

**Entwicklung und Charakterisierung von
HIV-1 Latenzmodellen
und proviralen Aktivatorsystemen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Bialek

aus Hannover

Hamburg, Mai 2017

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Joachim Hauber

Datum der Disputation: 2.Juni 2017

Datum der Druckfreigabe: 2.Juni 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Mai 2017 am Heinrich-Pette-Institut – Leibniz Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung „Antivirale Strategien“ angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgendem *peer reviewed* Journal veröffentlicht:

Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schäfer C, Spohn M, Stucka R, Hauber J Lange UC.
2016. Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional
Activator Systems. *PLoS One*, 11(6):e0158294.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Joachim Hauber, der mir die Bearbeitung dieses spannenden Themas ermöglichte und mit Unterstützung und Rat zur Seite stand. Vielen Dank für die Unterstützung und Förderung während dieser Zeit und Danke für eine immer offene Tür und ein offenes Ohr.

Ich danke Herrn Prof. Chris Meier, der sich freundlicherweise für die Begutachtung dieser Arbeit aus dem Fachbereich Chemie zur Verfügung gestellt hat.

Rolf Stucka vom Friedrich-Baur-Institut in München danke ich für das Aufspüren der Integrationsstellen in diversen Klonen und Michael Spohn vom HPI für die Unterstützung bei den bioinformatischen Analysen.

Ein großer Dank gilt allen (ehemaligen) Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Antivirale Strategien und der HIV-Gruppe des UKE für die stete Hilfsbereitschaft, das freundschaftliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Bettina Abel und Britta Weseloh danke ich für so manche TaqMan-PCR und Klonierung und für die geselligen Mittagsrunden, ebenso wie Julia Czechowicz.

Ulrike Lange und Gábor Dunay danke ich für die tolle Zusammenarbeit im „Latency-Team“. Besonders Ulrike danke ich für ihr Engagement und die vielen anregenden Diskussionen.

Bei Ilona Hauber, Jan Chemnitz, Helga Hofmann-Sieber, Maike Voges und Niklas Beschorner möchte ich mich für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und vor allem Gerrit danken, für die immerwährende Unterstützung, den Rückhalt und das Vertrauen über die Jahre.

Inhalt

Danksagung.....	VII
Inhalt.....	IX
Zusammenfassung.....	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus.....	2
1.1.1 Morphologie und Genomstruktur.....	2
1.1.2 Der HIV Replikationszyklus und antiretrovirale Wirkstoffe.....	5
1.2 Problematik der HIV-Latenz und neue Therapieansätze.....	7
1.2.1 Etablierung von HIV-Latenz.....	8
1.2.2 Zellkultur-basierte Modelle für HIV-Latenz.....	13
1.2.3 Latency-reversing agents (LRAs) als neuer Therapieansatz.....	15
1.3 Sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung durch das CRISPR/Cas9-System.....	20
1.3.1 Das SAM-System.....	21
1.3.2 Das SunTag-System.....	22
1.4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit.....	23
2 Materialien	24
2.1 Bakterienstämme	24
2.2 Eukaryotische Zelllinien.....	24
2.3 Primäre eukaryotische Zellen	24
2.4 Medien.....	24
2.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien.....	24
2.4.2 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
2.5 Oligonukleotide	25
2.6 Expressionsplasmide	29
2.7 Enzyme	30

2.8	Antikörper.....	31
2.9	Reagenzsysteme	31
2.10	DNA-Längenstandards	32
2.11	Antibiotika.....	32
2.12	Chemikalien.....	32
2.13	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.14	Lösungen und Puffer	34
2.15	Geräte	35
2.16	Software.....	36
3	Methoden.....	37
3.1	Mikrobiologische Methoden	37
3.1.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien.....	37
3.1.2	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	37
3.1.3	Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i>	37
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.1	Präparation und Isolierung von Plasmid-DNA	38
3.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
3.2.4	Restriktionsanalyse von DNA.....	40
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
3.2.6	Klonierung von DNA.....	41
3.2.7	Klonierung von gRNA-Expressionsplasmiden.....	43
3.2.8	Sequenzieren von DNA	44
3.2.9	Gesamt-RNA Präparation aus eukaryotischen Zellen	44
3.2.10	cDNA Synthese.....	45
3.2.11	Präparation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	46
3.2.12	Quantitative Realtime-PCR.....	46
3.2.13	Droplet Digital PCR (ddPCR).....	48
3.2.14	Bestimmung der Integrationsstelle des HIVis-Reporters mittels HiLo-PCR	50
3.3	Zellbiologische Methoden.....	51

3.3.1	Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen	51
3.3.2	Kultivierung adhärenter Zelllinien.....	51
3.3.3	Kultivierung von Suspensionszellen.....	52
3.3.4	Behandlung mit latency-reversing agents	52
3.3.5	Transiente Transfektion von Zelllinien.....	52
3.3.6	Transwell-Kokultivierungs-Assay	53
3.3.7	Isolierung und Kultivierung primärer CD4+ T-Zellen	54
3.3.8	Herstellung lentiviraler Partikel.....	55
3.3.9	Konzentration lentiviraler Vektorüberstände mittels Ultrazentrifugation	56
3.3.10	FACS-basierte Titration lentiviraler Partikel.....	56
3.3.11	Herstellung stabil transduzierter Zelllinien.....	57
3.3.12	Einzelzellklonierung stabil transduzierter Zelllinien	57
3.3.13	Transduktion primärer CD4+ T-Zellen.....	57
3.3.14	Transduktion von ruhenden CD4+ T-Zellen und Behandlung mit CCL19	58
3.3.15	Durchflusszytometrische Analysen.....	59
3.3.16	AlamarBlue Viabilitätsassay.....	61
3.4	Biochemische Methoden	61
3.4.1	HIV p24 Gag Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	61
3.4.2	Luciferase-Assay.....	62
3.5	Bioinformatische Analysen	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Etablierung von HIV-1 Latenzmodellen: Das HIVis-Reportersystem.....	64
4.1.1	Generierung und Charakterisierung latent infizierter HIVis-Einzelzellklone	65
4.1.2	Charakterisierung der latent infizierten Reporterzelllinie HIVisB2	69
4.1.3	HIV-1 Latenzmodelle in primären CD4+ T-Zellen	80
4.2	Aktivierung des 5'LTR mittels CRISPR/Cas-9-Systeme.....	93
4.2.1	Identifizierung einer Zielregion im HIV-1 5'LTR.....	94
4.2.2	SAM-vermittelte Aktivierung in HIV-1 Latenzmodellen.....	97
4.2.3	SAM-vermittelte HIV-Aktivierung führt zur vollständigen Virusreplikation..	100
4.2.4	Auswirkungen von Sequenzvariationen auf SAM-vermittelte Aktivierung.....	103
4.3	Übertragung des SAM-Systems auf primäre Zellen	106
4.3.1	Generierung lentiviraler Vektoren zum Gentransfer	106

5 Diskussion.....	112
5.1 Das HIVis-System	112
5.1.1 Generierung von HIVis-Klonen.....	115
5.1.2 Das HIVis-Reporterkonstrukt integriert in <i>recurrent integration genes</i> (RIGs).....	116
5.1.3 Die Latenzzelllinie HIVisB2.....	118
5.1.4 Latenzsysteme in primären Zellen	121
5.2 Das SAM-System als neues Instrument zur transkriptionellen Aktivierung von HIV	125
5.2.1 Einfluss von Sequenzvariationen und Übertragung in primäre Zellen	129
5.3 Fazit und Ausblick.....	133
6 Eidesstattliche Versicherung.....	135
7 Literaturverzeichnis.....	136
8 Abkürzungsverzeichnis.....	156
9 Anhang	160

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit dem Thema HIV-Latenz. Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) integriert in das Genom der Wirtszelle, was zu einer Etablierung von latent infizierten Zellreservoirien führt und eine lebenslange Behandlung HIV-infizierter Patienten mit antiretroviralen Medikamenten notwendig macht. Latent infizierte Zellen exprimieren keine viralen Gene und können daher nicht vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden und bieten keinen Angriffspunkt für antiretrovirale Medikamente. Latente Zellreservoirie stellen deshalb eine entscheidende Hürde bei der Entwicklung von kurativen Therapiestrategien dar. Da latent infizierte Zellen phänotypisch nicht von produktiv infizierten Zellen zu unterscheiden sind, ist es zudem schwierig, latent infizierte Zellen zu isolieren und funktionell zu charakterisieren. Die Aktivierung von latenten Proviren und eine sich anschließende Eliminierung durch CD8⁺ T-Zellen wird als essentieller Bestandteil einer erfolgreichen Eradizierungsstrategie angesehen. Die zurzeit klinisch erprobten pharmakologischen Aktivierungsreagenzien wirken indirekt über zelluläre Signalwege und führen deshalb nur zu einer unvollständigen Aktivierung und zu keiner Reduzierung des latenten Reservoirs.

In Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen neue Zellkulturmodelle für HIV-Latenz etabliert, welche die Charakterisierung von latent infizierten Zellen und Testung von Aktivierungsstrategien erlauben. Es wurde ein zweifach fluoreszenzmarkiertes provirales Reporterkonstrukt verwendet, mithilfe dessen sich latent infizierte Jurkat Zellen identifizieren und isolieren und somit Latenzzelllinien generieren ließen. Zudem ermöglicht der Reporter die durchflusszytometrische Verfolgung der Aktivität des HIV *long terminal repeat* (LTR)-Promotors. Generierte Latenzzelllinien wurden genauer charakterisiert und die Integrationsstellen bestimmt. Die Zelllinie HIVisB2 diente zur Untersuchung des Einflusses von Aktivierungsreagenzien auf verschiedene Latenzreportersysteme. Hierbei zeigte sich, dass Aktivierungsreagenzien in verschiedenen Modellen unterschiedlich wirken und nicht in einem einheitlichen Maße aktivieren. Zudem wurde eine Übertragung des Reportersystems auf primäre Zellen getestet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden neue Aktivierungsmethoden für HIV-Latenz erprobt. Es wurden zwei CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme, das SAM- und das SunTag-System, an den HIV-1 LTR-Promotor adaptiert und hinsichtlich ihrer Aktivierung von HIV proviraler DNA untersucht. CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme bestehen aus einer enzymatisch inaktiven Cas9 Nuklease und multiplen Aktivierungsdomänen und führen zu

einer sequenzspezifischen transkriptionellen Aktivierung. Es konnte eine optimale Zielregion im LTR-Promotor identifiziert werden. Das SAM-System war dem SunTag-System deutlich überlegen und führte in verschiedenen Latenzmodellen zu einer robusten und vollständigen transkriptionellen Aktivierung des Provirus. Die Aktivierung resultierte in der Freisetzung infektiöser viraler Partikel, was eine Voraussetzung für einen Einsatz solch neuartiger Aktivierungsmethoden als Bestandteil einer möglichen Eradizierungsstrategie wäre. CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme stellen somit ein vielversprechendes Werkzeug für die Induzierung und Quantifizierung des latenten Reservoirs *ex vivo* dar, und könnten in Zukunft in Verbindung mit geeigneten Vektorsystemen zur Entwicklung neuartiger kurativer Therapieverfahren bei HIV/AIDS beitragen.

Abstract

The subject of this dissertation is HIV latency. Human immunodeficiency virus (HIV) integrates into the host cell genome which leads to the establishment of latently infected cell reservoirs and makes life-long antiretroviral treatment necessary for HIV-infected patients. Latently infected cells do not express any viral genes and therefore cannot be recognized and eliminated by the immune system of the host and do not present any target for antiretroviral drugs. Thus, latent reservoirs represent a critical obstacle for the development of curative therapy strategies. Since latently infected cells are phenotypically indistinguishable from productively infected cells, it is difficult to isolate and characterize latently infected cells. Complete activation of latent proviruses and subsequent elimination by CD8⁺ T cells is considered to be a major building block for the development of successful eradication strategies. However, the currently clinically tested activating pharmacological reagents act indirectly through cellular pathways and, hence, only result in incomplete activation with no effect on the size of the latent reservoir

Within the scope of this study, new cell culture model systems for HIV latency, which allow the characterization of latently infected cells and testing of activation strategies, were established. A dual fluorescently labelled proviral reporter construct was used, which enabled identification and isolation of latently infected Jurkat cells and subsequent generation of clonal lines. In addition, the reporter construct allows flow cytometric monitoring of HIV long terminal repeat (LTR) promoter activity. Generated latency cell lines were further characterized and integration sites were determined. The generated latency cell line HIVisB2 was employed for the investigation of activating reagents in different latency reporter systems. Activating reagents showed to not activate uniformly in different models. Moreover, ways of transferring the latency reporter to primary cells were tested.

In the second part of this work new activation methods for HIV latency were investigated. Two CRISPR/Cas9-derived activator systems, the SAM- and SunTag-system, were adapted for the HIV-1 LTR promoter and tested with respect to activate HIV proviral DNA. CRISPR/Cas9-derived activator systems are composed of enzymatically inactive Cas9 nuclease and multiple transactivation domains and lead to sequence-specific transcriptional activation. An optimal target region for activation was identified within the HIV-1 LTR promoter. The SAM-system revealed to be superior to the SunTag-system and showed specific and robust transcriptional provirus activation in different latency models. Activation was complete, resulting in release of infectious viral particles, which is a prerequisite for the

implementation of such new activation methods in a potential eradication strategy. CRISPR/Cas9-derived activator systems may therefore represent a promising tool for induction and quantification of latently infected reservoirs *ex vivo* and, together with advanced vector systems, could be part of novel curative approaches for HIV/AIDS.

1 Einleitung

Zwischen Juni 1981 und September 1982 häuften sich in Metropolregionen an der Ost- und Westküste der USA knapp 600 Fälle einer erworbenen Immunschwäche-Erkrankung (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). Die Patienten waren von schweren opportunistischen Infektionen wie Pneumocystis-Pneumonie und Kaposi-Sarkom betroffen, Erkrankungen die normalerweise in Patienten mit geschwächtem Immunsystem auftreten. Die Rate der Neuerkrankungen verdoppelte sich in dieser Zeit alle 6 Monate mit einer Mortalität von über 60% nach einem Jahr. Die Erkrankung betraf überwiegend homo- und bisexuelle Männer (75%), Abhängige intravenös verabreichter Drogen (13%), Haitianer (6%) und an Hämophilie A Erkrankte (0,3%) (Centers for Disease Control [CDC], 1982).

Bereits 1983 konnte das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) von den Gruppen um Luc Montagnier und Robert Gallo als auslösender Erreger aus AIDS-Patienten identifiziert und isoliert werden (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Von Robert Gallo wurde es erst fälschlicherweise als Variante des humanpathogenen Retrovirus Humanes T-Zell Leukämie-Virus (HTLV) beschrieben. In den Folgejahren wurde das Virus als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) (Montagnier et al., 1984) und AIDS-assoziiertes Retrovirus (ARV) (Levy et al., 1984) bezeichnet, bevor das *International Committee on Taxonomy of Viruses* 1986 die Bezeichnung Humanes Immundefizienz-Virus, HIV, empfahl (Coffin et al., 1986).

HIV zeigt sich für eine globale Pandemie verantwortlich. Bis Ende des Jahres 2015 stieg die Zahl der HIV-Infizierten weltweit auf geschätzt 36,7 Millionen Menschen, mit 2,1 Millionen Neuinfektionen und 1,1 Millionen AIDS-Toten in selbigem Jahr (UN Joint Programme on HIV/AIDS [UNAIDS] 2016). Der Großteil der Infizierten lebt in den Ländern Zentral- und Südafrikas.

Durch mehr als 30 Jahre intensivster Forschung können wir heute die Biologie und Pathogenese von HIV gut verstehen. Durch Einführung der antiretroviralen Kombinations-Therapie (ART) 1995 konnte die Lebenserwartung von HIV-Infizierten drastisch erhöht werden (D. D. Ho, 1995). Dennoch ist HIV nach wie vor eine unheilbare Erkrankung.

1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus

Das Humane Immundefizienz-Virus gehört innerhalb der Familie der *Retroviridae* zur Gattung der Lentiviren. Retroviren besitzen ein dimeres Einzel(+)-Strang-RNA-Genom, ss(+)RNA, welches durch die eigene Reverse Transkriptase entgegen des üblichen genetischen Informationsflusses (retrograd) in DNA übersetzt wird. Der Begriff Lentivirus leitet sich vom lateinischen *lentus*, langsam, ab. Viele Vertreter der Gattung Lentivirus lösen langsam fortschreitende, chronisch degenerative Krankheiten aus. Es sind zwei Arten von HIV, HIV-1 und HIV-2, bekannt. HIV-1 und HIV-2 stammen beide evolutionär von Stämmen des Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) ab. HIV-1 stammt hauptsächlich von SIVcpz ab (Gao et al., 1999), das endemisch in Schimpansen vorkommt. HIV-2 ist am nächsten verwandt mit SIVsmm, das Raubmangabes aus der Familie der Meerkatzen befällt (Doms & Reeves, 2002). Beide Virusstämme scheinen unabhängig voneinander die Speziesbarriere überwunden zu haben und sich im Menschen zu HIV-1 beziehungsweise -2 entwickelt zu haben. HIV-2 beschränkt sich aufgrund einer geringeren Transmissionsrate hauptsächlich auf Westafrika.

In der vorliegenden Arbeit wird sich auf HIV-1 konzentriert. HIV-1 ist in vier Gruppen unterteilt, die mit M, N, O und P bezeichnet werden. M steht dabei für *major group* (Hauptgruppe), die O-Gruppe wurde nach *outlier* (Sonderfall) benannt und N steht für *new* (neu). Die P-Gruppe wurde dem Alphabet folgend benannt. In Gruppe M fallen über 90% der HIV-1 Infektionen weltweit. Sie wird wiederum in elf Subtypen unterteilt (Thomson, Pérez-Álvarez, & Nájera, 2002). Die am häufigsten verbreiteten Subtypen sind B (Nordamerika und Europa), A und D (vor allem in Afrika) und Subtyp C (hauptsächlich in Afrika und Asien). Die HIV-1 Gruppe O scheint fast ausschließlich in Westafrika verbreitet zu sein (Peeters et al., 1997), während die neu entdeckten Gruppe N- und P-Viren bislang nur bei wenigen Patienten nachgewiesen werden konnten (Mourez, Simon, & Plantier, 2013; Plantier et al., 2009). Bis heute haben nur HI-Viren der Gruppe M Ausmaße einer Pandemie angenommen.

1.1.1 Morphologie und Genomstruktur

Das HI-Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 bis 120 nm und ist umgeben von einer Phospholipidoppelmembran, die von der Zellmembran der Wirtszelle stammt. Eingebettet in die Membran sind neben Membranproteinen der Wirtszelle pro Virion 10 bis 15 *Spikes* (Dornen), 10 nm große heterotrimere Env-Glykoproteinkomplexe, bestehend aus je drei Molekülen des externen Oberflächen-Glykoproteins gp120 und drei Molekülen des Transmembran-Glykoproteins gp41. Das Transmembran-Glykoprotein gp41 ist mit einem

hydrophoben Anteil in der Hüllmembran verankert. Das Oberflächem-Glykoprotein gp120 bindet über nicht kovalente Wechselwirkungen an gp41. Die Innenseite der Hüllmembran ist ausgekleidet mit p17 Matrixproteinen. Das Matrixprotein ist dabei über einen Myristinrest in der Hüllmembran verankert. Im Inneren des Virions befindet sich das konische Kapsid, das aus Einheiten des Kapsidproteins p24 aufgebaut ist. Es enthält zwei Kopien des einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrang-Orientierung, welches mit Nukleokapsidproteinen p7 und dem *late assembly* Proteinen p6 assoziiert ist. Ebenso befinden sich im Kapsid die viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase und die akzessorischen Proteine Vpr (*viral protein r*), Vif (*viral infection factor*) und Nef (*negative factor*). Die virale Protease ist im gesamten Virion zu finden (zusammen gefasst in Sundquist & Kräusslich 2012; Freed 2015).

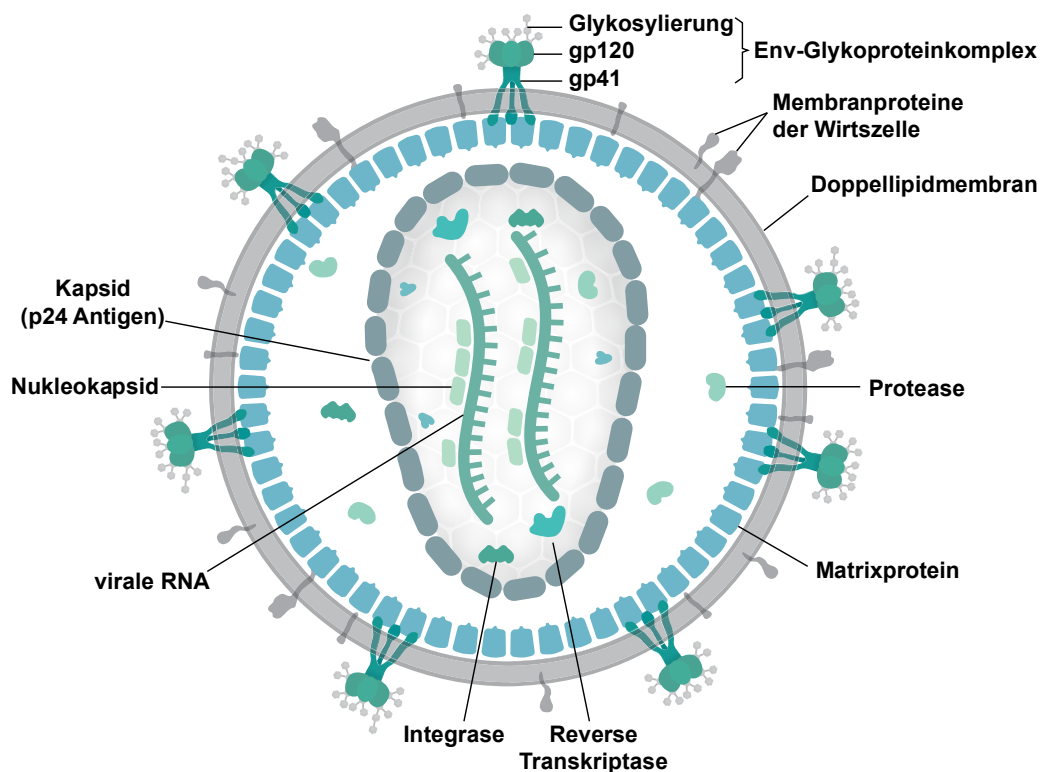


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HI-Virus. Das Virion besteht aus einer Lipidmembran mit verankerten Env-Glykoproteinkomplexen und assoziierten Matrixproteinen. Innerhalb des Virions befindet sich das aus p24-Proteinen aufgebaute Kapsid, welches das RNA-Genom assoziiert mit Nukleokapsid-Proteinen p7, die viralen Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase und die akzessorischen Proteine Vpr, Vif und Nef beherbergt. Die virale Protease ist im gesamten Virion zu finden (Bild: modifiziert von „Aufbau des HI-Virions“, Thomas Splettstoesser, (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HI-virion-structure_de.svg), Lizenz: CC BY-SA 4.0).

Das einzelsträngige RNA-Genom hat eine Länge von etwa 9,2 Kilobasen (kb). Es kodiert für 15 Proteine (Frankel & Young, 1998). Gag und Gag-Pol werden als Polyproteine synthetisiert und bei der Virusreifung durch die virale Protease in die Strukturproteine Matrixprotein p17,

1. Einleitung

Kapsidprotein p24, Nukleokapsidprotein p7, *late assembly* Protein p6 und *spacer* Peptid p1 und p2 (aus Gag-Polyprotein) und in die essentiellen Enzyme Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase und Protease (aus Gag-Pol-Polyprotein) prozessiert. Die Membranproteine gp41 und gp120 werden als Vorläuferprotein gp160 translatiert, im Golgi-Apparat glykosyliert und von der zellulären Furin Protease prozessiert. Weiterhin kodiert HIV für die essentiellen regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen regulatorischen Proteine Nef, Vpr, Vif und Vpu (Turner & Summers, 1999).

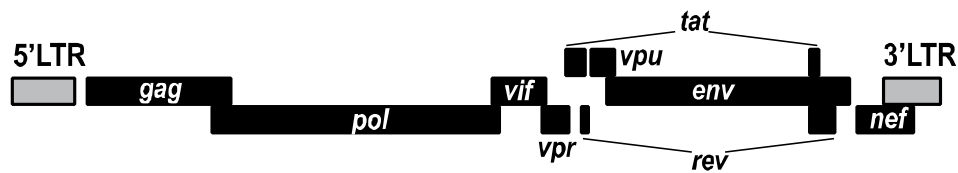


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIV-Genoms.

Der kodierende Bereich des viralen Genoms ist flankiert von regulatorischen Sequenzen, den *long terminal repeats* (LTR). Der 5'- und 3'LTR werden bei der reversen Transkription in DNA komplementiert und bestehen anschließend jeweils aus der U3, R und U5-Region. Nach der Integration in das Wirtsgenom fungiert der 5'LTR als Promotor. Die U3-Region enthält vielzählige Transkriptionsfaktor-Bindestellen sowie eine TATAA-Box. Die Transkriptionsstartstelle befindet sich am Anfang der R-Region. Darauf folgt das TAR-Element (*trans-activating response element*), eine stabile RNA-Haarnadelstruktur, an die der virale Transaktivator Tat bindet (Cullen, 1986; Kao, Calman, Luciw, & Peterlin, 1987), und ein Polyadenylierungssignal. Im Anschluss an die repetitive R-Region folgt der untranslatierte U5-Bereich und die Primerbindestelle, an die eine für die Initiation der reversen Transkription essentielle tRNA^{LYS} hybridisieren kann (Wain-Hobson, Sonigo, Danos, Cole, & Alizon, 1985). Vor dem Startcodon des gag-Gens befindet sich ein Ψ-Verpackungssignal (Lever, Gottlinger, Haseltine, & Sodroski, 1989), welches für die Dimerisierung des viralen Genoms und die Verpackung in Viruspartikel notwendig ist. Stromabwärts des kodierenden Bereichs, vor der U3-Region des 3'LTR, befindet sich der Polypurintrakt, der bei der reversen Transkription als Primer für die DNA-Synthese des (+)Stranges fungiert.

1.1.2 Der HIV Replikationszyklus und antiretrovirale Wirkstoffe

Der Replikationszyklus des HI-Virus ist sehr gut auf den Menschen und sein Immunsystem abgestimmt und bietet verschiedene Zielstrukturen für antiretrovirale Wirkstoffe. Derzeit zugelassene Therapeutika inhibieren den Eintritt des Virus in die Zelle (*Entry-Inhibitoren*), die reverse Transkription der viralen RNA (Reverse-Transkriptase-Inhibitoren), die Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle (Integrase-Inhibitoren) oder die Reifung der viralen Partikel (Protease-Inhibitoren) (zusammengefasst in Arts & Hazuda 2012).

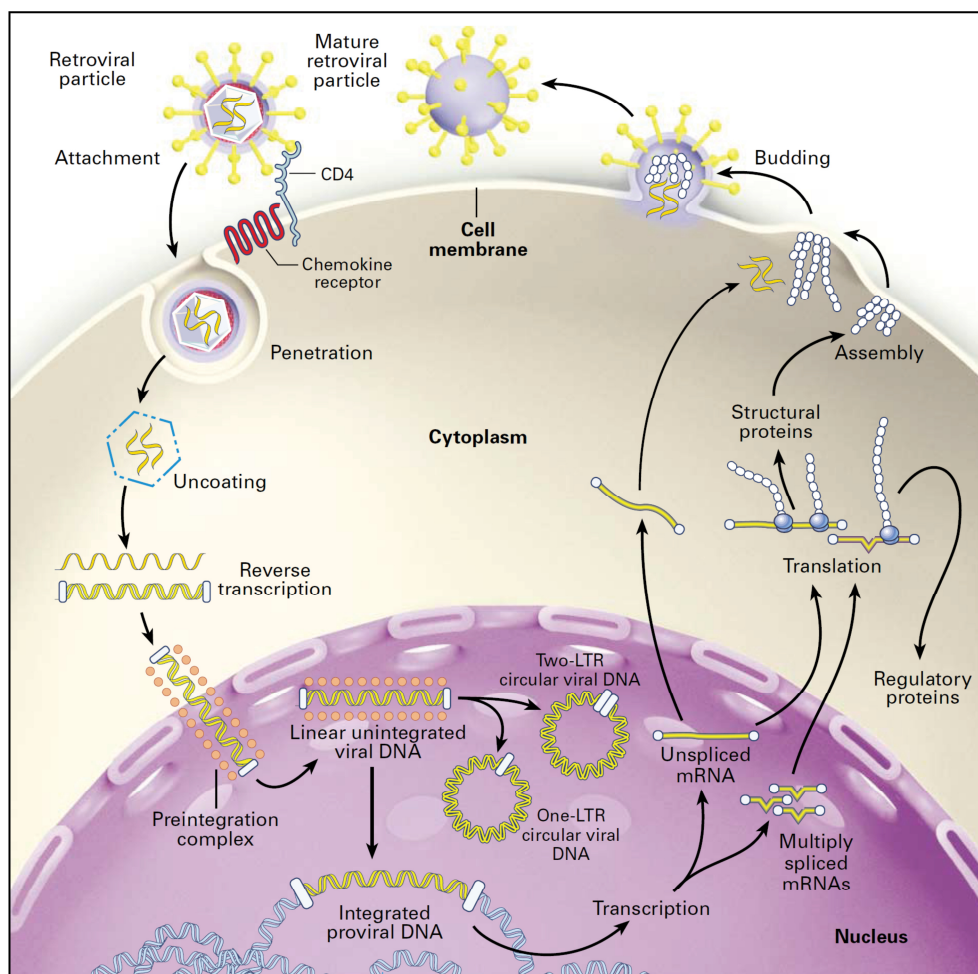


Abbildung 3: Schema des Replikationszyklus von HIV (Furtado et al., 1999).

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Bindung des Virions an die Zellmembran der Zielzellen. HIV infiziert hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen, die den CD4-Rezeptor und den Korezeptor CXCR4 und/oder CCR5 tragen. Aber auch Monozyten, Makrophagen dendritische Zellen und natürliche Killerzellen können in geringerem Maße durch HIV infiziert werden. Das Virion bindet über das virale Glykoproteins gp120 an das Oberflächenmolekül CD4 der humanen Zelle. Als Korezeptor dient entweder der

1. Einleitung

Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4. Nach erfolgtem Anlagern an die Wirtsmembran verschmilzt das Virion mit der Zellmembran und entlässt das virale Kapsid in die Wirtszelle. An diesem Punkt greifen *Entry*-Inhibitoren in den Replikationsszyklus des HI-Virus ein. Sie können entweder die Bindung an den Korezeptor (Korezeptorantagonisten) oder die Fusion von Virion und Zellmembran (Fusionsinhibitoren) verhindern (zusammengefasst in Haqqani & Tilton 2013).

Nach erfolgtem Zelleintritt wird die HIV-RNA im Zytoplasma durch die virale Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. In diesen Prozess kann durch zwei Arten von Reverse-Transkriptase-Inhibitoren eingegriffen werden. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) sind Nukleosidanaloga mit fehlender 3'-Hydroxygruppe an der Ribose. Sie führen zu einem Kettenabbruch des neu synthetisierten DNA-Strangs. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren binden an die Reverse Transkriptase und blockieren das katalytisch aktive Zentrum (zusammengefasst in Ilina & Parniak 2008).

Die in DNA umgeschriebene virale Erbinformation wird zusammen mit der Integrase und assoziierten viralen und zellulären Proteinen als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert und dort in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Integration kann durch Integrase-Inhibitoren inhibiert werden, die entweder die Bindung von DNA und Integrase unterbinden (Pyranodipyrimidine), die Entfernung des ersten Dinukleotids von beiden Enden der proviralen DNA inhibieren (Styrylquinolone, Diketosäuren), den Strangtransfer von Wirts- und viraler DNA inhibieren, oder die Reparatur der Einzelstrangbrüche durch wirtszelleigene Reparaturenzyme unterbinden (Methylxanthine) (zusammengefasst in Métifiot et al. 2013).

Nach der Integration kann das Virus entweder in eine latente Phase eintreten (das heißt, es werden keine viralen Gene exprimiert) oder aber in den lytischen Vermehrungszyklus übergehen. Während der lytischen Replikation werden die viralen Gene unter der Kontrolle des HIV-Promotors, der in der 5'LTR-Region liegt, transkribiert.

Die HIV-1 Transkription ist in erster Linie reguliert durch das HI-virale Protein Tat (*transactivator of transcription*). In Abwesenheit von Tat stoppt die Transkription in einer frühen Phase der Elongation und es kommt zu der Akkumulation kurzer Abbruchtranskripte. Die stochastische Transkription weniger Volllängentranskripte reicht jedoch aus, dass, nach erfolgtem Spleißen, einige Moleküle Tat gebildet werden können. Diese rekrutieren den Elongationsfaktor P-TEFb (*positive transcription elongation factor-b*) an die RNA-

Haarnadelstruktur TAR (*trans-activating response element*), die sich am 5'-Ende aller viralen Transkripte befindet. Dies führt zu einer stark prozessiven Transkription der viralen Gene und zu einem positivem *feedback loop* (Karn, 1999). Durch Spleißen des viralen Primärtranskripts und Translation entstehen, neben Tat, zuerst ausschließlich die viralen regulatorischen Proteine Rev und Nef. Wie zuvor erläutert, erhöht Tat die virale Transkription. Das dabei entstehende Primärtranskript wird im Zellkern jedoch komplett gespleißt. Einfach-gespleißte (Env-kodierend) und ungespleißte Transkripte (Gag/Pol-kodierendes Vollängen-Virusgenom) werden mithilfe des essentiellen Rev-Regulatorproteins in das Zytoplasma zur Bildung neuer Virionen transportiert (Pollard & Malim, 1998). Diese lösen sich durch Budding von der Plasmamembran.

In dem letzten Schritt des HIV-Lebenszyklus, der Reifung, werden die Polyproteine durch die virale Protease prozessiert. Dieser Schritt kann durch Proteaseinhibitoren inhibiert werden. Diese sind peptidähnliche Strukturen (Peptidomimetika) und stellen stabile Analoga des Übergangszustandes der Bindung zwischen aktivem Zentrum der Protease und der Erkennungssequenz des Substrats dar. Die Peptidbindungen sind dabei durch chemische Modifikationen vor einer Spaltung geschützt (zusammengefasst in Ghosh et al. 2016).

In der derzeitigen Therapie von HIV-Infizierten werden mindestens drei antivirale Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen eingesetzt, um eine Gefahr einer Resistenzbildung zu minimieren, und die Viruslast im Patienten langfristig bis unter die Nachweisgrenze zu senken und zu kontrollieren.

1.2 Problematik der HIV-Latenz und neue Therapieansätze

Durch die Einführung der kombinierten antiretroviralen Therapie (*combined antiretroviral therapy*, cART) in der Mitte der 1990er Jahre konnte die Lebenserwartung HIV-Infizierter signifikant erhöht werden (Palella et al., 1998). Erste optimistische Einschätzungen gingen davon aus, dass eine 2-3-jährige Therapie ausreichen könnte, um eine HIV-Infektion im Patienten zu eradizieren (Perelson et al., 1997). Es folgte jedoch bald die Erkenntnis, dass für eine solche Heilung eine mindestens 60 Jahre lange ununterbrochene Behandlung mit cART von Nöten wäre (Finzi et al., 1999). Der Grund hierfür sind die sogenannten latent infizierten Zellreservoirs. Latent HIV-infizierte Zellen sind dadurch charakterisiert, dass die replikationskompetente provirale DNA zwar in das Genom der Zelle integriert ist, es jedoch zu keiner Transkription und Expression viraler Gene und Freisetzung viraler Partikel kommt. In Patienten deren Viruslast infolge der cART-Behandlung unter die Nachweisgrenze gesenkt wurde, konnte bereits 1995 in in ruhenden CD4⁺ T-Zellen replikationskompetente provirale

1. Einleitung

DNA nachgewiesen werden (Chun et al., 1995, 1997; Finzi et al., 1997). Dieser latent infizierte Status ist extrem stabil und wird einzig durch die Lebensspanne der infizierten Zelle oder deren Nachkommen begrenzt. Es kann in supprimierten Patienten ohne detektierbare Viruslast bis zu 60 Jahre persistieren (J. D. Siliciano et al., 2003).

1.2.1 Etablierung von HIV-Latenz

Latent infizierte Zellen können in verschiedenen Anteilen in allen Subpopulationen der CD4⁺ T-Lymphozyten gefunden werden, inklusive naiven T-Zellen, Stamzell-Gedächtnis-T-Zellen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und terminal differenzierten T-Zellen (Lee & Lichterfeld, 2016) als auch in Monozyten und Makrophagen (Koppensteiner, Brack-Werner, & Schindler, 2012; A. Kumar, Abbas, & Herbein, 2014). Den größten Anteil an den latent infizierten Reservoirzellen scheinen dabei langlebige zentrale Gedächtnis-T-Zellen und Stamzell-Gedächtnis-T-Zellen zu haben. Sie führen durch ihre hohe Lebensspanne und Fähigkeit zur homöostatischen Proliferation unabhängig von *de novo* Infektionen zu einem Erhalt des latenten Reservoirs (Buzon et al., 2014; Chomont et al., 2009). In jüngeren Studien konnte zudem HIV-1 DNA in supprimierten Patienten in TH17, follikulären T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen gefunden werden, die auch eine Rolle als Reservoirzellen zu spielen scheinen (Perreau et al., 2013; Sun et al., 2015; Tran et al., 2008).

Nach einer erfolgten Infektion geht ein Großteil der CD4⁺ T-Zelle in den Zelltod über, bedingt durch die Belastung durch die Expression viraler Proteine, oder wird durch das Immunsystem beseitigt. In einem geringeren Teil der CD4⁺ T-Zellen kommt es zur Etablierung einer latenten Infektion. Dies kann auf zwei Wegen geschehen. Befindet sich eine CD4⁺ T-Zelle bei der Infektion im Übergang in einen ruhenden Status, kann es zum *Silencing* der viralen Genexpression kommen. Alternativ kann eine CD4⁺ T-Zelle, die sich in einem ruhenden Status befindet, auch direkt infiziert werden (Anderson et al., 2014). In diesem ruhenden Status ist der HIV-Promotor inaktiv und es findet keine Transkription der viralen Gene statt. Folglich werden auch keine HI-viralen Proteine hergestellt, sodass die latent infizierte Zelle weder immunologisch erkannt noch durch die cART beeinflusst werden kann.

Wie es zu der Etablierung des latenten Status nach der Infektion einer Zelle kommt, ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Zu den Mechanismen, die zur Entstehung von Latenz beitragen, gehören transkriptionelle Interferenz, die Integrationsstelle der proviralen DNA, Chromatinmodifikationen, ein Mangel an Transkriptions- oder Elongationsfaktoren, und eine unzureichende Aktivität des HIV-Transaktivators Tat. Welchen Stellenwert die einzelnen

Mechanismen einnehmen, ist derzeit noch unklar (Donahue & Wainberg, 2013; Hakre, Chavez, Shirakawa, & Verdin, 2012; R. F. Siliciano & Greene, 2011).

Die HIV-1 Transkription ist eng gekoppelt an den Aktivierungszustand der Wirtszelle und ist somit abhängig von zellulären Transkriptions- und Elongationsfaktoren, deren Mangel die Entstehung von Latenz begünstigen kann. So besitzt der LTR-Promotor unter anderem Bindungsstellen für die zellulären Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), welche Histonacetyltransferasen rekrutieren und die Transkription verstärken. Beide Transkriptionsfaktoren werden in ruhenden T-Zellen im Zytoplasma zurückgehalten und translozieren erst nach T-Zell-Aktivierung in den Nukleus. Dies hat einen Einfluss auf die Entstehung von Latenz. So konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien mit geringen basalen NF- κ B-Leveln die Entstehung von Latenz begünstigt ist, wohingegen eine Induktion der NF- κ B-Translokation durch Behandlung von Jurkat T-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder von primären Lymphozyten mit Phytohemagglutinin (PHA) die Etablierung viraler Latenz stark inhibierte (Duverger et al., 2009). Auch ein Mangel an Elongationsfaktoren kann die Entstehung von Latenz begünstigen. So zeigte sich in einem Latenzmodell mit primären Zellen, dass geringe zelluläre Spiegel des Elongationsfaktors *positive transcription elongation factor b* (P-TEFb), einem Kinasekomplex der zur Entstehung des Elongationskomplexes beiträgt, die Etablierung von Latenz begünstigen (Tyagi, Pearson, & Karn, 2010).

Die HIV-Transkription ist gekennzeichnet durch eine frühe Tat-unabhängige Phase, in der der LTR-Promotor unter der Kontrolle zellulärer Transkriptionsfaktoren steht, gefolgt von einer Tat-abhängigen Phase, in der das HI-virale Protein Tat für eine starke virale Transkription sorgt. In Latenzmodellen führte eine attenuierte Tat-Aktivität in erhöhtem Maße zu einer Etablierung von Latenz (Donahue, Kuhl, Sloan, & Wainberg, 2012; Pearson et al., 2008; Tyagi et al., 2010). In supprimierten Patienten konnte zudem eine Anreicherung von Tat-Varianten mit verminderter Aktivierungskapazität gefunden werden (Yukl et al., 2009). Die Stärke der basalen Tat-unabhängigen Transkription, die von zellulären Faktoren abhängt, kann entscheidend für den Eintritt des Provirus in einen latenten oder produktiven Status sein. Zelluläre Faktoren, die die basale HIV Transkription und/oder die Tat-Stabilität kontrollieren, sind somit kritisch für die Etablierung von HIV-Latenz. In *in vitro* generierten Zelllinien mit einer singulären proviralen Integrationsstelle zeigte sich, dass abhängig vom Integrationsort große Unterschiede in der basalen transkriptionellen Aktivität und der Reaktion auf Tat

1. Einleitung

vorliegen (Jordan, Defechereux, & Verdin, 2001; Pearson et al., 2008). Diese Daten deuten darauf hin, dass der Integrationsort zusammen mit der zellulären Umgebung die Balance zwischen Latenz und proviraler Expression beeinflussen kann.

Eine erste Kartierung der Integrationsorte von HIV-1 in T-Zelllinien zeigte eine Präferenz für transkribierte Gene und genreiche Regionen (A. R. W. Schröder et al., 2002), was auch *in vivo* in CD4⁺ T Zellen von Patienten bestätigt werden konnte (Han et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die HIV Integrase mit dem zellulären Koaktivator *lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF/p75) und zu einem geringeren Maßstab mit *hepatoma-derived growth factor related protein 2* (HRP-2) interagiert (Cherepanov et al., 2003; Schrijvers et al., 2012). Diese Interaktion leitet den HIV Präintegrationskomplex zu Introns aktiv transkribierter Gene (Lewinski et al., 2006), wo HIV präferentiell in die große Furche der DNA integriert.

In Modellsystemen mit definierten Integrationsorten zeigte sich, dass ein transkribiertes Gen stromaufwärts einer proviralen Sequenz die Transkription des Provirus beeinträchtigen kann (Greger, Demarchi, Giacca, & Proudfoot, 1998). Ein transkribiertes Gen in der gleichen Orientierung kann diese negativ (Lenasi, Contreras, & Peterlin, 2008) oder positiv beeinflussen (Han et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Transkription naheliegender Gene zu einer erhöhten Etablierung von Latenz führt (Lewinski et al., 2005; Shan et al., 2011). Dies lässt sich durch transkriptionelle Interferenz erklären. Des Weiteren kann eine Integration in transkriptionell repressiver Heterochromatin-Umgebung außerhalb von Genen oder in aliphoid DNA, bestehend aus nichtkodierenden hochrepetitiven Sequenzen in der Zentromer-Region, zur Etablierung von Latenz führen (Jordan, Bisgrove, & Verdin, 2003; Lewinski et al., 2005).

Die Integration in Regionen mit hoher transkriptioneller Aktivität kann als Folge zu transkriptioneller Interferenz und zu einer inaktiven Transkription des proviralen Genoms führen. Zum einen kann es durch Integration stromabwärts eines aktiven zellulären Promotors in gleicher Orientierung zu einer „*readthrough*“ Transkription der zellulären RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) kommen, wodurch essentielle Transkriptionsfaktoren am HIV LTR-Promotor verdrängt werden. Ist das provirale Genom in entgegengesetzter Orientierung integriert, kann dies in der Kollision der RNA-Pol II Komplexe des zellulären und viralen Promotors resultieren, was zu einer Termination der Transkription von dem schwächeren oder beiden Promotoren führen kann (Lewinski et al., 2005). Ein drittes Phänomen ist das *Enhancer Trapping*, welches auftritt wenn *Enhancer* des HIV-1 LTR-Promotors in räumlicher Nähe

eines zellulären Promotors binden und somit dessen Aktivität statt der des HIV-1 LTR-Promotors verstärken.

In einer Metaanalyse untersuchten Sherrill-Mix und Kollegen den Zusammenhang zwischen Integrationsort und verschiedenen regulatorischen genomischen Merkmalen und dem Expressionsstatus des Provirus in fünf verschiedenen Latenzmodellen (Sherrill-Mix et al., 2013). Innerhalb eines Modells konnte zwar ein Zusammenhang zwischen nah beieinander liegenden Integrationsorten und dem Latenzstatus des Provirus gefunden werden, eine Analyse aller Latenzmodelle konnte jedoch keine Vorhersage von einem genomischen Merkmal auf den Expressionsstatus des Provirus treffen (Sherrill-Mix et al., 2013). Die regulatorischen Merkmale, die die Entstehung von HIV Latenz beeinflussen, scheinen lokal und modellspezifisch zu sein.

Viele HIV-Integrationsorte, die in Patientenstudien gefunden wurden, wurden auch in *in vitro* Infektionen von CD4⁺ T-Zellen oder T-Zelllinien gefunden. Diese in verschiedenen Studien wiederauftretenden Genorte, *recurrent integration genes* (RIGs) genannt, haben einige Eigenschaften gemein. Neben der Präferenz für aktiv transkribierte Gene und eine offene Chromatinstruktur kommen sie in spezifischen Regionen der Chromosomen vor, die in den Randbereichen des Nukleus, nahe der Kernhülle, positioniert sind (Marini et al., 2015). Hier befinden sich Gene, die stark transkribiert werden und mit dem nuklearen Kernporenkomplex assoziiert sind und somit wahrscheinlich nach Kerneintritt des Präintegrationskomplexes mit diesem in Kontakt kommen.

Detaillierte Studien zur Kartierung von Integrationsorten in primären CD4⁺ T-Zellen bestätigten die bevorzugte Integration in aktiv transkribierte Genbereiche. Ein Großteil der gefundenen Integrationsorte war auf die Expansion einzelner infizierter T-Zellen zurückzuführen, was eine klonale Expansion von HIV-infizierten Zellen als Mechanismus der Persistenz in supprimierten Patienten nahelegt (Cohn et al., 2015; Maldarelli et al., 2014; Simonetti et al., 2016; Wagner et al., 2014). Diese Integrationsorte waren assoziiert mit Zellwachstum, Mitose und Krebsentwicklung (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Bis zu 98% der integrierten Proviren in supprimierten Patienten zeigen zudem Defekte wie interne Deletionen und Hypermutationen auf. Die Fraktion der intakten integrierten Proviren ist somit deutlich kleiner als bisher angenommen (Bruner et al., 2016; Y.-C. Ho et al., 2013). Die Defekte akkumulierten sehr früh und traten schon innerhalb 2-3 Wochen nach Infektion auf. Ho und Kollegen fanden in nicht transkriptionell aktivierbaren Proviren 88% defekte und 12% genomisch intakte provirale Sequenzen, was auf das Vorhandensein von

1. Einleitung

replikationskompetenten, nicht-induzierbaren Proviren schließen lässt. Die Diskrepanz zwischen genomisch intakten und damit potentiell replikationskompetenten Proviren und den messbar transkriptionell aktivierbaren Proviren erhöht die bis dahin angenommene Reservoirgröße noch einmal um das 60-fache (Y.-C. Ho et al., 2013).

Neben transkriptioneller Interferenz und dem Integrationsort können auch der Zustand des Chromatins und epigenetische Modifikationen einen Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von Latenz ausüben. Chromatin ist aufgebaut aus der DNA, die mit 146 bp um ein Nukleosom, bestehend aus einem Oktamer aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, gewunden ist, sowie weiteren assoziierten Proteinen. Die Chromatinkondensation ist kritisch für die Regulation der Genexpression und die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren. Die Histone können durch Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen modifiziert werden, wodurch sich der Chromatinstatus ändert und Interaktionen mit Chromatin-assoziierten Proteinen beeinflusst werden. Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) acetylieren oder deacetylieren selektiv Lysinreste der Histone. Die Acetylgruppen neutralisieren die positiven Ladungen des Lysinrests und verringern dadurch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Lysin und den negativen Ladungen der DNA und führen zu einer offenen Chromatinstruktur. Zudem können acetylierte Histone Transkriptionsfaktoren rekrutieren und sind somit mit einer offenen Chromatinstruktur und aktiv transkribiertem Euchromatin assoziiert. Deacetylierungen hingegen verdichten das Chromatin und verringern die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und sind mit inaktivem Heterochromatin assoziiert. Der HIV 5'LTR enthält unabhängig vom Integrationsort zwei Nukleosomen (Nuk-0 und Nuk-1). In latent infizierten Zelllinien werden kaum acetylierte Histone in diesem Bereich gefunden. Nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren dissoziiert Nuk-1 spezifisch und ermöglicht eine Transkription vom LTR-Promotor (Van Lint, Emiliani, Ott, & Verdin, 1996). DNA-Methylierungen werden durch Methyltransferasen vermittelt und können Transkription unterdrücken. Methylierungen treten hauptsächlich an CpG-Dinukleotiden auf und sind assoziiert mit Heterochromatin und dem *Silencing* von Genen. Im 5'LTR verhindert die Methylierung von CpG-Inseln die Bindung von essentiellen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und SP1 (Bednarik et al., 1991). In latent infizierten Zelllinien und primären T-Zellen wurden vermehrt Hypermethylierungen von zwei CpG-Inseln im 5'LTR um die Transkriptionsstartstelle (Kauder, Bosque, Lindqvist, Planelles, & Verdin, 2009), Trimethylierungen des Lysins an den Positionen 9 und 27 an Histon 3 (H3K9/27), sowie kaum acetylierte Histone H3 und hohe Level assoziierter HDACs gefunden (Pearson et al.,

2008; Tyagi et al., 2010). Dies verdeutlicht die Rolle von Chromatinmodifikationen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Latenz.

Insgesamt ist die Entstehung von Latenz hochkomplex und es ist bisher weitestgehend ungeklärt, welcher Stellenwert den einzelnen Mechanismen zukommt. Der Integrationsort vermag durch das Gen, in welches die Integration erfolgte, die Transkription direkt zu beeinflussen (*cis*-Effekte). Eine Beeinflussung findet aber auch durch die lokale Chromatin-Umgebung statt, bestehend aus naheliegenden Genen, die nicht zwingend auf dem gleichen Chromosom liegen müssen, sondern sich auch in räumlicher Nähe befinden können (*trans*-Effekte).

1.2.2 Zellkultur-basierte Modelle für HIV-Latenz

Da latent infizierte Zellen im Patienten nur in relativ geringer Anzahl vorkommen, werden für die Untersuchung von Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung von HIV-Latenz entsprechende Modellsysteme benötigt. SIV-infizierte Rhesusmakaken und andere nichthumane Primaten bieten die Möglichkeit, *in vivo* den Infektionsverlauf, die Rolle von Gewebereservoirien und die Reaktion auf Therapien zu untersuchen (zusammengefasst in Deere et al. 2011; Kumar et al. 2016). Eine Infektion mit SIV dient dabei als Modell für die HIV-Infektion. Ein weiteres *in vivo* Modell für die HIV-Infektion bilden humanisierte Mäuse, die mit humanem Gewebe oder Stammzellen transplantiert werden (zusammengefasst in Garcia 2016; Policicchio et al. 2016). Vorteile gegenüber nichthumanen Primaten sind die einfachere Handhabung und geringere Kosten, und die Möglichkeit die Infektion mit HIV statt SIV durchzuführen. Nachteile sind das weniger komplexe Immunsystem in humanisierten Mäusen, die kurze Lebensspanne und die geringere Menge an peripheren Blutzellen und Blutplasma die für Analysen entnommen werden kann.

In vitro Modelle für HIV-Latenz haben mehrere Vorteile gegenüber den genannten *in vivo* Modellen. Sie sind einfacher in der Handhabung, günstiger und haben eine kürzere Auslesezeit. Sie erlauben besonders das schnelle *Screening* potentieller neuer Therapeutika und Wirkstoffe. Viele der ersten Erkenntnisse über molekulare Mechanismen involviert in der Etablierung und Regulierung von HIV-Latenz wurden in *in vitro* Modellen in transformierten Zelllinien gewonnen. Die ersten T-Zelllinien und myeloiden Zelllinien ACH2, OM10.1, J1.1 und U1 (Butera, Perez, Wu, Nabel, & Folks, 1991; Folks et al., 1989; Folks, Justement, Kinter, Dinarello, & Fauci, 1987; Perez et al., 1991) gaben Aufschluss über die Relevanz der NF- κ B-Aktivierung für die Reaktivierung von HIV und waren nützlich bei der Identifizierung von Histondeacetylase-Inhibitoren als reaktivierende Agenzien (Van Lint et al., 1996). Einige

1. Einleitung

der Zelllinien tragen jedoch provirale Mutationen, die die Transkription beeinträchtigen und somit den Latenzstatus aufrechterhalten (Emiliani et al., 1996, 1998). Weiterentwickelte latent infizierte T-Zelllinien sind frei von solchen *loss-of-function*-Mutationen (J89GFP, JLat-Klone) (Jordan et al., 2003; Kutsch, Benveniste, Shaw, & Levy, 2002). Über integrierte Fluoreszenzreporter ist die Expression proviraler Gene zudem durchflusszytometrisch zu verfolgen. Obwohl die immortalisierten Zelllinien viel zum Verständnis von HIV-Latenz beigetragen haben, reflektieren sie durch ihre ständige Proliferation nur einen Teil der Aspekte von HIV-Latenz, da latente Infektionen *in vivo* hauptsächlich in ruhenden CD4+ Gedächtnis-T-Zellen gefunden werden. In den letzten Jahren wurden deshalb verschiedene experimentelle Modelle für HIV-Latenz basierend auf primären CD4+ T-Zellen entwickelt.

Latenzmodelle in primären CD4+ T-Zellen beinhalten einerseits Modelle in denen aktivierte T-Zellen infiziert werden und nach Infektion durch verschiedene Kultivierungsbedingungen in einen ruhenden Status zurückkehren sollen (zusammengefasst in Planelles et al. 2011; Hakre et al. 2012). Andere Modelle bedienen sich der direkten Infektion von unbehandelten oder Chemokin-behandelten ruhenden CD4+ T-Zellen, wobei nur wenige Prozent der Zellen latent infiziert werden, was die präferierte Infektion von aktivierten CD4+ T-Zellen widerspiegelt.

Aktivierte CD4+ T-Zellen gehen nach Infektion überwiegend in den Zelltod und nur zu sehr geringen Raten in einen ruhenden Status über, was die Schwierigkeit dieser Art von Latenzmodellen ausmacht. Durch Kultivierung mit Zytokinen wie IL-2 oder IL-7 nach Infektion kann die Überlebensrate der infizierten Zellen gesteigert werden. Andererseits tragen IL-2 und IL-7 auch zur Aktivierung von latentem HIV bei und können nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden (Brooks, Arlen, Gao, Kitchen, & Zack, 2003; Chun, Engel, Mizell, Ehler, & Fauci, 1998). Andere Modelle verzichten auf die Kultivierung mit Zytokinen und nutzen Strategien wie Kokultivierung mit *Feeder*-Zellen oder Transduktion mit dem anti-apoptotischen Gen *Bcl-2* (Sahu et al., 2006; Tyagi et al., 2010; Yang et al., 2009). In einem weiteren Ansatz werden CD4+ T-Zellen aktiviert und entwickeln sich durch verschiedene Kultivierungskonditionen in Richtung T-Helferzelle vom Typ 1 (TH1), Typ2 (TH2), oder in Richtung einer nicht-polarisierten zentralen Gedächtnis-T-Zelle (Messi et al., 2003). Die drei Populationen können infiziert werden und nach mehrtägiger Kultivierung in einen ruhenden Status zurückkehren. Das Modell erlaubt somit die Untersuchung von HIV-Latenz in Populationen von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (widergespiegelt durch TH1 und

TH2) und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (widergespiegelt durch nicht-polarisierte T-Helferzellen) (Bosque & Planelles, 2009).

Eine direkte Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen ist ein ineffizienter Prozess. Ruhenden CD4⁺ T-Zellen mangelt es an dNTPs für die reverse Transkription, ATP für den nuklearen Import und ihre statische kortikale Aktin-Barriere wirkt restriktiv (Pierson et al., 2002; Yoder et al., 2008; Zack et al., 1990). Eine direkte Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen ohne vorherige Aktivierung wurde von Swiggard und Agosto und Kollegen beschrieben (Agosto et al., 2007; Swiggard et al., 2005). Eine Integration in ruhenden T-Zellen konnte nachgewiesen werden, jedoch nur in einem viel geringeren Anteil als in aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Saleh und Kollegen entwickelten ein Modell basierend auf der Beobachtung, dass die Mehrheit der HIV-infizierten ruhenden CD4⁺ T-Zellen positiv für CCR7 ist, einen Homing-Rezeptor für lymphoide Organe. Die Autoren behandelten ruhende CD4⁺ T-Zellen mit den CCR7-Liganden CCL19 und CCL21, was die Empfänglichkeit der ruhenden T-Zellen für eine Infektion erhöhte (Saleh et al., 2007, 2011).

Insgesamt sind verschiedene *in vitro* Modelle für die Untersuchung von HIV-Latenz vorhanden, die jeweils ihre Vor- und Nachteile haben. Einige zeigten sich als nützlich für das Wirkstoff-Screening, während andere physiologische Eigenschaften des latenten Reservoirs besser reflektieren.

1.2.3 Latency-reversing agents (LRAs) als neuer Therapieansatz

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass eine Behandlung mit den verfügbaren antiretroviralen Wirkstoffen nicht zu einer Eradizierung von HIV im Patienten führt, wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht, das latent infizierte Zellreservoir zu reduzieren. Ein Ansatz zur Reduzierung des latenten Reservoirs ist die „*shock and kill*“ Strategie (Deeks, 2012). Durch den Einsatz pharmakologischer Agenzien soll hierbei die Transkription des proviralen Genoms in ruhenden, latent infizierten CD4⁺ T-Zellen induziert werden und durch die Neusynthese viraler Proteine die Wirtszelle durch virale zytopathische Effekte abgetötet, oder zum Ziel des körpereigenen Immunsystems gemacht und eliminiert werden. Gleichzeitig soll die Neuinfektion weiterer Zellen durch die gleichzeitige Gabe antiretroviraler Medikamente verhindert werden.

Bei der Suche nach *latency-reversing agents* (LRAs), Substanzen, die die HIV Expression induzieren ohne zu einer globalen toxischen T-Zellaktivierung zu führen, stellten sich Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) als besonders vielversprechend heraus.

1. Einleitung

Histondeacetylasen führen durch Deacetylierung der Lysinreste an den Histonen im Bereich des LTR-Promotors zur Ausbildung eines repressiven Chromatinstatus und einer Herunterregulierung der Transkription. Weiterhin werden durch HDACs wichtige zelluläre Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Sp1 sowie der HIV Transaktivator Tat deacetyliert und dadurch negativ reguliert (Chen et al., 2001; Pagans et al., 2005; Ryu et al., 2003). Durch den Einsatz von HDACi wird die Acetylierung von Histonen aufrechterhalten, was zu einer offenen Chromatinstruktur führt und provirale Genexpression begünstigt.

Der erste in HIV Patienten getestete HDACi war Suberoylanilid Hydroxyaminsäure (SAHA bzw. Vorinostat). Vorinostat wurde ursprünglich für die Behandlung des cutanen T-Zelllymphoms zugelassen (Mann, Johnson, Cohen, Justice, & Pazdur, 2007). Durch eine einfache Gabe von Vorinostat konnte in Patienten die virale Transkription aktiviert werden, was sich in einer 5-fachen Erhöhung der zellassozierten HIV-Transkripte in ruhenden T-Zellen äußerte (Archin, Liberty, et al., 2012). Ähnliche Resultate wurden bei einer täglichen Gabe über 14 Tage beobachtet (Elliott et al., 2014). Eine alternative Dosierungsstrategie (dreimal die Woche für 8 Wochen) zeigte hingegen keinen signifikanten Anstieg der HIV-Transkripte (Archin et al., 2014). In einer klinischen Studie mit dem potenteren HDACi Panobinostat, der für die Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen ist (Laubach, Moreau, San-Miguel, & Richardson, 2015), konnten erhöhte Raten von zellassozierten HIV-Transkripten als auch von Plasma-HIV-RNA in Patienten nachgewiesen werden (Rasmussen et al., 2014). Der jüngst getestete HDACi Romidepsin, eingesetzt für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen, führte in *in vitro* Latenzmodellen und in ruhenden CD4⁺ T-Zellen aus Patienten zu einer stärkeren Induktion der HIV-Transkription als Vorinostat und Panobinostat und auch zu der Freisetzung von Viruspartikeln (Wei et al., 2014). In einer klinischen Studien konnte nach Romidepsin-Behandlung ein Anstieg der Plasma HIV-RNA in 5 aus 6 Patienten (Sogaard et al., 2015) gemessen werden. Obwohl Romidepsin auch zu einem Anstieg der Virämie führte, die bei anderen HDACi so nicht beobachtet werden konnte, war der Anstieg der zellassozierten ungespleißten HIV-RNA ähnlich der in den vorherigen HDACi-Studien.

Auch die Behandlung mit Disulfiram, einem Inhibitor der Acetaldehyd-Dehydrogenase der zur Behandlung von Alkoholismus eingesetzt wird, führte in einem Zellmodell primärer latent infizierter CD4⁺ T-Zellen zu einer Aktivierung der HIV-Transkription (Xing et al., 2011). Disulfiram wirkt über den Akt-Signalweg durch Abbau des Phosphatase und Tensin Homologs (PTEN), das Akt inhibiert. Die Aktivierung diese Signalweges führt letztendlich zu einer Freisetzung von P-TEFb, welches an den LTR-Promotor rekrutiert wird und die virale

Transkription aktivieren kann (Doyon, Zerbato, Mellors, & Sluis-Cremer, 2012). In klinischen Studien führte Disulfiram zu mäßigen Anstiegen der HIV-Transkription (Elliott et al., 2015; Spivak et al., 2014).

Der NF- κ B- und Proteinkinase C (PKC)-Signalweg stellt einen weiteren Angriffspunkt zur Induktion der proviralen Expression in latenten Zellen dar. NF- κ B, ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, wird in einer inaktiven Form im Cytoplasma von I κ B gebunden. Die PKC kann nach Aktivierung I κ B phosphorylieren und somit NF- κ B freisetzen, welches in den Zellkern transloziert und die Transkription vom LTR-Promotor induziert. Wirkstoffe, die an diesem Signalweg angreifen sind unter anderem der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Prostratin und Bryostatin. Für Prostratin, einen Phorbolester, konnte gezeigt werden, dass er die HIV-Transkription in mehreren Latenzzelllinien aktiviert, als auch einen synergistischen Effekt zusammen mit HDACi hervorruft (Reuse et al., 2009; S. A. Williams et al., 2004). Zusätzlich regelt Prostratin die CD4-, CXCR4- und CCR5-Expression herunter, was eine *de novo* Infektion benachbarter Zellen verhindern kann (Kulkosky et al., 2001; Rullas et al., 2004). Zudem konnten Prostratin-Analoga entwickelt werden, die in Latenzzelllinien bis zu 100-fach potenter waren als die Ausgangssubstanz (Beans et al., 2013). Bryostatin, ein makrocyclisches Lacton, zeigte wie auch Prostratin eine starke Aktivierung der HIV-Transkription in Latenzzelllinien (Darcis et al., 2015; Laird et al., 2015) und wird bereits als Krebs-therapeutikum für B-Zell-Lymphome in klinischen Studien eingesetzt (Barr et al., 2009). In einer Pilotstudie in HIV-Patienten konnte jedoch nach Bryostatin-Gabe kein Effekt auf die HIV-Transkription oder auf die PKC-Aktivierung beobachtet werden (Gutiérrez et al., 2016).

Weitere Wirkstoffe, die eine Aktivierung der HIV Transkription herbeiführen können, sind BET-Inhibitoren (BETi). Das *bromodomain-containing protein 4* (BRD4) aus der *bromodomain extraterminal* (BET)-Familie von Transkriptionsregulatoren konkurriert mit Tat um die Bindung von P-TEFb (Bisgrove, Mahmoudi, Henklein, & Verdin, 2007; Boehm et al., 2013; S. Schröder et al., 2012). BETi, wie beispielsweise JQ1, können somit zu einer erhöhten Assoziation von Tat und P-TEFb und einer Rekrutierung von P-TEFb an den LTR-Promotor führen und resultierten in verschiedenen HIV-Latenzmodellen und in Patienten-T-Zellen in einer erhöhten HIV-Transkription (Banerjee et al., 2012; Boehm et al., 2013; Li, Guo, Wu, & Zhou, 2013; Zhu et al., 2012). BETi zeigten besonders in Kombination mit HDACi und NF- κ B-aktivierenden Agentien wie Prostratin eine synergistische Aktivierung

1. Einleitung

der HIV-Transkription. Ein neuerer BETi, OTX015, zeigte sich zudem potenter als JQ1 und wurde bereits in klinischen Studien für Blutkrebserkrankungen getestet (Lu et al., 2016).

Toll-like-Rezeptor (TLR)-Agonisten zeigten sich unlängst als weitere vielversprechende Kandidaten für die Aktivierung der HIV-Transkription. Der TLR7-Agonist GS986 führte in supprimierten SIV-infizierten Rhesusaffen zu einem transienten Anstieg der Plasma-SIV-RNA und zu einem Abfall der SIV-DNA-Spiegel um 56 bis 75% in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), Kolon und Lymphknoten (Whitney et al., 2015). In einer Folgestudie konnte nach der Behandlung mit GS986 und dem Analog GS9620 neben der transienten Plasmavirämie und verminderten SIV-DNA-Spiegel auch eine verlängerte Virussuppression in einigen der Makaken nach gezieltem Abbruch der ART verzeichnet werden (Whitney et al., 2016). In PBMCs aus supprimierten HIV-Patienten konnte GS9620 die HIV-RNA-Expression aktivieren (Sloan et al., 2015).

Obwohl die in klinischen Studien getesteten LRAs in der Lage waren die virale Transkription zu steigern, resultierte keine der klinischen Studien in einer messbaren Reduktion des viralen Reservoirs in Patienten. Eine reine Aktivierung der latent infizierten Zellen durch einzelne LRAs scheint demnach nicht auszureichen, um das latent infizierte Zellreservoir nachhaltig zu reduzieren. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Die Mehrheit der HIV-infizierten Zellen befindet sich in schwer zugänglichen Kompartimenten in lymphatischen Geweben wie den Lymphknoten und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe, aber auch in anderen anatomischen Regionen wie dem zentralen Nervensystem. Studien zur Wirksamkeit von LRAs konzentrierten sich hauptsächlich auf die HIV-Produktion und die Ausmaße des latenten Reservoirs in zirkulierenden T-Zellen im Patienten oder in *ex vivo* Modellen (Elliott et al., 2014; Rasmussen et al., 2015). Daher ist wenig bekannt über die Penetration der verschiedenen LRAs hinsichtlich lymphatischer Gewebe und anderer anatomischer Kompartimente, was in zukünftigen Studien untersucht werden müsste.

In verschiedenen *in vitro* Latenzmodellen wirkten verschiedene LRAs zum Teil stark unterschiedlich. Die Aktivität eines LRAs in einem Latenzmodell muss nicht zwangsläufig eine gute Wirksamkeit in anderen Modellen oder in Patientenzellen vorhersagen (Spina et al., 2013). Dies muss bei der Bewertung und der Suche nach neuen LRA-Kandidaten berücksichtigt werden. Bullen und Kollegen zeigten, dass verschiedene LRAs in klinisch relevanten Konzentrationen *ex vivo* in Kulturen von ruhenden CD4⁺ T-Zellen aus Patienten keine Freisetzung von Viruspartikeln bewirkten. Einen Anstieg des intrazellulären HIV-mRNA-Levels induzierte nur Bryostatine in einem Teil der untersuchten Individuen. Die

gleichen LRA-Kandidaten führten jedoch in einem Latenzmodell, das auf *Bcl-2* transduzierten ruhenden CD4⁺ T-Zellen beruht, zu einem Anstieg der HIV-mRNA-Spiegel (Bullen, Laird, Durand, Siliciano, & Siliciano, 2014). Demnach reagieren frisch isolierte latent infizierte Zellen aus infizierten Individuen anders auf die Behandlung mit LRAs als Zellkultur-Latenzmodelle.

Auch führen LRAs, wenn sie einzeln eingesetzt werden, wahrscheinlich nur in einer Unterpopulation der latent infizierten Zellen zu einer Aktivierung. Vermutlich werden Kombinationen verschiedener LRA Klassen benötigt, um eine ausreichende Aktivierung der HIV-Produktion zu erreichen. So führte eine Kombination von PKC-Agonisten mit BETi oder HDACi zu einer weitaus stärkeren Aktivierung als mit den einzelnen Wirkstoffen messbar war (Darcis et al., 2015; Laird et al., 2015; Reuse et al., 2009).

Weiterhin ist bekannt, dass in einer chronischen HIV-Infektion die zytolytische Kapazität der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) beeinträchtigt ist. Diese wird zwar durch die antiretrovirale Therapie verbessert, jedoch nicht vollständig wiederhergestellt (Hersperger et al., 2010; Kalams et al., 1999; Migueles et al., 2009; Sáez-Cirión et al., 2007). Shan und Kollegen konnten zeigen, dass infizierte ruhende CD4⁺ T-Zellen nach Provirus-Reaktivierung durch Vorinostat nicht durch virale zytopathische Effekte oder autologe CD8⁺ zytotoxische T-Zellen beseitigt wurden. Erst nach *in vitro* Stimulation der CD8⁺ Zellen mit HIV-Gag-Peptiden waren diese in der Lage, die infizierten T-Zellen effektiv zu eliminieren (Shan et al., 2012). Hinzukommend etablieren sich durch die hohe Mutationsrate der reversen Transkriptase und den Selektionsdruck durch CTL früh in der Infektion Immunevasions-Mutationen im langlebigen HIV-Reservoir, die dazu führen, dass selbst eine Aktivierung der HIV-Transkription und Expression viraler Epitope nicht in Immunerkennung und Eliminierung durch CTLs münden (Borrow et al., 1997; Deng et al., 2015). Eine Induzierung einer breiten CTL-Antwort durch immuntherapeutische Strategien, wie therapeutisch wirkende Vakzine, könnte helfen, die durch LRAs aktivierten infizierten T-Zellen zu eliminieren.

Eine effektive Reduzierung des latent infizierten Zellreservoirs wird demnach nicht durch eine Behandlung mit einem einzelnen LRA zu erzielen sein. Eine erfolgsversprechende Strategie könnte LRAs verschiedener Klassen und eine Maßnahme zur Stimulation der HIV-spezifischen Immunantwort beinhalten. Auch kann eine frühzeitige Initiierung der ART die Größe des latenten Reservoirs eindämmen (Archin, Vaidya, et al., 2012; Gianella et al., 2011; Pires, Hardy, Gazzard, Gotch, & Imami, 2004).

1.3 Sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung durch das CRISPR/Cas9-System

Versuche das latente Reservoir anzuregen, beziehungsweise zu *purgen*, scheiterten bis jetzt an der unzureichenden transkriptionellen Aktivierung durch LRAs, einer nicht vorhandenen Zellspezifität und, vereinzelt, in deren Toxizität. LRAs greifen in Signalwege der Zelle ein und vermitteln somit auch eine unspezifische Induktion der Genexpression der Wirtszelle. Ansätze, welche eine sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung der proviralen DNA unabhängig vom zellulären Status der Zelle verfolgen, umgehen diese Einschränkungen und könnten eine aussichtsreiche Strategie zur spezifischen Aktivierung des latenten Reservoirs darstellen.

In den letzten Jahren haben sich programmierbare DNA-bindende Proteine als geeignete Plattform für die Entwicklung synthetischer Transkriptionsfaktoren zur Modulation der Genexpression herausgestellt. So konnte mittels spezifisch für den HIV-LTR angepasster Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und *transcription activator-like effectors* (TALEs) eine Aktivierung in Latenzmodellen gezeigt werden (Geissler et al., 2015; Perdigão, Gaj, Santa-Marta, Barbas, & Goncalves, 2016; P. Wang et al., 2014; X. Wang et al., 2015). Das *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)-System stellt eine weitere Technologie zum *Genome Editing*, als auch zur Modulation der Genexpression dar. Durch die RNA-abhängige DNA-Bindeeigenschaft des Cas9-Proteins ist es zudem schneller, einfacher und kostengünstiger an eine gewünschte Ziel-DNA anzupassen als TALEs und Zinkfingerproteine.

Das CRISPR/Cas9-System wurde ursprünglich in Bakterien und *Archaea* als Bestandteil eines adaptiven Immunsystems entdeckt (zusammengefasst in Wiedenheft et al. 2012). Es führt gezielt DNA-Mutationen in pathogene virale und Plasmid-DNA ein. Das CRISPR/Cas9-System besteht aus zwei RNA Molekülen, der CRISPR RNA (crRNA) und der *trans-acting* CRISPR RNA (tracrRNA), sowie CRISPR-assoziierten (Cas) Proteinen. Die crRNA ist komplementär zu einer Fremd-DNA-Sequenz und hybridisiert zum Teil mit der tracrRNA. Zusammen mit der Endonuklease Cas bilden die beiden RNAs einen Ribonukleoprotein-komplex, der die Ziel-DNA durch Basenpaarung der crRNA erkennt und bindet. Der durch die Cas-Nuklease ausgeführte sequenzspezifische Schnitt erfolgt in der komplementären von der crRNA gebundenen Sequenz drei Nukleotide stromaufwärts des *protospacer adjacent motif* (PAM), einem Sequenzmotiv von drei Nukleotiden (NGG) in der Ziel-DNA. Der

nichtkomplementäre DNA-Strang wird dagegen an einer oder mehreren Stellen 3 bis 8 bp stromaufwärts des PAM geschnitten. (Jinek et al., 2012).

Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier entwickelten ein Zwei-Komponenten-System, in welchem die crRNA und tracrRNA zu einer teils selbsthybridisierenden singulären 17 bis 20 nt langen *guide RNA* (gRNA) fusioniert wurde und Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) an die gewünschte DNA-Sequenz leitet (Jinek et al., 2012). Durch entsprechende Wahl der gRNA-Nukleotidsequenz kann das artifizielle Cas9-System an eine gewünschte Zielsequenz angepasst werden. So konnte im Jahr 2013 mittels einer Kodon-optimierten Cas9-Nuklease erstmals in menschlichen Zellen ein gezieltes *Genome Editing* mittels CRISPR/Cas9 durchgeführt werden (Cong et al., 2013; Prashant Mali et al., 2013).

Nach Inaktivierung der zwei katalytischen Domänen der Nuklease Cas9 (Gasiunas, Barrangou, Horvath, & Siksnys, 2012; Jinek et al., 2012) kann Cas9 auch als programmierbares RNA-abhängiges DNA-Bindeprotein und Plattform für Transkriptionsaktivierungsdomänen für die Modulierung der Genexpression genutzt werden (Gilbert et al., 2013; Konermann et al., 2013; Maeder et al., 2013; P Mali et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Durch Fusion von dCas9 mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne VP16 aus Herpes Simplex-Virus (oder vier Kopien VP16 = VP64) konnte eine spezifisch erhöhte Expression des gewünschten Ziel-Gens induziert werden (A. W. Cheng et al., 2013; Maeder et al., 2013; P Mali et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Dabei konnte die Aktivierung durch die Rekrutierung mehrere Kopien dCas9-VP64 an denselben Promotor durch multiple nicht-überlappende gRNAs noch weiter erhöht werden. Um die Anwendbarkeit des CRISPR/Cas9-Systems zur transkriptionellen Aktivierung zu optimieren, wurden kürzlich neue, verbesserte Cas9-basierte Aktivierungssysteme vorgestellt, das SAM- und das SunTag-System (Konermann et al., 2015; Tanenbaum, Gilbert, Qi, Weissman, & Vale, 2014).

1.3.1 Das SAM-System

Das *synergistic activation mediator* (SAM)-System besteht aus einer enzymatisch inaktiven dCas9 (D10A/H840A), die mit dem synthetischen Aktivator VP64 fusioniert ist (Konermann et al., 2015). Basierend auf der Kristallstruktur der Cas9 im Komplex mit einer gRNA und der Ziel-DNA (Nishimasu et al., 2014) wurden zwei Sekundärstrukturen (*tetraloop* und *stemloop 2*) in der gRNA identifiziert, die aus der Struktur herausragen und keine Interaktionen mit Seitenketten der dCas9 eingehen. Diese Haarnadelstrukturen wurden jeweils mit einem minimalen RNA-Aptamer verlängert, welches spezifisch dimerisierte MS2

1. Einleitung

bacteriophage coat proteins, kurz MS2-Proteine, bindet (Peabody, 1993). Die MS2-Proteine wurden mit verschiedenen Transaktivatoren fusioniert, die verschiedene Transkriptionsfaktoren und Chromatin-modellierende Komplexe rekrutieren, wobei sich eine Kombination aus NF- κ B-transaktivierenden Untereinheit p65 und *heat shock factor 1* (HSF1)-Transaktivierungsdomäne als am vielversprechendsten herausstellte. Dieser Komplex aus MS2-p65-HSF1 wird über Bindung an MS2-Aptamere der gRNA an die Zielsequenz geleitet. Die dCas9-VP64 vermittelte Genaktivierung kann somit durch die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren signifikant gesteigert werden.

1.3.2 Das SunTag-System

Tanenbaum und Kollegen entwickelten sich wiederholende Peptid-Arrays, genannt SunTag, die die Bindung von bis zu 10 oder 24 Kopien eines Antikörper-Fusion-Proteins erlauben. Das Array besteht aus Peptiden des *general coat proteins 4* (GCN4), die spezifisch von *single chain variable fragment* (scFv)-Antikörpern erkannt werden. Durch Fusion des SunTag-Arrays an dCas9 und des VP64-Aktivators mit scFV-Antikörpern war es möglich, bis zu 10 Kopien VP64 über dCas9-SunTag und eine entsprechende gRNA an eine gewünschte Ziel-DNA zu rekrutieren. Dies führte in einer ersten Anwendung zu 10- bis 50-fach erhöhten Proteinspiegel von CXCR4, verglichen mit minimaler Erhöhung durch dCas9-VP64 allein (Tanenbaum et al., 2014).

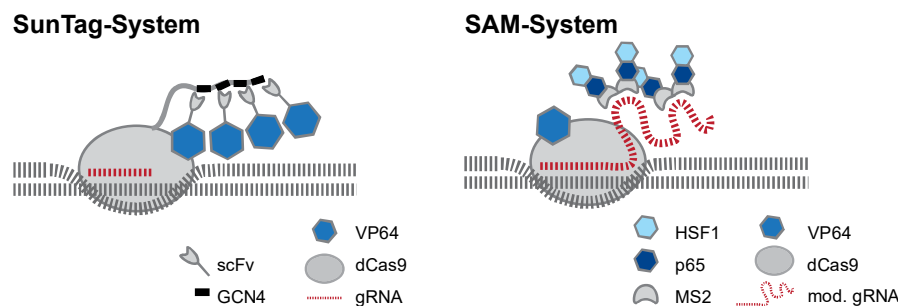


Abbildung 4: Schema des SunTag- und des SAM-Systems.

1.4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit

Mit derzeit geschätzt weltweit 36,7 Millionen HIV-infizierten Menschen ist das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) für eine globale Pandemie verantwortlich. Durch Einführung der antiretroviralen Kombinationstherapie ab Mitte der 1990er Jahre konnte die Lebenserwartung von HIV-Infizierten drastisch erhöht werden. Gleichwohl ist HIV nach wie vor eine unheilbare Erkrankung. Latent infizierte Zellreservoir, die die provirale Erbinformation stabil enthalten, aber keine viralen Antigene exprimieren, stellen die größte Hürde bei der Entwicklung von HIV-Eradizierungsstrategien dar. Die Mechanismen, die zur Etablierung von HIV-Latenz beitragen, sind multifaktoriell und nicht vollständig verstanden. Da latent infizierte Zellen phänotypisch nicht von produktiv infizierten Zellen zu unterscheiden sind, ist es schwierig, Populationen latent infizierter Zellen zu isolieren und funktionell zu charakterisieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher mithilfe eines fluoreszenzmarkierten proviralen Reporterkonstruktes Latenzzelllinien generiert werden, welche die schnelle und einfache durchflusszytometrische Identifizierung von latent und produktiv infizierten Zellen ermöglichen und sich für die Untersuchung neuer Reaktivierungs-Strategien eignen.

Eine vollständige Aktivierung von ruhenden latent infizierten Zellen und eine sich anschließende Eliminierung durch CD8⁺ T-Zellen wird als essentieller Baustein einer erfolgsversprechenden Eradizierungsstrategie angesehen. Die derzeit erprobten *latency-reversing agents* führen jedoch nur zu einer unvollständigen Aktivierung, erreichen nicht alle Subpopulationen des latenten Reservoirs und wirken nur indirekt über die Modulierung zellulärer Signalwege.

CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme können eine sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung unabhängig von einer globalen Zellaktivierung vermitteln. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatoren dazu geeignet sind, latente Proviren in einen transkriptionell aktiven Status zu überführen. Zwei verschiedene CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme sollten an den HIV-LTR adaptiert und eine optimale Zielsequenz für die Induktion des LTR-Promotors gefunden werden. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatoren zu einer vollständigen Aktivierung führen können, die in der Freisetzung viraler Partikel resultiert. Dies wäre eine wichtige Voraussetzung für einen möglichen Einsatz solcher neuartiger Aktivierungsmethoden als Bestandteil erfolgreicher Eradizierungsstrategien.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

E.coli XL-10 Gold

Stratagene (La Jolla CA, USA)

E.coli Stbl2

Invitrogen

2.2 Eukaryotische Zelllinien

Jurkat

American Type Culture Collection (ATCC) (#TIB-152)

HEK-293T

ATCC (#CRL-1573)

TZM-bl

NIH AIDS Reagent Program (#8129), zur Verfügung gestellt von Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu und Tranzyme Inc. (Derdeyn et al., 2000)

JLat6.3

NIH AIDS Reagent Program (#9846), zur Verfügung gestellt von Dr. Eric Verdin (Jordan et al., 2003)

J89

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. David N. Levy (New York University) (Kutsch et al., 2002)

MOLT-4/CCR5

NIH AIDS Reagent Program (#4984), zur Verfügung gestellt von Dr. Masanori Baba, Dr. Hiroshi Miyake, Dr. Yuji Iizawa (Baba, Miyake, Okamoto, Iizawa, & Okonogi, 2000)

2.3 Primäre eukaryotische Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren

Blutspendezentrale des UKE (Hamburg)

Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC)

2.4 Medien

2.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l, Bakterien-Hefe-Extrakt, 8 g/l NaCl, 1 g/l Glucose, pH 7.2 (eingestellt mit NaOH)

Tym Broth

20 g/l Bacto-Trypan, 5 g/l Bakterien-Hefe-Extrakt, 5,8 g/l NaCl, 2 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{xH}_2\text{O}$ (Medium autoklavieren)

2.4.2 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	Biochrom (Berlin)
versetzt mit:	
10% fötales Kälberserum (FKS) (v/v),	Biochrom (Berlin)
4 mM L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
1 mM Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
50 U/ml Penicillin	Biochrom (Berlin)
50 µg/ml Streptomycin	Biochrom (Berlin)
5% NaHCO ₃ (7,5% w/v)	Biochrom (Berlin)
RPMI 1640	Lonza (Basel, CH)
versetzt mit:	
10% FKS (PAN)	Biotech (Aidenbach)
4 mM L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
50 U/ml Penicillin	Biochrom (Berlin)
50 µg/ml Streptomycin	Biochrom (Berlin)
IMDM (<i>Icove's modified Eagle's medium</i>)	Lonza (Verviers, Belgium)
Opti-MEM® (serumreduziertes Medium)	Gibco® by Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
StemSpan® SFEM (serumfreiesMedium)	StemCell (Grenoble, France)

Die Inaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte bei 56°C für 30 min.

2.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) bezogen.

Tabelle 1: PCR-Primer für den Nachweis des HIVis-Reporters im *NUP188*-Lokus.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
NUP188-F	CTTTGTTGGGTAAGCATGGAGGTC	amplifizieren ein 634 bp Fragment auf dem <i>wildtyp</i> Allel
NUP188-R	CAGTTACTCACCTTTGCACATAGG	
LTR-R	CTTCTACCTTATCTGGCTCAACTGG	amplifiziert mit NUP188-F ein 336 bp Fragment vom HIVis-Reporter im <i>NUP188</i> -Lokus

2. Materialien

Tabelle 2: Primer und Sonden für die *Realtime*-PCR

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
HIV Tat fw	GGCATCTCCTATGGCAGGAA	Quantifizierung von <i>tat</i> -Sequenzen
HIV Tat rev	TGCTTTGATAGAGAACTTGATGAGTCT	
HIV Tat Sonde	(FAM)-ACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAA CAGT-(TAMRA)	
HIV Gag fw	ATCAATGAGGAAGCTGCAGAA	Quantifizierung von <i>gag</i> -Sequenzen
HIV Gag rev	GATAGGTGGATTATGTGTCAT	
HIV Gag Sonde	(FAM)-ATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAA-(TAMRA)	
GAPDH fw	GTCATCAATGGAAATCCCATCA	Quantifizierung von <i>gapdh</i> -Sequenzen
GAPDH rev	TGGTTCACACCCATGACGAA	
GAPDH Sonde	(FAM)-TCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC-(TAMRA)	
HBG fw	CTTAATGCCTTAACATTGTGTATAA	Quantifizierung von <i>hbg</i> -Sequenzen
HBG rev	GAATATGCAAATAAGCACACATATAT	
HBG Sonde	(FAM)-ACTTTACACAGTCTGCCTAGTACA TTAC-(TAMRA)	

Tabelle 3: Primer und Sonden für die ddPCR

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
HIV Gag fw	ATCAATGAGGAAGCTGCAGAA	Quantifizierung von <i>gag</i> -Sequenzen
HIV Gag rev	GATAGGTGGATTATGTGTCAT	
HIV Gag Sonde	(FAM)-ATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAA-(BHQ1)	
HIV Tat fw	GGCATCTCCTATGGCAGGAA	Quantifizierung von <i>tat</i> -Sequenzen
HIV Tat rev	TGCTTTGATAGAGAACTTGATGAGTCT	
HIV Tat Sonde	(FAM)-ACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAA CAGT-(BHQ1)	
HIV-LTR fw	GCCTCAATAAAGCTTGCC	Quantifizierung von LTR-Sequenzen
HIV-LTR rev	GGCGCCACTGCTAGAGATTTT	
HIV-LTR Sonde	(FAM)-AAGTRGTGTGTGCCC-(MGB)	

Tabelle 4: Primer für die HiLo-PCR

Name	Sequenz (5' - 3'Richtung)	Funktion
5'-LTR-281-las	GAAATGCTAGGCGGCTGTCAAACCTC CACTCTA	HiLo-Primer für Sequenz stromaufwärts des 5'LTR
5'-LTR-138-as	AGCACCATCCAAAGGTCAGT	<i>Nested</i> HiLo-Primer 5'LTR
3'-LTR-9990-s	TAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTA GCATTTC	HiLo-Primer für Sequenz stromabwärts des 3'LTR
3'-LTR-10310-s	AAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTG	<i>Nested</i> HiLo-Primer 3'LTR
5'-LTR-HiLo-seq	CTGGCCCTGGTGTGTAGTTCTGCCAA	Sequenzierung 5'LTR- Fragmente
3'-LTR-HiLo-seq	AAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTG	Sequenzierung 3'LTR- Fragmente

Tabelle 5: Oligonukleotidsequenzen für die gRNA-Klonierung für das SunTag-System (basierend auf HXB2-Sequenz).

gRNA	Oligo	Sequenz (5' - 3'Richtung)
gRNA3	sgRNA3-SunTag-up	atctgAGAGAGAAGTATTAGAGTGG
	sgRNA3-SunTag-low	aaacCCACTCTAATACTTCTCTCTc
gRNA4	sgRNA4-SunTag-up	atctgCCGCCTAGCATTTCATCACA
	sgRNA4-SunTag-low	aaacTGTGATGAAATGCTAGGCGGc
gRNA5	sgRNA5-SunTag-up	atctgCATGGCCCGAGAGCTGCATC
	sgRNA5-SunTag-low	aaacGATGCAGCTCTCGGGCCATGc
gRNA6	sgRNA6-SunTag-up	atctgCTGACATCGAGCTTGCTACA
	sgRNA6-SunTag-low	aaacTGTAGCAAGCTCGATGTCAGc
gRNA7	sgRNA7-SunTag-up	atctgCTTTCCGCTGGGGACTTTCC
	sgRNA7-SunTag-low	aaacGGAAAGTCCCCAGCGGAAAGc
gRNA8	sgRNA8-SunTag-up	atctgTTTCCAGGGAGGCGTGGCCT
	sgRNA8-SunTag-low	aaacAGGCCACGCCTCCCTGGAAAc

2. Materialien

Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen für die gRNA-Klonierung für das SAM-System (basierend auf HXB2-Sequenz wenn nicht anders angegeben).

gRNA	Oligo	Sequenz (5'- 3'Richtung)
gRNA1	sgRNA1-SAM-up	caccGACAAGATATCCTTGATCTG
	sgRNA1-SAM-low	aaacCAGATCAAGGATATCTTGTC
gRNA2	sgRNA2-SAM-up	caccAAGGTAGAAGAAGCCAATGA
	sgRNA2-SAM-low	aaacTCATTGGCTTCTTCTACCTT
gRNA3	sgRNA3-SAM-up	caccAGAGAGAAGTATTAGAGTGG
	sgRNA3-SAM-low	aaacCCACTCTAATACTTCTCTCT
gRNA4	sgRNA4-SAM-up	caccCCGCCTAGCATTTCATCACA
	sgRNA4-SAM-low	aaaCTGTGATGAAATGCTAGGCGG
gRNA5	sgRNA5-SAM-up	caccCATGGCCCGAGAGCTGCATC
	sgRNA5-SAM-low	aaacGATGCAGCTCTCGGGCCATG
gRNA6	sgRNA6-SAM-up	caccCTGACATCGAGCTTGCTACA
	sgRNA6-SAM-low	aaacTGTAGCAAGCTCGATGTCAG
gRNA7	sgRNA7-SAM-up	caccCTTTCGCTGGGGACTTTCC
	sgRNA7-SAM-low	aaacGGAAAGTCCCCAGCGGAAAG
gRNA8	sgRNA8-SAM-up	caccTTTCCAGGGAGGCGTGGCCT
	sgRNA8-SAM-low	aaacAGGCCACGCCTCCCTGGAAA
gRNA9	sgRNA9-SAM-up	caccCAGACCCTTTTAGTCAGTGT
	sgRNA9-SAM-low	aaacACACTGACTAAAAGGGTCTG
gRNA6 (NL4-3)	sgRNA6(NL4-3)-SAM-up	caccCTGACATCGAGCTTGCTACA
	sgRNA6(NL4-3)-SAM-low	aaacTGTAGCAAGCTCGATGTCAG
gRNA7 (NL4-3)	sgRNA7(NL4-3)-SAM-up	caccCTTTCGCTGGGGACTTTCC
	sgRNA7(NL4-3)-SAM-low	aaacGGAAAGTCCCCAGCGGAAAG

Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen für die gRNA-Klonierung für das SAM-System (mit Sequenzvariationen).

gRNA	Oligo	Sequenz (5'- 3'Richtung)
gRNA5*2	sgRNA5*2-SAM-up	caccCGTGGCCCGAGAGCTGCATC
	sgRNA5*2-SAM-low	aaacGATGCAGCTCTCGGGCCACG
gRNA5*10	sgRNA5*10-SAM-up	caccCATGGCCCGCGAGCTGCATC
	sgRNA5*10-SAM-low	aaacGATGCAGCTCGCGGGCCATG

gRNA5*16	sgRNA5*16-SAM-up	cacc CATGGCCCCGAGAGCTACATC
	sgRNA5*16-SAM-low	aaacGATGTAGCTCTCGGGCCATG
gRNA5*2,10	sgRNA5*2,10-SAM-up	caccCGTGGCCCCGCGAGCTGCATC
	sgRNA5*2,10-SAM-low	aaacGATGCAGCTCGCGGGCCACG
gRNA5*2,16	sgRNA5*2,16-SAM-up	caccCGTGGCCCCGAGAGCTACATC
	sgRNA5*2,16-SAM-low	aaacGATGTAGCTCTCGGGCCACG
gRNA5*10,16	sgRNA5*10,16-SAM-up	caccCATGGCCCCGCGAGCTACATC
	sgRNA5*10,16-SAM-low	aaacGATGTAGCTCGCGGGCCATG
gRNA5*2,10,16	sgRNA5*2,10,16-SAM-up	caccCGTGGCCCCGCGAGCTACATC
	sgRNA5*2,10,16-SAM-low	aaacGATGTAGCTCGCGGGCCACG
gRNA5*2,4,10,16	sgRNA5*2,4,10,16-SAM-up	caccCGTAGCCCCGCGAGATACATC
	sgRNA5*2,4,10,16-SAM-low	aaacGATGTATCTCGCGGGCTACG

2.6 Expressionsplasmide

Tabelle 8: Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide.

Name	Funktion	Herkunft
pRSV-Rev	Kodiert für Rev unter Kontrolle des RSV-Promotor s; für die Verpackung von lentiviralen Vektoren,	Dull et al., 1998
pMDL_g/pRRE	Kodiert für HIV-1 Gag/Pol und RRE für die Verpackung von lentiviralen Vektoren	erhalten von Dr. Carol Stocking, HPI (Hamburg), Dull et al., 1998
psPAX2	Verpackungsplasmid für lentivirale Vektoren der 2. und 3. Generation; kodiert für Gag/Pol, Rev, Tat und RRE	Addgene #12260
pCMV_VSV-G	Expression des Hüllproteins von VSV	Beyer et al., 2002
pNLT2-HIVis	Proviraies Reporterkonstrukt basierend auf NL4-3-Sequenz mit <i>bfp-SFFV-venus</i> im <i>nef</i> -ORF	Bialek, 2013
pcDNA-BFP SFFV-Venus	Zwischenkonstrukt mit der Expressionskassette BFP-SFFV-Venus	Bialek, 2013
pSH0	Lentiviraler Vektor, der unter der Kontrolle des PGK-Promotors GFP exprimiert	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pSH1_Tre1.0	Lentiviraler Vektor, als Ausgangskonstrukt für Klonierungen genutzt	Dr. Helga Hofmann-Sieber, HPI (Hamburg)
pSH9-scrambledTre	Lentiviraler Vektor, kodiert für SFFV-GFP-EF1 α -scrambled Tre;	Dr. Helga Hofmann-Sieber, HPI (Hamburg)

2. Materialien

	für die Expression von GFP unter der Kontrolle des SFFV-Promotors genutzt	
pNL4-3_mCherry	Vollständige Sequenz des HIV-1 Isolats NL4-3 mit <i>nef</i> ausgetauscht durch <i>mCherry</i> -Sequenz	Dr. Ilona Hauber, HPI (Hamburg)
pNL4-3	Vollständige Sequenz des HIV-1 Isolats NL4-3	Adachi et al. 1986
pNL_BaL(env)	Vollständige Sequenz des HIV-1 Isolats NL4-3 mit <i>env</i> -Sequenz aus BaL-Isolat	Dr. Ilona Hauber, HPI (Hamburg)
pHRdSV40-dCas9-10xGCN4_v4-P2A-BFP	Expression von dCas9 mit 4 Kopien GCN und BFP	Addgene #60903, SunTag
pHRdSV40- scFv-GCN4-sfGFP-VP64-GB1-NLS	Expression von scFv-Antikörpern fusioniert mit VP64	Addgene #60904, SunTag
pSUPER cloning backbone	H1-Promotor-abhängige gRNA-Expression; <i>BbsI</i> -Schnittstellen zur Insertion der <i>spacer</i> -Sequenz	Oligoengine
dCas9-VP64_GFP	Expression von dCas9-VP64 und GFP	Addgene #61422, SAM
MS2-P65-HSF1_GFP	Expression von MS2-p65-HSF1 und GFP	Addgene #61423, SAM
sgRNA(MS2) cloning backbone	U6-Promotor-abhängige gRNA-Expression mit MS2-Strukturen; <i>BbsI</i> -Schnittstellen zur Insertion der <i>spacer</i> -Sequenz	Addgene #61424, SAM
lenti_sgRNA(MS2)_zeo backbone	Lentiviraler Vektor für sgRNA mit MS2-Strukturen; <i>BsmBI</i> -Schnittstellen zur Insertion der <i>spacer</i> -Sequenz	Addgene #61427, SAM
pSH-SAM-gRNA5	Lentiviraler Vektor, der die Komponenten H1-gRNA5, PGK-dCas9-VP64 und EF1 α -MS2-p65-HSF1-2A-GFP exprimiert	Dr. Niklas Beschoner HPI, (Hamburg)

2.7 Enzyme

Phusion High Fidelity Polymerase

NewEngland Biolabs

(Ipswich MA, USA)

TaqPlus Precision Polymerase

Agilent (Santa Clara CA, USA)

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega (Madison WI, USA)

RQ1 DNase

Promega (Madison WI, USA)

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen NewEngland Biolabs (Ipswich MA, USA) und Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

2.8 Antikörper

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für FACS-Färbungen.

Antikörper	Markierung	Klon	Herkunft
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD25	PE-Dazzle 594	M-A251	BioLegend (San Diego CA, USA)
PE/Cy7 anti-human CD69	PE-Cy7	FN50	BioLegend (San Diego CA, USA)
anti-HIV core antigen KC57-RD1	RD1	KC57	Beckman Coulter (Brea CA, USA)

Tabelle 10: Antikörper für den p24-ELISA.

Antikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
α -HIV-1 p24 monoklonal (183-H12-5C)	Maus	Coating-Antikörper 1:1.000	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (Bethesda MD, USA)
α -HIV-1 p24 polyklonal	Kaninchen	Detektionsantikörper 1:10.000	Davids Biotechnologie (Regensburg)
α -Kaninchen-IgG- HRPO	Ziege	Sekundärantikörper 1:2.000	Dianova (Hamburg)

2.9 Reagenzsysteme

5'-Prime-Mastermix	5 Prime (Boulder CO, USA)
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Gibco, Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)	Bio-Rad Laboratories (München)
EasySep negative selection Human CD4 ⁺ T Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies (Vancouver BC, Canada)
Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Luciferase Assay System	Promega (Madison WI, USA)
Maxima Hot Start Green PCR Master Mix	Fermentas Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG	Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
PrimePCR ddPCR Expression Probe Assay: GAPDH	Bio-Rad Laboratories (München)
PrimePCR ddPCR Copy Number Assay: RPP30	Bio-Rad Laboratories (München)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

2. Materialien

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche (Mannheim)
RoboSep negative selection Human CD4 ⁺ T Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies (Vancouver BC, Canada)
LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Life Technologies (Carlsbad CA, USA)

2.10 DNA-Längenstandards

1 kb DNA ladder (#N3232)	NewEngland Biolabs (Ipswich MA, USA)
100 bp DNA ladder (#N3231)	NewEngland Biolabs (Ipswich MA, USA)

2.11 Antibiotika

Ampicillin	Roche (Mannheim)
Geneticin (G418)	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Penicillin	Biochrom (Berlin)
Streptomycin	Biochrom (Berlin)

2.12 Chemikalien

AlamarBlue	Bio-Rad Laboratories (München)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Biocoll 1,077 g/ml	Biochrom (Berlin)
Rekombinantes humanes CCL19	R&D Systems (Wiesbaden)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Serva (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
DNAzol	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
dNTPs	Roche (Mannheim)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Biomol (Hamburg)
EthylenDiamin-Tetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Biomol (Hamburg)

rhIL-2	CellGenix (Freiburg)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Liquemin N10.000	Roche (Mannheim)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumbicarbonat-Puffer (7,5 % w/v)	Biochrom (Berlin)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PeqGOLD TriFast™	Peqlab (Erlangen)
Phenol	Merck (Darmstadt)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
RNAzol	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Rox Reference Dye	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck (Darmstadt)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
TransIT-LT1, TransIT-Jurkat	Mirus Bio (Madison WI, USA)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)
Tris	Biomol (Hamburg)
Tween-20	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt)

2.13 Verbrauchsmaterialien

24-well Zellkulturtestplatten mit permeablem <i>Transwell</i> (PET, 0,4 µm Porengröße)	Corning (Corning, NY, USA)
6-well/ 12-well/ 24-well-/ 96-well- Zellkulturtestplatten	TPP (Trasadingen CH)

2. Materialien

96- <i>well</i> MaxiSorp Flachbodenplatten	(Nunc, Langenselbold)
Biosphere [®] FilterTips (10/ 20/ 200/1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
DG8 Cartridges für ddPCR	Bio-Rad Laboratories (München)
DG8 Gaskets für ddPCR	Bio-Rad Laboratories (München)
FACS Reaktionsgefäße	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
MicroAmp Fast Optical 96- <i>well</i> Reaction Plate	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Microlite Mikrotiter-Streifenplatten	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter	Millex [®] (Irland)
twin.tec PCR-Platten	Eppendorf (Hamburg)
Zellkultur-Flaschen (T-25,-75,-175)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.14 Lösungen und Puffer

DNA-Auftgaspuffer (6x)	40 % Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10 % Bromphenolblau,
Dynabeads-Waschpuffer	PBS, 2 mM EDTA, 0,1 % BSA
ELISA-Blockpuffer	PBS + 10 % NKS
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween-20
ELISA-Entwicklungspuffer	PBS, 0,1 M NaAc pH 6.0, TMB (10 mg/ml in DMSO) 1:100 (v/v), 30% H ₂ O ₂ 1:5000
FACS Puffer	PBS + 1% FKS, 1 mM EDTA
Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i> , PBS)	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PBS-EDTA	PBS, 1 mM EDTA (steril)
PBS-Liquemin	PBS, 0,05 % Liquemin N10.000
PBS-SE	PBS, 2 % FKS, 0,3 mM EDTA
TAE-Puffer (50x):	2,0 M Tris, 1,0 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7.4
Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i> , TBS)	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris, pH 8.0
TBS–Tween (TBS-T)	TBS + 0,2 % Tween-20

Tbf-I Puffer	30 mM Kaliumacetat, 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{xH}_2\text{O}$, 100 mM KCl, 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{xH}_2\text{O}$, 15% (w/v) Glycerol (Puffer steril filtrieren)
Tbf-II Puffer	10 mM Na-MOPS (pH 7,0), 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{xH}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 15 % (w/v) Glycerol (Puffer autoklavieren)

2.15 Geräte

Brutschrank BBD 6220 und Minitherm	Heraeus (Hanau)
Centro LB 960 Luminometer	Berthold Technologies, (Bad Wildbad)
Combi Spin FVL-2400N	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Easy Sep [®] Magnet	StemCell Technologies (Vancouver BC, Canada)
Einfrierbox	Stratagene (La Jolla Ca, USA)
Elektrophorese Power Supply EPS 300	Pharmacia Amersham (Amersham, UK)
FACS Canto II	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
FACS Fortessa	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
FACS Aria	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
FACS Aria Fusion	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
Geldokumentationssystem Gelstudio Sa	Analytik Jena (Jena)
Gelkammern	Bio-Rad Laboratories (München)
Kühlzentrifuge J6-MI	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Oberkochen)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda- Königshofen)
PCR System GeneAmp [®] 9700	Applied Biosystems [™] by Life Technologies (Carlsbad CA, USA)

2. Materialien

PCR System 7500 Fast Real-Time	Applied Biosystems™ by Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
Platten-Spektralphotometer VersaMax	Molecular Devices (Sunnyvale CA, USA)
PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories (München)
QX200 Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories (München)
QX200 Droplet Reader	Bio-Rad Laboratories (München)
RoboSep™ automatisierter Zellseparator	StemCell Technologies (Vancouver BC, Canada)
Sterilwerkbank Herasafe KS12	Heraeus (Hanau)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermozykler Biometra TAdvanced	Analytik Jena (Jena)
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
UV/VIS Spectrophotometer DU®730	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
UV-Transilluminator TFM-20	UVP (Upland CA, USA)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
2.16 Software	
CLC Main Workbench 7	QIAGEN Bioinformatics (Venlo, Niederlande)
FacsDiva	BD Biosciences (Franklin Lakes NJ, USA)
FlowJo V10	Tree Star (Ashland OR, USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software (San Diego CA, USA)
QuantaSoft 1.7.4	Bio-Rad Laboratories (Hercules CA, USA)
R Studio Version 0.99	RStudio (Boston MA, USA)
SoftMax Pro	Molecular Devices (Sunnyvale CA, USA)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

E.coli wurden für die Plasmidisolierung in 5 ml (Minipräparation) oder 250 ml (Maxipräparation) LB-Medium versetzt mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum für 16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Für die Konservierung transformierter *E.coli* wurden 500 µl Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Glycerin gemischt, in ein Kryokonservierungsgefäß überführt, und bei -80°C gelagert.

Selektionsagarplatten wurden aus LB-Medium versetzt mit 5,5 g/l Agar hergestellt. Der LB-Agar wurde autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, das gewünschte Antibiotikum zugegeben und die Selektionsagarplatten gegossen.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

3.1.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* XL-10 Gold oder Stbl2 hergestellt. Hierfür wurden Bakterien des entsprechenden Stammes aus einer Glycerinkultur in 1 ml LB-Medium verdünnt, auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert. Von einer Kolonie wurde eine Vorkultur von 10 ml in Tym-Broth-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Vorkultur wurde auf 500 ml mit Tym-Broth-Medium aufgefüllt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 1.800 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 150 ml eiskaltem Tbf I Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 20 ml eiskaltem TBF II Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden in Aliquots zu 200 µl aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

Für die Hitzeschock-Transformation von DNA in Bakterien wurden 200 µl chemisch kompetente *E.coli* XL-10 Gold oder Stbl2 auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA oder

3. Methoden

einem Ligationsansatz von 20 µl versetzt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und für 45 s auf 42°C im Wasserbad erwärmt (Hitzeschock). Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt, 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz zugegeben und der Ansatz für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 2 min bei 3.800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen im Rücklauf vorsichtig resuspendiert, die Zellsuspension auf geeignetem Selektionsagar ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation und Isolierung von Plasmid-DNA

Für eine Plasmidpräparation im Mini- oder Maximaßstab wurden 5 ml bzw. 250 ml LB-Medium versetzt mit einem geeigneten Selektionsantibiotikums mit einer Kolonie der transformierten *E.coli* angeimpft und die Kultur unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plasmidpräparation wurde nach Herstellerangaben mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit oder QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt und die Plasmid-DNA in 50 bzw. 400 µl Wasser aufgenommen. Die Plasmidpräparation erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch starke Erhöhung des pH-Wertes werden Proteine denaturiert und die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären DNA-Strängen zerstört. Nach einer Neutralisation nimmt kurze Plasmid-DNA ihre ursprüngliche doppelsträngige Form wieder an, nicht jedoch genomische DNA, die zusätzlich starken Scherungskräften ausgesetzt ist. Bruchstücke der genomischen DNA sowie denaturierte Proteine befinden sich nach einem Zentrifugationsschritt im Sediment, während Plasmid-DNA im Überstand gelöst bleibt. Der Überstand wird auf eine Silica-Membran gegeben, an welche die Plasmid-DNA bindet und von der sie nach mehrmaligen Waschschritten eluiert wird.

3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte an einem DU 730 Spektralphotometer (Beckman Coulter). Nukleinsäuren haben aufgrund der Absorption der Basen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Über die Absorption bei 260 nm wird die DNA-Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprechen 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Zusätzlich wird die Absorption bei 280 nm und 230 nm zur Überprüfung der Reinheit herangezogen. Proteine haben aufgrund der Absorption der aromatischen Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm und Phenole und Kohlenhydrate absorbieren bei 230 nm. Der Quotient der Absorptionen von 260 nm/280 nm sollte für DNA bei ungefähr 1,8 liegen und für RNA bei ungefähr 2. Der

Quotient der Absorptionen von 260 nm/230 nm sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Sind die Quotienten sehr viel geringer, kann nicht mehr von reiner DNA beziehungsweise RNA ausgegangen werden.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) kann ein bestimmter DNA-Abschnitt *in vitro* amplifiziert werden. Die PCR besteht aus einer zyklischen Abfolge bestimmter Inkubationsschritte. Zuerst findet die Denaturierung statt, bei der sich die Doppelstränge der *Template*-DNA trennen. Dann folgt das *Annealing*, das Anlagern der Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige *Template*-DNA. Während des Elongationsschritts findet die enzymatische Verlängerung der DNA statt. Dazu heftet die Polymerase komplementär zur Matrize Nukleotide an das 3'-OH-Ende der Primer an, bis wieder ein Doppelstrang vorliegt. Denaturierung, *Annealing* und Elongation werden zyklisch wiederholt, sodass die Menge an synthetisierter DNA exponentiell ansteigt (Mullis et al., 1986).

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde in einem GeneAmp® 9700 System (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Polymerase wurde die *Phusion*-Polymerase verwendet (NewEngland Biolabs). Diese verfügt über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*Proof-Reading* Funktion) und zeichnet sich durch ihre geringe Fehlerrate aus ($1:4,4 \times 10^7$). Sie ist eine rekombinante Form der ursprünglich aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* stammenden Polymerase.

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

5 µl	Phusion Puffer HF (NEB)
1 µl	Primer fw (20 µM)
1 µl	Primer rev (20 µM)
1 µl	dNTP (10 mM)
0,5 µl	Phusion Polymerase (NEB)
x µl	<i>template</i> DNA (10 ng)
ad 50 µl	Wasser bidest.

Die Elongationstemperatur richtet sich nach dem Aktivitätsoptimum der Polymerase und die Elongationszeit nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Die *Annealing*-Temperatur richtet sich nach den Schmelztemperaturen der Primer. Ein PCR-Standardprogramm ist im Folgenden wiedergegeben:

3. Methoden

Tabelle 11: PCR–Standardprogramm.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	98°C	1 min	
2. Denaturierung	98°C	10 sec	} 25 Zyklen
3. <i>Annealing</i>	56°C	10 sec	
4. Elongation	72°C	15 sec	
6. Finale Elongation	72°C	10 min	
7. Ende	4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl Wasser eluiert.

3.2.4 Restriktionsanalyse von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firmen NEB und Fermentas Thermo Fisher Scientific inkubiert. Standardmäßig wurden 2 µg Plasmid-DNA oder 2-10 µg PCR-Produkt für einen Restriktionsverdau verwendet:

x µl	Plasmid-DNA (2 µg) oder PCR-Produkt (2-10 µg)
1 µl	Restriktionsenzym
3 µl	zugehöriger Puffer (10x)
ad 30 µl	Wasser

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert oder für weitere enzymatische Anwendungen mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt und in 30 µl Wasser eluiert.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für die qualitative und semiquantitative Analyse von DNA wurde diese im 1-2% Agarose-TAE-Gel mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (6x) im Verhältnis 1:6 versetzt und für 30 min bei 90 V in Gelelektrophoresekammern aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die DNA wurde durch UV-Licht visualisiert, gewünschte Fragmente mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert und in 30 µl Wasser eluiert. Zur Größen- und Mengen-

abschätzung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Marker 1 kb DNA Ladder und 100 bp DNA Ladder (NewEngland Biolabs) verwendet.

3.2.6 Klonierung von DNA

Für die Klonierung von DNA-Konstrukten wurden standardmäßig 2 µg Plasmid-DNA und 2-10 µg PCR-Produkt nach Herstellerangaben mit spezifischen Restriktionsendonukleasen fragmentiert, auf einem präparativen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten DNA-Banden anschließend mittels Qiaquick Gel Extraction Kit isoliert. Die Ligation wurde mithilfe des DNA Rapid Dephosphorylation and Ligation Kit (Roche) mit 50 ng bis 100 ng Vektor und der dreifachen molaren Menge an *Insert* durchgeführt:

x µl	aufgereinigtes verdautes <i>Insert</i>
x µl	aufgereinigter verdauter Vektor
2 µl	Puffer 3
10 µl	Puffer 4
1 µl	Vial 5 (Ligase)
ad 20 µl	Wasser

Als Kontrolle wurde der Ligationsansatz anstatt des DNA-*Inserts* mit Wasser angesetzt. Der Ansatz wurde nach vorsichtigem Mischen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und wie unter 3.1.3 *Hitzeschock-Transformation von E.coli* beschrieben in *E.coli* des Stamms XL-10 Gold oder Stbl2 transformiert.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde jeweils Plasmid-DNA von vier Klonen isoliert (siehe 3.2.1 *Präparation und Isolierung von Plasmid-DNA*). Die Plasmid-DNA wurde anschließend mithilfe einer geeigneten Restriktionsanalyse (siehe 3.2.4 *Restriktionsanalyse von DNA*) und durch Sequenzierung (siehe 3.2.8 *Sequenzieren von DNA*) überprüft.

Im Folgenden sind die Klonierungsstrategien der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Konstrukte wiedergegeben.

3. Methoden

Tabelle 12: Klonierungsstrategien der lentiviralen Reporterkonstrukte und Vorkonstrukte.

Name des Konstrukts	Beschreibung	Klonierungsstrategie
pNLT2-HIVis-env(NL4-3)	Replikationskompetentes provirales HIVis-Reporterkonstrukt mit <i>env</i> -Sequenz aus NL4-3 Isolat	Austausch der Sequenz <i>vpr-tat-rev-vpu-env-tat-rev</i> mit Deletion im <i>env</i> -Gen gegen die Sequenz mit vollständigem <i>env</i> -Gen aus pNL4-3 über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> in pNLT2-HIVis
pNLT2-HIVis-env(BaL)	Replikationskompetentes provirales HIVis-Reporterkonstrukt mit <i>env</i> -Sequenz aus BaL Isolat	Austausch der Sequenz <i>vpr-tat-rev-vpu-env-tat-rev</i> mit Deletion im <i>env</i> -Gen gegen die Sequenz mit vollständigem <i>env</i> -Gen aus pNL_BaL(<i>env</i>) über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> in pNLT2-HIVis
pSH1-EF1 α -GFP	Lentiviraler Vektor zur Expression von GFP unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors	Ersetzung der Transgenkassette in pSH1-Tre1.0 durch EF1 α -GFP über <i>NheI</i> und <i>XmaI</i>
pcDNA-BFP-EF1 α -mKO2	Zwischenkonstrukt mit der Expressionskassette BFP-EF1 α -mKO2	Austausch der Kassette SFFV-Venus in pcDNA-BFP SFFV-Venus gegen EF1 α -mKO2 über <i>NheI</i> und <i>XhoI</i>
pNLT2-HIVis-mKO2	Modifiziertes provirales HIVis Reporterkonstrukt	Austausch der Kassette BFP-SFFV-Venus in pNLT2-HIVis gegen BFP-EF1 α -mKO2 aus pcDNA-BFP- EF1 α -mKO2 über <i>BlnI</i> und <i>XhoI</i>
pNLT2-HIVis-env(NL4-3)-mKO2	Modifiziertes replikationskompetentes provirales HIVis Reporterkonstrukt	Austausch der Sequenz <i>vpr-tat-rev-vpu-env-tat-rev</i> mit Deletion im <i>env</i> -Gen gegen die Sequenz mit vollständigem <i>env</i> -Gen aus pNL4-3 über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> in pNLT2-HIVis-mKO2

Tabelle 13: Klonierungsstrategien der modifizierten SAM-Expressionplasmide und lentiviralen Vektoren.

Name des Konstrukts	Beschreibung	Klonierungsstrategie
pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP	Austausch von GFP in MS2-p65-HSF1_GFP gegen BFP	T2A-GFP in MS2-P65-HSF1_GFP wurde gegen T2A-BFP über <i>NheI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen ausgetauscht
pLenti-gRNA-Venus	Einfügen des Fluoreszenzmarkers Venus in den lentiviralen Vektor lenti_sgRNA(MS2)_zeo backbone	EF1 α -Bleomycin in lenti_sgRNA(MS2)_zeo backbone wurde gegen SFFV-Venus-Sequenz über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen ausgetauscht
pLenti-dCas9-VP64-2A-mCherry	Austausch von GFP in dCAS9-VP64_GFP gegen mCherry	T2A-GFP in dCAS9-VP64_GFP wurde gegen T2A-mCherry über <i>NheI</i> und <i>EcoRI</i> Schnittstellen ausgetauscht

3.2.7 Klonierung von gRNA-Expressionsplasmiden

Die gRNA-Sequenzen wurden als revers komplementäre Oligonukleotide mit jeweils 4 bp 5'-Überhängen designt. Durch Hybridisierung und Klonierung über *BbsI*-Schnittstellen wurden die Oligonukleotide in den sgRNA(MS2) (SAM-System) bzw. pSuper (SunTag-System) Klonierungsvektor eingefügt.

2 μ g der Klonierungsvektoren wurden nach Standardprotokoll (siehe 3.2.4 *Restriktionsanalyse von DNA*) mit *BbsI* verdaut und mit *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) behandelt und nach einer Gelextraktion in 20 μ l H₂O aufgenommen. Die Oligonukleotide wurden in folgendem Ansatz bei 95°C für 5 min im Heizblock inkubiert, der Heizblock ausgeschaltet und die Oligonukleotide bis zu einem Abkühlen des Heizblocks auf Raumtemperatur inkubiert.

1 μ l	Primer fw (100 μ M)
1 μ l	Primer rev (100 μ M)
5 μ l	Buffer 4 (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche)
3 μ l	H ₂ O
10 μ l	

3. Methoden

Die Ligation der hybridisierten Oligonukleotide und des geschnittenen Klonierungsvektor wurde in folgendem Ansatz für 30 min bei durchgeführt und anschließend nach Standardprotokoll in *E.coli* XL10 Gold transformiert (siehe 3.1.3 *Hitzeschock-Transformation von E.coli*).

3,5 µl	geschnittener Klonierungsvektor
1 µl	hybridisierte Oligonukleotide (1:250 verdünnt in H ₂ O)
5 µl	Buffer 4 (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche)
<u>0,5 µl</u>	Ligase (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche)
10 µl	

3.2.8 Sequenzieren von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequence Laboratories (Seqlab, Göttingen) durchgeführt. Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Sequenzierungs-Labors vorbereitet und mit spezifischen Sequenzierprimern an Seqlab verschickt.

3.2.9 Gesamt-RNA Präparation aus eukaryotischen Zellen

Gesamt-RNA wurde entweder mit peqGold TriFast (Peqlab) oder RNazol (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Eine Isolierung mit RNazol erfolgte nach Herstellerangaben. Für eine Isolierung mit peqGold TriFast wurden $2-4 \times 10^6$ der gewünschten Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1ml TriFast aufgenommen, gut resuspendiert und bis zur RNA-Präparation bei -80°C gelagert. Für die Isolierung wurden die Proben aufgetaut, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Proben wurden 1 min gevortext und danach 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 8.600 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand (~500 µl) wurde in 500 µl Isopropanol überführt, gemischt und für 20 min bei 8.600 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet in 500 µl 80 % Ethanol gewaschen und für 20 min bei 8.600 x g und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss an diesen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand wiederum verworfen, das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Um die Lösung der RNA-Pellets zu verbessern, wurden die Proben danach bei -80°C eingefroren und anschließend bei 65°C für 15 min im Schüttler inkubiert.

Um eventuelle DNA Rückstände in den Proben zu entfernen, wurde eine DNase-Behandlung angeschlossen. Dafür wurden die Proben auf Eis gehalten und zu je 20 µl Probenvolumen 2,2 µl RQ1 DNase-Puffer und 1 µl RQ1 DNase (Promega) zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben bei 37°C für 30 min inkubiert.

Der DNase-Behandlung der Proben folgte ein erneuter Reinigungsschritt. Dafür wurden die Proben auf mit Wasser (RNase-frei) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol versetzt. Die Ansätze wurden gemischt und bei 20.800 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in das 2,5-fache Volumen Ethanol überführt, 3 M Natriumacetat im Verhältnis 1:10 zugegeben und bei 20.800 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µl 80 % Ethanol gewaschen und erneut bei 20.800 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet, in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Eine Isolation von RNA aus Zellkulturüberstand wurde nach Herstellerangaben mit RNeasy (Qiagen) durchgeführt.

3.2.10 cDNA Synthese

Mithilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde die Konzentration der präparierten RNA-Proben photometrisch bestimmt und ein Mastermix für die entsprechende Anzahl der Proben angesetzt.

Mastermix je Probe:

4 µl	5x M-MLV Puffer
2 µl	dNTPs (10mM)
1 µl	oligo dT Primer (100 µM)
3 µl	Wasser (RNase-frei)
0,25 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)

Folgender Ansatz wurde für die reverse Transkription in PCR-Gefäße vorgelegt:

10 µl	Mastermix
1 µg	RNA-Probe
ad 20 µl	Wasser (RNase-frei)

Die Proben wurden mit folgendem Zyklus-Programm im GeneAmp® PCR System, 9700 inkubiert und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

25 °C	10 min
42 °C	90 min
95 °C	5 min
12 °C	Hold

3.2.11 Präparation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Präparation von genomischer DNA wurden bis zu 5×10^6 Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit DNAzol (Thermo Fisher Scientific) oder mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen). Die Zellen werden mithilfe von Guanidiniumchlorid und Proteinase K aufgeschlossen, wobei zelluläre Proteine denaturiert und abgebaut werden. Dadurch wird die zelluläre DNA freigesetzt. Diese wird im Anschluss unter geeigneten pH-Bedingungen an eine Silica-Membran gebunden, oder durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert. Proteine und Salze werden durch mehrere Waschschriffe entfernt.

3.2.12 Quantitative *Realtime*-PCR

Die quantitative Analyse der Genexpression erfolgte mithilfe von TaqMan-Sonden in der *Realtime*-PCR. Die *Realtime*-PCR ermöglicht es, die DNA Kopienzahl der eingesetzten Probe zu bestimmen. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung von Fluoreszenzsignalen, die während der PCR-Zyklen in Echtzeit erfasst werden. Die Messung erfolgt über eine Hydrolyse-Sonde, die komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz ist und am 5'-Ende mit einem Molekül 6-Carboxyfluorescein (FAM, Fluoreszenzdonor) und am 3'-Ende mit einem Molekül Tetramethylrhodamin (TAMRA, Fluoreszenzakzeptor) gekoppelt ist. TAMRA ist ein Quencher, der die Fluoreszenz von FAM über einen FRET-Effekt (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Während der Elongation wird die gebundene Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut, der Donor freigesetzt und es kann ein Fluoreszenzsignal gemessen werden.

Über die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (*Threshold Cycle*, C_t -Wert) erfolgt die relative Quantifizierung. Der C_t -Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Über die Erstellung einer Standardkurve durch serielle Verdünnung eines Standardplasmids, welches die zu amplifizierende Sequenz enthält, kann von gemessenen C_t -Werten auf die DNA-Ausgangsmenge geschlossen werden.

Als Mastermix wurde der Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Life Technologies) verwendet. Die Reaktion wurde in Reaktionsplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt (MicroAmp Fast Optical 96-*well* Reaction Plate, Life Technologies). Für einen *Realtime*-PCR Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die *Realtime*-PCR.

	Tat	Gag	GAPDH	HBG
Mastermix (2x)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer fw (10 µM)	0,9 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
Primer rev (10 µM)	0,9 µl	0,9 µl	0,9 µl	0,9 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl	0,15 µl	0,15 µl	0,2 µl
dH ₂ O	1,93 µl	2,63 µl	2,63 µl	2,58 µl

Für die Kompensierung von Fluoreszenzabweichungen in den einzelnen Vertiefungen wurde zu dem Mastermix für eine Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen 2 µl ROX Reference Dye (Invitrogen) zum Gesamtansatz gegeben. Für die Erstellung der Standardkurve wurde von einem Standardplasmid in einer seriellen Verdünnung Konzentrationen von 3×10^1 bis 3×10^5 Kopien/µl hergestellt.

9 µl des Ansatzes wurden in die Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert und mit 1 µl der zu messenden Probe bzw. des Standards versetzt. Als Negativkontrolle diente dH₂O. Die Reaktionsplatte wurde mit einer adhäsiven Folie verschlossen und es folgte ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 300 x g und Raumtemperatur. Die Messung erfolgte in Quadrupeln in einem 7500 Fast Realtime PCR System mit folgendem PCR-Programm:

Tabelle 15: Zyklus-Programm für die *Realtime*-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
2. Denaturierung	95°C	15 sec	} 40 Zyklen
3. Hybridisierung und Elongation	60°C	30 sec	

Für die Auswertung wurden nur Werte verwendet, deren C_t-Wert in dem von der Standardkurve abgedeckten Bereich lagen. Es wurden die Mittelwerte der Vierfachmessungen gebildet und die gemessene Kopienzahl auf die Kopienzahl der internen Kontrolle GAPDH oder HBG normalisiert. Der Gesamtfehler wurde über Fehlerfortpflanzung der Standardabweichungen wie folgt berechnet:

$$u = \frac{\bar{\chi}(Tat \text{ bzw. } Gag)}{\bar{\chi}(GAPDH \text{ bzw. } HBG)} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma(Tat \text{ bzw. } Gag)}{\bar{\chi}(Tat \text{ bzw. } Gag)}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(GAPDH \text{ bzw. } HBG)}{\bar{\chi}(GAPDH \text{ bzw. } HBG)}\right)^2}$$

u = Gesamtfehler

$\bar{\chi}$ = Mittelwert

σ = Standardabweichung

3.2.13 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Die *Droplet Digital PCR* (ddPCR) ist eine PCR-Methode, bei der die Probe und die Komponenten der PCR-Reaktion in einer Wasser-Öl-Emulsion in eine große Anzahl räumlich getrennter Kompartimente in Form von Tröpfchen vereinzelt werden. In jedem der bis zu 20.000 Tröpfchen wird eine PCR-Amplifizierung mit TaqMan-Sonden durchlaufen und die Tröpfchen im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil PCR-positiver und -negativer Tröpfchen wird bestimmt und über eine Poisson-Verteilung die DNA-Konzentration der ursprünglichen Probe berechnet. Die Quantifizierung erfolgt absolut, eine Standardkurve wird nicht benötigt.

Für die ddPCR-Analyse wurde RNA aus Zellkulturüberstand oder aus Zellen mittels RNazol (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben isoliert. Genomische DNA wurde mittels QIAamp DNA micro Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die ddPCR-Analyse erfolgte an einer QX200 Plattform (BioRad).

Als Mastermix wurde der ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (BioRad) verwendet. Die Messungen erfolgten in Duplikaten. Ein 20 µl-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

10 µl	ddPCR Supermix (2x)
1 µl	Primer-F (20 µM)
1 µl	Primer-R (20 µM)
1 µl	Sonde (5 µM)
0,5 µl	cDNA (entspricht ungefähr 25 ng eingesetzter RNA)
ad 20 µl	Wasser (RNase-frei)

Für die Quantifizierung von HIV-*gag* wurden die gleichen Primer und Sonden wie in der *Realtime*-PCR verwendet, mit dem Quencher BHQ1 (*Black Hole Quencher* 1) statt TAMRA. Für die Normalisierung auf *gapdh*-Expression wurde der PrimePCR ddPCR Expression Probe Assay: GAPDH (Human, HEX; BioRad) verwendet. Die *gapdh*-Expression wurde in separaten Duplikaten mit einer 1:10-Verdünnung der cDNA und 1 µl des GAPDH-Expression-Assays in einem 20 µl-Ansatz bestimmt.

Für die Bestimmung von HIV-Sequenzen in genomischer DNA wurden die gleichen Gag- und Tat-Primer wie in der *Realtime*-PCR mit Quencher BHQ1 statt TAMRA sowie ein Primer-Set mit FAM-Sonde verwendet, das spezifisch im 5'LTR und der darauffolgenden Sequenz bindet (Avettand-Fènoël et al., 2009). Die Konzentration des *single-copy*-Gens *rpp30* wurde parallel im selben Ansatz bestimmt (PrimePCR ddPCR Copy Number Assay:

RPP30, HEX; BioRad). Ein 20 µl-Ansatz zur Bestimmung von *gag*- oder *tat*-Sequenzen enthielt:

10 µl	ddPCR Supermix (2x)
1 µl	Primer-F (20 µM)
1 µl	Primer-R (20 µM)
1 µl	Sonde (5 µM)
1 µl	RPP30 Copy Number Assay
5 µl	genomische DNA
ad 20 µl	Wasser (RNase-frei)

Ein 20 µl-Ansatz zur Bestimmung von 5'LTR-Sequenzen enthielt:

10 µl	ddPCR Supermix (2x)
1 µl	Primer HIV-LTR fw (8 µM)
1 µl	Primer HIV-LTR rev (8 µM)
1 µl	Sonde HIV-LTR (8 µM)
1 µl	RPP30 Copy Number Assay
5 µl	genomische DNA
ad 20 µl	Wasser (RNase-frei)

In jeder Messung wurden Kontrollen mit Wasser statt cDNA/DNA-Probe miteinbezogengeführt. Öltröpfchen wurden an einem QX200 Droplet Generator generiert und in twin.tec PCR-Platten mit 96-Vertiefungen (Eppendorf) transferiert, mit einer Aluminiumfolie verschlossen und in einem Thermozykler Biometra TAdvanced (Analytik Jena) mit 2°C/sec Temperaturerhöhung mit folgendem Programm die PCR-Amplifikation durchgeführt.

Tabelle 16: Zyklus-Programm für die ddPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
2. Denaturierung	94°C	30 sec	} 40 Zyklen
3. Hybridisierung und Elongation	55°C (56,2°C für HIV-LTR)	1 min	
4. Finale Elongation	98°C	10 min	

3. Methoden

Die Messung erfolgte am QX200 ddPCR Plate Reader (BioRad). Die Daten wurden mittels QuantaSoft 1.7.4 analysiert und Konzentrationen mithilfe von ddpcRquant in R Studio (Version 0.99 RStudio Inc.) (Trypsteen et al., 2015) berechnet.

3.2.14 Bestimmung der Integrationsstelle des HIVis-Reporters mittels HiLo-PCR

Die Bestimmung der Integrationsstelle des HIVis-Reporterkonstrukts erfolgte, wie bereits beschrieben (Hauber et al., 2013), mithilfe von HiLo-PCR (Larochelle et al., 2011). In der HiLo-PCR wird nur ein einzelner PCR-Primer verwendet, der am Anfang der Vektorsequenz im 5'LTR in Gegenstromrichtung oder am Ende der Vektorsequenz in Leserichtung bindet. Die HiLo-PCR besteht aus zwei Phasen. In der ersten Phase werden 25 Zyklen bei 65°C *Annealing*temperatur durchlaufen, wobei es zu spezifischer Primerbindung kommt. In der zweiten Phase werden 15 Zyklen mit 37°C *Annealing*temperatur durchgeführt, wobei nur unspezifische Primerbindung stattfinden kann. Aus dieser ersten HiLo-PCR wurde eine Aliquot für eine zweite *nested* HiLo-PCR verwendet, die die Ausbeute der PCR-Fragmente der Integrationsstelle erhöhen soll. Die PCR-Fragmente wurden anschließend sequenziert.

Der Reaktionsansatz der ersten und *nested* PCR (50 µl) enthielt folgende Komponenten: 25µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas), 1 pmol HiLo-Primer oder *nested* HiLo-Primer und 1 µg genomische DNA.

Tabelle 17: Zyklus-Programm für die erste HiLo-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
2. Denaturierung	94°C	1 min	} 25 Zyklen
3. Hybridisierung	65°C	1 min	
4. Elongation	72°C	3 min	
5. Denaturierung	94°C	30 sec	} 25 Zyklen
6. Hybridisierung	37°C	30 sec	
7. Elongation	72°C	2 min	
8. Finale Elongation	72°C	5 min	

Die *nested* HiLo PCR wurde mit 0,1 µl des ersten Reaktionsansatzes unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 18: Zykler-Programm für die *nested* HiLo-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
2. Denaturierung	94°C	30 sec	} 25 Zyklen
3. Hybridisierung	65°C	30 sec	
4. Elongation	72°C	3 min	
5. Denaturierung	94°C	20 sec	} 15 Zyklen
6. Hybridisierung	37°C	30 sec	
7. Elongation	72°C	2 min	
8. Finale Elongation	72°C	5 min	

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien wurden ca. 5×10^6 Zellen in 1 ml FKS versetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in einem 1,8 ml Kryokonservierungsgefäß mit Außengewinde in einer auf 4°C vorgekühlten Einfrierbox (Stratagene) schonend (-1°C/min) auf -80°C gekühlt und nach 24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen zügig durch Zugabe von auf 37°C erwärmtem Medium aufgetaut. Um das DMSO vollständig zu entfernen, wurden die Zellen rasch in 50 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Kultur genommen. Das Medium wurde nach 24 h erneut gewechselt.

3.3.2 Kultivierung adhärenter Zelllinien

HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293T Zellen und TZM-bl Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS (Biochrom), 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 5 % Natriumbicarbonat Puffer (7,5 % w/v) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden die adhärenen Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37°C vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Danach wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 10 ml Kompletmedium abgestoppt und die Zellen vom Zellkulturflaschenboden

3. Methoden

abgespült. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 bis 1:6 ausgesät.

3.3.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen (Jurkat Zellen und davon abgeleitete Zellen, JLat6.3, J89 und MOLT-4/CCR5 Zellen) wurden in RPMI 1640 Medium versetzt mit 10 % hitzeinkativiertem FKS (PAN, Biotech), 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei der Kultivierung von MOLT-4/CCR5 wurde zusätzlich 1 mg/ml G418 (Gibco Life Technologies) zugegeben. Die Kulturen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:5 verdünnt und weiterkultiviert.

3.3.4 Behandlung mit *latency-reversing agents*

Für eine Behandlung mit LRAs wurden HIVisB2 oder JLat6.3 Zellen in einer Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml ausgesät und, wenn nicht anders angegeben, mit den folgenden klinisch relevanten Konzentrationen (Laird et al., 2015) an LRAs (bezogen von Sigma-Aldrich) versetzt und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert

LRA	Konzentration
Vorinostat	335 nM
Prostratin	300 nM
PMA	50 ng/ml
Ionomycin	1 µM

3.3.5 Transiente Transfektion von Zelllinien

Für eine transiente Expression der SunTag- oder SAM-Komponenten wurde Plasmid-DNA mittels Transfektion in Zelllinien eingebracht. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5x10⁵ Zellen pro 6-well in 2,5 ml Zellkulturmedium ohne Antibiotikum 24 h vor Transfektion ausgesät. TZM-bl wurden mit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transfiziert. 12,5 µl Lipofectamine wurde zu 125 µl OptiMEM gegeben und vorsichtig gemischt. Die Plasmid-DNA wurde in einem separaten Reaktionsgefäß zu 125 µl OptiMEM gegeben, gemischt, und die Lipofectamine/OptiMEM-Mischung zu der DNA gegeben und vorsichtig gemischt. Der Transfektionsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen getropft.

JLat6.3, HIVisB2 und J89 Zellen wurden mit TransIT-Jurkat (Mirus Bio) transfiziert. Plasmid-DNA eines Ansatzes wurde zu 400 µl OptiMEM gegeben, gemischt, und 12 µl TransIT-Jurkat Reagenz langsam hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Transfizierte Zellen wurden frühestens 48 h nach Transfektion durchflusszytometrisch analysiert oder für weitere Analysen verwendet.

Für die Transfektion von JLat6.3 und J89 wurde aufgrund des in den Zelllinien enthaltenen Fluoreszenzmarkers GFP Plasmide für das SAM-System verwendet, in denen der GFP-Fluoreszenzmarker gegen BFP ausgetauscht wurde (siehe *Tabelle 13: Klonierungsstrategien der modifizierten SAM-Expressionplasmide und lentiviralen Vektoren.*). TZM-bl, JLat6.3 und J89 wurden mit gRNA-Expressionsvektoren basierend auf der HXB2-Sequenz transfiziert, HIVisB2 mit gRNA-Expressionsvektoren basierend auf der NL4-3-Sequenz.

Ein Transfektionsansatz pro *well* enthielt folgende Mengen Plasmid-DNA:

	<u>SAM-System</u>
0,9 µg	gRNA-Expressionsvektor (SAM-System)
1,3 µg	dCas9-VP64 Expressionsvektor
1,9 µg	MS2-p65-HSF1 Expressionsvektor
	<u>SunTag-System</u>
0,9 µg	gRNA-Expressionsvektor (SunTag-System)
1,2 µg	dCas9-GCN4 Expressionsvektor
1,9 µg	scFv-GCN4 Expressionsvektor

3.3.6 Transwell-Kokultivierungs-Assay

Für den Nachweis der Freisetzung infektiöser viraler Partikel nach SAM-vermittelter Aktivierung wurde ein *Transwell*-Kokultivierungs-Assay durchgeführt. J89 Zellen wurden wie in 3.3.5 *Transiente Transfektion von Zelllinien* beschrieben mit den SAM-Komponenten transfiziert und 72 h nach Transduktion GFP-positive Zellen durchflusszytometrisch an einem FACS Aria Fusion (BD Biosciences) angereichert. Die angereicherten J89 Zellen wurden mit MOLT-4/CCR5 Zellen in einem *Transwell* (Porengröße 0,4 µm) in einem Verhältnis von 1:20 kokultiviert (J89 im oberen *well*, MOLT-4/CCR5 im unteren *well*). Eine Kokultivierung von untransfizierten J89, die einem FACS-Durchlauf ohne Zellsortierung unterzogen wurden, mit MOLT-4/CCR5 diente als Kontrolle. 7 Tage nach Beginn der Kokultivierung wurde RNA aus einem Teil des Zellkulturüberstands und der Hälfte der MOLT-4/CCR5 Zellen isoliert, in

3. Methoden

cDNA umgeschrieben und mittels ddPCR die Kopien von *gag* bezogen auf eingesetzte RNA bzw. *gapdh* gemessen. Nach 12 Tagen der Kokultivierung wurde genomische DNA aus MOLT-4/CCR5 Zellen isoliert und mittels ddPCR LTR-Sequenzen und Kopien des *single-copy*-Gens *rpp30* gemessen. LTR-Sequenzen pro Zelle wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

3.3.7 Isolierung und Kultivierung primärer CD4⁺ T-Zellen

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden aus *Buffy Coats* (50 - 60 ml plasmafreies Blut aus 500 ml Vollblut) isoliert, die von der Blutbank des Universitätsklinikums Eppendorf (Institut für Transfusionsmedizin) bezogen wurden. Das Blut wird von der Blutbank auf Abwesenheit der Humanpathogene HIV, HCV und CMV getestet. 50 ml *Buffy Coat* wurden mit 50 ml PBS versetzt mit 0,05 % Liquemin (Roche) gemischt und über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurden in einem 50 ml Röhrchen 15 ml Biocoll (Biochrom) vorsichtig mit 25 ml des Blutgemisches überschichtet und für 30 min bei 400 x g und 20°C zentrifugiert, wobei die Bremsfunktion der Zentrifuge inaktiviert wird. Das Serum wurde weitgehend abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Interphase, in der sich die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) befinden, vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen mit kaltem PBS-EDTA (PBS, 1mM EDTA) überführt und bei 12°C für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets aus zwei Röhrchen vereinigt und der Waschschritt mit PBS-EDTA wiederholt. Das Zellpellet wurde anschließend in 30 ml PBS-EDTA aufgenommen und die PBMCs gezählt. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert und mit PBS-SE (PBS, 2 % FKS, 0,3 mM EDTA) auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die weitere Aufreinigung der CD4⁺ T-Zellen aus den PBMCs erfolgte am automatisierten Zellseparator RoboSep[™] (StemCell Technologies).

Dafür wurde die Zellsuspension auf 14 ml Röhrchen aufgeteilt (maximal 8,5 ml pro Röhrchen) und CD4⁺ T-Zellen mit dem RoboSep Negative Selection Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (StemCell Technologies) mittels negativer Selektion nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigten CD4⁺ T-Zellen wurden gezählt und direkt in Kultur genommen, oder mit FKS versetzt mit 10 % DMSO auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt, in 4,5 ml Kryokonservierungsgefäße überführt und eingefroren (siehe 3.3.1 *Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen*) und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kultivierung primärer CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit teils konditioniertem RPMI-Medium mit 10 % FKS (PAN, Biotech) unter Zugabe von 250 U/ml rhIL-2 bei 37°C und 5 % CO₂.

3.3.8 Herstellung lentiviraler Partikel

Lentivirale Vektorpartikel wurden mittels transienter Kotransfektion in HEK-293T Zellen hergestellt. Zur Verpackung der selbstinaktivierenden (SIN) Transfervektoren wurden die Verpackungsplasmide pMDL-gag/pol und pRSV-Rev verwendet, die für die Gene *gag-pol* sowie *rev* aus HIV-1 kodieren. Zur Pseudotypisierung diente das Plasmid pCMV-VSV-G, welches für das Hüllprotein VSV-G des Vesikular Stomatitis Virus kodiert, was eine Transduktion nahezu aller Zelltypen ermöglicht (Dull et al., 1998).

Zur Herstellung proviraler Partikel aus dem Konstrukt pNLT2-HIVis wurden keine Verpackungsplasmide verwendet, da die *gag*- und *pol*-Sequenzen im Transfervektor enthalten sind. Aufgrund einer 537 bp großen Deletion im *env*-Gen sind die von diesem Vektor produzierten Partikel replikationsinkompetent. Dieser Defekt wurde durch Kotransfektion des Plasmids pCMV-VSV-G ausgeglichen. Durch diese Vorgehensweise entstehen virale Partikel (*single round infectious particles*), die Zellen infizieren, ihre provirale DNA in die Wirtszelle integrieren und Partikel freisetzen können. Diese neugebildeten Partikel sind jedoch aufgrund des fehlenden Env Proteins nicht mehr infektiös und können keine neuen Zellen infizieren. Replikationskompetente virale Partikel wurden durch Transfektion der Vollängenkonstrukte in HEK-293T Zellen hergestellt.

Für die Herstellung der lentiviralen Partikel wurden 20 h vor der Transfektion 3×10^6 HEK-293T Zellen in 5 ml in einer 10 cm-Zellkulturschale in DMEM ohne Antibiotikazusatz ausgesät. 8-20 h nach Aussaat wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden zu 980 µl serumfreiem OptiMEM (Gibco) 6 µg des lentiviralen Transfervektors sowie für die lentiviralen Vektorpartikel jeweils 1,5 µg der Verpackungsplasmide pRSV-Rev und pCMV-VSV-G sowie 3 µg pMDL-gag/pol und für das provirale Transferkonstrukt 1,5 µg pCMV-VSV-G gegeben und gemischt. Anschließend wurden 20 µl des Transfektionsreagenz TransIT (Mirus Bio, Madison, WI, USA) zugegeben, gemischt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen getropft, die Zellen geschwenkt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen wurde der Zellkulturüberstand geerntet. Für die Ernte wurde der Überstand für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, mittels Sterilfilter (0,2 µm) steril filtriert und anschließend bei -80°C gelagert oder durch Ultrazentrifugation konzentriert (siehe 3.3.9 *Konzentration lentiviraler Vektorüberstände mittels Ultrazentrifugation*).

3. Methoden

Tabelle 19: Transfektionsansätze für die Herstellung lentiviraler Partikel.

	Replikationskompetente provirale Partikel	Replikationsdefiziente provirale Partikel	lentivirale SIN Partikel
OptiMEM	980 µl	980 µl	980 µl
Transfervektor	6 µg	6 µg	6 µg
pCMV-VSV-G		1,5 µg	1,5 µg
pRSV-Rev			1,5 µg
pMDL-gag/pol			3 µg
TransIT	20 µl	20 µl	20 µl

3.3.9 Konzentration lentiviraler Vektorüberstände mittels Ultrazentrifugation

Die in HEK-293T Zellen produzierten lentiviralen Partikel wurden mittels Ultrazentrifugation in einer Optima LE-80K Zentrifuge (Beckman Coulter) konzentriert. Dazu wurden Rotor (SW-28, Beckman Coulter) und Zentrifugenbuckets auf 4°C vorgekühlt und die Zentrifugenröhrchen mit 6 ml einer frisch zubereiteten, sterilfiltrierten Sucroslösung (20 % Sucrose in PBS) befüllt. Die Sucroslösung wurde mit 31 ml der steril filtrierten Vektorüberstände vorsichtig überschichtet und die Zentrifugengefäße exakt austariert. Bei einem Vakuum von <20 µ wurden die Vektorüberstände für 2 h bei 96.336 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, 300 µl SFEM (serumfreies Expansionsmedium, StemCell) zu dem Vektorpellet gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde vorsichtig resuspendiert, in 100 µl Aliquots in Kryokonservierungsgefäße überführt, kurz in Ethanol mit Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.10 FACS-basierte Titration lentiviraler Partikel

Die Titerbestimmung der lentiviralen Partikel erfolgte in HEK-293T Zellen. Es wurden 5×10^4 Zellen in 500 µl DMEM-Medium pro Vertiefung in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurden sie mit 20 µl, 5 µl, 2 µl und 1 µl Virussuspension behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Konzentrierte Virussuspension wurde zuvor 1:20 mit Medium verdünnt. Nach der Zugabe der Virussuspension wurden 5 µg/ml Protaminsulfat auf die Zellen gegeben und die Zellkulturplatte bei 836 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium durch frisches DMEM-Medium ohne Protaminsulfat ersetzt. Nach weiteren 72 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer hinsichtlich des Anteils

GFP-positiver Zellen (siehe 3.3.10 *FACS-basierte Titration lentiviraler Partikel*). Der Titer der lentiviralen Partikel berechnet sich über den Anteil GFP-positiver Zellen wie folgt:

$$T = \frac{N \cdot P}{V \cdot 100}$$

T: Titer in ffu/ml (*fluorescence forming units*)

N: Anzahl der ausgesäten Zellen

V: Volumen der eingesetzten Virussuspension

P: Prozentualer Anteil der GFP-positiven Zellen (nur Werte zwischen 5-25 % wurden ausgewertet)

3.3.11 Herstellung stabil transduzierter Zelllinien

Stabile Jurkat Zelllinien wurden durch Transduktion mit lentiviralen Partikeln hergestellt. Die Zellen wurden ausgezählt und $1,3 \times 10^6$ Zellen in 500 µl Medium in einem 24-well

angesät und Virussuspension hinzugegeben, sodass eine *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 bis 1 erreicht wurde. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml Protaminsulfat versetzt und bei 625 x g für 10 min bei Raumtemperatur spinokuliert. Anschließend wurden die Zellen für 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die transduzierten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl RPMI aufgenommen und in Kultur genommen. 48 h nach Transduktion konnten die Proben durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.3.12 Einzelzellklonierung stabil transduzierter Zelllinien

Für die Einzelzellklonierung von Jurkat-HIVis Zellen wurden Venus-positive Zellen einer Jurkat-HIVis Zellpopulation durchflusszytometrisch sortiert und in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen mit Rundboden abgelegt. Es wurden 200 µl RPMI mit 20% FKS (PAN, Biotech) vorgelegt. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nach 2 Wochen sichtbare Zellklone in ein nächstgrößeres Zellkulturgefäß überführt und expandiert. Nach einer weiteren Woche der Expansion wurden die Zellklone durchflusszytometrisch analysiert und gegebenenfalls eine zweite Einzelzellablage angeschlossen.

3.3.13 Transduktion primärer CD4+ T-Zellen

Für die Transduktion primärer CD4+ T-Zellen wurden die Zellen entweder frisch isoliert oder kryokonservierte Zellen aufgetaut. Zum Auftauen wurden Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, anschließend umgehend zweimal mit IMDM gewaschen (Zentrifugation bei den

3. Methoden

einzelnen Waschschritten jeweils für 5 min bei 300 x g). Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI (1% FKS) aufgenommen und in einer 48-*well* oder 24-*well* Zellkulturtestplatte ausgesät. Um eine Verbesserung der Transduktionseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen über Nacht mit anti-CD3/CD28-*Beads* (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, Gibco) stimuliert. Die *Bead*-Suspension wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und in einer Konzentration von 1 *Bead*/Zelle auf die CD4⁺ T-Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

20 h nach dem Inkulturnehmen der Zellen und der Zugabe der *Beads* wurde der Überstand der Zellen vorsichtig abgenommen und 5 min bei 300 x g zentrifugiert, um Zellen im Überstand nicht zu verwerfen. Zu den Zellpellets wurde anschließend die gewünschte Menge Virusüberstand und RPMI (1 % FKS) gegeben, um eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml zu erreichen, und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml Protaminsulfat versetzt, für 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend bei 1200 x g für 45 min bei Raumtemperatur spininokuliert und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach der Inkubation wurden die transduzierten T-Zellen vorsichtig resuspendiert, in ein FACS-Gefäß überführt und dieses für eine Minute im EasySep Magneten (StemCell Technologies) inkubiert. Auf diese Weise wurden die CD3/CD28-*Beads* abgetrennt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation bei den einzelnen Waschschritten jeweils für 5 min bei 300 x g) und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI (10 % FKS) versetzt mit 100 U/ml rhIL-2 (CellGenix) in Kultur genommen.

3.3.14 Transduktion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen und Behandlung mit CCL19

Ruhende CD4⁺ T-Zellen (zusätzlich negativ für HLA-DR und CD69) wurden mithilfe eines kundenspezifisch modifizierten EasySep Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kits (StemCell Technologies) aus PBMCs analog zu 3.3.7 *Isolierung und Kultivierung primärer CD4⁺ T-Zellen* isoliert. Ruhende CD4⁺ T-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI (10 % FKS) in Kultur genommen und mit 100 nM CCL19 (R&D Systems) versetzt. CCL19 wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Einmal aufgetaute CCL19-Aliquots wurden nicht wieder verwendet. Der Effekt von CCL19 auf das Aktinzytoskelett wurde 1 h nach Zugabe mikroskopisch überprüft. Eine deutliche Polarisation der behandelten Zellen sollte sichtbar sein. Ruhende CD4⁺ T-Zellen wurden für 72 h inkubiert. Anschließend folgte eine Zugabe der gewünschten Menge Virusüberstand und 5 µg/ml Protaminsulfat und eine Spinokulation für 2 h wie unter 3.3.13 *Transduktion primärer CD4⁺ T-Zellen* beschrieben. Unbehandelte ruhende CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen stimuliert mit CD3/CD28-*Beads* dienten als

Kontrolle. Über eine Antikörperfärbung der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 und durchflusszytometrische Analyse (siehe 3.3.15.1 *Antikörperfärbung von primären T-Zellen für die FACS-Analyse*) wurde der ruhende Charakter der ruhenden CD4⁺ T-Zellen bestätigt.

3.3.15 Durchflusszytometrische Analysen

Mithilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Parameter einer Zelle erfasst werden, darunter die Zellgröße und Granularität. Die Zellen passieren vereinzelt einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge. Das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von verschiedenen Detektoren ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht („*forward light scatter*“, FSC) dient als Maß für die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht („*sideward light scatter*“, SSC) als Maß für die intrazelluläre Granularität. Durch Färbung mit Antikörpern gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen können Zellen, die bestimmte Oberflächenproteine exprimieren, markiert und sichtbar gemacht werden. Auch die Markierung intrazellulärer Antigene oder die Anfärbung von DNA mittels interkalierender Farbstoffe ist möglich. Die Fluoreszenz in der Zelle exprimierter fluoreszierender Proteine kann nach Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge direkt gemessen werden. Durch den Einsatz mehrerer Laser verschiedener Wellenlänge und Filtern zur Detektion können mehrere Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 100 µl Zellsuspension in ein FACS-Gefäß gegeben und mit 3 ml FACS-Puffer versetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und nach Herstellerangaben im FACS Canto II oder FACS Fortessa (BD Biosciences) analysiert.

Zellen infiziert mit replikationskompetenten viralen Partikeln und J89 Zellen wurden für 20 min mit 200 µl 2% PFA in PBS fixiert, anschließend in PBS gewaschen, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.15.1 Antikörperfärbung von primären T-Zellen für die FACS-Analyse

Für eine Antikörperfärbung von Oberflächenproteinen wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und für 3 min bei 300 x g zentrifugiert, in 100 µl PBS aufgenommen, resuspendiert, der gewünschte Antikörper zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal PBS gewaschen, für 3 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer

3. Methoden

aufgenommen und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zellen infiziert mit replikationskompetenten lentiviralen Partikeln wurden für 20 min mit 200 µl 2% PFA in PBS fixiert, anschließend in PBS gewaschen, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 20: Verwendete monoklonale fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Antikörper	Markierung	Klon	Eingesetzte Menge	Herkunft
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD25	PE-Dazzle 594	Klon M-A251	1,5 µl	BioLegend (San Diego CA, USA)
PE/Cy7 anti-human CD69	PE-Cy7	Klon FN50	1 µl	BioLegend (San Diego CA, USA)
anti-HIV core antigen KC57-RD1	RD1	KC57	2 µl	Beckman Coulter (Brea CA, USA)

3.3.15.2 Intrazelluläre p24-Färbung

Für eine intrazelluläre p24^{Gag}-Färbung wurden 1x10⁶ Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA in PBS für 20 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit Perm/Wash Puffer (BD Biosciences) gewaschen und für 30 min im Dunkeln bei 4°C in 250 µl Fixation/Permeabilization Lösung (BD Biosciences) inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit Perm/Wash Puffer gewaschen und mit 2 µl anti-HIV core antigen clone KC57-RD1 Antikörper (Beckman Coulter) in 50 µl Perm/Wash Puffer für 60 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit Perm/Wash Puffer gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.15.3 Propidiumiodid-Färbung

Für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils toter Zellen wurde eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator der die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen kann. Nach Interkalieren in die DNA verschiebt sich das Absorptions- und Emissionsmaximum von Propidiumiodid. Zellen wurden für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet und kurz vor dem Messen mit 10 µl Propidiumiodidlösung (50 µg/ml) versetzt, gevortext und anschließend die Zellsuspension durchflusszytometrisch analysiert.

Alternativ wurde eine Lebend/Tot-Diskrimination mittels Färbung mithilfe des LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.15.4 Zellsortierung transduzierter Zellen

Die Isolierung und Zellsortierung transduzierter Zellen wurde von der Technologieplattform des Heinrich-Pette-Instituts an einem FACS Aria oder FACS Aria Fusion Cell Sorter (BD Biosciences) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen geerntet, 5 min bei 300 x g zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Konzentration von 1 bis 3×10^7 Zellen/ml in FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

3.3.16 AlamarBlue Viabilitätsassay

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der AlamarBlue-Viabilitätsassay durchgeführt. Durch Farbumschlag bei der Reduktion des Farbindikators Resazurin zu Resorufin stellt dieser Assay ein Maß für die metabolische Aktivität der Zelle dar. Zur Messung wurden je 100 µl Zellsuspension mit 20 µl AlamarBlue Lösung (AbD Serotec) versetzt und nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ die Extinktion in einem Platten-Spektralphotometer (Versamax, Molecular Devices) bei 570/600 nm bestimmt. Die Bestimmung der Zellviabilität der einzelnen Proben erfolgte jeweils in Triplikaten und wurde auf unbehandelte Zellen bezogen.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 HIV p24 Gag Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem p24 Antigen ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*) wurde quantitativ die Menge an HIV-1 p24-Kapsidprotein im Zellkulturüberstand und damit die Viruspartikelproduktion bestimmt. Es wurde ein Antigen-ELISA durchgeführt, bei dem das nachzuweisende Antigen über einen *Coating*-Antikörper immobilisiert wird und mithilfe eines Detektionsantikörpers und eines Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRPO) -gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen wird. Für den p24-ELISA wurde zum gewünschten Zeitpunkt 600 µl Überstand aus infizierten Zellkulturen entnommen, bei 9.500 x g für 3 min zentrifugiert und 450 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Triton-x inaktiviert.

Der murine, gegen das p24 Kapsidprotein gerichtete spezifische *Coating*-Antikörper α-HIV-1 p24 (183-H12-5C) wurde in einer Konzentration von 2 µg/Vertiefung in 100 µl PBS in einer 96-well MaxiSorp Mikrotiterplatte (Nunc) über Nacht in einer feuchten Kammer immobilisiert. Anschließend wurde die Platte für 2 h mit 100 µl Block-Puffer (PBS + 10 % NKS) pro well bei 37°C geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern.

3. Methoden

Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween-20) gewaschen und 100 µl der inaktivierten Zellkulturüberstände in geeigneten Verdünnungen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe definierter rekombinanter p24 Kapsidmengen in Duplikaten. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen und anschließend mit dem polyklonalen Detektionsantikörper α -HIV-1 p24 aus Kaninchen (1:1.000 verdünnt in Waschpuffer) für 1 h bei 37°C inkubiert, dreimal gewaschen und mit dem HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper α -Kaninchen-IgG-HRPO (1:2.000 verdünnt in Waschpuffer) in einem Volumen von 100 µl in Block-Puffer pro *well* ebenfalls für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer und einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit 100 µl ELISA-Entwicklungspuffer (0,1 M NaAc pH 6,0, TMB [10 mg/ml in DMSO] 1:100 [v/v], 30% H₂O₂ 1:5000) für 5 min entwickelt. Nach Oxidation des im Entwicklungspuffer enthaltenen Tetramethylbenzidins (TMB) durch die Peroxidase erscheint dieses blau mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm. Die Reaktion wurde mit 50 µl 0,5 M H₂SO₄ pro *well* gestoppt, wodurch ein Farbumschlag nach Gelb erfolgt, mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm. Die Extinktionsdifferenz von 560 - 450 nm wurde im VersaMax Platten-Spektralphotometer (Molecular Devices) gemessen und die p24-Konzentration über die gemessenen Extinktionswerte der Standardverdünnungen mithilfe einer Kalibriergeraden ermittelt.

3.4.2 Luciferase-Assay

Die Messung der Luciferase-Aktivität in TZM-bl Zellen erfolgte mithilfe des Luciferase Assay Systems (Promega) nach Herstellerangaben. TZM-bl Zellen aus einem 6-*well* (5x10⁵ Zellen) wurden 48 h nach Transfektion mit 0,5 ml 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst, in PBS gewaschen und in 400 µl Cell Culture Lysis Reagent (Promega) aufgenommen und für 20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zelllysate wurden bei 180.000 x g zentrifugiert und 250 µl des Überstandes in frische Reaktionsgefäße überführt. 10 µl der Lysate wurden in Triplikaten in weiße Microlite Mikrotiter-Streifenplatten (Thermo Fisher Scientific) pipettiert und die Lumineszenz-Messung unter Zugabe des Luciferase Assay Substrats an einem Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technologies) durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen.

3.5 Bioinformatische Analysen

Bioinformatische Analysen zur Sequenzkonserviertheit basierten auf der Los Alamos National Laboratory HIV Sequenzdatenbank (www.hiv.lanl.gov). Aus der Datenbank wurden

die Sequenzen herausgefiltert, welche die genomische Region von Nukleotidposition 241 bis 348 der HXB2-Annotation enthielten. Von den erhaltenen 3033 Sequenzen wurde jeweils der Hamming-Abstand zur gRNA3 -4 -5 und -6-Sequenz und die exakte Position der Abweichungen bestimmt. Sequenzen mit einem bestimmten Hamming-Abstand wurden gezählt. Für einen Hamming-Abstand d_H und eine gRNA-Sequenz s_{gRNA} mit einer Länge l_{gRNA} wurde jede Sequenz s_{db} der HIV-Datenbank in k-mere der Länge $k = l_{gRNA}$ aufgeteilt, resultierend in $n = l_{db} - l_{gRNA} + 1$ k-meren. Hatte ein k-mer einen Hamming-Abstand d_H zwischen k-mer und s_{gRNA} , wurde der Sequenz-Zählerstand um 1 erhöht. Für jedes der n k-mere mit einem Hammingabstand d_H zwischen k-mer und s_{gRNA} wurde zudem die exakte Position der Abweichung bestimmt. Aus allen k-meren der HIV-Datenbank mit einem Hamming-Abstand d_H von k-mer bis s_{gRNA} wurde ein *multiple sequence alignment* (MSA) mit Clustal Omega generiert (Sievers et al., 2011). Das MSA wurde zur Generierung von *sequence logos* mithilfe von Weblogo 2.8.2 verwendet (Crooks, Hon, Chandonia, & Brenner, 2004).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von HIV-1 Latenzmodellen: Das HIVis-Reportersystem

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein HIV-1 Latenzmodell etabliert werden, welches es ermöglicht, latent infizierte von produktiv HIV-infizierten Zellen zu unterscheiden und zu studieren. Hierzu wurde ein provirales Reporterkonstrukt verwendet, welches bereits früher konstruiert wurde (Bialek, 2013).

Das Reportersystem basiert auf der unabhängigen Expression zweier Fluoreszenzproteine. Das Gen des gelb-fluoreszierenden Proteins (*venus*) wird dabei konstitutiv unter der Kontrolle des *Spleen Focus-Forming Virus* (SFFV)-Promotors exprimiert. Somit sind alle Zellen, die das Reporterkonstrukt enthalten, positiv für das Venus-Protein. Das Gen des blau-fluoreszierenden Proteins (*bfp*) hingegen wird von dem HIV-spezifischen Promotor in der LTR-Region kontrolliert.

In produktiv infizierten Zellen wird demnach gleichzeitig Venus und BFP exprimiert. In latenten Zellen ist der HI-virale Promotor inaktiv und es wird nur Venus, nicht aber BFP exprimiert. Nicht-infizierte Zellen exprimieren weder BFP noch Venus. Das Reportersystem ermöglicht es somit, latent infizierte Zellen von produktiv und nicht-infizierten Zellen durchflusszytometrisch zu unterscheiden. Es wurde deshalb HIVis benannt, was für „HIV visible“ steht.

Das virale Reporterkonstrukt ist replikationsinkompetent und basiert auf der Sequenz des HIV-1 Isolates NL4-3 (Adachi et al., 1986). Es enthält eine 537 bp-Deletion im HIV-1 *env*-Gen. Der HIV-1 *nef* open reading frame (ORF) ist größtenteils ersetzt durch den ORF für blau-fluoreszierendes Protein BFP sowie den ORF für das gelb-fluoreszierende Protein Venus, das unter Kontrolle des konstitutiven SFFV-Promotors steht.

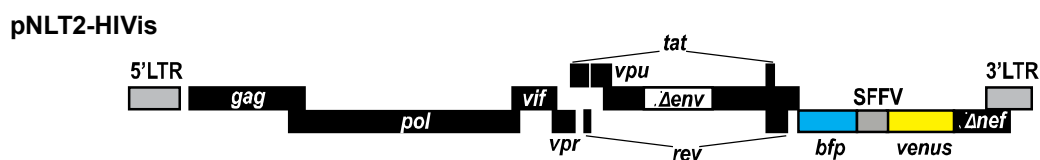


Abbildung 5: Schematische Darstellung des proviralen Reporterkonstrukts pNLT2-HIVis. Das Konstrukt basiert auf der Sequenz des HIV-1 Isolates NL4-3 und enthält eine 537 bp große Deletion im *env*-Gen. Der *nef*-ORF ist teilweise ersetzt durch die Kassette *bfp*-SFFV-Promotor-*venus*.

Mittels transienter Transfektion wurden von dem Latenzkonstrukt virale Partikel in HEK-293T Zellen hergestellt und mit dem Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisiert. Es wurden Titer von 7×10^6 ffu/ml bis 5×10^8 ffu/ml erreicht.

Für die Herstellung latent infizierter Reporterzellen wurden Jurkat T-Zellen mit lentiviralen Partikeln des Konstrukts pNLT2-HIVis transduziert. Über das Expressionsmuster der beiden Reporter BFP und Venus lassen sich durchflusszytometrisch nicht-infizierte, latent HIV infizierte und produktiv infizierte Zellen unterscheiden. Nicht-infizierte Zellen sind BFP- und Venus-negativ (I), latent infizierte Zellen nur Venus-positiv (II) und produktiv infizierte Zellen doppelt positiv für BFP und Venus (III).

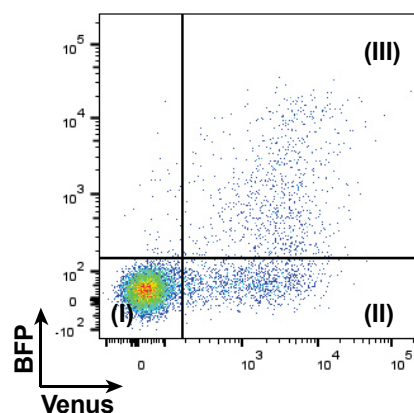


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse von Jurkat T-Zellen transduziert mit lentiviralen Partikeln des Reporterkonstrukts pNLT2-HIVis. Über das Expressionsmuster der Fluoreszenzreporter BFP und Venus ist es möglich, zwischen (I) nicht-infizierten, (II) latent infizierten und (III) produktiv infizierten Zellen zu unterscheiden.

4.1.1 Generierung und Charakterisierung latent infizierter HIVis-Einzelzellklone

Um stabil transduzierte HIVis-Reporterzelllinien zu erhalten, wurde von den mit lentiviralen Partikeln des Konstrukts pNLT2-HIVis transduzierten Jurkat Zellen eine Einzelzellklonierung (siehe 3.3.12 Einzelzellklonierung) im 96-well-Format durchgeführt. Drei bis vier Wochen nach Einzelzellablage wurden die 14 generierten Klone durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Venus-Expression analysiert (**Tabelle 21**). Von den generierten Zellklonen zeigte ein Klon, der Klon C, keine Venus-Expression und wurde verworfen. Die anderen 13 Zellklone ließen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe (Klon A, E, F, H, I, J und M) zeigte einen Anteil von gemittelt 35% (16,5% bis 55,6%) Venus-positiver Zellen mit einer mittleren relativen Fluoreszenzintensität von 625. Die zweite Gruppe (Klon B, D, G, K, L, N) zeigte eine deutlich höhere mittlere relative Fluoreszenzintensität von 4607 und einen deutlich höheren Anteil Venus-positiver Zellen von 93% (80,8% bis 99,5%). Zwei der Klone, Klon K

4. Ergebnisse

und N, hatten eine geringe Viabilität und wurden nicht weiter kultiviert. Von den übrigen Klonen wurden 6 Klone für eine zweite Einzelzellklonierung ausgewählt, 4 Klone aus der Gruppe hoher Venus-Expression und 2 Klone aus der Gruppe mittlerer Venus-Expression (**Tabelle 22**). Vier Wochen nach dieser zweiten Einzelzellablage wurden die Subklone erneut hinsichtlich der Venus-Expression untersucht. Dabei zeigten die Subklone einen geringeren Anteil Venus-positiver Zellen mit geringerer mittlerer relativer Intensität der Venus-Expression als die parental Klone. Eine Ausnahme bildete hierbei Klon G, dessen Subklone G1 bis G8 eine gleichbleibend hohe Venus-Expression aufwiesen. Um die Induzierbarkeit der BFP-Expression zu untersuchen, wurden die Subklone für 24 h mit den mitogenen Stimulanzen Phytohämagglutinin (PHA) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt. Nur die Subklone der Klone A, B und F zeigten einen Anteil BFP-positiver Zellen nach dieser Aktivierung. Die Subklone der Klone D, G und L zeigten hingegen keine BFP-Expression. Von den BFP-induzierbaren Klonen zeigten nur die Subklone B1 bis B4 eine hohe Venus-Expression.

Tabelle 21: 1. Einzelzellklonierung von HIVis-Klonen. Jurkat-HIVis Einzelzellklone wurden 3-4 Wochen nach der Einzelzellablage durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der Anteil lebender Zellen, Venus-positiver Zellen und die mittlere relative Fluoreszenzintensität. Unbehandelte Jurkat Zellen dienten als Kontrolle. Die Klone zeigten keine, eine mittlere (hellgelb markiert) bis hohe (gelb markiert) Venus-Expression und -Intensität. Klone mit geringer Viabilität wurden verworfen (rot markiert). Von ausgewählten Klonen wurde eine zweite Einzelzellablage durchgeführt (grün markiert).

1. Einzelzellklonierung			
Klon	[%] lebende Zellen	[%] Venus-positive Zellen	Mittlere relative Fluoreszenzintensität Venus
A	88,6	35,8	583
B	74,1	91,3	5101
C	88,7	0,3	313
D	76,3	89,2	2785
E	71,4	16,5	437
F	81,2	30,6	635
G	70,3	99,5	11745
H	75,4	23,6	436
I	68,9	29,0	622
J	77,2	55,6	632
K	5,7	80,8	1505
L	72,5	97,9	1762
M	79,5	54,2	1032
N	21,6	97,4	4746
Jurkat	89,8	0,3	265

Tabelle 22: 2. Einzelzellklonierung von HIVis-Klonen. Von ausgewählten Klonen wurde eine zweite Einzelzellablage durchgeführt. Gezeigt ist der Anteil lebender Zellen, Venus- und BFP-positiver Zellen und die mittlere relative Fluoreszenzintensität von Venus und BFP. Die Klone zeigten eine mittlere (hellgelb markiert) bis hohe (gelb markiert) Venus-Expression und -Intensität. Die erhaltenen Klone wurden nach 4 Wochen mit 1 µg/ml PHA-P und 150 ng/ml PMA stimuliert und nach 24 h durchflusszytometrisch analysiert. BFP-induzierbare Klone sind blau markiert.

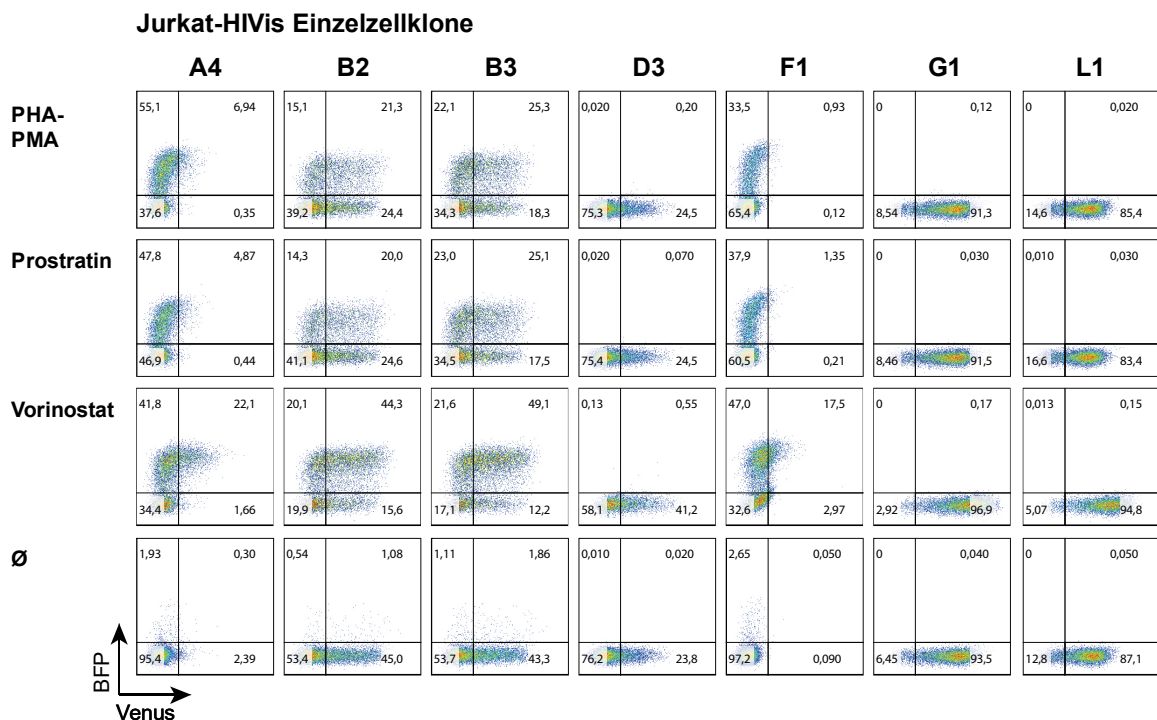
2. Einzelzellklonierung				Stimulation PHA-PMA			
Klon	[%] lebende Zellen	[%] Venus- positive Zellen	Mittlere relative Fluoreszenz- intensität Venus	[%] lebende Zellen	[%] BFP- positive Zellen	Mittlere relative Fluoreszenz- intensität BFP	Zusammenfassung
A1	74,6	11,0	425	59,7	73,9	1291	gering Venus- positiv, BFP aktivierbar
A2	61,6	1,0	291	53,8	72,0	1324	
A3	61,6	0,7	265	28,8	65,2	1099	
A4	81,9	15,9	428	74,1	75,4	1276	
A5	73,7	3,1	358	62,4	73,6	1523	
A6	82,1	15,1	437	10,4	83,0	1605	
B1	86,4	60,3	1165	26,9	54,4	956	60%-77% Venus- positiv, BFP aktivierbar,
B2	50,1	77,0	2569	81,1	47,2	627	
B3	51,1	75,8	1915	33,4	71,6	1306	
B4	83,2	68,8	1678	46,0	62,5	1152	
D1	58,3	70,7	1188	65,3	0,0	155	66%-70% Venus- positiv, BFP nicht aktivierbar
D2	53,5	62,7	1044	57,5	0,0	175	
D3	45,7	66,4	1374	37,7	0,4	181	
D4	56,0	8,1	503	43,1	0,2	159	kaum Venus- positiv, BFP nicht aktivierbar
D5	90,8	6,9	486	54,3	0,1	182	
F1	48,5	1,0	314	45,6	53,2	1550	wie A
G1	59,7	97,8	5646	68,2	0,1	235	ausschließlich Venus-positiv, BFP nicht aktivierbar
G2	78,5	99,4	7254	72,1	0,0	164	
G3	55,0	99,8	8513	76,2	0,0	247	
G4	57,6	99,6	11930	69,6	0,1	195	
G5	32,9	99,5	7045	70,1	0,1	180	
G6	60,5	99,5	7330	66,9	0,0	181	
G7	85,8	98,2	5990	64,8	0,0	186	
G8	70,2	99,7	7452	61,5	0,0	175	
L1	70,4	86,2	1420	59,2	0,1	170	86%-92% Venus- positiv, BFP nicht aktivierbar
L2	85,0	92,3	1752	48,3	0,3	166	

Um die HIVis-Klone weiter zu charakterisieren, wurden ausgewählte Subklone mit den *latency-reversing agents* (LRAs) Prostratin und Vorinostat sowie PMA und PHA stimuliert. Prostratin aktiviert die Transkription, indem es an dem NF-κB-Signalweg angreift und die Proteinkinase C aktiviert (Kulkosky et al., 2001). Vorinostat ist ein Histondeacetylase-Inhibitor (HDACi) und führt zu einer offenen Chromatinstruktur, welche die Transkription begünstigt (Archin et al., 2009). Weiterhin wurde von den ausgewählten Klonen genomische DNA isoliert und Fragmente des proviralen Genoms mittels PCR amplifiziert und sequenziert, um die Intaktheit des proviralen Genoms zu überprüfen.

4. Ergebnisse

Die HIVis-Klone wurden für 24 h mit PMA-PHA, Vorinostat oder Prostratin behandelt und die Venus- und BFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (**Abbildung 7A**). Die Klone D3, G1 und L1 zeigten weder nach Behandlung mit PHA-PMA noch mit Vorinostat oder Prostratin eine BFP-Expression. In den Klonen A4, B2, B3 und F1 hingegen ließ sich die BFP-Expression aktivieren. Eine Behandlung mit Vorinostat führte dabei zu der höchsten Rate BFP-positiver Zellen (64% bis 71%), gefolgt von Prostratin (34% bis 48%) und PMA-PHA (34% bis 47% BFP-positive Zellen). Dabei zeigten die Klone A4 und F1, wie schon zuvor beobachtet, im unbehandelten Zustand eine geringe Venus-Expression. Nach PHA-PMA-Behandlung stieg der Anteil Venus-positiver Zellen von 2,7% auf 10% (A4), bzw. von 0,1% auf 1,1% (F1) an. Die Vorinostat-Behandlung führte zu einem leicht höheren Anteil von 23,8% (A4) bzw. 20,5% Venus-positiven Zellen.

A



B



Abbildung 7: Analyse ausgewählter Jurkat-HIVis Einzelzellklone hinsichtlich Venus-Expression und Aktivierbarkeit der BFP-Expression sowie genomischer Integrität. **(A)** Jurkat-HIVis Einzelzellklone wurden für 24 h mit 5 μ M Vorinostat, 5 μ M Prostratin oder 1 μ g/ml PHA plus 10 μ M PMA stimuliert. Der Anteil Venus- und BFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Aktivierung durchflusszytometrisch gemessen. **(B)** Genomische DNA von HIVis-Klonen wurde isoliert und der LTR sowie die Kassette BFP-SFFV-Venus mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden sequenziert. Intakte

Sequenzen sind durch grüne Haken markiert. Nicht intakte Sequenzen oder nicht funktionierende PCRs sind durch rote Kreuze markiert.

Um die genomische Intaktheit des proviralen Konstrukts zu überprüfen, wurde der LTR-Promotor sowie die Kassette *bfp*-SFFV-*venus* der HIVis-Klone PCR-amplifiziert und sequenziert (**Abbildung 7B**). Der 5'LTR wurde mit einem Oligonukleotid-Primerpaar, das am Beginn des proviralen Genoms im 5'LTR sowie mittig im *gag*-Gen bindet, amplifiziert. Es ist auffallend, dass bei den Klonen D3 und G1, die nach Stimulation keine BFP-Expression zeigten, auch die PCR des LTRs auf genomischer DNA nicht funktionierte. Ob dies durch eine defekte LTR-Sequenz bedingt ist, oder durch Rekombinationsprozesse nur ein Teil des proviralen Reporterkonstrukts fehlerhaft integriert wurde, ist unklar. Bei Klon A4, B2, B3 und F1, die jeweils auch nach Stimulation eine BFP-Expression zeigten, war die Sequenz des 5'LTR korrekt. Das Fragment *bfp*-SFFV-*venus* ließ sich in allen Klonen mit einem Primerpaar, das am Anfang der *venus*-Sequenz und am Ende der *bfp*-Sequenz bindet, amplifizieren. Die Sequenzierung ergab jedoch, dass in 6 der 7 Klone die Kassette *bfp*-SFFV-*venus* defekt ist. Bei Klon A4, B3, D3, F1 und G1 deuteten die Sequenzierungsergebnisse darauf hin, dass eine Rekombination innerhalb der Reporterkassette zwischen *bfp* und *venus* stattgefunden hatte. Bei Klon L1 ist zwar die Anordnung der *bfp*-SFFV-*venus* Kassette korrekt, jedoch sind im *venus*-Gen und im *bfp*-Gen 8 bzw. 7 Mutationen vorhanden, die größtenteils zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten.

Von den analysierten Einzelzellklonen schien einzig der Klon B2 eine intakte 5'LTR-Sequenz sowie eine intakte Reportergen-kassette zu besitzen. Der Klon HIVisB2 zeigte eine stabile Venus-Expression mit hoher mittlerer Intensität und keine BFP-Expression im unbehandelten Zustand. Die BFP-Expression ließ sich durch Behandlung mit PMA-PHA und Prostratin auf 34-36% und durch Vorinostat auf ca. 64% anregen.

4.1.2 Charakterisierung der latent infizierten Reporterzelllinie HIVisB2

Aus der Generierung von HIVis-Einzelzellklonen ergaben sich insgesamt 14 Klone. Von 6 Klonen wurden Subklone generiert und detaillierter analysiert. Von diesen Klonen wies nur der Klon B2 eine eindeutige Induktion der BFP-Expression nach Stimulation mit verschiedenen LRAs und intakte provirale Sequenzen auf. Der Klon HIVisB2 wurde im Folgenden genauer hinsichtlich der Expression der Fluoreszenzmarker, der Anzahl der Integrate, der proviralen Integrationsstelle, und der Aktivierbarkeit durch verschiedene LRAs charakterisiert.

4.1.2.1 Quantifizierung der proviralen Integrate und Bestimmung der Integrationsstelle

Zuerst sollte bestimmt werden, wie viele Integrationen des proviralen Reporterkonstrukts im Jurkat Klon HIVisB2 stattgefunden hatten. Die Jurkat-HIVis Zellen wurden ursprünglich mit einer MOI von 0,1 transduziert, was vermuten lässt, dass die Venus-positiven Zellen auch nur ein Integrat des proviralen Reporterkonstrukts tragen. Um dies zu überprüfen, wurden mittels *Droplet Digital PCR* (ddPCR) die Kopienzahlen von HIV-*tat* und *gag* auf genomischer DNA des Klons HIVisB2 bestimmt. Die Werte wurden auf das singuläre Referenzgen *RPP30* (*ribonuclease P/MRP 30k Da subunit*) bezogen. Es zeigte sich, dass der Klon HIVisB2 0,99 Kopien *gag* bzw. 0,93 Kopien *tat* pro Genom enthält (**Abbildung 8**). Dies legt nahe, dass nur eine einzige Integration des proviralen Reporterkonstrukts stattgefunden hat.

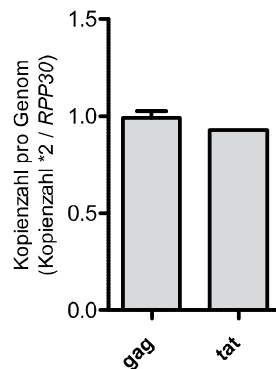


Abbildung 8: Bestimmung der Kopienzahl von HIV-*gag* und *tat* in Jurkat HIVisB2 Zellen. Von Jurkat HIVisB2 Zellen wurde genomische DNA isoliert und die Kopienzahl von HIV-*gag* und -*tat* mittels ddPCR bestimmt und auf das Referenzgen *RPP30* bezogen. Die Messung erfolgte mit zwei technischen Replikaten. Gezeigt sind die Werte von einem (*tat*) bzw. zwei unabhängigen Experimenten (*gag*).

Die Integrationsstelle des proviralen Reporterkonstrukts wurde mithilfe von HiLo-PCR (Larochelle et al., 2011) von Dr. Rolf Stucka (Friedrich-Baur-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München) bestimmt. In der HiLo-PCR wird nur ein einzelner PCR-Primer verwendet, der am Anfang der Vektorsequenz im 5'LTR in Gegenstromrichtung bindet. Die HiLo-PCR besteht aus zwei Phasen. In der ersten Phase werden 25 Zyklen bei 65°C *Annealing*temperatur durchlaufen, wobei es zu spezifischer Primerbindung kommt. In der zweiten Phase werden 15 Zyklen mit 37°C *Annealing*temperatur durchgeführt, wobei nur unspezifische Primerbindung stattfinden kann. Aus dieser ersten HiLo-PCR wurde eine Aliquot für eine zweite *nested* HiLo-PCR verwendet, die die Ausbeute der PCR-Fragmente der Integrationsstelle erhöhen soll. Die PCR-Fragmente wurden anschließend sequenziert.

Es konnte nur eine einzige Integrationsstelle gefunden werden. Die Integration erfolgte im 6. Intron des *NUP188*-Gens auf Chromosom 9, R-Bande q34.11 (**Abbildung 9A**) in positiver Leserichtung. Das Gen *NUP188* (Gene ID 23551) kodiert für das Nucleoporin 188 kDa Protein, welches Teil des Kernporenkomplexes (*Nuclear Pore Complex*, NPC) ist. Eine Datenbankanalyse (UCSC Genome Browser) der Region zeigte, dass die Region sehr genreich ist und in allen der untersuchten Zelllinien durch offenes Chromatin und aktive Transkription charakterisiert ist (**Abbildung 9B**). Eine Integration von HIV in der Nähe des *NUP188*-Gens wurde bereits in mehreren früher publizierten Studien beschrieben (Marini et al., 2015).

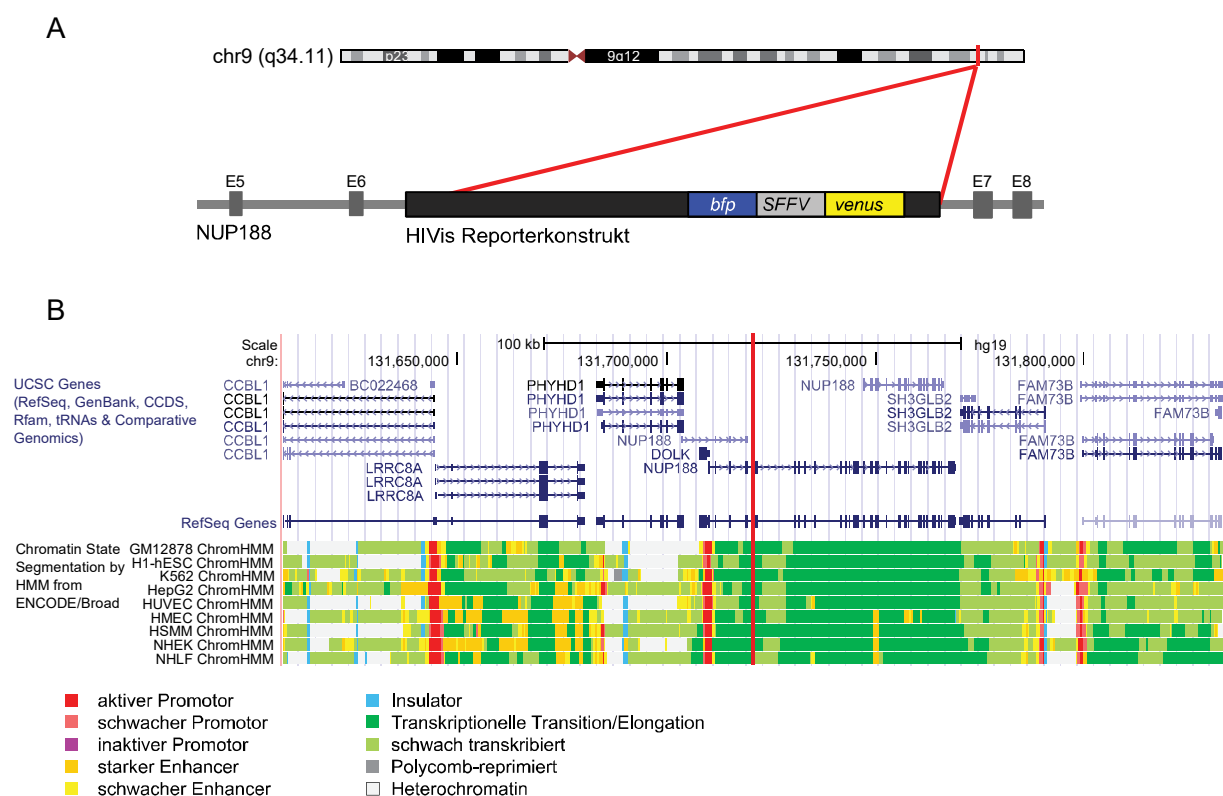


Abbildung 9: Analyse der Integrationsstelle in HIVisB2 Zellen. Mittels HiLo-PCR wurden Fragmente der Integrationsstelle in genomischer DNA von HIVisB2 Zellen amplifiziert, sequenziert und somit die Integrationsstelle bestimmt. (A) Schematische Darstellung der Integration des HIVis Reporterkonstrukts in Intron 6 des Gens *nup188* auf Chromosom 9. (B) Analyse der Region um die Integrationsstelle von HIVisB2 mittels UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/>). Die Integrationsstelle ist mit einer roten Linie markiert. Gezeigt sind umliegende Gene (blau) sowie die Chromatinstatus-Spuren von neun verschiedenen humanen Zelllinien, welche mithilfe von ChIP-Seq-Datensätzen generiert wurden (http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTrackUi?hgsid=569109697_vlz6OVZ5isDNwOh7JHENfFJMXe5d&g=wgEncodeBroadHmm).

4. Ergebnisse

4.1.2.2 Reportergenexpression und genotypische Analyse von HIVisB2

Um die Stabilität der Expression der Fluoreszenzreporter Venus und BFP zu untersuchen, wurde der HIVisB2 Klon über einen Zeitraum von 23 Tagen kultiviert und zu jedem Zeitpunkt des Passagierens Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Venus- und BFP-Expression analysiert.

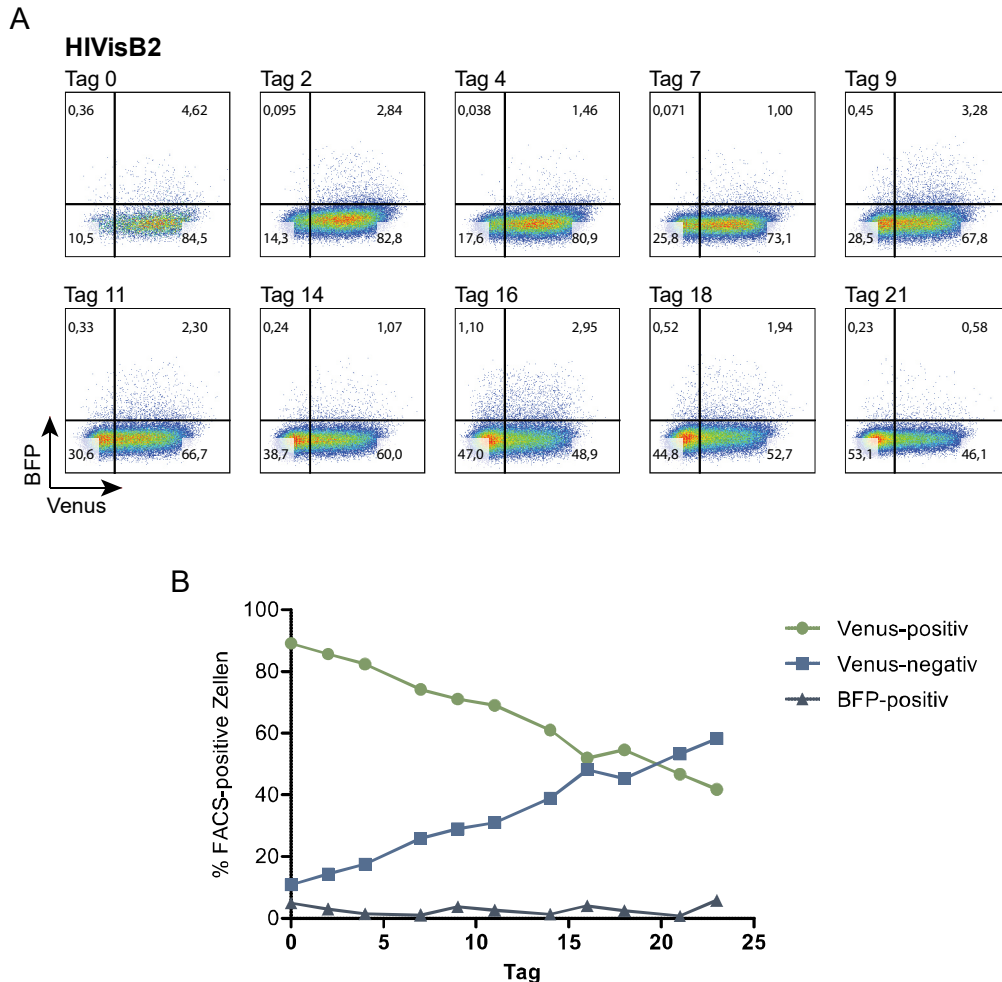


Abbildung 10: Verlauf der Venus-Expression in kultivierten HIVisB2 Zellen über einen Zeitraum von 23 Tagen. Eine Passagierung erfolgte alle 2-3 Tage passagiert. (A) Die Zellen wurden am Tag des Passagierens durchflusszytometrisch analysiert und (B) der Anteil der Venus- und BFP-positiven Zellen gegen die Zeit aufgetragen.

Zu Beginn war der Klon HIVisB2 zu 89% Venus-positiv. Über den Zeitraum der Kultivierung nahm der Anteil Venus-positiver Zellen kontinuierlich ab, bis an Tag 23 nur noch 42% Venus-positive Zellen gemessen wurden. Der Anteil BFP-positiver Zellen belief sich auf 0,8 bis 5% und blieb über den untersuchten Zeitraum konstant.

Um die Beschaffenheit der Venus-negativen Population weiter zu charakterisieren, wurden HIVisB2 Zellen bis zur Passage 12 kultiviert und durchflusszytometrisch hinsichtlich der Venus-Expression analysiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die HIVisB2 Zellen nur noch zu

36% Venus-positiv. Es folgte eine durchflusszytometrische Sortierung, die in einer zu 97% Venus-positiven Population, sowie einer zu 96% Venus-negativen Population resultierte (**Abbildung 11A**). Von den beiden Populationen wurde genomische DNA präpariert und mittels PCR analysiert, sowie ein Teil der Zellen mit PMA und Ionomycin behandelt. 24 h nach Induktion zeigte sich, dass sich sowohl in den Venus-positiven, als auch in den Venus-negativen Population die BFP-Expression aktivieren lässt (**Abbildung 11A**). Die Venus-Expression erhöhte sich in der Venus-negativen Population nach PMA-Ionomycin-Behandlung jedoch nicht.

Für die Genotypisierung der Venus-negativen und Venus-positiven Population wurde eine PCR mit genomischer DNA der verschiedenen Zellpopulationen sowie unsortierter HIVisB2 und Jurkat Zellen durchgeführt. Das erste Primerpaar (NUP188-F/-R) bindet im *NUP188*-Gen 5' und 3' der identifizierten Integrationsstelle und ergibt auf dem Wildtyp Allel ein Amplifikat von 634 bp. Dieses *NUP188*-spezifische Amplifikat konnte in allen HIVisB2 Zellpopulationen und den Jurkat Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 11B**). Um den proviralen HIVis Reporter direkt nachzuweisen, wurde zusätzlich ein Primer verwendet, der im 5'LTR revers bindet (LTR-R). Zusammen mit dem NUP188-F Primer ergibt dieses Primerpaar ein 336 bp großes Amplifikat. In den sortierten HIVisB2 Populationen sowie in den unsortierten HIVisB2 Zellen konnte mit diesem Primerpaar der Übergang vom *NUP188*-Gen in das HIVis Reporterkonstrukt nachgewiesen werden. In parentalen Jurkat Zellen wurde kein PCR-Produkt mit diesem Primerpaar amplifiziert. Die HIVisB2 Zellen scheinen somit heterozygot für das HIVis-Reporterkonstrukt zu sein, wobei sich kein Unterschied zwischen der Venus-negativen und Venus-positiven Population zeigte.

4. Ergebnisse

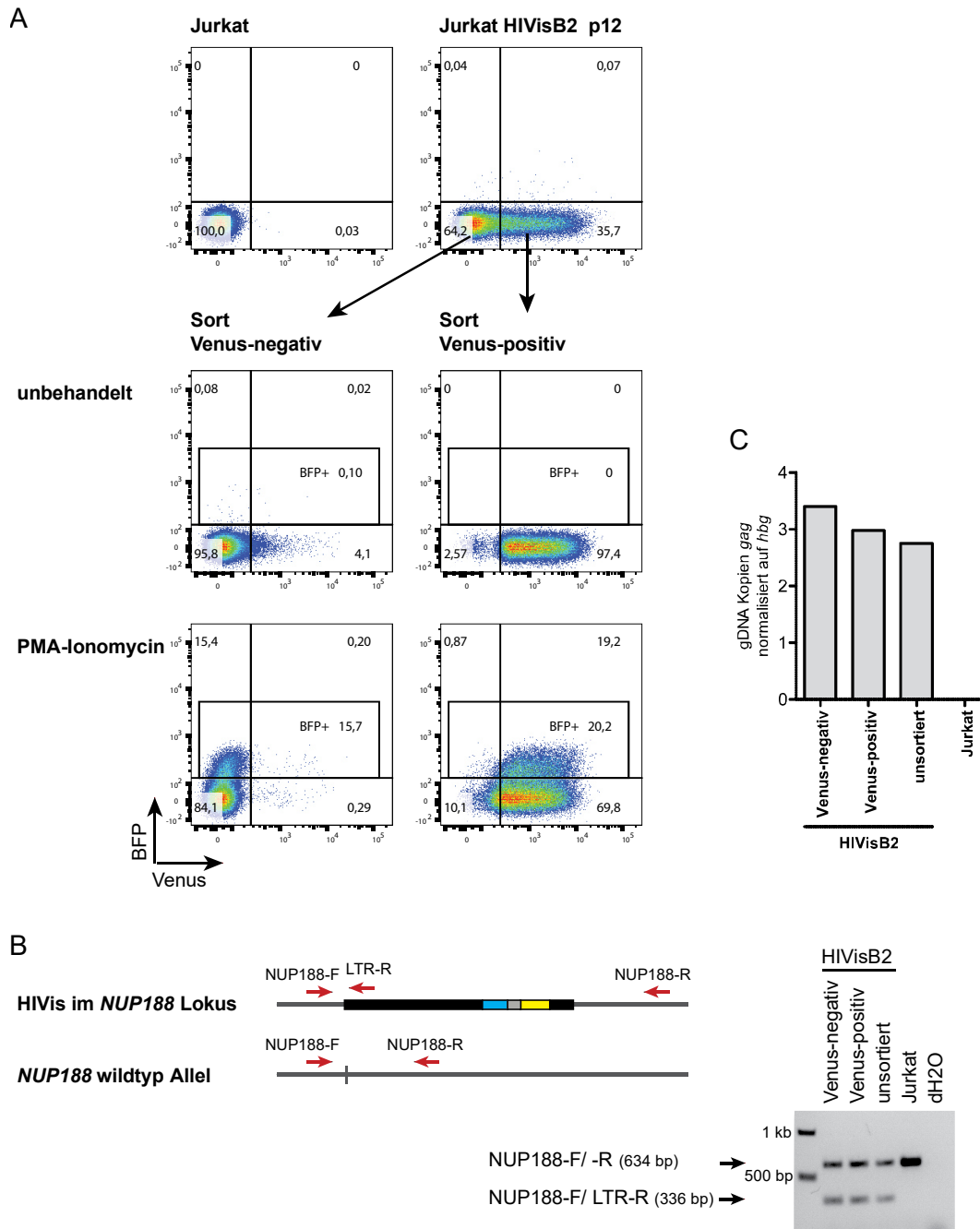


Abbildung 11: Charakterisierung der Venus-negativen und Venus-positiven Population in der Zelllinie HIVisB2. (A) HIVisB2 Zellen wurden für 12 Passagen kultiviert und die Venus-positive und Venus-negative Population durchflusszytometrisch mithilfe eines FACS Aria (BD) sortiert. Die Populationen wurden für 24 h mit 50 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin behandelt und der Anteil Venus- und BFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch gemessen. (B) Zur Genotypisierung der Venus-negativen und Venus-positiven Population wurde eine PCR mit drei Oligonukleotid-Primern durchgeführt. NUP18-F und -R Primer amplifizieren ein 634 bp großes Fragment im *NUP188*-Gen. NUP188-F und LTR-R amplifizieren ein 336 bp großes Fragment im Übergang von *NUP188*-Gen in den 5'-LTR. Unsortierte HIVisB2 und parentale Jurkat Zellen dienen als Kontrolle. (C) Von den Venus-positiven und Venus-negativen Zellpopulationen wurde genomische DNA präpariert und die Kopienzahl von *gag* bezogen auf *hbg* mittels *Realtime*-PCR ermittelt. Unbehandelte HIVisB2 und Jurkat Zellen dienen wiederum als Kontrolle.

Mittels *Realtime*-PCR wurde anschließend untersucht, ob sich die Kopienzahlen des integrierten HIVis-Reporterkonstrukts in den Venus-negativen und Venus-positiven Populationen der HIVisB2 Zellen unterscheiden. Es wurde das Verhältnis von HIV-*gag* zur internen Kontrolle *hbg* (*humanes beta-globin*) auf genomischer DNA quantitativ bestimmt. Die Kopienzahlen lagen in der Venus-negativen Population, in der Venus-positiven, sowie in unsortierten HIVisB2 Zellen auf dem gleichen Niveau (**Abbildung 11C**). In Jurkat Zellen konnte kein HIV-*gag* nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die HIVisB2 Zellen monoklonal sind und die Venus-negativ sortierte Zellpopulation das HIVis-Reporterkonstrukt genauso trägt wie die Venus-positiv sortierte Population. Der Rückgang der Venus-Expression im Verlaufe der Kultivierung muss demnach andere Gründe, beispielsweise in der Regulation des SFFV-Promotors, haben.

4.1.2.3 Aktivierung der Latenzzelllinie HIVisB2 durch *latency-reversing agents*

Nach der Charakterisierung des Integrationsortes und der genomischen Intaktheit des proviralen Reporterkonstrukts in HIVisB2 Zellen sollte der Zellklon hinsichtlich der Aktivierbarkeit durch LRAs weiter charakterisiert werden. Es ist bekannt, dass sich latent HIV infizierte Zellen durch Behandlung mit mitogenen Stimulanzen, wie beispielsweise Phytohämagglutinin (PHA) oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), in den produktiven Infektionszyklus überführen lassen (Saleh et al., 2011). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich nach Aktivierung neben dem Fluoreszenzreporter BFP auch HI-virale mRNA nachweisen lässt. In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss diverser LRAs in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen auf die Fluoreszenz-reportergenexpression und Viabilität der HIVisB2 Zellen und einer weiteren Latenzzelllinie, JLat6.3 Zellen, untersucht.

HIVisB2 Zellen wurden für 6 h mit 50 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin behandelt und anschließend die mitogenen Stimulanzen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden Zellen durchflusszytometrisch analysiert und RNA-Proben genommen (**Abbildung 12**). Sechs Stunden nach Stimulation stieg der Anteil BFP-positiver Zellen bereits auf 57%. Bei 2 Tagen nach Stimulation stieg der Anteil auf 86% und bis zu Tag 7 auf 95% BFP-positive Zellen. Als Kontrolle dienten unstimulierte HIVisB2 Zellen, die nach 6 h ebenso zweimal mit PBS gewaschen wurden. Die HIVisB2 Zellen zeigten zu Beginn des Experiments 0,9% BFP-positive Zellen. Bei 24 h nach Beginn des Experiments konnten 7,8% BFP-positive Zellen gemessen werden. In den darauffolgenden Tagen stellte sich der Anteil der BFP-positiven Zellen zwischen 2,6% und 3,3% ein.

4. Ergebnisse

Mittels quantitativer *Realtime*-PCR wurden die stimulierten HIVisB2 anschließend auf die Expression des HI-viralen Gens *tat* hin untersucht. Isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Kopienzahl von HIV *tat* im Verhältnis zur internen Kontrolle *gapdh* gemessen (**Abbildung 12B**). Direkt nach Stimulation war ein Maximum der *tat*-Expression sichtbar. Das Verhältnis der *tat/gapdh*-Kopienzahlen nahm daraufhin bis zum Ende des Experiments kontinuierlich ab. In Jurkat Zellen konnte keine *tat*-RNA nachgewiesen werden und in unbehandelten HIVisB2 Zellen waren sehr geringe *tat*-Kopienzahlen nachweisbar.

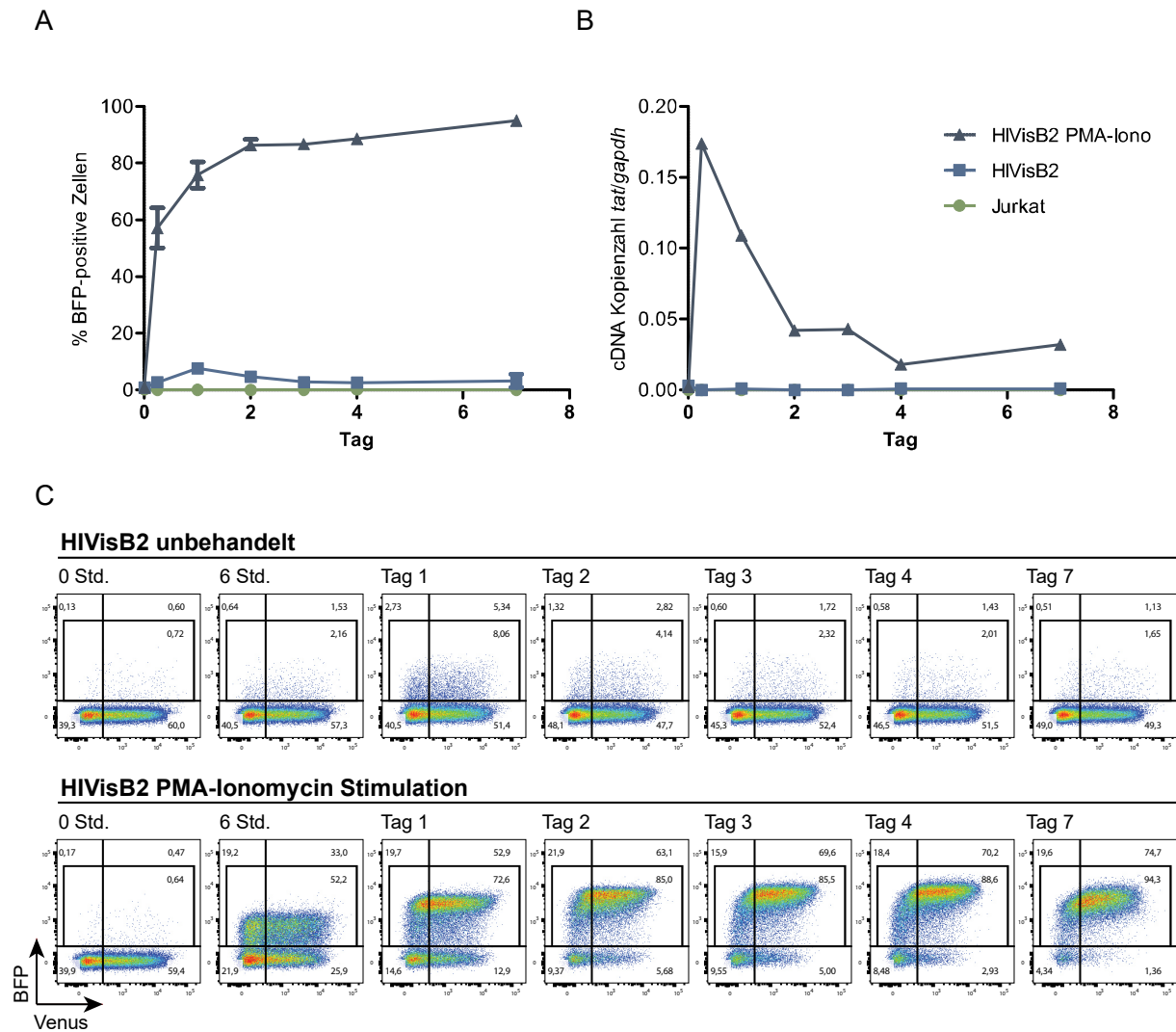


Abbildung 12: Stimulation von HIVisB2 Zellen mit PMA und Ionomycin. HIVisB2 Zellen wurden für 6 h mit 50 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin behandelt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden die Zellen kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert (**A** und **C**). In (**A**) sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente gezeigt. (**B**) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden RNA-Proben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer *Realtime*-PCR wurde HIV *tat* nachgewiesen. Der Nachweis von *gapdh* diente als interne Kontrolle. Unbehandelte Jurkat und HIVisB2 Zellen dienten jeweils als Kontrolle.

Anschließend wurde der Einfluss verschiedener Klassen von LRAs auf die Reportergenexpression und die Viabilität der Latenzzelllinie HIVisB2 untersucht. Zum Vergleich wurde die etablierte Latenzzelllinie JLat6.3 herangezogen. Diese Zelllinie ist ebenso wie HIVisB2 von Jurkat T-Zellen abgeleitet und trägt einen replikationsinkompetenten HIV-Reporter. Hierbei wurde eine *frameshift*-Mutation in das *env*-Gen eingeführt und in den *nef* Leserahmen das Gen für Grün fluoreszierendes Protein (GFP) eingefügt (Jordan et al., 2003).

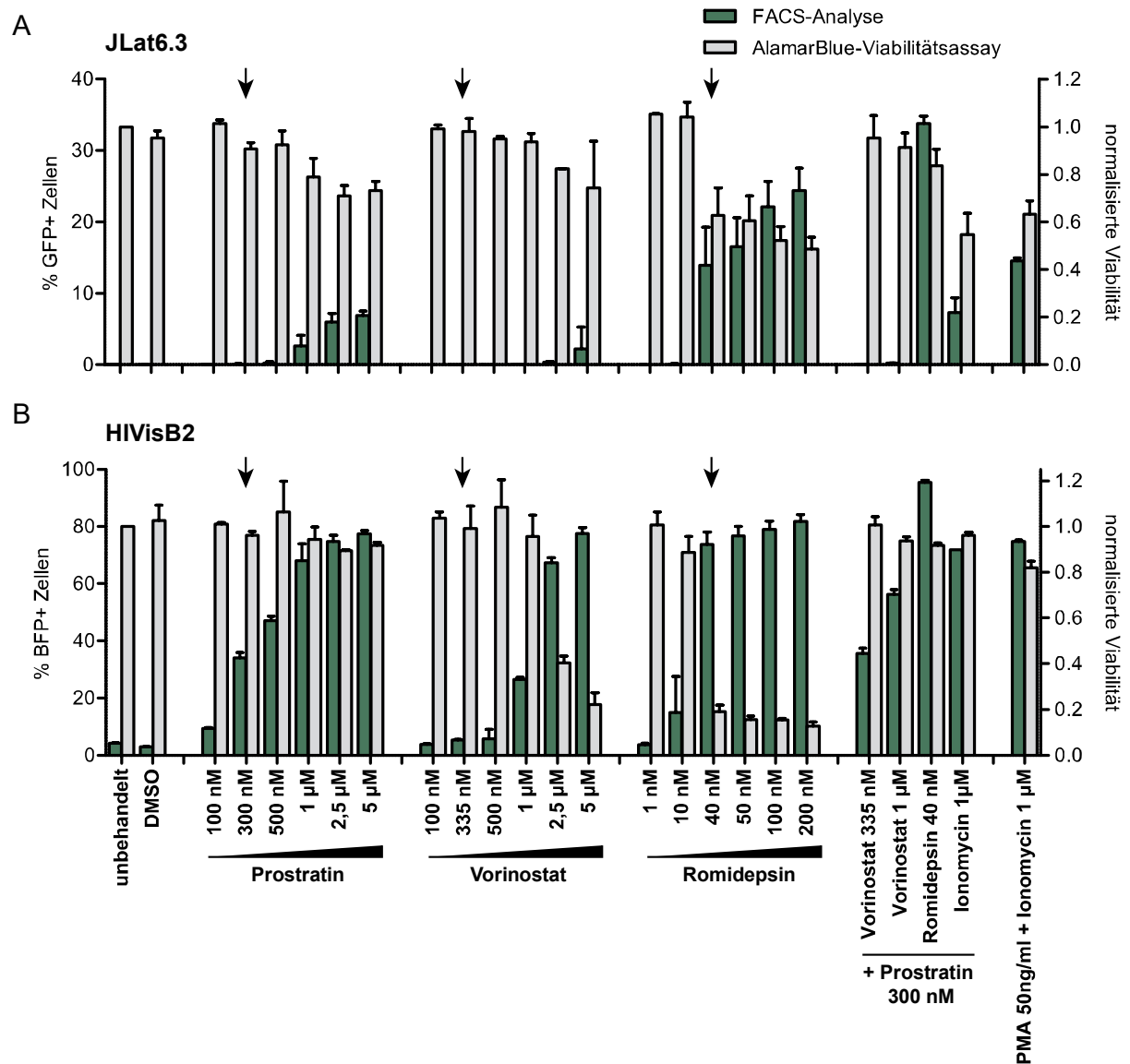


Abbildung 13: Behandlung von JLat6.3 und HIVisB2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen von LRAs. (A) JLat6.3 und (B) HIVisB2 Zellen wurden für 24 h den angegebenen Konzentrationen an LRAs ausgesetzt. Pfeile markieren klinisch relevante Konzentrationen der LRAs (Laird et al., 2015). Die provirale Aktivierung wurde durchflusszytometrisch und die Zellviabilität mittels AlamarBlue-Viabilitätsassay bestimmt. Die Werte des AlamarBlue-Assays wurden auf unbehandelte JLat6.3 bzw. HIVisB2 Zellen normalisiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

4. Ergebnisse

HIVisB2 und JLat6.3 Zellen wurden für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von Prostratin, Vorinostat und Romidepsin (Rasmussen & Lewin, 2016) behandelt und anschließend der Anteil FACS-positiver Zellen gemessen und die Zellviabilität mittels AlamarBlue-Assay bestimmt. Prostratin aktiviert den Proteinkinase C (PKC)-Signalweg und führt so zu einer Freisetzung von NF- κ B und anschließender Transkriptionsaktivierung. Vorinostat und Romidepsin sind beide Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi), die zu einem offenen Chromatinstatus führen und Transkription erleichtern. Als Positivkontrolle wurden PMA und Ionomycin verwendet, die in Kombination zu einer Aktivierung des PKC-Signalwegs durch das T-Zell-Mitogen PMA, sowie zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch das Ionophor Ionomycin führen. PMA und Ionomycin führen zu einer ähnlichen Aktivierung der Zelle wie bei der Aktivierung durch den T-Zell Rezeptor, bei dem durch Formation von Inositoltrisphosphat ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet wird, was zu einer Aktivierung der Phosphatase Calcineurin und folglich einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT und dessen Translokation in den Nukleus führt (Spina et al., 2013).

Generell führte die Behandlung mit LRAs zu einer deutlich höheren Aktivierung in HIVisB2 Zellen als in JLat6.3 Zellen. Eine Aktivierung mit PMA und Ionomycin führte in HIVisB2 Zellen zu 75% BFP-positiven Zellen, in JLat6.3 Zellen hingegen nur zu 15% GFP-positiven Zellen. In JLat6.3 Zellen ist auch die Zellviabilität geringer als in HIVisB2 Zellen (0,6 verglichen zu 0,8, normalisiert auf unbehandelte Zellen).

Prostratin ist genauso wie PMA ein Phorbolester und führt zu einer potenten T-Zell-Aktivierung über den PKC-Signalweg. Bei einer klinisch relevanten Konzentration von 300 nM resultierte Prostratin in 34% BFP-positiven HIVisB2 Zellen. Höhere Konzentrationen führten bis zu 77% BFP-positiver Zellen. Die Zellviabilität war dabei kaum beeinflusst. JLat6.3 Zellen reagierten deutlich anders auf Prostratin. Eine Konzentration von 300 nM führte zu 0,1% GFP-positiver Zellen. Die höchste eingesetzte Konzentration von 5 μM führte zu 7% GFP-positiven Zellen, mit einem deutlichen Rückgang der Zellviabilität (0,7 bezogen auf unbehandelte JLat6.3 Zellen).

Vorinostat, ein pan-HDACi der sowohl Klasse I HDACs (HDAC 1, 2, 3 und 8) als auch in geringerem Maße Klasse II HDACs (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 11) inhibiert, führte in HIVisB2 Zellen zu einer geringen Aktivierung (5,4% BFP-positive Zellen) bei Einsatz in klinisch relevanter Konzentration (335 nM). In höher eingesetzter Konzentration konnten bis zu 78% BFP-positive Zellen erreicht werden, jedoch sank auch die Zellviabilität stark. In

JLat6.3 Zellen hatte Vorinostat kaum einen Effekt. Die höchste Konzentration von 5 μM führte zu 2,2% GFP-positiven Zellen.

Der zweite getestete HDACi Romidepsin inhibiert HDACs der Klasse I. Romidepsin aktivierte HIVisB2 Zellen am stärksten, hatte jedoch auch eine zytotoxische Wirkung. Die klinisch relevante Konzentration von 40 nM führte bereits zu 74% BFP-positiven Zellen mit einer verminderten Viabilität von 0,2 bezogen auf unbehandelte Zellen. Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 200 nM konnte der Anteil BFP-positiver Zellen auf 82% gesteigert werden. Auch auf JLat6.3 Zellen hatte Romidepsin die stärkste Wirkung. Eine Konzentration von 40 nM führte zu 14% GFP-positiven Zellen bei einer Viabilität von 0,6. JLat6.3 Zellen ließen sich bei der höchsten Konzentration zu 24% aktivieren, bei einer Viabilität von 0,5.

Die Kombination von Prostratin mit Vorinostat beziehungsweise Romidepsin führte zu einer verstärkten, jedoch keiner synergistischen Aktivierung von HIVisB2 Zellen. Es fällt auf, dass HIVisB2 Zellen behandelt mit Prostratin in Kombination mit Romidepsin deutlich viabler sind als Zellen behandelt mit Romidepsin der entsprechenden Konzentration allein (0,9 zu 0,2). Bei JLat6.3 Zellen lässt sich ein synergistischer Effekt von Romidepsin und Prostratin feststellen. In Kombination führten beide Komponenten zu 34% GFP-positiven Zellen. Die Aktivierung durch die entsprechenden Konzentrationen alleine betrug zusammengerechnet jedoch nur 14% GFP-positive Zellen. Auch hier ist die Viabilität der mit Prostratin und Romidepsin in Kombination behandelten Zellen höher als die der nur mit Romidepsin behandelten Zellen (0,8 zu 0,6). Die Kombination von Prostratin mit Vorinostat führte in JLat6.3 zu einem kaum messbaren Anteil GFP-positiver Zellen.

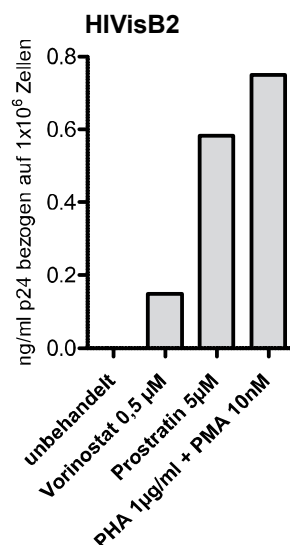
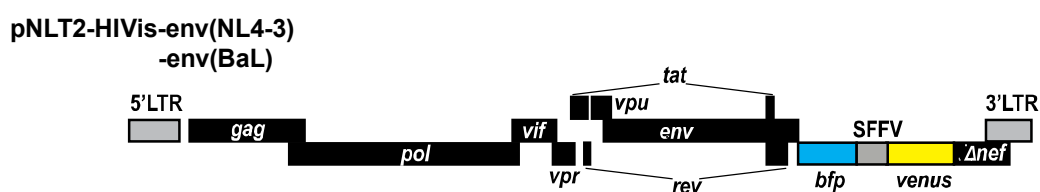


Abbildung 14: Aktivierung von HIVisB2 Zellen und p24^{Gag} Antigen-Messung. HIVisB2 Zellen wurden für 24 h mit Vorinostat (0,5 μM), Prostratin (5 μM) oder PHA (1 $\mu\text{g/ml}$) und PMA (10 nM)



4.1.3.2 Infektion von Jurkat Zellen und primären CD4+ T-Zellen mit HIV-1 Reporterkonstrukten

Die neu generierten replikationskompetenten lentiviralen Partikel HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) wurden in Jurkat T-Zellen ausgetestet. Der Titer der lentiviralen Partikel wurde über einen p24-ELISA bestimmt und Jurkat Zellen mit verschiedenen Mengen der Viruspartikel infiziert. Am Tag 5 beziehungsweise am Tag 8 und 12 Tage nach Infektion wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (**Abbildung 16**).

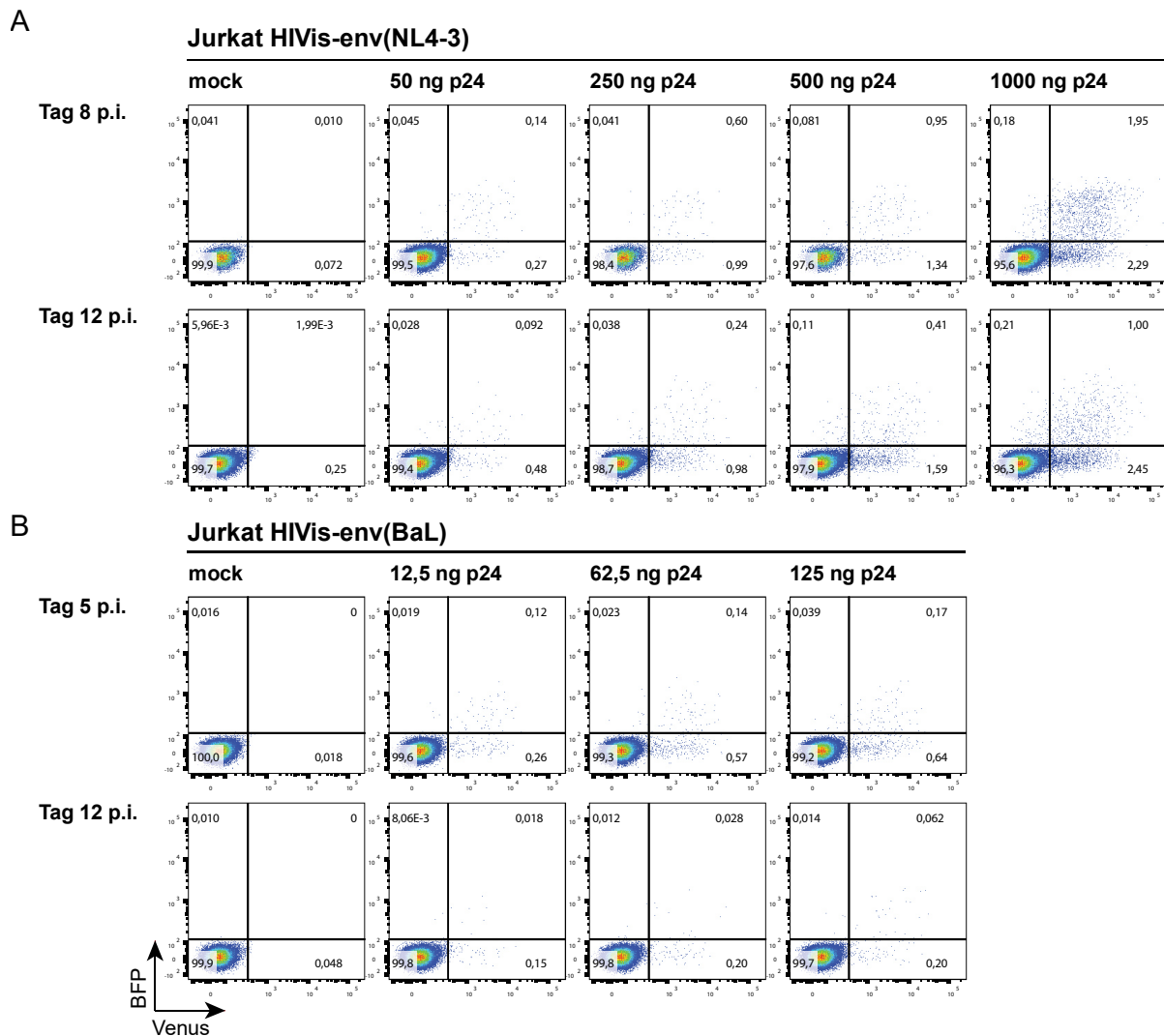


Abbildung 16: Infektion von Jurkat T-Zellen mit replikationskompetenten Viruspartikeln HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL). Jurkat (1×10^6) Zellen wurden mit der angegebenen Menge an lentiviralen Partikeln (A) HIVis-env(NL4-3) bzw. (B) HIVis-env(BaL) infiziert und die Zellen 8, 5, oder 12 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Infektion der Jurkat Zellen mit den replikationskompetenten Viruspartikeln HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) zeigte sich ein ähnliches Bild der Fluoreszenzreportergenexpression wie zuvor bei der Transduktion von Jurkat Zellen mit replikationsinkompetenten

4. Ergebnisse

VSV-G-pseudotypisierten HIVis Partikeln (**Abbildung 6**). Besonders deutlich waren bei der Transduktion mit 1000 ng p24^{Gag} HIVis-env(NL4-3) die Populationen latent infizierter (Venus-positiver) und produktiv infizierter (Venus-positiver und BFP-positiver) Jurkat Zellen zu unterscheiden (**Abbildung 16A**).

Anschließend wurden primäre CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen Mengen der replikationskompetenten Viruspartikel HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) infiziert. CD4⁺ T-Zellen wurden über Nacht mit CD3/CD28-*Beads* stimuliert, mit der entsprechenden Menge Viruspartikel bei 2000 x g für 90 min inokuliert und 24 h nach Infektion die Viruspartikel und CD3/CD28-*Beads* entfernt (siehe 3.3.13 *Transduktion primärer CD4⁺ T-Zellen*). Als Kontrolle wurden CD4⁺ T-Zellen mit Viruspartikeln HIV(NL4-3)-mCherry infiziert. Diese Viruspartikel tragen ein vollständiges HIV-Genom, wobei der mCherry-Fluoreszenzmarker, beziehungsweise eine entsprechende cDNA in das *nef*-Gen insertiert wurde. Die Viruspartikel wurden zuvor bereits in CD4⁺ T-Zellen getestet und dienten als Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion.

Die Infektion der CD4⁺ T-Zellen mit HIV(NL4-3)-mCherry führte zu einem deutlichen Anteil mCherry-positiver Zellen (**Abbildung 17C**), die Infektion der CD4⁺ T-Zellen war somit erfolgreich. In CD4⁺ T-Zellen zeigte sich bei der Infektion mit HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) ein anderes Bild als bei der Infektion von Jurkat Zellen. In CD4⁺ T-Zellen, die mit 100 ng p24^{Gag} von HIVis-env(NL4-3) infiziert wurden, waren kaum latent infizierte (Venus-positive) Zellen zu erkennen (0,37%). Der überwiegende Teil der infizierten Zellen war BFP-positiv und zeigte keine Venus-Expression (1,72%) (**Abbildung 17A**). Bei der Infektion mit HIVis-env(BaL) war noch deutlicher zu sehen, dass kaum Venus-positive Zellen vorhanden waren (**Abbildung 17B**).

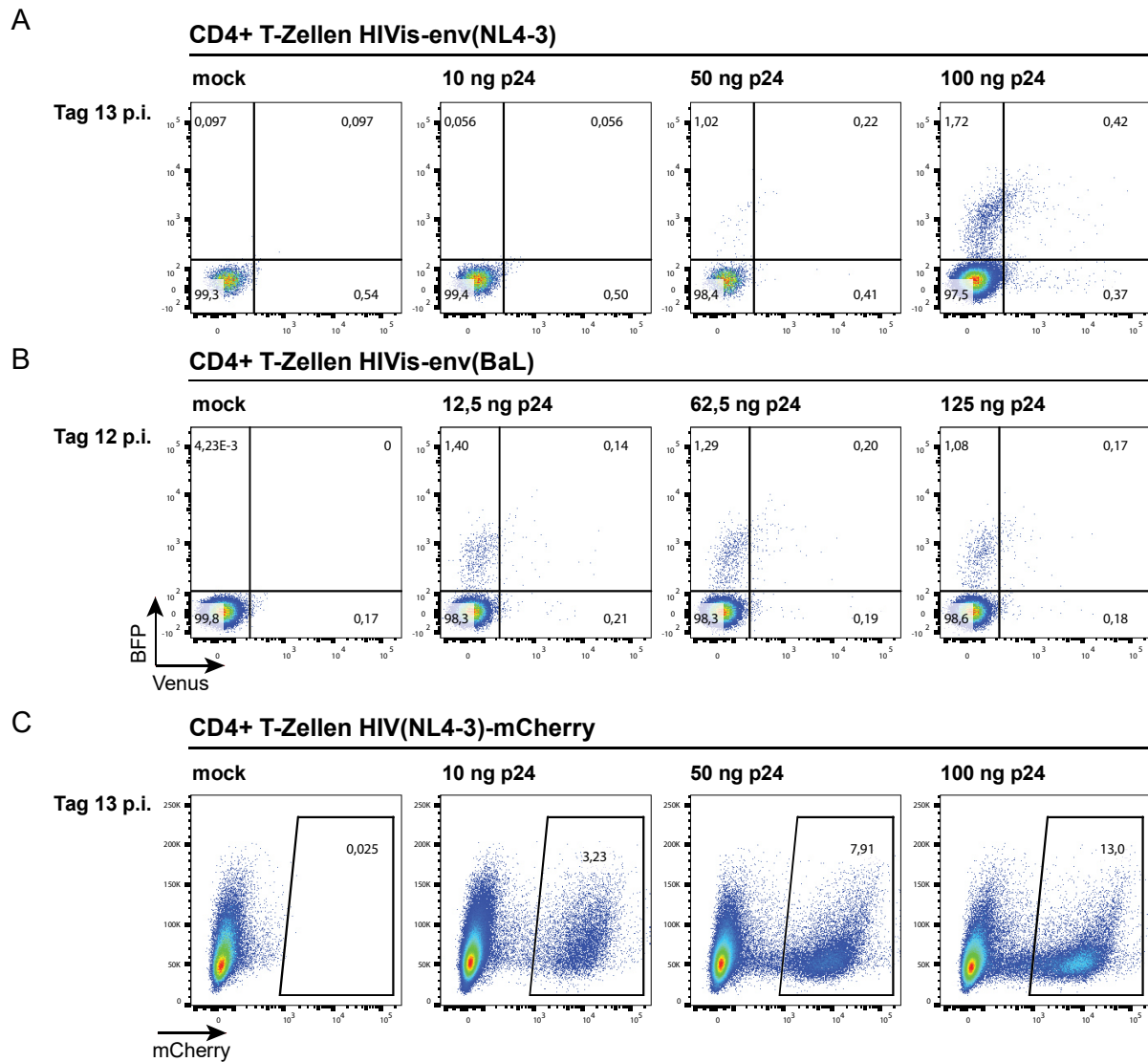


Abbildung 17: Infektion von primären CD4+ T-Zellen mit replikationskompetenten Viruspartikeln HIVis-env(NL4-3), HIVis-env(BaL) und HIV(NL4-3)-mCherry. CD4+ T-Zellen (1×10^6) wurden mit der angegebenen Menge an lentiviralen Partikeln HIVis-env(NL4-3) (A) bzw. HIVis-env(BaL) (B) infiziert. (C) Eine Infektion mit lentiviralen Partikeln HIV(NL4-3)-mCherry diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 13 bzw. 12 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert.

In einem weiteren Infektionsexperiment wurden CD4+ T-Zellen wieder mit 100 ng p24^{Gag} von HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) infiziert und der Infektionsverlauf von Tag 1 bis 6 durchflusszytometrisch verfolgt. An Tag 7 wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert und 24 h später durchflusszytometrisch gemessen. Hier zeigte sich wieder, dass kaum eine Population Venus-positiver latent infizierter Zellen zu identifizieren war. Eine Stimulation mit PMA und Ionomycin führte zu einem minimalen Anstieg der Venus- und BFP-Expression (Abbildung 18).

4. Ergebnisse

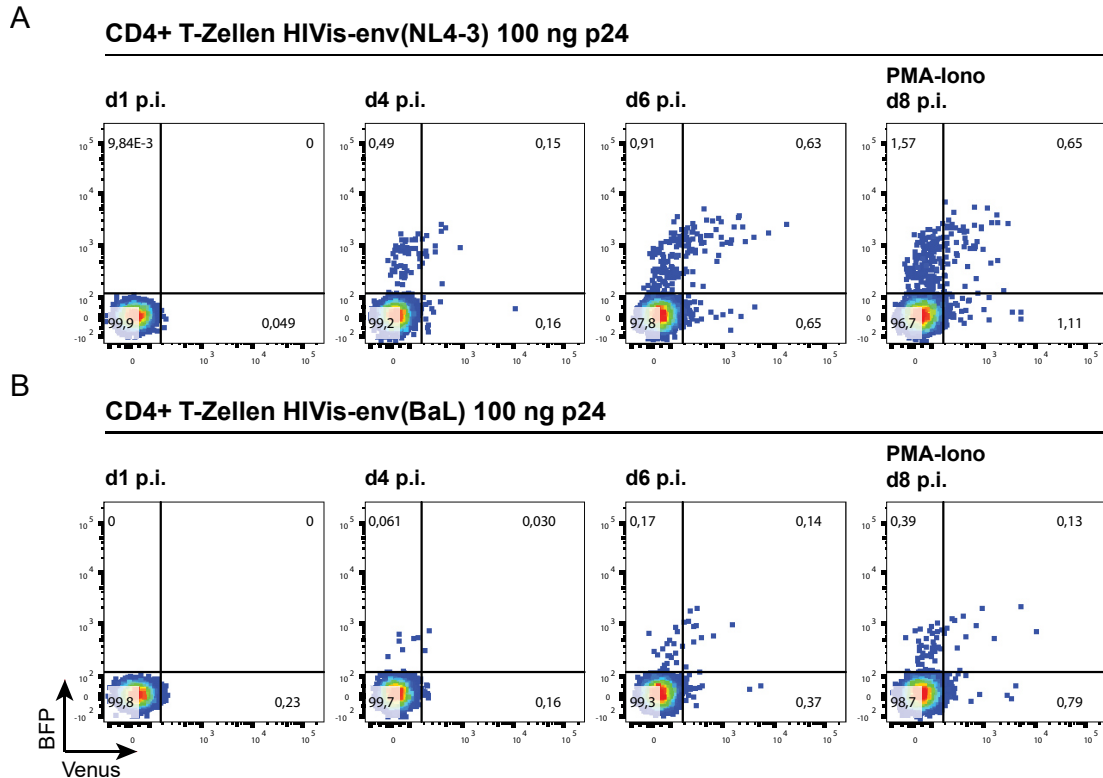


Abbildung 18: Infektion von primären CD4+ T-Zellen mit lentiviralen replikationskompetenten Partikeln HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL). CD4+ T-Zellen (1×10^6) wurden mit 100 ng der lentiviralen Partikeln HIVis-env(NL4-3) (A) bzw. HIVis-env(BaL) (B) infiziert. Die Zellen wurden 1, 4 und 6 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert. Am Tag 7 nach Infektion wurden die Zellen mit 1 μ M Ionomycin und 10 nM PMA behandelt und 24 h später durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Infektion von Jurkat Zellen zeigten die replikationskompetenten Viruspartikel HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) das erwartete Bild. Es ließen sich Populationen latent infizierter Zellen (Venus-positiv) und produktiv infizierter Zellen (Venus-positiv und BFP-positiv) von nicht-infizierten Zellen unterscheiden (**Abbildung 16**). In primären CD4+ T-Zellen zeigte sich ein anderes Ergebnis. Nach Infektion waren kaum einfach Venus-positive Zellen vorhanden. Vielmehr ist der Großteil der infizierten Zellen BFP-positiv und zeigt keine Venus-Expression (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**), obwohl das *venus*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven SFFV-Promotors exprimiert wird. Die HIVis-env(NL4-3) und HIVis-env(BaL) Viruspartikel sind funktional, wie die Infektion von Jurkat Zellen gezeigt hat. Als Latenzmodell für primäre CD4+ T-Zellen scheinen sie ungeeignet, da eine latente Population nicht auszumachen ist.

4.1.3.3 Vergleich verschiedener Promotoren in CD4+ T-Zellen

In primären CD4+ T-Zellen ist nach Infektion mit replikationskompetenten HIVis Viruspartikeln im Gegensatz zu Jurkat Zellen kaum eine Venus-Expression zu erkennen. Eine mögliche Ursache wäre, dass über den SFFV-Promotor in CD4+ T-Zellen, anders als in der Jurkat T-Zelllinie, keine konstitutive Genexpression möglich ist. Um dies zu untersuchen, und um einen optimalen Promotor für die konstitutive Genexpression in primären CD4+ T-Zellen zu finden, wurden lentivirale Vektoren mit dem *gfp*-Gen unter der Kontrolle des EF1 α -, PGK- und SFFV-Promotors konstruiert (siehe *Tabelle 12: Klonierungsstrategien der lentiviralen Reporterkonstrukte und Vorkonstrukte.*). CD4+ T-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit den lentiviralen Vektoren transduziert und 2 und 6 Tage nach Transduktion der Anteil GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transduktion mit lentiviralen Partikeln mit EF1 α -Promotor führte 6 Tage nach Transduktion zu 79% GFP-positiven Zellen, der höchsten gemessenen Rate. Der SFFV-Promotor führte zu 71% GFP-positiven Zellen.

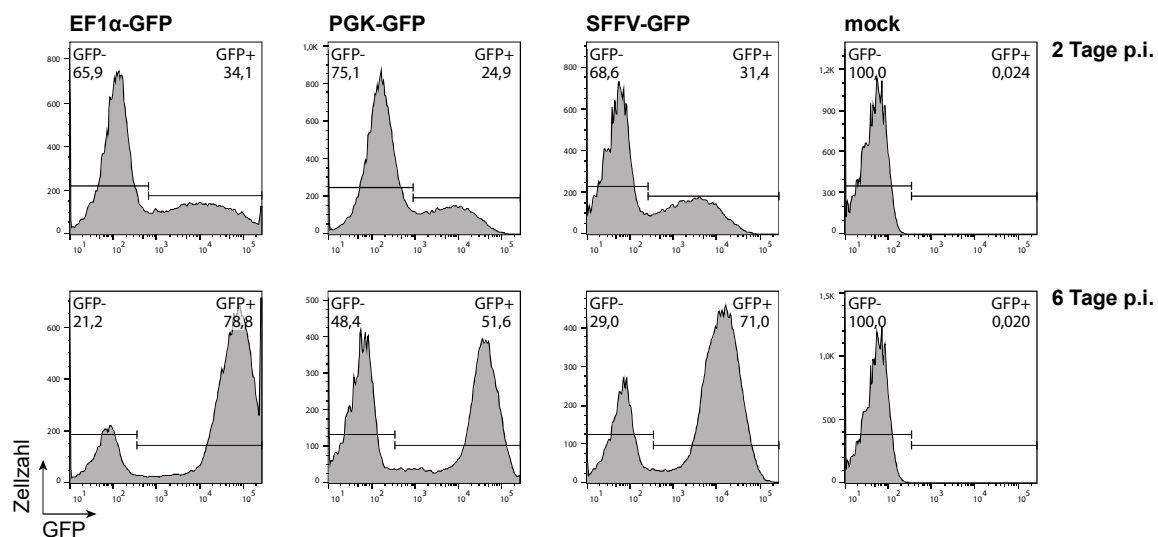


Abbildung 19: Transduktion von CD4+ T-Zellen mit lentiviralen Partikeln mit GFP unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Humane CD4+ T-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mittels Spininfektion (840 x g für 15 min) mit lentiviralen Partikeln transduziert. Am Tag 2 und 6 nach Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

4.1.3.4 Ein optimierter Latenzreporter für CD4⁺ T-Zellen: HIVis-mKO2

Da sich der konstitutive Promotor EF1 α als gut funktionierend in primären CD4⁺ T-Zellen herausgestellt hatte, wurde ein neues Latenzreporterkonstrukt mit EF1 α -Promotor statt SFFV-Promotor entworfen. Das Gen für das Venus-Fluoreszenzprotein wurde ausgetauscht gegen das Gen für monomerisches Kusabira Orange 2 (mKO2) Fluoreszenzprotein. Die Fluoreszenzproteine Venus und BFP sind beide Varianten des aus der Quallenart *Aequorea victoria* isolierten GFP (Nagai et al., 2002; Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast, & Cormier, 1992). Das Protein Kusabira Orange ist isoliert aus der Koralle *Fungia concinna* (auf Japanisch *Kusabira-ishi*) (Sakaue-Sawano et al., 2008). Durch die Sequenzhomologien zwischen der *bfp*- und *venus*-Sequenz könnten bei der Integration des HIVis-Reporterkonstrukts ungewollte Rekombinationsereignisse auftreten. Zwischen der *mKO2*- und *bfp*-Sequenz treten keine Sequenzhomologien auf, wodurch Rekombinationsereignisse unwahrscheinlicher wären. Aus diesem Grund wurde Venus durch mKO2 im HIVis-Reporterkonstrukt ersetzt. Das neue Reporterkonstrukt wurde HIVis-mKO2 benannt.

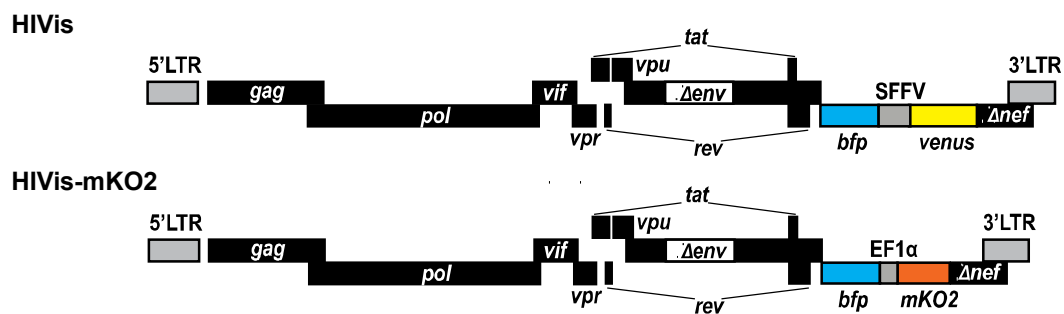


Abbildung 20: Die Reporterkonstrukte HIVis und HIVis-mKO2. Im Reporterkonstrukt HIVis-mKO2 wurde der SFFV-Promotor durch den EF1 α -Promotor ersetzt, sowie das Gen des Venus Fluoreszenzproteins gegen das Gen für das monomerische Kusabira Orange 2 Fluoreszenzprotein (mKO2) ausgetauscht.

Die Expression von Kusabira Orange wurde durch Transfektion eines Plasmids mit dem *mKO2*-Gen unter Kontrolle des EF1 α -Promotors in HEK-293T und Jurkat Zellen untersucht (**Abbildung 21A** und **B** linkes Feld). Es zeigte sich, dass sich mKO2 sowohl in HEK-293T als auch in Jurkat Zellen gut exprimieren lässt. Zur Überprüfung der klonierten Reporterassette BFP-EF1 α -mKO2 wurde ein Vorkonstrukt, das Plasmid pcDNA-BFP-EF1 α -mKO2, ebenso in HEK-293T und Jurkat Zellen transfiziert (**Abbildung 21A** und **B** rechtes Feld). Die Zellen waren mKO2-positiv und zu einem kleineren Anteil doppelt BFP- und mKO2-positiv. Demnach funktionierte die Expression der beiden Fluoreszenzmarker durch die neu konstruierte Reporterassette

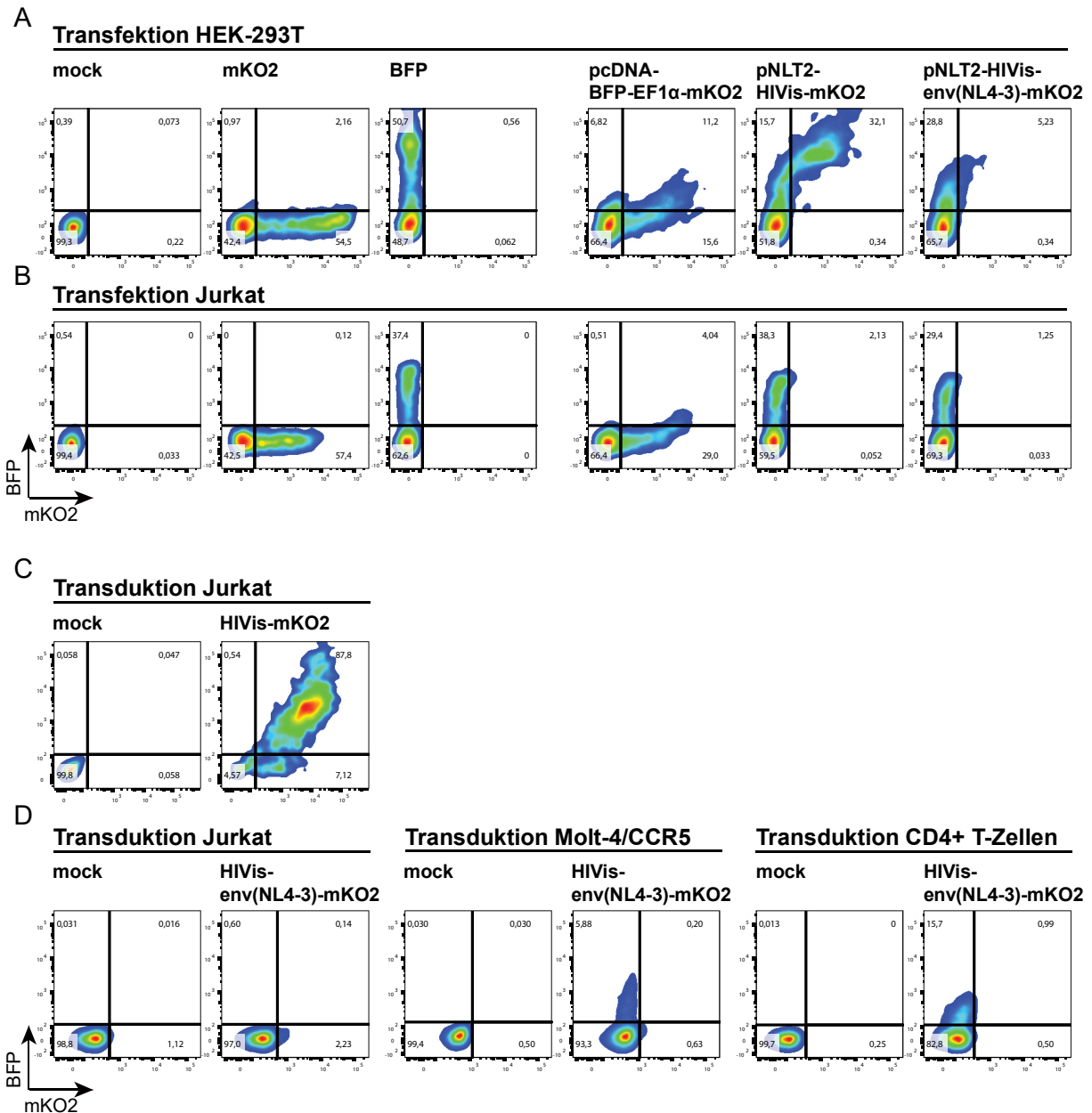


Abbildung 21: Transfektion und Transduktion der HIVis-mKO2 Plasmide und Viruspartikel in verschiedene Zelllinien und primäre CD4+ T-Zellen. (A) HEK-293T und (B) Jurkat Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA-BFP-EF1 α -mKO2, pNLT2-HIVis-mKO2 und pNLT2-HIVis-env(NL4-3)-mKO2 transfiziert und 48 h (A) bzw. 72 h (B) nach Transfektion die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten Transfektionen mit Plasmiden, die das *mKO2*- bzw. *bfp*-Gen tragen. (C) Jurkat Zellen wurden mit VSV-G-pseudotypisierten replikationsinkompetenten lentiviralen Partikeln HIVis-mKO2 mit einer MOI von 1 transduziert und die Zellen 7 Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. (D) Jurkat, MOLT-4/CCR5 und CD4+ T-Zellen wurden mit replikationskompetenten lentiviralen Partikeln HIVis-env(NL4-3)-mKO2 mit 3900 ng p24^{Gag} pro 1×10^6 Zellen transduziert und die Zellen 7 Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert.

Die Reporterkassette BFP-EF1 α -mKO2 wurde in den lentiviralen Vektor pNLT2 und pNLT2-env(NL4-3) eingesetzt und die Vektorplasmide zur Überprüfung der Funktionalität der mKO2-Expression in HEK-293T und Jurkat Zellen transfiziert (Abbildung 21A und B rechtes Feld). Im Gegensatz zum Vorkonstrukt pcDNA-BFP-EF1 α -mKO2 zeigte sich in

4. Ergebnisse

beiden Zelllinien eine deutlich höhere BFP-Expression, bedingt durch den LTR-Promotor. In HEK-293T Zellen waren nach Transfektion mit dem replikationsinkompetenten Konstrukt pNLT2-HIVis-mKO2 32% der Zellen mKO2-positiv. Bei Transfektion mit dem replikationskompetenten Konstrukt pNLT2-HIVis-env(NL4-3)-mKO2 waren dagegen nur 5,6% mKO2-positive HEK-293T Zellen zu detektieren. In Jurkat Zellen waren nach Transfektion mit beiden Konstrukten kaum mKO2-positive Zellen zu messen.

Von dem Konstrukt pNLT2-HIVis-mKO2 wurden replikationsinkompetente VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Partikel hergestellt und Jurkat Zellen mit einer MOI von 1 transduziert (**Abbildung 21C**). Am Tag 7 nach Transduktion konnte beobachtet werden, dass der Großteil der Zellen (88%) doppelt-positiv für mKO2 und BFP, also produktiv infiziert war. Von dem Konstrukt pNLT2-HIVis-env(NL4-3)-mKO2 wurden replikationskompetente HIV-1 abgeleitete Viruspartikel hergestellt und primäre CD4⁺ T-Zellen mit 3900 ng p24^{Gag} der Viruspartikel infiziert. Zusätzlich wurden die für HIV-1 empfänglichen T-Zelllinien Jurkat und MOLT-4/CCR5 mit HIVis-env(NL4-3)-mKO2 infiziert. In allen drei Zellarten konnte keine mKO2-Expression detektiert werden (**Abbildung 21D**). In CD4⁺ T-Zellen wurden 17% BFP-positive Zellen, in MOLT-4/CCR5 6% und in Jurkat Zellen 0,7% BFP-positive Zellen gemessen.

Nach Transduktion von T-Zellen mit Viruspartikeln HIVis-mKO2 konnte keine latente, also einfach mKO2-positive Zellpopulation identifiziert werden. Die DNA-Sequenz des Vektorplasmids pNLT2-HIVis-env(NL4-3)-mKO2 wurde erneut mittels Sequenzierung überprüft und keine Abweichungen gefunden. Das HIVis-mKO2 Reportervirus scheint deshalb als Latenzmodell für primäre CD4⁺ T-Zellen ungeeignet zu sein.

4.1.3.5 Das CCL19-Latenzmodell in CD4⁺ T-Zellen

In den vorherigen Abschnitten wurde beobachtet, dass nach Infektion von aktivierten primären CD4⁺ T-Zellen mit den Viruspartikeln HIVis-env(NL4-3), HIVis-env(BaL) und HIVis-env(NL4-3)-mKO2 kaum latent infizierte, also einfach Venus- bzw. mKO2-positive Zellen aufzufinden waren. BFP-positive Zellen waren nach Infektion jedoch eindeutig nachweisbar, was für eine Aktivität des HIV-1 LTR-Promotors nach der Infektion spricht.

Eine Möglichkeit, um latent infizierte Zellen zu erhalten, wäre die direkte Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden ruhende CD4⁺ T-Zellen mittels negativer Selektion aus PBMCs eines gesunden Spenders isoliert. CD4⁺ T-Zellen wurden als ruhend betrachtet, wenn sie die Oberflächenantigene CD69 und CD25 nicht exprimierten. CD69 ist ein früher Marker der T-Zell Aktivierung (Simms & Ellis, 1996). CD25 wird etwas später nach Aktivierung exprimiert (Caruso et al., 1997). Zusätzlich sollten ruhende CD4⁺ T-Zellen mit dem Zytokin *CC-chemokine ligand 19* (CCL19) behandelt werden. CCL19 ist ein Zytokin aus der Familie der CC-Chemokine und bindet spezifisch den Chemokinrezeptor CCR7 (Yoshida et al., 1997). CCL19 wird hauptsächlich im Thymus und in Lymphknoten exprimiert und ist chemotaktisch für dendritische Zellen, aktivierte B-Zellen und CCR7-positive zentrale Gedächtnis-T-Zellen. Es sorgt neben anderen Faktoren für die T-Zell-Migration und -Rezirkulation zwischen Blut und Geweben (Bromley, Thomas, & Luster, 2005; Cyster, 2005). Eine Zugabe von CCL19 zu ruhenden CD4⁺ T-Zellen *in vitro* soll eine chemokinreiche Mikroumgebung wie in den lymphoiden Geweben modellieren und in einer erhöhten Rate von HIV-Integrationsereignissen bei Beibehaltung des ruhenden Charakters der CD4⁺ T-Zellen resultieren (Saleh et al., 2007, 2011). Die Etablierung von HIV-Latenz könnte zudem durch Chemokin-induzierte Änderungen im Aktinzytoskelett der Zelle begünstigt werden (Cameron et al., 2010).

Um die Infizierbarkeit von ruhenden gegenüber aktivierten CD4⁺ T-Zellen und den Einfluss der Infektion auf den Aktivierungsstatus der T-Zellen zu untersuchen, wurden T-Zellen unter vier verschiedenen Kulturbedingungen für 72 h inkubiert und anschließend mit 500 ng p24^{Gag} HIVis-env(NL4-3) für 2 h spininokuliert. CD4⁺ T-Zellen wurden für 24 h mit CD3/CD28-*Beads* und IL-2 aktiviert oder unbehandelt belassen. Ruhende CD4⁺ T-Zellen wurden mit 100 nM CCL19 behandelt oder unbehandelt belassen. Vor und nach der Spininokulation wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression der Oberflächenantigene CD69 und CD25 analysiert.

4. Ergebnisse

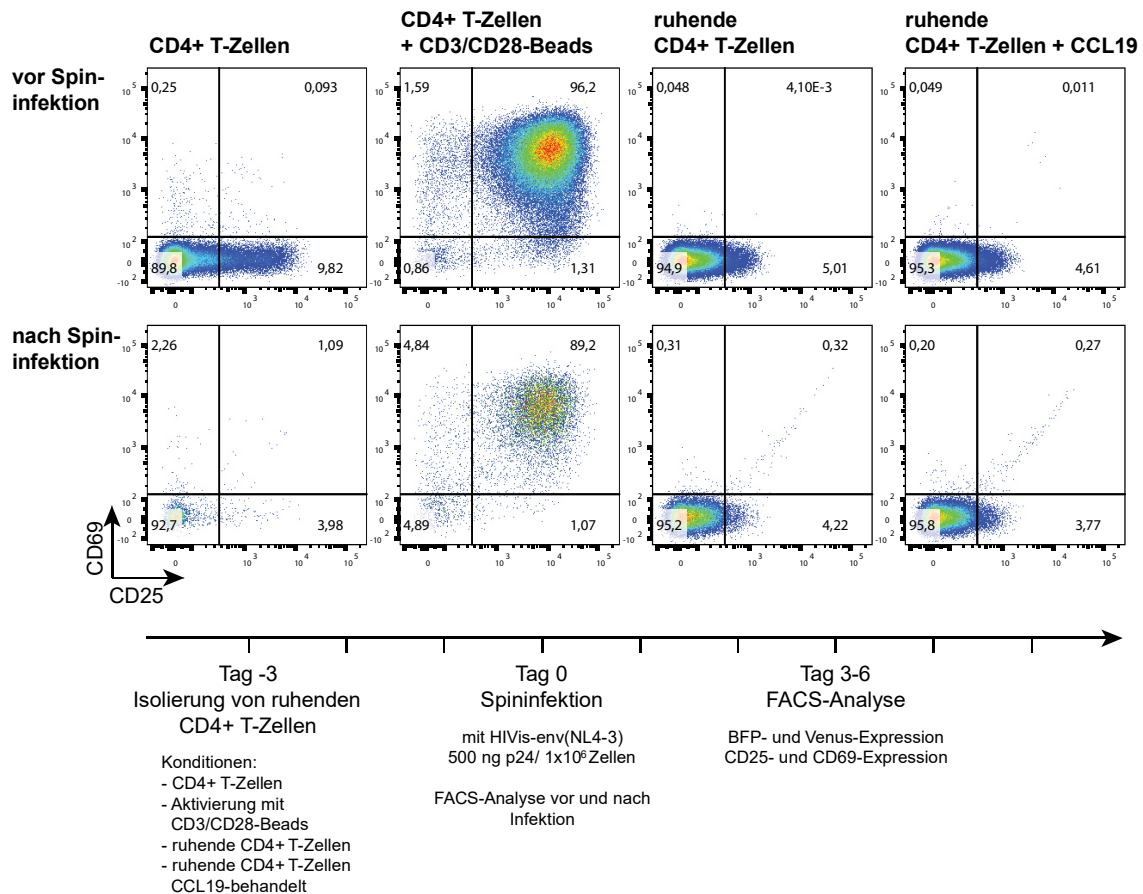


Abbildung 22: Infektion von CD4+ T-Zellen und ruhenden CD4+ T-Zellen nach Behandlung mit CD3/CD28-Beads und CCL19. CD4+ T-Zellen und ruhende, CD69- und CD25-negative CD4+ T-Zellen wurden isoliert. CD4+ T-Zellen wurden mit CD3/CD28-Beads und 100 U/ml IL-2 aktiviert oder unbehandelt belassen. Ruhende CD4+ T-Zellen wurden mit 100 nM CCL19 versetzt oder unbehandelt belassen. Die verschiedenen Ansätze wurden für 3 Tage kultiviert. Die T-Zellen wurden mit 500 ng p24^{Gag} HIVis-env(NL4-3) per 1x10⁶ Zellen für 2 h bei 1200 x g inokuliert und anschließend das Virus durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Vor und nach Infektion wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und dafür hinsichtlich CD69- und CD25-Expression gefärbt. Viable Zellen wurden mittels Lebend/Tot-Färbung (Live/Dead Near IR stain) diskriminiert.

Die unbehandelten CD4+ T-Zellen waren zu 10% CD25-positiv. Unter 1% der CD4+ T-Zellen exprimierte CD69. Eine Stimulation mit CD3/CD28-Beads führte zu 96% doppelt positiven Zellen für CD25 und CD69. Die ruhenden CD4+ T-Zellen exprimierten zu 5% CD25 und kein CD69. Die Behandlung mit CCL19 veränderte das Expressionsmuster nicht (**Abbildung 22**). Direkt nach der Spininokulation wurden die T-Zellen erneut durchflusszytometrisch analysiert. Es war in allen Kulturen ein minimaler Abfall der CD25-Expression und ein leichter Anstieg der CD69-Expression zu beobachten. Durch die Spininfektion änderte sich der Aktivierungszustand der T-Zellen nicht.

Um den Infektionsverlauf zu verfolgen, wurde die Expression der Fluoreszenzreporter Venus und BFP durchflusszytometrisch gemessen. Direkt nach Infektion konnten bereits 4 bis 6% Venus-positive Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 23**). Der höchste Anteil Venus-positiver latenter Zellen war dabei in ruhenden CCL19-behandelten Zellen zu detektieren. An Tag 3 nach Infektion zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den unterschiedlich kultivierten T-Zellen. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen waren zu 47% BFP-positiv und produktiv infiziert. Unstimulierte CD4⁺ T-Zellen hingegen waren nur zu 2% BFP-positiv. Ruhende, mit CCL19 behandelte CD4⁺ T-Zellen zeigten keine BFP-Expression. In den unbehandelten ruhenden CD4⁺ T-Zellen hingegen war eine kleine Population BFP-positiver Zellen auszumachen (**Abbildung 23**, rote Markierung).

Ein Anteil Venus-positiver latenter Zellen war in allen Populationen direkt nach Infektion nachzuweisen, verringerte sich aber bis Tag 3 nach Infektion. Die Behandlung mit CCL19 führte in ruhenden T-Zellen dazu, dass sich keine produktive Infektion etablierte und keine BFP-positiven Zellen messbar waren. Somit war in den CCL19-behandelten ruhenden CD4⁺ T-Zellen der relative Anteil Venus-positiver latenter Zellen höher als in unbehandelten ruhenden T-Zellen.

Das Experiment wurde dreimal mit CD4⁺ T-Zellen verschiedener Spender wiederholt. In diesen drei Experimenten konnte wiederholt beobachtet werden, dass eine Stimulation der CD4⁺ T-Zellen zu einem hohen Anteil BFP-positiver infizierter Zellen führte. Ein Unterschied in der Venus- und BFP-Expression zwischen CCL19-behandelten und unbehandelten ruhenden CD4⁺ T-Zellen konnte in diesen drei Infektionsexperimenten nicht beobachtet werden. Die Behandlung mit CCL19 scheint spenderabhängig eine produktive Infektion in ruhenden CD4⁺ T-Zellen zu vermindern und die Etablierung einer latenten Infektion zu begünstigen.

4. Ergebnisse

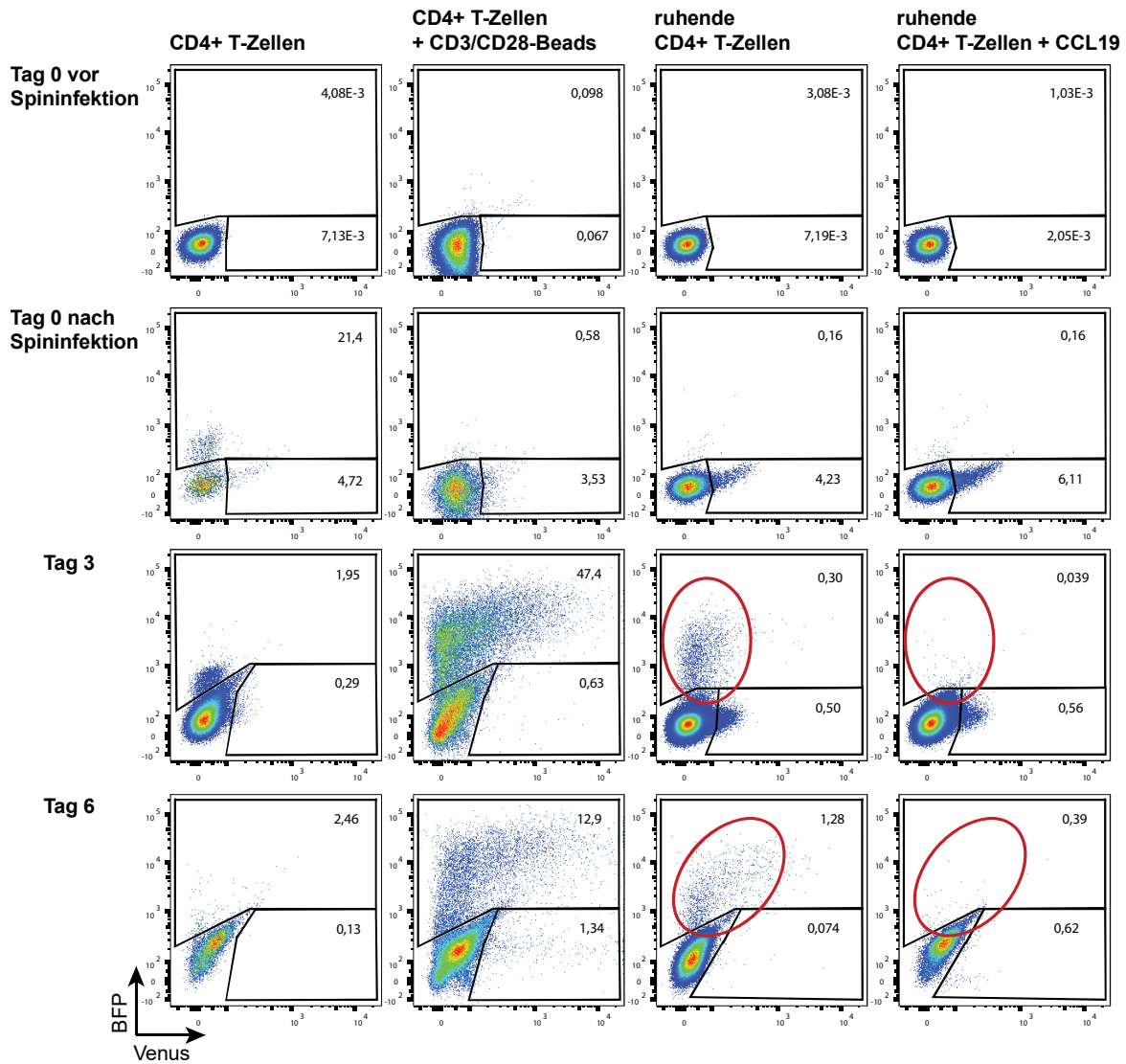


Abbildung 23: Infektion von CD4+ T-Zellen und ruhenden CD4+ T-Zellen nach Behandlung mit CD3/CD28-Beads und CCL19. CD4+ T-Zellen und ruhende, CD69- und CD25-negative CD4+ T-Zellen wurden isoliert. CD4+ T-Zellen wurden mit CD3/CD28-Beads und 100 U/ml IL-2 aktiviert oder unbehandelt belassen. Ruhende CD4+ T-Zellen wurden mit 100 nM CCL19 versetzt oder unbehandelt belassen. Die verschiedenen Ansätze wurden für 3 Tage kultiviert. Die T-Zellen wurden mit 500 ng p24Gag HIVis-env(NL4-3) per 1×10^6 Zellen für 2 h bei 1200 x g inokuliert und anschließend das Virus durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Vor und nach Infektion, sowie 3 und 6 Tage nach Infektion wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich der BFP- und Venus-Expression analysiert. Für die FACS-Analyse wurden lebende Zellen mittels Lebend/Tot-Färbung (Live/Dead Near IR stain) diskriminiert.

4.2 Aktivierung des 5'LTR mittels CRISPR/Cas-9-Systeme

Latent infizierte Zellen, die ein vollständiges provirales Genom tragen, jedoch transkriptionell ruhen und keine viralen Gene exprimieren, bilden eine entscheidende Hürde bei Eradizierungsstrategien. Maßnahmen zur transkriptionellen Aktivierung der latent infizierten Zellen können zu einem besseren Verständnis von HIV-Latenz und zur Charakterisierung und Quantifizierung des latenten Reservoirs führen. Aktuell werden LRAs eingesetzt, um das latente Reservoir zu aktivieren und anschließend zu identifizieren und quantifizieren. LRAs wie HDACi oder PKC-Aktivatoren sind jedoch in ihrer Wirkung nicht auf HIV-infizierte Zellen limitiert und wirken nicht sequenzspezifisch auf den LTR-Promotor. Um eine spezifische transkriptionelle Aktivierung zu erreichen, die unabhängig von Signalwegen der Zelle ist, wurden in dieser Arbeit zwei CRISPR/Cas9-abgeleitete Systeme verwendet, die transkriptionelle Transaktivatoren an den HIV-1 LTR-Promotor rekrutieren sollen. Das Kapitel 4.2 wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrike Lange (Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie und Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

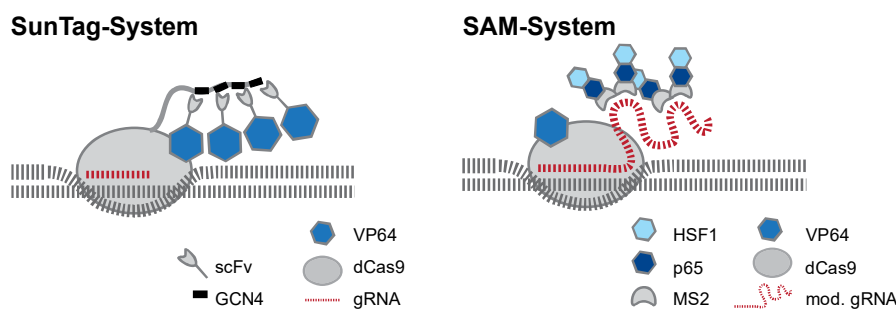


Abbildung 24: Schema des SunTag- und SAM-Systems. In beiden Systemen wird über eine komplementäre gRNA eine enzymatisch inaktive dCas9 mit multiplen Aktivatorodomänen (VP64, HSF1, p65) an die Zielsequenz rekrutiert.

Die verwendeten CRISPR/Cas9-abgeleiteten Systeme bestehen aus einer enzymatisch inaktiven *dead*-Cas9 Nuklease (dCas9), die über Bindung an eine komplementäre guideRNA (gRNA) an die Zielsequenz rekrutiert wird. Im Falle des SunTag-Systems (Tanenbaum et al., 2014) ist die dCas9 fusioniert mit einem Peptid-Array aus dem *general control protein 4* (GCN4), genannt SunTag. An das Peptid-Array können VP64-Aktivatorodomänen binden, die durch Fusion mit *single chain variable fragment* (scFv)-Antikörpern eine Bindungsspezifität für GCN4 Peptide haben. Im Falle des SAM-Systems (*synergistic activation mediator*) (Konermann et al., 2015) ist die dCas9 direkt fusioniert mit einer VP64-Aktivatorodomäne. Die gRNA enthält zusätzlich Aptamere, an die *MS2 bacteriophage coat proteins*, kurz MS2 Proteine, binden können. MS2 Proteine sind in diesem System fusioniert mit der NF-κB

transaktivierenden Untereinheit p65 und der *heat shock factor 1* (HSF1)-Aktivierungsdomäne, die über Bindung von MS2 an die Aptamere der modifizierten gRNA an die Zielsequenz gebracht werden.

4.2.1 Identifizierung einer Zielregion im HIV-1 5'LTR

Um die CRISPR/Cas9-abgeleiteten Transaktivator-Systeme für die Aktivierung von HIV zu adaptieren, wurde basierend auf der Sequenz des HIV-1 Isolats HXB2 (GenBank #K03455.1) eine Reihe von gRNAs entworfen, die den HIV 5'LTR abdecken. Die gRNAs 3 bis 8 decken speziell einen Bereich in der U3-Region des 5'LTR ab, der eine Reihe von Transkriptionsfaktorbindestellen enthält und kürzlich erfolgreich in einer Studie zur TALE-vermittelten Aktivierung des HIV-LTR genutzt wurde (Geissler et al., 2015). Die verschiedenen gRNAs bestehen aus einer *spacer*- und einer *scaffold*-Sequenz. Die *scaffold*-Sequenz ist für die Bindung des Cas9-Proteins essentiell. Im Falle des SAM-Systems ist sie um MS2-Aptamere ergänzt. Die 20 nt lange *spacer*-Sequenz entspricht der Zielsequenz im Genom und bindet an den nichtkodierenden Strang. Stromabwärts der Zielsequenz muss auf dem kodierenden Strang das *protospacer adjacent motif* (PAM) 5'-NGG-3' direkt folgen. Die *spacer*-Sequenzen der entsprechenden gRNAs binden im 5'LTR von bp 28 bis bp 388 (gRNA1 bis -8) (**Abbildung 25**). Zusätzlich wurde eine gRNA entworfen, die in der U5-Region an Position bp 600 bis bp 619 bindet (gRNA9).

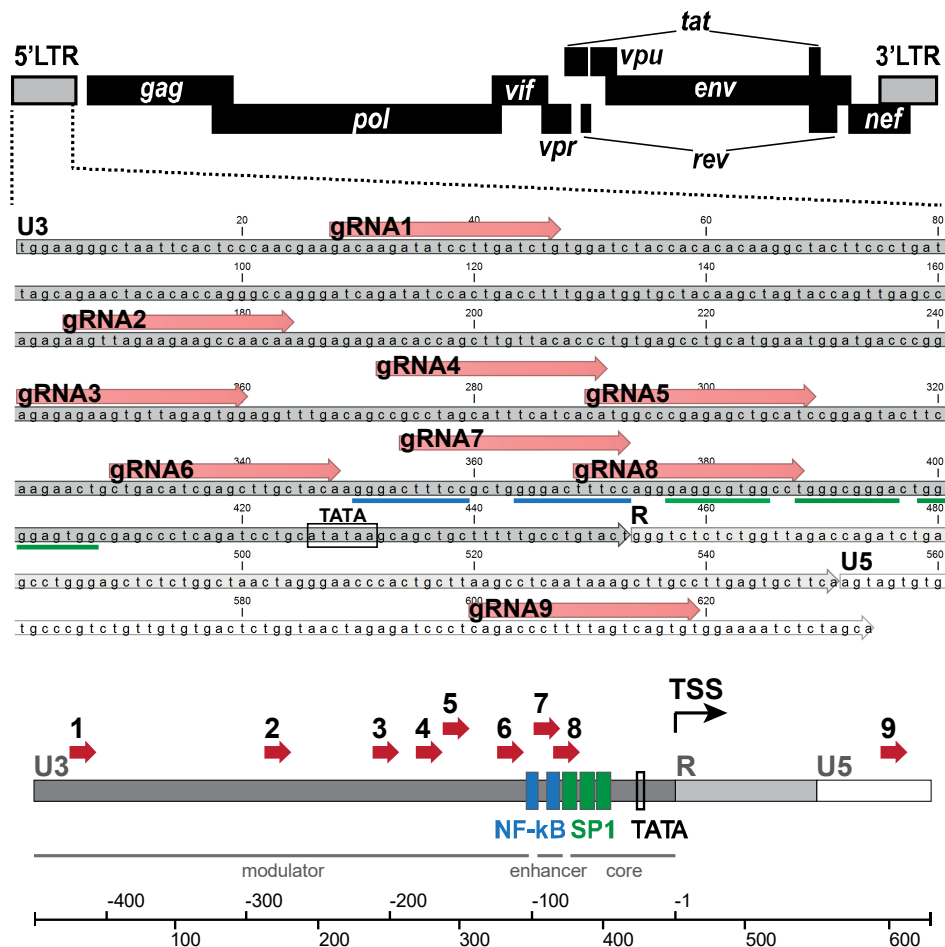


Abbildung 25: Design von gRNAs im HIV 5'LTR. Gezeigt ist die 5'LTR-Sequenz aus dem Virusisolat HXB2 mit *spacer*-Sequenzen der gRNAs 1-9 (rote Pfeile). Die gRNAs decken die U3-Region vor der Transkriptionsstartstelle (TSS) ab, die Transkriptionsfaktorbindestellen für NF-κB und SP1 trägt. Die gRNA9 bindet außerhalb von U3 in der U5-Region.

Die verschiedenen gRNAs wurden zusammen mit den SAM- oder SunTag-Komponenten in TZM-bl Zellen transfiziert. TZM-bl sind abgeleitet von HeLa Zellen und tragen einen Luciferase-Reporter unter der Kontrolle des HIV LTR-Promotors. Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach Transfektion in Relation zur Kontrolle (SunTag- bzw. SAM-Komponenten und gRNA-Expressionsplasmid ohne *spacer*-Sequenz) gemessen. Die Expressionsplasmide für dCas9-VP64 und MS2-p65-HSF1 tragen das Gen für GFP als Transfektionskontrolle. Der Anteil aktivierter Zellen wurde auf den Anteil GFP-positiver transfizierter Zellen bezogen.

4. Ergebnisse

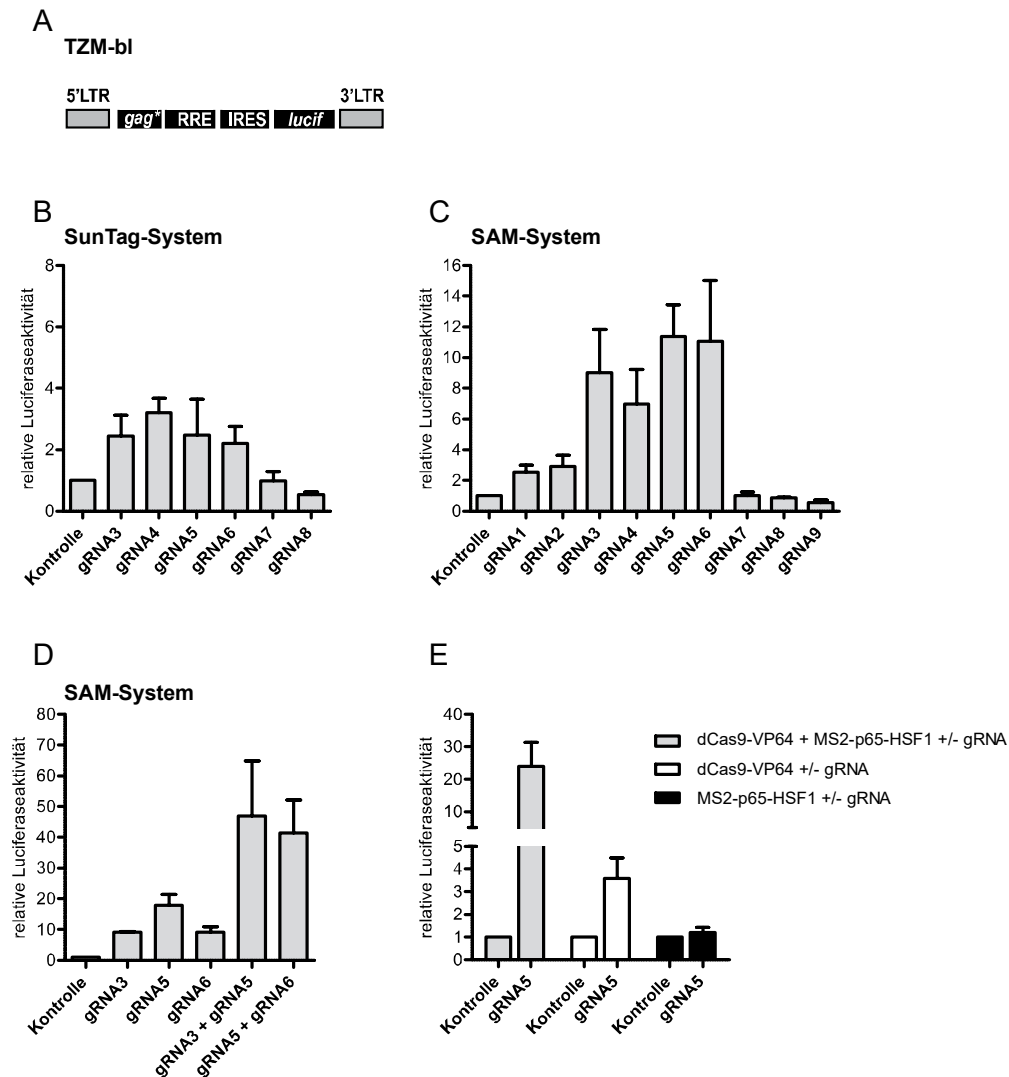


Abbildung 26: Aktivierung des HIV LTR-Promotors in TZM-bl mittels CRISPR/Cas9-abgeleiteter Systeme. (A) TZM-bl Zellen tragen einen Luciferase Reporter unter der Kontrolle des HIV 5'LTR-Promotors. TZM-bl Zellen wurden mit (B) den SunTag-Komponenten bzw. (C) den SAM-Komponenten und entsprechendem gRNA-Expressionsplasmid transfiziert und 48 h nach Transfektion die Luciferaseaktivität bezogen auf transfizierte Zellen in Relation zur Negativkontrolle (SAM- bzw. SunTag-Komponenten mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz) gemessen. (D) Eine Kombination verschiedener gRNAs bzw. (E) einzelne Komponenten des SAM-Systems wurden in TZM-bl transfiziert. Gezeigt sind Ergebnisse von drei (A, B) bzw. zwei (D, E) unabhängigen Experimenten.

Beide CRISPR/Cas9-abgeleiteten Aktivatorsysteme, das SunTag- und das SAM-System, führten in TZM-bl Zellen zu einer Aktivierung des LTR-Promotors. Das SAM-System führte generell zu deutlich höheren Aktivierungsraten als das SunTag-System (Abbildung 26B und C). Eine Rekrutierung der Aktivatorsysteme an die Region stromaufwärts der Transkriptionsfaktorbindestellen, abgedeckt durch gRNA3 bis -6, aktivierte den LTR-Promotor am stärksten. Das SAM-System aktivierte den LTR-Promotor maximal 11-fach (gRNA5), das SunTag-System führte zu maximal 3-facher Aktivierung (gRNA4). Die Aktivierung ist in besonderem Maße sequenzspezifisch, so konnte mit gRNA7 bis -9 keine

Aktivierung gemessen werden, die über das Maß der Negativkontrolle (gRNA ohne *spacer*-Sequenz) hinausging.

Die Region von 213 bp bis 106 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) scheint besonders für eine transkriptionelle Aktivierung durch die CRISPR/Cas9-abgeleiteten Systeme geeignet zu sein, mit einer maximalen Aktivierung vermittelt durch gRNA5. Die Wirkung von gRNA5 konnte durch Kombination mit gRNA3 oder gRNA6 noch potenziert werden (**Abbildung 26D**). Die Aktivierung durch das vollständige SAM-System war der Aktivierung nur durch dCas9-VP64 oder nur durch p65 und HSF1 überlegen (**Abbildung 26E**).

4.2.2 SAM-vermittelte Aktivierung in HIV-1 Latenzmodellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob das CRISPR/Cas9-abgeleitete System geeignet ist, um provirale HIV-1 Genome aus der Latenz in einen transkriptionell aktiven Zustand zu überführen. Für diese Untersuchung wurde sich auf das SAM-System konzentriert, das dem SunTag-System in TZM-bl Zellen überlegen war. Die SAM-Komponenten wurden zusammen mit den entsprechenden gRNAs in HIVisB2 Zellen transfiziert und der Anteil aktivierter BFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Für die Expression in HIVisB2 Zellen wurden gRNAs basierend auf der Sequenz des HIV-1 Isolats NL4-3 (Adachi et al., 1986) verwendet. Die Expressionsplasmide für dCas9-VP64 und MS2-p65-HSF1 tragen das Gen für GFP als Transfektionskontrolle. Für die Berechnung des Anteils aktivierter BFP-positiver Zellen wurden nur GFP-positive transfizierte Zellen berücksichtigt.

In HIVisB2 Zellen zeigte sich ein ähnliches Muster wie in TZM-bl Zellen. Die Transfektionen mit SAM-Komponenten und gRNA3 bis -6 führten zu einer signifikanten Aktivierung der HIVisB2 Zellen (**Abbildung 27A**). Ein maximaler Anstieg auf 72% BFP-positive Zellen konnte 96 h nach Transfektion mit gRNA5 gemessen werden. Durch gRNA1, -2 und -7 bis -9 konnte keine Aktivierung vermittelt werden, die signifikant über dem Wert der Kontrolle lag (SAM-Komponenten mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz).

4. Ergebnisse

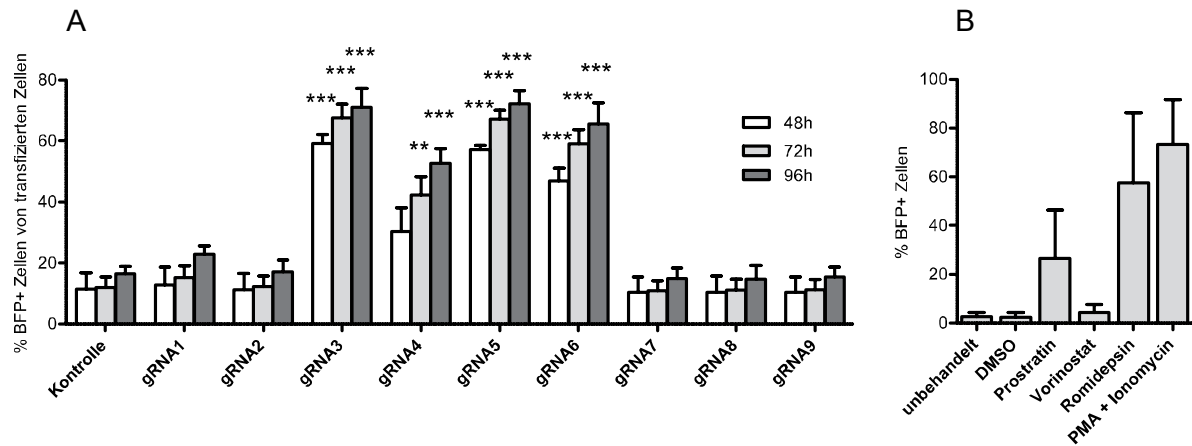


Abbildung 27: Aktivierung von HIVisB2 Zellen mittels SAM-System und LRAs. **(A)** HIVisB2 Zellen wurden mit den SAM-Komponenten und entsprechender gRNA transfiziert und der Anteil BFP-positiver Zellen bezogen auf die transfizierten Zellen 48, 72 und 96 h nach Transfektion durchflusszytometrisch gemessen. Eine Transfektion mit SAM-Komponenten und gRNA ohne *spacer*-Sequenz diente als Kontrolle. **(B)** HIVisB2 Zellen wurden mit klinisch relevanten Konzentrationen von LRAs behandelt und nach 24 h durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels *two-way analysis of variance* (ANOVA) bezogen auf die Kontrolle berechnet (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Aktivierung durch das SAM-System erreichte Niveaus die vergleichbar waren mit denen von LRAs (**Abbildung 27B** Romidepsin, PMA-Ionomycin) oder diesen sogar überlegen waren (**Abbildung 27B** Prostratin, Vorinostat).

In SAM-gRNA5 transfizierten HIVisB2 Zellen korrelierte die Expression des Fluoreszenzreporters BFP mit der Expression der viralen Gene *tat* und *gag*, deren Expression 72 h nach Transfektion mittels *Realtime*-PCR bestimmt wurde (**Abbildung 28A** und **B**). Weiterhin konnte intrazelluläres virales Protein $p24^{Gag}$ durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, welches mit der Expression von BFP korrelierte (**Abbildung 28C**). In Zellen, die mit gRNA8 oder gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) und SAM-Komponenten transfiziert wurden, konnte kein signifikanter Anstieg viraler Transkripte und kein $p24^{Gag}$ -Protein detektiert werden.

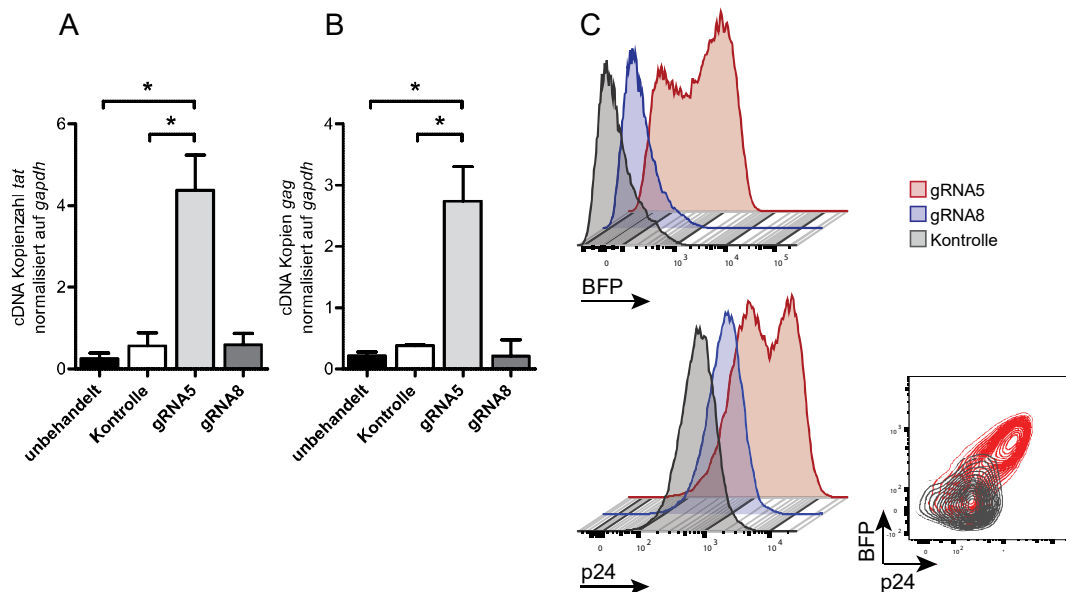


Abbildung 28: SAM-Aktivierung in HIVisB2 Zellen führt zu RNA- und Proteinexpression. HIVisB2 Zellen wurden mit den SAM-Komponenten und gRNA5, gRNA8 oder gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) transfiziert und 72 h nach Transfektion RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels *Realtime*-PCR die Kopien von *tat* (A) und *gag* (B) bezogen auf *gapdh* gemessen. Signifikanzen wurden mittels *one-way analysis of variance* (ANOVA) berechnet (* $p < 0,05$). Gezeigt sind Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. (C) 72 h nach Transfektion wurde der Anteil BFP-positiver Zellen und der Anteil p24^{Gag}-positiver Zellen nach intrazellulärer p24-Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Der Konturplot zeigt SAM-gRNA5 transfizierte Zellen (rot) und Kontrollzellen (grau).

In Abbildung 13 konnte beobachtet werden, dass LRAs in verschiedenen Latenzmodellen zu einer unterschiedlich starken HIV-Aktivierung führen. Um zu untersuchen, ob auch das SAM-System in verschiedenen Latenzmodellen unterschiedlich effektiv ist, wurde das SAM-System zusätzlich in JLat6.3 Zellen getestet. JLat6.3 Zellen tragen einen proviralen GFP-Reporter eingefügt in das *nef*-Gen (Jordan et al., 2003). Zur Diskriminierung der transfizierten Zellen wurde das *gfp*-Gen in den SAM-Expressionsplasmiden gegen *bfp* als Transfektionskontrolle ausgetauscht. Für die Expression in JLat6.3 Zellen wurden gRNAs basierend auf dem HIV-1 Isolat HXB2 verwendet.

In JLat6.3 Zellen konnte durch das SAM-System und gRNA5 eine ähnliche Rate aktivierter Zellen wie in HIVisB2 Zellen erreicht werden (69% verglichen zu 72% 96 h nach Transfektion; **Abbildung 29B**). Die außerhalb der optimalen Zielsequenz liegende gRNA8 führte zu keinem signifikanten Anstieg der GFP-Expression verglichen mit der Kontrolle. Die Aktivierungsraten die in JLat6.3 Zellen durch das SAM-System erreicht wurden, waren der Aktivierung durch LRAs in klinisch relevanten Konzentrationen deutlich überlegen (**Abbildung 29C**).

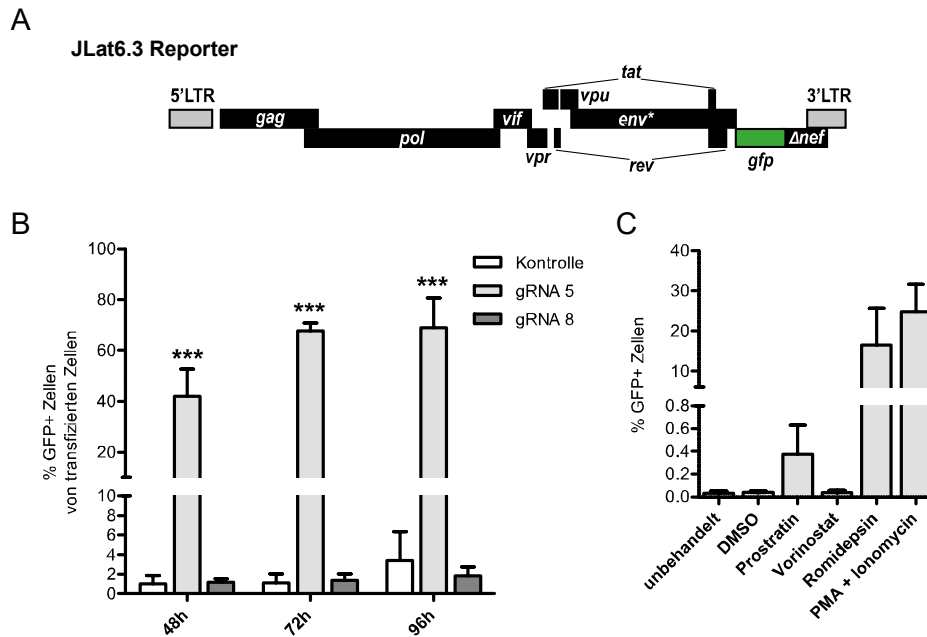


Abbildung 29: Aktivierung von JLat6.3 Zellen mittels SAM-System und LRAs. (A) Schema des JLat6.3 Reporters. JLat6.3 Zellen tragen das *gfp*-Gen eingefügt in den *nef*-ORF und eine *frameshift*-Mutation im *env*-Gen. (B) JLat6.3 Zellen wurden mit den SAM-Komponenten und gRNA5, -8 oder gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) transfiziert und der Anteil GFP-positiver Zellen bezogen auf die transfizierten Zellen 48, 72 und 96 h nach Transfektion durchflusszytometrisch gemessen. (C) JLat6.3 Zellen wurden mit klinisch relevanten Konzentrationen von LRAs behandelt und nach 24 h. durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels *two-way analysis of variance* (ANOVA) bezogen auf die Kontrolle berechnet (***) $p < 0,001$.

4.2.3 SAM-vermittelte HIV-Aktivierung führt zur vollständigen Virusreplikation

In dem JLat6.3 sowie HIVisB2 Latenzmodell konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch das SAM-System zusammen mit der optimalen gRNA5 zu einer starken Reportergenexpression, sowie zu einem Anstieg der viralen Transkripte *tat* und *gag* sowie des viralen Proteins p24^{Gag} führte. Ein Nachweis der Freisetzung von infektiöser viralen Partikeln konnte in diesen Systemen jedoch nicht erfolgen, da die JLat6.3 und HIVisB2 Zelllinie eine *frameshift*-Mutation bzw. Deletion im *env*-Gen besitzen und dadurch replikationsinkompetent sind. Um die Freisetzung von infektiösen Nachkommenviren zu untersuchen, wurde ein replikationskompetentes HIV-1 Latenzmodell verwendet. Das J89 Latenzmodell ist abgeleitet von Jurkat Zellen und enthält ein voll replikationskompetentes provirales HIV-1 Genom basierend auf der Sequenz des HXB2-Isolats, mit einem *gfp*-Gen eingefügt zwischen *env*- und *nef*-Gen (Kutsch et al., 2002). Der GFP-Reporter wird in Abhängigkeit des LTR-Promotors exprimiert. Unter unbehandelten Bedingungen ist der LTR-Promotor in der J89 Zelllinie transkriptionell inaktiv und es ist keine GFP-Expression messbar.

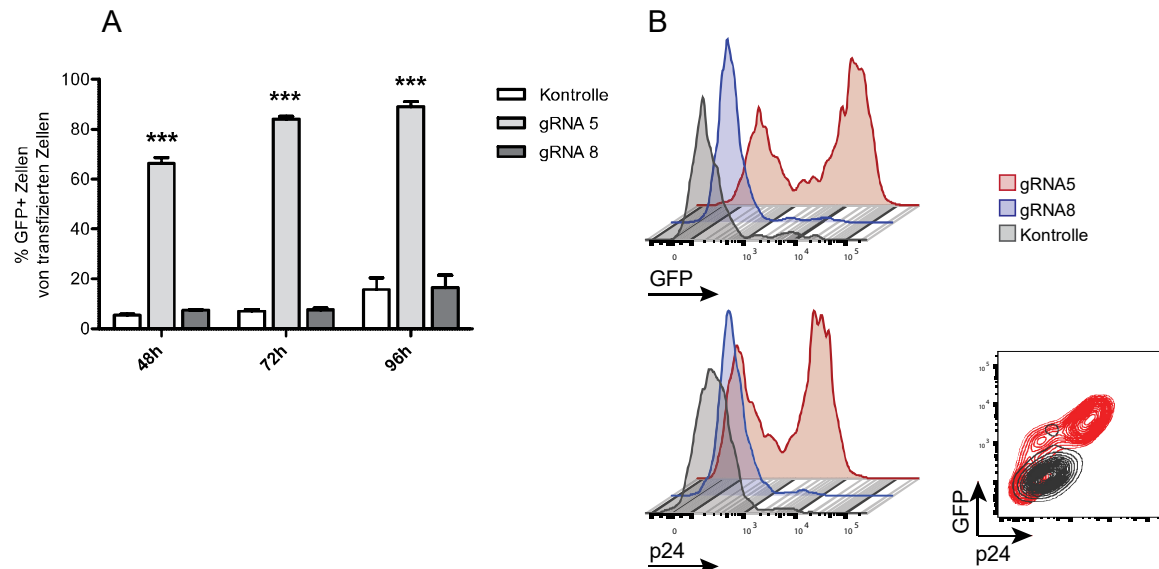


Abbildung 30: Aktivierung von J89 Zellen mittels SAM-System. **(A)** J89 Zellen wurden mit den SAM-Komponenten und gRNA5, gRNA8 oder gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) transfiziert und 48, 72 und 96 h nach Transfektion der Anteil GFP-positiver Zellen bezogen auf transfizierte Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Signifikanzen wurden mittels *two-way analysis of variance* (ANOVA) berechnet (* $p < 0,001$). Gezeigt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** 72 h. nach Transfektion wurde der Anteil GFP-positiver Zellen und der Anteil p24^{Gag}-positiver Zellen nach intrazellulärer p24-Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Der Konturplot zeigt SAM-gRNA5 transfizierte Zellen (rot) und Kontrollzellen (grau).

Die SAM-Komponenten zusammen mit gRNA5 bzw. gRNA8 oder gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) wurden in J89 transfiziert und die GFP-Reportergenexpression 48, 72 und 96 h nach Transfektion gemessen. Die Expression des SAM-Systems zusammen mit gRNA5 führte zu einer Induktion von bis zu 89% GFP-positiven Zellen 96 h. nach Transfektion (**Abbildung 30A**). Die Transfektion mit gRNA8 führte zu keinem signifikanten Anstieg der GFP-Expression verglichen mit der Kontrolle. Die Expression des GFP-Reporters lief einher mit der Expression des HI-viralen Proteins p24^{Gag} (**Abbildung 30B**).

Um die virale Partikelproduktion nach Aktivierung durch das SAM-System zu untersuchen, wurden SAM-aktivierte J89 Zellen zusammen mit Empfängerzellen in einem *Transwell*-System kokultiviert. J89 Zellen wurden mit den SAM-Komponenten und gRNA5 transfiziert und GFP-positive Zellen 72 h nach Transfektion durchflusszytometrisch angereichert. Die aktivierten J89 Zellen wurden zusammen mit MOLT-4/CCR5 Empfängerzellen kultiviert. In dem *Transwell*-System sind die beiden Zellpopulationen voneinander abgegrenzt. Ein Austausch des Zellkulturmediums einschließlich potentieller Viruspartikel ist jedoch über die 0,4 μm großen Poren der *Transwell*-Membran möglich. MOLT-4/CCR5 sind eine T-Zelllinie, die die für die HIV-Infektion essentiellen Rezeptoren CD4 und CCR5 exprimieren (Baba et

4. Ergebnisse

al., 2000). In dem *Transwell*-System dienen sie dazu, etwaige von J89 Zellen freigesetzte virale Partikel zu amplifizieren.

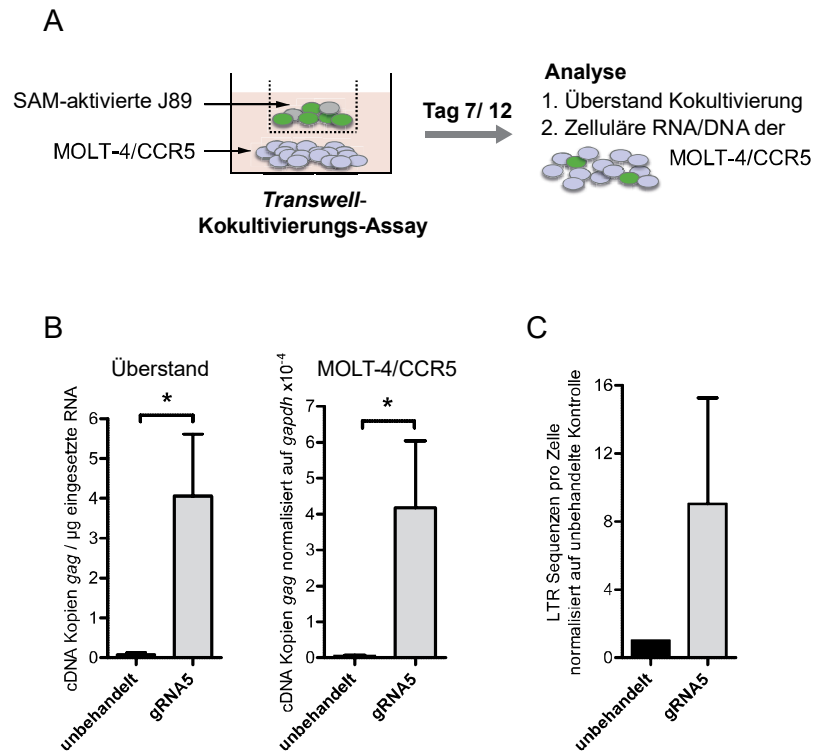


Abbildung 31: Kokultivierung von SAM-aktivierten J89 Zellen mit MOLT4-/CCR5. **(A)** J89 Zellen wurden mit SAM-Komponenten und grNA5 transfiziert und 72 h nach Transfektion aktivierte GFP-positive Zellen durchflusszytometrisch angereichert. SAM-aktivierte J89 Zellen wurden mit MOLT-4/CCR5 Zellen in einem *Transwell* (Porengröße 0,4 µm) kokultiviert. **(B)** Nach 7 Tagen der Kokultivierung wurde RNA aus Überstand und MOLT-4/CCR5 Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels ddPCR die Kopien von *gag* bezogen auf eingesetzte RNA bzw. *gapdh* gemessen. Eine Kokultivierung von untransfizierten J89 mit MOLT4/CCR5 diente als Kontrolle (unbehandelt). Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney Test berechnet (* $p < 0,05$). **(C)** Nach 12 Tagen der Kokultivierung wurde genomische DNA aus MOLT-4/CCR5 Zellen isoliert und mittels ddPCR LTR-Sequenzen und Kopien des *single-copy*-Gens *rpp30* gemessen. LTR-Sequenzen pro Zelle wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Nach 7 Tagen der Kokultivierung wurde Zellkulturüberstand und ein Teil der MOLT-4/CCR5 Zellen entnommen, RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Im Überstand als auch in den MOLT-4/CCR5 Zellen konnte ein signifikanter Anstieg von *gag* Kopien mittels ddPCR nachgewiesen werden (**Abbildung 31B**). Als Kontrolle diente ein *Transwell*-Experiment mit unbehandelten J89 und MOLT-4/CCR5 Zellen. Nach 12 Tage der Kokultivierung wurde das Experiment beendet und genomische DNA der MOLT-4/CCR5 isoliert. Mittels ddPCR konnten HIV-LTR-Sequenzen in der genomischen DNA der MOLT-4/CCR5 Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 31C**), die auf eine Infektion durch von J89 Zellen freigesetzte virale Partikeln hinweisen.

4.2.4 Auswirkungen von Sequenzvariationen auf SAM-vermittelte Aktivierung

Die vorhergegangenen Experimente haben gezeigt, dass gRNA5 zusammen mit den SAM-Komponenten zu einer spezifischen transkriptionellen Aktivierung des latenten HIV-1 LTR-Promotors *in vitro* führte. Um eine mögliche Anwendung des SAM-Systems zur Aktivierung des latenten Reservoirs *in vivo* zu evaluieren, wurde der Einfluss von Sequenzvariationen im 5'LTR in der optimalen Zielregion des SAM-Systems untersucht.

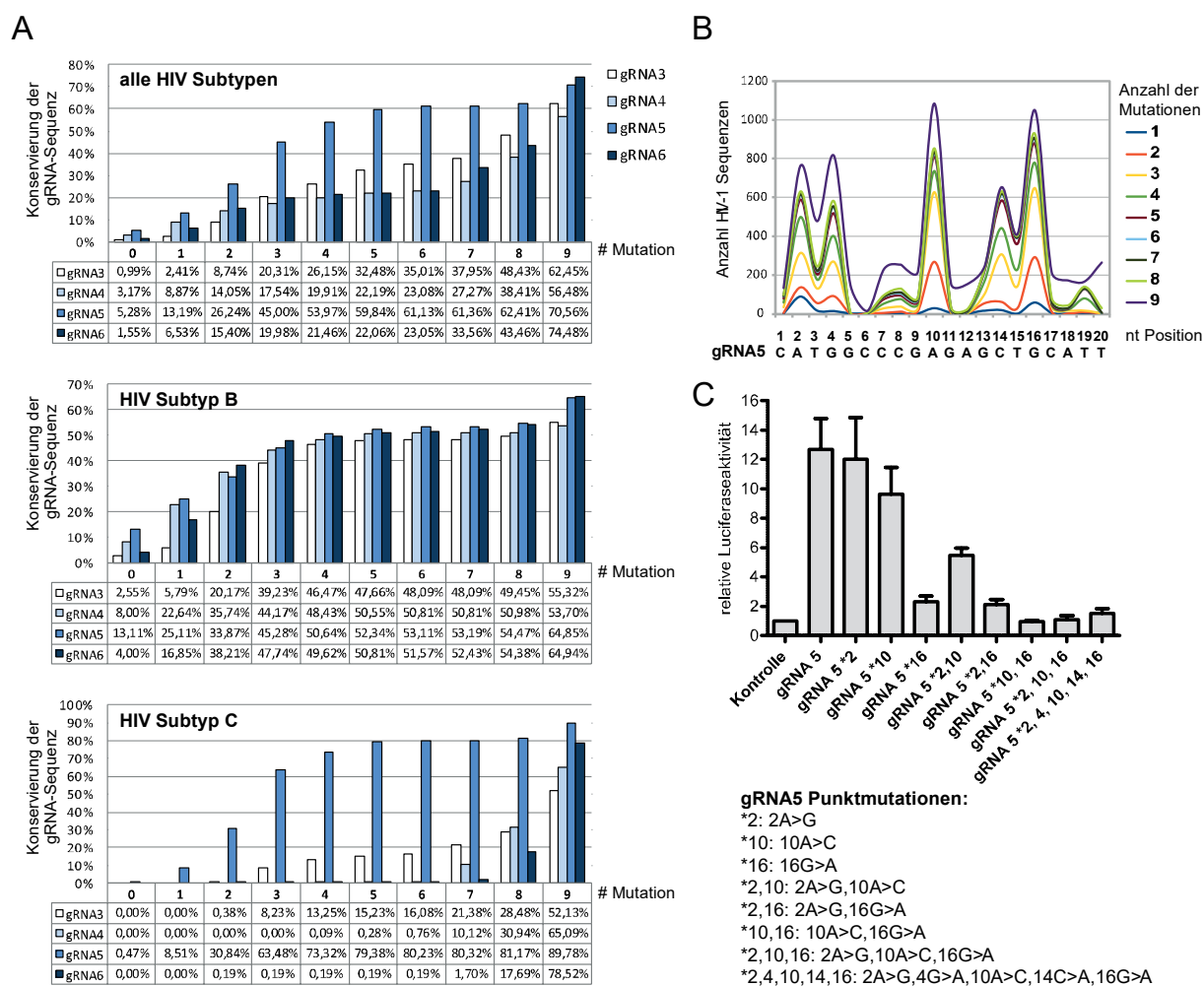


Abbildung 32: Konservierung der Sequenzen von gRNA3 bis -6 und Einfluss auf die SAM-vermittelte Aktivierung in TZM-bl. (A) Konservierung der gRNA3 bis -6 Sequenzen (basierend auf HXB2-Isolat) im Vergleich zu Sequenzen aus der Los Alamos HIV Sequenzdatenbank bezüglich aller HIV Subtypen, Subtyp B und Subtyp C. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Wiederfindung innerhalb der Datenbanksequenzen nach Zulassung von 0 bis 9 Punktmutationen in der entsprechenden gRNA-Sequenz. (B) Häufigkeiten der auftretenden Mutationen innerhalb der gRNA5-Sequenz. Gezeigt ist die Anzahl der gefundenen Datenbanksequenzen mit entsprechender Anzahl an Mutationen (verschiedene Farben indizieren Zahl der Mutationen) innerhalb der gRNA5-Sequenz. (C) Die am häufigsten auftretenden Mutationen wurden in die gRNA5-Sequenz eingefügt (* bezeichnet die Position der Mutation) und zusammen mit den SAM-Komponenten in TZM-bl Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität bezogen auf transfizierte Zellen in Relation zur Negativkontrolle (SAM-Komponenten mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz) gemessen. Gezeigt sind Experimente von drei unabhängigen Experimenten.

4. Ergebnisse

Die Konservierung der Sequenz von gRNA3, -4, -5 und -6 wurde innerhalb des 5'LTR analysiert. Dabei wurde die entsprechende gRNA-Sequenz mit den Sequenzen von klinischen Isolaten aus der Los Alamos National Laboratory HIV Sequenzdatenbank verglichen (**Abbildung 32A**). Die Sequenz der gRNA5 ist die konservierteste der vier untersuchten gRNA-Sequenzen. Sie lässt sich in 5% der Sequenzen aller HIV-1 Subtypen, sowie in 13% aller Subtyp B und 0,5% aller Subtyp C Isolate wiederfinden. Lässt man zwei Punktmutationen innerhalb der 20 nt Sequenz zu, erhöht sich die Konserviertheit der gRNA5-Sequenz auf 26% aller HIV-1 Sequenzen, 34% der Subtyp B Sequenzen und 31% der Subtyp C Sequenzen. Für alle erhaltenen HIV-1 Sequenzen zeigt sich, dass die gRNA3, -4 und -6-Sequenzen weit weniger konserviert sind als die gRNA5-Sequenz. So müssen 9 Mutationen in gRNA3, -4 und -6 erlaubt sein, um über 50% aller HIV-1 Datenbank-Sequenzen wiederzufinden, jedoch nur 4 Mutationen in gRNA5.

Eine genauere Untersuchung der gRNA5-Sequenz zeigt, dass an Position 2 und 4 am 5' Ende der Sequenz und zentral an Position 10 und an Position 14 und 16 in der *seed region* die Sequenz am variabelsten ist (**Abbildung 32B**). Um den Effekt dieser Variationen zu untersuchen, wurden Mutanten der gRNA5 generiert und zusammen mit den SAM-Komponenten in TZM-bl transfiziert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Nukleotide wurden entsprechend der am häufigsten auftretenden Variationen ausgetauscht. Die häufigste Variation bei einer erlaubten Mutation ist beispielsweise ein Austausch von A zu G an Position 2, abgekürzt als gRNA5*2. Bei zwei erlaubten Mutationen ist am häufigsten ein Austausch von A zu C an Position 10 und G zu A an Position 16 zu finden (gRNA5*10, 16) (siehe **Abbildung 32B** und **Abbildung 33**). Mutationen an Position 2 oder 10 haben einzeln kaum einen Effekt auf die SAM-vermittelte Aktivierung (**Abbildung 32C**). Mutationen an beiden Positionen führen zu einer Reduzierung der Luciferase-Aktivität um ca. 50%. Eine Mutation an Position 16 in der *seed region* hingegen führt zu einem fast vollständigen Verlust der Luciferase-Aktivität.

gRNA5 Sequenz CATGCCCCGAGAGCTGCATC

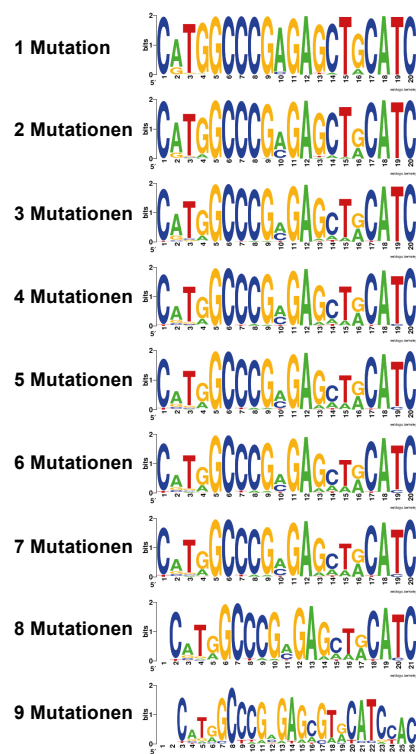


Abbildung 33: Sequenzlogos der gRNA5-Sequenz mit bis zu 9 erlaubten Mutationen. Die Los Alamos HIV-Sequenzdatenbank wurde für die Untersuchung der Konservierung der gRNA5(HXB2)-Sequenz genutzt und Sequenzlogos mithilfe von Weblogo2.8.2 (Crooks et al., 2004) erstellt.

Die Analyse der Konservierung der gRNA-Sequenzen innerhalb des 5'LTRs verschiedener HIV-Isolate und Subtypen wurde in Zusammenarbeit mit M.Sc. Michael Spohn (Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie) durchgeführt.

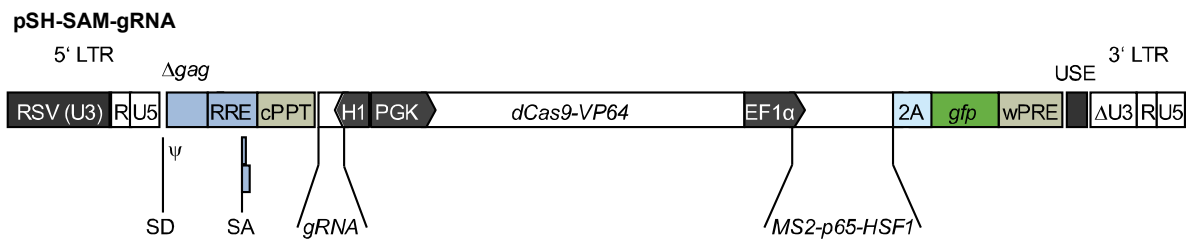
4.3 Übertragung des SAM-Systems auf primäre Zellen

Im vorherigen Abschnitt konnte in Zelllinien gezeigt werden, dass das SAM-System bei der Rekrutierung an eine optimale Sequenz innerhalb des HIV 5'LTR-Promotors zu einer robusten Aktivierung der viralen Transkription führt, die in einer Freisetzung von viralen Partikeln resultiert. Um das Potential des SAM-Systems in primären Zellen und in Zellen aus HIV-Patienten zu testen, müssen Wege der Übertragung der SAM-Komponenten in primäre Zellen gefunden werden. Der größte Anteil HIV-infizierter Zellen im Patienten sind CD4⁺ T-Zellen. Primäre CD4⁺ T-Zellen lassen sich jedoch schlecht bis gar nicht mit DNA transfizieren (Zhao et al., 2006). Im folgenden Abschnitt wurde die Möglichkeit der Übertragung der SAM-Komponenten in primäre CD4⁺ T-Zellen mittels lentiviraler Vektorsysteme evaluiert.

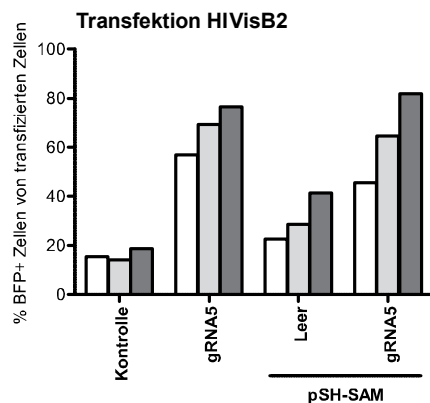
4.3.1 Generierung lentiviraler Vektoren zum Gentransfer

Um die SAM-Komponenten in primäre CD4⁺ T-Zellen zu transferieren, wurde ein lentiviraler Vektor konstruiert (siehe *Tabelle 13: Klonierungsstrategien der modifizierten SAM-Expressionplasmide und lentiviralen Vektoren.*). Der Vektor pSH-SAM enthält alle Komponenten des SAM-Systems auf einem Konstrukt (**Abbildung 34A**). Die Sequenz des dCas9-VP64 Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines PGK-Promotors, die gRNA wird in entgegengesetzter Leserichtung durch einen H1-Promotor exprimiert, und die Aktivatoren MS2-p65-HSF1 sowie das Gen für GFP werden unter der Kontrolle eines EF1 α -Promotors exprimiert. Die GFP- und MS2-p65-HSF1-Sequenz sind dabei durch die Sequenz eines 2A-Peptids (aus dem equinen Rhinitis-A Virus) getrennt, welches die Produktion equimolarer Mengen an GFP und MS2-p65-HSF1 von derselben mRNA erlaubt (Donnelly et al., 2001). Als Kontrolle wurde ein Vektorplasmid mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz hergestellt (pSH-SAM-Leer). Zur Überprüfung der Funktionalität der SAM-Komponenten auf dem lentiviralen Vektorkonstrukt wurde Vektor-DNA in HIVisB2 Zellen transfiziert und 48, 72 und 96 h nach Transfektion der Anteil BFP-positiver Zellen der GFP-positiven transfizierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Das pSH-SAM-gRNA5 Konstrukt führte 96 h nach Transfektion zu einer Aktivierung von 82% BFP-positiven Zellen. Dies war vergleichbar mit der Aktivierungsrate erreicht durch Transfektion der SAM-Komponenten und gRNA5 auf einzelnen Expressionsplasmiden (77% BFP-positive Zellen) (**Abbildung 34B**). Das pSH-SAM-Leer Konstrukt führte zu einer doppelt so hohen Aktivierung wie die SAM-Komponenten mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) auf einzelnen Expressionsplasmiden (42% und 19% BFP-positive Zellen, **Abbildung 34B**).

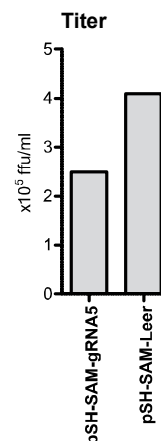
A



B



C



D

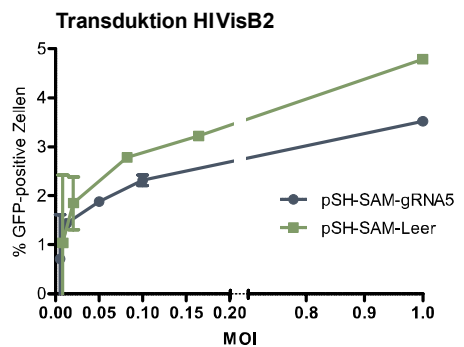


Abbildung 34: Transfektion und Transduktion von HIVisB2 Zellen mit pSH-SAM-gRNA5. (A) Schema des lentiviralen Vektors pSH-SAM-gRNA. Der Vektor enthält selbstinaktivierende (SIN) LTRs mit Rous Sarcoma Virus (RSV)-U3-Promotor und einer Deletion in der U3-Region (Δ U3), Splice-Donor und -Akzeptor (SD, SA), ein Verpackungssignal (Ψ), das *Rev response element* (RRE), den zentralen Polypurintrakt (cPPT), eine verkürzte *gag*-Sequenz, ein postregulatorisches Element aus dem Woodchuck Hepatitis Virus (wPRE) und SV40 *upstream polyadenylation enhancer elements* (USE). Die Transgenkassette kodiert für die gRNA-Sequenz unter der Kontrolle des H1-Promotors, dCas9-VP64 unter Kontrolle des PGK-Promotors und MS2-p65-HSF1 unter Kontrolle des EF1 α -Promotors. GFP wird getrennt durch eine 2A-Sequenz vom EF1 α -Promotor exprimiert. (B) HIVisB2 Zellen wurden mit pSH-SAM-gRNA5 und pSH-SAM-Leer Vektor-DNA transfiziert und 48, 72 und 96 h nach Transfektion der Anteil BFP-positiver Zellen von transfizierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit den SAM-Komponenten und gRNA5 bzw. gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle) auf jeweils einzelnen Expressionsplasmiden. (C) Lentivirale Partikel wurden mittels Kotransfektion mit pRSV-Rev, pMDL-gag/pol und pCMV-VSV-G in HEK-293T Zellen hergestellt und in HEK-293T Zellen titriert. (D) HIVisB2 Zellen wurden mit pSH-SAM-gRNA5 und pSH-SAM-Leer mit einer MOI von 0,005 bis 1 transduziert und 48 h. nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert.

Von den Vektorkonstrukten pSH-SAM-gRNA5 und pSH-SAM-Leer wurden durch Kotransfektion mit pRSV-Rev, pMDL-gag/pol und pCMV-VSV-G (Beyer, Westphal, Ostertag, & von Laer, 2002; Dull et al., 1998; Sandrin et al., 2002) in HEK-293T Zellen VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Vektoren hergestellt, und mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Anschließend wurde der Titer der lentiviralen Partikel in HEK-293T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Titer der lentiviralen Partikel beliefen sich auf geringe 2,5 bzw. 4×10^5 ffu/ml (pSH-SAM-gRNA5 bzw. -Leer) (Abbildung 34C). Die lentiviralen Partikel wurden in HIVisB2 Zellen ausgetestet. HIVisB2 Zellen wurden mit einer MOI von

4. Ergebnisse

0,005 bis 1 transduziert und 48 h nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. Bei einer MOI von 1 konnten 3,5% beziehungsweise 4,8% (pSH-SAM-gRNA5 bzw. pSH-SAM-Leer) GFP-positive transduzierte Zellen gemessen werden (**Abbildung 34D**). In den GFP-positiven transduzierten Zellen war jedoch keine Aktivierung, also BFP-Expression messbar. HIVisB2 Zellen wurden anschließend zweifach an aufeinander folgenden Tagen transduziert. Eine zweifache Transduktion erhöhte die Transduktionsrate nicht.

Da das Vektorkonstrukt pSH-SAM-gRNA5 mit allen SAM-Komponenten auf einem Vektor nur zu geringen Titern und Transduktionsraten geführt hat (**Abbildung 34C und D**), wurden neue Vektoren konstruiert. Die Komponenten des SAM-Systems wurden auf drei lentivirale Vektoren aufgeteilt mit jeweils einem Fluoreszenzreporter zur Transduktionskontrolle (siehe *Tabelle 13: Klonierungsstrategien der modifizierten SAM-Expressionplasmide und lentiviralen Vektoren.*). Als Basis diente der selbstinaktivierende lentivirale pLenti-Vektor. Die Gene für dCas9-VP64 bzw. MS2-p65-HSF1 werden unter der Kontrolle eines EF1 α -Promotors exprimiert, gefolgt von einer 2A-Sequenz und mCherry- bzw. BFP-Sequenz (**Abbildung 35A**). Die gRNA (gRNA5 bzw. gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Leer)) wird unter der Kontrolle eines U6-Promotors exprimiert, gefolgt von der SFFV-Promotorsequenz und der Sequenz des gelb fluoreszierenden Proteins Venus. Die drei lentiviralen Vektoren tragen somit unterschiedliche Fluoreszenzreporter, sodass die Transduktion mit den drei Komponenten durchflusszytometrisch verfolgt werden kann.

Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurden die Vektoren zusammen mit dem Verpackungsplasmid psPAX2 und pCMV-VSV-G in HEK-293T Zellen kotransfiziert und die lentiviralen Partikel mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Die lentiviralen Partikel wurden in HEK-293T Zellen titriert. Die Titer beliefen sich auf durchschnittlich 2×10^8 ffu/ml (pLenti-gRNA-Venus), 5×10^7 ffu/ml (pLenti-dCas9-mCherry) und 7×10^5 ffu/ml (pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP) (**Abbildung 35B**). CD4⁺ T-Zellen wurden mit aufsteigenden MOI der lentiviralen Vektoren transduziert und 4 oder 5 Tage nach Transduktion der Anteil FACS-positiver Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Nach Transduktion mit pLenti-gRNA-Venus konnten bei einer MOI von 1 bereits 60% beziehungsweise 78% Venus-positive T-Zellen gemessen werden (**Abbildung 35C**). Eine Transduktion mit pLenti-dCas9-VP64-mCherry führte bei einer MOI von 1 zu 12-16% mCherry-positiver Zellen. Der Anteil transduzierter FACS-positiver Zellen erreichte nach Erhöhung der MOI ein Plateau (gRNA-Venus) oder sank sogar ab (dCas9-mCherry). Maximal konnten 84% (gRNA-Venus) bzw. 17% (dCas9-mCherry) FACS-positive Zellen gemessen werden. Von dem Vektor pLenti-

MS2-p65-HSF1-BFP waren die erhaltenen Titer 2-3 Logstufen geringer (**Abbildung 35B**). T-Zellen wurden mit einer MOI von 0,2 transduziert, was zu einer Rate von 11% BFP-positiven Zellen führte.

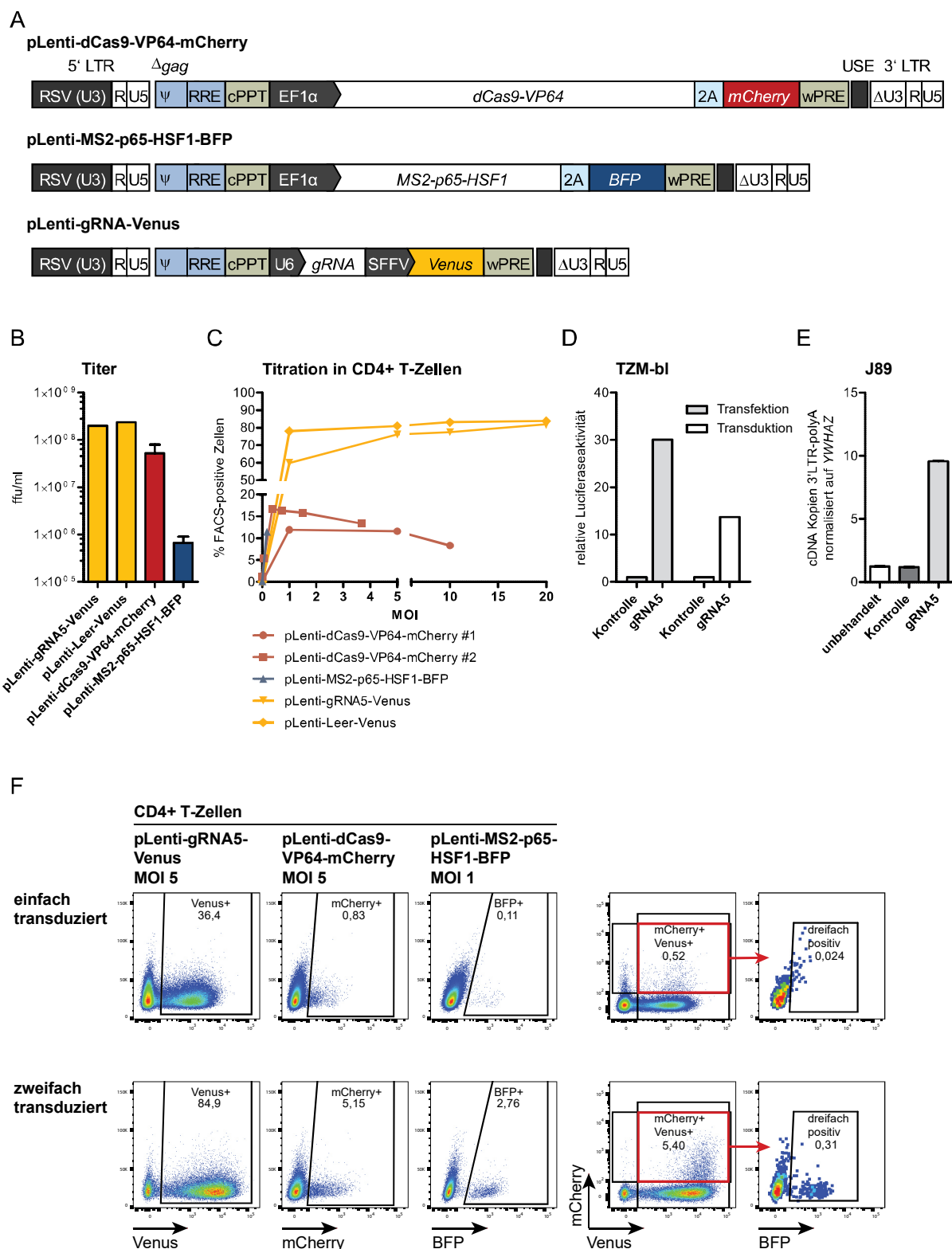


Abbildung 35: pLenti-Vektoren zur Übertragung der SAM-Komponenten in CD4+ T-Zellen. (A) Schema der lentiviralen Vektoren pLenti-dCas9-VP64-mCherry, pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP und pLenti-gRNA-Venus. Die Vektoren enthalten selbstinaktivierende (SIN) LTRs mit Rous Sarcoma Virus (RSV)-U3-Promotor und einer Deletion in der U3-Region ($\Delta U3$), ein Verpackungssignal (Ψ),

4. Ergebnisse

das *Rev response element* (RRE), den zentralen Polypurintrakt (cPPT), eine verkürzte *gag*-Sequenz, ein postregulatorisches Element aus dem Woodchuck Hepatitis Virus (wPRE) und SV40 *upstream polyadenylation enhancer elements* (USE). Die Transgenkassette kodiert für EF1 α -dCas9-VP64-2A-mCherry, EF1 α -MS2-p65-HSF1-BFP oder U6-gRNA-SFFV-Venus. **(B)** Die lentiviralen Vektoren wurden in HEK-293T titriert und die Titer durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die gemittelten Titer von 4 Produktionen pLenti-dCas9-VP64-mCherry und 8 Produktionen pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP. **(C)** CD4⁺ T-Zellen wurden mit aufsteigenden MOI der lentiviralen Partikel transduziert und 4 bzw. 5 Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. **(D)** TZM-bl wurden mit den Vektorplasmiden pLenti-dCas9-VP64-mCherry, pLenti-MS2-p65-HSF1 und pLenti-gRNA5-Venus bzw. pLenti-Leer-Venus transfiziert oder mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln mit einer MOI von jeweils 1 transduziert. 48 h nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität bezogen auf transfizierte Zellen in Relation zur Negativkontrolle (pLenti-Leer-Venus) gemessen. In transduzierten Zellen wurde 6 Tage nach Transduktion die Luciferaseaktivität bezogen auf transfizierte Zellen in Relation zur Negativkontrolle gemessen. **(E)** J89 Zellen wurden mit den lentiviralen Vektoren pLenti-dCas9-VP64-mCherry, pLenti-MS2-p65-HSF1 und pLenti-gRNA5-Venus bzw. pLenti-Leer-Venus mit einer MOI von jeweils 1 transduziert und 4 Tage nach Transduktion RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels ddPCR wurden die Kopien 3'LTR-*polyA* bezogen auf *YWHAZ* gemessen. Mit pLenti-Leer-Venus statt pLenti-gRNA5-Venus transduzierte J89 Zellen dienten als Kontrolle. **(F)** CD4⁺ T-Zellen wurden mit pLenti-dCas9-VP64-mCherry, pLenti-gRNA5-Venus und pLenti-MS2-p65-HSF1 mit einer MOI von 5 bzw. 1 einfach (obere Reihe) oder zweifach an aufeinanderfolgenden Tagen (untere Reihe) transduziert und 4 bzw. 5 Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch hinsichtlich der Venus-, mCherry- und BFP-Expression analysiert. Gezeigt sind die prozentualen Anteile positiver Zellen von lebenden Zellen.

Zur Überprüfung der Funktionalität der SAM-Komponenten auf den lentiviralen Vektoren wurden TZM-bl Zellen mit den Vektorplasmiden transfiziert oder mit den lentiviralen Vektorpartikeln transduziert. Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach Transfektion beziehungsweise 6 Tage nach Transduktion bezogen auf FACS-positive Zellen gemessen. Die Transfektion mit den SAM-Komponenten und gRNA5 auf pLenti-Vektor-DNA führte zu einer 30-fachen Aktivierung bezogen auf eine Transfektion mit pLenti-Vektoren und gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle). Eine Transduktion mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln (MOI 1) führte zu einer 14-fachen Aktivierung (**Abbildung 35D**). In J89 Zellen konnte 4 Tage nach Transduktion mit den lentiviralen Partikeln ein Anstieg HI-viraler Transkripte gemessen werden. Mittels ddPCR wurde eine Sequenz im HIV 3'LTR mit poly(A)-Sequenz detektiert, die Aufschluss über den Anstieg korrekt terminierter HI-viraler Transkripte gibt (**Abbildung 35E**) (Bullen et al., 2014). Normiert wurde auf die Kopien des Haushaltgens *YWHAZ*, das für das ζ -Polypeptid des Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase aktivierenden Proteins kodiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte J89 Zellen sowie J89 transduziert mit den SAM-Komponenten und Vektor mit gRNA ohne *spacer*-Sequenz (Kontrolle).

Nach der Titration der lentiviralen Partikel und der Untersuchung der Funktionalität wurden CD4⁺ T-Zellen mit den drei lentiviralen Partikeln gleichzeitig transduziert. In unabhängigen Experimenten wurden die T-Zellen einfach oder zweifach mit den lentiviralen Vektoren

transduziert und 4 bzw. 5 Tage nach Transduktion hinsichtlich der Venus-, mCherry- und BFP-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Nach Transduktion mit drei Vektoren waren geringere Transduktionsraten als nach Transduktion mit den einzelnen Vektoren zu verzeichnen. So waren nach einer Transduktion mit einer MOI von 5 nur 36% Venus-positive und 0,8% mCherry-positive Zellen zu verzeichnen (**Abbildung 35F** obere Reihe), verglichen mit 76% und 12% nach Transduktion mit einzelnen Vektoren (**Abbildung 35C**). Insgesamt waren nach einfacher Transduktion mit den drei Vektoren nur 0,024% der lebenden Zellen dreifach-positiv für Venus, mCherry und BFP. Limitierend war die Transduktionsrate von pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP, die nur zu 0,1% BFP-positiven Zellen aufgrund des geringen Titers führte.

In einem zweiten Experiment wurden CD4⁺ T-Zellen zweifach an aufeinanderfolgenden Tagen mit den drei lentiviralen Partikeln transduziert. 5 Tage nach der zweiten Transduktion konnten deutlich höhere Raten an FACS-positiven Zellen gemessen werden (**Abbildung 35F** untere Reihe). Der Anteil der Venus-positiven Zellen hatte sich verdoppelt, die mCherry-positiven Zellen versechsfacht und der Anteil BFP-positiver Zellen war 25-fach höher. Es war eine deutliche Population dreifach-positiver Zellen zu erkennen, deren Anteil 0,31% der lebenden Zellen betrug. Dies bedeutete eine 13-fache Steigerung des Anteils dreifach-positiver Zellen verglichen mit der einmaligen Transduktion der CD4⁺ T-Zellen.

Insgesamt waren die lentiviralen Vektoren funktional, was die Aktivierung des LTR-Promotors in TZM-bl und der Anstieg HI-viraler Transkripte in J89 Zellen nach Transduktion zeigten. Jedoch konnten vor allem von dem Konstrukt pLenti-MS2-p65-HSF1-BFP nur lentivirale Partikel mit sehr geringen Titern erhalten werden, auch nach Konzentration mittels Ultrazentrifugation. Diese waren limitierend bei der Transduktion von primären CD4⁺ T-Zellen. Durch zweimalige Transduktion konnte der Anteil der dreifach-transduzierten Zellen zwar erhöht werden, belief sich aber auf unter 1% der lebenden Zellen. Für Versuche mit CD4⁺ T-Zellen aus HIV-Patienten reichten diese Transduktionsraten nicht aus.

5 Diskussion

5.1 Das HIVis-System

Latent infizierte Zellreservoirare stellen die größte Hürde bei der Entwicklung von HIV-Eradizierungsstrategien dar. Die Mechanismen, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung von HIV-Latenz beitragen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Da latent infizierte Zellen phänotypisch nicht von produktiv infizierten Zellen zu unterscheiden sind, ist es äußerst schwierig, Populationen latent infizierter Zellen zu isolieren und funktionell zu charakterisieren. In dem ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden deshalb mithilfe eines proviralen Reporterkonstrukts latent infizierte Jurkat Zelllinien hergestellt, in welchen über die Expression zweier unabhängiger Fluoreszenz-Reporter spezifisch zwischen latent HIV-infizierten, produktiv HIV-infizierten und nicht-infizierten Zellen unterschieden werden kann. Das verwendete Reporterkonstrukt pNLT2-HIVis basiert auf der Expression zweier Fluoreszenzmarker: einem HIV-Promotor-abhängigen Markerprotein für die produktive Infektion (BFP) und einem weiteren Markerprotein, das konstitutiv exprimiert wird (Venus). Die Kasette aus *bfp*, SFFV-Promotor und *venus* ersetzt zum größten Teil das *nef*-Gen. Die Infektion von Zellen mit diesem Reporterkonstrukt erlaubte die schnelle und einfache durchflusszytometrische Identifizierung und Isolierung von produktiv (Venus+/BFP+), latent (Venus+/BFP-) und nicht-infizierten (Venus-/BFP-) Zellpopulationen. Das System wurde HIVis benannt, was für „HIV *visible*“ steht, und ermöglicht es, die Population der latent HIV-infizierten Zellen genauer zu charakterisieren. Es eignet sich dabei besonders für die schnelle Untersuchung verschiedener Reaktivierungs-Strategien.

Fluoreszenzreporterzelllinien zur Identifizierung und Untersuchung von HIV-Latenz wurden schon früher entwickelt und trugen zum Verständnis grundlegender Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung von HIV-Latenz bei. Diese Reporterzelllinien beinhalten in der Regel einen einzelnen Marker für die aktive Infektion, exprimiert unter der Kontrolle des LTR-Promotors. Durch Selektion und Kultivierung über einen längeren Zeitraum konnten Klone isoliert werden, von denen angenommen wurde, dass sich in ihnen Latenz etabliert hatte. Die ersten vielfach verwendeten Latenzreporterzelllinien waren die sogenannten JLat-Klone, mit einem GFP-Reporter insertiert in das *nef*-Gen (Jordan et al., 2003). Nach Infektion von Jurkat Zellen mit dem replikationsinkompetenten Reporter wurden Klone, die direkt GFP exprimierten und produktiv infiziert waren, aussortiert, und die Klone ausgewählt, die erst nach TNF α -Behandlung GFP exprimierten. Somit wurden Klone selektiert, die durch TNF α aktivierbar waren.

Weitere Fluoreszenzreporterzelllinien sind die J89 oder THP89 Zelllinien. Sie wurden durch Infektion von Jurkat oder THP-1 Zellen mit einem replikationskompetenten Reporter mit *gfp*-Sequenz, eingefügt zwischen *env*- und *nef*-Gen, hergestellt (Kutsch et al., 2002). Ursprünglich GFP-positive Klone wurden über einen längeren Zeitraum kultiviert und überlebende Klone ohne GFP-Expression selektiert. Somit wurden Klone ausgewählt, in denen eine ursprünglich aktive HIV-Transkription abgeschaltet wurde und die einen *Silencing*-Prozess durchliefen.

Mit diesen Modellen ist es jedoch nicht möglich, frühe Ereignisse der Latenzetablierung zu untersuchen, da ein Marker für die latente Infektion in ihnen fehlt. Durch die Selektionierungsschritte werden die Modelle zudem in Richtung früher/initialer oder sekundärer Latenz beeinflusst. Werden früh in der Generierung eines Modells Zellen aussortiert, die positiv für eine produktive Infektion sind, werden Klone selektioniert, die direkt bei der Infektion eine frühe Latenz etablierten. Werden Klone ausgewählt, die erst positiv für den Marker waren und im Laufe der Kultivierung negativ wurden, werden Klone selektiert, die einen *Silencing*-Prozess durchliefen.

Andere Latenzmodelle benötigen eine Vorstimulation mit spezifischen Komponenten oder Zytokinen, und eine anschließende Reaktivierung, um eine latente Population zu identifizieren (Bosque & Planelles, 2009; Duverger et al., 2009; Hakre et al., 2012). Diese Modelle beschränken sich nur auf Zellen, die sich durch die verwendeten Stimulanzen reaktivieren lassen und zytotoxische Effekte der Reaktivierung überstehen.

Durch die Verwendung eines zweiten Markers, der eine latente Infektion anzeigt, können latent infizierte Zellen positiv selektioniert werden und auch frühe Schritte der Infektion untersucht werden. Mit dem HIVis-Reporter werden latente Zellen unabhängig von dem Aktivierungszustand der Zelle identifiziert. Durch den Marker SFFV-*venus* ist es zudem möglich, latente Zellen ohne virale Reaktivierung durch T-Zell-Aktivatoren von uninfizierten Zellen zu unterscheiden. So wird der Selektionierungsbias, wie in den traditionellen Modellen mit einfachem Fluoreszenzmarker vorhanden, umgangen.

Zu Beginn der Konstruktion des proviralen Reporterkonstrukts pNLT2-HIVis war bereits ein auf zwei Fluoreszenzmarkern basierendes Latenzmodell publiziert (Dahabieh, Ooms, & Simon, 2013). Dieses Latenzmodell enthält eine unter Aufrechterhaltung des Leserahmens in das *gag*-Gen insertierte *gfp*-Sequenz. Die Lokalisation zwischen Matrix- und Kapsid-Leserahmen ist von HIV-Protease-Schnittstellen flankiert. Dies führt zu der Bildung eines Gag-GFP-Fusionsproteins, das bereits im Virion enthalten ist und bei Infektion in die

5. Diskussion

Zielzelle entlassen wird. Nach der Integration erfolgt die *gag-gfp*-Expression unter der Kontrolle des LTR-Promotors. Ein weiterer Fluoreszenzreporter, mCherry, steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und ersetzt den *nef*-ORF. Dadurch, dass GFP bereits im Virion enthalten ist, ist es mit diesem Konstrukt im Gegensatz zu dem HIVis-Konstrukt nicht möglich, die frühen Kinetiken der Infektion zu beobachten, da etwaige Signale durch das mit der *de novo* Infektion in die Zelle gebrachte GFP überdeckt würden.

Das von Dahabieh und Kollegen vorgestellte Konstrukt basiert genauso wie das HIVis-Konstrukt auf der Sequenz des HIV-Isolates NL4-3. Es trägt eine Mutation an Nukleotidposition 7136 im *env*-Gen, was dem Konstrukt Replikationsinkompetenz verleiht. Das HIVis-Konstrukt trägt eine 537 bp große Deletion im *env*-Gen, was der Bildung von Revertanten vorbeugt und wodurch es in Sicherheitsaspekten dem vorgenannten Konstrukt überlegen ist.

Zeitgleich mit der Fertigstellung des HIVis-Reporterkonstrukts (Bialek, 2013) wurden von Eric Verdin und Kollegen zwei ähnliche HIV-Reporterkonstrukte vorgestellt (Calvanese, Chavez, Laurent, Ding, & Verdin, 2013). Mit diesen Reporterkonstrukten können auf gleiche Weise latent und produktiv infizierte Zellen durchflusszytometrisch unterschieden werden. Das erste Konstrukt enthält *gfp-EF1 α -mCherry* anstelle des *nef*-ORF und basiert auf dem HIV-1 Konstrukt R7/E⁻/GFP, welches auch für die Generierung der JLat-Klone verwendet wurde (Jordan et al., 2003). Ein weiteres Konstrukt enthält eine Expressionskassette bestehend aus *mApple-SFFV-gfp*, die den *nef*-ORF ersetzt. Das Konstrukt basiert auf der Sequenz des HIV-1 Isolats 89.6 und enthält eine Deletion im *env*-Gen, um die Replikationsinkompetenz zu gewährleisten (Carter et al., 2010). Diese Konstrukte unterscheiden sich lediglich hinsichtlich des genetischen Hintergrunds der jeweils verwendeten HIV-Sequenz sowie der verwendeten Fluoreszenzmarker vom HIVis-Reporterkonstrukt.

Mit den hergestellten Reporterviren wurden Jurkat, SupT1 und A301 Zellen transduziert (Calvanese et al., 2013). Das Expressionsmuster der Fluoreszenzreportergene sieht ähnlich aus wie in Jurkat-HIVis Zellen (**Abbildung 6** und Bialek 2013). Einzelzellklone wurden von diesem Konstrukt jedoch nicht hergestellt, sodass in der Arbeit von Calvanese und Kollegen (Calvanese et al., 2013) nur Populationen transduzierter Zellen untersucht wurden.

5.1.1 Generierung von HIVis-Klonen

Durch Transduktion von Jurkat Zellen mit VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Partikeln des Reporterkonstrukts und anschließender Einzelzellklonierung konnten 14 HIVis-Klone und von 6 Klonen Subklone generiert werden. Diese unterschieden sich zum Teil stark in der Stärke der Venus-Expression und der Induzierbarkeit der BFP-Expression. Die Klone waren einzuteilen in eine Gruppe mittlerer und hoher Venus-Expression. Auffallend war, dass sich in dem Großteil der Klone aus der Gruppe hoher Venus-Intensität keine BFP-Expression durch mitogene Stimulation anregen ließ. Einzig die Subklone des Klons B zeigten nach PMA-PHA-Stimulation einen Anteil von ca. 50% bis 70% BFP-positiven Zellen. In der Gruppe der Klone mit mittlerer Venus-Intensität ließen sich sowohl BFP-induzierbare als auch nicht-induzierbare Klone identifizieren. Die Venus-Expression ließ sich in diesen Klonen durch mitogene Stimulation nicht erhöhen. Die Vermutung lag nahe, dass eine fehlerhafte Sequenz der Reporter-kassette oder des LTR-Promotors die Ursache für das Ausbleiben der BFP-Expression war. In der Tat ließ sich in den untersuchten Klonen, in welchen sich keine BFP-Expression induzieren ließ, auch keine intakte 5'LTR-Promotorsequenz nachweisen (Klon D3, G1, L1). In den Klonen, die nach Stimulation BFP exprimierten, war die 5'LTR-Sequenz dagegen intakt.

Bei der Sequenzierung der *bfp*-SFFV-*venus*-Reporter-kassette trat in 5 der mittels PCR und Sequenzierung untersuchten 7 Klone eine Rekombination innerhalb der Reporter-kassette zwischen *bfp*- und *venus*-Sequenz auf (Klon A4, B3, D3, F1 und G1). Ein weiterer Klon wies eine Vielzahl von Mutationen in dieser Region auf (Klon L1). Von den generierten und untersuchten Klonen zeigte letztendlich nur der Klon B2 eine stabile Venus-Expression im unbehandelten Zustand und eine robuste BFP-Expression nach Stimulation mit verschiedenen aktivierenden Reagenzien sowie eine intakte 5'LTR-Sequenz und *bfp*-SFFV-*venus*-Reporter-kassette. Die Rekombinationen und Mutationen können während der reversen Transkription der viralen RNA in DNA entstanden sein. Die Fehlerrate der retroviralen reversen Transkriptasen liegt aufgrund der fehlenden *proofreading*-Funktion bei 10^{-4} bis 10^{-5} pro Nukleotid und Replikationszyklus und führt zu einer sehr hohen Mutationsrate (Menéndez-Arias, Sebastián-Martín, & Álvarez, 2017). Für HIV wird die Fehlerrate auf $3,4 \times 10^{-5}$ geschätzt (Mansky, 1996). Des Weiteren haben Retroviren eine hohe Rekombinationsrate. Die Viruspartikel enthalten zwei Kopien des viralen RNA-Genoms, die über eine palindromische Sequenz im 5'LTR dimerisieren und zusammen in das Kapsid verpackt werden (Moore et al., 2007). Durch die Sequenzähnlichkeit der beiden RNA-Kopien wird eine *template switching* und folglich eine Rekombination des viralen Genoms bei der

reversen Transkription möglich. Für HIV wird basierend auf *gag* als Referenzen eine Rekombinationsrate von $1,35 \times 10^{-3}$ pro Nukleotid und Replikationszyklus geschätzt (Schlub, Smyth, Grimm, Mak, & Davenport, 2010). Das lentivirale Reporterkonstrukt pNLT2-HIVis, von dem replikationsinkompetente lentivirale Partikel für die Generierung der HIVis-Zelllinien hergestellt wurden, enthält zudem in der Reporter-kassette *bfp-SFFV-venus* zwei Sequenzen mit starker Homologie. Die beiden Fluoreszenzproteine Venus und BFP sind Varianten des aus der Quallenart *Aequorea victoria* isolierten GFP (Nagai et al., 2002; Prasher et al., 1992) und zeigen dementsprechende Sequenzhomologien. Dies könnte ein *template switching* zwischen den zwei RNA-Kopien bei der reversen Transkription begünstigen und zu den beobachteten Rekombinationen in der *bfp-SFFV-venus*-Kassette geführt haben.

5.1.2 Das HIVis-Reporterkonstrukt integriert in *recurrent integration genes* (RIGs)

Der hier identifizierte Klon HIVisB2 trägt eine einzelne Integration des proviralen Reporterkonstrukts. Die Integration erfolgte im 6. Intron des Gens *NUP188* (Gene ID 23551) auf Chromosom 9 q34.11, an Position 131.720.581 mit einer Duplikation von 5 Nukleotiden (GTAAG). Der Übergang vom 5'LTR sowie vom 3'LTR in das Genom wurde durch HiLo-PCR identifiziert und mittels PCR und Sequenzierung bestätigt. Die Region wurde mit dem UCSC *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) basierend auf der humanen Referenzsequenz GRCH37/hg19 (*Genome Reference Consortium Human Build 37/hg19*) analysiert. *NUP188* grenzt an eine Vielzahl von Genen (**Abbildung 9**). Die Region im Bereich von 500 kb stromaufwärts bis 228 kb stromabwärts von *NUP188* ist sehr reich, stark transkribiert und geprägt von aktiven Promotor- und *Enhancer*-Elementen. Es folgt stromabwärts eine weniger genreiche Region mit schwachen und inaktiven Promotoren und Regionen von Heterochromatin.

In der genreichen Region überlappen Promotor- und *Enhancer*-Elemente des *NUP188*-Gens und der umliegenden Gene mit Signalen des Histonmarkers H3K27ac (Acetylierung an Lysin 27 von Histon 3). H3K27ac ist assoziiert mit aktiver Transkription und wird genutzt um aktive *Enhancer* zu lokalisieren (Creyghton et al., 2010). Die Modifikation H3K27me3 (Trimethylierung an Lysin 27 von Histon 3) wird am gleichen Lysinrest 27 von Histon 3 gefunden. H3K27me3 wirkt antagonistisch zu H3K27ac und ist ein Marker für repressives Chromatin das eine Genexpression unterbindet (Voigt, Tee, & Reinberg, 2013). H3K27me3 wird in den untersuchten Zelllinien im Bereich des *NUP188*-Gens und 500 kb davor nicht

gefunden. Das erste H3K27me3-Signal stromabwärts von NUP188 findet sich im Gen *IER5L* (*Homo sapiens immediate early response 5 like*), 228 kb von *NUP188* entfernt.

Der Marker H3K4me3 (Trimethylierung an Lysin 4 von Histon 3), der in aktiven Promotoren nahe der Transkriptionsstartstelle angereichert ist und zur Identifizierung aktiver Promotoren herangezogen wird (Guenther, Levine, Boyer, Jaenisch, & Young, 2007), zeigt Signale in allen Promotorbereichen der genreichen Region. In der genärmeren folgenden Region sind die H3K4me3-Signale weniger intensiv.

Die Integration des HIVis-Reporterkonstrukts in den Genlokus *NUP188* steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Studien, in denen eine bevorzugte Integration von HIV in Introns transkriptionell aktiver Gene und genreiche Regionen in T-Zelllinien als auch in CD4⁺ T-Zellen aus Patienten gefunden wurde (Han et al., 2004; A. R. W. Schröder et al., 2002).

NUP188 kodiert für das Nucleoporin 188 kDa Protein, welches Teil des Kernporenkomplexes ist (Miller, Powers, Park, Fischer, & Forbes, 2000). Der Kernporenkomplex reguliert den Fluss von Proteinen und mRNAs zwischen Kern und Zytoplasma und ist aufgebaut aus jeweils 8 bis 64 Kopien von ungefähr 30 verschiedenen Nucleoporinen (NUPs). Die Struktur hat eine 8-fache Rotationssymmetrie und besteht aus einem inneren Ring, einem nukleären Ring mit nukleärem *basket* und einem zytoplasmatischen Ring mit zytoplasmatischen Filamenten. NUP188 gehört zu den *scaffold* NUPS und ist mit NUP205, NUP155, NUP93 und NUP35 am Aufbau des inneren Ringkomplexes beteiligt (Beck & Hurt, 2016). Neben der Beteiligung am Aufbau der Kernpore spielt NUP188 auch eine Rolle in der Regulierung der Mitose. NUP188 lokalisiert an den Spindelpolen und ist notwendig für eine korrekte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphase (Itoh et al., 2013).

Eine Integration von HIV in der Nähe des *NUP188*-Gens wurde bereits in mehreren publizierten Studien zu Integrationsstellen gefunden (Marini et al., 2015). In der Metaanalyse verglichen Marini und Kollegen die identifizierten Integrationsstellen aus sechs verschiedenen Studien (Brady et al., 2009; Han et al., 2004; Ikeda, Shibata, Yoshimura, Koito, & Matsushita, 2007; Liu et al., 2006; Marini et al., 2015; A. R. W. Schröder et al., 2002) in *in vitro* infizierten Zelllinien, primären CD4⁺ T-Zellen und in Zellen von HIV-Patienten. Insgesamt wurden 1136 verschiedene Integrationsorte (Gene) gefunden. Gene die in mehr als einer der 6 Studien auftraten, wurden HIV *recurrent integration genes* (RIGs) benannt. Von ausgewählten RIGs wurde mittels dreidimensionaler Immuno-DNA-*fluorescence in situ*

hybridisation (FISH) die Lokalisation innerhalb des Nukleus in CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die RIGs befanden sich zu 44% in Zone 1 und zu 42% in Zone 2, bei einer Einteilung des Nukleus in drei vom Volumen gleich große Zonen, beginnend mit Zone 1 direkt unterhalb der Kernmembran. *NUP188* befindet sich 325 kb entfernt von einem mittels FISH untersuchten RIG auf Chromosom 9 q34.11 (*SPTAN1*, Gene ID 6709). *SPTAN1* fand sich in mehreren der untersuchten Studien wieder (Marini et al., 2015). Mittels FISH ließ sich eine Lokalisation überproportional häufig in Zone 1 und Zone 2 des Nukleus feststellen. Durch die chromosomale Nähe zu dem Integrationsort *NUP188* lässt sich vermuten, dass auch dieser sich in relativer Nähe zur Kernmembran in den äußeren Zonen des Nukleus befindet. Die Region auf Chromosom 9 q34.11 scheint zudem ein *Hotspot* für die Integration zu sein. Auf diesem Locus wurde neben *SPTAN* und *NUP188* noch das RIG *GLE1* (Gene ID 2733) und *FNBPI* (Gene ID 23048) gefunden (Marini et al., 2015).

Neben dem Klon HIVis B2 wurde noch in 5 weiteren HIVis-Klonen, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, der Integrationsort bestimmt. In einem Klon (HIVisF1) integrierte der HIVis-Reporter in eine Alu-Sequenz auf Chromosom 2 q14.3. Der Integrationsort von HIVis33A ist ein Locus, der wiederholt als RIG in den früheren Studien beschrieben wurden (*STAT5B*, Gene ID 6777) (Marini et al., 2015). In zwei Studien fand sich zudem ein RIG (*SMARCE1*, Gene ID 6605) auf derselben Chromosomenbande Chr.17q21.2. Auch in HIVis70A und HIVisA4 konnte jeweils eine bereits beschriebene Integrationsstelle identifiziert werden (*AKAP10*, Gene ID 11216 Chr.17p11.2 bzw. *ADNP*, Gene ID 23394 Chr.20q13.13) (Han et al., 2004). Auf dem chromosomalen Locus Chr.17p11.2 liegt zudem ein weiteres RIG, das in mehreren Studien identifiziert wurde (*NCOR1*, Gene ID 9611, Chr.17p11.2). Die Integrationsstelle des letzten analysierten Klons HIVisAS4 liegt ebenso auf einer chromosomalen Bande, auf der bereits ein RIG beschrieben wurde (*ITCH*, Gene ID 83737, Chr.20q11.22) (Marini et al., 2015).

Insgesamt ließ sich in 5 der 6 Jurkat-HIVis-Klonen, in denen der Integrationsort im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, entweder ein bereits beschriebenes RIG wiederfinden, oder eine Integration in einem chromosomalen Locus, in dem bereits ein RIG beschrieben wurde. Der 6. Klon trägt das provirale Reporterkonstrukt in einer Alu-Sequenz.

5.1.3 Die Latenzzelllinie HIVisB2

Die latent infizierte Zelllinie HIVisB2 trägt ein Integrat des proviralen Reporterkonstrukts HIVis an einer definierten Integrationsstelle, dem Genlocus *NUP188*. Im unbehandelten Zustand zeigt die Zelllinie eine geringe basale BFP-Expression von weniger als 5% der Zellen

und ist somit als latent zu betrachten. Durch mitogene Stimulation können die HIVisB2 Zellen in einen produktiven Infektionszustand überführt werden. So konnte durch eine 6-stündige PMA-Ionomycin-Behandlung die BFP-Expression bereits auf 57% angeregt, sowie ein deutlicher Anstieg der viralen RNA-Kopien *tat* nachgewiesen werden (**Abbildung 12**). Nach weiterer Kultivierung der stimulierten HIVisB2 Zellen stieg der Anteil der BFP-Expression auf bis zu 95%. Mithilfe der HIVisB2 Zellen konnte auch gezeigt werden, dass LRAs in verschiedenen latenten Klonen die virale Transkription unterschiedlich stark aktivieren. HIVisB2 Zellen ließen sich durch Behandlung mit LRAs deutlich stärker aktivieren als der etablierte Latenzzellklon JLat6.3 (**Abbildung 13**). Prostratin und Vorinostat aktivierten JLat6.3 in klinisch relevanten Konzentrationen kaum, Romidepsin führte zu einer Aktivierung von 14% GFP-positiven Zellen. Die höchste Aktivierung wurde mit einer Kombination von Prostratin und Romidepsin erreicht (34% GFP-positiven Zellen). In HIVisB2 Zellen hingegen ließen sich durch die gleiche Behandlung bis zu 95% der Zellen aktivieren und auch die klinisch relevanten Konzentrationen von Prostratin und Romidpesin führten zu 34% beziehungsweise 73% BFP-positiven Zellen. Einzig Vorinostat aktivierte kaum über das Niveau der basalen BFP-Expression. LRAs aktivieren den LTR-Promotor nicht uniform in verschiedenen Latenzmodellen, was auch schon in früheren Studien beobachtet werden konnte (Spina et al., 2013). Die Stimulation mit LRAs führte in HIVisB2 Zellen neben einem Anstieg viraler RNA auch zu einer Freisetzung von viralem Kapsidprotein p24^{Gag}. Somit resultiert die LRA-Behandlung von HIVisB2 Zellen nicht nur in einer Erhöhung der proviralen Transkription, sondern auch in der Bildung und Freisetzung viraler Partikel. Hinsichtlich von zukünftigen „*Shock and Kill*“-Strategien wäre dies eine essentielle Voraussetzung zur immunologischen Erkennung ursprünglich latent infizierter Wirtszellen (Deeks, 2012).

Wird die HIVisB2 Zelllinie über einen längeren Zeitraum kultiviert, reduziert sich der Anteil der Venus-exprimierenden Zellen deutlich. Der Anteil BFP-exprimierender Zellen bleibt konstant auf einem basalen Niveau von unter 5%. Nach 12 Passagen war der Anteil der Venus-positiven Zellen von ursprünglich 89% auf 36% gesunken (**Abbildung 12**). In der Venus-negativen Population konnte mittels PCR und *Realtime*-PCR der HIVis-Reporter in gleicher Kopienzahl wie in der Venus-positiven Population nachgewiesen werden. Auch ließ sich in der Venus-negativen Population ebenso die BFP-Expression durch PMA-Iono-Behandlung induzieren. Der Rückgang der Venus-positiven Zellen ist also nicht auf einen Verlust des Reporterkonstrukts zurückzuführen. Die HIVisB2-Zelllinie ist monoklonal, was auch durch einen *Southern Blot* bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Ein Rückgang

der Venus-Expression könnte durch ein *Silencing* des SFFV-Promotors im Laufe der Kultivierung erfolgt sein.

Ein *Silencing* kann abhängig von dem Integrationsort bei Integration in Regionen von Heterochromatin erfolgen, oder lokusunabhängig durch DNA-Methylierung von Promotorregionen (Antoniou, Skipper, & Anakok, 2013). Lentivirale und γ -retrovirale Vektoren integrieren wie HIV präferentiell in oder in die Nähe von aktiv transkribierten Genen, wie auch geschehen im HIVisB2 Klon. Ein *Silencing* der Genexpression von lentiviralen Vektoren geschieht hauptsächlich durch Promotor-DNA-Methylierung (Antoniou et al., 2013). Ein *Silencing* des SFFV-Promotors durch CpG-Methylierung nach lentiviraler oder γ -retroviraler Transduktion konnte in verschiedenen Zelltypen beobachtet werden (Mukherjee et al., 2011; Müller-Kuller et al., 2015; Pfaff et al., 2013; Qin, Penkert, & Kalejta, 2013; Stein et al., 2010).

Um eine Expression von dem SFFV-Promotor zu stabilisieren, wie in dem Fall des HIVisB2-Klons die Venus-Expression, könnten transkriptionelle regulatorische Elemente eingefügt werden. Dies wären zum einen Elemente mit einer abschirmenden Funktion wie Isolator-Elemente und *scaffold/matrix attachment regions* (S/MARs), oder *ubiquitous chromatin opening elements* (UCOE), die eine Chromatin-remodellierende und transkriptionell aktivierende Funktion haben. Durch eine Flankierung einer transkriptionellen Einheit mit S/MARs (200 bis 5000 bp lange AT-reiche Sequenzen) oder Isolator-Elementen (mit denen DNA-bindende Proteine interagieren), kann diese vor dem reprimierenden Effekt umgebenden Heterochromatins abgeschirmt und auch das umgebende Wirtsgenom vor Einflüssen regulatorischer Elemente des Vektors geschützt werden (Antoniou et al., 2013). UCOEs sind CpG-reiche unmethylierte DNA-Sequenzen mit aktiven Histonmarkern aus der Promotorregion verschiedener Haushaltsgene wie des *HNRPA2B1*- und *CBX3*-Gens. Sie halten eine transkriptionell zugängliche Chromatinstruktur aufrecht und erlauben eine erhöhte und stabile Genexpression in Säugerzellen auch wenn diese in Heterochromatin-Umgebungen integriert sind (Antoniou et al., 2003). Ein UCOE kann genutzt werden, um die Expression von einem assoziierten heterologen Promotor zu stabilisieren (S. Williams et al., 2005).

So konnte durch das Einfügen eines 2,2 kb Subfragments des A2UCOE aus dem *HNRPA2B1*-Promotor in lentivirale Vektoren vor den SFFV- oder CMV-Promotor ein höheres Niveau und eine größere Reproduzierbarkeit der GFP-Expression in transduzierten peripheren Blutzellen und Knochenmarkszellen erreicht werden (F. Zhang et al., 2007). Die Expression einer lentiviralen 2.2UCOE-eGFP-Kassette war über 40 Tage in murinen P19 Zellen unverändert

hoch, wohingegen die Expression von SFFV-eGFP nach 14 bis 21 Tagen fast komplett abgeklungen war (F. Zhang et al., 2010). Das 2.2UCOE als auch 1,5 und 1,2 kb große Subfragmente des UCOE konnten eine Resistenz gegenüber DNA-Methylierung vermitteln und somit die Reporterexpression von einem assoziierten SFFV-Promotor aufrechterhalten (F. Zhang et al., 2010). Weitere Studien legen nahe, dass selbst ein stark verkürztes 0,6 kb oder 0,7 kb Subfragment des UCOE ausreicht, um eine stabile Reporterexpression von einem assoziierten Promotor zu vermitteln (Bandaranayake et al., 2011; Uchiyama, Adriani, Jagadeesh, Paine, & Candotti, 2012), speziell konnte ein 0.7UCOE den SFFV-Promotor vor CpG-Methylierung und *Silencing* in murinen embryonalen Stammzellen, humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und in differenzierten Nachkommenzellen schützen (Müller-Kuller et al., 2015).

Durch Einfügen eines 0,7 kb großen UCOE-Fragments vor den SFFV-Promotor innerhalb der *bfp*-SFFV-*venus*-Kassette des proviralen Reporterkonstrukts pNLT2-HIVis könnte somit verhindert werden, dass die SFFV-kontrollierte Venus-Expression im Laufe der Zeit abnimmt. Durch die 537 bp-Deletion im *env*-Gen wäre zudem ein Einhalten der Größenkapazität des HIV-abgeleiteten Vektors noch gewährleistet. Somit könnten eventuell auch über einen längeren Zeitrahmen latent-infizierte Zellen in einem Zellpool durchflusszytometrisch verfolgt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch Einfügen von UCOEs die Titer von lentiviralen Vektorproduktionen nicht negativ beeinflusst werden (Antoniou et al., 2013). Abschirmende Elemente wie S/MARs oder Isolatoren wären für das Reporterkonstrukt pNLT2-HIVis weniger geeignet, da sie am 5'- und 3'Ende der transkriptionellen Einheit eingefügt werden müssten (Antoniou et al., 2013), recht groß sind und dadurch die Titer der Vektorproduktion negativ beeinflussen (Benabdellah, Gutierrez-Guerrero, Cobo, Muñoz, & Martín, 2014).

5.1.4 Latenzsysteme in primären Zellen

Um das HIVis-Reporterkonstrukt auf primäre CD4⁺ T-Zellen zu übertragen, wurde das *env*-Gen mit 537 bp-Deletion gegen vollständiges (*wildtyp*) *env* ausgetauscht. Mit den replikationskompetenten lentiviralen Partikeln konnten Jurkat Zellen infiziert werden, es zeigte sich das erwartete Muster der Reporterexpression. Nach einer Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen konnte eine deutliche BFP-positive Population, jedoch kaum Venus-positive, latent infizierte Zellen identifiziert werden (**Abbildung 17**). Die Vermutung lag nahe, dass die Expression von dem SFFV-Promotor nicht nur wie in den Jurkat-abgeleiteten HIVisB2 Zellen kontinuierlich mit der Zeit herabreguliert wird, sondern von Anfang an keine

ausreichende Expression des Fluoreszenzreportergens *venus* in primären CD4⁺ T-Zellen erlaubt. Um die HIVis-Reporter-kassette für die Expression in primären CD4⁺ T-Zellen zu optimieren, sollten alternative Promotoren und Fluoreszenzreporter ausgetestet werden. Der virale SFFV-Promotor wurde durch den konstitutiven Promotor des *eukaryotic translation elongation factor 1- α* (EF1 α) ersetzt, der in primären T-Zellen im Vergleich von EF1 α -, PGK- und SFFV-Promotor die höchste Expressionsrate erzielte (**Abbildung 19**). Ein Überlegenheit von eukaryotischen Promotoren gegenüber viralen Promotoren, speziell des EF1 α -Promotors gegenüber SFFV-Promotor, konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden (Gilham, Lie-A-Ling, Taylor, & Hawkins, 2010; Herbst et al., 2012). Das Gen des Fluoreszenzreporters Venus in der HIVis-Reporter-kassette wurde gegen mKO2 ausgetauscht, da dieses nicht wie Venus und BFP aus der Quallenart *Aequorea victoria*, sondern aus der Koralle *Fungia concinna* abgeleitet ist. Durch weniger Sequenzhomologien sollten so Rekombinationsereignisse unterdrückt werden.

Eine Infektion von Jurkat Zellen mit VSV-G-pseudotypisierten HIVis-mKO2 Viruspartikeln führte zu dem erwarteten Expressionsmuster der Fluoreszenzreporter mKO2 und BFP. Nach Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen mit replikationskompetenten HIVis-env(NL4-3)-mKO2 Partikeln konnten jedoch, wie schon zuvor bei der Infektion mit HIVis-env(NL4-3) beobachtet, keine einfach mKO2-positiven latent infizierten Zellen detektiert werden. Ein Teil der T-Zellen wurde produktiv infiziert, markiert durch BFP-Expression. Diese produktiv infizierten Zellen waren jedoch auch negativ für den Marker mKO2, obwohl dieser konstitutiv vom EF1 α -Promotor exprimiert werden müsste. Ein Austausch von SFFV- zu EF1 α -Promotor führte folglich zu keiner gesteigerten Expression des konstitutiv exprimierten Infektions-Markers.

Diese Beobachtung konnte durch eine Arbeit von Calvanese und Kollegen bestätigt werden, in der ein bereits erwähntes Reporterkonstrukt (Calvanese et al., 2013), welches im Aufbau dem HIVis-Konstrukt vergleichbar ist, verwendet wurde. In primären CD4⁺ T-Zellen zeigte sich eine deutliche Population produktiv infizierter Zellen nach Infektion (Chavez, Calvanese, & Verdin, 2015). Eine eindeutige Expression des konstitutiv exprimierten Fluoreszenzmarkers war jedoch auch hier nicht zu erkennen.

In primären CD4⁺ T-Zellen ist folglich direkt nach Infektion mit HIVis-env-Partikeln eine Aktivität des LTR-Promotors vorhanden, sichtbar gemacht durch die BFP-Expression. Die Expression des konstitutiv exprimierten Markers für Latenz wird unterdrückt, möglicherweise durch Promotorinterferenz. In Jurkat Zellen ging nach Transduktion mit HIVis-Viruspartikeln

der ursprünglich hohe Anteil BFP-positiver Zellen zurück. Vermutlich wird diese Population durch zytotoxische Effekte der viralen Genexpression weiter dezimiert. Nach einiger Zeit der Kultivierung ließ sich eine latent infizierte Zellpopulation isolieren (Bialek, 2013), aus der letztendlich die Latenzklone generiert werden konnten. In primären CD4⁺ T-Zellen reduziert sich nach HIVis-Infektion die Aktivität des LTR-Promotors und die BFP-Expression nicht. Über einen Zeitraum von einer Woche konnte beobachtet werden, dass sich der Anteil BFP-positiver Zellen noch erhöhte (**Abbildung 18**).

Dies lässt sich durch die Möglichkeit der vollständigen Replikation und der Freisetzung infektiöser Nachkommenviren der HIVis-env-Viruspartikel erklären. Weiterhin wurden primäre CD4⁺ T-Zellen vor der Infektion mit CD3/CD28-*Beads* behandelt, um eine effiziente Infektion zu ermöglichen. Durch diese Stimulation konnte die Infektionsrate um das 21-Fache gegenüber unbehandelten T-Zellen erhöht werden (**Abbildung 23**). Folglich liegen die CD4⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Infektion in einem aktivierten zellulären Zustand vor, eine produktive Infektion überwiegt in dem Großteil der Zellen und eine direkte Etablierung einer latenten Infektion ist eingeschränkt (Donahue & Wainberg, 2013; Duverger et al., 2009; R. F. Siliciano & Greene, 2011).

Eine Umgehung dieser Einschränkung bietet sich durch die direkte Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen. Die Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen ist ein ineffizienter Prozess, da in ruhenden T-Zellen der nukleare Import, die Integration und die reverse Transkription von HIV nicht effizient unterstützt werden (Pan, Baldauf, Keppler, & Fackler, 2013). Gleichwohl wurde in einigen Studien eine *in vitro* Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen demonstriert (Saleh et al., 2007; Swiggard et al., 2005) und auch *in vivo* wurde dies in lymphoiden Geweben nachgewiesen (Z. Zhang, 1999). Dabei scheint die Mikroumgebung in den lymphoiden Geweben einschließlich Zytokinen und Chemokinen eine wichtige Rolle zu spielen (Kinter, Moorthy, Jackson, & Fauci, 2003). Basierend auf diesen Beobachtungen soll in einem von Saleh und Kollegen entwickelten Latenzmodell durch Kultivierung von ruhenden CD4⁺ T-Zellen mit dem CCR7-Liganden CCL19 vor Infektion eine chemokinreiche Mikroumgebung wie in den lymphoiden Geweben simuliert, und der Anteil der latent infizierten Zellen erhöht werden (Saleh et al., 2007, 2011). CCL19 induziert zudem Änderungen im Aktinzytoskelett und soll so die Zelle für eine Infektion empfänglicher machen (Cameron et al., 2010).

Eine direkte Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen mit replikationskompetenten HIVis-Partikeln war ineffizienter als eine Infektion von unbehandelten CD4⁺ T-Zellen und

insgesamt 60-mal weniger effektiv als eine parallele Infektion von CD3/CD28- und IL2-stimulierten T-Zellen des gleichen Spenders (**Abbildung 23**). Durch CCL19-Behandlung konnte der Anteil der infizierten Zellen insgesamt nicht erhöht werden. Die Behandlung führte jedoch dazu, dass sich keine produktive Infektion etablierte und der relative Anteil der Venus-positiven latent infizierten Zellen erhöht wurde (**Abbildung 23**). Dieses Phänomen konnte in drei weiteren unabhängigen Experimenten nicht wiederholt beobachtet werden.

Saleh und Kollegen demonstrierten, dass eine Behandlung von ruhenden CD4⁺ T-Zellen mit CCL19 zu einer effizienteren Integration von HIV führte (Saleh et al., 2007, 2011). Diese Beobachtung konnte von Pace und Kollegen nicht bestätigt werden. Eine Behandlung mit CCL19 konnte die Integrationseffizienz nach Infektion mit und ohne Spinokulation nicht erhöhen (Pace et al., 2012). Zudem scheint der Einfluss von CCL19 spenderabhängig zu sein. So wurde kürzlich gezeigt, dass nur in 50% der T-Zell-Spender CCL19 die Etablierung einer latenten Infektion in ruhenden CD4⁺ T-Zellen begünstigt (Anderson et al., 2016). Eine Spenderabhängigkeit des Effekts von CCL19 zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Das Latenzmodell ließ sich somit nicht reproduzieren, was sich auch Rückgang der Publikationen, die dieses Modell in Studien nutzen, widerspiegelt.

Insgesamt reproduzieren Latenzmodelle jeweils nur einen bestimmten Aspekt der Etablierung von Latenz und LRAs aktivieren die virale Genexpression in verschiedenen Latenzmodellen nicht in einem einheitlichen Maße (Spina et al., 2013). Der Goldstandard für die Bewertung neuer Therapieansätze für HIV-Latenz sind daher nach wie vor Zellen von HIV-Patienten. CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut sind einfach zu isolieren und können *ex vivo* verschiedenen LRAs ausgesetzt werden oder werden für die Charakterisierung des latenten Reservoirs genutzt. CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut machen jedoch nur 2% der gesamten CD4⁺ T-Zellen aus (Wong & Yukl, 2016), von denen sich die Mehrzahl in lymphatischen Organen befindet. Weitere Gewebe wie das zentrale Nervensystem stellen womöglich ein geschütztes Reservoir dar, die im Patienten nicht einfach untersucht werden können. Zudem wird je nach Wahl der Analysemethode das virale Reservoir überschätzt (PCR-basierte Methoden) oder unterschätzt (*Viral Outgrowth Assay*) (Eriksson et al., 2013).

Da noch nicht alle zellulären Faktoren und Signalwege bekannt sind, die bei der Etablierung von HIV-Latenz eine Rolle spielen, ist die rationale Entwicklung von Reagenzien, die HIV aus der Latenz aktivieren sollen, erschwert. Latenzzelllinien wie der HIVisB2 Klon sind hilfreich bei der schnellen Evaluierung von neuen LRAs und Therapieansätzen. Eine Evaluierung sollte dabei immer in mehreren Latenzzelllinien erfolgen. Ein *in vitro* Modell in

primären T-Zellen, welches die Generierung ausreichender Mengen latent infizierter Zellen ermöglicht und Rückschlüsse auf das Aktivierungspotential *in vivo* zulässt, muss jedoch noch entwickelt werden.

5.2 Das SAM-System als neues Instrument zur transkriptionellen Aktivierung von HIV

Eine vollständige Aktivierung von ruhenden latent HIV-infizierten Zellen und eine folgende Eliminierung durch CD8⁺ T-Zellen wird als Baustein einer erfolgsversprechenden Eradizierungsstrategie für HIV angesehen (Deeks, 2012). Eine Aktivierung mittels der momentan zur Verfügung stehenden LRAs ist unvollständig und erreicht nicht alle Subpopulationen des latenten Reservoirs (Bullen et al., 2014). Dagegen können CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatoren eine sequenzspezifische transkriptionelle Aktivierung unabhängig vom zellulären Status der Zelle vermitteln. In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme zur Induktion latenter Proviren führen. Das SAM- und SunTag-System wurden an den HIV-LTR-Promotor adaptiert und führten zu einer starken und reproduzierbaren Aktivierung der LTR-vermittelten Transkription. Das SAM-System war dabei dem SunTag-System überlegen. Es wurde eine optimale Zielregion innerhalb des HIV-LTRs identifiziert, von 213 bp bis 106 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle in der U3-Region angrenzend an die NF- κ B und SP1 Transkriptionsfaktorbindestellen. Eine SAM-vermittelte Aktivierung des HIV-LTRs führte insbesondere zu der Freisetzung infektiöser viraler Partikel.

Das SAM-System führte im Vergleich zu LRAs zu einer vergleichbaren bis deutlich überlegenen Aktivierung (**Abbildung 27, 29**) (Saayman et al., 2015; Y. Zhang et al., 2015). LRAs vermitteln eine globale Zellaktivierung und wirken zum Teil toxisch (Xing & Siliciano, 2013). In einem *ex vivo* Modell konnte zudem durch keinen der LRA-Kandidaten eine vollständige Aktivierung der latent infizierten Zellen herbeigeführt werden (Bullen et al., 2014). Eine sequenzspezifische Aktivierung kann diese Einschränkung umgehen. CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme wirken nur auf Zellen, die die provirale Sequenz enthalten, im Gegensatz zu LRAs, die auch nicht-infizierte Zellen beeinflussen. Die Aktivierung ist hoch spezifisch und wirkt zielgerichtet auf den LTR-Promotor in der infizierten Zelle. Durch das SAM-System werden multiple Aktivatoren an die Zielsequenz rekrutiert. Die resultierende Aktivierung war einer Aktivierung durch dCas9-VP64 oder das SunTag-System mit vier VP64-Aktivatorodomänen deutlich überlegen (**Abbildung 26**). Die

Aktivierung konnte durch eine Kombination zweier gRNAs noch potenziert werden (**Abbildung 26**).

Weiterhin ist denkbar, dass durch die sequenzspezifische Aktivierung auch latente T-Zell-Subpopulationen erreicht werden können, die durch momentan zur Verfügung stehende LRAs nicht aktivierbar sind (Y.-C. Ho et al., 2013), wie auch Nicht-T-Zellreservoirs der myeloiden Linie, wie Makrophagen und Mikrogliazellen, in denen die Effekte von LRAs als unzureichend beschrieben wurden (Darcis et al., 2015). Razooky und Kollegen zeigten ferner, dass HIV-Latenz hauptsächlich durch die virale Sequenz und die Regulierung durch Tat bestimmt wird und weniger von zellulären Faktoren abhängt, was die unvollständige Aktivierung durch LRAs erklären würde (Razooky, Pai, Aull, Rouzine, & Weinberger, 2015). Sollten zelluläre Faktoren gegenüber proviralen Faktoren eine untergeordnete Rolle bei der Regulierung von Latenz spielen, wären sequenzspezifische Aktivatoren das Mittel der Wahl, um Proviren aus der Latenz in einen transkriptionell aktiven Status zu überführen.

Eine sequenzspezifische Aktivierung des LTR-Promotors konnte auch durch TALEs (Geissler et al., 2015; Perdigão et al., 2016; X. Wang et al., 2015) oder Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (P. Wang et al., 2014) erreicht werden. TALE- und Zinkfingerproteine sind DNA-Bindeproteine deren DNA-Bindeeigenschaft auf einer spezifischen Aminosäuresequenz beziehungsweise Bindungsdomäne beruht. TALE-Proteine enthalten eine Sequenz von 33 bis 35 Aminosäuren in tandemartigen Wiederholungen, von denen jeweils eine Wiederholung eine DNA-Base erkennt. Zinkfingerproteine vom Typ Cys₂-His₂ bestehen aus einer Anordnung aus mehreren Zinkfinger-Motiven, von denen jedes eine $\beta\alpha$ -Faltung beschreibt und eine 3 bp-DNA Sequenz erkennt und bindet. Eine Anpassung an eine Zielsequenz erfolgt durch modulares Assemblieren bereits vorhandener Zinkfinger-Motive. Dagegen lassen sich CRISPR/Cas9-abgeleitete Systeme ohne Protein-*Engineering* durch Bereitstellung einer gRNA mit entsprechender Basenabfolge an eine Zielsequenz anpassen und sind in Hinsicht ihrer Programmierung für eine Zielsequenz den TALE- und Zinkfingerproteinen deutlich überlegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit (Bialek et al., 2016) werden durch jüngste Studien bestätigt, in denen *in vitro* eine Aktivierung latent infizierter Zellen mittels verschiedener transkriptioneller Aktivierungssysteme, basierend auf der CRISPR/Cas9-Technologie, erreicht werden konnte (Ji et al., 2016; Limsirichai, Gaj, & Schaffer, 2015; Saayman et al., 2015; Y. Zhang et al., 2015). Die Studien beruhen auf verschiedenen Effektormodulatoren, wie einer Fusion von dCas9 mit VP64 (dCas9-VP64), Fusion mit VP64, p65 und Epstein-Barr

Virus R Transaktivator (Rta; dCAS9-VPR), Fusion mit Histonacetyltransferase p300 (dCas9-p300), als auch SAM- und SunTag-System. Unabhängig von dem Effektor und dem verwendeten Latenzmodell konnte in allen Studien eine Induktion der Transkription vom latenten LTR-Promotor beobachtet werden. Weiterhin konnte in den Studien eine offensichtliche Überschneidung der optimalen Promotor-Zielregionen gefunden werden. Eine Rekrutierung der Aktivatorsysteme an eine Sequenz 164 bp bis 91 bp stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle führte in allen vier Studien und in der vorliegenden Arbeit zu einer maximalen Aktivierung, unabhängig vom verwendeten Latenzmodell und Effektor (**Abbildung 36**).

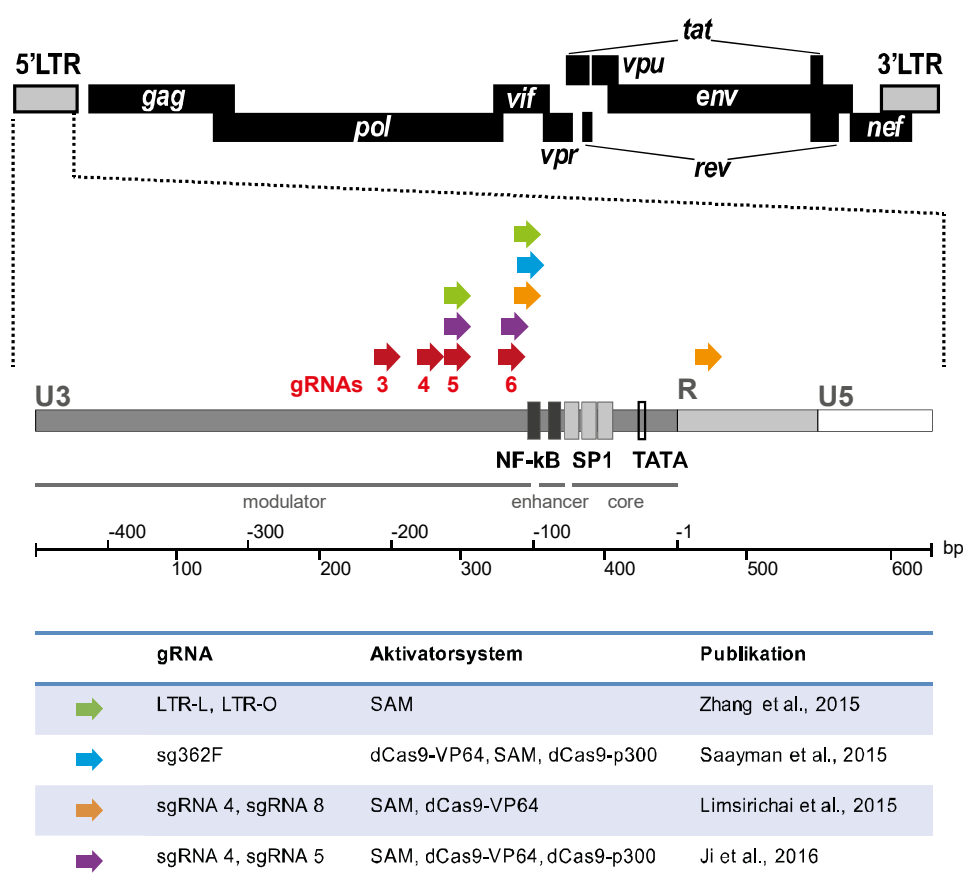


Abbildung 36: Vergleich der optimalen gRNA-Sequenzen aus verschiedenen Studien für die Rekrutierung CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme an den HIV 5'LTR. Die Lokalisierungen der optimalen gRNA-Sequenzen aus vier Studien, die zu einer maximalen Aktivierung des LTR-Promotors führten, sind als Pfeile eingezeichnet. Rote Pfeile markieren die gRNA3 bis -6 Sequenz, die in TZM-bl und HIVisB2 Zellen zu einer maximalen SAM-vermittelten Aktivierung führten.

Diese Studien erschienen in kurzem Zeitabstand und zum Teil parallel. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch als einziges gezeigt werden, dass eine CRISPR/Cas9-vermittelte Aktivierung der proviralen Transkription zu einem vollständigen viralen Lebenszyklus führt, resultierend in der Freisetzung infektiöser viraler Partikel (**Abbildung 31**).

Eine Einschränkung des CRISPR/Cas9-Systems ergibt sich durch die Möglichkeit von sogenannten *off-target* Effekten. Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen mit anschließender Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung (ChIPseq) zur Charakterisierung von genomweiten *off-target* Bindestellen von dCas9/gRNA oder Cas9/gRNA ergaben, dass dCas9 beziehungsweise Cas9 an *off-target* Sequenzen binden kann. So konnten abhängig von der gewählten gRNA einige wenige bis Hunderte bis Tausende *off-target* Bindestellen nachgewiesen werden (Duan et al., 2014; Kescu, Arslan, Singh, Thorpe, & Adli, 2014; O'Geen, Henry, Bhakta, Meckler, & Segal, 2015; Polstein et al., 2015; Wu et al., 2014). Ein Vergleich der ChIPseq-Daten mit einer Analyse der globalen Genexpression (RNAseq) zeigte jedoch, dass die Aktivierung der Genexpression durch dCas9-VP64 hochspezifisch war (Polstein et al., 2015). In dieser Studie war die Bindung von dCas9-VP64 an *off-target* Sequenzen deutlich schwächer als an die Zielsequenz und resultierte in keiner signifikant erhöhten Genexpression außerhalb der Zielsequenz (Polstein et al., 2015). Weitere RNAseq-Analysen der globalen Genexpression zeigten, dass dCas9-VP64 als auch das SAM-System nur zu einer spezifischen Hochregulierung der Expression der Zielgene führten und bestätigten die hohe Spezifität CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme (Konermann et al., 2015; Perez-Pinera et al., 2013).

Relevant für die Bindspezifität scheinen die Basen in der *seed region* direkt stromaufwärts des PAM zu sein. Drei bis fünf Abweichungen in der 5'-Region werden hingegen toleriert. (Kescu et al., 2014). Kescu und Kollegen gehen davon aus, dass eine korrekte 10 bp Sequenz stromaufwärts des PAM für die Vermittlung einer Bindung der dCas9 ausreicht (Kescu et al., 2014). Weiterhin waren *off-target* Bindestellen überproportional mit einem offenem Chromatin-status, Promotoren, 5'-untranslatierten Bereichen (5'UTRs) und Exonen assoziiert, was daraufhin hindeutet, dass die lokale Chromatinstruktur bei der dCas9-Bindung eine Rolle spielt (Duan et al., 2014; Kescu et al., 2014; O'Geen et al., 2015; Polstein et al., 2015; Wu et al., 2014). Durch Einbeziehung dieser Determinanten der dCas9-Bindung könnten verbesserte bioinformatische Programme zur Vorhersage von *off-target* Bindestellen entwickelt werden und somit potentielle *off-target* Effekte minimiert werden.

In einigen Studien mit an dCas9 gekoppelter VP64 oder VP160 Aktivierungsdomäne konnte erst durch multiple gRNAs eine robuste Aktivierung des Zielgens erreicht werden. (A. W. Cheng et al., 2013; Maeder et al., 2013; P Mali et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Durch eine solche Kombination mehrerer gRNAs in der Promotorregion eines Zielgens könnten *off-*

target Effekte weiter reduziert und die Spezifität der CRISPR/Cas9-vermittelten Genaktivierung noch erhöht werden.

5.2.1 Einfluss von Sequenzvariationen und Übertragung in primäre Zellen

Analysen zur Sequenzspezifität haben gezeigt, dass Abweichungen am 5'Ende der gRNA-Sequenz gut toleriert werden, während Abweichungen in der 5 bp *seed region* stromaufwärts des PAM zu einem fast vollständigen Verlust der Cas9-Rekrutierung führen (**Abbildung 32**) (O'Geen et al., 2015; Wu et al., 2014). Da latente HIV-Reservoirire eine Vielzahl viraler Genomvarianten enthalten, muss eine erfolgreiche CRISPR/Cas9-vermittelte Aktivierung diese Sequenz-Varianten berücksichtigen. Dies könnte durch den Einsatz eines Pools von gRNA-Varianten passend zu dem vorherrschenden HIV-Subtyp geschehen. Auch eine Kombination multipler maßgeschneiderter gRNAs, die an verschiedenen Stellen im Promotor binden und Aktivatoren rekrutieren, könnte ein vielversprechender Ansatz sein. Eine Expression zweier gRNAs 29 bp beziehungsweise 37 bp voneinander entfernt führte nicht zu einer Interferenz sondern konnte die CRISPR/Cas9-vermittelte Aktivierung noch potenzieren (**Abbildung 26**). Eine Rekrutierung mehrerer Aktivatorkomplexe durch multiple gRNAs an den Promotor eines Zielgens führte in mehreren Studien zu einer synergistischen Aktivierung (A. W. Cheng et al., 2013; Maeder et al., 2013; P Mali et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013).

CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme wurden in dieser Arbeit mittels Kotransfektion dreier Plasmide in verschiedene Zelllinien eingebracht. Somit konnte die prinzipielle Anwendbarkeit von CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatoren zur transkriptionellen Aktivierung von latentem HIV aufgezeigt werden. Für eine translationale Anwendung in Zellen aus HIV-Patienten müssen Wege der Übertragung in primäre Zellen gefunden werden. Die Komponenten des SAM-Systems (dCas9-VP64, gRNA, MS2-p65-HSF1) wurden in einen singulären lentiviralen SIN-Vektor eingefügt (**Abbildung 34**). Eine Produktion hochtitriger lentiviraler Partikeln war mit diesem Konstrukt nicht möglich, was wahrscheinlich an der Größe der Transgenkassette von 7,7 kb und der resultierenden Größe des Vektors von 10,6 kb (von R- bis R-Region) liegt, welche die Verpackung der transgenen Genome in lentivirale Viruskapside möglicherweise negativ beeinflusst. Das native HIV-RNA-Genom hat eine Länge von 9,2 kb. Zwar konnte eine Herstellung von lentiviralen Vektoren mit 7,5 kb bis 8,5 kb großem Transgen beschrieben werden, jedoch sanken bereits ab einer Größe des Transgens von 5 kb die praktisch erreichten Titer deutlich (Konishi, Kawamoto, Izumikawa, Kuriyama, & Yamashita, 2008).

5. Diskussion

Eine Aufteilung der SAM-Komponenten auf zwei lentivirale Vektoren (pLenti-EF1 α -dCas9-2A-mCherry und pSH-U6-gRNA-EF1 α -MS2-p65-HSF1-2A-GFP) führte zwar zu einer robusten Aktivierung von HIVisB2 nach transienter Transfektion, jedoch war es auch hier nicht möglich, einen genügend hohen Titer von dem Vektor pSH-U6-gRNA-EF1 α -MS2p65HSF1-2A-GFP zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Der Vektor pSH-U6-gRNA-EF1 α -MS2p65HSF1-2A-GFP hat eine Transgengröße von 3,8 kb. Trotz der relativ geringen Größe ließen sich nur Titer in der Größenordnung von 1×10^5 ffu/ml erreichen. Von dem deutlich größeren lentiviralen Vektor pLenti-EF1 α -dCas9-2A-mCherry (Transgen: 6,4 kb) ließen sich zwei Logstufen höhere Titer produzieren.

Die Sequenz MS2-p65-HSF1 scheint der limitierende Faktor bei der Produktion der lentiviralen Partikel zu sein, was sich auch bei der Aufteilung der SAM-Komponenten auf drei Vektoren bestätigte. Von Vektoren mit der MS2-p65-HSF1-Sequenz waren die erreichten Titer zwei bis drei Logstufen geringer als von lentiviralen Vektoren mit der Sequenz dCas9-mCherry- oder gRNA-Venus (**Abbildung 35**). Insgesamt waren diese drei Vektoren funktional, was eine erfolgreiche Aktivierung des LTR-Promotors nach Transduktion von TZM-bl und J89 Zellen zeigte (**Abbildung 35**). Es war jedoch nicht möglich, mit diesen Vektoren primäre CD4⁺ T-Zellen in ausreichendem Maße zu transduzieren. Eine Transduktionsrate von mehr als 1% konnte hierbei nicht erreicht werden (**Abbildung 35**).

In anderen Studien wurden lentivirale SIN-Vektoren zum Einbringen der SAM-Komponenten und weiterer CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme in TZM-bl, CHME5 Mikrogliazellen und JLat Klone verwendet (Limsirichai et al., 2015; Y. Zhang et al., 2015). In diesen Studien wurden immortalisierte Zelllinien transduziert und die transduzierten Zellen durch übertragene Antibiotikaresistenzen selektiert. Ein Transfer der CRISPR/Cas9-abgeleiteten Aktivatorsysteme in primäre Zellen wurde nicht gezeigt. Auch mit den in dieser Arbeit hergestellten lentiviralen Partikeln war eine Transduktion und Aktivierung von immortalisierten Zelllinien möglich, eine Transduktion von primären CD4⁺ T-Zellen in ausreichendem Maße jedoch nicht.

Eine klinische Anwendung benötigt einen sicheren und effektiven Transfer der CRISPR/Cas9-abgeleiteten Aktivatoren in infizierte Zellen. Eine Möglichkeit des sicheren Transfers bieten Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV) (Mockenhaupt & Grimm, 2011). AAV sind wenig immunogen, nicht mit Krankheiten assoziiert und können auch ruhende Zellen infizieren. AAV liegen nach Infektion episomal vor. In Anwesenheit des AAV-*rep*-Gens kann es zu einer Integration in den in *AAVS1*-Lokus auf Chromosom 19 kommen. Es ist

ein breites Spektrum an AAV-Serotypen bekannt, die sich durch Unterschiede in den Hüllproteinen in ihrem Tropismus unterscheiden. Synthetische AAV können durch Wahl des Serotyps mit dem gewünschten Kapsid an das Zielgewebe angepasst werden. So konnten zwei AAV-Varianten gefunden werden, die für eine effiziente Transduktion primärer CD4⁺ T-Zellen geeignet scheinen (Boerner et al., 2015). Die Transgenkapazität von AAV beträgt 4,7 kb. Ein einzelner AAV wäre für eine Verpackung der SAM-Komponenten mit entsprechenden Promotoren (7,2 kb) somit nicht geeignet.

Ein effizienter Transfer der *wildtyp* SpCas9 (4,1 kb) plus gRNA in Jurkat T-Zellen und *in vivo* in murine Hepatozyten konnte bereits mithilfe eines singulären AAV erreicht werden (Senís et al., 2014). Durch die Nutzung kleinerer orthologer Cas9, zum Beispiel aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9; 3,2 kb) (Ran et al., 2015), ist es zudem möglich, zwei gRNAs zusammen mit SaCas9 von einem AAV zu exprimieren (Kaminski et al., 2016; Yin et al., 2017). Durch Aufteilung der SpCas9 in einen N- und C-terminalen Teil und Fusion an eine N-beziehungsweise C-terminale Inteinsequenz konnte die kodierende Sequenz auf 2,5 kb beziehungsweise 2,2 kb verringert werden (kürzer als alle zurzeit bekannten orthologen Cas9), was Raum für zusätzliche genetische Elemente lässt (Chew et al., 2016). Durch Transsplicing werden die beiden Proteinteile zu einem funktionalen Protein zusammengefügt. Der C-terminale Teil der Cas9 konnte in dieser Studie zusätzlich an die dreiteilige Aktivatorodomäne VP64-p65-Rta (VPR; 1,6kb) fusioniert und zusammen mit einer gRNA von einem AAV exprimiert werden (Chew et al., 2016). Eine ähnliche Strategie wäre auch für das SAM-System mit Fusion der SpCas9 an VP64 (150 bp) und Expression von MS2-p65-HSF1-Sequenz (1,4 kb) möglich.

Eine weitere Möglichkeit zum Transfer größerer DNA-Sequenzen mittels AAV besteht in der Eigenschaft, dass rekombinante AAV-Genome nach Transduktion in der Zelle konkatemerisieren und einer homologen Rekombination unterliegen können. Dies erlaubt das Aufteilen großer Transgene in separate Vektoren mit überlappenden Sequenzen und eine intrazelluläre Genrekonstruktion nach Vektor-Genom-Konkatemerisierung (Hirsch, Wolf, & Samulski, 2016).

Im Gegensatz zu AAV wäre mit adenoviralen Vektoren eine Expression der SAM-Komponenten von einem singulären Vektor möglich. Mit adenoviralen Vektoren lassen sich sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren. Sie integrieren nicht in das Genom und führen zu einer transienten Expression des Transgens. Adenovirale Vektoren der dritten Generation besitzen eine Verpackungskapazität von bis zu 36 kb an Fremd-DNA

(Alba, Bosch, & Chillon, 2005) und können je nach Spezies in Abhängigkeit der äußeren Fiber verschiedene Zelltypen infizieren. Durch Austausch des Fiber-kodierenden Gens konnten chimäre adenovirale Vektoren vom Typ 5 mit Fiberprotein vom Typ 11 generiert werden, die in der Lage sind, primäre humane T-Lymphozyten mit hohen Transduktionsraten zu transduzieren (Beschoner, 2014). Durch Verwendung von chimären adenoviralen Vektoren könnte eine transiente Expression des SAM-Systems in CD4⁺ T-Zellen erreicht werden.

Ein Nachteil von adenoviralen Vektoren ist jedoch die Möglichkeit der Insertionsmutagenese und eine Auslösung erhöhter immunologischer Reaktionen, was zu einer Eliminierung der transduzierten Zellen führen kann (Schagen, Ossevoort, Toes, & Hoebe, 2004). Erste Studien zum Transfer von *wildtyp* Cas9 und entsprechender gRNA mittels adenoviraler Vektoren in Mäusen zeigten nur kurzzeitige phänotypische Effekte, wahrscheinlich bedingt durch eine effiziente Eliminierung der transduzierten Zellen (R. Cheng et al., 2014; Ding et al., 2014). Eine weitere Studie konnte die vermittelte Geneditierung in der Leber noch vier Monate nach Injektion des adenoviralen Vektors nachweisen (D. Wang et al., 2015). Für eine Anwendung im Patienten wären die zytotoxischen Eigenschaften und die verstärkte Immunreaktion gegen adenovirale Vektoren problematisch. In einer *ex vivo* Anwendung des CRISPR/Cas9-abgeleiteten Aktivatorsystems ist die bekannte direkte Immunantwort gegen Adenoviren der Spezies C (Hartman, Appledorn, & Amalfitano, 2008) und die Neutralisierung des Vektors vernachlässigbar.

Eine weitere Methode zum gezielten Transfer CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme in primäre T-Zellen stellen nicht-integrierende lentivirale Vektoren dar. Durch eine inaktivierende Mutation im katalytischen Motiv der Integrase ist die Integration nicht möglich und die episomal vorliegende Vektor-DNA erlaubt eine transiente Expression des Transgens (Yáñez-Muñoz et al., 2006). Nichtintegrierende lentivirale Vektoren konnten bereits zum Transfer von Zinkfinger-Nukleasen zur Editierung des CCR5-Gens *ex vivo* in ruhende CD4⁺ T-Zellen aus Patienten genutzt werden (Yi et al., 2014). Sie besitzen die gleiche Verpackungskapazität (ungefähr 8 kb zusätzlich zu den *cis*-wirkenden Sequenzen) wie lentivirale Vektoren. Geringe Transduktionsraten und schwache Transgenexpression sind bekannte Nachteile dieses Vektorsystems (Wanisch & Yáñez-Muñoz, 2009). Eine Weiterentwicklung stellen oberflächenmodifizierte lentivirale Vektoren dar, die durch die Pseudotypisierung mit Masernvirus-Glykoprotein fusioniert und durch Präsentation eines

CD4-spezifischen Peptidliganden (DARPin) selektiv für CD4⁺ T-Zellen sind, und auch ruhende CD4⁺ T-Zellen ohne vorherige Stimulation transduzieren können (Zhou et al., 2015)

Eine weitere Möglichkeit des Transfers von Cas9/gRNA *ex vivo* ist der direkte Transfer von Cas9/gRNA-Ribonukleoproteinen (RNP). Cas9 Protein wird dabei komplexiert mit *in vitro* transkribierter gRNA durch Elektroporation in die Zelle eingebracht. Schumann und Kollegen konnten mit dieser Methode *in vitro* assemblierte Cas9/gRNA-RNP erfolgreich in primäre CD4⁺ T-Zellen einbringen, was zu einer effizienten Geneditierung führte (Schumann et al., 2015), die der durch Elektroporation von Plasmid-DNA überlegen war (Mandal et al., 2014). Dies lässt einen *ex vivo* Transfer von dCas9-VP64/gRNA als RNP in CD4⁺ T-Zellen denkbar erscheinen. Eine Kombination von Cas9/gRNA-RNP mit einem AAV mit einer Donor-DNA-Sequenz für die homologe Rekombination führte zu einer erfolgreichen und effizienten Geninsertion (Gaj et al., 2017). Eine Kombination von dCas9-VP64/gRNA-RNP mit einem Transfer der Aktivator-domänen MS2-p65-HSF1 via AAV ist somit auch vorstellbar.

Es ist abzusehen, dass neue Entwicklungen und Verbesserungen der bestehenden Vektorsysteme und Methoden zum Einbringen von DNA und Proteinen in primäre Zellen in naher Zukunft eine effiziente Expression CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme in primären Zellen ermöglichen werden. Diese Systeme würden eine wichtige Voraussetzung zur Aktivierung (und anschließenden immunologischen Entfernung) latent infizierter Zellen in HIV-Patienten darstellen und könnten somit zur Entwicklung neuartiger kurativer Therapieverfahren bei HIV/AIDS entscheidend beitragen.

5.3 Fazit und Ausblick

Die Mechanismen die zu der Etablierung des latenten Reservoirs beitragen sind multifaktoriell und nur ansatzweise verstanden. Latenzmodelle in immortalisierten Zelllinien haben zum Verständnis der grundlegenden Mechanismen, die zur Etablierung von HIV-Latenz führen, beigetragen. Dazu gehören transkriptionelle Interferenz, der Ort der Integration, epigenetisches *Silencing* und die Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle. Auf diese Mechanismen zielt die Wirkweise der zurzeit klinisch getesteten LRAs ab, zu denen PKC-Agonisten, HDACi, BETi und unklassifizierte Agenzien wie Disulfiram gehören.

In jüngster Zeit rückte neben den molekularen Mechanismen zur Etablierung von Latenz auch die Charakterisierung der Heterogenität der Proviren im latenten Reservoir in den Fokus der Forschung. So stellte sich heraus, dass das latente Reservoir neben transkriptionell inaktiven

latentem Proviren auch aus persistierenden replikations-inkompetenten defekten Proviren und aus replikationskompetenten Proviren besteht, die einer stochastischen Genexpression unterliegen und deren transkriptionelle Aktivität nicht von der Aktivierung der Wirtszelle abhängt (Y.-C. Ho et al., 2013). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Latenz hauptsächlich autonom viral reguliert wird (Razooky et al., 2015). Eine Unabhängigkeit von Latenz vom zellulären Status würde auch erklären, warum es bis heute nicht gelungen ist, das latente Reservoir mittels LRAs nachhaltig und komplett zu aktivieren.

Eine vollständige Identifizierung, Isolierung und Quantifizierung des latenten Reservoirs ist bis jetzt nicht möglich. Ein Fortschritt in diese Richtung stellt das kürzlich als Marker für eine HIV-Infektion in ruhenden CD4⁺ T-Zellen identifizierte Oberflächenrezeptorprotein CD32a dar (Descours et al., 2017). CD32a wird nach Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Zellen hochreguliert, bei einer produktiven Infektion von aktivierten CD4⁺ T-Zellen jedoch nicht.

Für eine Quantifizierung des latenten Reservoirs wird eine vollständige Aktivierung benötigt, wie sie zurzeit mit LRAs nicht erreicht werden kann. Eine sequenzspezifische Aktivierung des LTR-Promotors mittels CRISPR/Cas9-Technologie ist eine effizientere, von zellulärer Aktivität entkoppelte Strategie. CRISPR/Cas9-abgeleitete Aktivatorsysteme sind somit ein vielversprechendes Werkzeug, um das latente Reservoir *ex vivo* zu induzieren und anschließend mittels sensitiver Methoden wie *Viral Outgrowth Assay* und ddPCR zu quantifizieren. Fortschritte in der Entwicklung von Vektorsystemen zum Einbringen CRISPR/Cas9-abgeleiteter Aktivatorsysteme in primäre CD4⁺ T-Zellen werden dies ermöglichen und dadurch mit den CRISPR/Cas9-abgeleiteten Aktivatorsystemen entscheidende Werkzeuge zur Identifizierung und Quantifizierung des latenten Reservoirs bereitstellen.

6 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 5.Mai 2017

A handwritten signature in blue ink, reading "Julia Bialek", is written over a horizontal dotted line.

(Julia Bialek)

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., & Martin, M. A. (1986).** Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.*, 59(2), 284–91.
- Agosto, L. M., Yu, J. J., Dai, J., Kaletsky, R., Monie, D., & O'Doherty, U. (2007).** HIV-1 integrates into resting CD4+ T cells even at low inoculums as demonstrated with an improved assay for HIV-1 integration. *Virology*, 368(1), 60–72.
- Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005).** Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.*, 12 Suppl 1, S18–S27.
- Anderson, J. L., Cheong, K., Lee, A. K. H., Saleh, S., da Fonseca Pereira, C., Cameron, P. U., & Lewin, S. R. (2014).** Entry of HIV in Primary Human Resting CD4(+) T Cells Pretreated with the Chemokine CCL19. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 30(3), 207–8.
- Anderson, J. L., Mota, T. M., Evans, V. A., Kumar, N., Rezaei, S. D., Cheong, K., ... Lewin, S. R. (2016).** Understanding Factors That Modulate the Establishment of HIV Latency in Resting CD4+ T-Cells In Vitro. *PLoS One*, 11(7), e0158778.
- Antoniou, M. N., Harland, L., Mustoe, T., Williams, S., Holdstock, J., Yague, E., ... Crombie, R. (2003).** Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics*, 82(3), 269–279.
- Antoniou, M. N., Skipper, K. A., & Anakok, O. (2013).** Optimizing retroviral gene expression for effective therapies. *Hum. Gene Ther.*, 24(4), 363–74.
- Archin, N. M., Bateson, R., Tripathy, M. K., Crooks, A. M., Yang, K.-H., Dahl, N. P., ... Margolis, D. M. (2014).** HIV-1 expression within resting CD4+ T cells after multiple doses of vorinostat. *J. Infect. Dis.*, 210(5), 728–35.
- Archin, N. M., Espeseth, A., Parker, D., Cheema, M., Hazuda, D., & Margolis, D. M. (2009).** Expression of Latent HIV Induced by the Potent HDAC Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid, 25(2).
- Archin, N. M., Liberty, A. L., Kashuba, A. D., Choudhary, S. K., Kuruc, J. D., Crooks, A. M., ... Margolis, D. M. (2012).** Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*, 487(7408), 482–485.
- Archin, N. M., Vaidya, N. K., Kuruc, J. D., Liberty, a. L., Wiegand, A., Kearney, M. F., ... Perelson, a. S. (2012).** Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(24), 9523–9528.
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012).** HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(4), a007161.
- Avettand-Fènoël, V., Chaix, M.-L., Blanche, S., Burgard, M., Floch, C., Toure, K., ... French Pediatric Cohort Study ANRS-CO 01 Group. (2009).** LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J. Med. Virol.*, 81(2), 217–23.

- Baba, M., Miyake, H., Okamoto, M., Iizawa, Y., & Okonogi, K. (2000).** Establishment of a CCR5-Expressing T-Lymphoblastoid Cell Line Highly Susceptible to R5 HIV Type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16(10), 935–941.
- Bandaranayake, A. D., Correnti, C., Ryu, B. Y., Brault, M., Strong, R. K., & Rawlings, D. J. (2011).** Daedalus: A robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Res.*, 39(21), e143.
- Banerjee, C., Archin, N., Michaels, D., Belkina, A. C., Denis, G. V., Bradner, J., ... Montano, M. (2012).** BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.*, 92(6), 1147–1154.
- Barr, P. M., Lazarus, H. M., Cooper, B. W., Schluchter, M. D., Panneerselvam, A., Jacobberger, J. W., ... Remick, S. C. (2009).** Phase II study of bryostatins 1 and vincristine for aggressive non-Hodgkin lymphoma relapsing after an autologous stem cell transplant. *Am. J. Hematol.*, 84(8), 484–7.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–71.
- Beans, E. J., Fournogerakis, D., Gauntlett, C., Heumann, L. V., Kramer, R., Marsden, M. D., ... Wender, P. A. (2013).** Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(29), 11698–703.
- Beck, M., & Hurt, E. (2016).** The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18(2), 73–89.
- Bednarik, D. P., Duckett, C., Kim, S. U., Perez, V. L., Griffis, K., Guenther, P. C., & Folks, T. M. (1991).** DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappa B proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs. *New Biol.*, 3(10), 969–76.
- Benabdellah, K., Gutierrez-Guerrero, A., Cobo, M., Muñoz, P., & Martín, F. (2014).** A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells. *PLoS One*, 9(1), e84268.
- Beschorner, N. (2014).** *Entfernung proviraler HIV-1 DNA aus infizierten Zellen mittels nicht-integrierender Vektoren.* Universität Hamburg.
- Beyer, W. R., Westphal, M., Ostertag, W., & von Laer, D. (2002).** Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol*, 76(3), 1488–1495.
- Bialek, J. K. (2013).** *Charakterisierung und funktionelle Analyse von Doxycyclin-induzierbarer Tre-Rekombinase.* Universität zu Lübeck.
- Bialek, J. K., Dunay, G. A., Voges, M., Schäfer, C., Spohn, M., Stucka, R., ... Lange, U. C. (2016).** Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional Activator Systems. *PLoS One*, 11(6), e0158294.
- Bisgrove, D., Mahmoudi, T., Henklein, P., & Verdin, E. (2007).** Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 13690–13695.

- Boehm, D., Calvanese, V., Dar, R. D., Xing, S., Schroeder, S., Martins, L., ... Ott, M. (2013).** BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. *Cell Cycle*, 12(3), 452–462.
- Boerner, K., Nickl, M., Schmidt, F., Gnirck, A.-C., Bayer, P., Kräusslich, H.-G., & Grimm, D. (2015).** AAV Vector-Mediated CRISPR Attacks on Proviral HIV-1 DNA for Purging of Cellular Reservoirs. *Mol. Ther.*, 23(May), S25.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., ... Shaw, G. M. (1997).** Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.*, 3(2), 205–11.
- Bosque, A., & Planelles, V. (2009).** Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4⁺ T cells. *Blood*, 113(1), 58–65.
- Brady, T., Agosto, L. M., Malani, N., Berry, C. C., O'Doherty, U., & Bushman, F. (2009).** HIV integration site distributions in resting and activated CD4⁺ T cells infected in culture. *AIDS*, 23(12), 1461–71.
- Bromley, S. K., Thomas, S. Y., & Luster, A. D. (2005).** Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat. Immunol.*, 6(9), 895–901.
- Brooks, D. G., Arlen, P. A., Gao, L., Kitchen, C. M. R., & Zack, J. A. (2003).** Identification of T cell-signaling pathways that stimulate latent HIV in primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(22), 12955–12960.
- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., ... Siliciano, R. F. (2016).** Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat. Med.*, 22(August), 1043–1049.
- Bullen, C. K., Laird, G. M., Durand, C. M., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2014).** New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat. Med.*, 20(4), 425–429.
- Butera, S. T., Perez, V. L., Wu, B. Y., Nabel, G. J., & Folks, T. M. (1991).** Oscillation of the human immunodeficiency virus surface receptor is regulated by the state of viral activation in a CD4⁺ cell model of chronic infection. *J. Virol.*, 65(9), 4645–53.
- Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., ... Lichterfeld, M. (2014).** HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 20(2), 139–42.
- Calvanese, V., Chavez, L., Laurent, T., Ding, S., & Verdin, E. (2013).** Dual-color HIV reporters trace a population of latently infected cells and enable their purification. *Virology*, 446(1–2), 283–292.
- Cameron, P. U., Saleh, S., Sallmann, G., Solomon, A., Wightman, F., Evans, V. A., ... Lewin, S. R. (2010).** Establishment of HIV-1 latency in resting CD4⁺ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(39), 16934–16939.
- Carter, C. C., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L. A., Riddell, J., Bixby, D., Savona, M. R., & Collins, K. L. (2010).** HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell

- death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat. Med.*, 16(4), 446–451.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., ... Turano, A. (1997).** Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, 27(1), 71–6.
- Centers for Disease Control [CDC]. (1982).** Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 31(37), 507–8, 513–4.
- Chavez, L., Calvanese, V., & Verdin, E. (2015).** HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T, 1–21.
- Cheng, A. W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T. W., ... Jaenisch, R. (2013).** Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.*, 23(10), 1163–1171.
- Cheng, R., Peng, J., Yan, Y., Cao, P., Wang, J., Qiu, C., ... Zhang, P. (2014).** Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Lett.*, 588(21), 3954–3958.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., ... Debyser, Z. (2003).** HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J. Biol. Chem.*, 278(1), 372–81.
- Chew, W. L., Tabebordbar, M., Cheng, J. K. W., Mali, P., Wu, E. Y., Ng, A. H. M., ... Church, G. M. (2016).** A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. *Nat. Methods*, 13(10), 868–874.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. a, Yassine-Diab, B., ... Sékaly, R.-P. (2009).** HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.*, 15(8), 893–900.
- Chun, T.-W., Engel, D., Mizell, S. B., Ehler, L. a, & Fauci, A. S. (1998).** Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected CD4 + T Cells Using a Combination of Cytokines. *J. Exp. Med.*, 188(1), 83–91.
- Chun, T.-W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., & Siliciano, R. F. (1995).** In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.*, 1(12), 1284–90.
- Chun, T.-W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A. M., Baseler, M., ... Fauci, A. S. (1997).** Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94(24), 13193–13197.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., ... al., et. (1986).** Human immunodeficiency viruses. *Science (80-.)*, 232(4751).
- Cohn, L. B., Silva, I. T., Oliveira, T. Y., Rosales, R. A., Parrish, E. H., Learn, G. H., ... Nussenzweig, M. C. (2015).** HIV-1 Integration Landscape during Latent and Active Infection. *Cell*, 160(3), 420–432.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013).** Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-.)*, 339(6121), 819–823.

- Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., ... Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(50), 21931–6.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.*, 14(6), 1188–1190.
- Cullen, B. R. (1986). Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell*, 46(7), 973–82.
- Cyster, J. G. (2005). Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Annu. Rev. Immunol.*, 23(1), 127–159.
- Dahabieh, M. S., Ooms, M., & Simon, V. (2013). A Doubly Fluorescent HIV-1 Reporter Shows that the Majority of Integrated HIV-1 Is Latent Shortly after Infection, 87(8), 4716–4727.
- Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., ... Van Lint, C. (2015). An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.*, 11(7), e1005063.
- Deeks, S. G. (2012). HIV: Shock and kill. *Nature*, 487(7408), 439–440.
- Deere, J. D., Schinazi, R. F., & North, T. W. (2011). Simian immunodeficiency virus macaque models of HIV latency. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 6(1), 57–61.
- Deng, K., Perteza, M., Rongvaux, A., Wang, L., Durand, C. M., Ghiaur, G., ... Siliciano, R. F. (2015). Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature*, 517(7534), 381–385.
- Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Sfakianos, J. N., Wu, X., O'Brien, W. A., Ratner, L., ... Hunter, E. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.*, 74(18), 8358–67.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., ... Benkirane, M. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*.
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K. M., Ng, S. L., Gosis, B. S., Regan, S. N., ... Musunuru, K. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.*, 115(5), 488–492.
- Doms, R. W., & Reeves, J. D. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.*, 83(6), 1253–1265.
- Donahue, D. A., Kuhl, B. D., Sloan, R. D., & Wainberg, M. A. (2012). The viral protein Tat can inhibit the establishment of HIV-1 latency. *J. Virol.*, 86(6), 3253–63.
- Donahue, D. A., & Wainberg, M. A. (2013). Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. *Retrovirology*, 10(1), 11.
- Donnelly, M. L. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., Ten Dam, E., Gani, D., &

- Ryan, M. D. (2001).** The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. *J. Gen. Virol.*, 82(5), 1027–1041.
- Doyon, G., Zerbato, J., Mellors, J. W., & Sluis-Cremer, N. (2012).** Disulfiram reactivates latent HIV-1 expression through depletion of the phosphatase and tensin homolog (PTEN). *Aids*, (May), 1.
- Duan, J., Lu, G., Xie, Z., Lou, M., Luo, J., Guo, L., & Zhang, Y. (2014).** Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res.*, 24(8), 1009–1012.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998).** A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.*, 72(11), 8463–71.
- Duverger, A., Jones, J., May, J., Bibollet-Ruche, F., Wagner, F. A., Cron, R. Q., & Kutsch, O. (2009).** Determinants of the establishment of human immunodeficiency virus type 1 latency. *J. Virol.*, 83(7), 3078–93.
- Elliott, J. H., McMahon, J., Chang, C. C., Lee, S. A., Hartogensis, W., Bumpus, N. N., ... Lewin, S. R. (2015).** Short-term Disulfiram to Reverse Latent HIV Infection: A Phase 2 Dose Escalation Study. *Lancet HIV*, 2(12), 520–529.
- Elliott, J. H., Wightman, F., Solomon, A., Ghneim, K., Ahlers, J., Cameron, M. J., ... Lewin, S. R. (2014).** Activation of HIV Transcription with Short-Course Vorinostat in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog.*, 10(10), e1004473.
- Emiliani, S., Fischle, W., Ott, M., Van Lint, C., Amella, C. A., & Verdin, E. (1998).** Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line. *J. Virol.*, 72(2), 1666–70.
- Emiliani, S., Van Lint, C., Fischle, W., Paras, P., Ott, M., Brady, J., & Verdin, E. (1996).** A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(13), 6377–6381.
- Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. A., Lysenko, E. S., ... Siliciano, J. D. (2013).** Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathog.*, 9(2), e1003174.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., ... Siliciano, R. F. (1999).** Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.*, 5(5), 512–517.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., ... Siliciano, R. F. (1997).** Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295–300.
- Folks, T. M., Clouse, K. A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J. H., & Fauci, A. S. (1989).** Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(7), 2365–2368.
- Folks, T. M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C. A., & Fauci, A. S. (1987).** Cytokine-

- induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science*, 238(4828), 800–802.
- Frankel, A. D., & Young, J. A. T. (1998).** HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 67(1), 1–25.
- Freed, E. O. (2015).** HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*, 13(8), 484–496.
- Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., ... Wolinsky, S. M. (1999).** Persistence of HIV-1 Transcription in Peripheral-Blood Mononuclear Cells in Patients Receiving Potent Antiretroviral Therapy. *N. Engl. J. Med.*, 340(21), 1614–1622.
- Gaj, T., Staahl, B. T., Rodrigues, G. M. C., Limsirichai, P., Ekman, F. K., Doudna, J. A., & Schaffer, D. V. (2017).** Targeted gene knock-in by homology-directed genome editing using Cas9 ribonucleoprotein and AAV donor delivery. *Nucleic Acids Res.*, 1–11.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., ... Popovic, M. (1983).** Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 865–7.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., ... Hahn, B. H. (1999).** Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–441.
- Garcia, J. V. (2016).** In vivo platforms for analysis of HIV persistence and eradication. *J. Clin. Invest.*, 126(2), 424–431.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012).** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(39), E2579-86.
- Geissler, R., Hauber, I., Funk, N., Richter, A., Behrens, M., Renner, I., ... Behrens, S.-E. (2015).** Patient-adapted, specific activation of HIV-1 by customized TAL effectors (TALEs), a proof of principle study. *Virology*, 486, 248–254.
- Ghosh, A. K., Osswald, H. L., & Prato, G. (2016).** Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *J. Med. Chem.*, 59(11), 5172–5208.
- Gianella, S., von Wyl, V., Fischer, M., Niederoest, B., Battegay, M., Bernasconi, E., ... HIV Cohort Study, the S. (2011).** Effect of early antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on cell-associated HIV-1 DNA and plasma HIV-1 RNA. *Antivir. Ther.*, 16(4), 535–545.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., ... Qi, L. S. (2013).** CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451.
- Gilham, D. E., Lie-A-Ling, M., Taylor, N., & Hawkins, R. E. (2010).** Cytokine stimulation and the choice of promoter are critical factors for the efficient transduction of mouse T cells with HIV-1 vectors. *J. Gene Med.*, 12(2), 129–136.
- Greger, I. H., Demarchi, F., Giacca, M., & Proudfoot, N. J. (1998).** Transcriptional

- interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 26(5), 1294–1300.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2007).** A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell*, 130(1), 77–88.
- Gutiérrez, C., Serrano-Villar, S., Madrid-Elena, N., Pérez-Eliás, M. J., Martín, M. E., Barbas, C., ... Moreno, S. (2016).** Bryostatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS*, 30(9), 1385–92.
- Hakre, S., Chavez, L., Shirakawa, K., & Verdin, E. (2012).** HIV latency: Experimental systems and molecular models. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36(3), 706–716.
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Ahmad, R., Shimoji, S., Liu, X., ... Siliciano, J. D. (2004).** Resting CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J. Virol.*, 78(12), 6122–33.
- Han, Y., Lin, Y. B., An, W., Xu, J., Yang, H. C., Connell, K. O., ... Siliciano, R. F. (2008).** Orientation-dependent Regulation of Integrated HIV-1 Expression by Host Gene Transcriptional Readthrough. *Cell Host Microbe*, 4(2), 134–146.
- Haqqani, A. A., & Tilton, J. C. (2013).** Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.*, 98(2), 158–170.
- Hartman, Z. C., Appledorn, D. M., & Amalfitano, A. (2008).** Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.*, 132(1–2), 1–14.
- Hauber, I., Hofmann-Sieber, H., Chemnitz, J., Dubrau, D., Chusainow, J., Stucka, R., ... Hauber, J. (2013).** Highly significant antiviral activity of HIV-1 LTR-specific tre-recombinase in humanized mice. *PLoS Pathog.*, 9(9), e1003587.
- Herbst, F., Ball, C. R., Tuorto, F., Nowrouzi, A., Wang, W., Zavidij, O., ... Glimm, H. (2012).** Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Mol. Ther.*, 20(5), 1014–21.
- Hersperger, A. R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L. Y., ... Betts, M. R. (2010).** Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8⁺ T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.*, 6(5), 1–13.
- Hirsch, M. L., Wolf, S. J., & Samulski, R. J. (2016).** Delivering transgenic DNA exceeding the carrying capacity of AAV vectors. In *Methods Mol. Biol.* (Vol. 1382, pp. 21–39).
- Ho, D. D. (1995).** Time to hit HIV, early and hard. *N. Engl. J. Med.*, 333(7), 450–1.
- Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I. S., ... Siliciano, R. F. (2013).** Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell*, 155(3), 540–551.
- Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K., & Cullen, B. R. (1991).** Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*, 253(5015), 71–4.

- Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, A., & Matsushita, S. (2007).** Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4⁺ T cell populations during effective highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.*, 195(5), 716–725.
- Ilina, T., & Parniak, M. A. (2008).** Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Adv. Pharmacol.*, 56(7), 121–67.
- Itoh, G., Sugino, S., Ikeda, M., Mizuguchi, M., Kanno, S. I., Amin, M. A., ... Tanaka, K. (2013).** Nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci.*, 104(7), 871–879.
- Ji, H., Jiang, Z., Lu, P., Ma, L., Li, C., Pan, H., ... Zhu, H. (2016).** Specific Reactivation of Latent HIV-1 by dCas9-SunTag-VP64-mediated Guide RNA Targeting the HIV-1 Promoter. *Mol. Ther.*, 24(3), 508–521.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012).** A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.)*, 337(6096), 816–821.
- Jordan, A., Bisgrove, D., & Verdin, E. (2003).** HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.*, 22(8), 1868–1877.
- Jordan, A., Defechereux, P., & Verdin, E. (2001).** The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.*, 20(7), 1726–1738.
- Kalams, S. A., Goulder, P. J., Shea, A. K., Jones, N. G., Trocha, A. K., Ogg, G. S., & Walker, B. D. (1999).** Levels of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Cytotoxic T- Lymphocyte Effector and Memory Responses Decline after Suppression of Viremia with Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 73(8), 6721–6728.
- Kaminski, R., Bella, R., Yin, C., Otte, J., Ferrante, P., Gendelman, H. E., ... Khalili, K. (2016).** Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.*, (April), 1–6.
- Kao, S.-Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., & Peterlin, B. M. (1987).** Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330(6147), 489–493.
- Karn, J. (1999).** Tackling tat. *J. Mol. Biol.*, 293(2), 235–254.
- Kauder, S. E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., & Verdin, E. (2009).** Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog.*, 5(6).
- Kinter, A., Moorthy, A., Jackson, R., & Fauci, A. S. (2003).** Productive HIV infection of resting CD4⁺ T cells: role of lymphoid tissue microenvironment and effect of immunomodulating agents. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 19(10), 847–856.
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Hsu, P. D., Heidenreich, M., Cong, L., ... Zhang, F. (2013).** Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500(7463), 472–6.
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., ... Zhang, F. (2015).** Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–8.

- Konishi, M., Kawamoto, K., Izumikawa, M., Kuriyama, H., & Yamashita, T. (2008).** Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.*, 10(6), 610–618.
- Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., & Schindler, M. (2012).** Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*, 9(1), 82.
- Kulkosky, J., Culnan, D. M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Michael, R., ... Boyd, M. R. (2001).** Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, 98(10), 3006–3015.
- Kumar, A., Abbas, W., & Herbein, G. (2014).** HIV-1 Latency in Monocytes/Macrophages. *Viruses*, 6(4), 1837–1860.
- Kumar, N., Chahroudi, A., & Silvestri, G. (2016).** Animal models to achieve an HIV cure. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 11(4), 432–441.
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., & Adli, M. (2014).** Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 32(7), 677–683.
- Kutsch, O., Benveniste, E. N., Shaw, G. M., & Levy, D. N. (2002).** Direct and quantitative single-cell analysis of human immunodeficiency virus type 1 reactivation from latency. *J. Virol.*, 76(17), 8776–86.
- Laird, G. M., Bullen, C. K., Rosenbloom, D. I. S., Martin, A. R., Hill, A. L., Durand, C. M., ... Siliciano, R. F. (2015).** Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency – reversing drug combinations, 125(5), 1–12.
- Larochelle, N., Stucka, R., Rieger, N., Schermelleh, L., Schiedner, G., Kochanek, S., ... Lochmüller, H. (2011).** Genomic integration of adenoviral gene transfer vectors following transduction of fertilized mouse oocytes. *Transgenic Res.*, 20(1), 123–35.
- Laubach, J. P., Moreau, P., San-Miguel, J. F., & Richardson, P. G. (2015).** Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 21(21), 4767–73.
- Lee, G. Q., & Lichterfeld, M. (2016).** Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4+ T-cell subpopulations. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 1.
- Lenasi, T., Contreras, X., & Peterlin, B. M. (2008).** Transcriptional Interference Antagonizes Proviral Gene Expression to Promote HIV Latency. *Cell Host Microbe*, 4(2), 123–133.
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., & Sodroski, J. (1989).** Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.*, 63(9), 4085–4087.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., & Oshiro, L. S. (1984).** Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, 225(4664), 840–2.
- Lewinski, M. K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannenhalli, S., ... Bushman, F. D. (2005).** Genome-Wide Analysis of Chromosomal Features Repressing

- Human Immunodeficiency Virus Transcription. *J. Virol.*, 79(11), 6610–6619.
- Lewinski, M. K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., ... Bushman, F. D. (2006).** Retroviral DNA Integration: Viral and Cellular Determinants of Target-Site Selection. *PLoS Pathog.*, 2(6), e60.
- Li, Z., Guo, J., Wu, Y., & Zhou, Q. (2013).** The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res.*, 41(1), 277–287.
- Limsirichai, P., Gaj, T., & Schaffer, D. V. (2015).** CRISPR-mediated activation of latent HIV-1 expression. *Mol. Ther.*
- Liu, H., Dow, E. C., Arora, R., Kimata, J. T., Bull, L. M., Arduino, R. C., & Rice, A. P. (2006).** Integration of human immunodeficiency virus type 1 in untreated infection occurs preferentially within genes. *J. Virol.*, 80(15), 7765–8.
- Lu, P., Qu, X., Shen, Y., Jiang, Z., Wang, P., Zeng, H., ... Zhu, H. (2016).** The BET inhibitor OTX015 reactivates latent HIV-1 through P-TEFb. *Sci. Rep.*, 6(1), 24100.
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., & Joung, J. K. (2013).** CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 10(10), 977–979.
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F. R., Shao, W., Hill, S., ... Hughes, S. H. (2014).** Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science (80-.)*, 345(6193), 179–183.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., ... Church, G. M. (2013).** CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.*, 31(9), 833–8.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013).** RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science (80-.)*, 339(6121), 823–826.
- Mandal, P. K., Ferreira, L. M. R., Collins, R., Meissner, T. B., Boutwell, C. L., Friesen, M., ... Cowan, C. A. (2014).** Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 15(5), 643–652.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2007).** FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist*, 12(10), 1247–52.
- Mansky, L. M. (1996).** The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology*, 222(2), 391–400.
- Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., ... Lusic, M. (2015).** Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature*, 521(7551), 227–231.
- Menéndez-Arias, L., Sebastián-Martín, A., & Álvarez, M. (2017).** Viral reverse transcriptases. *Virus Res.*, 234, 153–176.
- Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., & Sallusto, F. (2003).**

- Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat. Immunol.*, 4(1), 78–86.
- Métifiot, M., Marchand, C., & Pommier, Y. (2013).** HIV integrase inhibitors. 20-year landmark and challenges. In *Adv. Pharmacol.* (Vol. 67, pp. 75–105).
- Migueles, S. A., Weeks, K. A., Nou, E., Berkley, A. M., Rood, J. E., Osborne, C. M., ... Connors, M. (2009).** Defective Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8⁺ T-Cell Polyfunctionality, Proliferation, and Cytotoxicity Are Not Restored by Antiretroviral Therapy. *J. Virol.*, 83(22), 11876–11889.
- Miller, B. R., Powers, M., Park, M., Fischer, W., & Forbes, D. J. (2000).** Identification of a new vertebrate nucleoporin, Nup188, with the use of a novel organelle trap assay. *Mol. Biol. Cell*, 11(October), 3381–3396.
- Mockenhaupt, S., & Grimm, D. (2011).** Vektorologie: Adeno-assoziierte Viren für effizientes Gene Targeting in humanen Zellen. *BioSpektrum*, 17(5), 533–536.
- Montagnier, L., Chermann, J. C., Barré-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., ... Rouzioux, C. (1984).** Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp.*, 15, 319–31.
- Moore, M. D., Fu, W., Nikolaitchik, O., Chen, J., Ptak, R. G., & Hu, W.-S. (2007).** Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J. Virol.*, 81(8), 4002–11.
- Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J.-C. (2013).** Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(3), 448–461.
- Mukherjee, S., Santilli, G., Blundell, M. P., Navarro, S., Bueren, J. A., & Thrasher, A. J. (2011).** Generation of functional neutrophils from a mouse model of X-linked chronic granulomatous disorder using induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 6(3), e17565.
- Müller-Kuller, U., Ackermann, M., Kolodziej, S., Brendel, C., Fritsch, J., Lachmann, N., ... Grez, M. (2015).** A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 43(3), 1577–1592.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., & Miyawaki, A. (2002).** A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.*, 20(1), 87–90.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... Nureki, O. (2014).** Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–49.
- O’Geen, H., Henry, I. M., Bhakta, M. S., Meckler, J. F., & Segal, D. J. (2015).** A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Res.*, 43(6), 3389–3404.
- Pace, M. J., Graf, E. H., Agosto, L. M., Mexas, A. M., Male, F., Brady, T., ... O’Doherty, U. (2012).** Directly Infected Resting CD4⁺T Cells Can Produce HIV Gag without Spreading Infection in a Model of HIV Latency. *PLoS Pathog.*, 8(7), e1002818.

- Palella, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., ... Investigators, the H. O. S. (1998).** Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Engl. J. Med.*, 338(13), 853–860.
- Pan, X., Baldauf, H., Keppler, O. T., & Fackler, O. T. (2013).** Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res.*, 23(7), 876–85.
- Peabody, D. S. (1993).** The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *EMBO J.*, 12(2), 595–600.
- Pearson, R., Kim, Y. K., Hokello, J., Lassen, K., Friedman, J., Tyagi, M., & Karn, J. (2008).** Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J. Virol.*, 82(24), 12291–303.
- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., ... Delaporte, E. (1997).** Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS*, 11(4), 493–8.
- Perdigão, P., Gaj, T., Santa-Marta, M., Barbas, C. F., & Goncalves, J. (2016).** Reactivation of Latent HIV-1 Expression by Engineered TALE Transcription Factors. *PLoS One*, 11(3), e0150037.
- Perelson, A. S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., ... Ho, D. D. (1997).** Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, 387(6629), 188–191.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., ... Gersbach, C. A. (2013).** RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods*, 10(10), 973–6.
- Perez, V. L., Rowe, T., Justement, J. S., Butera, S. T., June, C. H., & Folks, T. M. (1991).** An HIV-1-infected T cell clone defective in IL-2 production and Ca²⁺ mobilization after CD3 stimulation. *J. Immunol.*, 147(9), 3145–8.
- Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E. K., ... Pantaleo, G. (2013).** Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J. Exp. Med.*, 210(1), 143–56.
- Pfaff, N., Lachmann, N., Ackermann, M., Kohlscheen, S., Brendel, C., Maetzig, T., ... Moritz, T. (2013).** A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *Stem Cells*, 31(3), 488–499.
- Pierson, T. C., Zhou, Y., Kieffer, T. L., Christian, T., Buck, C., Siliciano, R. F., & Ruff, C. T. (2002).** Molecular Characterization of Preintegration Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.*, 76(17), 8518–8531.
- Pires, A., Hardy, G., Gazzard, B., Gotch, F., & Imami, N. (2004).** Initiation of Antiretroviral Therapy During Recent HIV-1 Infection Results in Lower Residual Viral Reservoirs. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 36(3), 783–790.
- Planelles, V., Wolschendorf, F., & Kutsch, O. (2011).** Facts and fiction: cellular models for high throughput screening for HIV-1 reactivating drugs. *Curr HIV Res*, 9(8), 568–578.

- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., ... Simon, F. (2009).** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.*, 15(8), 871–872.
- Policicchio, B. B., Pandrea, I., & Apetrei, C. (2016).** Animal Models for HIV Cure Research. *Front. Immunol.*, 7, 12.
- Pollard, V. W., & Malim, M. H. (1998).** The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52(1), 491–532.
- Polstein, L. R., Perez-pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, M., Bledsoe, P., Song, L., ... Surgery, O. (2015).** Genome-wide specificity of DNA binding , gene regulation , and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR / Cas9-based transcriptional activators. *Genome Res.*, 25, 1158–1169.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992).** Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233.
- Qin, Q., Penkert, R. R., & Kalejta, R. F. (2013).** Heterologous Viral Promoters Incorporated into the Human Cytomegalovirus Genome Are Silenced during Experimental Latency. *J. Virol.*, 87(17), 9886–94.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. a., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., ... Zhang, F. (2015).** In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–190.
- Rasmussen, T. A., & Lewin, S. R. (2016).** Shocking HIV out of hiding: where are we with clinical trials of latency reversing agents? *Curr. Opin. HIV AIDS*, 11(4), 1.
- Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Brinkmann, C. R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., ... Sogaard, O. S. (2014).** Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV*, 1(1), e13–e21.
- Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Moller, H., Brinkmann, C. R., Olesen, R., Erikstrup, C., ... Sogaard, O. S. (2015).** Activation of Latent Human Immunodeficiency Virus by the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat: A Pilot Study to Assess Effects on the Central Nervous System. *Ofid*, 2(1), 1–8.
- Razooky, B. S., Pai, A., Aull, K., Rouzine, I. M., & Weinberger, L. S. (2015).** A hardwired HIV latency program. *Cell*, 160(5), 990–1001.
- Reuse, S., Calao, M., Kabeya, K., Guiguen, A., Gatot, J. S., Quivy, V., ... Van Lint, C. (2009).** Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: Implications for treatment of latent infection. *PLoS One*, 4(6).
- Rullas, J., Bermejo, M., García-Pérez, J., Beltán, M., González, N., Hezareh, M., ... Alcamí, J. (2004).** Prostratin induces HIV activation and downregulates HIV receptors in peripheral blood lymphocytes. *Antivir. Ther.*, 9(4), 545–54.
- Saayman, S. M., Lazar, D. C., Scott, T. A., Hart, J. R., Takahashi, M., Burnett, J. C., ... Weinberg, M. S. (2015).** Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex. *Mol. Ther.*

- Sáez-Cirión, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., ... Venet, A. (2007).** HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(16), 6776–81.
- Sahu, G. K., Lee, K., Ji, J., Braciale, V., Baron, S., & Cloyd, M. W. (2006).** A novel in vitro system to generate and study latently HIV-infected long-lived normal CD4+ T-lymphocytes. *Virology*, 355(2), 127–137.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., ... Miyawaki, A. (2008).** Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*, 132(3), 487–498.
- Saleh, S., Solomon, A., Wightman, F., Xhilogal, M., Cameron, P., & Lewin, S. (2007).** The CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting CD4+ T cells to HIV infection. *Blood*, 110(13), 4161–4164.
- Saleh, S., Wightman, F., Ramanayake, S., Alexander, M., Kumar, N., Khoury, G., ... Lewin, S. R. (2011).** Expression and reactivation of HIV in a chemokine induced model of HIV latency in primary resting CD4+ T cells. *Retrovirology*, 8(1), 80.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., ... Cosset, F.-L. (2002).** Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood*, 100(3), 823–32.
- Schagen, F. H. E., Ossevoort, M., Toes, R. E. M., & Hoeben, R. C. (2004).** Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 50(1), 51–70.
- Schlub, T. E., Smyth, R. P., Grimm, A. J., Mak, J., & Davenport, M. P. (2010).** Accurately measuring recombination between closely related HIV-1 genomes. *PLoS Comput. Biol.*, 6(4), e1000766.
- Schrijvers, R., De Rijck, J., Demeulemeester, J., Adachi, N., Vets, S., Ronen, K., ... Gijssbers, R. (2012).** LEDGF/p75-Independent HIV-1 Replication Demonstrates a Role for HRP-2 and Remains Sensitive to Inhibition by LEDGINs. *PLoS Pathog.*, 8(3), e1002558.
- Schröder, A. R. W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., & Bushman, F. (2002).** HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell*, 110(4), 521–529.
- Schröder, S., Cho, S., Zeng, L., Zhang, Q., Kaehlcke, K., Mak, L., ... Ott, M. (2012).** Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.*, 287(2), 1090–1099.
- Schumann, K., Lin, S., Boyer, E., Simeonov, D. R., Subramaniam, M., Gate, R. E., ... Marson, A. (2015).** Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(33), 10437–10442.
- Senís, E., Fatouros, C., Große, S., Wiedtke, E., Niopek, D., Mueller, A. K., ... Grimm, D. (2014).** CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol. J.*, 9(11), 1402–1412.

- Shan, L., Deng, K., Shroff, N. S., Durand, C. M., Rabi, S. A., Yang, H. C., ... Siliciano, R. F. (2012).** Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity*, 36(3), 491–501.
- Shan, L., Yang, H.-C., Rabi, S. A., Bravo, H. C., Shroff, N. S., Irizarry, R. A., ... Siliciano, R. F. (2011).** Influence of host gene transcription level and orientation on HIV-1 latency in a primary-cell model. *J. Virol.*, 85(11), 5384–93.
- Sherrill-Mix, S., Lewinski, M. K., Famiglietti, M., Bosque, A., Malani, N., Ocwieja, K. E., ... Bushman, F. D. (2013).** HIV latency and integration site placement in five cell-based models. *Retrovirology*, 10(1), 90.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, 7(1), 539.
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., ... Siliciano, R. F. (2003).** Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat. Med.*, 9(6), 727–728.
- Siliciano, R. F., & Greene, W. C. (2011).** HIV Latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 1(1), a007096–a007096.
- Simms, P., & Ellis, T. (1996).** Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3(3), 301–304.
- Simonetti, F. R., Sobolewski, M. D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., ... Maldarelli, F. (2016).** Clonally expanded CD4⁺ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(7).
- Sloan, D. D., Irrinki, A., Tsai, A., Kaur, J., Lalezari, J., Murry, J., & Cihlar, T. (2015).** TLR7 Agonist GS-9620 Activates HIV-1 in PBMCs From HIV-Infected Patients on cART. In *Conf. Retroviruses Opportunistic Infect. 2015, Seattle, Washing.* (p. P-F7, 417).
- Sogaard, O. S., Graversen, M. E., Leth, S., Olesen, R., Brinkmann, C. R., Nissen, S. K., ... Tolstrup, M. (2015).** The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.*, 11(9), 1–22.
- Spina, C. A., Anderson, J., Archin, N. M., Bosque, A., Chan, J., Famiglietti, M., ... Planelles, V. (2013).** An In-Depth Comparison of Latent HIV-1 Reactivation in Multiple Cell Model Systems and Resting CD4⁺ T Cells from Aviremic Patients. *PLoS Pathog.*, 9(12), 1–15.
- Spivak, A. M., Andrade, A., Eisele, E., Hoh, R., Bacchetti, P., Bumpus, N. N., ... Deeks, S. G. (2014).** A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 58(6), 883–890.
- Stein, S., Ott, M. G., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., ... Grez, M. (2010).** Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.*, 16(2), 198–204.

- Sun, H., Kim, D., Li, X., Kiselina, M., Ouyang, Z., Vandekerckhove, L., & Shang, H. (2015). Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 89(22), 11284–11293.
- Sundquist, W. I., & Kräusslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*
- Swiggard, W. J., Baytop, C., Yu, J. J., Li, C., Schretzenmair, R., Doherty, U. O., ... O'Doherty, U. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4 + T Cells in the Absence of Activating Stimuli. *J. Virol.*, 79(22), 14179–14188.
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., & Vale, R. D. (2014). A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell*, 159(3), 635–646.
- Thomson, M. M., Pérez-Álvarez, L., & Nájera, R. (2002, August). Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* Elsevier.
- Tran, T. A., de Goër de Herve, M. G., Hendel-Chavez, H., Dembele, B., Le Nénot, E., Abbed, K., ... Taoufik, Y. (2008). Resting regulatory CD4 T cells: A site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One*, 3(10).
- Trypsteen, W., Vynck, M., De Neve, J., Bonczkowski, P., Kiselina, M., Malatinkova, E., ... De Spiegelaere, W. (2015). ddpcRquant: threshold determination for single channel droplet digital PCR experiments. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(19), 5827–5834.
- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.*, 285(1), 1–32.
- Tyagi, M., Pearson, R. J., & Karn, J. (2010). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J. Virol.*, 84(13), 6425–37.
- Uchiyama, T., Adriani, M., Jagadeesh, G. J., Paine, A., & Candotti, F. (2012). Foamy Virus Vector-mediated Gene Correction of a Mouse Model of Wiskott–Aldrich Syndrome. *Mol. Ther.*, 20(6), 1270–1279.
- UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2016). *Global AIDS Update - 2016*.
- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., & Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J.*, 15(5), 1112–20.
- Voigt, P., Tee, W.-W., & Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.*, 27(12), 1318–1338.
- Wagner, T. A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C. Y. K., Larsen, B., Styrchak, S., ... Frenkel, L. M. (2014). Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science (80-.)*, 345(6196), 570–573.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., & Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*, 40(1), 9–17.

- Wang, D., Mou, H., Li, S., Li, Y., Hough, S., Tran, K., ... Xue, W. (2015). Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. *Hum. Gene Ther.*, 26(7), 432–442.
- Wang, P., Qu, X., Wang, X., Zhu, X., Zeng, H., Chen, H., & Zhu, H. (2014). Specific reactivation of latent HIV-1 with designer zinc-finger transcription factors targeting the HIV-1 5'-LTR promoter. *Gene Ther.*, 21(5), 490–495.
- Wang, X., Wang, P., Fu, Z., Ji, H., Qu, X., Zeng, H., ... Zhu, H. (2015). Designed Transcription Activator-Like Effector Proteins Efficiently Induced the Expression of Latent HIV-1 in Latently Infected Cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 31(1), 98–106.
- Wanisch, K., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2009). Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol. Ther.*, 17(8), 1316–1332.
- Wei, D. G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., ... Cihlar, T. (2014). Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLoS Pathog.*, 10(4), e1004071.
- Whitney, J. B., Lim, S.-Y., Osuna, C., Sanisetty, S., Barnes, T., Cihlar, T., ... Hesselgesser, J. (2016). Repeated TLR7 Agonist Treatment of SIV+ Monkeys on ART Can Lead to Viral Remission. In *Conf. Retroviruses Opportunistic Infect. 2016, Bost. Massachusetts* (p. O-7, 95LB).
- Whitney, J. B., Lim, S.-Y., Osuna, C., Sanisetty, S., Barnes, T., Hrabner, P., ... Hesselgesser, J. (2015). Treatment With a TLR7 Agonist Induces Transient Viremia in SIV-Infected ART-Suppressed Monkeys. In *Conf. Retroviruses Opportunistic Infect. 2015, Seattle, Washingt.* (p. O-9, 108).
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331–338.
- Williams, S. A., Chen, L.-F., Kwon, H., Fenard, D., Bisgrove, D., Verdin, E., & Greene, W. C. (2004). Prostratin Antagonizes HIV Latency by Activating NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, 279(40), 42008–42017.
- Williams, S., Mustoe, T., Mulcahy, T., Griffiths, M., Simpson, D., Antoniou, M., ... Crombie, R. (2005). No Title. *BMC Biotechnol.*, 5(1), 17.
- Wong, J. K., & Yukl, S. A. (2016). Tissue reservoirs of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 11(4), 362–370.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., ... Sharp, P. A. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 32(7), 670–676.
- Xing, S., & Siliciano, R. F. (2013). Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discov. Today*, 18(11–12), 541–551.
- Yáñez-Muñoz, R. J., Balaggan, K. S., MacNeil, A., Howe, S. J., Schmidt, M., Smith, A. J., ... Thrasher, A. J. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.*, 12(3), 348–53.
- Yang, H., Xing, S., Shan, L., Connell, K. O., Dinoso, J., Shen, A., ... Siliciano, R. F.

- (2009). Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *J. Clin. Invest.*, 119(11), 3473–3485.
- Yi, G., Choi, J. G., Bharaj, P., Abraham, S., Dang, Y., Kafri, T., ... Shankar, P. (2014). CCR5 Gene Editing of Resting CD4(+) T Cells by Transient ZFN Expression From HIV Envelope Pseudotyped Nonintegrating Lentivirus Confers HIV-1 Resistance in Humanized Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 3(August), e198.
- Yin, C., Zhang, T., Qu, X., Zhang, Y., Putatunda, R., Xiao, X., ... Hu, W. (2017). In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Mol. Ther.*, 25(5), 1–19.
- Yoder, A., Yu, D., Dong, L., Iyer, S. R., Xu, X., Kelly, J., ... Wu, Y. (2008). HIV Envelope-CXCR4 Signaling Activates Cofilin to Overcome Cortical Actin Restriction in Resting CD4 T Cells. *Cell*, 134(5), 782–792.
- Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitauro, M., ... Yoshie, O. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J. Biol. Chem.*, 272(21), 13803–13809.
- Yukl, S. A., Pillai, S., Chang, K., Pasutti, W., Ahlgren, C., Havlir, D., ... Wong, J. (2009). Latently-Infected CD4+ T Cells are Enriched for HIV-1 Tat Variants with Impaired Transactivation Activity. *Virology*, 387(1), 98–108.
- Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A., & Chen, I. S. Y. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*, 61(2), 213–222.
- Zhang, F., Frost, A. R., Blundell, M. P., Bales, O., Antoniou, M. N., & Thrasher, A. J. (2010). A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 18(9), 1640–9.
- Zhang, F., Thornhill, S. I., Howe, S. J., Ulaganathan, M., Schambach, A., Sinclair, J., ... Thrasher, A. J. (2007). Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood*, 110(5), 1448–1457.
- Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T., Li, F., Yang, W., Kaminski, R., ... Hu, W. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci. Rep.*, 5(October), 16277.
- Zhang, Z. (1999). Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4+ T Cells. *Science (80-.)*, 286(5443), 1353–1357.
- Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C. J., Gattinoni, L., Palmer, D. C., Restifo, N. P., ... Morgan, R. A. (2006). High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Mol. Ther.*, 13(1), 151–159.
- Zhou, Q., Uhlig, K. M., Muth, A., Kimpel, J., Lévy, C., Münch, R. C., ... Buchholz, C. J. (2015). Exclusive Transduction of Human CD4+ T Cells upon Systemic Delivery of CD4-Targeted Lentiviral Vectors. *J. Immunol.*, 195(5), 2493–2501.

Zhu, J., Gaiha, G. D., John, S. P., Pertel, T., Chin, C. R., Gao, G., ... Brass, A. L. (2012).
Reactivation of Latent HIV-1 by Inhibition of BRD4. *Cell Rep.*, 2(4), 807–816.

8 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom, (<i>Aquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
ARV	AIDS-assoziiertes Retrovirus
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BET	<i>bromodomain extraterminal</i>
BFP	blau fluoreszierendes Protein
BHQ1	<i>Black Hole Quencher 1</i>
BLB	Blasticidin-linker-BFP
bp	Basenpaar (<i>basepair</i>)
BRD4	<i>bromodomain-containing protein 4</i>
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i>
Cas	CRISPR-assoziiert
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cPPT	zentraler Polypurintrakt (<i>central polypurine tract</i>)
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
C _t	<i>Threshold Cycle</i>
CTL	CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zelle (<i>cytotxic T cell</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSIF	<i>DRB-sensistive inducing factor</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Env	<i>Envelope</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
<i>ffu</i>	<i>fluorescence forming units</i>

FKS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	<i>forward scatter</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HAT	Histonacetyltransferase
<i>hbg</i>	<i>humanes beta-globin</i>
HDAc	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HEK-293T	humane embryonale Nierenzellen 293T (<i>human embryonic kidney 293T</i>)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP-2	<i>hepatoma-derived growth factor related protein 2</i>
HSF1	<i>heat shock factor 1</i>
HTLV	Humanes T-Zell Leukämie-Virus
IMDM	<i>Icove's modified Eagle's medium</i>
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEDGF/p75	<i>lens epithelium-derived growth factor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
mKO2	monomerisches Kusabira Orange 2
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MS2-Protein	<i>MS2 bacteriophage coat protein</i>
Nef	<i>negative factor</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NELF	negativer Elongationsfaktor
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
<i>NUP188</i>	Nucleoporin 188 kDa
I κ B α	NF- κ B-Inhibitor-alpha
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>

8. Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglycerat-(3)-Kinase
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
P-TEFb	positiver Transkriptions- und Elongationsfaktor b
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNP	Ribonukleoproteinen
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
SA	Spliceakzeptor
SaCas9	Cas9 aus <i>Staphylococcus aureus</i>
SAHA	Suberoylanilid Hydroxyaminsäure
SD	Splicedonor
SFEM	serumfreies Expansionsmedium
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SIN	selbstinaktiverend
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SpCas9	Cas9 aus <i>Streptococcus pyogenes</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TALE	<i>transcription activator-like effector</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TAR	<i>trans-activating response element</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, (<i>Tris buffered saline</i>)
TNF- α	Tumornekrosisfaktor α

tracrRNA	<i>trans-acting</i> CRISPR RNA
TRE3G	<i>tetracyclin response element 3rd Generation</i>
USE	<i>upstream polyadenylation enhancer element</i>
Vif	<i>viral infection factor</i>
Vpr	<i>viral protein r</i>
wPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>
ZFN	Zink-Finger Nuklease

9 Anhang

Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS.

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Chloroform	06 giftig; 08 gesundheits- gefährdend	302, 331, 315, 319, 351, 361, 336, 372	261, 281, 305+351+338, 311
DNAzol	07 Achtung	226, 303, 313, 316	210, 233, 264, 270, 271, 273, 281, 301+330+331, 302+361+352, 306, 363, 304+340, 305+351+338, 303+351+338, 303+361+353, 309+311, 370+378, 403+233
Ethidiumbromid	06 giftig oder sehr giftig; 08 gesundheits- gefährdend	302, 330, 341	260, 281, 284, 310
EthylenDiamin- Tetraacetat (EDTA)	07 Achtung	319	305+351+338
Natriumhydroxid	05 ätzend	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Isopropanol	02 leicht-/ hochentzündlich	225, 319, 336	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
PeqGOLD TriFast	06 giftig oder sehr giftig, 05 ätzend, 08 gesundheits- gefährdend	301+311+331, 313, 335, 341, 373, 412	201, 261, 264, 280, 273, 301+310, 302+352, 04+361+353, 304+340, 05+351+338, 403+233, 501
Phenol	06 giftig oder sehr giftig, 05 ätzend, 08 gesundheits- gefährdend	301+311+331, 314, 341, 373, 411	260, 280, 301+330+331+310, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Propidiumiodid	07 Achtung	315, 319, 335	261, 305+351+338
RNAzol	07 Achtung,	314, 341, 373,	301+312, 304

	08 gesundheits- gefährdend, 05 ätzend	412, 302, 312, 332, 335	340, 301+330+331, 303+361+353
Schwefelsäure	05 ätzend	290-314	280-301, 330, 331-305, 351, 338-308, 310
Tetramethylbenzidin	07 Achtung	315, 319, 335	261, 305+351+338
Wasserstoffperoxid	03 brandfördernd, 05 ätzend, 07 Achtung	271, 302, 314, 332, 335, 412	210, 220, 260, 280, 305+351+338, 370+378