P. N. and D. C. Anderson (1989). "The biology and immunopathology of simian immunodeficiency virus infection." Curr Opin Immunol **2**(3): 403-8.

Gallo, R. C., *et al.* (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." Science **224**(4648): 500-3.

Gantier, M. P. and B. R. Williams (2007). "The response of mammalian cells to double-stranded RNA." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 363-71.

Garmendia, C., *et al.* (1992). "The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme." J Biol Chem **267**(4): 2594-9.

Gaynor, R. (1992). "Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression." Aids **6**(4): 347-63.

Goldschmidt, V., *et al.* (2003). "Does the HIV-1 primer activation signal interact with tRNA³(Lys) during the initiation of reverse transcription?" Nucleic Acids Res **31**(3): 850-9.

- Gonda, M. A., *et al.* (1994). "Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions." Virus Res **32**(2): 155-81.
- Gragoudas, E. S., *et al.* (2004). "Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **351**(27): 2805-16.
- Grandvaux, N., *et al.* (2002). "The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion." Curr Opin Infect Dis **15**(3): 259-67.
- Grimm, D., *et al.* (2006). "Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways." Nature **441**(7092): 537-41.
- Gulick, R. M., *et al.* (2000). "Randomized study of saquinavir with ritonavir or nelfinavir together with delavirdine, adefovir, or both in human immunodeficiency virus-infected adults with virologic failure on indinavir: AIDS Clinical Trials Group Study 359." J Infect Dis **182**(5): 1375-84.
- Gura, T. (2000). "A silence that speaks volumes." Nature **404**(6780): 804-8.
- Hacein-Bey-Abina, S., *et al.* (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Halloran, P. J. and R. G. Fenton (1998). "Irreversible G2-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues." Cancer Res **58**(17): 3855-65.
- Haqqi, T., Zhao, X., Panciu, A., Yadav, S.P. (2002). "Sequencing in the Presence of Betaine: Improvement in Sequencing of the Localized Repeat Sequence Regions." Journal of Biomolecular Techniques **13**: 265 - 271.
- Harrich, D., *et al.* (1996). "A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription." J Virol **70**(6): 4017-27.
- Held, D. M., *et al.* (2006). "HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers." Front Biosci **11**: 89-112.
- Henschel, A., *et al.* (2004). "DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W113-20.
- Holen, T. (2006). "Efficient prediction of siRNAs with siRNARules 1.0: an open-source JAVA approach to siRNA algorithms." Rna **12**(9): 1620-5.
- Houbaviy, H. B., *et al.* (2003). "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." Dev Cell **5**(2): 351-8.
- Ill, C. R. and H. C. Chiou (2005). "Gene therapy progress and prospects: recent progress in transgene and RNAi expression cassettes." Gene Ther **12**(10): 795-802.
- Isel, C. and J. Karn (1999). "Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation." J Mol Biol **290**(5): 929-41.

- Izquierdo, M., *et al.* (1996). "Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy." Gene Ther **3**(6): 491-5.
- Jabs, D. A. and P. D. Griffiths (2002). "Fomivirsen for the treatment of cytomegalovirus retinitis." Am J Ophthalmol **133**(4): 552-6.
- Jacque, J. M., *et al.* (2002). "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." Nature **418**(6896): 435-8.
- Jagla, B., *et al.* (2005). "Sequence characteristics of functional siRNAs." Rna **11**(6): 864-72.
- Ji, X. (2008). "The mechanism of RNase III action: how dicer dices." Curr Top Microbiol Immunol **320**: 99-116.
- Jordan, A., *et al.* (2001). "The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation." Embo J **20**(7): 1726-38.
- Kaiser, J. (2003). "Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial." Science **299**(5606): 495.
- Kameoka, M., *et al.* (2004). "RNA interference directed against Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells." J Virol **78**(16): 8931-4.
- Kamine, J., *et al.* (1991). "Sp1-dependent activation of a synthetic promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat protein." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8510-4.
- Kammler, S., *et al.* (2006). "The strength of the HIV-1 3' splice sites affects Rev function." Retrovirology **3**: 89.
- Karn, J. (1999). "Tackling Tat." J Mol Biol **293**(2): 235-54.
- Karthikeyan, S., *et al.* (2003). "Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a beta barrel fold and a novel active site arch." Structure **11**(3): 265-73.
- Kasim, V., *et al.* (2003). "Control of siRNA expression utilizing Cre-loxP recombination system." Nucleic Acids Res Suppl(3): 255-6.
- Kawakami, K., *et al.* (1988). "Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4700-4.
- Ketting, R. F., *et al.* (1999). "Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD." Cell **99**(2): 133-41.
- Kingsman, S. M. and A. J. Kingsman (1996). "The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression." Eur J Biochem **240**(3): 491-507.

- Kittler, R., *et al.* (2004). "An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division." Nature **432**(7020): 1036-40.
- Klaver, B. and B. Berkhout (1994). "Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus." J Virol **68**(6): 3830-40.
- Kumar, A., *et al.* (1994). "Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6288-92.
- Kumar, P., *et al.* (2008). "T Cell-Specific siRNA Delivery Suppresses HIV-1 Infection in Humanized Mice." Cell.
- Lagos-Quintana, M., *et al.* (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-9.
- Lee, N. S., *et al.* (2002). "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells." Nat Biotechnol **20**(5): 500-5.
- Lee, R. C., *et al.* (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., *et al.* (2004a). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J **23**(20): 4051-60.
- Levine, B. L., *et al.* (2006). "Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17372-7.
- Levy, J. A., *et al.* (1984). "Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS." Science **225**(4664): 840-2.
- Li, W. and L. Cha (2007). "Predicting siRNA efficiency." Cell Mol Life Sci **64**(14): 1785-92.
- Lim, L. P., *et al.* (2003). "Vertebrate microRNA genes." Science **299**(5612): 1540.
- Liu, Y. P., *et al.* (2008). "Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron." Nucleic Acids Res.
- Lund, E., *et al.* (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-8.
- Luo, B., *et al.* (2004). "Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED)." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5494-9.
- Luo, K. Q. and D. C. Chang (2004). "The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region." Biochem Biophys Res Commun **318**(1): 303-10.
- Ma, J. B., *et al.* (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." Nature **429**(6989): 318-22.

- MacGregor, R. R. (2001). "Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects." Hum Gene Ther **12**(16): 2028-9.
- Maddon, P. J., *et al.* (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." Cell **47**(3): 333-48.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-94.
- Marasco, W. A., *et al.* (1999). "Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS." J Immunol Methods **231**(1-2): 223-38.
- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2005). "Small regulatory RNAs in mammals." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R121-32.
- McCune, J. M., *et al.* (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." Cell **53**(1): 55-67.
- Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**(7006): 343-9.
- Miller, M. D., *et al.* (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." J Virol **71**(7): 5382-90.
- Modrow, S. a. F., D (1997). Molekulare Virologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag
- Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." Cancer Res **46**(10): 5276-81.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Myers, J. W., *et al.* (2003). "Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing." Nat Biotechnol **21**(3): 324-8.
- Naito, Y., *et al.* (2006). "siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W448-50.
- Napoli, C., *et al.* (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Neff, T., *et al.* (2003). "Methylguanine methyltransferase-mediated in vivo selection and chemoprotection of allogeneic stem cells in a large-animal model." J Clin Invest **112**(10): 1581-8.
- Ngok, F. K., *et al.* (2004). "Clinical gene therapy research utilizing ribozymes: application to the treatment of HIV/AIDS." Methods Mol Biol **252**: 581-98.

- Nishitsuji, H., *et al.* (2004). "Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells." Microbes Infect **6**(1): 76-85.
- Nisole, S. and A. Saib (2004). "Early steps of retrovirus replicative cycle." Retrovirology **1**: 9.
- Novina, C. D., *et al.* (2002). "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection." Nat Med **8**(7): 681-6.
- Nykanen, A., *et al.* (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." Cell **107**(3): 309-21.
- Palatnik, J. F., *et al.* (2003). "Control of leaf morphogenesis by microRNAs." Nature **425**(6955): 257-63.
- Papa, S., *et al.* (2005). "NF-kappaB meets ROS: an 'iron-ic' encounter." Cell Death Differ **12**(10): 1259-62.
- Patzel, V., *et al.* (2005). "Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency." Nat Biotechnol **23**(11): 1440-4.
- Paule, M. R. and R. J. White (2000). "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III." Nucleic Acids Res **28**(6): 1283-98.
- Pawliuk, R., *et al.* (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science **294**(5550): 2368-71.
- 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**(11): 6365-78.
- Rana, T. M. (2007). "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 23-36.
- Reid, R., *et al.* (1988). "Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate." J Biol Chem **263**(8): 3898-904.
- Reynolds, A., *et al.* (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." Nat Biotechnol **22**(3): 326-30.
- Robert-Guroff, M., *et al.* (1990). "Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages." J Virol **64**(7): 3391-8.
- Rossi, J. J., *et al.* (2007). "Genetic therapies against HIV." Nat Biotechnol **25**(12): 1444-54.
- Sambrook, J. and D. Russell (2000). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (3).

- Sanger, F., *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santoyo, J., *et al.* (2005). "Highly specific and accurate selection of siRNAs for high-throughput functional assays." Bioinformatics **21**(8): 1376-82.
- Sarver, N., *et al.* (1990). "Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents." Science **247**(4947): 1222-5.
- Scherer, L. J., *et al.* (2004). "Rapid assessment of anti-HIV siRNA efficacy using PCR-derived Pol III shRNA cassettes." Mol Ther **10**(3): 597-603.
- Schroder, A. R., *et al.* (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.
- Schultz, S. J. and J. J. Champoux (2008). "RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription." Virus Res **134**(1-2): 86-103.
- Schwartz, S., *et al.* (1990a). "Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **64**(6): 2519-29.
- Schwartz, S., *et al.* (1990b). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs." J Virol **64**(11): 5448-56.
- Sen, G., *et al.* (2004). "Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries." Nat Genet **36**(2): 183-9.
- Shah, J. K., *et al.* (2007). "siR: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database." BMC Bioinformatics **8**: 178.
- Shirane, D., *et al.* (2004). "Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs." Nat Genet **36**(2): 190-6.
- Shivdasani, R. A. (2006). "MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation." Blood **108**(12): 3646-53.
- Shrivastava, N. and A. Srivastava (2008). "RNA interference: an emerging generation of biologicals." Biotechnol J **3**(3): 339-53.
- Sledz, C. A. and B. R. Williams (2004). "RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 952-6.
- Sparger, E. E., *et al.* (1989). "Feline immunodeficiency virus is a lentivirus associated with an AIDS-like disease in cats." Aids **3** **Suppl 1**: S43-9.
- Spence, R. A., *et al.* (1995). "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors." Science **267**(5200): 988-93.
- Stewart, C. K., *et al.* (2008). "Adverse effects induced by short hairpin RNA expression in porcine fetal fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **370**(1): 113-7.

- Subbaraman, R., *et al.* (2007). "Adverse effects of highly active antiretroviral therapy in developing countries." Clin Infect Dis **45**(8): 1093-101.
- Szulc, J., *et al.* (2006). "A versatile tool for conditional gene expression and knockdown." Nat Methods **3**(2): 109-16.
- ter Brake, O., *et al.* (2006). "Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach." Mol Ther **14**(6): 883-92.
- ter Brake, O. a. B., B (2005). "a novel approach for inhibition of HIV-1 by RNA interference: counteracting viral escape with a second generation of siRNAs." Journal of RNA and Gene Silencing **1**(2): 56-65.
- Theisen, D. M., *et al.* (2006). "Targeting of HIV-1 Tat traffic and function by transduction-competent single chain antibodies." Vaccine **24**(16): 3127-36.
- Trask, T. W., *et al.* (2000). "Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors." Mol Ther **1**(2): 195-203.
- Turner, J. J., *et al.* (2007). "MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA degradation in serum confirms an RNase A-like activity." Mol Biosyst **3**(1): 43-50.
- van Rij, R. P. and R. Andino (2006). "The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals." Trends Biotechnol **24**(4): 186-93.
- Vasileva, A. and R. Jessberger (2005). "Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting." Nat Rev Microbiol **3**(11): 837-47.
- Vaucheret, H., *et al.* (2001). "Post-transcriptional gene silencing in plants." J Cell Sci **114**(Pt 17): 3083-91.
- Verma, I. M. (2002). "Success and setback: another adverse event." Mol Ther **6**(5): 565-6.
- Vincent, A. J., *et al.* (1996). "Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for rat malignant brain tumors." Hum Gene Ther **7**(2): 197-205.
- Voinnet, O. (2001). "RNA silencing as a plant immune system against viruses." Trends Genet **17**(8): 449-59.
- von Eije, K. J., *et al.* (2008). "Human immunodeficiency virus type 1 escape is restricted when conserved genome sequences are targeted by RNA interference." J Virol **82**(6): 2895-903.
- Wang, L. and F. Y. Mu (2004). "A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette." Bioinformatics **20**(11): 1818-20.
- Westerhout, E. M., *et al.* (2005). "HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome." Nucleic Acids Res **33**(2): 796-804.

- Williams, B. R. (1997). "Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation." Biochem Soc Trans **25**(2): 509-13.
- Wiznerowicz, M. and D. Trono (2005). "Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology." Trends Biotechnol **23**(1): 42-7.
- Woffendin, C., *et al.* (1996). "Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2889-94.
- Wu, L., *et al.* (1996). "CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5." Nature **384**(6605): 179-83.
- Wu, R. H., *et al.* (2007). "A tightly regulated and reversibly inducible siRNA expression system for conditional RNAi-mediated gene silencing in mammalian cells." J Gene Med **9**(7): 620-34.
- Xie, Z., *et al.* (2003). "Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation." Curr Biol **13**(9): 784-9.
- Yamamoto, T., *et al.* (2006). "Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages." Blood **108**(10): 3305-12.
- Yamamoto, T. and Y. Tsunetsugu-Yokota (2008). "Prospects for the therapeutic application of lentivirus-based gene therapy to HIV-1 infection." Curr Gene Ther **8**(1): 1-8.
- Yang, L., *et al.* (2006). "Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11479-84.
- Yi, R., *et al.* (2005). "Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs." Rna **11**(2): 220-6.
- Yi, R., *et al.* (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-6.
- Yuan, B., *et al.* (2004). "siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W130-4.
- Zeng, Y., *et al.* (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." Mol Cell **9**(6): 1327-33.
- Zhang, H., *et al.* (2002). "Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP." Embo J **21**(21): 5875-85.
- Zhang, L., *et al.* (2007). "Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2." Mol Cell **28**(4): 598-613.
- Zhao, H. F., *et al.* (2005). "High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi

libraries delivered via bacterial invasion." Nat Methods **2**(12): 967-73.

Zhao, Y., *et al.* (2007). "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2." Cell **129**(2): 303-17.

Zheng, L., *et al.* (2004). "An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 135-40.

Zhou, M. Y., *et al.* (1995). "Universal cloning method by TA strategy." Biotechniques **19**(1): 34-5.

8.1 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich der Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens C. Brüning betreut worden.

Köln, im August 2008

Carola Pongratz

8.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Carola Pongratz
Adresse: Lohsestr. 6
50733 Köln
Telefon: 0177 3739175
Email: carola.pongratz@uk-koeln.de
Geburtsdatum: 24. August 1978
Geburtsort: Siegen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulische Ausbildung:

1985 – 1989 Gemeinschaftsgrundschule Fellinghausen
1989 – 1998 „Friedrich-Flick“-Gymnasium, Kreuztal mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

1998 – 2000 Studium der Biologie und Erlangung des Vordiploms an der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät der „Friedrich-Wilhelm Universität“, Bonn
2000 – 2002 Hauptstudium der Biologie an der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität zu Köln

2002

Diplomprüfungen

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Biochemie & Tierphysiologie

2002 – 2004

Diplomarbeit am Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uni-Kliniken Köln zum Thema „Inhibition der Virusreplikation in HIV-1 infizierten Zellen mittels transduktionskompetenter anti-Tat *single chain Intrabodies*“

2004 – 2008

Dissertation am Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uni-Kliniken Köln zum Thema „Potente HIV-gerichtete RNA-Interferenz mittels Selektion einer randomisierten lentiviralen shRNA-Bibliothek“

Publikationen:

Kashkar, H., *et al.* (2007). "NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs." Blood **109**(9): 3982-8.

Theisen, D.M., *et al.* (2006). "Targeting of HIV-1 Tat traffic and function by transduction-competent single chain antibodies." Vaccine **24**(16): 3127-36.

8.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uniklinik Köln unter Leitung von Prof. Dr. Martin Krönke und Dr. Benjamin Yazdanpanah wissenschaftlich betreut.

Für die wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionen während der Promotionszeit möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Martin Krönke, Dr. Benjamin Yazdanpanah, Dr. Hamid Kashkar und Dr. Dr. Oliver Coutelle bedanken. Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für die Übernahme der Betreuung der Dissertation und die Anfertigung des Gutachtens.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Kashkar und Katja Krönke-Wiegmann für die tägliche Hilfsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Benjamin, Oliver, Hamid und Obinna für die kritische und kompetente Korrektur dieses Manuskriptes bedanken.

Benni gilt außerdem mein spezieller Dank für die motivierende Unterstützung und für seine Liebe.

Mein abschließender Dank geht an meiner Familie, die mich bei allem unterstützt und an meine Freunde, auf die ich mich immer verlassen kann.