

Charakterisierung von SIV_{mac239} kodierten microRNAs



Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Wiebke Pauline Ibing
aus Bad Soden am Taunus

Düsseldorf, März 2015

aus dem Institut für Gefäß- und Endovaskularchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Hubert Schelzig

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2015

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 HIV (<u>H</u> umanes <u>I</u> mmundefizienz- <u>V</u> irus)	1
1.1.1 SIV als Modell für HIV.....	2
1.2 MicroRNAs.....	9
1.2.1 microRNA Biogenese	10
1.2.2 miRNA und RNA Interferenz (RNAi) als antivirale Strategie.....	11
1.2.3 Virus kodierte miRNAs und deren Funktion	12
1.2.4 DNA-Viren und microRNAs.....	13
1.2.5 Retroviren und microRNAs	14
1.2.6 HIV-1 und miRNAs	15
1.2.7 miRNA und RNAi als therapeutisches Mittel gegen HIV	18
1.3 Ziel der Arbeit	19
2 Material.....	21
2.1 Geräte.....	21
2.2 Arbeitsmittel	22
2.3 Chemikalien und Reagenzien	23
2.4 Kommerziell erhältliche Kits	25
2.5 Enzyme.....	26
2.6 Antikörper	26
2.7 Oligonukleotide	27
2.7.1 Zur Detektion der genomischen viralen RNA	27

2.7.2	Zur Detektion von miRNAs im Poly-Adenylierungs Assay	27
2.7.3	Stem-Loop-Assay	28
2.7.4	Sequenzierung	29
3	Methoden	30
3.1	Zellkultur	30
3.1.1	Kultivierung von Suspensionszelllinien	30
3.1.2	Kultivieren von adhärennten Zelllinien	31
3.1.3	Generierung eines HIV-1 Virusstocks	32
3.1.4	Generierung von virus-like-particals (VLPs) nach Brandt et al.	32
3.1.5	Infektion von Suspensionszelllinien mit SIV _{mac239}	32
3.1.6	Virus Isolation zur RNA Extraktion	33
3.1.7	Bestimmung des SIV-Titers mittels Immuno-Peroxidase Anti-Peroxidase Assay (IPAP)	33
3.1.8	Bestimmung des Virus-Titers mittels TZM-bl Test.....	35
3.1.9	Durchflusszytometrie	36
3.2	Transfektion	37
3.2.1	Transfektion von adhärennten Zellen durch Lipofektion.....	37
3.3	Generierung von transgenen Zelllinien.....	38
3.3.1	Herstellen von <i>virus like particles</i> (VLPs) zur Transduktion.....	38
3.3.2	Transduktion.....	38
3.4	Isolation von PBMCs aus EDTA-(Voll)blut mittels Zentrifugation.....	39
3.4.1	Isolation von PBMCs aus Citrat-Blut mit Hilfe des Ficoll-Diatrizoat-Gradienten.....	39
3.4.2	Isolation von CD4+ T-Zellen aus PBMCs.....	40
3.5	RNA.....	41
3.5.1	Arbeiten mit RNA.....	41
3.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion.....	41
3.5.3	Isolierung von microRNA und macroRNA	41
3.5.4	Isolation viraler RNA	42
3.6	Fällung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Natrium-Acetat/Ethanol.....	42
3.6.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	43
3.7	Aufreinigung von isolierter RNA	43
3.7.1	Qualitätskontrolle der RNA mittels Bioanalyzer.....	44
3.8	Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)	44

3.8.1	cDNA-Synthese von gesamt-RNA	44
3.8.2	cDNA Synthese von viraler RNA.....	45
3.8.3	cDNA-Synthese von kleiner RNA (miRNA)	45
3.9	Polymerase Ketten Reaktion.....	47
3.10	Quantitative real time PCR (qRT-PCR)	48
3.10.1	Bestimmung der viralen RNA Genomkopien.....	49
3.10.2	Detektion von miRNA	50
3.10.3	Quantifizierung von mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) 51	
3.11	$\Delta\Delta$ CT-Methode nach Winer et al., 1999	52
3.12	Gelelektrophorese.....	53
3.12.1	Gelelektrophorese für kleine PCR-Produkte <200 bp	53
3.12.2	Gelelektrophorese größerer DNA-Fragmente >200 bp	54
3.13	Isolierung von DNA aus einem Agarosegel.....	54
3.14	Arbeiten mit Bakterien.....	55
3.14.1	Verwendete Bakterienstämme	55
3.14.2	Bakterienkultivierung	55
3.14.3	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	55
3.14.4	Isolation von Plasmid-DNA	56
3.14.5	Analytisches Schneiden von Plasmid-DNA mithilfe von Restriktionsenzymen	56
3.14.6	Ligation von DNA in Plasmide	56
3.15	Sequenzierung.....	57
3.16	Statistik	58
3.17	Computerprogramme	58
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Infektion von C8166 und CEMx174 Zellen mit SIV _{mac239} und HIV-1	59
4.1.1	Virus Kinetik in SIV _{mac239} infizierten C8166 und CEMx174 Zellen.....	60
4.1.2	Virus Kinetik in HIV-1 infizierten C8166 und CEMx174 Zellen	66
4.1.3	Bestimmung der infektiösen SI-Viruspartikel im Zellkulturüberstand	67
4.2	Die HIV-1-TAR-Region enthält miRNAs	70
4.2.1	<i>In silico</i> Analyse zeigt mögliche pre-miR-Struktur in SIV _{mac239} TAR an	71
4.2.2	Bestimmung einer internen Kontrolle	72

4.2.3	Die SIV-miR-86 und -87 konnte in SIV _{mac239} infizierten C8166 nachgewiesen werden.....	74
4.2.4	Kinetik der SIV-miR-86 und der SIV-miR-87 in SIV _{mac239} Infektions-Experimenten von C8166 Zellen.....	75
4.2.5	Identifizierung der SIV-miR-TAR-5p.....	80
4.2.6	Detektion der SIV-miR-TAR-5p mittels Stem-Loop PCR Assay	82
4.2.7	Kinetik der SIV-miR-TAR-5p in SIV _{mac239} Infektions-Experimenten von C8166 Zellen	83
4.3	Funktionelle Analyse der SIV-miR-TAR und der HIV-miR-TAR.....	84
4.3.1	Insertion der pre-miRNAs der SIV-miR-TAR und der HIV-miR-TAR	84
4.3.2	Infektion der SIV- und HIV-miR-TAR transgenen Zelllinien mit SIV _{mac239} ...	86
4.3.3	Infektion der transgenen Zelllinien mit SIV-R-Region mutierten „ <i>virus like particles</i> “ (VLPs)	87
4.4	Detektion der SIV-miR-TAR-5p in RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen (Pilotstudie) 91	
4.5	Nachweis von SIV-miR-TAR-5p im Zellkulturüberstand von SIV _{mac239} -infizierten Zellen.....	93
4.5.1	Isolation von Viruspartikeln aus SIV _{mac239} -infizierten Zellkulturüberständen 93	
4.5.2	Charakterisierung der isolierten Probe.....	94
4.5.3	Bestimmung der RNA/DNA Konzentration in der isolierten Probe.....	95
4.5.4	Größenbestimmung der aufgereinigten RNA mittels Bioanalyser.....	96
4.5.5	Charakterisierung der isolierten RNA im Qubit Fluorometer.....	97
4.6	Nachweis von SIV-miR-TAR-5p im Zellkulturüberstand von SIV _{mac239} -infizierten Zellen.....	98
5	Diskussion	100
5.1	Die Replikation von SIV _{mac239} und HIV-1 unterscheiden sich in der T-Zelllinie C8166 und der T/B-Zelllinie CEMx174	101
5.1.1	HIV-1 kodiert miRNAs.....	103
5.2	Identifizierung und Charakterisierung der SIV-miR-TAR <i>in vitro</i> inkl. Etablierung sensitiver Nachweismethoden	104
5.3	Expression der transgenen Zelllinien	109
5.4	Infektion der transgenen Zelllinien mit SIV _{mac239} zeigte keinen Unterschied...	110
5.5	Infektion der transgenen Zelllinien mit $\Delta 7$ Mutanten zeigte keine Komplementierung.....	112

5.6	Die SIV-miR-TAR-5p konnte <i>in vivo</i> nachgewiesen werden	114
5.7	Nachweis im Virion: In C8166 replizierender SIV _{mac239} schließt TAR-5p in das Viruspartikel ein	116
6	Zusammenfassung	119
7	Abstract	121
8	Bibliografie	122
8.1	Literaturverzeichnis	122
8.2	Abbildungsverzeichnis	149
8.3	Tabellenverzeichnis	151
9	Appendix	153

Eidesstaatliche Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
AIDS	engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ; dt.: Erworbenes Immundefektsyndrom
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
C _T	engl.: <i>cycle threshold</i> ; dt.: Schwellenwert
cDNA	Komplementäre DNA
CON-A	Concavalin-A
dd	doppelt destilliert
dpi	engl.: <i>days post infection</i> ; dt.: Tage nach der Infektion
DNA	Desoxyribonuclein Säure
dNTP	Deoxynucleotid Triphosphat
ds	Doppelstrang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
env	engl.: <i>envelope protein</i> ; dt.: Hüllprotein
et al.	lat.: et alii
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein

Abkürzung	Bedeutung
gag	engl.: <i>group-specific antigen</i> dt.: Kapsidprotein
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> ; dt.: Meerrettich Peroxidase
HTLV	humanes T Zell Lymphotropes Virus
i.e.	lat.: id est
igG	Immunoglobulin G
PAP	Immuno-Peroxidase-Anti- Peroxidase
kb	Kilo-Base
l	Liter
lat.	Lateinisch
LB	Luria Bertani
LTR	engl.: <i>long terminal repeats</i> ; dt.: identische regulatorische Sequenzen
M	Molar (mol/l)
m-	mili (10 ⁻³)
μ-	micro (10 ⁻⁶)
min	Minute
miRNA	microRNA
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
n-	Nano (10 ⁻⁹)
nef	engl.: <i>negative factor</i>

Abkürzung	Bedeutung
nt	Nukleotide
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> dt.: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pol	Polymerase
pre-	engl.: <i>precursor</i> dt.: Vorläufer
pri-	engl.: <i>primary</i> dt.: Primär-
qRT-PCR	Quantitative real-time ("Echtzeit") PCR
RISC	engl.: <i>RNA induced silencing complex</i> dt.: RNA induzierter Silencing Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interference
rRNA	ribosomale RNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i> dt.: kleine eingreifende RNA
SIV	dt.: Simiane Immundefizienz-Virus
snoRNA	kleine nukläre RNA
ss	Einzelstrang
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tat	engl.: <i>transactivator of transcription</i>
tRNA	transfer-RNA

Abkürzung	Bedeutung
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
UTR	untranslated Region
V	Volt
vif	engl.: <i>viral infectivity factor</i>
vpr	Virales Protein R
vpu	virales Protein U
v/v	engl.: <i>volume per volume</i> dt.: Volumenanteil
WHO	World Health Organization
w/v	Masse pro Volumen
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung (g= 9,80665)

1 Einleitung

1.1 HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)

Das humane *Immundefizienz-Virus* (HIV, „human immunodeficiency virus“) gehört zur Familie der Retroviren in der Gattung der Lentiviren (Murphy et al., 1990). Retroviren integrieren ihr Genom in das zelluläre Wirtsgenom und erhalten so eine langjährige Persistenz aufrecht. Retroviren besitzen Einzelstrang(+)-RNA, die von einer Proteinhülle umgeben ist. Die meisten Lentiviren lösen langsam fortschreitende, chronische Krankheiten aus, im Falle des HI-Virus die Immunschwächeerkrankung AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) (Broder et al., 1984; Gallo et al., 1984). Durch die hohe Mutationsrate und Variabilität des Virus wird der Aufbau einer Immunantwort des Wirtes erschwert.

Nachdem AIDS erstmals 1981 von Gottlieb et al. als neue humane Krankheit erkannt wurde, wurde 1983 HIV, damals LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) genannt, von Barré-Sinoussi et al. isoliert (Barré-Sinoussi, 1983). Gleichzeitig wurde von Gallo et al. in einem unabhängigen Isolat ein Retrovirus isoliert, welches von ihnen als HTLV-III (Humanes T-Zell-lymphotropes Virus III) bezeichnet wurde (Gallo et al., 1983). Wenig später erkannte man das Virus als Ursache für die Entstehung von AIDS und benannte es in humanes Immundefizienzvirus (HIV) um (Shaw et al., 1984). 2008 erhielten Montagnier und Barré-Sinoussi für die Entdeckung von HIV den Nobelpreis für Medizin.

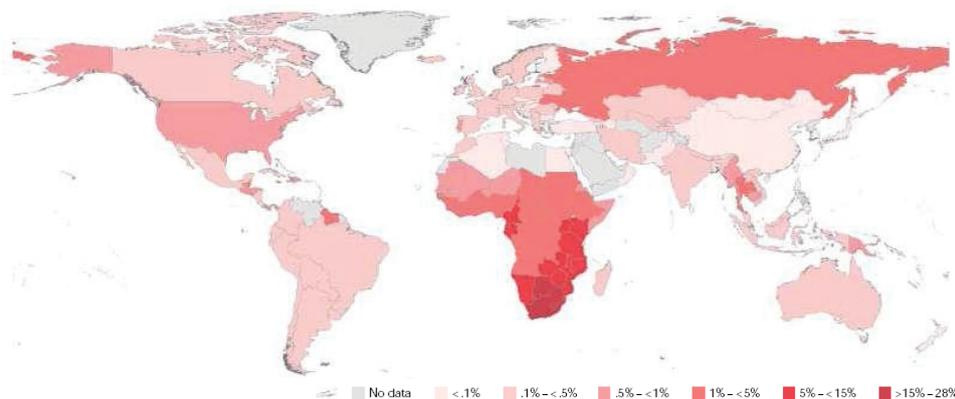


Abb. 1.1–1: Globale Verbreitung von HIV Infektionen. Quelle: UNAIDS 2009

Im Jahr 2009 waren geschätzte 31 bis 35 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert (UNAIDS/WHO), davon waren 2,6 Millionen Neuinfektionen zu verzeichnen und 1,8 Millionen

Menschen starben an den Folgen von AIDS. Die globale Verteilung der HIV-Infektionen ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

Man unterteilt HIV in die zwei Subspezies HIV-1 und HIV-2, welche sich wiederum in Gruppen und Subtypen aufteilen lassen (Abb 1.6-1). Die Homologie auf Proteinebene beträgt nur ca. 50%. So unterscheiden sie sich in ihren akzessorischen Proteinen. Das Protein vpu wird nur in HIV-1 synthetisiert, wohingegen vpx ausschließlich in HIV-2 vorkommt. Sowohl HIV-1 als auch HIV-2 sind in Afrika südlich der Sahara entstanden, doch nur HIV-1 wurde zu einer globalen Pandemie. HIV-2 ist eine endemische Erkrankung in West-Afrika, aber verbreitet sich nun zunehmend auch in Indien.

1.1.1 SIV als Modell für HIV

1.1.1.1 Das Simiane Immundefizienz Virus (SIV)

Wie HIV gehört auch das Simiane Immundefizienz Virus (SIV, engl. *simian immunodeficiency virus*) zu den komplexen Retroviren der Gattung Lentiviren (Letvin et al., 1985; Daniel et al., 1985). Nachdem 1983 eine Gruppe von Makaken im New England Regional Primate Research Center an AIDS-ähnlichen Symptome erkrankten (Letvin et al., 1983; Hunt et al., 1983), wurde 1985 aus einem dieser Tiere das erste SI-Virus isoliert (SIV, damals noch simian T-Lymphotropic Virus Typ III benannt) (Daniel et al., 1985). Dieses Virus war genetisch und morphologisch dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) sehr ähnlich und replizierte ebenfalls vorzugsweise in CD4+ T-Zellen (Kannagi et al., 1985).

Im Laufe der Jahre fand man heraus, dass die meisten afrikanischen Primaten natürliche Wirte verschiedener SIV-Subtypen sind. Im Gegensatz zur HIV-1 Infektion im Menschen verläuft eine SIV in den natürlichen Wirten apathogen (Ambrose et al., 2007).

Molekulare Studien belegten daraufhin, dass HIV-1 und HIV-2 unabhängig voneinander aus unterschiedlichen SI-Viren entstanden sind. In Afrika wurde SIV durch den Verzehr von Primaten (engl. *bush meat*) und vor allem durch Jagd dieser der Virus auf den Menschen übertragen und das Virus passte sich dem neuen Wirt an. Das HIV-1 Vorläufervirus stammt aus Schimpansen (SIV_{cpz}) (Keele et al., 2006, Gao et al., 1999), wohingegen HIV-2 eine hohe Sequenzhomologie zu dem SIV der Rußmangabe (SIV_{smm}) aufweist (Damond et al., 2004; Santago et al., 2005; Gao et al., 1992). Abbildung 1.1.5-1 zeigt die Verwandtschaft der HIV und SIV Subtypen basierend auf einer Analyse des Pol-Proteins.

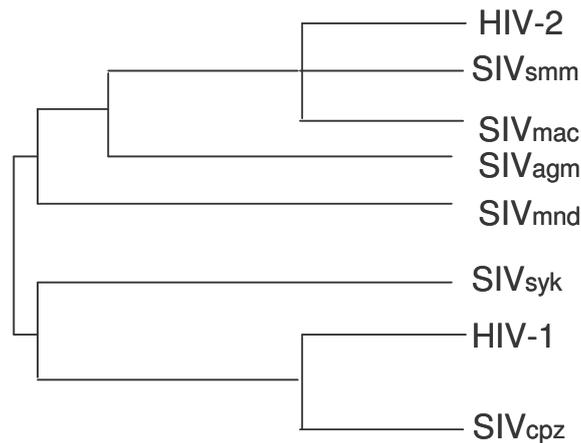


Abb. 1.1–1: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen SIV und HIV. Die Verwandtschaft wurde unter Verwendung einer Maximum-likelihood Analyse der Pol-Protein-Sequenz durchgeführt. Die Untergruppen von HIV-1 und die Subtypen von HIV-2 sind gezeigt. Die SIV-Subtypen werden anhand des angehängten Suffixes nach ihrem Ursprungswirt benannt. cpz („chimpanzee“, Schimpanse), mnd („mandrill“, Mandrill), agm („African green monkey“, Westliche Grünmeerkatze), mac („macaque“, Makaken,) smm („Sooty mangabey“, Rußmangabe), syk („Sykes´monkey“, Weißkehlmeerkatze). (entnommen aus Schultheiß, 2009)

Erstaunlicherweise ist HIV-1 hoch spezifisch für den Menschen und ist im Allgemeinen nicht infektiös für andere Spezies. Auch die meisten nicht-humanen Primaten sind resistent gegen HIV-1 (Williams et al., 2009).

Da die SIV Infektion in den natürlichen Wirten (Afrikanische Affen wie Schimpansen, Mandrills und Westliche Grünmeerkatzen) apathogen verläuft, kann dies nicht als experimentelles Tiermodell für die (hoch) pathogen verlaufende HIV-1 Infektion im Menschen dienen.

Das erste SIV-Isolat stammte aus einem Rhesusaffen (*Macaca mulatta* indischer Herkunft) vom New England Primate Research Center, welches natürlich in Rußmangaben (*Cercocebus atys*) vorkommt (Letvin et al., 1983). Diese Tiere zeigten als nicht-natürliche Wirte ebenfalls AIDS ähnliche Symptome (Letvin et al., 1985). Dieses SIV Isolat, welches zunächst STLVIII genannt wurde, wurde kloniert und als SIV_{mac} bezeichnet. Weil SIV_{mac} im Rhesusaffen den gleichen Krankheitsverlauf zeigt wie HIV-1 im Menschen, eignen sich experimentell infizierte Rhesus-Makaken besonders zur Untersuchung der Wirts-Virus-Interaktion.

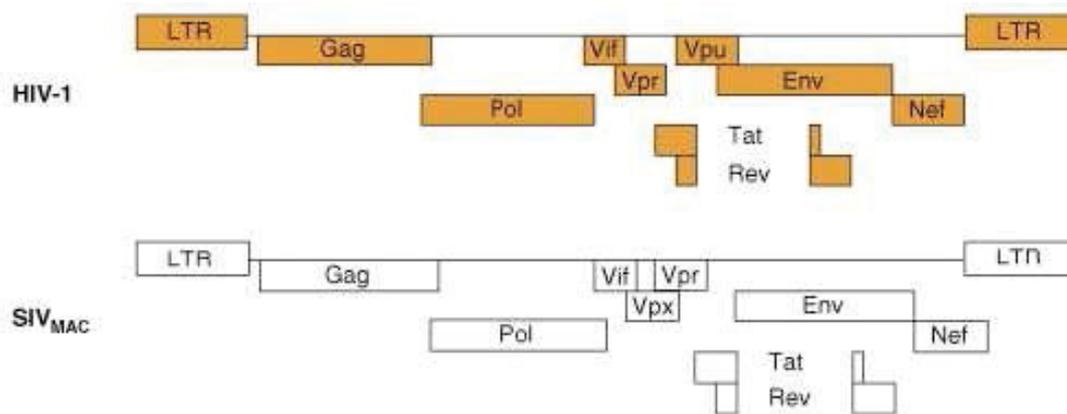


Abb. 1.1–2: Schematische Gegenüberstellung der Genome von HIV-1 und SIV_{mac}. Das Genom von HIV-1 ist in orange und das Genom von SIV_{mac} ist in weiß dargestellt. Erläuterung siehe Text. (entnommen und modifiziert aus Ambrose et al., 2007)

Trotz der hohen Sequenzhomologie existieren Unterschiede zwischen den beiden Viren. So kodiert nur HIV-1 für das akzessorische Protein vpu. Auch zeigen die reversen Transkriptasen (RT) von SIV und HIV eine Homologie von 60% in der Aminosäuresequenz, hierbei unterscheiden sie sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber RT-Inhibitoren (Überla et al., 1995). Um potenzielle RT-Inhibitoren gegen HIV im Tiermodell testen zu können, wurden SIV-HIV Chimären (SHIVs), wie das in Abb 1.1.7-3 gezeigte RT-SHIV, erstellt. In der abgebildeten Chimäre wurde die SIV-RT des SIV_{mac239}-Klones durch eine HIV-1 RT des HxB2-Klones ersetzt (Überla et al., 1995).

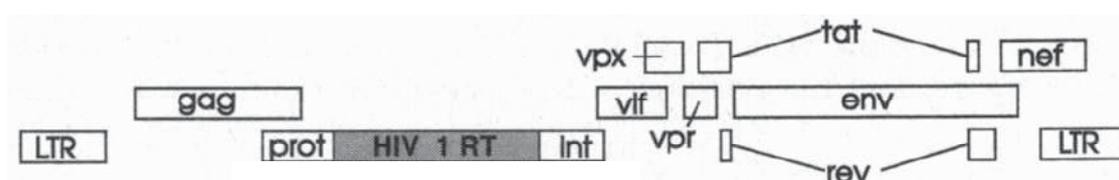


Abb. 1.1–3: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von RT-SHIV. Gene des SIV_{mac239}-Klones sind in weiß dargestellt. Die RT von HIV-1 ist in grau abgebildet. (entnommen und modifiziert aus Überla et al., 1995)

1.1.1.2 Das Genom von HIV/SIV und die Funktion der kodierten Proteine

Das virale Genom von HIV/SIV besteht aus zwei jeweils ca. 10 Kilobasenpaar (kb) langen linearen plus-Strang (+) RNA-Molekülen. Insgesamt kodiert das Genom für neun Gene (Andersen et al., 2008) und wird von „long terminal repeat“ Regionen (LTR) eingeschlossen. Hierbei ist die LTR-Region derjenige Teil des viralen Genoms, der bei der Integration beidseitig mit der zellulären DNA verbunden wird (Leavitt et al., 1992; Krebs et al., 2002). Das Genom von SIV_{mac239} ist in Abbildung 1.1-5 schematisch dargestellt.

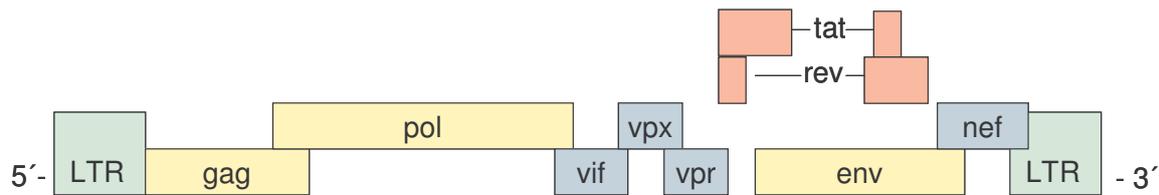


Abb. 1.1–4: Schematische Genkarte von SIV_{mac239}. Die drei in allen Retroviren vorkommenden strukturellen Gene *gag* (group-specific antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope) sind in gelb dargestellt. Die Transaktivator Gene *tat* (transactivator of transcription) und *rev* (regulator of expression) sind in rot gezeigt. Die akzessorischen Gene *nef* (negative effective factor), *vif* (viral infectivity factor), *vpr* (viral protein r), *vpx* (viral protein x) sind in blau abgebildet. Die LTR (long terminal repeat) –Region (grün) schließt das virale Genom ein.

Die Gene *gag*, *pol* und *env* kommen in jedem Retrovirus vor (Wong-Staal et al., 1991). Das *gag*-Gen („group-Specific antigen“) kodiert für die Strukturproteine des Virus das Kapsidprotein (CA), das Kernmatrixprotein (MA) und das Nukleokapsidprotein (NC) (Ono et al., 1999; Göttlinger, 2001). Das *pol*-Gen („polymerase“) kodiert die viralen Enzyme, die reverse Transkriptase (RT), die Protease (PR) und die Integrase (IN) (Hill et al., 2005; Frankel et al., 1998). Das *env*-Gen („envelope“) kodiert das Glykoprotein der Virusoberfläche/Virushülle (gp 120/SU) sowie das Transmembran-Glykoprotein (gp 41/TM) (Wyatt et al., 1998; Checkley et al., 2011).

Zusätzlich zu den Strukturgenen für *gag*, *pol* und *env* enthält das virale Genom die Transaktivatorgene *tat* („transactivator of transcription“) und *rev* („regulator of expression of virion proteins“). Die von diesen Genen kodierten Proteine stimulieren die Transkription von der viralen DNA in RNA und sind wesentlich für die Regulation der Translation verantwortlich (Grewe and Überla, 2010; Karn, 2000). Zudem fördert das *rev* Protein den Transport der RNA Genome vom Zellkern ins Cytoplasma (Suhasingi und Reddy, 2009).

Die Gene *nef*, *vpu* (*vpx*), *vpr* und *vif* kodieren die sogenannten akzessorischen Proteine, welche nicht für die Replikation des Virus erforderlich sind. Diese werden erst in der Wirtszelle synthetisiert. Nef („negative effective factor“) und vpu („viral protein u“) sind unter anderem für die Herunterregulation des CD4-Rezeptors zuständig (Piguet and Trono, 1999; Neri et al., 2011; Levy et al., 2003). Vpr („viral protein r“) in HIV-1 und vpx („viral protein x“) in HIV-2 und SIV_{mac}, stoppen die Proliferation der Wirtszelle (Zhang et al., 1997). Zusätzlich kontrollieren sie den Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern (Heinzinger et al., 1994). Das Vif („viral infectivity factor“) Protein ist für die Produktion von infektiösen Partikeln aus CD4⁺-Zellen verantwortlich, indem es das antivirale zelluläre Protein APOBEC3G bindet (Sheehy et al., 2002), welches virale DNA:RNA Heteroduplexe im Cytoplasma deaminiert (Yu et al., 2003). Durch die Bindung an vif wird APOBEC3G ubiquiniert und dann im Proteasom der Wirtszelle degradiert (Conticello et al., 2003; Liddament et al., 2004; Marin et al., 2003).

1.1.1.3 Aufbau des HI-Virus

Das HI-Virus ist ein ca. 100 – 120 nm großes, nahezu kugelförmiges umhülltes Retrovirus. Der Kern des Virus, wie in Abbildung 1.1-6 schematisch dargestellt, besteht aus Kapsidproteinen (CA). In ihm befinden sich neben der viralen RNA die bereits synthetisierten Enzyme reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN), welche das Virus zum Einbau seiner Erbinformation in das Wirtsgenom benötigt (Hirsch and Curran, 1990; Montagnier and Clavel, 1994). Die Hülle des Virus ist eine komplexe Struktur aus dem Matrixprotein (MA), die von einer äußeren Lipiddoppelschicht umgeben ist. In der Lipiddoppelschicht ist das Transmembranglykoprotein gp 41 verankert, welches das exponierte Oberflächen-Glykoprotein gp 120 (SU) bindet. Das gp 120 ist für die Erkennung der Zielzellen zuständig. Es bindet an das zelluläre Oberflächenprotein CD4 (Hauptrezeptor) und einen Korezeptor CCR5 (CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5) oder CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4).

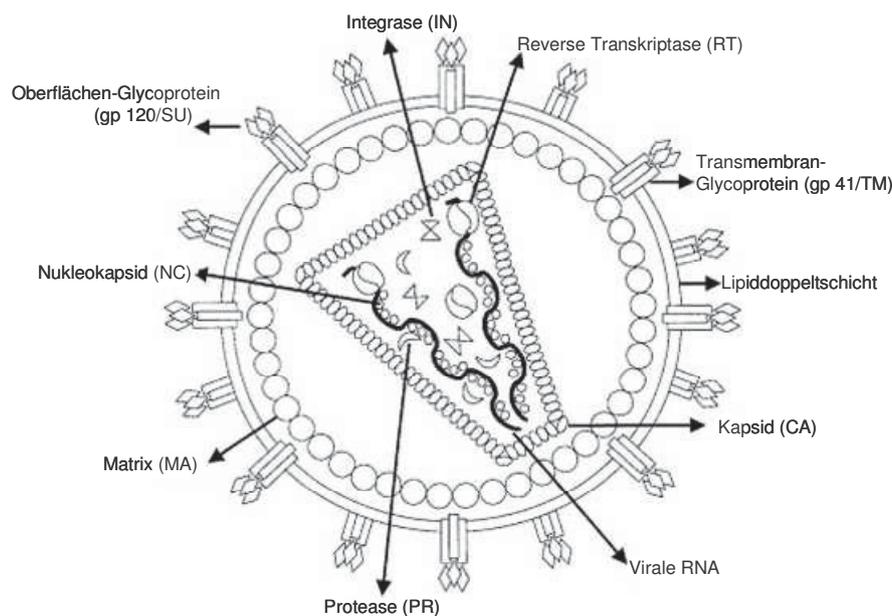


Abb. 1.1–5: Schematische Darstellung eines HI-Virus. Die Kernhülle des Virus besteht aus dem Kapsidprotein (CA) und dem Nukleokapsid (NC). In dem Kapsid befinden sich neben der zwei Kopien der (+) ssRNA die viralen Enzyme, Protease (PR), Integrase (IN) und reverse Transkriptase (RT), welche an die RNA gebunden ist. Die Hülle des Virus ist eine komplexe Struktur aus dem Matrixprotein (MA), welche von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. In der Lipiddoppelschicht ist unter anderem das Transmembranglykoprotein gp41 (gp41/TM) verankert, welches das Glykoprotein gp 120 bindet (gp 120/SU). (Alberts et al., 2001).

1.1.1.4 Infektionszyklus

Die Übertragung von HIV erfolgt im Wesentlichen über drei Wege: Blut und Blutprodukte (Schreiber et al., 1996), sexuellen Kontakt (Turner et al., 1989) und die Übertragung von der

Mutter auf ihr ungeborenes Kind (Fowler et al., 1996). Nach der Infektion repliziert HIV vor allem in CD4⁺ T-Zellen (Montagnier et al., 1984; Letvin et al., 1990). Der Infektionszyklus eines HI-Virus beginnt mit der Anheftung des viralen Hüllproteins gp 120 an zelluläre Rezeptoren der Wirtszelle (Weiss, 1993). CD4 ist hierbei der Hauptrezeptor und die Transmembran-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 sind die häufigsten Korezeptoren (Clapham and McKnight, 2002). Nach der Bindung erfolgt eine Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtsmembran, anschließend dringt der Virus-Kern in das Cytoplasma der Zelle ein (Abb. 1.1-7) (Freed et al., 1992). Nach der Degradation der Kernhülle gelangen die RNA-Stränge und die viralen Enzyme in das Cytoplasma der Wirtszelle. Die virale RT schreibt die genomische RNA in einen negativen DNA-Strang um, welcher anschließend zum DNA-Doppelstrang ergänzt wird (Hirsch and Curran, 1990; Harrich and Hooker, 2002). Die doppelsträngige Virus-DNA (Provirus) wandert dann in den Kern der Wirtszelle (Haffar and Bukrinsky, 2005). Dabei kann die virale DNA in drei verschiedenen Formen vorliegen: lineare oder zirkuläre Formen, welche entweder eine LTR (1-LTR) oder aber zwei LTR Regionen (2-LTR) erhalten kann (Wu, 2004). Die zirkuläre Form wird vor der Integration linearisiert. Die lineare doppelsträngige DNA inseriert dann mit Hilfe der viralen Integrase ungerichtet in das Genom der Wirtszelle (Bushman, 2002; Schroeder et al., 2002; Van Maele and Debyser, 2005). Nach der Insertion erfolgt die Transkription der proviralen DNA mittels der zellulären Polymerase II. Daraufhin werden die viralen Proteine Tat, Rev und Nev translatiert (early Phase). Die Bindung von Tat an die TAR-Region der LTR aktiviert die Transkription (Harrich et al., 1996). Die hierbei entstehende Virus-RNA verlässt den Kern der Wirtszelle durch die Kernporen ins Cytoplasma, wo sie translatiert wird. Nach der Translation wird das Env-Vorläuferprotein in gp120 und gp41 gespalten und in die Zellmembran eingelagert. Die viralen Proteine (Vorläuferproteine) Gag und Gag-Pol wandern ebenfalls zu der Zellmembran und starten die Assemblierung (late Phase) (Sandefur et al., 2000; Briggs et al., 2003; Derdowski et al., 2004). Hierbei lagern sich die viralen Enzyme, die viralen RNA-Stränge, die zelluläre tRNA-Lys³ und weitere zelluläre Proteine zu einem unreifen Viruspartikel zusammen (Freed, 2002, Ono and Freed 2001, Zimmerman et al., 2002). Danach werden das Kapsidprotein (CA) sowie das Nukleokapsidprotein (NC) und die Matrixprotein (MA) aus dem Gag Protein synthetisiert und formen die Virushüllen (Briggs et al., 2003; Wilk et al., 2001). Abschließend folgt die Knospung. Daher enthält die Virushülle neben den viralen Hüllglykoproteinen auch Elemente der Plasmamembran der Wirtszelle.

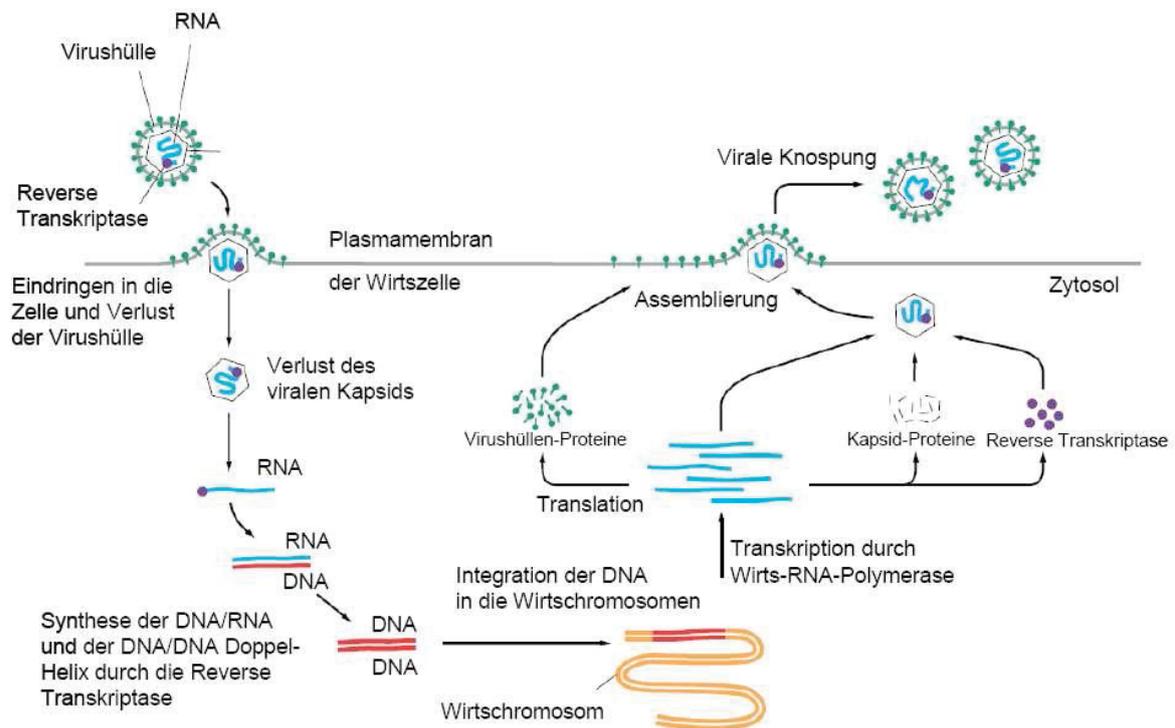


Abb. 1.1–6: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von HIV/SIV. Erklärung siehe Text (modifiziert nach Alberts et al., 2001)

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind 19 bis 24 nt große, nicht-kodierende RNAs, welche durch Bindung an messenger RNAs (mRNAs) die Genexpression post-transkriptionell regulieren können. Entdeckt wurden miRNAs zuerst in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und anschließend auch in nahezu allen Tieren, Pflanzen und vielen Viren (Millar and Waterhouse, 2005; Jover-Gil et al., 2005; Sayed and Abdellatif, 2011; Plaisance-Bonstaff and Renne, 2011; Lee et al., 2006). Heute sind mehr als 16000 miRNAs in 153 Spezies bekannt, dabei alleine über 1400 humane-miRNAs (miRBase v17.0) (Griffiths-Jones et al. 2006).

Einzelne miRNAs haben das Potential über 300 verschiedene mRNAs zu binden (Bartel et al, 2009; Friedman et al, 2009). Dies zeigt, welchen Einfluss einzelne miRNAs auf die gesamte Genexpression der Zelle haben können. MiRNAs haben Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Wachstum, Homeostase, Apoptose und Immunaktivierung (Bartel et al., 2009; Xiao et al., 2009).

1.2.1 microRNA Biogenese

Die miRNA Biogenese (Abb. 1.2-1) beginnt mit der Transkription von längeren primär-miRNAs (pri-miRNAs) mittels der RNA Polymerase II (Pol II) (Cullen, 2004). Die pri-miRNAs enthalten einen 5'-cap, sind polyadenyliert und formen eine oder mehrere ca. 80 nt große Haarnadelstrukturen. Die Haarnadelstruktur (Stem-Loop-Struktur) besteht aus einem ca. 32 bp großem „Stamm“ und einem kleinen Loop an deren Ende. Diese Struktur wird von dem Heterodimer, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und dem Cofaktor DGCR8, erkannt und ca. 22 bp oberhalb der Loop-Struktur geschnitten, sodass eine ungefähr 60 nt lange Vorläufer-(precursor) miRNA (pre-miRNA) entsteht, welche meist einen 2 nt Überhang am 3'-Ende aufweist (Cullen 2004; Zeng et al. 2005), sodass die pri-miRNA in drei Teile geschnitten wird, in die pre-miRNA und in die flankierenden 5'- und 3'-Sequenzen. Anschließend wird die pre-miRNA durch die Bindung des Heterodimers bestehend aus Exportin 5 (Exp5) und ranGTP an den 2 nt 3'-Überhang aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Cullen, 2006). Im Cytoplasma wird die Loop-Struktur mittels Dicer, einer zweiten RNase III, und dem TAR-RNA-Bindeprotein (TRBP) entfernt, sodass nun eine doppelsträngige ca. 22 bp große miRNA, mit jeweils 2 nt Überhängen an den 3'-Enden entsteht (Chendrimada et al. 2005; Hutvagner et al. 2001).

Ein Strang (miRNA) der doppelsträngigen miRNAs (guide Strang) wird in den RNA-induzierten-Stilllegungs-Komplex („*RNA induced silencing complex*“, RISC) eingebaut, dieser bindet an der komplementären mRNA. Der andere Strang (passenger Strang; miRNA*) wird degradiert. Wichtig für das Targeting an die mRNA sind die Nukleotide 2 bis 7- am 5'-Ende der miRNA („seed-region“) (Bartel, 2009). Im Falle einer perfekten Bindung von miRNA und mRNA (100% Homologie, „high homology“), welche in *Drosophila* Zellen beobachtet wurde, führt diese zu einem endonukleolytischen Abbau der mRNA (Hammond et al., 2000). Bei den meisten tierischen und viralen miRNAs kommt es nur zu einer partiellen Bindung („partial homology“) an die mRNA, die dann zu einer Inhibition der Translation führt (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008).

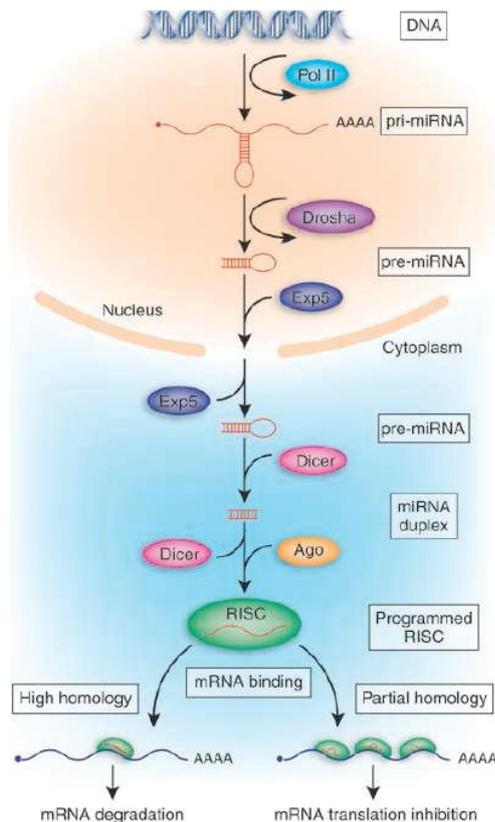


Abb. 1.2–1: Biogenese und Funktion von zellulären miRNAs. Nach der Transkription der primären miRNA (pri-miRNA) im Nucleus mittels Polymerase II wird diese von Drosha in Vorläufer- (precursor)-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Die pre-miRNA ist ca. 80 nt lang. Anschließend transportiert Exprotin 5 (Exp5) die pre-miRNA aus dem Nucleolus in das Cytoplasma, wo die pre-miRNA von Dicer erkannt und prozessiert wird. Der entstandene miRNA duplex wird in den „RNA induced silencing complex“ (RISC), bestehend aus Argonaut Proteinen (Ago), integriert. Dort wird ein Strang abgebaut. Der „guide“ (Leit-)Strang bindet an die mRNA. Besteht eine hohe Homologie („high homology“) zwischen der mRNA und der miRNA, so wird die mRNA degradiert. Ist die Homologie nur partiell („partial homology“), so wird die Translation der mRNA inhibiert. (Entnommen aus Cullen et al., 2006)

1.2.2 miRNA und RNA Interferenz (RNAi) als antivirale Strategie

RNA Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus zur Genregulation in Pflanzen, Insekten und Säugetieren, dessen Rolle das Prozessieren von miRNA und kleinen-interferierenden RNA (siRNA, „*small/short-interfering RNA*“) ist. Erstmals beschrieben wurde der RNA Interferenz Mechanismus 1998 in den Nematoden *Ceanorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Fire et al., 1998), wofür Craig C. Mello und Andrew Z. Fire 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten. Auch kann der RNAi Mechanismus durch künstliche Substrate induziert werden. Hierbei können sowohl transient transfizierte siRNAs als auch intrazellulär stabil exprimierte kurze Haarnadel RNA (shRNA, „*short-hairpin RNA*“), welche dann in siRNAs prozessiert werden, verwendet werden. Aufgrund dieser Eigenschaften wird RNAi häufig zur Erforschung von Genfunktionen mittels „*gene-knockdown*“ genutzt. Zudem wurden erste Studien zur Inhibition der Virusreplikation mit Hilfe von RNAi zur Etablierung eines Medikamentes durchgeführt. So wurden Mäuse mit siRNA gegen den Influenza Virus und den Respiratorisches-Synzytial-Virus (RSV) (Bitko et al., 2005; Ge et al., 2004) sowie Rhesusaffen mit einer siRNA gegen das Schwere Akute Respiratorische Syndrom (SARS)-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV), behandelt (Li et al., 2005). In beiden Fällen konnte der Virustiter und die virus-bedingte Sterberate reduziert werden (Bitko et al., 2005; Ge et al., 2004; Li et al., 2005). Auch ein intranasal appliziertes shRNA-exprimierendes Plasmid gegen RSV führte zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters (Zhang et al., 2005).

1.2.3 Virus kodierte miRNAs und deren Funktion

MiRNAs sind für Viren eine potenzielle Möglichkeit in ihre eigenen oder die Genexpression des Wirtes zu regulieren. Im Gegensatz zu viralen Proteinen sind miRNAs nicht immunogen, beanspruchen wenig Platz auf dem Genom und können schnell synthetisiert werden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele Viren sich dies zunutze machen. Bis heute wurden über 200 virale miRNAs identifiziert, hauptsächlich in doppelsträngigen DNA-Viren, wie Herpesviren (Pfeffer et al. 2004; Grundhoff et al. 2006), Polyomaviren (Sullivan et al. 2005), Adenoviren (Sano et al, 2006), aber auch in verschiedenen RNA-Viren.

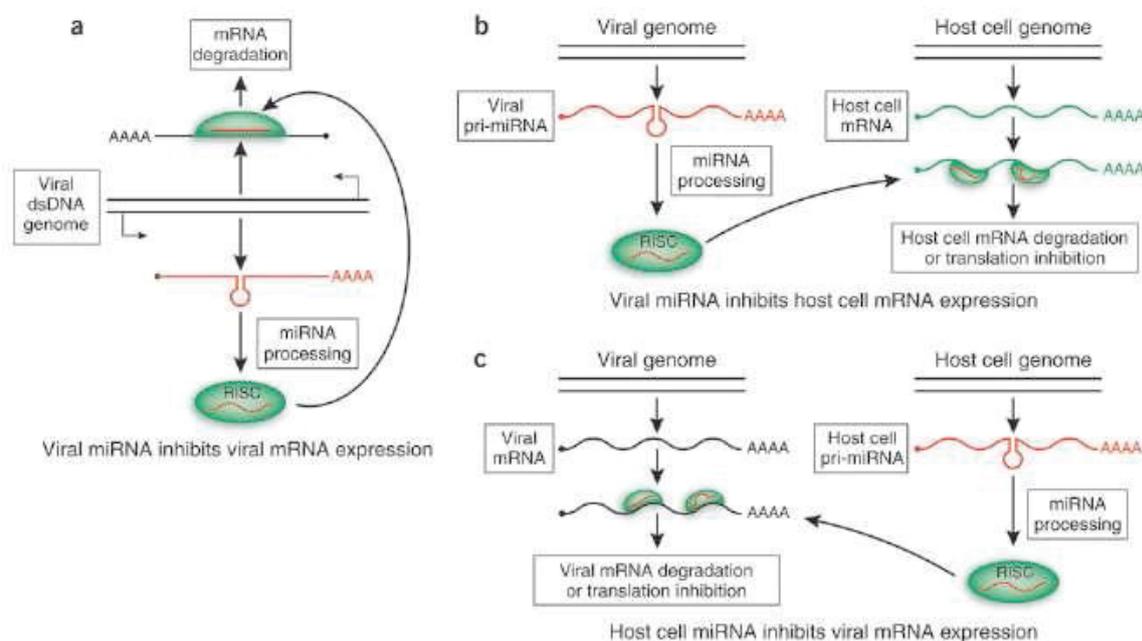


Abb. 1.2–2: Mögliche Funktionen viraler miRNAs. Virale miRNA können auf verschiedenen Wegen in die Virusreplikation eingreifen. Zum einen können virale miRNA die Expression von viralen mRNAs inhibieren (a), zum anderen ist die Inhibition von zellulärer mRNA (host) möglich (b). Zudem können auch zelluläre miRNAs virale mRNA binden (c) und somit Auswirkungen auf die Virus Replikation haben. (dsDNA = Doppelsträngige DNA; entnommen aus Cullen et al., 2006)

Virale miRNAs können zwei verschiedene Funktionen erfüllen: sie können an die virale mRNA binden und somit in die virale Proteinexpression regulieren, wie es im Falle des Polyomavirus SV40 und dem Herpesvirus hCMV (Gottwein und Cullen, 2008) nachgewiesen wurde; ebenfalls können virale miRNAs durch Bindung an Wirts-mRNA in die Genexpression eingreifen und somit überleben und die Verbreitung des Virus positiv beeinflussen (B). So konnten Hussain und Kollegen 2011 eine im West-Nil-Virus (WNV) kodierte kleine RNA (KUN-miR-1) in Stechmückenzellen identifizieren, welche durch die Bindung an die zelluläre GATA4 mRNA die Virusreplikation positiv beeinflusst (Hussain et al., 2011).

Auch zelluläre miRNAs können an die virale mRNA binden und so die Virusreplikation und die Pathogenese beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die hsa-miR-32. In Zellkultur-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese miRNA einen inhibitorischen Effekt auf das prototypische Foamyvirus Typ 1 (PFV-1) hat (Lecellier et al. 2005). Im Gegensatz dazu können zelluläre miRNAs aber auch die Virusvermehrung fördern. So bindet z.B. die Leber-spezifische miRNA hsa-miR-122 an die genomische RNA des Hepatitis-C-Virus (HCV) und erleichtert damit die Replikation des pathogenen RNA-Virus (Jopling et al., 2005; Henke et al., 2008).

1.2.4 DNA-Viren und microRNAs

2004 konnten durch Pfeffer et al. die ersten Virus-kodierten miRNAs identifiziert werden. Die Arbeitsgruppe konnte aus humanen B-Zellen, die latent mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert waren, fünf virale miRNAs mittels Klonierung nachweisen (Pfeffer et al, 2004). Heute sind mehr als 140 virus-kodierte miRNAs in der Gruppe der Herpesviren bekannt. Neben EBV wurden virale miRNAs auch im Kaposi's Sarcoma-assoziiertem Herpesvirus (KSHV) (Ganem et al. 2008), im humanen Cytomegalovirus (HCMV) (Dolken et al. 2009), in Herpes Simplex-1 und -2 (HSV-1, HSV-2) (Boss et al. 2009) und beim Herpes B Virus (Amen und Griffith, 2011) bestätigt. Hierbei unterscheiden sich die Funktionen der verschiedenen miRNAs. Bei den α -Herpesviren, denen HSV-1/2 zugeordnet werden, wurden miRNAs in Latenz-assoziierten Transkriptregionen gefunden (Cullen, 2011). Es wird vermutet, dass die miRNAs die Etablierung und die Aufrechterhaltung der Viruslatenz durch die posttranskriptionelle Regulation viraler Genexpression unterstützen (Umbach et al. 2008).

Neben den Herpesviren wurden miRNAs unter anderem auch in Polyomaviren, Adenoviren und Ascoviren nachgewiesen. Hierbei exprimiert das Adenovirus zwei ca. 160 nt lange RNA Polymerase III-Transkripte („virus-associated“ RNAi (VAI), VAII). (Xu et al., 2007; Anderson et al., 2005; Aparicio et al., 2006; Lu, Cullen, 2004). Diese binden mRNAs, die in Zellwachstum, Genexpression und DNA-Reperatur involviert sind (Aparicio et al., 2010). Das Insekten-Virus *Heliothis virescens* Ascovirus (HvAV), kodiert eine miRNA, die in einem späten Stadium der Infektion die mRNA der viralen DNA Polymerase bindet und dadurch die Virusreplikation herunterreguliert (Hussain et al., 2008).

Polyomaviren infizieren viele verschiedene Vertebraten, wie Säuger, Nager und Vögel. Humane Polyomaviren-Infektionen sind im Allgemeinen asymptomatisch, bestehen aber lebenslang, wie zum Beispiel die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) (Padgett et al., 1971). In *immunsupprimierten* Patienten verläuft die PML lebensbedrohlich (Johnson et al., 2011). 2005 wurde erstmals eine pre-miRNA (pre-miR-S1) in dem Primaten Polyomavirus (SV40) detektiert, die in der Spätphase der Infektion exprimiert wird (Sullivan

et al., 2005) und hier das akkumulierte T-Antigen herunterreguliert. Sowohl die genomische Lokalisation der miR-S1 als auch die temporäre Expression ist in vielen Polyomaviren, wie dem humanen BK Virus (BKV), dem Merkel Zell Virus (MCV) und dem Maus Polyomavirus (mPyV) (Seo et al., 2009; Seo et al., 2008; Sullivan et al., 2009), konserviert.

1.2.5 Retroviren und microRNAs

Während zahlreiche miRNAs von DNA-Viren publiziert wurden, war das Vorhandensein von miRNAs in RNA-Viren lang umstritten. Viele Versuche miRNA aus HIV-1 infizierten Zellen zu klonieren schlugen zunächst fehl (Pfeffer et al., 2005; Lin und Cullen, 2007). Dennoch wurde vermutet, dass virus-kodierte miRNAs mit in einer sehr geringen Expressionsrate mit diesen Methoden nicht detektiert werden könnten. Zudem könnte die Expression der viralen miRNAs von vielen unterschiedlichen Faktoren während einer Infektion abhängen, wie zum Beispiel auch dem Zelltyp. Durch den Einsatz von sensitiveren Methoden, wie den RNase-Protection-Assay (RPA) oder der Hochdurchsatz-Sequenzierungen (Yeung et al., 2009) konnten gering exprimierte kleine, virale, nicht-kodierende RNAs auch in den RNA-Viren HIV-1 (Yeung et al., 2009) und Influenza (Varble et al., 2010) nachgewiesen werden.

1.2.6 HIV-1 und miRNAs

In HIV-1 infizierten Zellen wurden durch „next-generation“ Sequenzierung 125 kleine, nicht-kodierende virus-spezifische RNAs detektiert (Yeung et al., 2009). Zudem konnte die Arbeitsgruppe Bereiche auf dem HIV-1-Genom identifizieren, die in der Sequenzierung besonders stark vertreten waren. Das TAR_Element (transactivation response element) und das Nef zeigten besonders viele kleine, nicht-kodierende RNAs.

1.2.6.1 Nef-miRNA

Der offene Leserahmen („open reading frames“, ORF) des nef-Gens stellte sich in einer 2009 publizierten „next-generation“ Sequenzierung als potenziell-miRNA-kodierender Bereich auf dem HIV-1 Genom dar (Yeung et al., 2009). Nef gehört zu den akzessorischen Proteinen, das am 3'-Ende des viralen Genoms kodiert ist und zum Teil mit der 3'-LTR überlappt (Krebs et al., 2002; LANL HIV Sequence Database, 2011). Während einer Infektion wird Nef früh translatiert und ist wichtig für die Virusreplikation (Klotman et al., 1991; Cullen, 1998; Henao-Mejia et al., 2009). Die Nef-miRNA wurde 2004 von Omoto et al. zuerst in HIV-1 infizierten Zellen beschrieben. Die Arbeitsgruppe zeigte eine 25 nt lange, RNaseA

und RNaseT1 resistente, kleine RNA, die auf eine doppelstängige RNA schließen lässt. Diese miRNA wurde von ihnen kloniert und sequenziert und als miR-N367 benannt. Die Autoren zeigten, dass die miR-N367 sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell die *nef* Expression herunterregulieren kann (Omoto et al. 2004). Auch in HIV-1-Patienten mit einer niedrigen Virusbelastung konnte die miR-N367 nachgewiesen werden, dort inhibierte sie die Transkription von HIV-1 (Omoto et al., 2004). Dies lässt erkennen, welchen potentiellen Wert HIV-1-kodierte miRNAs für zukünftige Therapien zur Viruskontrolle bieten könnten.

1.2.6.2 TAR Element (transactivation response element) und seine mögliche miRNA

Das HIV-1 TAR Element ist eine ca. 50 nt lange Haarnadelstruktur (Abb 2.4.2) (Berkhout et al., 1990) und gilt als zweiter potenziell-miRNA-kodierender Bereich auf dem HIV-1 Genom. Sie ist Teil der LTR („*long terminal repeat*“)-Region, genauer der R Region (Abb. 1.2.4.2-1) und liegt sowohl am 5´ als auch am 3´-Ende des HIV-1 Genoms vor (Schopman et al., 2011). Das TAR-Element dient dem viralen Protein Tat als Bindestelle und fungiert so als Transaktivator der HIV-1 LTR.

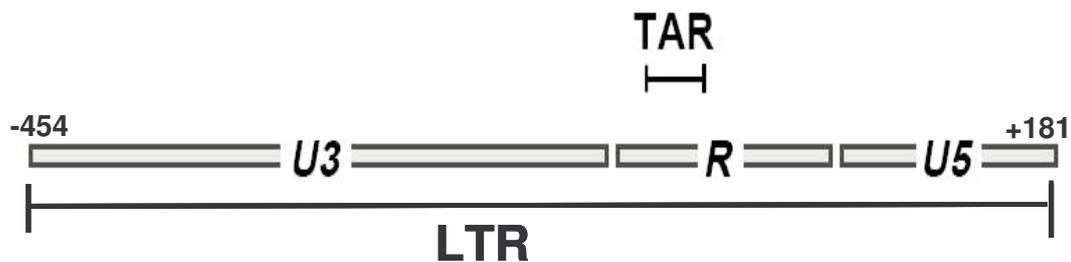


Abb. 1.2-3: Schematische Struktur der HIV-1 LTR. Gezeigt ist die LTR des HIV-1 Genoms mit ihren strukturellen Untereinheiten (U3, R, U5). Das TAR Element wird gesondert gezeigt (modifiziert nach Krebs et al., 2002).

Es gibt verschiedene Anhaltspunkte, die aufzeigen, dass das HIV-1 TAR-Element eine miRNA beinhalten könnte (Purzycka et al., 2008). Zum einen ist die Struktur der TAR-mRNA einer pri-miRNA sehr ähnlich und somit als Substrat zum Schneiden durch Drosha und Dicer geeignet. Zum andern haben Computerprogramme das TAR-Element in HIV-1 als einen von fünf möglichen Dicer Schnittstellen errechnet (Bennasser et al., 2004). Auch in HIV-2 befindet sich eine 124-nt lange TAR-RNA, die einer pre-miRNA strukturell sehr ähnelt (Purzycka et al., 2008).

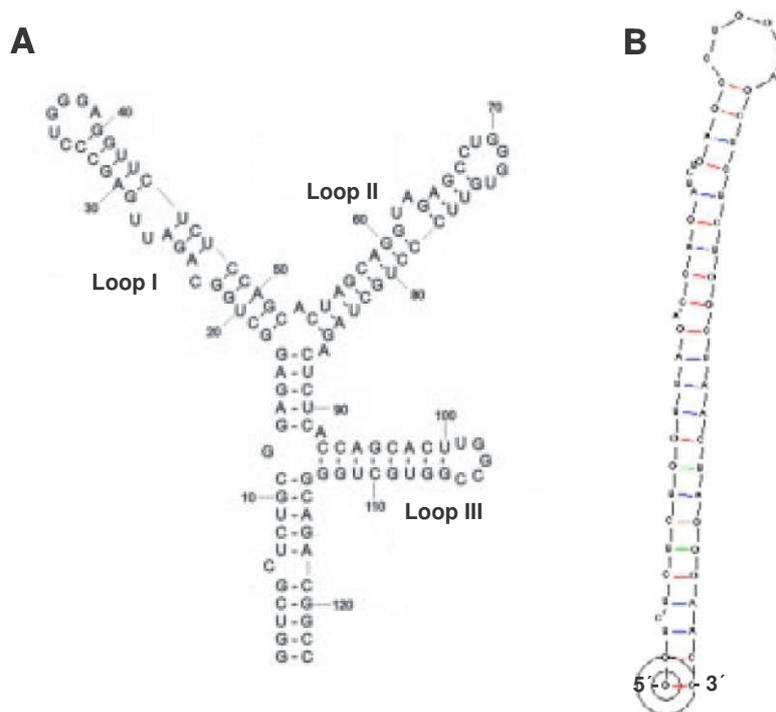


Abb. 1.2-4: Ansicht der Strukturen von HIV-2 TAR (A) und HIV-1 TAR RNA Sequenz (B). In beiden Viren sind die für pre-miRNAs üblichen Stem-Loop-Strukturen zu erkennen (entnommen aus Purzycka et al., 2008 (A) und aus Klase et al., 2007(B)).

1.2.6.3 TAR-miRNA

Die Bindung von Dicer an das TAR Element wurde 2007 von Klase et al. mit Hilfe eines pull down-assays und radioaktiv-markierten Sonden nachgewiesen. Beide Methoden detektierten ein 21 nt langes RNA-Fragment. Ein siRNA basierter knockdown von zellulärem Dicer belegte, dass Dicer für die Prozessierung des TAR-Elements benötigt wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass die TAR-miRNA die virale Genexpression herunterreguliert und dass das TAR-Element am 5'-Ende der mRNA von HIV-1 eine regulatorische miRNA darstellt (Ouellet et al. 2008). Hierfür isolierten sie (unter anderem) primäre CD4+ T-Lymphozyten und infizierten diese mit dem HIV-1 Klon pNL4-3. Sie konnten eine kleine RNA mittels Northern Blot detektieren. Anschließend konnte 2009 die Arbeitsgruppe um Klase deutliche Hinweise finden, dass die TAR-miRNA einen Effekt auf den Zellzyklus des Wirtes hat (Klase et al., 2009). Sie legten den Schluss nahe, dass die TAR-miRNA schützende Wirkung vor stressinduziertem Zelltod hat. Die Tatsache, dass die TAR-miRNA sowohl in Latenz wie auch in akut-infizierten Zellen exprimiert wird, spricht für ein breitgefächertes Bindungs- und Regulationspotenzial verschiedener Transkripte (Klase et al. 2009). Die TAR-miRNA konnte sowohl *in vitro* mittels RPA in chronisch infizierten CD4+ T-Zellen (Klase et al., 2007, Klase et al., 2009) als auch *in vivo* in HAART therapierten HIV-Patienten nachgewiesen werden (Klase et al., 2007).

2011 wurde die TAR-miRNA mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung erneut nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Ben Berkhout verglich uninfizierte SupT1-Zellen (eine humane T-Zelllinie) mit infizierten SupT1-Zellen (Schopman et al., 2011). Zur Infektion nutzten sie zum einen kompletten HIV-1-Klon und zum anderen eine HIV-1-Mutante, in welcher die Stem-Loop-Struktur der TAR-Region modifiziert wurde (HIV-rtTA), sodass das HIV-1 tat-Protein nicht mehr an diese bindet. Neben vier weiteren viralen miRNAs konnte die TAR-miRNA sequenziert werden. Erstaunlicherweise konnten in den mit HIV-rtTA infizierten Zellen mehrere kleine RNAs detektiert werden. Die Autoren nehmen an, dass dies durch die vorgenommenen Punktmutationen und dadurch bedingten strukturellen Veränderungen bedingt ist. Eine Heraufregulierung der TAR-miR mit Hilfe eines Plasmides, auf der die TAR-miR (plus 100bp up und downstream der miRNA) kodiert ist, ergab jedoch keinen Effekt auf die Replikation von HIV-1 (Schopman et al., 2011).

1.2.6.4 HIV-miRNA-H1

Die dritte nachgewiesene miRNA in HIV-1 ist die miR-H1. Sie wird von einer 81 nt langen Haarnadelstruktur kodiert, welche ebenfalls in der LTR des HIV-1 Genoms kodiert ist (Benasser et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die miRNA sowohl den Apoptose-antagonisierenden-Transkriptions-Faktor (AATF) degradiert (Kaul et al., 2009) als auch die Expression der zellulären miRNA miR-149 herunterreguliert, die an die mRNA des HIV-1 Proteins Vpr binden könnte (Kaul et al., 2009).

1.2.7 miRNA und RNAi als therapeutisches Mittel gegen HIV

Der Lebenszyklus, die Genexpression und das Genom von HIV-1 sind gut charakterisiert, daher eignet sich HIV-1 besonders für ein RNAi-basiertes Medikament. Es wurden synthetische siRNAs („*small/short-interfering RNA*“) und shRNAs („*short-hairpin RNA*“) gegen nahezu alle HIV-1 codierten mRNAs wie *env*, *gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und der LTR in Zelllinien untersucht (Lee et al., 2002; Jacque et al., 2002; Novina et al., 2002; Martinez et al., 2002; Coburn and Cullen, 2002). Durch die Insertion spezifischer siRNAs gegen *tat* und *rev* konnte die Genexpression und die Replikation von HIV-1 inhibiert werden (Coburn and Cullen, 2002). Jacque und Kollegen induzierten mit selbst designeten siRNAs gegen *vif*, *nef* und die LTR von HIV-1 eine spezifische Degradation der jeweiligen viralen Ziel-RNAs (Jacque et al., 2002). Zudem konnte belegt werden, dass eine Inhibition des Virus auch nach der Integration in das Zellgenom möglich ist (Novina et al., 2002).

Trotz der beschriebenen Erfolge von RNAi-bedingter Inhibition von HIV-1 mRNAs in Zelllinien stellt die Möglichkeit einer siRNA-basierten Therapie *in vivo* eine größere Herausforderung

dar. Die Sequenzveränderungen durch die hohe Mutationsrate von HIV-1 kann die spezifische Bindung therapeutischer siRNA oder miRNA an die virale RNA (langfristig) erschweren. Zudem müssen auch Risiken einer solchen Therapie in Betracht gezogen werden. So ist die Integration einer shRNA mittels eines retroviralen Vektor-Systems nicht gerichtet. Ferner wird durch die Transfektion oder Überexpression von siRNA eine Interferon-Antwort in Säugerzellen induziert (Bride et al., 2003; Sledz et al., 2003) und die Überexpression einer shRNAs kann toxische Auswirkungen haben (Grimm et al., 2006).

1.3 Ziel der Arbeit

2009 und 2007 konnten die Arbeitsgruppen um Yeung et al und Klase erste HIV-1 kodierte microRNAs nachweisen (Yeung et al, 2009; Klase et al, 2007;). Jedoch konnten keine näheren Angaben zur Funktion der viralen miRNAs gemacht werden. Daher war die Zielsetzung der Arbeit kleine virus-spezifische nicht-kodierende RNAs im SIV_{mac239} Genom zu identifizieren und zu charakterisieren.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollten:

- Wie verhält sich die Replikation von SIV_{mac239} im Zeitverlauf *in vitro*?
- Unterscheidet sich die SIV_{mac239}-Replikation in einer T-Zelle und in einer B/T-Hybrid-Zelle gleich?
- Unterschieden sich die Replikationen von SIV_{mac239} und HIV-1 in beiden hier verwendeten Zelllinien?
- Werden miRNAs und/oder kleine nicht-kodierende RNAs im SIV_{mac239} Genom kodiert?
- Wie verhält sich die kleine nicht kodierende RNA im Infektionsverlauf?
- Werden miRNAs in das Viruspartikel verpackt?
- Welchen Einfluss hat/haben die miRNA(s) und nicht kodierenden RNAs auf die Replikation und Infektiosität des Virus?
- Sind die SIV_{mac239} kodierte miRNA auch *in vivo* detektierbar?

2 Material

2.1 Geräte

Tab. 2.1-1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Bakterien Inkubator	Hereaus Instruments
Feinwaage supermicro	Satorius
Gel Elektrophorese Kammer, PerfectBlue Maxi Gel System	Peqlab Biotechnologie
Gel Jet Imager	Intas
Heizblock, ThermoStat plus	Eppendorf
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr
Laborwaage LC2200	Satorius
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Microskop Axio Observer A.1 + Axio Cam MRc	Carl Zeiss
Mikroskop IX70	Olympus
Multipette	Eppendorf
MyCycler Thermocycler	Biorad Laboratories
NanoDrop Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie
Pipetten (1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hischmann Laborgeräte
Real-Time PCR Gerät 7500"	Applied Biosystems
Sequenzier, Genetic Analyser 3130x	Applied Biosystems
Sterilbank Gelair	BioFlow Technik

Geräte	Hersteller
Stickstofftank	Chronos Messer
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80 °C)	New Brunswick Scientific
Ultrazentrifuge, Sorvall discovery 90; Rotor TFT 80.4	Thermo Scientific
Vakuumzentrifuge, Concentrator plus	Eppendorf
Vortexer	Ernst Schütt jr.
Zellkultur Inkubator	Thermo Scientific
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge, Biofuge fresco	Hereaus Instrument
Zentrifuge, Multifuge S-R	Hereaus Instrument
Zentrifuge, Multifuge1 S-R	Hereaus Instrument

2.2 Arbeitsmittel

Tab. 2.2-1: Verwendete Arbeitsmittel

Arbeitsmittel	Hersteller
Leucosept-Röhrchen (50 mL)	Greiner Bio-One
MACS Depletionssäulen (LD)	Miltenyi Biotec
MACS Mult Stand	Miltenyi Biotec
MACS Selektionssäulen (LS)	Miltenyi Biotec
MACS Separations Einheit	Miltenyi Biotec
MicoAmp Optical 8-Tube Streifen (0,2 mL)	Applied Biosystems
Microseal B adhäsive Folie	Applied Biosystems
Microtiter Platte, 96 Well	Applied Biosystems
Neubauer Zählkammer	Marienfeld

Arbeitsmittel	Hersteller
Optical caps	Applied Biosystems
PCR Softtubes (0,2 mL)	Biozym
Pipettenspitzen, steril (1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL)	Sarstedt
Pipettenspitzen, steril, gestopft, RNAse frei (1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL)	Sarstedt
Reagiergefäße („Eppis“) (1,5 mL, 1 mL, 0,5 mL)	Sarstedt
Reagiergefäße („Eppis“) (2 mL)	Eppendorf
Reagiergefäße, low DNA bind (1,5 mL)	Eppendorf
Serologische Pipetten, steril (1 mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt
Spritzenfilter (0,45 µm)	Heinemann Labortechnik GmbH
Tubes (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten, 96 Well, steril	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sartedt

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.3-1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
3_Amino-9-Ethylcarbazol	Roth
Agarose Metaphore, GenAgarose Tiny LMH	Genaxxon BioScience
Agarose, NEEQ Ultra Quality	Roth
Ampicillin	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA; FCS)	PAN-Biotech
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Concanavalin A (ConA) = Lectin (von <i>Canavalia ensiformis</i>)	SERVA
DEAE-Dextran	Applichem
Dimethylformamid	Roth

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMEM	PAN Biotech
DNA-Exitus-Plus	Applichem
Essigsäure	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol (99,8%)	Roth
Ethanol, vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Applichem
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH
Formaldehyd	Roth
Glutaraldehyd	Roth
Glycerol	Merck
Hefe-Extrakt	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhexacyanidoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Roth
Kaliumhexacyanidoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Roth
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roth
MEM	Gibco
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Opti MEM	Gibco
Penicillin (10 000 U/mL)	PAN Biotech
Phenol-Chloroform	Ambion
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Roth
RPMI 1640	PAN Biotech

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Streptomycin (10 mg/mL)	PAN Biotech
Tris-HCl	Roth
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypton	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma-Aldrich

2.4 Kommerziell erhältliche Kits

Tab. 2.4-1: Verwendete Kits

Name	Hersteller
A plus Poly (A) Polymerase tailing Kit	Epicentre Biotechnologies
ATP (100 mM)	Epicentre Biotechnologies
Big Dye Terminator v3.1 Cyclor Sequencing Kit	Applied Biosystems
BioScript One-Step RT-PCR Kit	Bioline
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Fermentas
DNA ladder, GeneRuler, Low Range	Fermentas
DNA ladder, GeneRuler, UltraLow Range	Fermentas
dNTP Mix (25 mM each)	Fermentas
Eukaryote Total RNA Nano Kit (Bioanalyzer)	Agilent Technologies
Ladepuffer (6x)	Fermentas
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
mirVana microRNA Isolation Kit	Ambion
NucleoSpin Plasmid DNA Isolation Kit	Macherey-Nagel
Nukleasefreies H ₂ O	Qiagen
pGEM T easy cloning Kit	Promega
Power SYBR-Green MasterMix	Applied Biosystems

Name	Hersteller
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiamp Viral RNA mini Kit	Qiagen
Random Hexamers	Fermentas
Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems

2.5 Enzyme

Tab. 2.5-1: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
A-Plus-Polymerase, 4 U/ μ L	Epicentre Biotechnologies
Bioscript RT, 200 U/ μ L	Bioline
DNase 1, 1U/ μ L	Fermentas
RNase Inhibitor, RiboLock, 40 U/ μ L	Fermentas
RNase A, 100 mg/mL	Qiagen
RNase One, 10 U/ μ L	Promega
RNase H, 5 U/ μ L	Fermentas

2.6 Antikörper

Tab. 2.6-1: Antikörper zur Bestimmung des SIV-Titers mittels IPAP

Name	Eigenschaften	Herkunft
monkey anti-SIV	polyklonal	Rhesus Macaque S1604, DPZ
Peroxidase-konjugierter AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Ziegen anti-human IgG (H+L)	monoklonal	Jackson Immuno Research Laboratories

2.7 Oligonukleotide

2.7.1 Zur Detektion der genomischen viralen RNA

Tab. 2.7-1: Primer zur Bestimmung der viralen RNA

Name	Sequenz (5' - 3')	bezogen von:
<i>gag-for</i>	ACCCAGTACAACAAATAGGTGGTAACT	TIB MOLBIOL
<i>gag-rev</i>	TCAATTTTACCAGGCATTTAATG	TIB MOLBIOL
<i>gag-probe</i>	FAM -TCCACCTGCCATTAAGCCCGAGAA- TMR	TIB MOLBIOL

FAM= 5/6-Carboxyfluorescein, TMR= TAMRA = 6-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester

2.7.2 Zur Detektion von miRNAs im Poly-Adenylierungs Assay

Tab. 2.7-2: cDNA-Synthese Primer des Poly-Adenylierungs Assay

Name	Sequenz (5' - 3')	bezogen von:
RT-probe- anchor(dT)	ATTCTCACCGGATTCAGTCGTCCCCTCATTGCGA T CCAGGTTACACAGtttttttttttttttt	TIB MOLBIOL
RT-ancor(dT)	ATTCTCACCGGATTCAGTCGTcttttttttttttttt	TIB MOLBIOL

Tab. 2.7-3: Zur Detektion der miRNAs im Poly-Adenylierungs Assay mittels qRT-PCR

Name	Sequenz (5' - 3')	bezogen von:
hsa-miR-16-1	AGCAGCACGTAAATATTGGC	TIB MOLBIOL
UniRev	ATTCTCACCGGATTCAGTCG	TIB MOLBIOL
Fu-Probe	FAM-CCCTCATTGCGATCCAGGTTACACAG-TMR	TIB MOLBIOL
SIV-miR-21	GATTGGAATTGGGAGATT	TIB MOLBIOL
SIV-miR-86	CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAG	TIB MOLBIOL
SIV-miR-86-11	TGCGGAGAGGCTGGCAGATTG	TIB MOLBIOL
SIV-miR-86-13	CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGAT	TIB MOLBIOL

Name	Sequenz (5' - 3')	bezogen von:
SIV-miR-86-15	GCTCTGCGGAGAGGCTGGCAG	TIB MOLBIOL
SIV-miR-86-17	CGCTCTGCGGAGAGGCTGGC	TIB MOLBIOL
SIV-miR-87	GTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCT	TIB MOLBIOL

FAM= 5/6-Carboxyfluorescein, TMR= TAMRA = 6-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester

2.7.3 Stem-Loop-Assay

Tab. 2.7-4: cDNA-Synthese Primer des Stem-Loop-Assays

Name	Sequenz (5' -3')	bezogen von:
RT-SIV21-Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTTAGTG	TIB MOLBIOL
RT-SIVTAR-LA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTCAATCT	TIB MOLBIOL
RT-SIVTAR-LB	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTAATCTG	TIB MOLBIOL
RT-SIVTAR-LC	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTATCTGC	TIB MOLBIOL
RT-SIVTAR-LD	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTTCTGCC	TIB MOLBIOL
RT-miR-16-Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTGCCAA	TIB MOLBIOL

Tab. 2.7-5: qRT-PCR Primer des Stem-Loop-Primers

Name	Sequenz (5' -3')	bezogen von:
SIV-21-Loop for	CAGAGGTGGCAGAACTGTATC	TIB MOLBIOL
SIV-miR-TAR-FA	CGCTCTGCGGAGAGGCTGGC	TIB MOLBIOL
SIV-miR-TAR-FB	TCGCTCTGCGGAGAGGCTGG	TIB MOLBIOL
SIV-miR-TAR-FC	GTCGCTCTGCGGAGAGGCTG	TIB MOLBIOL
SIV-miR-TAR-FD	CAGTCGCTCTGCGGAGAGGCT	TIB MOLBIOL
hsa-miR-16-LFor	TCAGCTGGGTAGCAGCACGTAAA	TIB MOLBIOL
Loop Rev	CAGTGCAGGGTCCGAGGT	TIB MOLBIOL

2.7.4 Sequenzierung

Tab. 2.7-6: Primer zur Sequenzierung der Plasmide pGEM-T easy und pJet 1.2

Name	Sequenz (5' - 3')	bezogen von:
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	IBA Nucleic Acid Synthesis
M13 for (-20)	GTAAAACGACGGGCCAGTG	IBA Nucleic Acid Synthesis
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATG	IBA Nucleic Acid Synthesis
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	IBA Nucleic Acid Synthesis
pJet 1.2 for	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Fermentas
pJet 1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Fermentas

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tab. 3.1-1 abgebildet.

Tab. 3.1-1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenzen
C8166	humane T-Lymphoblastom Zelllinie, enthält HTLV-1 Provirus, exprimiert den Virus jedoch nicht, exprimiert die tat Sequenz. Suspensionszelllinie	Saladdulin et al., 1983
CEMx174	Fusionsprodukt der humanen B-Zelllinie 721.174 und der humanen T-Zelllinie CEM. Suspensionszelllinie	Salter et al., 1985
TZM-bl	Subklon der humanen HeLa Zelllinie. Die Zelllinie JC.53 exprimiert CD4 und CCR5, aus welchen die TZM-bl Zellline (auch als JC53-bl (Klon 13) bekannt) durch die Integration der Luciferase der β -Galaktosidase unter der Kontrolle des HIV-1 Promoters entstand. adhärent	Platt et al., 1998
HEK293FT	Subklon der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293. adhärent	Graham et al., 1997

3.1.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Suspensionszelllinien C8166 und CEMx174 wurden jeweils dreimal pro Woche passagiert. Hierbei wurden zunächst die jeweiligen Kulturmedien und das zum Waschen verwendete PBS in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 3.1-2 dargestellt.

Bei der Passagierung wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 106 x g für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem PBS (pH 7,2) gewaschen und in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. 10 μ l der

Zellsuspension wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit Trypan-Blau 1:1 verdünnt und zum Zählen der Zellen auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop mit Durchlicht gezählt und ein Mittelwert der Quadrate gebildet. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor und der Neubauer-Zählkammerfaktor multipliziert. So ergab sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension. Die Zellsuspension wurden auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt, in Zellkulturflaschen überführt und bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

PBS : 120 mM NaCl
 17 mM Na₂HPO₄
 3 mM KH₂PO₄
 pH 7.2

3.1.2 Kultivieren von adhärennten Zelllinien

Wie die Suspensionszellen wurde die adhärennte Zelllinie TZM-bl ebenfalls dreimal in der Woche passagiert. Hierzu wurden das Kulturmedium und das zu verwendende PBS in einem Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 3.1-2 aufgelistet.

Tab. 3.1-2: Kulturmedien zur Kultivierung von Suspensionszellen

Zelllinie	Kulturmedium
C8166	RPMI- Medium (RPMI 1640, stab Glutamine, 2g/L NaHCO ₃) + 10% (v/v) FCS (Bovine Serum Albumin) + 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin
CEMx174	RPMI- Medium (RPMI 1640, stab Glutamine, 2g/L NaHCO ₃) + 10% (v/v) FCS (Bovine Serum Albumin) + 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin
TZM-bl	DMEM-Medium (stab. Glutamine, 2g/L NaHCO ₃) + 10% (v/v) FCS (Bovine Serum Albumin) + 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin
HEK293FT	MEM-Medium (stab. Glutamine, 2g/L NaHCO ₃) + 10% (v/v) FCS (Bovine Serum Albumin) + 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin

Nach dem Vorwärmen der Lösungen wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen und das verbrauchte Medium abgenommen. Danach wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit Hilfe von 1x Trypsin-Lösung von der Zellkulturflasche gelöst. Zur Trypsin Inaktivierung wurde die Zellsuspension mit der vierfachen Menge an Kulturmedium versetzt. Daraufhin wurde alles in ein

Zentrifugenröhrchen überführt und bei 106 x g zentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte und die Kultivierung erfolgten unter denselben Bedingungen wie bei den Suspensionszelllinien (Kap.3.1.1).

3.1.3 Generierung eines HIV-1 Virusstocks

Der in dieser Arbeit verwendete HIV-1 Virusstock wurde durch Transfektion (Kap. 3.2) des pNL4-3 Plasmides in TZM-bl Zellen generiert. Auf dem pNL4-3 Vektor ist das vollständige HIV-1 Genom kodiert (Adachi et al., 1986). Hierfür wurden zunächst TZM-bl Zellen, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, mit 5 µg Plasmid transfiziert. Der Zellkulturüberstand wurde ab dem zweiten Tag nach der Transfektion gesammelt, steril-filtriert (0,45 µm Filter) und bei -80°C aufbewahrt. Der Virustiter wurde durch eine qRT-PCR mit spezifischen Primern unter Verwendung einer pGEM-T easy-HIV-1 TAR Standardreihe bestimmt.

3.1.4 Generierung von virus-like-particals (VLPs) nach Brandt et al.

Die Generierung der VLPs erfolgte nach Brandt et al. 2006 in HEK₂₉₃FT Zellen. Diese wurden am 2. Tag nach der Transfektion zur Infektion der C8166 und CEMx174 Zellen verwendet.

3.1.5 Infektion von Suspensionszelllinien mit SIV_{mac239}

Die T-Zelllinie C8166 oder die T/B-Hybrid-Zelllinie CEMx174 wurden gewaschen und gezählt (Kap. 3.1.1). Anschließend wurden 1×10^8 Zellen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, mit Medium auf 48 mL aufgefüllt und mit SIV_{mac239} mit einer MOI (Multiplizität der Infektion, „multiplicity of infection“) von 0,01 infiziert. Die Virus/Zellsuspension wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert und danach 7 min bei 106 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 37°C vorgewärmten PBS gewaschen, danach in Medium aufgenommen und mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in eine Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, jeweils dreimal in der Woche. Bei jeder Passagierung wurden jeweils Zellen zur RNA-Isolation und zur Provirus-Bestimmung entnommen. Zur Virustiterbestimmung wurde

an jedem Wochentag 1 ml Zellkulturüberstand entnommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße á 250 µL aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Parallel kultivierte, uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle.

3.1.6 Virus Isolation zur RNA Extraktion

Zur Aufreinigung und Isolation von SIV oder HIV wurde der Zellkulturüberstand ab dem 7. Tag (dpi 7, days post infection(dpi)) nach Infektion verwendet. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand zunächst bei 1800 x g für 15 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände dekantiert und entweder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder bei 16000 x g in einer Ultrazentrifuge, bei 4°C für 1 Stunde zentrifugiert. Eine 50%ige (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 6000 -Stocklösung wurde jeweils frisch angesetzt. Wiederum wurde der Überstand dekantiert und auf 0,3 M NaCl mit 10 % PEG (w/v) eingestellt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 4°C für mind. 2 h auf einem Roller. Die Lösung wurde jetzt bei 4500 x g über Nacht bei 4°C zentrifugiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1x DNase1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden mit 5 U/mL DNase1 350 µg/mL RNase A und 100 U/mL RNase One zugegeben und für mindestens 4 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde eine RNA-Isolation (Kap. 3.5.2) durchgeführt.

10 fach DNase1-Puffer nach New England Biolabs:

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
25 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂

3.1.7 Bestimmung des SIV-Titers mittels Immuno-Peroxidase Anti-Peroxidase Assay (IPAP)

Zur Bestimmung des SIV-Titers (= infektiöse Viruspartikel/ml oder TCID₅₀) in den Zellkulturüberständen SIV infizierter C8166-Zellkulturen wurde ein Immuno-Peroxidase Anti-Peroxidase Assay (IPAP) durchgeführt. Hierbei wurden C8166 Zellen mit dem Zellkulturüberstand von SIV infizierten C8166 Zellkulturen verschiedener Zeitpunkte inokuliert. Zu Beginn des Testes wurden 1:10-Verdünnungsreihen der infektiösen Zellkulturüberstände jeweils von 10⁻² bis zu 10⁻⁸ in einem Volumen von 1 ml angesetzt.

HRP Substrat:	2 M 3-Amino-9-Ethylcarbazol
	5 % Dimethylformamid
	0,015 % (v/v) Wasserstoffperoxid
	15 mM Natriumacetat

Nach etwa 10 bis 15 min wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit PBS (100 µl/Well) gestoppt. Abschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet. Die Anzahl der braun gefärbten Zellen pro Well wurde ausgewertet. Hierbei wurde jedes Well, das mindestens eine braune Zelle enthielt, als positiv bewertet. Die halbinfektöse Dosis (TCID₅₀, 50% *tissue culture infectious dose*) wurde mittels der untenstehenden Formel berechnet.

$$\text{Titer [TCID}_{50}/\text{ml}] = \frac{D^{(n/p + 0.5)}}{D_0 \times D \times V}$$

D: Verdünnungsfaktor (hier: 10)

n: Anzahl positiver Wells

p: Anzahl der Replikate

D₀: erste Verdünnung (hier: 1/10 = 0,1)

V: Volumen der zugegebenen Virusverdünnung in mL (hier: 0,1)

3.1.8 Bestimmung des Virus-Titers mittels TZM-bl Test

Für diesen Test wurde die Zelllinie TZM-bl verwendet. Diese Zelllinie exprimiert die Oberflächenproteine CD4 und CCR5, welche für eine Infektion mit HIV und SIV notwendig sind. In der TZM-bl Zelllinie sind Kopien von Luciferase und β-Galactosidase-Genen unter der Kontrolle des HIV-1 Promoters in das Genom integriert. Somit kann diese Zelllinie nicht nur durch HIV oder SIV infiziert werden, sondern, durch die integrierten Gene, auch als Indikator- Zelllinie dienen.

Zur Durchführung des Testes wurden zunächst 9×10^3 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte ausgesät und anschließend über Nacht bei 37°C und 95% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde 20 µg/mL DEAE-Dextran in DMEM (DEAE-Dextran-Medium) verdünnt. Anschließend folgte eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ des infektiösen Zellkulturüberstandes in DEAE-Dextran-Medium. Das Medium wurde von der Zellkulturplatte abgesaugt und 100 µL Kulturmedium und 100 µL Virusverdünnung in

jedes Well gegeben. Es wurden vier Replikate pro Virusverdünnung angesetzt. Als Kontrolle diente die Zugabe von 200 µL Kulturmedium von uninfizierten Zellen pro Well. Die Platten wurden leicht geschwenkt und für 48 h bei 37°C in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen anschließend mit 200 µL Formaldehyd-Fixierlösung für 5 min bei RT fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurden 100 µL frisch angesetzter Färbelösung in jedes Well gegeben. Es folgte eine Inkubation für 50 min bei 37°C. Wiederum wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden 100 µL PBS in jedes Well pipettiert und die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bioreader-3000. Die halbinfektöse Dosis pro mL (TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose) konnte abschließend wie unten angegeben errechnet werden.

$$\text{Titer } \left(\frac{[\text{TCID}_{50}]}{(\text{mL})} \right) = \text{Anzahl der gefärbten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

Fixierlösung: 1% Formaldehyd (v/v)
 0,2% Glutaraldehyd (w/v)
 in PBS

Färbelösung: 4 mM K₃[Fe(CN)₆]
 4 mM K₄[Fe(CN)₆]
 2 mM MgCl₂
 10 µM X-Gal in DMSO
 in PBS

3.1.9 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach der Infektion mit VLPs wurden diese mittels eines Durchflusszytometers bestimmt. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den VLPs infiziert. Anschließend wurden die Zellen mind. 72h kultiviert. Zunächst wurden die Zellen dreimal mit 300 µL PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 4%igen Formaldehyd für 20 min bei 37°C fixiert und wiederum mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurden die Zellen in 300 – 500 µL PBS aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte im LSR-III (BD). Das folgende Gating-Schema wurde verwendet:

Zuerst wurden mittels des Forward und des Side Scatters die Größe und Granularität der Probe bestimmt und die Population der Zellen isoliert (hier 46,7%). Hieraus wurden anschließend mittels Forward und Forward Scatter die Einzelzellen (hier 77,3%) von den Dupletten getrennt. Daraufhin folgte die Bestimmung des prozentualen Anteils der GFP-exprimierenden Zellen in den Einzelzellen (hier 7,44%).

3.2 Transfektion

Die Transfektion ist in der Molekular Biologie eine Technik, die verwendet wird, um Nukleinsäuren in eukaryoische Zellen zu bringen.

3.2.1 Transfektion von adhärennten Zellen durch Lipofektion

Um Plasmide in die adhärennten Zellen zu bringen, wurde die Lipofektion (Felgner et al., 1987) verwendet. In der Lipofektion wird DNA in kleine kationische Vesikel (Liposomen) gebracht, welche der Phospholipid Doppelschicht der Zellmembran gleicht. Diese Liposomen fusionieren dann mit der Zellmembran und transferieren dabei die Plasmid DNA in das Zytoplasma der Zelle.

Hierzu wurden die adhärennten Zellen zunächst in Kulturmedium (Tab 3.1-2) kultiviert (siehe Kap. 3.1.1). Vor der Transfektion wurden die Zellen nicht mehr als zehnmal passagiert. Einen Tag vor der Transfektion wurden 3×10^6 Zellen in einer 10 cm-Platte in Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Die Zellen sollten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 – 80% erreicht haben. Zu Beginn der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und durch 2 mL Opti-MEM ersetzt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen bis zur weiteren Bearbeitung wieder in den Brutschrank gesetzt. Nun wurden 22,5 μ L Lipofectamin 2000 (Invitrogen) mit 100 μ L Opti-MEM in ein Eppendorf-Reagiergefäß pipettiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Parallel dazu wurden je 5 μ g Plasmid mit Opti-MEM auf ein Volumen von 100 μ L aufgefüllt. Nach 5 min wurde die Plasmid-Mischung mit der Lipofectamin-Mischung zusammengeführt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension vorsichtig auf die Zellen getropft. Diese wurden daraufhin für vier bis fünf Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 10 mL Kulturmedium vorsichtig auf die Zellen gegeben.

3.3 Generierung von transgenen Zelllinien

Um eine stabile Expression einer Ziel-RNA zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit transgene Zelllinien mit Hilfe des Retroviralen Vektor-Systems pVPack vector system von Stratagen hergestellt. Hierzu wurden zunächst Virus ähnliche Partikel (VLP, "*virus like particles*") generiert, welche die Ziel-Sequenz enthalten. Nach der Ernte der VLPs wurden diese auf die Zielzellen gegeben, hierbei wurden die Zellen infiziert. Die Ziel-RNA integriert hierbei in das Genom der Ziel-Zelle.

3.3.1 Herstellen von *virus like particles* (VLPs) zur Transduktion

Die VLPs wurden mittels eines lentiviralen Vektor-Systems (pVPack vector system, Stratagen) in HEK₂₉₃FT hergestellt. Hierzu wurden die Zellen, wie in Kap. 3.1.1 beschrieben, kultiviert. Jeweils 5 µg der Packvektoren pVPack- VSV-G (Hüllprotein) und pVPack- GP (gag /pol) wurden mit 5 µg des lentiviralen Vektors pBabe, mit Hilfe einer Lipofektion, in die Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurde der Zellkulturüberstand entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Der entnommene Überstand wurde mittels eines 45 µm Sterilfilters filtriert und zum Teil in die Transduktion (Kap. 3.3.2) eingesetzt. Der restliche Teil wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Gleiches erfolgte am dritten Tag nach der Transfektion. Zur Kontrolle wurden Viruspartikel generiert, die GFP (pBabe-GFP) integrieren.

3.3.2 Transduktion

Die Transduktion erfolgte in die Zelllinien C8166 und CEMx174.

Zur Transduktion wurden 1×10^5 Zellen in 500 µL Medium in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. 2 mL VLP-Suspension wurden pro Transduktionsansatz mit 3 µg/mL Polybreen versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Virus-Zell-Mischung wurde anschließend bei 32°C und 1500 x g für 3,5 h zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen wieder in der Virus-Lösung resuspendiert und in eine 6-Well Zellkulturplatte pipettiert. Dann wurden 2 mL frisches Kulturmedium in jedes Well zugeführt und die Zellen, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, kultiviert. Zur Selektion wurden die Zellen nach fünf Tagen in Selektions-Medium (Kulturmedium + 2 µg/mL

Puromycin) kultiviert. Danach wurden die Zellen durchgängig in Puromycin-haltigem Selektions-Medium kultiviert.

3.4 Isolation von PBMCs aus EDTA-(Voll)blut mittels Zentrifugation

Nach der Blutentnahme aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) wurden die Citrat-Röhrchen sofort geschwenkt und für maximal eine Stunde bei RT aufbewahrt. Danach wurden 5-9 ml EDTA-Blut in ein 15 mL Röhrchen überführt und bei 800 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Buffy Coat (Leukozytenfilm) vorsichtig abgenommen, in 10 mL kaltes PBS pH 7,2 pipettiert und bei 4°C für 10 min bei 310 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Lysis Puffer (miR VANA-Kit, Ambion) gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pellet bei -80°C aufbewahrt.

3.4.1 Isolation von PBMCs aus Citrat-Blut mit Hilfe des Ficoll-Diatrizoat-Gradienten

Blutproben in Citrat-Röhrchen wurden nach der Entnahme nicht länger als eine Stunde bei RT geschwenkt. Anschließend wurde das Blut über einen Ficoll-Diatrizoat-Gradienten in Erythrozyten, Lymphozyten und Plasma getrennt (Noble und Cutts, 1967).

Zuerst wurden 16 mL Ficoll in ein 50 mL Leucosept-Röhrchen gegeben. Um das Ficoll unter den Filter zu bringen, wurde das Röhrchen bei 310 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden 35 mL Citratblut auf den Filter pipettiert und bei RT für 60 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Lymphozytensaum wurde abgenommen und in 35 mL kaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Pelletierung bei 4°C für 30 min bei 485 x g konnten die Zellen direkt weiter verarbeitet werden. Die isolierten PBMCs wurden zur RNA-Isolation (Kap. 3.5.2) oder zur Isolierung von CD4+ T-Zellen (Kap. 3.4.2) verwendet.

3.4.2 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs

Zur Isolation von CD4-positiven (CD4⁺) T-Zellen aus PBMCs (Kap. 3.4.1) wurde das „CD4⁺ T Cell Isolation“ Kit für nicht-humane Primaten verwendet. Hierbei werden mittels spezifischer Antikörper und magnetischer „beads“ Zellen gezielt separiert.

Da ausschließlich CD4⁺ T-Zellen isoliert werden sollten und Monozyten neben CD14 ebenfalls CD4 exprimieren, wurde zunächst eine Negativ-Selektion durchgeführt, welche die CD14⁺ Zellen aus den PBMCs entfernt. Hierfür wurden 1×10^8 PBMCs in 800 μ L Puffer und 200 μ L MACS CD14 MicroBeads aufgenommen. Anschließend folgte eine Inkubation der Probe für 15 min bei 4°C. Parallel wurde eine Depletionssäule (LD) in dem magnetischen Separator fixiert und mit 2 mL Puffer äquilibriert. Daraufhin wurde die Probe auf die vorbereitete Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 mL Puffer wurden die unmarkierten Zellen von der Säule gewaschen. Der Durchfluss wurde gesammelt und für die Positiv-Selektion von CD4⁺ Zellen verwendet. Die Zellen des Durchflusses wurden mit 300 x g für 10 min bei RT pelletiert. Das Pellet wurde in 160 μ L Puffer und 40 μ L MACS CD4 MicroBeads aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Äquilibrierung der Selektionssäule (LS) mit 5 mL Puffer wurde die Probe auf die vorbereitete Säule pipettiert. Die Säule wurde dreimal mit je 3 mL Puffer gewaschen und dann aus dem Separator genommen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit 5 mL Puffer von der Säule eluiert. Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Abschließend wurde die RNA mit Hilfe von Trizol isoliert (Kap. 3.5.2).

Puffer: 0,5% Bovine Serum Albumin (BSA)
 2 mM EDTA
 in PBS, pH 7,2

3.5 RNA

3.5.1 Arbeiten mit RNA

RNA ist aufgrund ihrer chemischen Struktur sehr sensitiv für RNasen und daher wurden besondere Schutzmaßnahmen für die Arbeiten mit RNA getroffen:

- Reinigung des Arbeitsplatzes mit RNase Away (Roth)
- Wechseln der Handschuhe vor Beginn der Arbeit
- Zügiges Arbeiten, wenn möglich auf Eis
- Verwendung von RNase-freien Reagenzien, Reaktionsgefäßen und gestopften Pipettenspitzen

3.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des Trizol-Reagents (Invitrogen). Hierzu wurden maximal 1×10^7 Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Zentrifugation bei $106 \times g$ für 7 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL Trizol-Reagent resuspendiert und für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden 200 μ L Chloroform zugegeben, das Reaktionsgefäß geschwenkt und wiederum für 3 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben bei $13000 \times g$ für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 mL Isopropanol versetzt. Nach zehnmütiger Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben erneut bei 4°C für 15 min bei $13000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in RNase freiem Wasser (Qiagen) gelöst. Mittels Natrium-Acetat/Ethanol-Fällung wurde die isolierte RNA entsalzt und aufkonzentriert.

3.5.3 Isolierung von microRNA und macroRNA

Zur Isolierung von RNA unterschiedlicher Größe wurde das mirVana miRNA Isolations Kit (Ambion) verwendet. Dabei werden durch verschiedene Ethanolkonzentrationen RNAs größer (macroRNA) bzw. kleiner als 200 nt (microRNA) in unterschiedlichen

Fraktionen gesammelt. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird das Isolat von RNAs <200 nt als „miRNA“ bezeichnet. Die Durchführung richtete sich hierbei weitestgehend nach dem Protokoll des Herstellers. Abweichend wurde zur Elution zweimal 50 µL 95°C warmer Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen. Zur Aufkonzentrierung und zum Entsalzen der isolierten RNA wurde abschließend eine Natrium-Acetat/Ethanol-Fällung (Kap. 3.6) durchgeführt.

3.5.4 Isolation viraler RNA

Die virale RNA wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des QIAmp viral RNA Mini Kit (Qiagen) aus dem gesammelten Zellkulturüberstand gewonnen (Kap 3.1.3). Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Hierbei wurden 140 µL Überstand mit 560 µL AVE-Puffer und 10 µg/mL Carrier RNA-Lösung durch vortexen gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurde die Probe mit 560 µL Ethanol versetzt und auf eine Säule gegeben. Diese wurde bei 6000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde 0,5 mL Waschpuffer AW1 auf die Säule pipettiert und wiederum für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und der zweite Waschschrift erfolgte mit 0,5 mL Waschpuffer AW2. Zum Entfernen des restlichen Ethanols wurde die Säule nochmals für 1 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der viralen RNA wurden 50 µL AVE-Puffer auf die Säule gegeben, für eine Minute inkubiert und abschließend für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Danach wurde das Eluat, wie in Kap 3.6 beschrieben, gefällt.

3.6 Fällung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Natrium-Acetat/Ethanol

Zur Konzentrierung oder zum Entsalzen einer Probe wurde eine Natrium-Acetat/Ethanol-Fällung durchgeführt. Hierbei wurde die Probe mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol (99,9%) und dem 0,1-fachen Volumen an 3 M Natriumacetat, pH 5,5, durch vortexen vermischt. Daraufhin wurde die RNA für mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 13200 x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die

Probe bei 13200 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Trocknen erfolgte in einer Vakuumzentrifuge für 5 bis 10 min bei RT. Abschließend wurde das Pellet in entsprechender Menge DEPC-H₂O oder nukleasefreiem Wasser (Qiagen) resuspendiert.

3.6.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop (PeqLab). Durch ihre aromatischen Ringe absorbieren Nukleinsäuren UV-Licht bei einer Wellenlänge von ca. 260 nm.

Zur Messung wurde das Gerät zunächst auf den Probenpuffer kalibriert. Es wurden dann 1,3 µL der Probe auf die optische Linse gegeben und die Messung durchgeführt. Die Konzentration berechnet sich über die Lambert-Beer'sche Gleichung:

$$\text{Konzentration } c \left(\frac{[\text{ng}]}{[\mu\text{L}]} \right) = \frac{\text{Absorption [AU]} \times \text{Absorptionskoeffizient} \left[40 \frac{\text{ng}}{\text{mL} \times \text{cm}} \right] *}{\text{Küvettenseitenlänge [0,01 cm]}}$$

*der Absorptionskoeffizient beträgt bei RNA 40 ng/(mL x cm) und bei DNA 50 ng/(mL x cm)

Da das Absorptionsmaximum von Proteinen durch die Aminosäure Tryptophan bei 280 nm liegt, kann durch das Verhältnis der optischen Dichten OD₂₆₀/OD₂₈₀ auf die Reinheit eine Nukleinsäurenlösung geschlossen werden. Der OD₂₆₀/OD₂₈₀ – Wert sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.7 Aufreinigung von isolierter RNA

Um sicherzustellen, dass die isolierte RNA keine Fragmente genomischer DNA aufweist, wurde ein DNase I Verdau (Fermentas) durchgeführt. Dazu wurden 500 ng RNA mit einfachem DNase I-Puffer (Fermentas), 2 U DNase I (Fermentas) und 40 U RNase Inhibitor (RiboLock, Fermentas) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit nukleasefreiem Wasser (Qiagen) auf 10 µL aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 1 µL 25 mM EDTA-Lösung zugegeben und die Reaktion bei 95°C für 5 min gestoppt. Abschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.1 Qualitätskontrolle der RNA mittels Bioanalyser

Die Qualität und Größenverteilung einzelner RNA-Proben wurden mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent) bestimmt. Hierbei wurden je nach Probe das RNA 6000 Nano Assay Kit für mRNA oder das small RNA Assay Kit für miRNA verwendet.

Der Agilent 2100 Bioanalyser trennt die RNA-Proben über Mikrokapillaren nach ihrer Größe auf. Der hinzugefügte Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht es, die Laufzeit jeder RNA-Fraktion mittels eines Detektors zu registrieren. Die 2100 Expert Software verarbeitet die Daten zu einem Elektropherogramm und einem virtuellen Elektrophoreseprofil. Zudem ermittelt die Software mit Hilfe eines Algorithmus aus dem Verhältnis von 28S zu 18S ribosomaler RNA (rRNA) den sogenannten RIN-Wert („*RNA Integrity Number*“), welcher einen Anhaltspunkt zur Qualität der RNA liefert. Dabei stellt ein Wert von 10 eine undegradierete Probe und 1 eine degradierte Probe dar.

3.8 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)

Da in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nur DNA amplifiziert werden kann, musste die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dabei wird die RNA mittels einer reversen Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben.

3.8.1 cDNA-Synthese von gesamt-RNA

Die isolierte gesamt-RNA wurde mittels randomisierter Hexamer-Primer (Fermentas) in DNA umgeschrieben. Hierzu wurde das BioScript-One-Step RT-PCR Kit (Bioline) verwendet und 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

Master Mix 1:	1 μ L	Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ μ L)
	100 ng	Gesamt-RNA
	ad 12 μ L	nukleasefreies H ₂ O (Qiagen)

Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA wurde der Master Mix 1 zunächst für 5 min bei 75 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf 4 °C gekühlt und 8 μ l vom Master Mix 2 dazu gegeben. Bei jeder cDNA-Synthese wurde zur

Kontrolle eine Probe parallel mitgeführt, bei der die reverse Transkriptase (Bioscript) durch Wasser ersetzt wurde (minus RT-Kontrolle).

Master Mix 2:	4 μ L	5 fach Puffer (Bioline)
	1 μ L	dNTP (je 10 μ M, Fermentas)
	2,25 μ L	nukleasefreies H ₂ O (Qiagen)
	0,25 μ L	RNase Inhibitor (RiboLock™, 40 U/ μ l, Fermentas)
	0,5 μ L	Bioscript (Bioline)

Temperaturprofil im Thermocycler (BioRad):

5 min	70°C	Denaturierung der RNA
10 min	4°C	Master Mix 2 Zugabe
60 min	42°C	Hybridisierung und Elongation
10 min	70°C	Inaktivierung der RT

Die cDNA wurde nun direkt in die quantitative real-time-PCR (Kap. 3.10) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.8.2 cDNA Synthese von viraler RNA

Das Umschreiben von viraler RNA in cDNA erfolgte ähnlich der cDNA-Synthese von Gesamt-RNA. Hierbei wurde ebenfalls ein Random Hexamer Primer verwendet und 2 μ L isolierte virale RNA eingesetzt. Die restlichen Schritte (Master Mix und Temperaturprofil) erfolgten wie bei der cDNA-Synthese von gesamt-RNA (Kap. 3.8.1). Abschließend konnten die Proben ebenfalls direkt in die qRT-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.8.3 cDNA-Synthese von kleiner RNA (miRNA)

Da miRNAs eine Länge von ca. 20 nt besitzen, ist es nicht möglich sowohl einen forward- als auch einen reverse-Primer zu generieren, die beide für diese Sequenz spezifisch sind. Daher wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die kleinen RNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Hier wurde zum einen der Poly-

Adenylierungs-Assay (Fu et al., 2006) und zum andern der Stem-Loop-Primer Assay (Chen et al., 2005) verwendet.

3.8.3.1 Polyadenylierungs Assay nach Fu et al., 2006

Im Gegensatz zu den meisten mRNAs weisen miRNAs keinen Poly-A-Schwanz auf. Die Arbeitsgruppe um Fu entwickelte 2006 einen Test zur Detektion von kleinen RNAs auf Basis einer Polyadenylierung. Hierbei wurden die kleinen RNAs mittels einer Poly(A) Polymerase zunächst polyadenyliert und anschließend in cDNA umgeschrieben.

Die Polyadenylierung wurde mit Hilfe des Poly(A) Polymerase Tailing Kits (Epicentre Biotechnologies) durchgeführt, wobei jeweils 500 ng miRNA eingesetzt wurde.

Reaktionansatz:

500 ng	miRNA
2 µL	10x Adenylierungspuffer (Epicentre)
2 µL	ATP (10 mM, Epicentre)
0,5 µL	RNase Inhibitor (RiboLock, Fermentas)
1 µL	PolyA-Polymerase (Epicentre)
ad 20 µL	nukleasefreies Wasser (Qiagen)

Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die polyadenylierte RNA direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt.

Für die cDNA-Synthese wurde ein Poly-(dT)-Primer verwendet. Der Primer enthält neben dem Poly-(dT)-Teil eine spezifische Sequenz für eine Sonde und für einen reverse Primer. Hierbei werden 4 µL (100 ng) miRNA und 0,5 µM Primer in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 3.8.1 (cDNA-Synthese von Gesamt-RNA) beschrieben.

Der so synthetisierte cDNA-Strang besteht anschließend aus (von 5' zu 3') der komplementären miRNA-Sequenz, einem PolyT-Schwanz, einer Sonden-Sequenz und einer reverse-Primer-Sequenz. Der Vorteil dieses Assays ist, dass man mit einer cDNA durch einen spezifischen forward-Primer mit einer universellen Sonde und einem universellen reverse-Primer verschiedene miRNAs in einer Probe detektieren kann.

3.8.3.2 Stem-Loop RT PCR (Chen et al., 2005)

Der von Chen et al. 2005 entwickelte Assay basiert auf einer spezifischen cDNA-Synthese. Bei diesem Assay wird für jede miRNA eine spezifische cDNA synthetisiert. In der anschließenden qRT-PCR werden neben der miRNA-spezifischen cDNA ein universeller Reverse-Primer, eine spezifische Sonde und ein spezifischer Forward-Primer verwendet (Kap. xy).

Der spezifische cDNA-Primer (RT-Primer) bindet 5-6 nt des 3'-Endes der jeweiligen miRNA-Sequenz. Darüber hinaus enthält der Primer eine Sequenz für die Bindung eines universellen reverse Primers und Sequenzen zum Ausbilden einer Loop-Struktur. Der Loop soll eine unspezifische Bindung des Primers an RNA verhindern.

In die cDNA-Synthese wurden jeweils 100 ng RNA mit 1 µL spezifischer RT-Primer (10 µM) und nuklease-freies Wasser (Qiagen) in einem Volumen von 12 µL eingesetzt. Die anschließenden Arbeiten erfolgten wie bei der cDNA-Synthese von Gesamt-RNA.

3.9 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (Polymersase chain reaction (PCR); Saiki et al., 1985) ist eine Methode zur gezielten Amplifikation einer DNA-Sequenz. Hierbei wurden für die verschiedenen DNA-Sequenzen unterschiedliche Oligonukleotide (Tab. 2.7) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des Phusion-Reaction-Kit (Finnzymes) durchgeführt. Für 25 µL Reaktionsansatz wurden verwendet:

Reaktionsansatz für PCR:

1x	GC-Puffer (Finnzymes)
1 mM	MgCl ₂
800 µM	dNTPs (10mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,02 %	DMSO (v/v)
10 µM	Oligonukleotid (500 µM je Primer)
1 U	Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes)
100 ng	cDNA Template
ad 25 µL	H ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde, wenn nicht anders erwähnt, im Temperatur-Cycler „My Cycler“ der Firma BioRad unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tab. 3.9-1: Reaktionsbedingungen für PCR

Erst-Denaturierung	98 °C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	98 °C	10 sec	35 Zyklen
Annealing	62 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	40 sec	
End-Elongation	72 °C	5 min	1 Zyklus
Kühlung	4 °C		

Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit einfachem Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

3.10 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Diese Methode eignet sich zur Quantifizierung sehr geringer RNA-Mengen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Techniken angewendet.

a) Quantitative real-time PCR mittels SYBR-Green

Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Cyaninfarbstoff, welcher in doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Der gebundene Farbstoff kann durch blaues Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden, woraufhin er ein grünes Licht der Wellenlänge 521 nm emittiert, welches dann detektiert werden kann. Die Zunahme der gebildeten (Target-)DNA korreliert daher mit der Zunahme des Fluoreszenzsignals.

b) Quantitative real-time -PCR mittels spezifischer Sonden

Basierend auf dem 1991 von Holland et al. entwickelten 5'-Nuklease-Assay macht sich die sondenabhängige qRT-PCR die 5'-3'-Exonukleaseaktivität zu Nutze. Hierbei wird neben den Primern zusätzlich eine spezifische Sonde verwendet, die zwischen den Primern an den (DNA-)Matrizenstrang bindet. An dieser Sonde befinden sich zwei nukleotidgekoppelte Fluoreszenz-Farbstoffe, zumeist am 5'-Ende ein fluoreszierender Reporter und am 3'-Ende ein sogenannter „Quencher“. Wird der Reporter nun mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt, wird durch die räumliche Nähe diese Energie

zu großen Teilen auf den Quencher übertragen („*Förster resonance energy transfer*“, FRET).

Während der Elongation trifft die Taq-DNA-Polymerase auf die Sonde und durch ihre 5'-3'- Exonukleaseaktivität wird diese nun hydrolysiert und Reporter und Quencher werden frei. Durch den Verlust ihrer räumlichen Nähe ist keine Energieübertragung mehr möglich, wodurch der Reporter seine aufgenommene Energie selbst emittiert. Die hierdurch erzeugte Änderung der Fluoreszenz-Emission ist proportional zur Menge von neu erzeugten PCR-Produkten und wird kontinuierlich gemessen. Diese Technik ermöglicht einen hochspezifischen, quantitativen Nachweis der Probe.

Die Detektion der Signale erfolgte mittels des ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte über eine Halogenlampe. Die Emission wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen. Die erste Verarbeitung der gewonnenen Daten wurde von der integrierten 7500 SDS-Software übernommen. Die weitere Aufwertung zur relativen Quantifizierung erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Kap. 3.11) .

3.10.1 Bestimmung der viralen RNA Genomkopien

Zur Bestimmung der genomischen Virus-RNA im Zellkulturüberstand wurde virales *gag* in einer qRT-PCR detektiert. Zur Quantifizierung wurde das Konstrukt *pSTBlue1-gag* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. U. Sauer mann) in einer Verdünnungsreihe von 1×10^7 bis 1×10^2 Kopien pro μL verwendet.

Pro 25 μL Ansatz wurden verwendet:

cDNA/Plasmid	0,5	μL
Universal Master Mix (ABI)	12,5	μL
<i>gag</i> -Sonde (10 μM)	1	μL
<i>gag</i> sense Primer (10 μM)	1	μL
<i>gag</i> antisense Primer (10 μM)	1	μL
H ₂ O	9	μL
Endvolumen	25	μL

Dabei wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet:

Tab. 3.10-1: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR zur Bestimmung der viralen RNA-Genomkopien

Erst-Denaturierung	95°C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	15 sec	45 Zyklen
Annealing und Elongation	58°C	45 sec	
End-Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus
Kühlung	4°C	∞	

Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

3.10.2 Detektion von miRNA

Die Detektion von miRNAs erfolgte mit Hilfe des Poly-Adenylierungs-Assays oder des Stem-Loop-Assays. Bei beiden Assays kann sowohl SYBR-Green als auch eine universelle Sonde verwendet werden. Dafür wurden verschiedene Master Mixe benutzt. Die jeweiligen Pipettier-Schemata sind im Folgenden aufgeführt:

Tab. 3.10-2: Reaktionsansatz des SYBR-Green Master Mix

Power SYBR-Green Mix (ABI)	12,5 µL
sense-Primer (10 µM)	1 µL
antisense-Primer (10 µM)	1 µL
cDNA	0,5 µL
H ₂ O	10 µL
Endvolumen	25 µL

Tab. 3.10-3: Reaktionsansatz des *TaqMan* Master Mix

Universal MasterMix (ABI)	12,5 µL
Sonde (10 µM)	1 µL
sense-Primer (10 µM)	1 µL
anitsense-Primer (10 µM)	1 µL
cDNA	0,5 µL
H ₂ O	10 µL
Endvolumen	25 µL

Tab. 3.10-4: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR für miRNAs

Erst-Denaturierung	95°C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing und Elongation	58°C	45 sec	45 Zyklen
End-Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus
Kühlung	4°C	∞	

Auch hier wurden alle Proben in Duplikaten angesetzt und gemessen.

3.10.3 Quantifizierung von mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Nach der Isolation der gesamt-RNA aus den Zellen wurde sie mittels randomisierter Hexamer-Primer in cDNA umgeschrieben. Die anschließende Detektion von cDNAs einzelner Transkripte erfolgte mit Hilfe von SYBR-Green in einer QPCR. Dafür wurde folgendes Pipettenschema verwendet. Für eine Probe wurde ein Ansatz von 25 µL verwendet.

cDNA/Plasmid	0,5	μL
Power SYBR-Green	12,5	μL
sense Primer (10 μM)	1	μL
antisense Primer (10 μM)	1	μL
H ₂ O	10	μL
Endvolumen	25	μL

Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

3.11 $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Winer et al., 1999

Um die Regulation von miRNAs in infizierten und uninfizierten Zellen zu bestimmen, wurden die C_T -Werte von zwei Replikaten gegen die hsa-miR-16 normalisiert.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT} (\text{miR-x}) - \text{CT} (\text{hsa-miR-16})$$

$$SD(\Delta\text{CT}) = \sqrt{\frac{SD^2 (\text{CT} (\text{miR-x}))}{n (\text{CT} (\text{miR-x}))} + \frac{SD^2 (\text{CT} (\text{hsa-miR-16}))}{n (\text{CT} (\text{hsa-miR-16}))}}$$

Die Regulation einer bestimmten miRNA während einer SIV_{mac239}-Infektion wurde durch das Abziehen des ΔC_T -Wertes von SIV-infizierten (SIV-inf.) Zellen von uninfizierten (uninf.) Proben errechnet.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{uninf.}) - \Delta\text{CT} (\text{SIV-inf.})$$

$$SD(\Delta\Delta\text{CT}) = \sqrt{\frac{SD^2 (\Delta\text{CT} (\text{uninf.}))}{n (\Delta\text{CT} (\text{uninf.}))} + \frac{SD^2 (\Delta\text{CT} (\text{SIV-inf.}))}{n (\Delta\text{CT} (\text{SIV-inf.}))}}$$

Diese Differenz kann auch als Regulationsfaktor dargestellt werden.

$$\text{Regulationsfaktor} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

In dieser Arbeit wurden jedoch virale miRNAs untersucht. Dies bringt die Schwierigkeit der internen Kontrolle zur Normalisierung mit sich, da zelluläre miRNAs sich nur bedingt eignen. Um eine Regulation unabhängig von zellulären miRNAs zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Regulation der detektieren viralen miRNAs mittels Expression über dem Hintergrund (Expression üH) bestimmt und dargestellt. Hierfür wurden die jeweils parallel mitgeführten uninfierten Proben und die -RT Kontrollen als Hintergrund betrachtet. Die folgenden Formeln wurden verwendet.

$$\text{Expression üH} = \text{CT (uninf.)} - \text{CT (SIV-inf.)}$$

$$SD(\text{Expression üH}) = \sqrt{\frac{SD^2 (\text{CT (uninf.)})}{n (\text{CT (uninf.)})} + \frac{SD^2 (\text{CT (SIV-inf.)})}{n (\text{CT (SIV-inf.)})}}$$

$$\text{relative Expression} = 2^{\text{Expression üH}}$$

3.12 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung und Überprüfung von PCR-Produkten wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wandert die negativ geladene Nukleinsäure im elektrischen Feld zur positiven Anode.

3.12.1 Gelelektrophorese für kleine PCR-Produkte <200 bp

Für die Auftrennung von PCR-Produkten <200 bp wurde ein 2%iges MetaPhor Agarosegel mit TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) zunächst für mindestens 20 min quellen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid oder GelRed versetzt und in die vorbereiteten Kammern gegossen. Nach Ausgelatinierung der Agarose wurden die Proben mit 1 fach DNA-Probenpuffer (Fermentas) versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größenstandard wurde GeneRuler Low Range DNA Ladder (700 - 25 bp) (Fermentas) oder GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (300 – 10 bp) (Fermentas) eingesetzt. Dann wurden die Proben bei 90-100 V für

45 min bis 1 h aufgetrennt. Anschließend wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht dokumentiert, gegebenenfalls ausgeschnitten und bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

3.12.2 Gelelektrophorese größerer DNA-Fragmente >200 bp

War das zu überprüfende Produkt länger als 200 bp, so wurde hierfür ein 0,7 -1%iges Agarose (Roth) Gel verwendet. Außerdem wurde der Größenstandard der erwarteten Größe des jeweiligen DNA-Fragmentes entsprechend gewählt (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 20000 -75 bp (Fermentas) oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 1000-100 bp (Fermentas)). Die weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 3.13 beschrieben.

TAE Puffer (10 x): 400 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
200 mM Essigsäure
pH 8,0

3.13 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte je nach Größe des DNA-Fragments. Kleine DNA-Fragmente (< 800 bp) wurden mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) und größere Fragment (> 800bp) mit NukleoSpin Extract II Kit (Macherey Nagel) jeweils nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die so gewonnene DNA wurde anschließend direkt zur Ligation in einen Vektor eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.14 Arbeiten mit Bakterien

3.14.1 Verwendete Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme verwendet.

Tab. 3.14-1: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Anbieter
α -select Gold	F' <i>deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 phoA</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Bioline
Bio Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>porAB lacI^q Z</i> Δ M15 Tn10(Tet ^R)]	Bioline
TOP10F'	F' { <i>lacI^q, Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

3.14.2 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, in Luria-Bertani (LB)-Medium, versetzt mit 100 μ g/mL Ampicillin, bei 37°C über Nacht.

Luria-Bertani (LB)-Medium auf 1 L H₂O

10 g	Trypton (Roth)
5 g	Hefe-Extrakt (Roth)
10 g	NaCl (Roth)

3.14.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden verschiedene chemisch kompetente *E. coli* Stämme verwendet (s.o.).

Zur Transformation wurde zunächst ein Aliquot *E. coli* Stock auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden maximal 1/10 Volumen des ligierten Plasmids zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C wurde die Probe sofort für 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 600 μ L LB-Medium zugegeben

und die Probe für 30 bis 45 min bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden die Bakterien auf Selektions-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Selektions-Agar-Platten auf 1 L H₂O

10 g	Trypton (Roth)
5 g	Hefe-Extrakt (Roth)
10 g	NaCl (Roth)
15 g	Agar (Roth)
100 µg/mL	Ampicillin (Merck)

3.14.4 Isolation von Plasmid-DNA

Die in der Transformation gentechnisch veränderten *E. coli* Stämme wurden zur Präparation von Plasmid-DNA eingesetzt. Hierfür wurde eine *E. coli* Kolonie von der Selektionsplatte gepickt und in 5 mL LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des NukleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.14.5 Analytisches Schneiden von Plasmid-DNA mithilfe von Restriktionsenzymen

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen nach den Angaben des Herstellers geschnitten, wobei 1 µg DNA eingesetzt wurde. Die DNA-Fragmente der Probe wurden zur Überprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und dokumentiert.

3.14.6 Ligation von DNA in Plasmide

Zur Ligation wurden sowohl Produkte aus einer qRT-PCR sowie aus einer PCR verwendet. Da die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Produkte mit Hilfe verschiedener Polymerasen amplifiziert wurden, mussten die Fragmente in „blunt-end“ oder „sticky-end“ Vektoren ligiert werden.

Ligation in "blunt-end" Vektoren

Die Ligation eines PCR-Produktes erfolgte in den Vektor pJet 1.2 nach dem Protokoll des Herstellers in einem Verhältnis von 1:3 von Vektor zu Insert über Nacht bei 4 °C.

Ligation in "sticky end" Vektoren

Produkte von qRT-PCRs wurden in den pGEM-T-easy Vektor ligiert. Sie erfolgte bei RT für 1h in einem Verhältnis von 1:3 nach den Angaben des Herstellers.

3.15 Sequenzierung

Um die Klonierungen/Ligation zu überprüfen, wurden die Plasmide sequenziert.

Reaktionsansatz:

1 µL	Big Dye (Applied Biosystems)
1,5 µL	5x Big Dye Puffer
1 µL	Primer (3,3 µM)
300 ng Plasmid	
ad 10 µL	H ₂ O

Reaktionsbedingungen der Sequenzierreaktion:

96 °C	30 sec.
50 °C	15 sec.
60 °C	45 min.
4 °C	∞

Im Anschluss wurde folgende DNA-Fällung durchgeführt:

10 µL	Sequenzreaktion
90 µL	dH ₂ O
250 µL	100% Ethanol
10 µL	Natrium Acetat (3 M)

Die Probe wurde nun bei 16 000 x g für 10 min bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Die Probe wurde anschließend mit 250 µL 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 16 000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann bei 4°C aufbewahrt. Die abschließende Sequenzierung wurde in der Abteilung Primatengenetik in einem ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer durchgeführt.

3.16 Statistik

Die in dieser Arbeit verwendeten Statistiken wurden mit dem GraphPad Prism 5.01 durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels des unabhängigen t-Test mit Welch-Korrektur bestimmt.

3.17 Computerprogramme

Tab. 3.17-1: Verwendete Computerprogramme und ihre Anwendungsbereiche

Anwendung	Computerprogramm
Bibliothekenerstellung	EndNote 8.0.2 (Thomas Reuters)
Datenanalyse	Microsoft Office 2003 (Word, Excel, Power Point) (Microsoft Cooperation)
Datendarstellung und Analyse, Statistik	GraphPad Prism 5.01 (Graphpad software, Inc.)
Gel Fotos	INRAS Application software (INTRAS)
Mikroskopische Fotos	CellF (Olympus)
miRNA Analyse	miR base
qRT-PCR	SDS 7500 System Software (Applied Biosystems)
RNA Sekundärstrukturanalyse	RNAfold web server (Vienna RNA Web Server)
Sequenzanalysen, Primerdesign	Vector NTI advanced 11.0 (Invitogen)
Durchflusszytometer	DIVA/ Flow Jo

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Regulation von viralen microRNAs (miRNA) nach Infektion mit SIV wurden die T-Zelllinie C8166 und die B/T-Zelllinie CEMx174 ausgewählt. Beide Zelllinien finden in der SIV/HIV-Forschung häufig Verwendung (Rudensey, 1993, Lim, 2008; Hayes et al., 2011) und lassen sich sowohl mit HIV-1 (Agy et al., 1990) als auch mit SIV (Agy et al., 1991) infizieren.

Um zellspezifische und viruspezifische Effekte zu unterscheiden, wurden beide oben genannten Zelllinien sowohl mit SIV_{mac239} und dem humanpathogenen HIV-1 infiziert. Sowohl SIV_{mac239} als auch HIV-1 sind molekulare Klone. Der HIV-1 Klon pNL4-3 ist eine Chimäre aus dem LAV-Klon (Barre-Sinoussi et al., 1983) und dem NY5 (Benn et al., 1985), so dass das hier verwendete Virus einen X4-Tropismus ausweist (Adachi et al., 1986; McCarthy et al., 1998).

4.1 Infektion von C8166 und CEMx174 Zellen mit SIV_{mac239} und HIV-1

C8166 und CEMx174 Zellen wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben mit einer MOI von 0,01 mit SIV_{mac239} oder HIV-1 infiziert. Zur Kontrolle wurden uninfizierte Zellen parallel mitgeführt. Hierbei wurden die Zellen sowohl vor der Infektion als auch im Verlauf eines Experimentes in einer permanenten Zellkultur alle zwei bis drei Tage passagiert und jeweils mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/mL ausgesät. Eine exemplarische Darstellung der Probenentnahme von infizierten und uninfizierten Zellkulturen ist in Abb. 4.1-1 gezeigt. Zur Bestimmung der Wirtsantwort wurden für die Isolation von RNA bei jeder Passage Zellaliquots von infizierten und uninfizierten Zellen entnommen. Um die mittlere infektiöse Dosis (MID₅₀) und die Kopienzahlen an viraler RNA im Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurden Zellkulturüberstände in einem dichteren Intervall abgenommen. Das Experiment wurde bei stark zunehmendem Zellsterben beendet.

A	-2	-1	Inf.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	dpi
				x	x	x	x		x	x	x	x	x	
					+		+		+		+		+	

Abb. 4.1–1: Exemplarische Darstellung der Probenentnahme während eines Infektionsversuchs. In dieser Arbeit wurden C8166 oder CEMx174 Zellen mit SIV_{mac239} oder HIV-1 infiziert. Zur Isolation von RNA wurden Zellen an verschiedenen Tagen nach der Infektion („days post infection“, dpi) entnommen (+). Zur Bestimmung der Viruskopien/mL und des Virustiters/mL wurde Zellkulturüberstand entnommen (x). A = Aussäen der Zellen, Inf. = Infektion

Erste Anzeichen einer Infektion wurden durch die Bildung von Synzytien und Riesenzellen in der Zellkultur erkennbar und traten ab dpi 5 bis 7 auf. Eine infektionsbedingte Lyse der Zellen begann zumeist an dpi 9 nach der Infektion (Abb. 4.1-2).

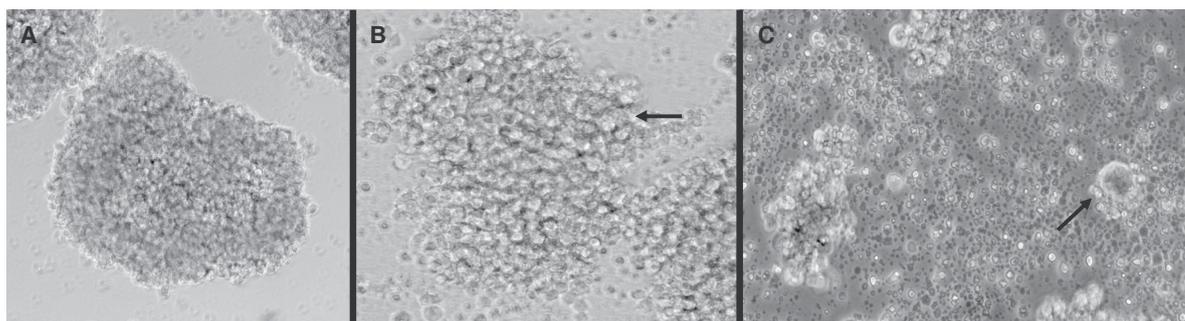


Abb. 4.1–2: Licht-Mikroskopische Aufnahmen von C8166 Zellen im Verlauf einer Infektion mit SIV_{mac239}. A: C8166 Zellen vor der Infektion, B: bei dpi 5 und C: bei dpi 9. Entstandene Synzytien sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Aufnahme A wurde in 20facher Vergrößerung und die Aufnahmen B und C wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

4.1.1 Virus Kinetik in SIV_{mac239} infizierten C8166 und CEMx174 Zellen

Um die Dynamik der Virusreplikation während der SIV_{mac239} Infektion zu untersuchen, wurden drei verschiedene Methoden zur Quantifizierung angewendet. Hierbei gibt die quantitative „real time“-PCR (qRT-PCR) des viralen *gag*-Gens die virale Kopienzahl/mL im Zellkulturüberstand an (Kap. 3.10.1). Der Virustiter (die mittlere infektiöse Dosis) wurde zum einen mittels Immunperoxidase-Anti-Peroxidase-Assays (IPAP) (Kap. 3.1.7) und zum andern mit dem TZM-bl Test ermittelt (Kap. 3.1.8).

Die Dynamik der HIV-1 Replikation wurde analog durchgeführt. Im Gegensatz zur Infektion in statischer Kultur wurde in dieser Arbeit durch die permanente Kultur das Absterben der Zellen auf Grund von Nährstoffmangel durch die regelmäßige Passage der Zellen alle zwei bis drei Tage und ein neues Aussäen dieser in einer konstanten Zelldichte verhindert. Eine uninfizierte Kontrolle wurde zu jeder Zeit mitgeführt und gleich behandelt.

Zur Virusbestimmung im Zellkulturüberstand wurde virale RNA wie in Kapitel. 3.5.4 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde die isolierte RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase unter der Verwendung von randomisierten Hexamer-Primern in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Kap. 3.8.2). Anschließend wurde die cDNA in der qRT-PCR mittels *gag*-spezifischen Primern amplifiziert und mit Hilfe einer *gag*-spezifischen Fluoreszenzsonde detektiert (Kap. 3.10.1).

Um die absolute Kopienzahl pro mL Zellkulturüberstand zu ermitteln, wurde eine *gag*-DNA Standardreihe mitgeführt. Die Detektionsgrenze des Tests wurde hierbei anhand der parallel mitgeführten Kontrollen (uninfizierter Überstand; -RT-Kontrolle von virushaltigen Zellkultur-Überständen) ermittelt und auf 1×10^4 Viruskopien pro mL Zellkulturüberstand festgesetzt.

Das Ergebnis der Virusreplikation von SIV_{mac239} in **C8166** Zellen ist in Abbildung 4.1.-3 gezeigt. Hierbei steigt die Zahl der Virus-Kopien pro mL Zellkulturüberstand im Verlauf der Infektion an. Ab dem 9. Tag nach der Infektion (dpi 9) wird ein Plateau erreicht. Die mathematische Bestimmung des Plateaus mittels GraphPad aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ergab eine maximale Virusdichte von $10^{9,5(+/-1,4)}$ Viruskopien/mL.

Der relative Anstieg der Virusdichte im Zellkulturüberstand wurde mittels einer exponentiellen Regression interpoliert (Abb. 4.1-3). Hierbei zeigten die errechneten Regressionskurven jeweils ein Korrelationskoeffizient von $> 0,95$.

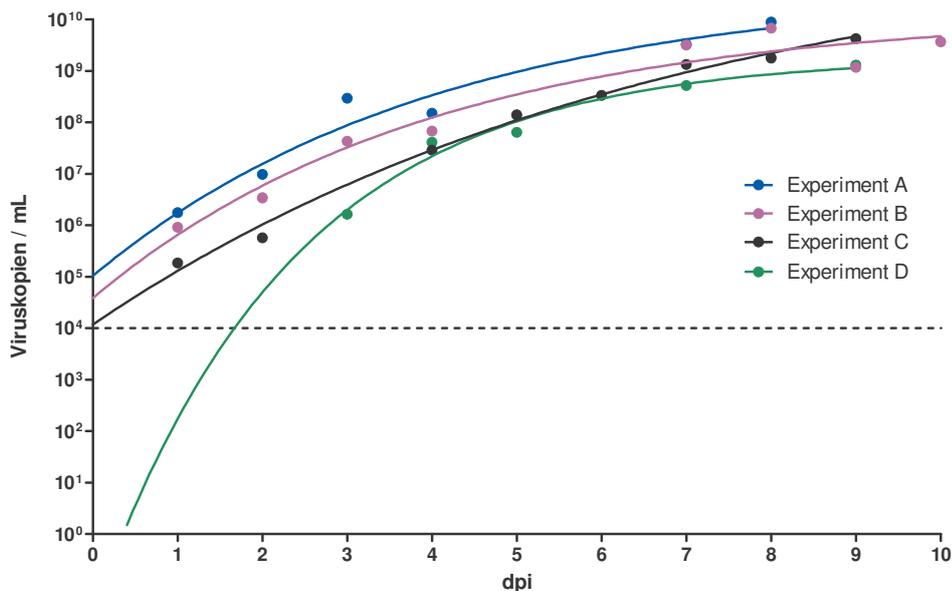


Abb. 4.1–3: Kinetik einer SIV_{mac239} -Infektion von C8166 Zellen. C8166-Zellen wurden mit SIV_{mac239} mit einer MOI von 0,01 mit infiziert, kontinuierlich alle 2-3 Tage passagiert und mit einer konstanten Zelldichte ausgesät. Zur Isolation von viraler RNA wurde Zellkulturüberstand entnommen und die RNA-Kopien mit Hilfe von qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt ist die Anzahl der Viruskopien/mL (y-Achse) im Verlauf der Infektion (dpi, x-Achse) aus 4 unabhängig durchgeführten Experimenten (A-D). Die Kurven entsprechen der nicht-linearen Regression der Datenpunkte mit einem Korrelationskoeffizient von $> 0,95$. Die Detektionsgrenze wurde anhand parallel mitgeführter uninfizierter Proben sowie -RT-Kontrollen ermittelt (gestrichelte Linie).

Um zu untersuchen, ob die höchste Virusdichte über einen längeren Zeitraum konstant bleibt, wurde ein Infektionsexperiment der C8166 Zellen mit einer gleichbleibenden Zellzahl durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit einer MOI von 0,01 infiziert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert und die Zelldichte über den gesamten Zeitraum des Experimentes konstant eingestellt. Um dies zu erreichen, wurden lysierte Zellen durch Zugabe von uninfizierten Zellen ersetzt. Hierzu wurde der zweieinhalbfache Zeitraum eines Infektionsexperimentes gewählt, um festzustellen ob die Virusdichte im Zellkulturüberstand tatsächlich konstant bleibt. Wie im vorherigen Experiment wurden auch hier die Datenpunkte mittels einer nicht-linearen Regression interpoliert. Hierbei wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,94 errechnet. Es zeigte sich, dass das erreichte Plateau im Verlauf des Experimentes konstant war und dem zuvor berechneten Plateaus entspricht ($10^{9,2}$ vs. $10^{9,5(+/-1,4)}$ Viruskopien/mL; Abb. 4.1-4).

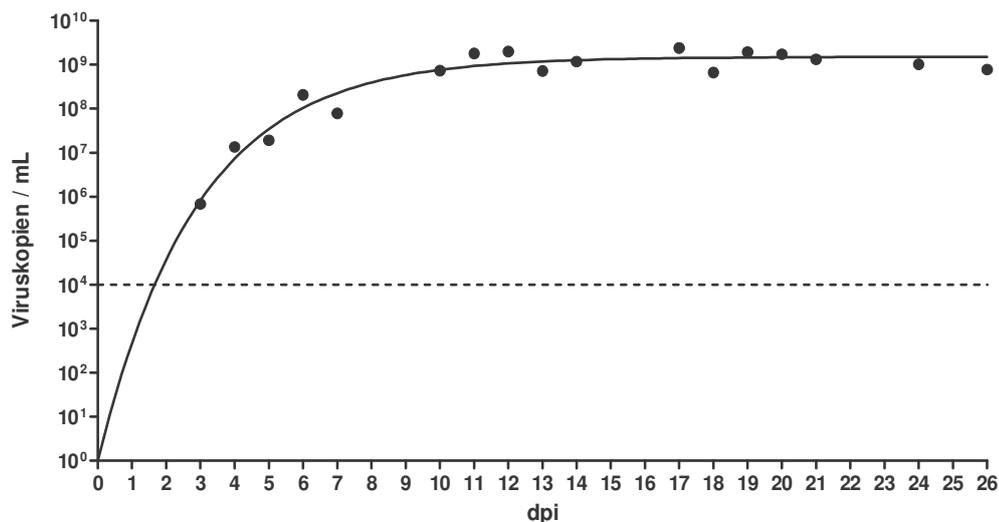


Abb. 4.1–4: Kinetik einer SIV_{mac239} -Infektion von C8166-Zellen unter der Zugabe von uninfizierten Zellen. C8166-Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert, kontinuierlich alle 2 bis 3 Tage passagiert und durch Zugabe von uninfizierten Zellen in einer konstanten Zellzahl ausgesät. Der Überstand wurde abgenommen und die Viruskopien/mL mittels qRT-PCR quantifiziert (y-Achse). Die x-Achse zeigt die Dauer des Infektionsexperimentes. Die gestrichelte Linie markiert die Detektionsgrenze.

Die Ergebnisse der Infektionsexperimente unter Verwendung der T-Zelllinie C8166 mit SIV_{mac239} zeigten sowohl bei den Experimenten ohne Zugabe von uninfizierten Zellen als auch bei Zugabe von nicht-infizierten Zellen nach 9 dpi einen nicht-linearen, sigmoiden Anstieg der Virusdichte. Ab dem neunten Tag nach der Infektion wurde ein Plateau bei $10^{9,2}$ Viruskopien/ml erreicht. Dies zeigt, dass die T-Zelllinie C8166 eine maximale Viruslast von $10^{9,5 (+/-1,4)}$ SIV_{mac239} -Viruskopien pro mL Zellkulturüberstand produzieren kann.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit untersucht, ob B/T-Zellen andere Eigenschaften haben als T-Zellen. Hierzu wurden analoge Experimente durchgeführt

So zeigte das Ergebnis der qRT-PCR ebenfalls einen Anstieg der Virus-Replikation im Verlauf der Infektion der B/T-Hybridzelllinie **CEMx174**. Wie auch bei der Infektion von C8166 Zellen wurde hier der letzte Überstand der uninfizierten Zellkultur parallel mitgeführt. Im Gegensatz zur SIV -Infektion von C8166 Zellen wurde bei der Infektion von CEMx174 Zellen kein Plateau erreicht (Abb. 4.1-5). Eine Verrechnung der Datenpunkte mittels einer nicht-linearen Regression zeigte einen Korrelationskoeffizienten von $< 0,7$, welcher auf eine lineare Regression hindeutet. Eine anschließende Auswertung der Datenpunkte mittels einer linearen Regression

zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0,94 (+/-0,05) für die in der Abbildung 4.1-5 dargestellten unabhängigen Experimente A-C.

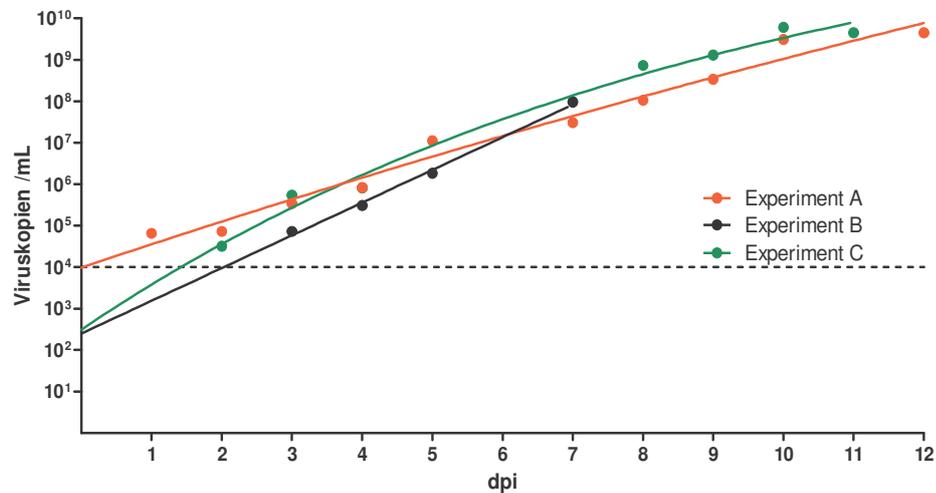


Abb. 4.1–5: SIV_{mac239}-Kinetik der B/T Hybrid-Zelllinie CEMx174 in Viruskopien/mL. In drei unabhängigen Experimenten (A-C) wurden CEMx174-Zellen mit einer MOI von 0,01 mit SIV_{mac239} infiziert. Die Zellen wurden in einer kontinuierlichen Zellkultur alle 2 bis 3 Tage passagiert und mit einer konstanten Zelldichte ausgesät. Zellkulturüberstand wurde zur Isolation von viraler RNA in engen Intervallen entnommen. Zur Kontrolle wurde Überstand uninfizierter Zellen parallel aufgearbeitet. Die viralen RNA-Kopien wurden mit Hilfe von qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt ist die Anzahl der Viruskopien/mL (y-Achse) im Verlauf der Infektion (dpi, x-Achse). Eine Auswertung der Datenpunkte mittels linearer Regression zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0,94 (+/-0,05). Die Detektionsgrenze wurde anhand einer parallel mitgeführten uninfizierten Proben sowie –RT-Kontrollen ermittelt (gestrichelte Linie).

Um die Steigung der Virusdichte im Verlauf eines Infektionsexperimentes näher zu untersuchen, wurde auch für die Zelllinie CEMx174 eine permanente Infektion mit konstanter Zellzahl über 26 Tage durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls die lysierten Zellen durch uninfizierte Zellen ersetzt. Ab dem siebten Tag nach der Infektion wurden uninfizierte Zellen zugeführt. Es zeigte sich, dass ab 10 dpi ein Plateau bei 10^{9,89} Viruskopien/mL erreicht wurde, welches bis zur Beendigung des Experimentes konstant blieb (Abb. 4.1-6). Der mittels nicht-linearer Regression errechnete Korrelationskoeffizient der Datenpunkte betrug 0,97.

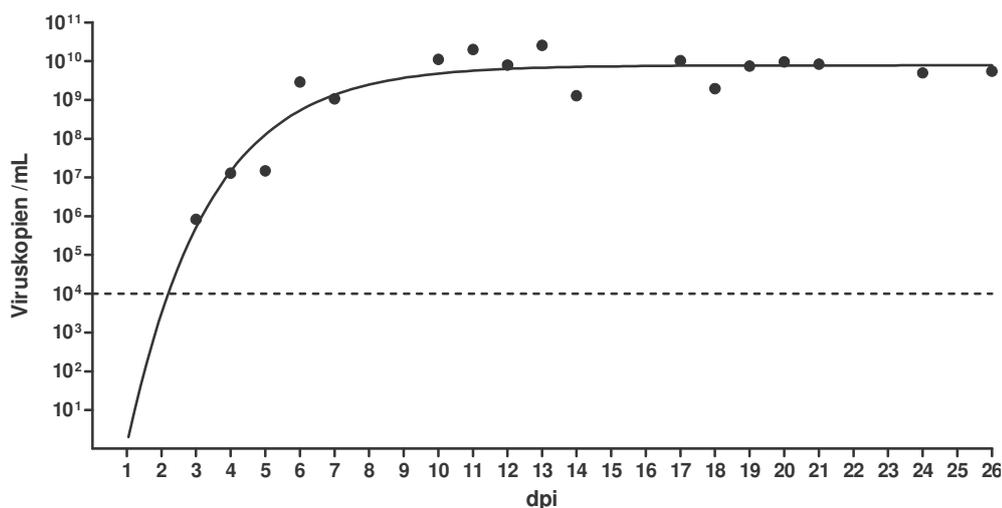


Abb. 4.1–6: Kinetik einer SIV_{mac239} -Infektion von CEMx174 Zellen unter Zugabe von uninfizierten Zellen. Die B/T-Hybridzelllinie CEMx174 wurde mit einer MOI von 0,01 infiziert, kontinuierlich alle 2 bis 3 Tage passagiert und in einer konstanten Zelldichte ausgesät. Lysierte Zellen wurden durch uninfizierte Zellen ersetzt. Der Überstand wurde abgenommen und die Viruskopien/mL mittels qRT-PCR quantifiziert (y-Achse). Die x-Achse zeigt die Dauer des Infektionsexperimentes. Die gestrichelte Linie zeigt die Detektionsgrenze.

Die Infektionsexperimente mit CEMx174-Zellen zeigen, dass ohne Zugabe von uninfizierten Zellen die infektionsbedingte Lyse der Zellen so schnell fortschreitet, dass hier kein Plateau erreicht wurde. Es scheint keinen zellulären Faktor zur Limitation der Virusproduktion zu geben. Wurden jedoch uninfizierte Zellen zugegeben, zeigte sich auch in der B/T-Hybridzelllinie eine Regression mit einem Plateau von $10^{10,3}$ ab dem zehnten Tag nach der Infektion. Dieses lag im Vergleich höher als das von C8166, was darauf hindeutet, dass die B/T-Zelllinie CEMx174 mehr Viren pro Zelle produzieren kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die hier verwendeten Zelllinien wesentlich in der Virusreplikation unterscheiden. Hierbei zeigten die B/T-Hybridzelllinie CEMx174 einen linearen und die T-Zelllinie C8166 einen nicht-linearen Anstieg der Virusdichte im Zellkulturüberstand. Wurden jedoch uninfizierte Zellen zugegeben, zeigten beide Zelllinien zunächst einen sigmoiden Anstieg, das Plateau wurde jeweils an Tag 9 bis 10 nach der Infektion erreicht. Hierbei lag das erreichte Plateau der CEMx174-Zelllinie ($10^{10,3}$) deutlich über dem Plateau der C8166-Zelllinie ($10^{9,5(+/-1,4)}$). Dies deutet auf eine unterschiedliche Toleranz der Zellen zum Virus hin, welche aufgrund des unterschiedlichen Backgrounds der Zelllinie nicht ungewöhnlich ist.

4.1.2 Virus Kinetik in HIV-1 infizierten C8166 und CEMx174 Zellen

Wie zuvor gezeigt wurde, unterscheidet sich die SIV_{mac239} -Virusreplikation in den Zelllinien C8166 und CEMx174. Nun sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in der Virusreplikation alleine von der Zelllinie oder auch von dem verwendeten Virus abhängt. Daher wurden beide Zelllinien mit dem verwandten humanpathogenen Virus HIV-1 infiziert.

Um die Dynamik der Virusreplikation einer HIV-1-Infektion mit der SIV_{mac239} -Replikation zu vergleichen, wurden die HIV-1-Infektionsexperimente analog zu den SIV_{mac239} -Infektionsexperimenten durchgeführt. Zur Bestimmung der Virus-RNA wurde die aus dem Zellkulturmedium isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und mittels HIV-1-TAR spezifischen Primern in einer qRT-PCR amplifiziert. Zur Detektion diente SYBR Green im Master Mix (Kap. 3.10). Zur Vergleichbarkeit der detektierten Viruskopien von SIV_{mac239} und HIV-1 wurden mit Hilfe der Formel: $E = 10^{-1/m}$ die Effizienzen der verwendeten Primerpaare berechnet. Hieraus ergab sich für das SIV_{mac239} *gag*-Primerpaar eine Effizienz von 1,98, für das HIV-1 TAR-Primerpaar eine Effizienz von 1,97, also vergleichbaren Effizienzen. Die Detektionsgrenze wurde anhand der parallel mitgeführten uninfizierten Probe und einer –RT-Kontrolle ermittelt und wurde hier bei $3,2 \times 10^3$ Viruskopien pro mL festgesetzt. Die Viruskopien nach der Infektion mit der HIV-1-Infektion in der T-Zelllinie C8166 im Vergleich zu der B/T-Hybrid-Zelllinie CEMx174 ist in Abbildung 4.1.-7 gezeigt.

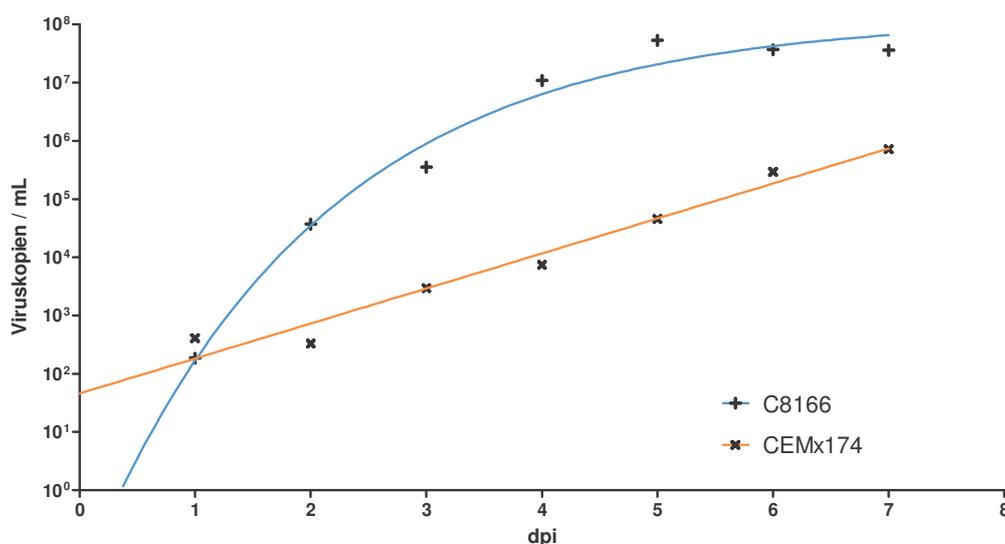


Abb. 4.1–7: Vergleich der HIV-1 Replikation in Zeitverlauf einer Infektion von C8166 sowie von CEMx174. Die beiden Zelllinien C8166 und CEMx174 wurden mit einer MOI von 0,01 mit HIV-1 (Klon pNL4-3) infiziert und alle 2 – 3 Tage passagiert. Aus dem Zellkulturüberstand wurde virale RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit HIV-1 TAR-spezifischen Primern durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Viruskopien/mL (y-Achse) im Verlauf der Infektion (dpi, x-Achse). Die Detektionsgrenze liegt bei $3,2 \times 10^2$ Viruskopien/mL. Die Datenpunkte wurden mittels einer Regression interpoliert.

Die Regression der gemessenen Datenpunkte zeigten wie im Falle einer SIV-Infektion bei den C8166-Zellen eine sigmoide Virusreplikation und bei den CEMx174-Zellen eine lineare Virus-Vermehrung an. Somit unterscheidet sich die Dynamik der Replikation von HIV-1 nicht von der des SI-Viruses. Dies lässt darauf schließen, dass der Unterschied in der Virusreplikation zelltypspezifisch und nicht virusspezifisch ist. Jedoch unterscheiden sich die in detektierten Plateaus der Zellkulturüberstände von C8166-Zellen infiziert mit SIV_{mac239} ($10^{9,5 (+/- 1,4)}$) im Vergleich zu HIV-1 ($10^{7,8}$) erheblich.

4.1.3 Bestimmung der infektiösen SI-Viruspartikel im Zellkulturüberstand

Da in der Literatur erhebliche Unterschiede zwischen den messbaren Viruskopien im Vergleich zur Menge an infektiösen Viruspartikeln beschrieben sind (Bourinbaiar, 1994; Ercoli et al., 1995), wurde neben der Quantifizierung der Virus-RNA-Kopien die Zahl infektiöser Viren im Zellkulturüberstand untersucht. Hierfür wurden zwei Tests durchgeführt: Der Immunoperoxidase-Anti-Peroxidase (IPAP)-Test und der TZM-bl

Test. Es wurden jeweils Aliquots derselben Probe verwendet, in welcher zuvor die Viruskopien/mL bestimmt wurden.

Für die Durchführung des **IPAP** wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} des gesammelten Zellkulturüberstandes verwendet. 100 μ L jeder Überstandsverdünnung wurden in acht Replikaten auf C8166-Zellen gegeben. Als Kontrolle diente der zuletzt gesammelte Überstand der uninfizierten Kontrollzellen. Nach einer Woche wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Detektion der SIV_{mac239}-infizierten Zellen erfolgte mit einem gegen SIV gerichteten polyklonalen anti-p24-SIV-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Stahl-Hennig), der von einem monoklonalen Peroxidase konjugierten Ziege anti-Human IgG (H+L) erkannt wurde. Der Sekundärantikörper verfügt über eine Meerrettich-Peroxidase, diese setzt das zugeführte Substrat um und färbt so die infizierten Zellen an (Kap. 3.1.7). Die Anzahl der infizierten Zellen pro Well wurde ausgezählt. Anschließend wurde die mittlere infektiöse Dosis (*50 % tissue culture infectious dose* (TCID₅₀)) nach der Methode von Reed and Muench (Reed and Muench, 1938) errechnet.

Für die Durchführung des **TZM-bl-Tests** wurde die Zelllinie TZM-bl verwendet. Die TZM-bl-Zellen sind eine adhärenzte Zelllinie und stammen von der JC.53-Zelllinie ab. Die JC.53-Zelllinie exprimiert stabil eine hohe Anzahl der Oberflächenproteine CD4 und CCR5, welche für eine Infektion mit HIV und SIV notwendig sind. Für die TZM-bl Zelllinie wurde in die JC.53-Zellen Kopien von Luciferase und β -Galactosidasen-Genen unter der Kontrolle des HIV-1-Promoters in das Genom integriert. Somit kann diese Zelllinie nicht nur durch HIV oder SIV infiziert werden, sondern durch die integrierten Reporter auch als Indikator-Zelllinie dienen.

Zunächst wurden Zellen ausgesät, am darauffolgenden Tag wurde der gesammelte Zellkulturüberstand von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt. Der verdünnte Überstand wurde in vier Replikaten zusammen mit 100 μ L Zellkulturmedium auf die ausgesäten TZM-bl Zellen gegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Überstand der uninfizierten Zellen parallel mitgeführt. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert. Das X-Gal enthaltene Substrat wurde zugegeben, wodurch die β -Galactosidase der infizierten Zellen gespalten wird und diese blau einfärbt. Abschließend wurden die gefärbten Zellen gezählt und der Virustiter errechnet (Kap. 3.1.8). In beiden hier verwendeten Tests zeigten die uninfizierten Negativkontrollen keine angefärbten Zellen.

Aus den Aliquots der Proben aus Kap 4.1.2 wurde neben der Viruslast der Virustiter mittels der IPAP und der TZM-bl-Test ermittelt. Die beiden verwendeten Tests zur

Bestimmung des Virustiters ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) im Verlauf einer SIV-Infektion zeigten keine Unterschiede in der Kinetik. Die Regressionskurven beider Tests liegen ab dpi 4 übereinander. Dies zeigt die Vergleichbarkeit der beiden Tests (Abb. 4.1-8). Jedoch konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den detektierten Viruskopien/mL und dem qRT-PCR generierten Virustiter beobachtet werden. Das Ergebnis der errechneten Viruskopien/mL liegen im gesamten Experiment ca. 10^3 höher als die TCID_{50} .

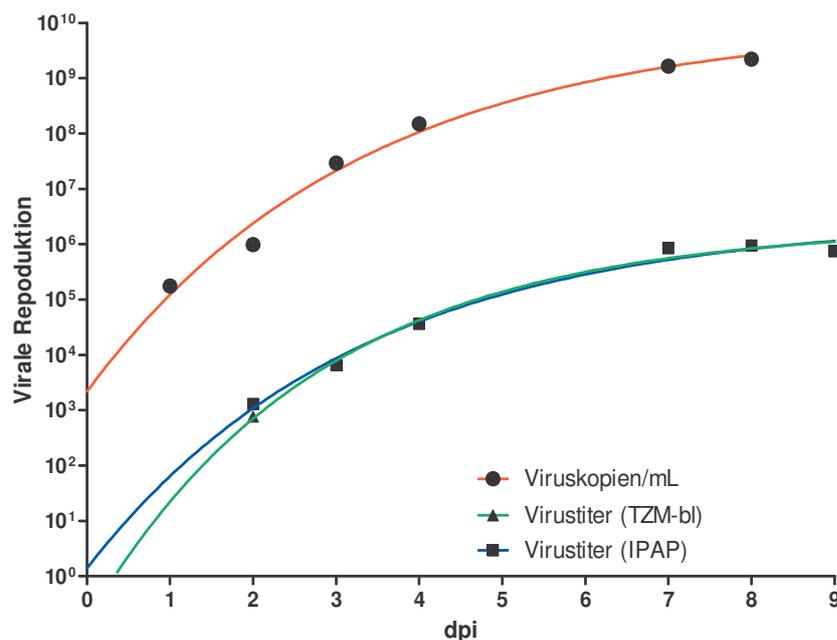


Abb. 4.1–8: Vergleich der Viruskopien zum Virustiter im Verlauf einer $\text{SIV}_{\text{mac239}}$ -Infektion von C8166-Zellen. Nach der Infektion der Zellen wurde in dichten Intervallen Zellkulturüberstand entnommen (x-Achse, „days post infection“, dpi). Die Regressionskurven zeigen den Verlauf der Virusreplikation mittels drei verschiedener Methoden (qRT-PCR (Rot), IPAP (Blau) und TZM-bl Test (Grün)).

Dies lässt darauf schließen, dass entweder nur jeder tausendste produzierte Virus infektiös ist (Bourinbaier, 1994) oder die *in vitro*-Assays eine 1000fach niedrigere Sensitivität besitzen.

Abbildung 4.1-9 zeigt den Verlauf der Virusreplikation im Vergleich zu den Viruskopien pro mL Zellkulturüberstand in einer $\text{SIV}_{\text{mac239}}$ -Infektion der B/T-Hybrid-Zelllinie **CEMx174**. Auch hier ist der Unterschied zwischen den mittels qRT-PCR detektierten Viruskopien/mL und dem unter Verwendung des IPAPs bestimmten, Virustiters von ca. 10^3 vorhanden. Eine Verrechnung der Datenpunkte mittels einer linearen Regression

zeigte für die detektierten Viruskopien/mL einen Korrelations-Koeffizienten von 0,97 sowie für den Virustiter einen Korrelationskoeffizienten von 0.94.

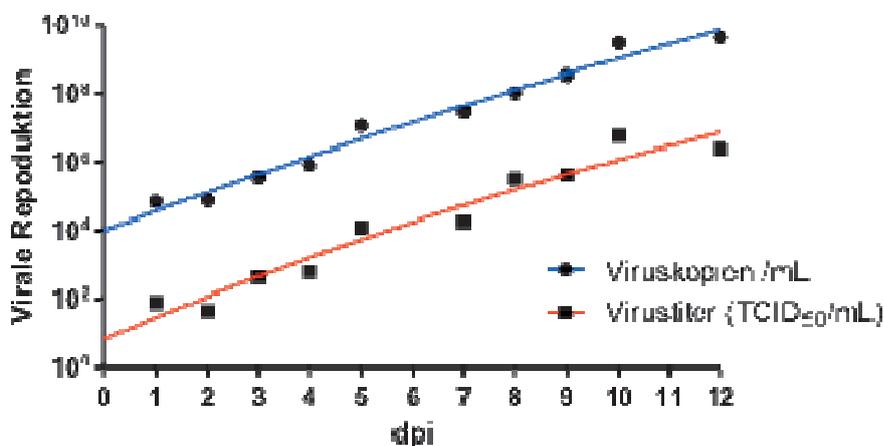


Abb. 4.1–9: Bestimmung der Viruskopien und des Virustiters im Verlauf einer *SIV_{mac239}*-Infektion von CEMx174-Zellen. Nach der Infektion der Zellen wurde in dichten Intervallen (days post infection, dpi) Zellkulturüberstand entnommen. Hieraus wurden zu einem die Viruskopien/mL mit Hilfe einer qRT-PCR ermittelt (blaue Regressionsgerade). Zum anderen wurde der Virustiter unter Verwendung des IPAPs bestimmt (rote Regressionsgerade).

Der Unterschied zwischen der Detektion von Viruskopien mittels qRT-PCR und TCID₅₀ wurde auch für andere Viren beschrieben (Carletti et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist durch die Verschiedenheit der Tests begründet. Die qRT-PCR, welche mit spezifischen Primern ein Fragment des *SIV_{mac239} gag*-Gens detektiert, ist eine sehr sensitive Methode, um die virale RNA-Kopien Anzahl zu bestimmen (Workenhe et al., 2008). Zudem werden im Falle der qRT-PCR im Gegensatz zum Infektiositäts-Tests auch defekte Viruspartikel detektiert, welche die Kapazität zur Infektion verloren haben (Richt et al., 2004). Dies könnte die hohe Anzahl detektierter Virus-RNA im Vergleich zum Virustiter erklären.

4.2 Die HIV-1-TAR-Region enthält miRNAs

Die „*trans-activating response*“ (TAR)-Region ist in der LTR („*long terminal repeat*“) der genomischen HIV-1 RNA kodiert (Bannwarth et al., 2005). Sie ist in allen mRNA-Transkripten des Genoms vorhanden.

Das HIV-1-*tat*-Protein bindet an die TAR-RNA und stimuliert dadurch die weitere Transkription (Karn, 1999; Peterlin and Price, 2006). 2008 wurden von Klase et al. in der HIV-1-TAR-Region zwei miRNA (hiv1-miR-TAR-5p und hiv-1-miR-TAR-3p) beschrieben (Klase et al., 2008). Auch in HIV-2 wurden in der TAR-Region zwei mögliche miRNAs postuliert (Purzycka et al., 2008). Da die TAR-Regionen von SIV_{mac239} und HIV-2 sowohl in der Struktur als auch in der Primärsequenz sehr ähnlich sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die SIV_{mac239} TAR ebenfalls für miRNAs kodiert.

4.2.1 *In silico* Analyse zeigt mögliche pre-miR-Struktur in SIV_{mac239} TAR an

Die *in silico* Analyse ist eine klassische Methode für die Vorhersage von miRNAs. Sie wird in der miRNA-Forschung häufig angewendet (Purzycka et al., 2008).

In dieser Arbeit wurden die RNA-Sekundärstrukturvorhersagen unter Verwendung des *Vienna RNA WebServers* (RNAfold) ermittelt. Hierbei werden drei Arten von dynamischen Programmieralgorithmen für die Struktur-Vorhersage verwendet: der Algorithmus zur Minimierung der freien Energie (Zucker und Stiegler, 1981), der Algorithmus zur Zustandssumme (McCaskill, 1990) und der Algorithmus zur suboptimalen Faltung (Wuchty et al., 1999).

Nach einer *in silico* Analyse des SIV_{mac239}-Genoms mit RNAfold (Hofacker et al., 2009) konnte ein Bereich der TAR-Region als mögliche pre-miRNAs identifiziert werden. Diese liegt in der TAR-Region zwischen den Basen 793 und 814. Diese Stem-Loop-Struktur könnte für eine miRNA mit einem „guide“ (Leit-) und einem „passenger“ (Passagier-Strang) kodieren.

Die möglichen miRNAs wurden als SIV-miR-86 und SIV-miR-87 benannt. Hierbei liegt die SIV-miR-86 5´ der Loop-Struktur und die SIV-miR-87 3´ des Loops der pre-miR Struktur (Abb. 4.2-1).

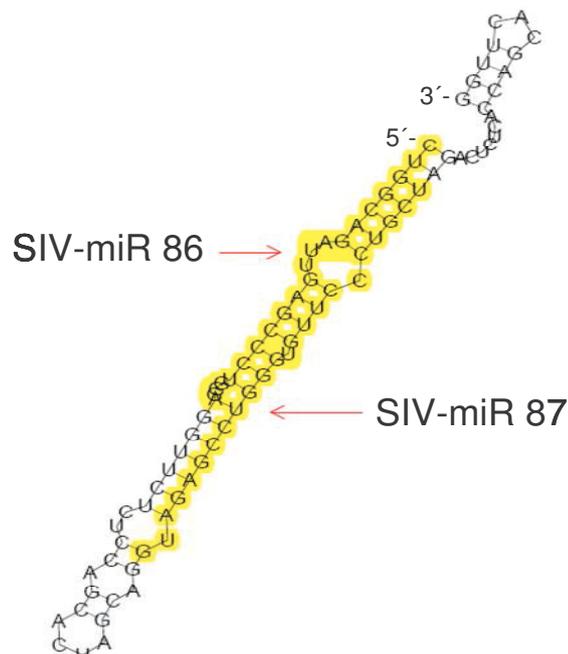


Abb. 4.2–1: Vorhergesagte pre-miRNA mit zwei möglichen miRNAs. Die hier abgebildete Stem-Loop-Struktur liegt in der TAR-Region des Genoms (SIV_{mac239} Genom 793 bis 814). Auf beiden Seiten des Stammes könnten miRNAs kodiert sein, diese werden nachfolgend als SIV-miR-86 und SIV-miR-87 bezeichnet (gelb unterlegt).

4.2.2 Bestimmung einer internen Kontrolle

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der vorhergesagten miRNAs -86 und -87 wurde eine interne Kontrolle zur Normalisierung („housekeeping“ miRNA) benötigt. Ein möglicher Kandidat war die hsa-miR-16, welche bei einer Infektion mit HIV-1 keine Regulation im Northern Blot zeigte (Ouellet et al., 2008). Im microRNA-Microarray wurde daher zunächst ein Screening von nicht infizierten und SIV-infizierten C8166-Zellen an dpi 7 durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die hsa-miR-16 stark exprimiert und unter einer SIV-Infektion nicht reguliert war (Orlik, 2009). Das Ergebnis der qRT-PCR zeigte, dass die Expression von hsa-miR-16 sowohl mit dem Poly-Adenylierungs-Assay als auch mit dem Stem-Loop-Assay im Verlauf einer SIV-Infektion keinen starken Schwankungen unterliegt (Abb. 4.2-2). Als Negativkontrolle dienten die jeweiligen parallel mitgeführten -RT-Proben. Hierbei zeichnete sich der Poly-Adenylierungs-Assay durch eine Adenylierung der in der Probe befindlichen RNA aus. Bei der anschließenden cDNA-Synthese wurde ein universeller (dT)-RT-Primer verwendet, welcher an den Poly-A-Schwanz bindet. Bei der anschließenden qRT-PCR

wird die miRNA dann mittels eines spezifischen forwards und eines universellen reverse-Primers detektiert.

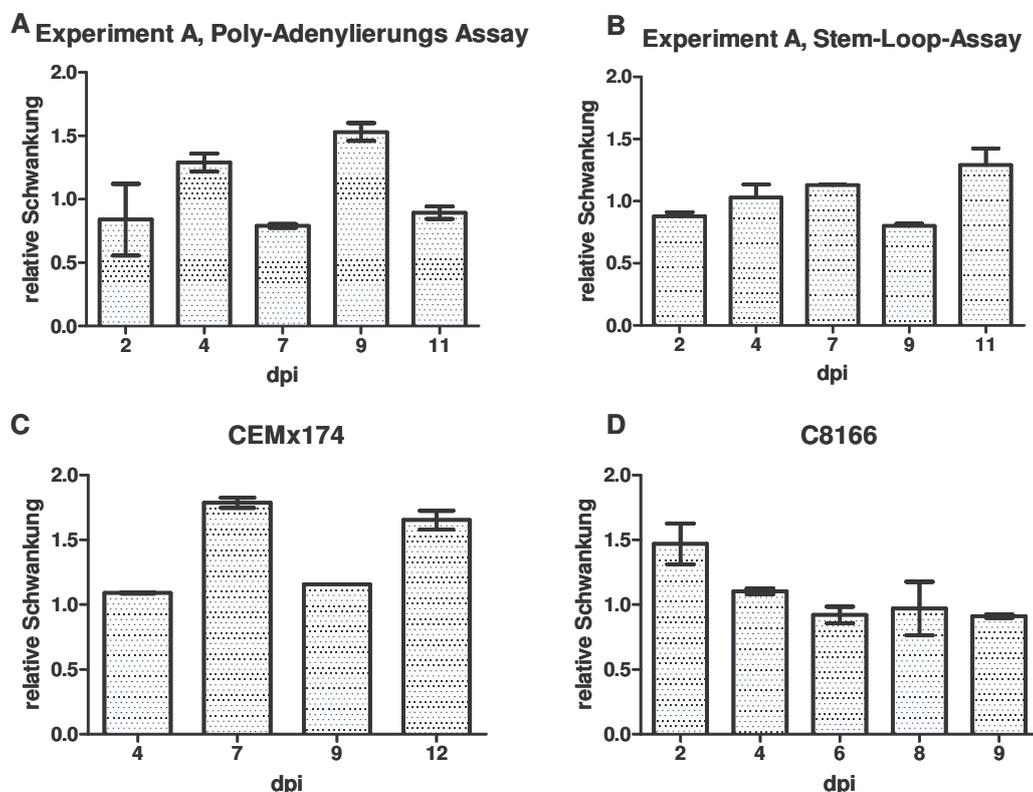


Abb. 4.2–2: Validierung der hsa-miR-16 als "housekeeping" miRNA in verschiedenen Experimenten. C8166 (A, D) und CEMx174 (B, C) Zellen wurden in je zwei unabhängigen Experimenten mit SIV_{mac239} (MOI 0,01) infiziert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Zellaliquots wurden an verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse; dpi) entnommen. Anschließend wurde miRNA aus den Zellen isoliert. Die Expression der hsa-miR-16 wurde in Duplikaten mittels Poly-Adenylierungs-Assays (A, B; Fu et al., 2006) und/oder Stem-Loop-Assays (C, D; Chen et al., 2005) in spezifischen qRT-PCRs detektiert. Die relative Schwankung der Expression wurde anhand der C_T-Werte der qRT-PCR ermittelt.

Zur Kontrolle der qRT-PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt. Hierbei konnten sowohl die korrekte Größe des Amplifikationproduktes als auch die Spezifität der Primer überprüft werden (Abb. 4.2-3). Die aufgetrennten Proben wurden in einer Endpunktbestimmung nach 45 PCR-Zyklen aufgetragen. Abbildung 4.2.2-2 zeigt, dass die erwartete Produktgröße im Poly-Adenylierungs-Assay von 87 bp in den SIV_{mac239} infizierten sowie in den uninfizierten Proben detektierbar ist. Die –RT– Kontrolle zeigt einen undefinierte Bande, diese liegt jedoch über dem zu erwarteten Produkt.

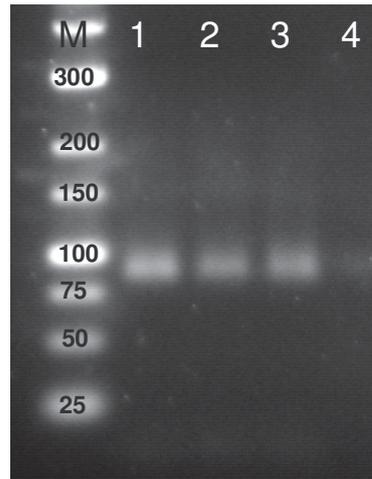


Abb. 4.2–3: Größenauftrennung der amplifizierten hsa-miR-16.PCR-Produkte aus SIV_{mac239} -infizierten (1), uninfizierten (2) C8166-Zellen 7 dpi und SIV_{mac239} -infizierten CEMx174-Zellen an dpi 9 (3). Die Amplifikation erfolgte in einer qRT-PCR mittels des Poly-Adenylierungs-Assays. Als Kontrolle dienten –RT Kontrollen von infizierten C8166-Zellen (4). Die Auftrennung wurde in einem 2%igem Metaphor-Agarosegel durchgeführt. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde der „Low Range“-Größenmarker (M) aufgetragen.

Die Stetigkeit der „*housekeeping*“-Eigenschaften der hsa-miR-16 wurde in jedem Experiment untersucht, wobei sich maximale Schwankungen von einem bis zwei C_T s zwischen den SIV -infizierten und den uninfizierten Proben zeigen. Diese Schwankungsbreite wurde als Hintergrund definiert. Im Folgenden wurde die hsa-miR-16 zur Normalisierung der detektierten miRNAs verwendet.

4.2.3 Die SIV -miR-86 und -87 konnte in SIV_{mac239} infizierten C8166 nachgewiesen werden

Um die möglichen miRNA in der SIV_{mac239} TAR-Region, SIV -miR-86 und SIV -miR-87, zu identifizieren, wurden zunächst in SIV_{mac239} -infizierten C8166 am neunten Tag nach der Infektion (dpi 9) untersucht. Als Kontrolle wurden uninfizierte Zellen parallel mitgeführt. In der nachfolgenden qRT-PCR wurden die SIV -miRs 86 und 87 mit spezifischen forward-Primern und einem universellen reverse-Primer amplifiziert. Jedoch ist zu beachten, dass sich neben der untersuchten miRNA eine permanente, lineare Amplifikation bedingt durch den universellen reverse-Primer nicht verhindern lässt, sodass eine Quantifizierung nur bedingt möglich ist. Die relative Expression wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode errechnet, die Normalisierung erfolgte mittels der parallel mitgeführten hsa-miR-16. Zur Kontrolle wurden –RT-Proben

mitgeführt, diese zeigten in keinem der Experimente eine Amplifikation. Beide miRNAs konnten an dpi 9 erfolgreich spezifisch amplifiziert werden. Zudem zeigte sich eine unterschiedliche Stärke in der Expression (Abb. 4.2-4). Daher wurde im nächsten Schritt die Kinetik der Regulation in SIV_{mac239}-Experimenten untersucht.

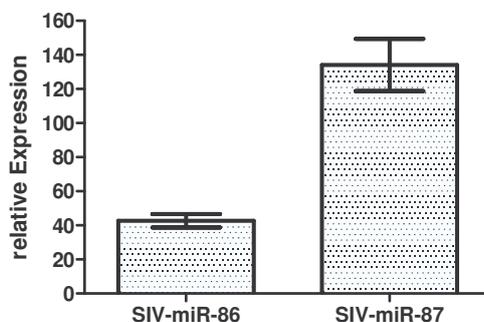


Abb. 4.2.-4: Nachweis der vorhergesagten SIV-miR-86 und SIV-miR-87 in SIV_{mac239} infizierten C8166-Zellen. Nach der Infektion von C8166 Zellen wurde an dpi 9 miRNA aus infizierten und uninfizierten Zellen isoliert. Die Detektion der möglichen miRNAs erfolgte mittels des Poly-Adenylierungs-Assays. Mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde die relative Expression bestimmt. Zur Normalisierung wurde die parallel mitgeführte hsa-miR-16 verwendet.

4.2.4 Kinetik der SIV-miR-86 und der SIV-miR-87 in SIV_{mac239} Infektions-Experimenten von C8166 Zellen

Zur Bestimmung des Expressionsprofils von SIV-miR-86 und-87 im Verlauf der Infektion wurden diese in zwei unabhängigen Experimenten mit Hilfe des Poly-Adenylierungs-Assays in der qRT-PCR untersucht. In beiden Experimenten wurden die Expressionen beider miRNAs im Verlauf einer SIV_{mac239}-Infektion von C8166-Zellen detektiert. Hierbei zeigte sich, dass die beiden miRNAs ein ähnliches Expressionsprofil aufweisen. In dem in Abb. 4.2-5 A gezeigten Experiment steigt die Expression sowohl der SIV-miR-86 als auch der SIV-miR-87 von dpi 2 bis dpi 9 stark an und fällt ab dpi 11 wieder ab. Im zweiten Experiment (Abb. 4.2-5 B) wurden noch zwei zusätzliche Zeitpunkte (dpi 6 und 8) gewählt, um den Anstieg der Expression zwischen Tag 4 und Tag 9 nach der Infektion (dpi 4 – 9) genauer zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. –RT-Proben wurden zur Kontrolle parallel mitgeführt und zeigten eine Amplifikation bei $C_T > 40$, welche als Hintergrund festgesetzt wurde. In der Abbildung sind die relativen Expressionen gezeigt. Die Kinetik und die Virusreplikation

der jeweiligen SIV_{mac239}-Infektionen sind zum Vergleich dargestellt, diese wurden mittels qRT-PCR (Viruskopien/mL, Kap. 3.10.1) ermittelt. Die Expression der SIV-miR-86 und SIV-miR-87 folgen im Weitesten der Virusreplikation in C8166 Zellen.

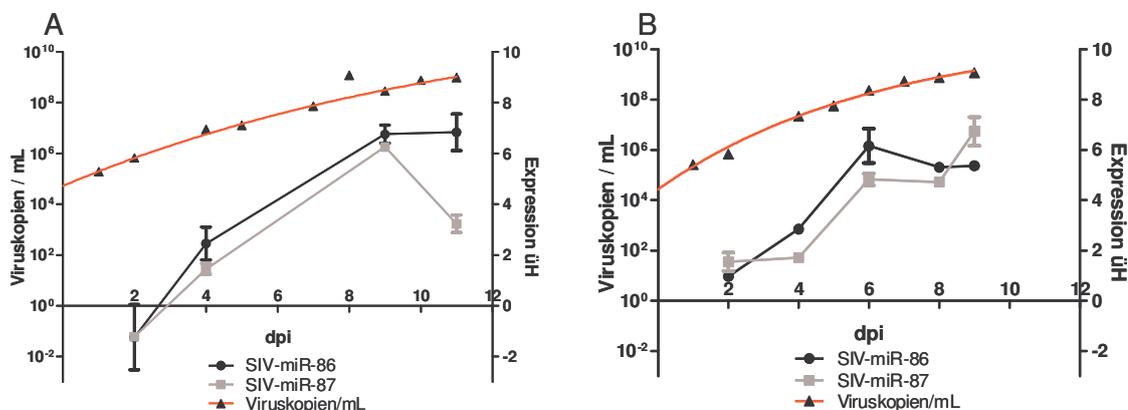


Abb.4.2-5: Expressionsprofil von SIV-miR-86 und -87 in SIV_{mac239}-infizierten C8166-Zellen.

Für das Experiment wurden C8166-Zellen mit einer MOI von 0,01 mit SIV_{mac239} infiziert, parallel wurden uninfizierte Zellen gleich behandelt. Die Zellen wurden kontinuierlich alle 2-3 Tage passagiert und zur Isolation von miRNA entnommen. Die Expression über dem Hintergrund (üH) der SIV-miR-86 (schwarz) und der SIV-miR-87 (grau) wurde im Zeitverlauf mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode analysiert (rechte y-Achse). Der Verlauf der Virusreplikation der jeweiligen Experimente ist ebenfalls dargestellt (rot, linke y-Achse).

4.2.4.1 Das Agarosegel zeigt spezifische Banden bei 80 bp und 115 bp in SIV-infizierten Proben

Die Produkte der durchgeführten qRT-PCR wurden anschließend auf einem 2%igen MetaPhor-Agarosegel aufgetrennt. Eine definierte Band war aufgrund der Polyadenylierung nicht zu erwarten. Es zeigten sich je zwei Amplifikationsprodukte, ein größeres von ca. 115 bp und ein kleineres von ca. 80 bp. (Abb. 4.2-6). Im Falle der SIV-miR-86 waren beide Produkte ab dpi 2 detektierbar (Abb. 4.2-6 oben). Das 115 bp große Produkt verschwand im Laufe der Infektion, sodass ab dpi 8 nur das kleinere 80 bp Amplifikat detektierbar war.

Auch nach der Amplifikation der SIV-miR-87 (Abb. 4.2.-6 unten) wurden zwei Produkte aufgetrennt. Im Gegensatz zu SIV-miR-86 konnten diese jedoch erst ab dem 6. Tag nach der Infektion (dpi 6) detektiert werden, beide konnten bis dpi 9 nachgewiesen werden.

Alle uninfizierten Proben zeigten keine Banden in dieser Größe.

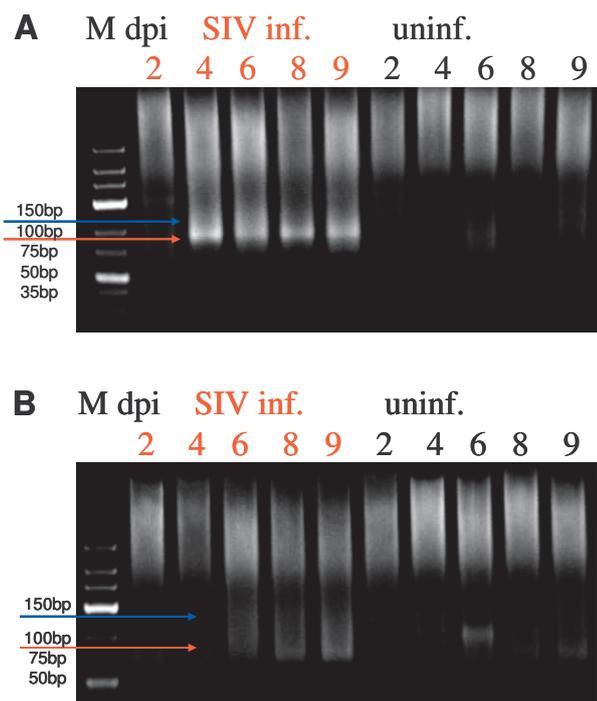


Abb. 4.2 – 6: Auftrennung der qRT-PCR Amplifikationsprodukte des Poly-Adenylierungs-Assays. Unter Verwendung der SIV-miR-86- (A) und der SIV-miR-87- (B) Primers wurden sowohl der SIV-infizierten (SIV inf., rot) als auch der uninfizierten (uninf., schwarz) Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (2,4,6,8,9 dpi) mittels eines 2%igen MetaPhor-Agarosegels aufgetrennt. Als Größenmarker diente der Ultra-Low-Range-Marker. Es wurden zwei Produkte (größeres Produkt, blauer Pfeil; kleineres Produkt, roter Pfeil) detektiert. Diese wurden aus dem Gel eluiert, kloniert und anschließend sequenziert.

4.2.4.2 Die Sequenzierung zeigte die beiden Produkte der Amplifikation

Nachdem die PCR-Produkte aus dem Gel eluiert wurden, wurden die Amplifikationsprodukte von der SIV-miR-86 PCR in den Vektor pGEM-T-easy kloniert und anschließend sequenziert. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass das größere Produkt mit ca. 115 bp der vorhergesagten pre-miRNA entspricht, welche die beiden möglichen SIV-miRNAs enthält (Abbildung 4.2-7) stellt die Sequenzierungen der Banden dar, die Sequenzen wurden in unabhängigen Klonen nachgewiesen. Beide Produkte zeigen neben den Primern Basen des SIV_{mac239}-Genoms.

SIV_{mac239} (785–890 Base)
 CCGAGAGG CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGCCCGGTGCTGGGCA
 43972 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGAAAAA
 43980 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGAAAAA
 43979 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTAAAAA
 Primer SIV-miR-86 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAG

SIV_{mac239} (785–890 Base)
 CCGAGAGG CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGCCCGGTGCTGGGCA
 43976 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGCCCGGTGCTGGGCA
 43975 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCCCTGCTAGACTCTCACCAGCACCTTGGAAAAA
 43977 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGGTGTTAAAAA
 Primer SIV-miR-86 CTGGCAGATTGAGCCCTGGGAG

Abb. 4.2–7: Das Sequenzierergebnis zeigt die erwartete pre-miRNA und ein Fragment.

Um die SIV-miR-TAR nachzuweisen, wurde aus SIV_{mac239} infizierten und uninfizierten Zellen miRNA isoliert und mittels spezifischer Primer (SIV-miR-86: rot) für die jeweilige miRNA unter Verwendung des Poly-Adnylierungs-Assay in der qRT-PCR detektiert. Die *in silico* vorhergesagten miRNAs SIV-miR-86 und SIV-miR-87 wurden gelb unterlegt. Die Sequenzierungen der 85bp-Bande (A) entspricht der vorhergesagten TAR pre-miRNA. Das Ergebnis der Sequenzierung der 70 bp Bande (B) zeigte hingegen die SIV-miR-86 mit einem unerwarteten 3'Ende. Der synthetisierte Poly-A-Schwanz ist in grün dargestellt. Die in schwarz dargestellten Basen sind alle identisch zum SIV_{mac239}- Genom.

Die Sequenz der 80 bp Bande entspricht nicht der *in silico* vorhergesagten miRNA (Abb. 4.2-8A). Die amplifizierte Sequenz endet innerhalb der vorhergesagten Loop-Struktur, was nicht für eine miRNA spricht. Somit wurde eine erneute *in silico*-Analyse des nun sequenzierten 80 bp Amplikons mit ca. 14-18 Basen up und downstream des SIV_{mac239}-Genoms (Basen 773 bis 845) mittels *RNAfold* durchgeführt (Abb. 4.2.-8 B).

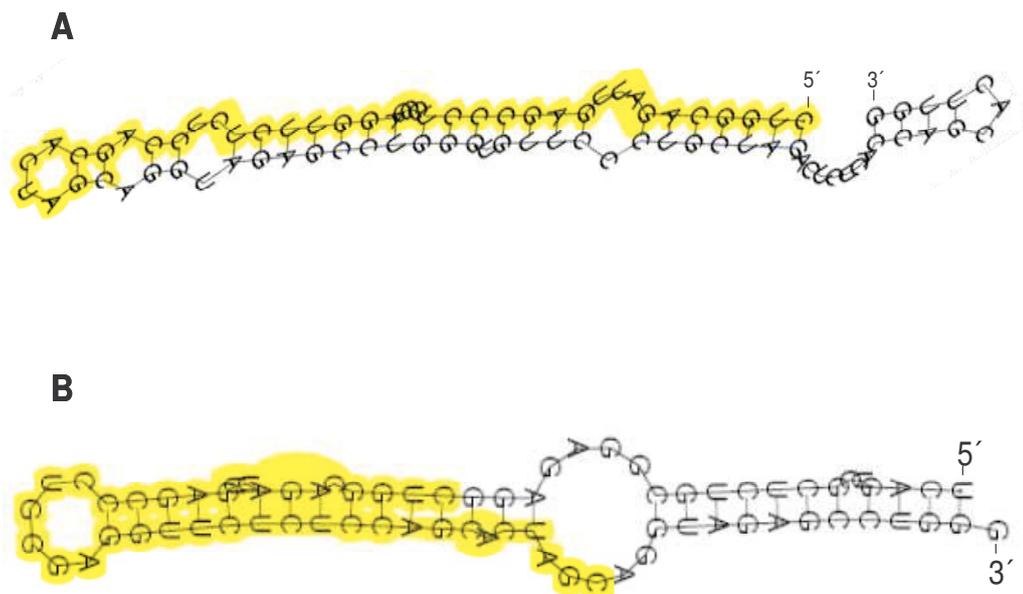


Abb. 4.2–8: Mögliche Sekundärstruktur der sequenzierten 80bp Probe. **A** zeigt die zuvor vorhergesagte Struktur der möglichen pre-miRNA. Eine erneute *in silico*-Analyse des sequenzierten Bereiches mit 14-18 Basen up und downstream des SIV_{mac239}-Genomes (Base 773-845) mittels *RNAfold* ist in **B** gezeigt. Die sequenzierten Basen sind gelb unterlegt.

Die durchgeführte *in silico*-Analyse lässt vermuten, dass das mittels dem SIV-miR-86 Primer amplifizierte, 80 bp große Produkt der Sequenz einer pre-miRNA entspricht. Demzufolge würde das sequenzierte Ende des Produktes dem 3'-Ende einer SIV-miR-TAR-3p entsprechen.

Hingegen zeigen das 115 bp große Amplifikationsprodukt neben der pre-miRNA noch zusätzliche Basen. Diese Struktur könnte ein noch unprozessiertes RNA-Fragment darstellen.

4.2.5 Identifizierung der SIV-miR-TAR-5p

Durch die Sequenzierung der SIV-miR-86 qRT-PCR-Produkte wurde das mögliche 3'-Ende der SIV-miR-TAR-3p aufgezeigt. Nun sollte untersucht werden, ob im 5p-Bereich der Haarnadelstruktur ebenfalls eine miRNA kodiert ist. Hierfür wurden entsprechende Primer designt. Der erste Primer endet 11 Basen hinter dem 3'-Ende des SIV-miR-86-Primers und wurde SIV-miR-86-11 (schwarz) genannt. Die darauffolgenden Primer liegen weiter upstream hinter dem SIV-miR-86-11-Primer und wurden dementsprechend -13 (magenta), -15 (blau) und -17 (rot) genannt (Abb. 4.2-9). Die 3'-Enden wurden in der Abbildung durch farblich gekennzeichnete Pfeile markiert.

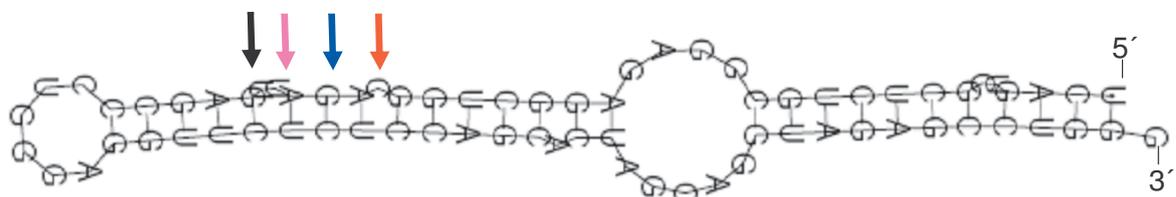


Abb. 4.2–9: Verwendete Primer zum Nachweis der SIV-miR-TAR-5p. Es wurden Primer designt, welche im Abstand von 2 Basen 5' des vorhergesagten Endes der SIV-miR-TAR-5p liegen. Die 3'-Enden der Primer wurde durch Pfeile gekennzeichnet (SIV-miR-86-11 schwarz); SIV-miR-86-13 (magenta); SIV-miR-86-15 (blau); SIV-miR-86-17 (rot)).

Nach dem Designen der Primer wurden diese, im Vergleich mit den SIV-miR-86 Primer zur Detektion der pre-miR, im Poly-Adenylierungs-Assay verwendet. Hierzu wurde zunächst Tag 7 und anschließend an Tag 9 einer SIV_{mac239}-Infektion von C8166 Zellen verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abbildung 4.2-10 A (Tag 7) und B (Tag 9) gezeigt. Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Zur Normalisierung wurde die hsa-miR-16 verwendet. Zur Kontrolle wurden –RT-Proben parallel mitgeführt, diese zeigten C_T -Werte von >37 und beeinflussten somit die Ergebnisse nicht. Es zeigte sich, dass die relative Expression der SIV-miR-86 unter der Verwendung der Primer SIV-miR-86 und SIV-miR-87 am stärksten war. Jedoch konnten mit den upstream liegende Primer SIV-miR-86-11, SIV-miR-86-13, SIV-miR-86-15 und SIV-miR-86-17 ebenfalls relative Expressionen von über 50 detektiert werden. Hierbei zeigte der Primer SIV-miR-86-13 die höchste Expression. Zur Überprüfung der qRT-PCR wurden die Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Auftrennung der PCR-Produkte von dpi 9 ist in Abbildung 4.5-10 C gezeigt. Die SIV-Proben zeigen jeweils das gleiche Bandenmuster in unterschiedlicher Intensität.

Sowohl bei der Verwendung des SIV-miR-86-17-Primers als auch des SIV-miR-86-13-Primers und des SIV-miR-86-11-Primers sind je eine Bande bei 200 und 150 bp detektierbar. Die Proben der uninfizierten Zellen zeigten keine entsprechenden Banden dieser Größe. Die 150bp-Bande wurde aus dem Gel eluiert und in den pGEM-T easy Vektor kloniert.

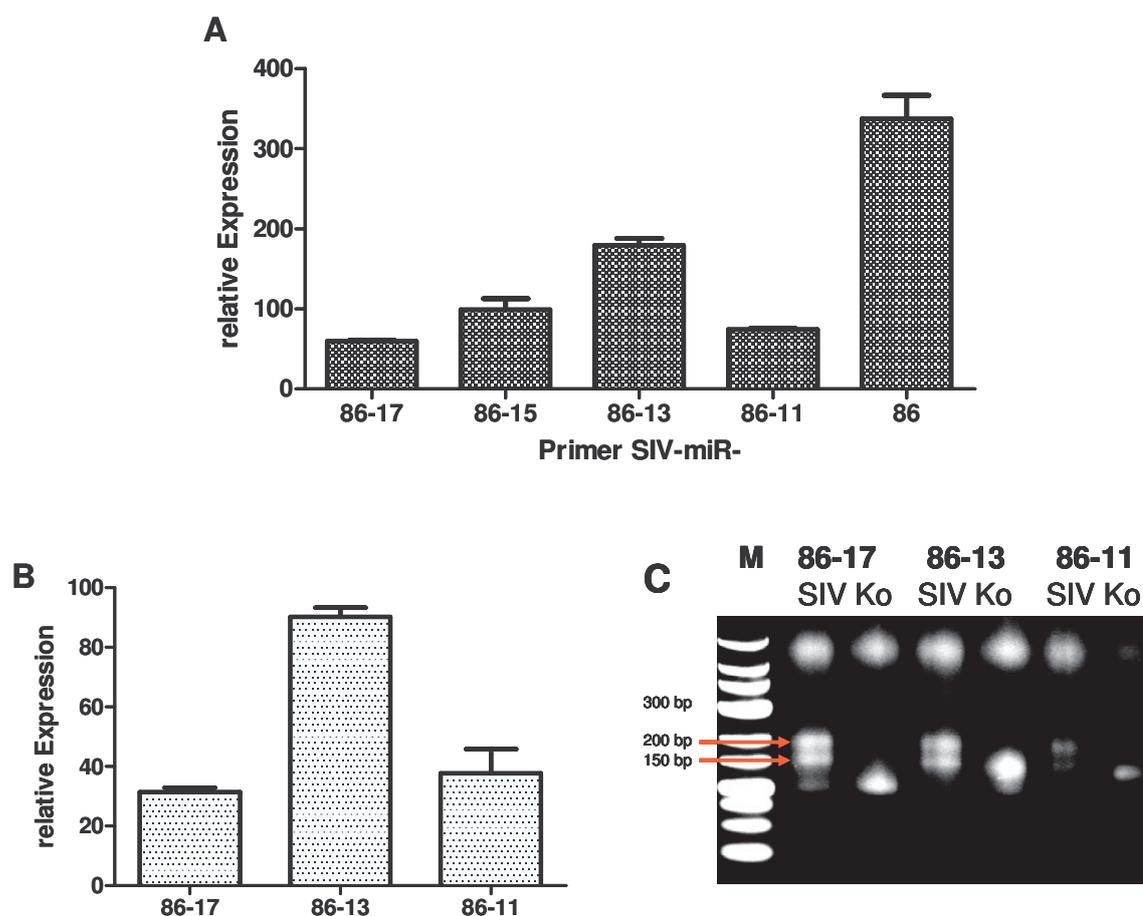


Abb. 4.2–10: qRT-PCR Ergebnisse und Auftrennung der Produkte der Primer SIV-miR-86-11, SIV-miR-86-13 und SIV-miR-86-17. Die Spezifität der Primer SIV-miR-86-11, SIV-miR-86-13 und SIV-miR-86-17 wurden in einem Experiment an zwei verschiedenen Tagen nach Infektion mittels einer qRT-PCR überprüft. Als Kontrolle dienten parallel mitgeführte –RT-Proben. In den Abbildungen A (dpi 7) und B (dpi 9) wurden die relative Expression der qRT-PCR gegen die jeweiligen Primer aufgetragen. Die Produkte dieser wurde auf einem 2%igen Metaphor-Agarosegel aufgetrennt (C). Als Größenmarker diente der Low-Range-Marker von Fermentas. Die anschließend detektierten Produkte wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Abbildung 4.2-11 abgebildet. Die in schwarz dargestellten Basen zeigen das detektierte SIV_{mac239}-Genom, welches in keinem der hier verwendeten Primer vorkommt. Das 150 bp große

Amplifikationsprodukt des SIV-miR-86-11 forward-Primers zeigt kein definiertes 3'-Ende auf. Hingegen wurde entweder die pre-miRNA oder einen ungerichteter Abbruch detektiert.

<p>A</p>	<p>SIV_{mac239}-Genom (773 - 845 Basen) 48510 48511 48512 48513 48514 48447 48452 SIV-miR-86-11</p>	<p>TCAGTCGCTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGG TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAAAAAACAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGGAAAAAAAAAAAA TGCGGAGAGGCTGGCAGATTG</p>
<p>B</p>	<p>SIV_{mac239}-Genom (773 - 845 Basen) 48515 48516 48517 48518 48519 SIV-miR-86-13</p>	<p>TCAGTCGCTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGG CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGAT</p>
<p>C</p>	<p>SIV_{mac239}-Genom (773 - 845 Basen) 48506 48507 48508 48509 SIV-miR-86-17</p>	<p>TCAGTCGCTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGAGCCTGG TCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CTCTGCGGAGAGGCTGGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CGCTCTGCGGAGAGGCTGGC</p>

Abb. 4.2–11: Sequenzen des 150 bp Produktes aus dem Poly-Adenylierungs-Assay zum Nachweis der SIV-miR-TAR-5p. Produkte der Primer SIV-miR-86-17 (C, rot), SIV-miR-86-13 (B, magenta), und SIV-miR-86-11 (A, orange) wurden in den pGEM-T-easy Vektor kloniert und sequenziert. Der Sequenzvergleich zeigt, dass mit den Primern SIV-miR86-13 und -17 die mature Form der SIV-miR-TAR-5p amplifiziert wurde. Die vorhergesagte SIV-miR-TAR-5' wurde gelb unterlegt.

Im Gegensatz dazu entsprechen die generierten Produkte der Primer SIV-miR-86-13 und SIV-miR-86-17 dem erwarteten Produkt und bestätigen somit das 3'-Ende der miRNA TAR-5p. Hiernach endet die SIV-miR-TAR-5p mit AGAT an der Base 802 im SIV_{mac239}-Genom.

4.2.6 Detektion der SIV-miR-TAR-5p mittels Stem-Loop PCR Assay

Da eine Quantifizierung mittels des Poly-Adenylierungs-Assays aufgrund des Nebenproduktes nicht möglich war, wurde in dieser Arbeit ein zweiter spezifischerer Assay verwendet. Der Stem-Loop-Assay (Chen et al., 2005) hat gegenüber dem zuvor verwendeten Poly-Adenylierungs-Assay den Vorteil, dass nur die spezifische mature miRNA in cDNA umgeschrieben wird und somit auch nur diese in der qRT-PCR amplifiziert wird. Mit Hilfe der in Kapitel 4.2.5 durchgeführten Analysen konnte das 3'-

Ende der miRNA der vorhergesagten SIV-miR-TAR-5p bestätigt werden, welches als Ausgangspunkt zum Design spezifischer Primer verwendet wurde.

Zur Überprüfung der Spezifität des Loop Assays wurden einige Kontrollexperimente mit infizierten, nicht-infizierten und -RT Proben durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2-12 gezeigt. Hierbei liegen die C_T -Werte der -RT-Kontrollen über dem definierten Detektionslimit von 37. Der C_T -Wert der uninfizierten Probe liegt mit 34,4 ebenfalls nahe dem Hintergrundrauschen. Einzig die SIV-infizierte Probe liegt mit einem C_T -Wert von 24,5 deutlich im detektierbaren und quantifizierbaren Bereich.

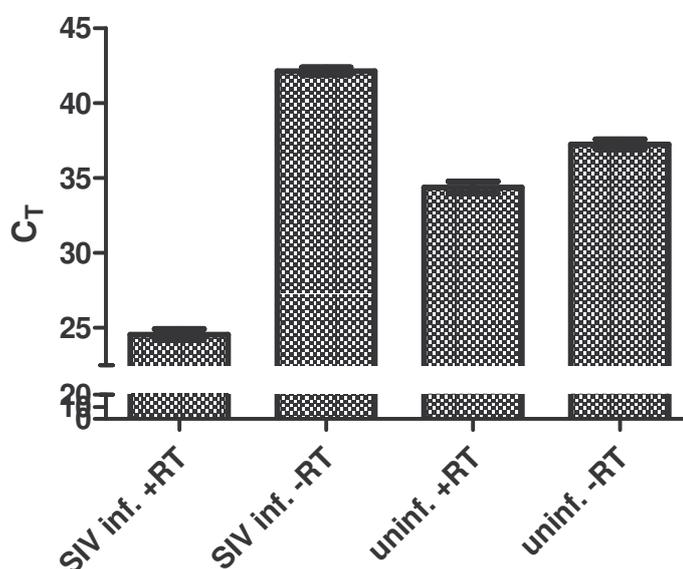


Abb. 4.2–12: Spezifität des Stem-Loop-Assays zum Nachweis von SIV-miR-TAR-5p. Zur Überprüfung des Assays wurde aus SIV_{mac239}⁻ (SIV inf.) und uninfizierten (uninf.) C8166 Zellen miRNA isoliert und in cDNA ungeschrieben. Zur Kontrolle wurden –RT-Proben (-RT) generiert. Anschließend wurde die Spezifität mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind die C_T -Werte der Proben.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des Stem-Loop Assays eine spezifische Amplifikation von SIV-miR-TAR-5p durchgeführt werden kann.

4.2.7 Kinetik der SIV-miR-TAR-5p in SIV_{mac239} Infektions-Experimenten von C8166 Zellen

Nach der Identifizierung der SIV-miR-TAR-5p und der Etablierung eines sensitiven und spezifischen Nachweissystems sollte die Expression im Verlauf eines

Infektionsexperimentes untersucht werden (Abb. 4.2-13). Hierfür wurden dieselben Proben, in welchen zuvor die SIV-miR-TAR-5p im Poly-Adenylierungs-Assay nachgewiesen wurde, verwendet. Im Zeitverlauf zeigte sich, dass die Expression der SIV-miR-TAR-5p zunächst bis zu Tag 7 und 8 nach der Infektion im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen ansteigt, anschließend nimmt die Expression an dpi 9 wieder ab. Somit folgt die Expression der SIV-miR-TAR-5p nicht der Virusreplikation bzw. der gag-Expression. Dies deutet auf eine Funktion der SIV-miR-TAR-5p in der späten Phase der Infektion ab dpi 7 hin, welche unabhängig von der Virusreplikation ist.

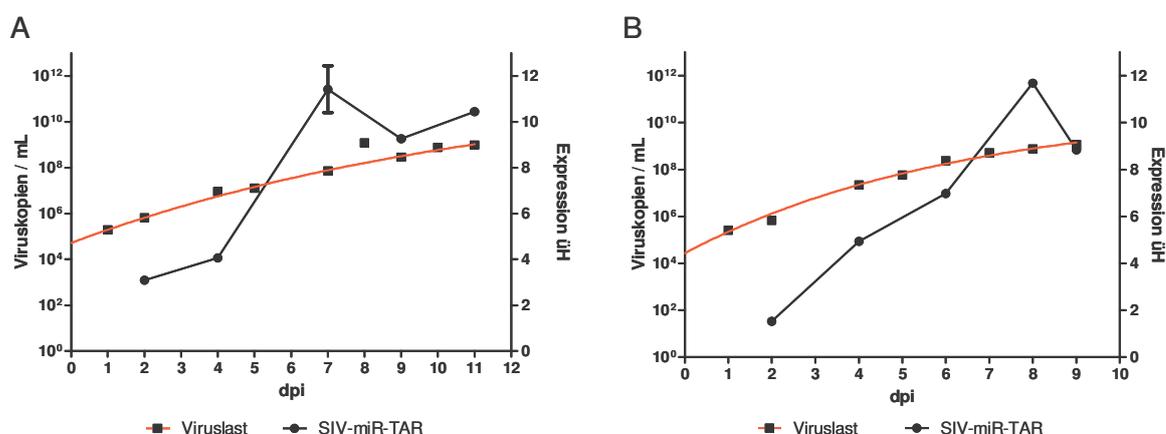


Abb. 4.2–4: Expression der SIV-miR-TAR-5p im SIV_{mac239} Infektionsexperiment. Aus infizierten und nicht infizierten C8166-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (dpi, *days post infection*, x-Achse) miRNA isoliert. Der Verlauf der Expression der SIV-miR-TAR-5p wurde im Stem-Loop-Assay in zwei unabhängigen Experimenten (A, B, linke y-Achse) nachgewiesen. Zum Vergleich wurden die detektierten Viruskopien pro mL Zellkulturüberstand mit dargestellt (rechte y-Achse).

4.3 Funktionelle Analyse der SIV-miR-TAR und der HIV-miR-TAR

4.3.1 Insertion der pre-miRNAs der SIV-miR-TAR und der HIV-miR-TAR

Um die Funktion der SIV-miR-TAR genauer zu untersuchen, wurde die pre-miRNA sowohl in der T-Zelllinie C8166 sowie in der B/T-Zelllinie CEMx174 überexprimiert. Zur Expression der miRNAs HIV-miR-TAR und SIV-miR-TAR wurden in beide Zelllinien (C8166, CEMx174) die jeweiligen pre-miRNAs mittels eines lentiviralen Vektorkonstruktes transduziert. Zur Kontrolle wurden parallel Zellen mit der publizierten pre-HIV-miR-TAR von HIV-1 (Klase et al. 2009) sowie mit einem Leervektor

transduziert. Die erfolgreiche Transduktion und die ektoische Expression der pre-miRNAs wurden anschließend über qRT-PCR nachgewiesen (Abb. 4.3-1). Zur Normalisierung wurde GAPDH mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten –RT-Kontrollen und die generierten Leer-Zellen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe der für die Transduktion verwendeten Plasmide (pBabe-SIV-TAR, pBabe-HIV-TAR) mitgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Insertion der pre-miRNAs SIVTAR und HIVTAR erfolgreich war (Abb. 4.3.1). Hierbei konnten Unterschiede in der Überexpression der verschiedenen pre-miRNAs in den beiden Zelllinien detektiert werden.

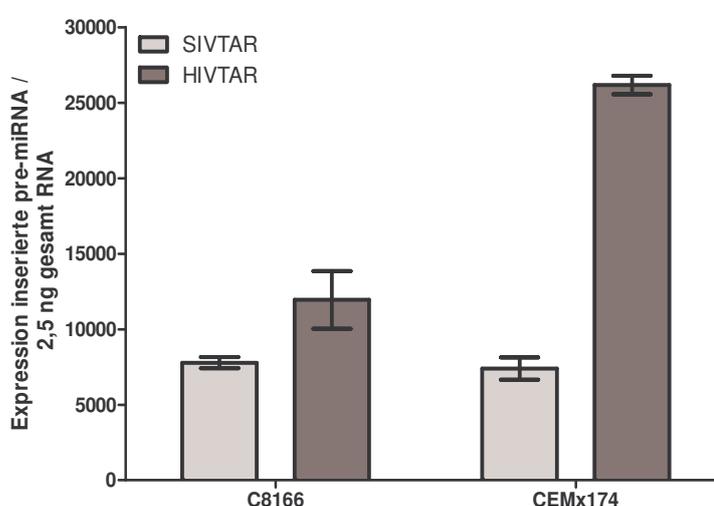


Abb. 4.3–1: Ektopische Expression der pre-SIV-miR-TAR (SIVTAR) und pre-HIV-miR-TAR (HIVTAR). Nach der Transduktion der T-Zelllinie C8166 und der B/T Zelllinie CEMx174 wurde die Expression der integrierten pre-miRNAs mittels qRT-PCR bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Standardreihen. Es wurde jeweils 2,5 ng gesamt RNA eingesetzt.

Auch wurde gezeigt, dass die Expression der pre-HIV-miR-TAR (19055,38 +/-7106,95) im Vergleich zu der pre-SIV-miR-TAR (7582,18 +/-192,38) höher war. Zudem zeigt die B/T-Zelllinie CEMx174 eine doppelt hohe Expression (26162,33) der pre-HIV-miR-TAR im Vergleich zu der T-Zelllinie C8166 (11948,43). Diese Unterschiede sind möglicherweise durch zellspezifische Eigenschaften bedingt. Die Expression der pre-SIV-miR-TAR liegt in beiden Zelllinien jedoch bei ca. 7500 Kopien pro 2,5 ng gesamt RNA.

Alle Transduktionen erfolgten parallel unter den gleichen Bedingungen. Die detektierten Unterschiede in der Expression sind durch Varianzen der Effizienzen der Aufreinigung sowie der Transduktion und/oder durch Sequenz bedingte Unterschiede

erklärbar. Da die Insertion unspezifisch erfolgt, ist es auch möglich, dass die pre-HIV-miR-TAR im Gegensatz zur pre-SIV-miR-TAR in stärker exprimierten Genen inseriert hat, dies sollte aufgrund der ungerichteten Insertion jedoch ausgleichen sein. Auch könnten die unterschiedlichen pre-miRNAs (SIV-miR-TAR und HIV-miR-TAR) unterschiedlich prozessiert werden.

4.3.2 Infektion der SIV- und HIV-miR-TAR transgenen Zelllinien mit SIV_{mac239}

Eine Infektion der transgenen Zellen mit SIV_{mac239} wurde zur Untersuchung des Einflusses der miRNAs SIV-TAR und HIV-TAR auf die Infektiosität und die Virusreplikation durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.5 geschrieben mit einer MOI von 0,01 mit SIV_{mac239} infiziert. Die Passagierung erfolgte nach Protokoll alle 2-3 Tage. Um die Virusreplikation besser beurteilen zu können, wurden die Infektionsexperimente mit und ohne Zugabe uninfizierter Zellen durchgeführt.

Zur Isolation des Virusgenoms wurde an verschiedenen Zeitpunkten Zellkulturüberstand entnommen (days post infection, dpi). Die virale RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels gag-spezifischer Primer wurden unter Verwendung der qRT-PCR die Viruskopien/mL bestimmt. Zur Quantifizierung wurde parallel eine gag-Plasmid-Standardreihe mitgeführt (Abb. 4.3-2). Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Virus-Replikationen in den verschiedenen transgenen Zelllinien. Hierbei konnten weder in den transgenen Zelllinien C8166-SIVTAR, C8166-HIVTAR im Vergleich zu C8166-pBabe leer (Transduktion ohne inserierte Target Sequenz) noch in den Zelllinien CEMx174-SIVTAR, CEMx174-HIVTAR im Gegensatz zur der Kontrollzelllinie CEMx174 pBabe leer Unterschiede in der Virusreplikation festgestellt werden.

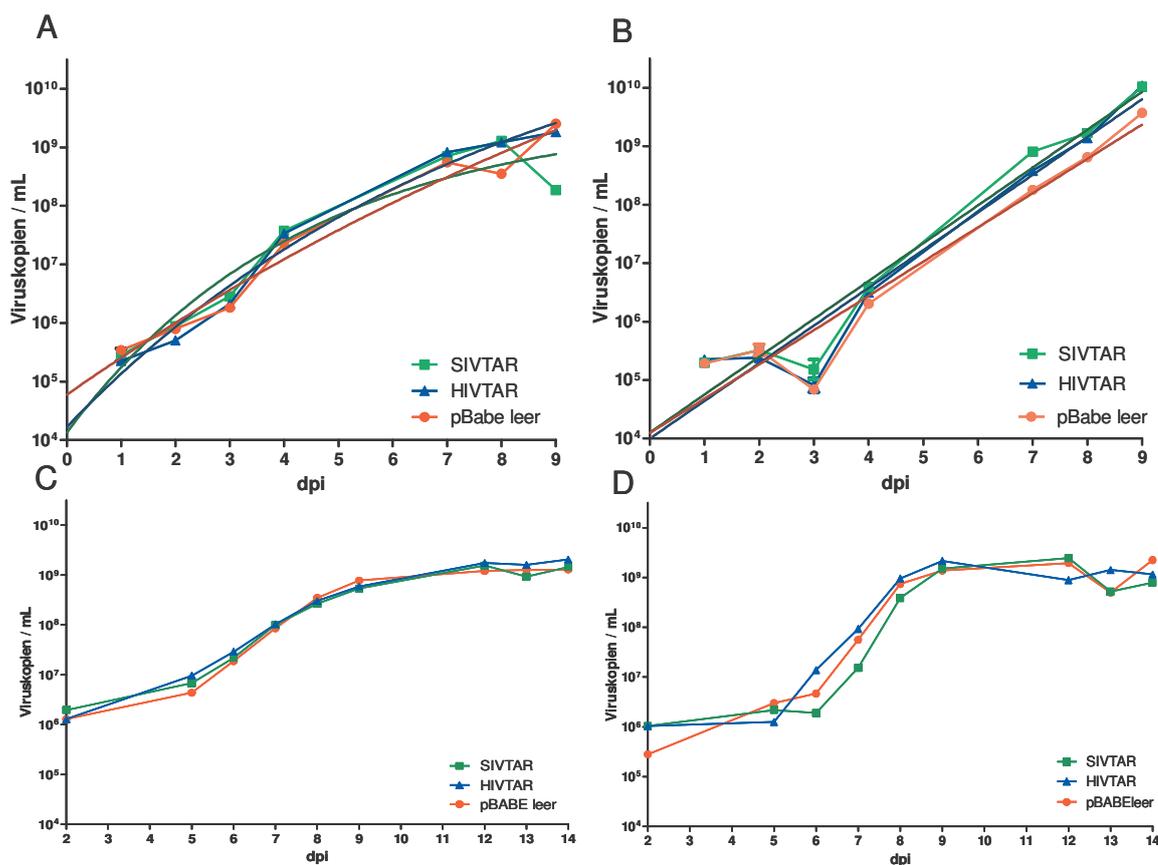


Abb. 4.3–2: SIV_{mac239} Replikation in transgenen Zelllinien. Die Zelllinien C8166 und CEMx174 wurden mit einem retroviralen Vektorsystem mit den pre-miRNAs SIV-miR-TAR (SIVTAR, grün), HIV-miR-TAR (HIVTAR; blau) und zur Kontrolle mit einem Leervektor (pBABE leer, rot) transduziert. Anschließend wurden die Zellen mit SIV_{mac239} (MOI von 0,01)(C8166: A, C; CEMx174: B, D) infiziert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. A und B zeigten Infektionen ohne Zugabe von uninfizierten Zellen. In den in C und D gezeigten Experimenten wurden an dpi 9 uninfizierte Zellen zugeführt. Die Virusreplikation wurde anhand der Viruskopien im Zellkulturüberstand an verschiedenen Zeitpunkten (days post infection, dpi) der Infektion mittels qRT-PCR unter Verwendung von gag spezifischen Primern quantifiziert.

4.3.3 Infektion der transgenen Zelllinien mit SIV-R-Region mutierten „virus like particles“ (VLPs)

Um zu untersuchen, ob die überexprimierten miRNAs defiziente Viren komplementieren können, wurden die transgenen Zelllinien mit Viren infiziert, die Mutationen in der R-Region von SIV_{mac239} enthalten.

Die hierfür verwendeten Plasmide (R53, R53Δ7, R5R3Δ7, R5ΔR3) und das Infektionsprotokoll wurden freundlicherweise von Dr. Sabine Brandt, Prof. Dr. Klaus Überla (Uni. Bochum) und Prof. Dr. Ralf Wagner (pcRev, Uni. Regensburg) zur

Verfügung gestellt (Brandt et al, 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten VLPs (R53 Δ 7, R5R3 Δ 7, R5 Δ R3) weisen Deletionen von sieben Basen in der R-Region in der 5' und/oder 3'-SIV-LTR auf, die dazu führt, dass die pre-miRNA typische Sekundärstruktur (Abb. 4.3-3) nicht entstehen kann. Hierbei enthält das R53 Δ 7-Konstrukt Deletionen von sieben Basen in der 5' und 3'R-Region, wohingegen das R5R3 Δ 7 eine Deletion der sieben Basen ausschließlich in der 3'R-Region hat. Eine Deletion der kompletten 5'R-Region wurde in das R3 Δ R5-Konstrukt kloniert. Als Kontrolle diente das R53- Konstrukt, welcher den WT kodiert.



Abb. 4.3–3: Sekundärstruktur der mutierten R-Region (A) im Vergleich zur Wildtyp (B) R-Region von SIV_{mac239}. Die Deletion von 7 Basen in der R-Region von SIV_{mac239} (780-845) wurden von Sabine Brand (Uni. Bochum) kloniert. Die Sekundärstruktur wurde mittels *RNAfold* generiert. Die SIV-miR-TAR wurde in gelb markiert.

Die transgenen Zelllinien wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben mit den VLPs infiziert und die Replikation mit Hilfe der gag qRT-PCR quantifiziert. Als Kontrollen wurden -RT-Proben mitgeführt, zur Normalisierung diente GAPDH. Zur besseren Übersicht wurden die relativen gag-Expressionen der Kontrollzelllinie pBabe leer auf jeweils 100% normalisiert.

Ein Two-Way ANOVA nach Bonferroni zeigte keine signifikant (ns) erhöhte Infektionseffizienz der Wildtyp VLPs R53 in den transgenen C8166 Zelllinien (SIVTAR, HIVTAR) im Vergleich zu der Kontrollzelllinie (pBabe leer). Dies bestätigt die zuvor detektierten Daten der SIV_{mac239}-Infektion der verschiedenen transgenen Zelllinien, auch hier zeigten sich keine Unterschiede in der Virusreplikation (Abb. 4.3-4).

Bei den Deletionsmutanten, R53 Δ 7 R5R3 Δ 7 und R3 Δ R5, konnten jedoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$ (**)) und $p < 0,001$ (***) sowohl zwischen den transgenen Zellen (SIVTAR; HIVTAR) und den Kontrollzellen bestimmt werden. Nur die Deletionsmutante R5R3 Δ 7, welche eine Deletion von 7 Basen in der 3'-Region der R-Region enthält, zeigte keine Signifikanzen zwischen den transgenen Zelllinien HIVTAR und SIVTAR.

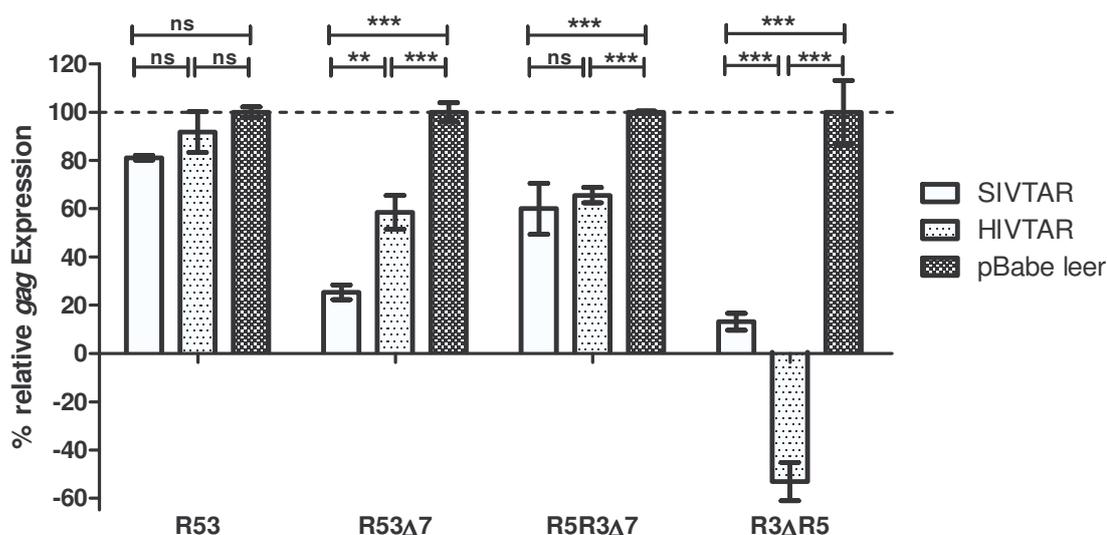


Abb. 4.3–4: Infektion der SIVTAR und HIVTAR transgenen Zelllinie C8166 mit SIV-R-Region Δ 7-defizienten virus-like-particles (VLPs). In C8166 wurden mittels retroviraler TR α -ansduktion entweder pre-SIV-miR-TAR (SIVTAR) oder die pre-HIV-miR-TAR (HIVTAR) inseriert. Als Kontrolle wurde eine Transduktion ohne Target-Sequenz durchgeführt (pBabe leer). Die Zellen wurden mit VLPs (nach Bandt et al. 2006) infiziert. Hierbei entspricht R53 der Wildtyp R-Region, R53 Δ 7 einer Deletion von 7 Basen in der 5' und der 3' R-Region, R5R3 Δ 7 einer Deletion von 7 Basen in der 3' R-Region und R3 Δ R5 einer Deletion der kompletten 5' R-Region. 72h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und die gesamte RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und die virale RNA in Duplika mittels gag-spezifischer Primer detektiert. Die Normalisierung erfolgte durch parallel detektiertes GAPDH. Die relative gag-Expression der Kontrollzelllinie (pBabe leer) wurde jeweils auf 100% normalisiert. Eine statistische Analyse der Daten wurde mittels Bonferroni im Two-Way ANOVA durchgeführt. (ns= nicht signifikant; $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)).

4.3.3.1 Bestimmung des Anteils an VLP infizierten Zellen

Brandt et al. zeigten Unterschiede der VLPs in der Pack-Effizienz und des Titers auf (Brandt et al., 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften der verschiedenen VLPs (R53, R53 Δ 7, R5R3 Δ 7 und R3 Δ R5) wurde der Anteil an VLP-infizierten Zellen bestimmt.

Da die Plasmide (R53, R53 Δ 7, R5R3 Δ 7 und R3 Δ R5) neben der R-Region das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodieren, konnte der prozentuale Anteil der infizierten Zellen in der Probe anhand der GFP-Expression in den Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen infiziert und 72h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und 1 Millionen Datenpunkte („events“) mittels Durchflusszytometrie detektiert. Nach dem Ausschluss von Dubletten und Zellschrott wurde der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt (Abb. 4.3-5). Die Annahme, dass die unterschiedlichen VLPs Zellen verschieden effizient infizieren, konnte hier bestätigt werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-VLP (R53) zeigten alle Deletionsmutanten eine geringere Anzahl von GFP-exprimierenden Zellen (auf 1 Mio. Zellen). Auch konnten Unterschiede zwischen den Mutanten R5R3 Δ 7 und R53 Δ 7, welche beide eine 7-Basen-Deletion in der 5'-R Region und der R53 Δ 7, welche zusätzlich eine Deletion in der 3'-R Region aufweisen, detektiert werden. Zudem zeigte sich, dass die transgenen Zelllinien, welche aus der T-Zelllinie C8166 generiert wurden, einen höheren Anteil an GFP-exprimierenden Zellen in allen hier verwendeten VLPs (Wildtyp und Deletionsmutanten) im Vergleich zu den transgenen CEMx174-Zelllinien aufweisen. Wie auch im Falle einer Infektion mit SIV_{mac239} oder HIV-1, zeigte sich, dass die Infektion zelltypspezifisch ist. Jedoch sind auch hier kaum Unterschiede zwischen den transgenen Zelllinien eines Zelltypes (z.B. C8166-HIVTAR, C8166-SIVTAR und C8166-pBabe leer) detektierbar, sodass die Insertion der pre-miRs keine Auswirkung auf die Effizienz der Infektion bzw. der GFP-Expression hat.

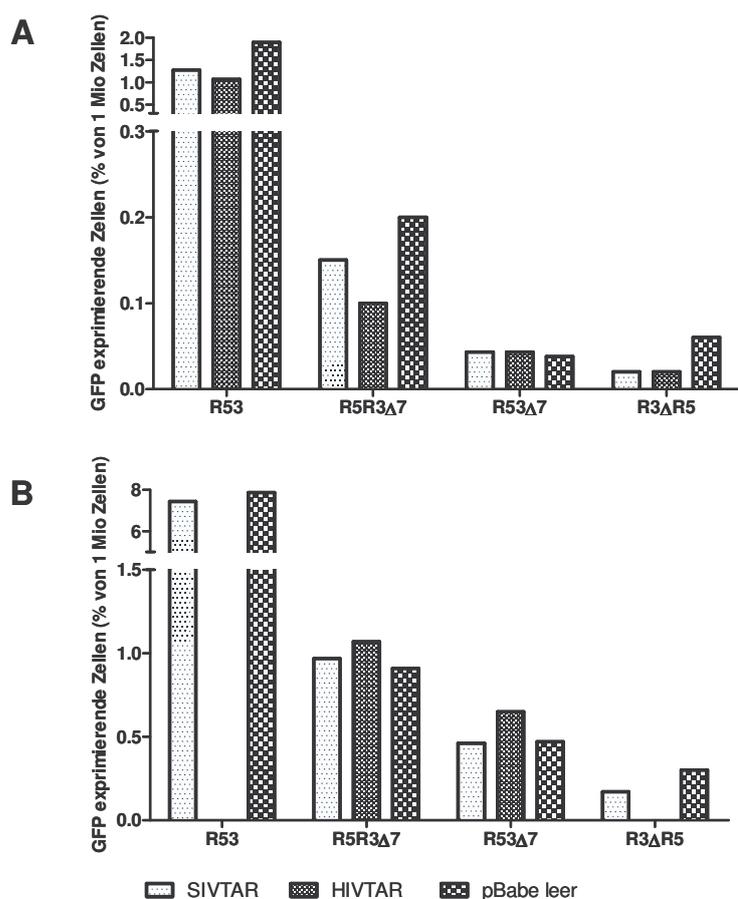


Abb. 4.3–5: Bestimmung des prozentualen Anteils an infizierten Zellen. Die transgenen Zelllinien CEMx174 (A) und C8166 (B) -HIVTAR, -SIVTAR wurden mit dem Wildtyp-VLP R53 und den Deletionsmutanten R5R3 Δ 7, R53 Δ 7 und R3 Δ R5 infiziert und 72h kultiviert. Als Kontrolle diente eine parallel durchgeführte Infektion und Kultivierung der jeweiligen pBabe leer-Zelllinie. Die Anzahl der GFP exprimierenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden 1 Millionen Zellen gemessen.

4.4 Detektion der SIV-miR-TAR-5p in RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen (Pilotstudie)

Nachdem die Detektion der SIV-miR-TAR in den SIV_{mac239}-infizierten C8166-Zellen erfolgreich war, wurde untersucht, ob die SIV-miR-TAR ebenfalls in RT-SHIV-infizierten nicht-humanen Primaten detektierbar ist.

Hierzu wurden aus dem Blut von 3 RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und 4 uninfizierten Rhesusaffen CD4-positive (CD4⁺) T-Zellen isoliert. Daraufhin wurde die gesamte RNA dieser Zellen mittels Trizol isoliert. Um eine miRNA-Fraktion (< 200 bp) zu erhalten, wurde die gesamte RNA nochmals der Größe nach

aufgetrennt. 100 ng der gewonnenen miRNA-Fraktion wurden anschließend in den Stem-Loop-Assay eingesetzt. Zur Normalisierung wurde die hsa-miR-16 verwendet. Diese wurde, wie in Kap 4.2.2 erwähnt, in HIV-1 infizierten und uninfizierten primären humanen CD4⁺Zellen mittels eines Northern blot detektiert. Hierbei zeigte sich keine Expressionsunterschiede zwischen den infizierten und den Kontrollzellen (Ouellet et al., 2008). Jedoch wurde in HIV-1 infizierten Patienten mit hohem Virustiter eine Heraufregulation der hsa-miR-16 im Vergleich zu uninfizierten Patienten detektiert (Witwer et al., 2012). Dagegen zeigte eine andere Publikation von Houzet und Kollegen eine Herunterregulation der hsa-miR-16 in PBMCs von HIV seropositiven Patienten (Houzet et al., 2008). Im nicht humanen Primaten wurde eine Regulation der hsa-miR-16 jedoch nie beobachtet. Abbildung 4.4-1 zeigt die relative Abundanz der SIV-miR-TAR in den experimentellen Tieren.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen eine starke Expression der SIV-miR-TAR-5p in den RT-SHIV infizierten (3 ΔC_T s) im Vergleich zu den uninfizierten Rhesusaffen (-4 ΔC_T s). Bei Annahme einer 100%igen Effizienz der qRT-PCR Reaktion entspricht dies einem Signal, dass mehr als 100fach über der Nachweisgrenze (im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren) liegt. In der sehr begrenzten Zahl an Tieren konnte somit in isolierten CD4⁺ T-Zellen SIV-TAR-5p nachgewiesen werden.

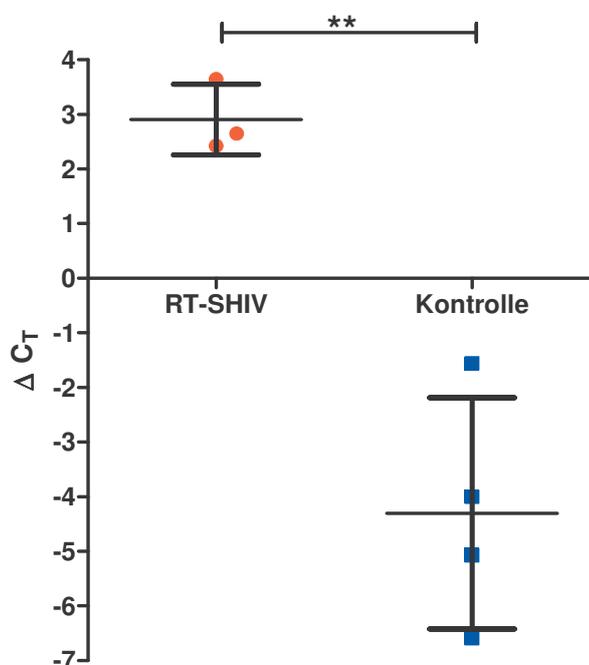


Abb. 4.4–1: Pilotstudie zur Regulation der SIV-miR-TAR-5p in vivo. Aus Blutproben von 3 RT-SHIV infizierten und 4 uninfizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) wurden CD4⁺-Zellen isoliert. Anschließend wurden kleine RNAs (< 200bp) aus den isolierten CD4⁺-Zellen

aufgereinigt. Unter Verwendung des Stem-Loop-Assays die SIV-miR-TAR mittels qRT-PCR detektiert. Zur Normalisierung wurde die hsa-miR-16 parallel mitgeführt. Alle Proben wurden in Duplika gemessen. Die y-Achse zeigt die ΔC_T -Werte der detektierten Proben. Die RT-SHIV-infizierten Proben (RT-SHIV) sind in rot und die uninfizierten Proben (Kontrolle) in blau dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests mit Korrektur nach Welch bestimmt (**; $p = 0,0077$).

4.5 Nachweis von SIV-miR-TAR-5p im Zellkulturüberstand von SIV_{mac239}-infizierten Zellen

Nachdem die SIV-miR-TAR-5p in SIV_{mac239} infizierten C8166 Zellen und in SHIV-infizierten Rhesusaffen nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob sich die miRNA auch in Viruspartikeln nachweisen lässt.

4.5.1 Isolation von Viruspartikeln aus SIV_{mac239}-infizierten Zellkulturüberständen

Es ist bekannt, dass HIV-1 die tRNA-Lys (Kleiman et al., 2004) und die 7SL-RNA (Paul et al., 2003) in das Viruspartikel verpackt. Um zu untersuchen, ob SIV_{mac239} ebenfalls tRNAs oder andere kleine RNAs in Viruspartikel einbaut, wurden Viruspartikel angereichert. Hierzu wurde Zellkulturüberstand von SIV_{mac239}-infizierten und uninfizierten C8166-Zellen ab dpi 7 gesammelt. Das Virus wurde über verschiedene Zentrifugationsschritte unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) 6000 (Lewis and Metcalf, 1988) aufkonzentriert.

PEG präzipitiert neben Viruspartikeln auch Vesikel, wie z.B. Exosomen sowie im Zellkulturmedium enthaltene Proteine. Um zu verhindern, dass Oligonukleotide aus dem FCS-haltigen Zellkulturmedium isoliert und anschließend detektiert werden, wurden die aufgereinigten Viruspartikel zunächst mit DNase 1, RNase A und RNase One (Cliffe et al., 2009) behandelt. Hierbei hydrolysiert DNase 1 sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA. RNase A erkennt einzelsträngige RNA und spaltet diese. RNase One degradiert RNA zu Mono-, Di- und Trinukleotiden. Nach dieser Behandlung wurden die in den Viruspartikeln enthaltenen Nukleinsäuren mit Hilfe einer Trizol-Isolation isoliert, wobei die zugesetzten Nukleasen inaktiviert wurden. Die Konzentrationen der isolierten Nukleinsäuren aus je 500 mL Zellkulturüberstand wurden photometrisch bestimmt und sind in Tab. 4.5-1 dargestellt.

Tab. 4.5-1: Vergleich der Nukleotidkonzentrationen in isolierten Proben im Vergleich zur erwarteten Menge an Nukleinsäuren durch genomische Virus RNA

	C8166 SIV+	C8166 Ko
Menge der angereicherten Nukleinsäuren in 500 mL Zk-Überstand	13,3 µg	3,55 µg
Erwartete Viruskopien in 500 mL Zk-Überstand	1,552 x10 ¹¹ Viruskopien = 0,912 µg	0 µg

Die Probe aus dem Überstand von uninfizierten Kontrollzellen enthält keine SIV_{mac239} Viruspartikel. Es war daher anzunehmen, dass die aufgereinigten und detektierten Oligonukleotide aus Vesikeln stammen. Die Hälfte der im Cytoplasma befindlichen RNA ist in Mikrosomen eingeschlossen (Bünthe and Bünthe, 2004). Dies lässt den Schluss zu, dass neben Viruspartikeln (in der infizierten Probe) diese und andere von der Zelle abgesonderte Vesikel, wie Exosomen, ebenfalls aufkonzentriert und eingeschlossene Oligonukleotide extrahiert wurden (Wang et al., 2010).

Somit war davon auszugehen, dass in der isolierten Probe der infizierten Zellen mindestens Nukleinsäuren in der Größenordnung von 3,55 µg in Vesikeln eingeschlossen war, was etwa 27% der isolierten Probe entspricht. Die erwartete Menge genomischer Virus-RNA der infizierten Probe wurde anhand der detektierten Viruskopien im verwendeten Zellkulturüberstand vor der Anreicherung berechnet. Die theoretische Menge an isolierter viraler RNA entspricht mit 0,912 µg also etwa 7% der isolierten Menge. Somit ist davon auszugehen, dass ca. 66% der isolierten Probe aus Nukleinsäuren besteht, welche infektionsspezifisch, aber unbekannter Herkunft sind.

4.5.2 Charakterisierung der isolierten Probe

Um die genaue Menge von SIV_{mac239}-RNA in der isolierten Probe zu bestimmen, wurde diese unter Verwendung der qRT-PCR quantifiziert. Hierbei wurde das SIV_{mac239} *gag*-Gen mit spezifischen Primern detektiert.

Zunächst wurden 100 ng isolierter RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend wurden 20 ng in die qRT-PCR eingesetzt. In den infizierten C8166 konnte eine Konzentration von 7,53x10⁹ Viruskopien/500 mL Überstand nachgewiesen werden (Tab. 4.5-2). Ein Replikat der uninfizierten Probe zeigte eine Amplifikation bei C_T 41,

der als Hintergrund definiert wurde. In der -RT-Kontrolle des infizierten Überstandes der C8166-Zellen konnte keine Amplifikation detektiert werden.

Tab. 4.5-2: Ergebnisse der Detektion von Viruskopien im aufkonzentrierten Zellkulturüberstand und der Menge der erwarteten viralen RNA

	C8166 SIV+	C8166 Ko
Erwartete RNA Menge	0,912 µg	0
Detektierte Viruskopien in 500mL Zk-Überstand	$7,53 \times 10^9$	0
Errechnete RNA Menge nach detektierten Viruskopien	44,25 ng	0

Die aufgereinigte Probe enthält circa eine Zehnerpotenz (Tab. 4.5-2) weniger als der theoretisch errechnete Wert (Tab. 4.5-1). In SIV_{mac239}-infizierten C8166-Zellen wurden $1,552 \times 10^{11}$ Viruskopien in 500 mL Zellkulturmedium nachgewiesen. Nach der Aufkonzentrierung und der Trizol Isolation der RNA konnten jedoch nur $7,53 \times 10^9$ Viruskopien in 500 mL Überstand detektiert werden. Dies ist möglicherweise auf große Verluste sowohl während der Aufkonzentration der Viruspartikel als auch bei der Isolation der RNA zu erklären. Somit enthält die isolierte Probe RNA, welche nur zu ca. 0,33% aus dem SIV Virusgenom stammt. In Folge dessen besteht die Probe aus 99,6% aus nicht-viraler RNA. Diese kann zu einem aus aufgereinigten Vesikeln oder aber aus im Viruspartikel befindlicher zellulärer RNA bestehen.

4.5.3 Bestimmung der RNA/DNA Konzentration in der isolierten Probe

Um die Nukleinsäurezusammensetzung der Isolate genauer zu definieren, wurden 1000 ng der SIV_{mac239}-infizierten Probe zur weiteren Analyse unter Verwendung von DNase1 und einem RNase-Mix bestehend aus 10 µg/µL RNaseA, 1 U RNaseH und 1 U RNase One behandelt (Tab. 4.5-3). Als Positivkontrollen wurde zum einen 1000 ng eines Kontroll-Plasmids und zum andern 1000 ng Kontroll-RNA parallel mit hydrolysiert. Die Detektion der Degradation der verdauten Probe erfolgte einerseits mit Hilfe des NanoDrops und andererseits mittels qRT-PCR. Als Negativkontrolle in der qRT-PCR diente eine -RT-Probe. Die Detektionsgrenze wurde auf einem C_T-Wert von >35 festgesetzt.

Tab. 4.5-3: Ergebnis des Verdauens der isolierten Probe aus SIVmac239-infizierten Zellkulturüberstand von C8166-Zellen. Es wurde 1000 ng Probe eingesetzt. Eine –RT-Probe wurde als Negativkontrolle parallel mitgeführt. Die Detektionsgrenze wurde auf $> 35C_T$ s festgesetzt.

Enzym	NanoDrop Ergebnis [ng]	qRT-PCR Ergebnis [gag-Kopien/mL]
DNase 1	992 ng	Amplifikation, C_T 23
RNase Mix	0 ng	keine Amplifikation

RNase Mix = 10µg/µl RNase A, 1U RNase H, 1U RNase One

Die Desoxyribonuklease 1 (DNase 1) ist eine Endonuklease, sie degradiert einzelsträngige sowie doppelsträngige DNA. Das Ergebnis ist in Tab. 4.5-3 dargestellt. Von den eingesetzten 1000 ng Probe konnten nach der Hydrolyse mittels DNase1 992 ng detektiert werden. Zudem konnten $6,63 \times 10^9$ Viruskopien/mL in einer gag-spezifischen qRT-PCR detektiert werden. Dagegen konnten bei einer Hydrolyse der Probe mit einem RNase-Mix keine Nukleinsäuren mittels NanoDrop nachgewiesen werden, auch zeigte die spezifische qRT-PCR keine Amplifikation des gag-Gens. Dies zeigt, dass die isolierte Probe nur zu einem sehr geringen, nicht messbaren Anteil aus DNA besteht und somit RNA isoliert wurde.

4.5.4 Größenbestimmung der aufgereinigten RNA mittels Bioanalyser

Die Größenverteilung der isolierten RNA wurde mittels eines Bioanalyser mit Hilfe des Eukaryote-total-RNA-Nano-Chips untersucht. Die Ergebnisse des Bioanalyser zeigten in allen Proben Banden (Abb. 4.5-1 A) bzw. Fluoreszenzdetektion (Abb. 4.5-1 B). Somit enthält die isolierte Probe RNA in einer Größenverteilung um 25 Basen, was in etwa der Größe von microRNAs entspricht. Aufgrund der vergleichsweise geringen Konzentration von viraler genomischer RNA ist davon auszugehen, dass die hier isolierten kleinen RNAs zum Hauptteil aus Vesikeln oder aber, im Falle der SIV infizierten Zellen, aus im Virus eingeschlossenen zellulären RNAs abstammen. Da jedoch das Fluoreszenzprofil identisch ist, ist davon auszugehen, dass es sich zum Großteil um RNA handelt, welche sowohl in den infizierten als auch in den Kontrollzellen in die Viruspartikel eingebaut wurde.

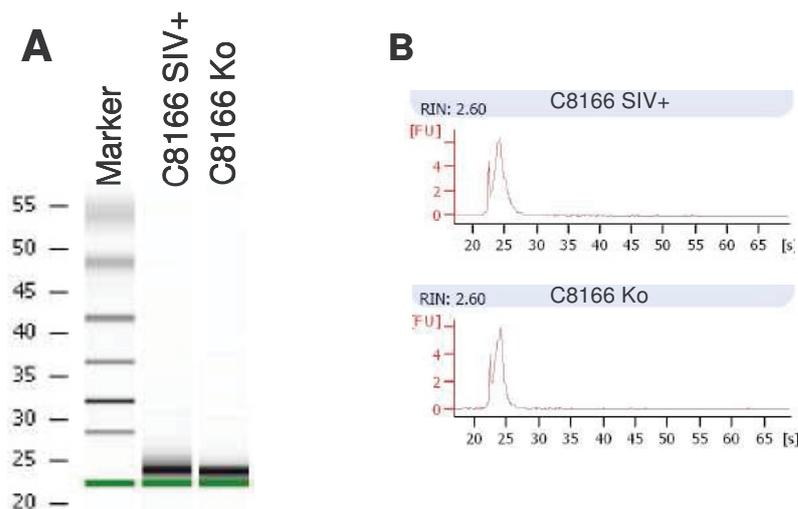


Abb. 4.5–1: Charakterisierung der isolierten RNA aus Zellkulturüberstand von SIVmac239-infizierten und uninfizierten Zellen mittels Bioanalyzer. Aus dem Überstand von infizierten (SIV+) C8166-Zellen wurde mittels verschiedener Zentrifugationsschritte und einer PEG-Fällung Virus aufkonzentriert, als Kontrolle wurde Zellkulturüberstand von uninfizierten C8166-Zellen parallel aufgearbeitet. Anschließend wurde die RNA mit Trizol isoliert. Der Bioanalyzer zeigt neben der Auftrennung der Proben (A) das Fluoreszenzchromatogram jeder Probe (B). Zur Bestimmung der Größe der Probe wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Menge der detektierten RNAs entspricht der Menge der detektierten Fluoreszenz und ist in relativen Einheiten (“Fluorescence units“, FU) angegeben.

4.5.5 Charakterisierung der isolierten RNA im Qubit Fluorometer

Zur genaueren Charakterisierung der isolierten Probe von infizierten und nicht infizierten C8166 Zellkulturüberständen wurde von der Firma Fasteris die RNA-Konzentration mittels Qubit-Fluorometer unter Verwendung von picogreen durchgeführt. Hierbei interkaliert picogreen in doppelsträngige Oligonukleotide, welche anschließend im Fluorometer detektiert werden können. Die gemessenen Ergebnisse des Qubit-Fluorometers im Vergleich zum NanoDrop, der die Konzentration von DNA, RNA und anderen Oligonukleotiden bei 260nm bestimmt, sind in Tab. 4.5-4 dargestellt.

Tab. 4.5-4: Vergleich der RNA-Konzentrationen detektiert im Qubit (picogreen) und mittels NanoDrop

	Qubit (picogreen) [ng/μL]	NanoDrop [ng/μL]
C8166 Kontrolle	15,2	163,78
C8166 SIV-infiziert	16,2	332,6

Da der Qubit unter Verwendung von picogreen nur ca. 10% der im Nanodrop messbaren RNA-Menge detektiert wird, ist davon auszugehen, dass der Hauptteil der aufkonzentrierten Probe aus einzelsträngiger RNA besteht.

4.6 Nachweis von SIV-miR-TAR-5p im Zellkulturüberstand von SIV_{mac239}-infizierten Zellen

Um kleine RNAs wie miRNAs zu detektieren, wurde die mittels Trizol isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe des miR Vana-Kits in zwei Fraktionen aufgetrennt. Aus 1 μg Gesamt-RNA von infizierten C8166 und CEMx174 Zellen sowie uninfizierten C8166 und CEMx174 Zellen wurden macroRNA (> 200bp) und miRNA (< 200 bp) isoliert.

Zur Analyse der isolierten miRNA wurde der Poly-Adenylierungs-Assay verwendet. Als Kontrolle der Größenfraktionierung der gesamten Virus-RNA diente die Detektion des SIV_{mac239}-*gag*-Gens. Das Vorhandensein von *gag* wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren ausgeschlossen. Zur Kontrolle der qRT-PCR wurden –RT-Proben parallel mit detektiert. Das Ergebnis der qRT-PCR zeigte, dass weder ein *gag*-Produkt mittels spezifischer forward- und reverse-Primer noch mittels Poly-Adenylierungs-Assay detektierbar war. In allen Proben konnte eine Amplifikation erst ab C_T 39 nachgewiesen werden und stellt somit unspezifischen Hintergrund dar.

Nachdem die SIV-miR-TAR-5p in SIV_{mac239}-infizierten C8166-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob sich die miRNA auch in den Viruspartikeln bestätigen lässt.

Hierfür wurde eine zuvor getestete miRNA-Fraktion verwendet. Wie oben beschrieben wurden 100ng SIV-infizierter und uninfizierter Probe polyadenyliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der SIV-miR-TAR erfolgte mittels der zuvor verwendeten forward-Primer SIV-miR-86 in der qRT-PCR.

Wie auch in den Zellen zeigten die Ergebnisse der qRT-PCR, dass die SIV-miR-TAR in der SIV-infizierten Probe nachweisbar ist. Diese zeigt bei einem Threshold von 0,02 einen C_T von 24,5. Sowohl die –RT-Kontrollen als auch die uninfizierte Probe lagen mit C_T -Werten von 30,1 bis 31,9 deutlich hinter der SIV-Probe. Da keine interne Kontrolle detektiert wurde, erfolgte keine weitere Normalisierung. Jedoch wurden sowohl von der infizierten als auch von der uninfizierten Probe 2 ng miRNA in die qRT-PCR eingesetzt. Somit konnte hier nachgewiesen werden, dass im Zellkulturüberstand von SIV_{mac239}-infizierten C8166 Zellen SIV-miRNA-TAR-5p nachweisbar ist, wobei das Signal ca. 100x höher liegt als in den entsprechenden Kontrollreaktionen (Abb. 4.6-1).

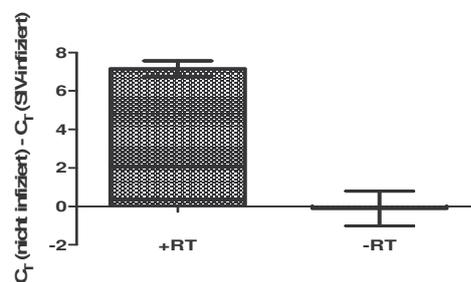


Abb. 4.6–1: Nachweis der SIV-miR-TAR in der miR-Fraktion von isolierter Virus-RNA. Nach Trizol-Isolation der Virus-RNA wurde aus dieser die miRNA (>200bp) isoliert. Anschließend wurden 100 ng der miR-Fraktion polyadenyliert und in cDNA umgeschrieben. Die SIV-miR-TAR wurde im Poly-Adenylierungs-Assay unter Verwendung von SYBR Green® detektiert. Zur Kontrolle wurden –RT-Kontrollen durchgeführt (x-Achse). Die y-Achse zeigt die Subtraktion der C_T -Werte der nicht-infizierten und der infizierten Probe.

5 Diskussion

2013 starben ca. 1,5 Millionen Menschen weltweit an den Folgen von AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). 2,6 Millionen Menschen infizierten sich 2013 mit dem humanen Immundefizienz-Virus, kurz HIV, neu. Somit sind AIDS und HIV eine der der gefährlichsten Krankheiten unserer Zeit (UNAIDS/WHO, 2013). Bis heute ist weder eine Impfung zum Schutz vor einer Infektion noch ein heilendes Präparat erhältlich.

Um neue Therapien gegen AIDS und HIV zu entwickeln, wurden verschiedene Ansätze untersucht. Unter anderem wurde dabei der RNAi-Mechanismus untersucht. RNAi (RNA Interferenz) ist ein Genregulations-Mechanismus in Pflanzen, Insekten und Säugetieren, dessen Aufgabe die Regulation von zellulärer Genexpression zur Kontrolle der Zellentwicklung ist (beschrieben in He et al., 2004). Hierbei sind miRNAs einer der meist verwendeten Mediatoren der RNAi (Hutvanger et al., 2002).

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine einzelsträngige RNAs, welche durch die Inhibition der Translation oder der Degradation von Ziel-mRNAs ein wichtiges Hilfsmittel bei der posttranskriptionellen Regulation verschiedenster Zellfunktionen sind (Liu et al., 2011). Auch spielen sie in der Zellabwehr (Gursansky et al., 2011), auch gegen Viren (Cullen et al., 2009), eine wichtige Rolle. Die Regulation von verschiedenen miRNAs konnte bereits in HIV-1 infizierten Zellen nachgewiesen werden (Sun et al. 2011). Neben zellulären miRNAs haben auch virale miRNAs einen Einfluss auf die Translation von zellulärer und viraler mRNA. Bis heute sind drei auf dem HIV-1 Genom kodierte miRNAs bekannt: HIV-miR-TAR (Quellet et al., 2008; Klase et al., 2007; Klase 2009), miR-N367 (kodiert im *nef*, Omoto et al., 2004) und miR-H1 (kodiert in der LTR, Benasser et al., 2004; Lamers et al., 2010). Jedoch ist noch keine viruskodierte miRNA in dem verwandten SI-Virus publiziert worden.

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen und die Regulation von viruskodierten miRNAs unter Infektion von SIV_{mac239} (Simianes Immundefizienz-Virus) und HIV-1 *in vitro* und *in vivo* untersucht.

5.1 Die Replikation von SIV_{mac239} und HIV-1 unterscheiden sich in der T-Zelllinie C8166 und der T/B-Zelllinie CEMx174

Die T-Zelllinie C8166 sowie die T/B-Zelllinie CEMx174 können mit SIV_{mac239} und HIV-1 infiziert werden. Das Virus repliziert in beiden Zelllinien.

Die T-Zelllinie C8166 wurde 1983 zuerst mit HIV-1 (damals noch HTLVIII benannt) infiziert (Salahuddin et al., 1983; Lee et al.; 1984). 1985 wurde von Salter et al. die T/B-Hybridzelllinie CEMx174, aus der T-Zelllinie CEM und der B-Zelllinie 721.174, generiert. Beiden Zelllinien finden seitdem in der Erforschung zum Verständnis von HIV-1 und SIV_{mac239} häufige Verwendung. Auch heute sind sie und ihre Subklone die Zellen der Wahl, um die Replikation des Virus *in vitro* zu untersuchen (Guan et al., 2001; Bixby et al., 2010; Teo et al., 2005). Jedoch wurde bisher nie die Kinetik der Virus-Replikation im Verlauf eines Infektionsexperimentes unter Verwendung der C8166 oder der CEMx174 Zelllinien detailliert untersucht.

Die Erforschung der Virus-Dynamik im Verlauf ist jedoch relevant, seitdem Expressionsunterschiede in dem viralen Lebenszyklus bekannt wurden. Studien, welche die medikamentösen Effekte untersuchen, zum Beispiel von „antagomirs“ (synthetisierte Oligonukleotide, welche komplementär zu einer spezifischen miRNA sind; Krützfeldt et al., 2005) oder siRNAs („small interfering RNA“, kurze einzel- oder doppelsträngige RNA-Moleküle, welche in der RNA Interferenz eine große Rolle spielen; Hassnoot et al., 2007) stützen sich auf die Charakterisierung der Produktion von HIV-1 im Zeitverlauf (Huang et al., 2007; Triboulet et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die T-Zelllinie C8166 und die T/B-Hybridzelllinie CEMx174 sowohl mit SIV_{mac239} als auch mit HIV-1 mit einer MOI von 0,01 infiziert (Kap. 3.1.5). Zur Untersuchung der Virus-Dynamik wurde in engen Intervallen der Zellkulturüberstand zur Bestimmung der Virusreplikation entnommen. Hierbei wurde sowohl die RNA-Kopien pro mL Zellkulturüberstand bei einer SIV/HIV-Infektion mittels qRT-PCR ermittelt. Im Falle einer SIV-Infektion wurde zusätzlich der Virustiter (halbe infektiöse Dosis; TCID₅₀) unter Verwendung des Immuno-Peroxidase-Antiperoxidase-Testes (IPAPs; Kap. 3.1.7) und des TZM-bl-Testes (Kap. 3.1.8), nur bei Infektionen von C8166 Zellen) ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Replikationsdynamiken in den beiden Zelllinien signifikant unterscheiden. Die Virusvermehrung in den C8166 Zellen folgt einer exponentiellen Regression, hingegen ist die Virusvermehrung in CEMx174 Zellen ohne die Zugabe von uninfizierten Zellen linear. Dies ist konnte sowohl bei einer Infektion mit

SIV_{mac239} als auch mit HIV-1 beobachtet werden. Daher lässt es den Schluss zu, dass die Replikation abhängig von der Zelllinie und nicht abhängig vom Virus ist.

Im Laufe der Zeit haben Zellen verschiedene Mechanismen zur Inhibierung der retroviralen Replikation und Vermehrung entwickelt. Die angeborene anti-virale Immunität der Zellen umfasst unter anderem die Proteine APOBEC3G („*apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G*“), Trim5α („*Tripartite motif-containing protein 5*“) und Tetherin (zusammengefasst in Levy, 2011). Jedoch hat HIV wie auch SIV mit den akzessorischen Proteinen Antagonisten entwickelt. So wird APOBEC3G durch das virale Protein Vif gebunden und mittels eines Proteinkomplexes in verschiedenen zellulären Proteinen polyubiquitiniert, worauf dieses abgebaut wird. Das zelluläre Abwehrprotein Tetherin wird durch das virale Protein Vpu gebunden, ubiquitiniert und abgebaut (zusammengefasst in Kirchhoff, 2010).

Diese anti-viralen Abwehrmechanismen werden sicherlich in den beiden hier verwendeten Zelllinien exprimiert. Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob sich die Expressionslevel in den verschiedenen Zelllinien (im Besondern in Hybridzelllinien aus zwei verschiedenen Zelltypen) unterscheiden. Wäre dies der Fall, würden unterschiedliche Expressionen der zellulären anti-viralen Proteine die verschiedenen Zeitverläufe einer SIV_{mac239}/HIV Infektion erklären.

Im Gegensatz zur Bestimmung der Viruskopien mittels qRT-PCR zeigte die Bestimmung des Virustiters (TCID₅₀/mL) im Verlauf einer SIV-Infektion in beiden hier verwendeten Tests (IPAP und TZM-bl-Testes) in denselben Proben keine Unterschiede in der Kinetik, beide Regressionskurven liegen ab dem vierten Tag nach der Infektion direkt übereinander. Dies wurde in allen gemessenen Experimenten beobachtet.

Jedoch konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den detektierten Virus-Kopien/mL und dem Virustiter beobachtet werden. Das Ergebnis der errechneten Viruskopien/mL liegt bei allen gemessenen Zeitpunkten ca. 10³ höher als die TCID₅₀. Dies lässt darauf schließen, dass nur ca. jeder 1000 produzierte Virus infektiös ist, dies steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten (Bourinbaïar, 1994). Es ist beschrieben, dass, bedingt durch die fehlende Korrekturlese- („*proofreading*“) Funktion der RT, eine hohe Mutationsrate von HIV existiert. Es wird diskutiert, ob der Unterschied zwischen den detektierbaren RNA-Kopien und den infektiösen Partikeln durch diese Mutationen bedingt ist. Hierbei wurden zumeist in Patienten Proben untersucht (Vella et al., 2000; Quin et al., 2000; Dictor et al., 2001; Harrington et al., 2000).

Dennoch zeigen Hochdurchsatz-Sequenzierungen keine letalen Mutationen des Virusgenoms im Infektionsverlauf. Wie oben beschrieben haben Zellen eine angeborene anti-virale Immunität, welche ebenfalls ein Grund für die geringe Anzahl an infektiösen Partikeln im Zellkulturüberstand sein könnte. Da die anti-virale Proteine, wie APOBEC3G, Trim5 α und Tetherin, nicht direkt an der Transkription des integrierten Virusgenoms und des RNA Transportes aus dem Zellkern beteiligt sind, ist es möglich, dass zwar das Genom unversehrt und somit in der *gag* spezifischen qRT-PCR detektierbar ist, der Viruspartikel an sich jedoch nicht infektiös ist bzw. nicht replizieren kann.

Auch ist zu bedenken, dass hier humane Zellen mit dem Affenvirus SIV_{mac239} infiziert wurden. Es ist bekannt, dass HIV-1 Rhesusaffen nicht infizieren kann, dies wird unter anderem dem zellulären anti-viralen Protein Trim5 α zugeschrieben (zusammengefasst in Nakayama und Shioda, 2012). Es ist also nicht auszuschließen, dass humane zelluläre Proteine andere Effekte auf die Replikation des Virus ausüben als Proteine einer Rhesusaffen T-Zelllinie.

5.1.1 HIV-1 kodiert miRNAs

Virus kodierte miRNAs haben einen Einfluss auf die Virusreplikation (Chen et al., 2007). Jedoch wurde das Vorhandensein von HIV-1 kodierten miRNAs kontrovers diskutiert (Lin und Cullen, 2007). Durch die Anwendung von Methoden speziell zur Klonierung von kleinen RNAs („small RNA cloning methods“) konnte keine HIV-1 kodierte miRNA sequenziert werden (Pfeffer et al., 2005). Andererseits konnten mittels neuer hochsensitiver Sequenzierungsmethoden („*deep sequencing*“) kleine HIV-spezifische RNAs sequenziert werden (Schopman et al., 2011; Yeung et al., 2009). Auch haben drei unabhängige Arbeitsgruppen mittels Northern Blot Hinweise auf kleine-HIV-1 kodierte RNAs gefunden (Omoto et al., 2004; Benasser et al., 2005, Ouellet et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein von SIV_{mac239} kodierten miRNAs *in vivo* und *in vitro* untersucht.

in der TAR-Region nachweisen (Klase et al., 2009). 2008 wurden zwei mögliche miRNA in der HIV-2 TAR-Region postuliert (Purzycka et al., 2008). Erste Untersuchungen von Klase et al. zeigten eine Inhibition der LTR-getriebenen Genexpression. Unter Verwendung eines reporter-genbasierenden Tests konnte die Arbeitsgruppe eine Inhibition der Expression der Wildtyp TAR-Region im Vergleich zu verschiedenen Mutanten nachweisen. Kommerziell erhältliche siRNAs gegen sowohl die HIV-mir-5p wie auch gegen die HIV-mir-3p zeigten ebenfalls eine Inhibition (Klase et al., 2007). Dennoch sind die genauen Funktionen der HIV-1 oder der HIV-2 miRNAs-TAR bis heute nicht endgültig geklärt. Erste funktionelle Analysen der HIV-miR-TAR-5p zeigten einen antiapoptotischen Effekt und eine Verstärkung der Histone deacetylase 1 (HDAC-1) auf (Klase et al., 2009). HDAC-1 sind Enzyme, welche durch Veränderungen in den Histonen einen Effekt auf die Transkription ausüben können.

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein von miRNAs in der TAR-Region von SIV_{mac239} *in vitro* und *in vivo* untersucht. Hierbei konnte eine kleine RNA in der TAR-Region detektiert, kloniert und sequenziert werden. Zudem wurde die Dynamik der Expression im Verlauf einer SIV_{mac239}-Infektion untersucht.

Um zu verhindern, dass falsch positive miRNAs untersucht werden, wurde zunächst nach einer unter SIV-Infektion nicht regulierten miRNA gesucht. Diese „housekeeping“-miRNA sollte in beiden verwendeten Zelllinien und in allen angewandten Tests stabil unreguliert sein.

Hierfür eignet sich die hsa-miR-16. Die Meinungen dazu sind allerdings zwiespältig. Ouellet et al. konnten 2008 unter Verwendung eines Northern Blot zeigen, dass sich die Expression weder der pri-miR-16 noch der pre-miR-16 noch der maturen hsa-miR-16 in *ex vivo* HIV-1-infizierten primären humanen CD4⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu uninfizierten nicht unterscheiden (Ouellet et al., 2008). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die hsa-miR-16 in HIV-1 infizierten Zellen und HIV-1 Patienten herunterreguliert sind (Houzet et al., 2008; Benasser et al., 2006).

In Infektionsexperimenten zeigte sich die hsa-miR-16 sowohl in einem ersten Screening mittels eines miRNA-Microarray von isolierter miRNA aus SIV_{mac239}-infizierten und uninfizierten C8166-Zellen unreguliert (Orlik, 2009). Zur Bestimmung der Regulation im Verlauf eines Infektionsexperimentes wurde die Expression der hsa-miR-16 mit Hilfe der qRT-PCR in allen verwendeten Assays und Zelllinien an unterschiedlichen Infektionszeitpunkten validiert. Die subtrahierten C_T-Werte der nicht infizierten Probe von der infizierten Probe zeigten zu keinem Zeitpunkt im Verlauf einer SIV-Infektion weder im Poly-Adenylierungs-Assay noch im Stem-Loop-Assay eine

Regulation von >1. Dies wurde als vernachlässigbarer Hintergrund angesehen. Die Robustheit der Expression der hsa-miR-16 wurde in jedem Experiment bestimmt.

Zum Nachweis einer SIV kodierten miRNA wurde zunächst *eine in silico*-Analyse des Virusgenoms durchgeführt. Hierbei wurde die TAR-Region als mögliche pre-miRNA identifiziert. Diese Region zeigte zwei mögliche miRNAs auf, diese wurden zunächst SIV-miR-86 und SIV-miR-87 benannt (5'(-86) und 3'(-87) des Loops).

Aufgrund der unsicheren Lokalisation und des genauen 3'-Ende der SIV-miRNA in der TAR-Region wurde zunächst ein Poly-Adenylierungs-Assay durchgeführt. Der Vorteil dieses Tests ist die „Unspezifität“ der cDNA-Synthese, sodass neben der maturen miRNAs die pre-miRNAs aber auch mit aufgereinigte Bruchstücke des viralen sowie des zellulären Genoms detektiert werden könnten (Fu et al., 2006).

Zunächst wurden die vorhergesagten miRNAs an einem Zeitpunkt (dpi 9) im Infektionsverlauf von C8166 Zellen detektiert. Die gemessenen Proben wurden an einem späten Zeitpunkt, jedoch nicht am Endpunkt der Infektion gewählt. Wie zuvor gezeigt ist die Viruslast an diesem Zeitpunkt am höchsten, somit ist anzunehmen, dass die Expression und Prozessierung einer SIV-kodierten miRNAs am stärksten und somit am besten detektierbar ist, jedoch vor einer infektionsbedingten Apoptose der Zellen. Hierbei zeigten sich beide miRNAs exprimiert, jedoch in einer unterschiedlichen Stärke. Andere Arbeitsgruppen verwendeten zumeist dauerinfizierte Zelllinien, um die HIV-1 bedingte miRNA-Regulation zu untersuchen (Ouellet et al., 2008; Klase et al., 2007; Omoto et al., 2004). Diese chronisch infizierten Zelllinien haben den Vorteil, dass sie stabil HIV-1 exprimieren, nicht sterben und einfach zu kultivieren sind. Hierbei ist jedoch keine Detektion infektionsbedingter miRNAs oder des HIV-Infektionsverlaufes möglich. Dagegen infizierten Schopman und Kollegen die T-Zelllinie SupT1 und kultivierten diese bis mindestens 60% der Zellen HIV-1 infiziert waren, um anschließend mittels einer Hochdurchsatz-Sequenzierung Virus-kodierte miRNAs zu identifizieren (Schopman et al., 2011). So konnte die Arbeitsgruppe 5 HIV-1 kodierte miRNAs (incl. bereits von Klase et al. 2007 publizierten der HIV-miR-TAR) identifizieren.

Eine Untersuchung der Expression im Infektionsverlauf zeigte zunächst einen Anstieg der Expression beider miRNAs. Bei beginnender Apoptose und somit am Ende des Experimentes sanken die Expressionen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die SIV-miR-86 und -87 Funktionen spät im Infektionsverlauf ausüben.

Im Vergleich mit den jeweiligen Virustitern im Zellkulturüberstand der Experimente zeigten beide miRNAs eine ähnliche Funktion wie die mittels *gag* detektierte

Virusreplikation. Dementsprechend folgen die Expressionsprofile der SIV-miR-86 und SIV-miR-87 im weitesten Sinn der Virusreplikation in C8166 Zellen.

Eine Auftrennung der Amplifikationsprodukte zeigte in den SIV-miR-86-Proben zu Beginn der Infektion (dpi 2) zwei Produkte (115 bp und 80 bp), welche in der SIV-miR-87-Probe ebenfalls ab dpi 6 bis zur Beendigung des Experimentes (dpi 9) detektierbar waren. Die detektierten Produktgrößen entsprechen den publizierten Produkten (110bp= pre-miRNA; 80bp= mature miRNA) von Fu et al. (Fu et al., 2006). Ein klar abgegrenztes Bandenmuster war nicht erkennbar und ist mit der unterschiedlichen Polyadenylierung der miRNAs in der Ausgangsprobe erklärbar.

Jedoch veränderten sich die Amplifikationsprodukte der SIV-miR-86. So wurde das 115 bp große Produkt im Infektionsverlauf weniger amplifiziert und das 80 bp große Produkt stärker. Dies spricht für eine Prozessierung des 115bp- zum 80bp-Produkt in der Zelle. Eine Sequenzierung der beiden Produkte zeigte, dass die 115bp-Produkte über der erwarteten pre-miRNA hinausgingen. Hingegen zeigte das 80bp-Produkt die eine andere mögliche pre-miRNA auf.

Mittels verschiedener Primer wurde als nächstes das 3'-Ende der mature-miRNA auf die Base 804 des viralen Genoms bestimmt, welches wiederum mittels Sequenzierung der Amplifikationsprodukte bestätigt wurde. Die detektierte und sequenzierte miRNA wurde aufgrund ihrer Lage als SIV-miR-TAR-5p benannt.

Aufgrund des nun definierten 3'-Endes der SIV-miR-TAR-5p konnten anschließend Primer für eine zweite, unabhängige miRNAs-Nachweismethode – hier der Stem-Loop-Assay (Chen et al., 2005)- designt werden. Es wurde dargelegt, dass die SIV-miR-TAR-5p mit dem spezifischeren Assay (spezifische cDNA-Synthese + spezifische qRT-PCR) ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Die Expression im Infektionsverlauf zeigte einen Verlauf, welcher unabhängig von dem genomischen *gag* Transkripten ist. Das Expressionsmaximum lag bei Tag 7 bis Tag 8 nach Infektion und fiel ab Tag 9 wieder ab. Dies deutet auf eine Funktion der SIV-miR-TAR-5p in der späten Phase der Infektion ab dpi 7 hin, welche unabhängig von der Virusreplikation ist.

Die bisher nachgewiesenen HIV-1 miRNAs miR-N367 (kodiert im *nef*; Omoto et al., 2004), HIV-1-miR-TAR (Klase et al., 2007) und miR-H1 (kodiert in der LTR; Benasser et al., 2005) wurden, wie schon erwähnt, zumeist in chronisch infizierten Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen uninfizierten Zelllinien detektiert (Omoto et al, 2004, Oullet et al., 2008; Klase et al.,2007; Benasser et al., 2004). Dies hat den Vorteil, dass das Virus-Genom und somit auch die virale miRNA, kontinuierlich exprimiert werden. Zudem wird die Kultivierung der Zellen vereinfacht sowie die Reproduzierbarkeit der

gewonnenen Daten erhöht. Auch werden infektionsbedingte Nebeneffekte wie Stress ausgeschlossen. Zum andern gibt es jedoch den Nachteil, dass die Funktion und eventuelle zelluläre Faktoren von den Untersuchungen ausgeschlossen werden. Ferner wird die *in vivo* Situation einer Infektion durch einen langsamen Anstieg infizierter Zellen eher simuliert. Zusätzlich können sehr früh in der Infektion exprimierende miRNAs detektiert werden. Leider befassen sich bisher nur wenige Publikationen mit den Expressionen von infektionsspezifischen miRNAs im Zeitverlauf, so dass hier nur Vermutungen über die Funktion von miRNAs, welche im Zeitverlauf verschieden stark exprimiert werden, gemacht werden können.

So wurden Zeitverläufe von zellulären miRNAs von Influenzainfektionen mittels Microarray-Analyse untersucht (Loveday et al., 2012). Loveday und Kollegen untersuchten hierbei die Unterschiede der miRNA-Expression von verschiedenen pathogenen Influenza-Stämmen im frühen (0 bis 24h nach Infektion) und im späten Infektionsstadium (48 bis 72h nach der Infektion). Es zeigte sich, dass im Frühstadium der Hauptteil der exprimierten miRNAs herunterreguliert war. Im Spätstadium dagegen zeigte sich der Großteil der miRNAs heraufreguliert (Loveday et al., 2012). Die spät regulierten miRNAs zeigten hierbei Korrelationen zu der Herunterregulation von zellulären Signalwegen, welche mit dem Zellzyklus, der Replikation, der Signalgabe und der Chromosominstandhaltung assoziiert sind (Loveday et al., 2012).

Wie oben angedeutet führten Klase et al. 2009 erste funktionelle Analysen der HIV-miR-TAR durch. Hierbei wurde ein anti-apoptotischer Effekt und eine Verstärkung der Histone deacetylase 1 (HDAC-1) der HIV-miR-TAR detektiert und genauer untersucht (Klase et al., 2009). Eine Heraufregulierung der HIV-miR-TAR mit Hilfe eines Plasmides, auf der die HIV-miR-TAR (plus 100bp up und downstream der miRNA) kodiert ist, ergab jedoch keinen Effekt auf die Replikation von HIV-1 (Schopman et al., 2011)

Aufgrund des Expressionsmaximums an dpi 7-8, also kurz vor den infektionsbedingten, apoptotischen Absterben der Zellen und somit der Beendigung des Experimentes, lässt dies auf einen Effekt der SIV-miR-TAR-5p im späten Infektionszyklus und/oder der infektionsbedingten Apoptose zu. Im weiteren Verlauf wurde die Funktion der SIV-miR-TAR auch unter Berücksichtigung einer möglichen anti-apoptotischen Wirkung untersucht.

5.3 Expression der transgenen Zelllinien

Die Funktion der SIV-miR-TAR wurde anhand transgener Zelllinien, welche die pre-miRNA der TAR-Region von HIV-1 (5' und 3'-miR, Klase et al., 2009) und SIV_{mac239} exprimieren (C8166-SIVTAR, C8166-HIVTAR, CEMx174-SIVTAR, CEMx174-HIVTAR), untersucht. Die inserierten pre-miRNAs zeigten Unterschiede in der Expression. Hierbei unterschieden sich sowohl die Expression der pre-miR-TARs von SIV und HIV-1 wie auch die Expression dieser in den beiden Zelllinien C8166 (T-Zelllinie) und CEMx174 (T/B-Hybridzelllinie). Dies ist zum einem durch die ungerichtete retrovirale Integration des Targets in die Zelllinien als auch durch die Verschiedenheit der Zelllinien erklärbar. In der Literatur sind keine Unterschiede in der Methylierung und DNA-Verpackung bekannt. Dies wäre eine gute Erklärung für die verschiedene Insertion des retrovirealen Provirus in den Zelllinien.

Da sich die Expression der pre-miR-SIV-TAR in den beiden Zelllinien jedoch kaum unterscheidet (7582,18 +/-192,38) ist davon auszugehen, dass die Insertion, wenn auch ungerichtet, sequenzspezifisch Regionen im Genom bevorzugt, welche im Fall der SIV-TAR bei beiden hier verwendeten Zelllinien gleich stark von Drosha und/oder Dicer prozessiert wurde. Ist die Prozessierung sequenzspezifisch, würde dies im Falle der pre-miR-HIV-TAR bedeuten, dass diese in der T/B-Zelllinie stärker prozessiert wird als in der T-Zelllinie C8166 (C8166 11948,43 vs. CEMx174 26162,33). Die unterschiedliche Prozessierung der pre-miRNA korreliert zudem mit dem maximal erreichten Virustiter (Viruskopien/mL Zellkulturüberstand) in den beiden Zelllinien. So wurde ein maximaler SIV_{mac239}-Virustiter von ca. $10^{9,9(+/-1,4)}$ (CEMx174: $10^{10,3}$; C8166: $10^{9,5(+/-1,4)}$) in beiden Zelllinien detektiert. Im Falle einer HIV-1 Infektion unterschied sich der maximale Virustiter mit $10^{7,8}$ Viruskopien/mL in C8166 und $10^{5,3}$ Viruskopien/mL in CEMx174 Zellen erheblich.

Um die Prozessierung genauer zu untersuchen, könnten ein siRNA Knockdown der Enzyme Dicer und/oder Drosha Aufschluss bringen. Auch könnte eine Überexpression der pre-miRNAs in Monozyten, welche Dicer nur gering oder gar nicht exprimieren (Coley et al., 2010), Einblicke über die Prozessierungsmechanismen viraler miRNAs in Zellen geben.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der kodierten miRNA in einer SIV Infektion untersucht.

5.4 Infektion der transgenen Zelllinien mit SIV_{mac239} zeigte keinen Unterschied

Ziel des Experimentes war zu untersuchen, ob der von Klase et al. 2009 beschriebene anti-apoptotische Effekt der HIV-miR-TAR auch mit der in dieser Arbeit identifizierten SIV-miR-TAR übereinstimmt.

Die von Klase publizierten Daten wurden mittels zwei latent-infizierter Zelllinien HLM-1 (HeLaT4⁺ + HIV-1_{IIIIB}) und ACH-2 (CEM + HIV-1_{LAV}) mittels FACS generiert, als Kontrolle dienten die zwei uninfizierten Zelllinien HeLaT4⁺ und CEM. Für beide Zelllinien wurde zuvor die Expression der HIV-miR-TAR nachgewiesen. Die Apoptose wurde mittels Unterernährung der Zellen eingeleitet. Nach 4 Tagen zeigte sich, dass die latent infizierten Zelllinien eine geringere, stressbedingte Apoptoseaktivität im Vergleich zu den uninfizierten Zelllinien zeigten (Klase et al., 2009). Auch konnte dieser Effekt durch Herunterregulation der maturen-miRNA in HLM-1 Zellen die gleiche Apoptoseaktivität wie in HeLaT4⁺ Zellen neutralisiert werden.

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien C8166/CEMx174-SIVTAR und C8166/CEMx174-HIVTAR mit SIV_{mac239} (MOI 0,01) parallel infiziert. Es zeigten sich keine Auswirkungen der pre-miRNA auf die Replikation des Virus. Das Virus zeigte dieselben Replikationskurven im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (transduzierte Zellen ohne Target, C8166/CEMx174-pBabe leer) und genetisch unveränderter Zellen (C8166, CEMx174). Auch der von Klase et al. beschriebene anti-apoptotische Effekt der HIV-1-miR-TAR konnte weder in den T-Zelllinie noch in der T/B-Hybridzelllinie mit transduzierter pre-HIV-miR-TAR noch mit pre-SIV-miR-TAR gezeigt werden (Klase et al., 2009). Die transgenen Zelllinien zeigten an dpi 7 der Infektion dasselbe infektionsbedingte Synzytienbildung und das Absterben der Zellen ab dpi 9 im Verhältnis zu den transduzierten Zellen ohne Target.

In den transgenen Zelllinie C8166 und CEMx174 konnte weder mit der integrierten pre-miR-SIV-TAR noch mit der pre-miR-HIV-TAR nach Infektion mit SIV_{mac239} sowohl an Endpunkt der Infektion als auch während des Infektionsverlaufes waren keine Veränderungen, weder lichtmikroskopisch noch zellzahlbedingt, erkannt werden. Auch in der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzelllinie war eine Veränderung detektierbar. Zudem ist in den von Klase verwendeten Zelllinien das komplette provirus-Genom integriert und nicht ausschließlich die pre-miRNA. Die in dieser Arbeit generierten Zellen weisen jedoch eine starke Überexpression an der zu

untersuchenden pre-miRNAs HIV-miR-TAR und SIV-miR-TAR auf, somit wäre zu erwarten, dass der Effekt eher stärker und eindeutiger ist.

Wie oben erwähnt wurden die von Klase nachgewiesene anti-apoptotische Effekt der HIV-miR-TAR in latent -infizierten HLM-1 (HeLaT4⁺ + HIV-1_{IIIB}) und ACH-2 (CEM + HIV-1_{LAV}) im Vergleich zu den nicht infizierten HeLaT4⁺ und CEM-Zelllinien mittels FACS detektiert. Hierbei zeigten die HLM-1 Zelllinien annähernd keine Apoptose im Verhältnis zu der uninfizierten HeLaT4⁺-Zelllinie (Klase et al., 2009). Auch konnte in diesen Zelllinien eine Dicer-Abhängigkeit und HIV-miR-TAR-Spezifität des Effektes detektiert werden (Klase et al., 2009). In der T-Zelllinie ACH-2 konnte die Arbeitsgruppe jedoch nur einen sehr geringen Anstieg des anti-apoptotischen Effektes im Vergleich zu den CEM-Zellen detektieren (Klase et al., 2009). Es ist also davon auszugehen, dass der anti-apoptose Effekt zellbedingt ist.

In dieser Arbeit wurde der anti-apoptotische Effekt der HIV-miR-TAR und der SIV-miR-TAR jedoch ausschließlich in Lymphozyten-generierten Zelllinien (T bzw. T/B-Zellen) untersucht. Diese T-Zelllinien haben den Vorteil, dass sie CD4 „natürlich“ exprimieren und aus den HIV-Wirtszellen generiert wurden. Somit konnte ein näherer Bezug zu der *in vivo*-Situation aufgewiesen werden.

Hierbei ist zu beachten, dass die SIV-miR-TAR zwar wie die von Klase beschriebene HIV-miR-TAR in der TAR-Region kodiert ist, sich die Sequenzen indes jedoch unterscheiden. Im Speziellen unterscheiden sie sich unter anderem in der genauen Lage der miRNA im Genom (HIV-miR-TAR-5p: 455-474; HIV-miR-TAR-3p: 490-510 (Klase et al., 2007); SIV-miR-TAR-5p: 779-791). Auch ist die für die Bindung an das Target wichtige „seed-region“ (Nukleotide 2-7 des 5`-Ende der miRNA, Bartel et al., 2009) verschieden (HIV-miR-TAR-5p: GUCUCU, HIV-miR-TAR-3p: UCUCUG (Klase et al., 2007); SIV-miR-TAR-5p UCUGCG), was für unterschiedliche Targets spricht.

Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass der anti-apoptotischen Effekt der HIV-TAR miRNA nicht auf die SIV-miR-TAR zutrifft und die SIV-miR-TAR eine andere Funktion in der Virusreplikation und/oder Wirtsantwort hat.

Zudem ist SIV eine Krankheit des Affen und nicht des Menschen, sodass für eine genauere Untersuchung der SIV-miR-TAR in Affenzellen, wie z.B. RhesusaffenT-Zellen, zur genauen Funktion notwendig ist. Vielleicht würde sich hier der anti-apoptotische Effekt der HIV-miR-TAR bestätigen.

Dass sich miRNAs humaner Viren nicht hundertprozentig/komplett auf verwandte Viren des nicht humanen Primaten übertragen lassen, wurde bereits mehrfach gezeigt. So ist nur eine (von bisher vierzehn bekannten) miRNA des Rhesus Cytomegalovirus

homolog zum humanen Cytomegalovirus (Hancock et al, 2012). Dagegen haben die nahverwandten Viren Herpes B und HSV-1/-2 keine übereinstimmende miRNA (Amen und Griffiths, 2011).

Zur näheren Analyse der Funktion der SIV-miR-TAR wäre sicherlich eine Targetanalyse mit anschließender Validierung der Bindung der nächste Schritt. Dieses könnte genaue Angaben über Bindungspartner und mögliche Konsequenzen über eine Herunterregulation dieser für den Virus wie auch für den Wirt bringen.

Für die HIV-miR-TAR erfolgte eine erste Target-Analyse von Klase et al., hierbei haben sie ihr Augenmerk jedoch hauptsächlich auf den von ihnen postulierten anti-apoptischen Effekt gelegt (Klase et al., 2009). Dieser konnte für die SIV-miR-TAR jedoch nicht beobachtet werden.

5.5 Infektion der transgenen Zelllinien mit $\Delta 7$ Mutanten zeigte keine Komplementierung

Um die Funktion der SIV-miR-TAR und HIV-miR-TAR in der Virusinfektion näher zu untersuchen, wurden die transgenen Zelllinien C8166 SIV-TAR und C8166 HIV-TAR mit defizienten „*virus like particles*“ (VLPs) infiziert. Die VLPs weisen eine $\Delta 7$ Basen Deletion in der 5'-und/oder 3'-R-Region von SIV_{mac239} auf. Die R-Region ist ein Teil der TAR-Region, durch die Mutation der R-Region wurde die Struktur der pre-SIV-miR-TAR so verändert, dass die mature miRNA nicht mehr prozessiert werden kann. Als Kontrolle wurden die „C8166 pBabe leer Zelllinie“ (transduzierte C8166 ohne Insert) und das Wildtyp VLP R53 (VLP ohne Deletion in der SIV R-Region) verwendet.

Hat die SIV-miR-TAR eine Funktion in der Infektion, der Insertion oder der Replikation des Virus, so sollte in der transgenen Zelllinie C8166 SIV-TAR eine Komplementierung der mutierten pre-miRNA im VLP im Vergleich zu dem Wildtyp erfolgen. In der Kontrollzelllinie „C8166 pBabe leer“ sollte sich jedoch keine Komplementierung ereignen. Die zweite transgene Zelllinie C8166 HIV-TAR wurde zum Vergleich parallel mitgeführt, hier wurde ebenfalls keine Komplementierung erwartet.

Da die unterschiedlichen VLPs jedoch verschiedene Packeffizienzen aufweisen (Brandt et al., 2006) und nicht ausgeschlossen werden kann, dass Nebeneffekte detektiert werden, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Analyse der infizierten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil an GFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Neben den SIV_{mac239}-LTR's und dem SIV_{mac239}-gag Protein kodiert der virale

Vektor das Grün fluoreszierende Protein (GFP). Als Positivkontrolle diente wiederum das Wildtyp-VLP (R53). Die Analyse der Daten zeigte einen starken Unterschied in der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen der T-Zelllinie C8166 (maximale Anteil 7,86%) und der T/B-Hybridzelllinie CEMx174 (maximale Anteil 1,89%) in der Kontrollzelllinie pBabe leer 72h nach der Infektion mit dem Wildtyp-VLP (R53), sodass, wie auch im Falle einer SIV_{mac239} Infektion, von einer Zellspezifität des Virus (bzw. hier VLP) auszugehen ist.

Die $\Delta 7$ Mutanten VLPs zeigen dagegen eine noch geringe Konzentration an GFP-exprimierenden Zellen in allen VLP-infizierten Zellkulturen auf (C8166: 0,97 – 0,17; CEMx174: 0,2 – 0,02). Dies beruht zum einen sicherlich auf der von Brandt et al. beschriebenen Packeffizienzen und Infektiosität der VLPs (Brandt et al., 2006) sowie der beobachteten Zellspezifität der VLPs. Aufgrund dieser Beobachtung wurden anschließend T-Zelllinien C8166, mit und ohne Inserierter pre-miRNAs, für die weitere Untersuchung verwendet.

Die Replikation der verschiedenen VLPs in den Zielzellen wurde mittels qRT-PCR gegen das im Vektor enthaltende SIV_{mac239}-*gag*-Transkript detektiert. Die Infektion erfolgte in Duplikaten, wie auch die Detektion in Duplikaten detektiert wurde. Zur Normalisierung wurde GAPDH parallel mitgeführt.

Es konnte keine Komplementierung von $\Delta 7$ Mutanten VLPs in den transgenen Zelllinien (C8166 SIV-TAR und C8166 HIV-TAR) nachgewiesen werden. Auch zeigten die Wildtyp-VLP keine signifikanten Unterschiede in der relativen *gag*-Expression in den verschiedenen Zelllinien. Dies unterstützt die zuvor gezeigten Infektionen der transgenen Zelllinien mit SIV_{mac239}.

Jedoch konnten signifikante Unterschiede in der relativen *gag*-Expression der verschiedenen VLPs in den transgenen Zelllinien im Vergleich zu der Kontrollzelllinie im Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur detektiert werden. So zeigten alle VLPs-Infektionen der transgenen Zelllinien signifikante Unterschiede zu der Kontrollzelllinie, unabhängig von den verwendeten VLP-Mutanten. Auch zwischen der C8166 SIV-TAR und der C8166 HIV-TAR Zelllinien sind bei der Deletionsmutante R53 $\Delta 7$ ($\Delta 7$ -Deletion in der 5' und der 3'R-Region) und der R3 Δ R5 (Deletion der kompletten 5' R-Region). Nur im Falle des R5R3 $\Delta 7$ ($\Delta 7$ -Deletion ausschließlich der 3'R-Region) konnte keine Signifikanzen detektiert werden.

Die Unterschiede in der relativen *gag*-Expression können zum einen durch Veränderungen des Genoms in der Zelllinie liegen, sodass die Transduktion eventuell eine Infektion der Zellen negativ beeinflusst, womit die TAR miRNAs (sowohl von SIV_{mac239} wie auch von HIV-1) einen anti-viralen Effekt im Falle einer Infektion der hier

verwendeten VLPs haben. Im Gegensatz dazu zeigten die pre-miRNAs jedoch keinen Einfluss auf eine SIV_{mac239} Infektion. Da die VLPs mithilfe eines retroviralen Vektorsystems basierend auf dem Murinen-Leukämievirus (*gag*, *pol*) und dem *env*-Protein des Vesikular-Stomatitisvirus bestehen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die pre-miRNAs oder/und die miRNAs selbst einen oder auch keinen Einfluss auf die Infektion einer dieser beiden Viren hat. Allerdings sind zu dem Einfluss von viralen miRNAs auf andere Viren noch keine Daten veröffentlicht.

5.6 Die SIV-miR-TAR-5p konnte *in vivo* nachgewiesen werden

Zelllinien werden aus meist durch Krebs veränderten Zellen generiert und/oder die Zellen werden nach der Isolation genetisch so verändert, dass sie über einen längeren Zeitraum kultiviert werden können. Auch wurden Zelllinien (wie z.B. die HeLaT4⁺) genetisch so verändert, dass sie von Viren infiziert werden können, obwohl sie *in vivo* keine Zielzelle des Virus darstellen (z.B. HeLaT4⁺ + HIV-1). So sind *in vitro*-Daten zwar meist eindeutig, sollten jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da die Proteinexpression und zelluläre Bestandteile eventuell verändert sein können und Veränderungen nicht ausgeschlossen werden können. Auch wurde beschrieben, dass die miRNAs let-7 und lin-4 *in vivo* nicht die gleichen Funktionen aufzeigen wie zuvor *in vitro* vermutet wurde (Omoto et al., 2004).

In HIV-1 wurden bis heute die miRNA TAR und N-367 *in vivo* bzw. *ex vivo* (im HIV-1 infizierten Patienten) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der inserierte shRNA („*short hairpin*“) der miR-N367 (kodiert in dem Negativ factor (Nef) Gen) im Mausmodell die korrespondierende *nef*-Expression inhibiert und ein virusbedingter Gewichtsverlust verhindert werden konnte (Omoto et al., 2004). 2008 konnte gezeigt werden, dass die HIV-miR-TAR in *ex vivo* infizierten primären CD4⁺-Zellen exprimiert wird (Ouellet et al., 2008). Hierbei konnten neben der maturen HIV-miR-TAR (nt 40-59) verschiedene Zwischenstufen der Synthese detektiert werden (Ouellet et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde aus logistischen Gründen das Vorhandensein der SIV-miR-TAR in humanen Zelllinien untersucht. Um das Vorhandensein der SIV-miR-TAR unter bestmöglichen physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde diese *in vivo* in Rhesusaffen nachgewiesen.

Für den Nachweis wurden CD4⁺-Zellen aus Blut von 3 infizierten und 4 uninfizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) isoliert. Hierbei wurden die Rhesusaffen mit dem RT-SHIV-Virus infiziert. Dieses Virus ist eine Chimäre aus SIV und HIV-1, bei dem die

Reverse Transkriptase von SIV_{mac239} gegen die HIV-1-Reverse Transkriptase ausgetauscht wurde (Überla et al., 1995).

Nachdem die Zellen isoliert wurden, wurde die miRNA (<200bp) aufgereinigt. Mittels des Poly-Adenylierungs-Assays wurde diese in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung einer spezifischen qRT-PCR detektiert. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der parallel mitgeführten hsa-miR-16.

Wie zuvor beschrieben diente die hsa-miR-16 der Arbeitsgruppe um Ouellet et al. als Kontrolle und zeigte sich im Northern Blot als nicht reguliert (Ouellet et al., 2008). Jedoch wurde sie in anderen Publikationen *in vitro* sowie in humanen Patienten mit HIV-1-Infektion als reguliert beschrieben (Houzet et al., 2008; Witwer et al., 2012). Da sich die hsa-miR-16 in dem hier verwendeten *in vitro*-Assay als nicht reguliert zeigte, wurde sie trotz allem zur Kontrolle und Normalisierung verwendet. Auch zeigt die Rhesusaffen-miR-16 die gleiche Sequenz im Vergleich zu der humanen miR-16 (Griffiths-Jones, 2006:miRBase Release 18, Nov.2011).

Die uninfizierten Tiere zeigten eine negative Regulation. Da davon auszugehen ist, dass in den uninfizierten Tieren keine SIV-miR-TAR exprimiert wird, sind die negativen Regulationen keine Verwunderung und als Hintergrund anzusehen. Dagegen zeigten die infizierten Rhesusaffen eine 2,98fache Expression über der Nachweisgrenze. Es ist jedoch eine starke Streuung detektierbar, diese ist in *in vivo*-Experimenten sicherlich durch individuelle Unterschiede nicht verwunderlich und nur durch eine hohe Probenzahl auszugleichen. Ein durchgeführter t-Test mit Korrektur nach Welch zeigte eine Signifikanz ($p=0,077$) auf.

In der Literatur sind leider keine Angaben Expressionsprofilen von viralen miRNAs im Zeitverlauf einer Infektion zu finden. Dennoch ist der Expressionsverlauf einer oder mehrerer miRNAs im Zeitverlauf einer Infektion sicherlich von großer Bedeutung, da dies Rückschlüsse auf eine Korrelation zum Krankheitsverlauf zulässt.

Eine Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen miRNA SIV-miR-TAR-5p im Infektionsverlauf ist im Speziellen interessant. Die hier gezeigten *in vitro*-Daten lassen den Schluss zu, dass die SIV-miR-TAR-5p direkt nach der Infektion (dpi2; wenn auch im geringeren Massen) exprimiert wird und detektiert werden kann, sodass hier eine Möglichkeit für die Etablierung eines schnellen und effektiven Tests besteht.

In vitro zeigte die SIV-miR-TAR die höchste relative Expression an dpi 8 nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen erste Synzytien-Bildungen (dpi 7), jedoch hatte das Absterben der Zellen noch nicht eingesetzt (ab dpi 9), sodass das Expressionsmaximum der SIV-miR-TAR ebenfalls ein Indikator für eine

morphologische Veränderung der T-Zellen vor einer virusbedingten Depletion sein kann.

5.7 Nachweis im Virion: In C8166 replizierender SIV_{mac239} schließt TAR-5p in das Viruspartikel ein

Nach der Identifizierung und Charakterisierung der SIV_{mac239}-kodierte SIV-miR-TAR-5p *in vitro* und *in vivo* ist dennoch die Funktion dieser immer noch unklar. So zeigte sie den von Klase und Kollegen beschriebenen anti-apoptischen Effekt der HIV-miR-TAR nicht (Klase et al., 2009). Dies und die Tatsache, dass die HIV-miR-TAR-5p sowie die HIV-miR-TAR-3p verschiedene „*seed-regions*“ aufweisen, lässt den Schluss zu, dass die SIV-miR-TAR eine andere Funktion in der Virusreplikation erfüllt. Um ein genaueres Bild der Funktion der SIV-miRNA zu bekommen, wurde das Vorhandensein der miRNA im Virion untersucht.

Neben den viralen Proteinen und den viralen Genom packen Viren auch zelluläre Proteine (z. B. Proteine der APOBEC3-Familie; Wiegand und Cullen, 2007) und kleine zelluläre RNA, besonders tRNAs, in den Viruspartikel ein (Pavon-Eternod et al., 2010). So werden zelluläre tRNAs unter anderem von den Retroviren als Primer zur Initialisierung der reversen Transkription verwendet (Gen et al., 2002) und hierfür in das Virion verpackt. Die tRNA^{Trp} wird vom Rous Sarcoma Virus (RSV) sowie allen anderen Mitgliedern der Avian-Leukosis-Sarcoma-Viren (ALSV) als Primer genutzt (Peters und Hu, 1980; Sawyer und Dahlberg, 1973; Waters und Mullin, 1977). Im Moloney Murines Leukämievirus (Mo-MuLV) wird unter anderem die tRNA^{Pro} als Primer gebraucht (Onafuwa-Nuga et al., 2005). Die tRNA^{Lys3} hingegen findet Verwendung als Primer der reversen Transkriptase in HIV-1 (Mak und Kleimann, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einschluss von Nukleinsäuren im Viruspartikel untersucht. Hierfür wurde infektiöser Zellkulturüberstand gesammelt und die Viruspartikel aufgereinigt. Als Kontrolle wurde Zellkulturüberstand uninfizierter Zellen parallel aufbereitet. Um einen Aufschluss von eventuell mit isolierten lysierten Zellen zu verhindern, wurden die Proben vor der Isolation der RNA mittels DNase 1, RNase A und RNase One verdaut, sodass alle freizugänglichen Nukleinsäuren hydrolysiert wurden. Die eingeschlossenen Nukleinsäuren wurden mittels Trizol isoliert. Eine Hydrolyse der Probe mittels DNase 1 zeigte, dass die eingeschlossenen Nukleinsäuren

zu 95% aus RNA bestehen, von dieser waren ca. 1% virale RNA, sodass 99% der Probe unbekannt war. Zur Detektion der SIV-miR-TAR erfolgte anschließend eine Anreicherung der Nukleinsäuren <200 bp (miRNA Fraktion). Die Anreicherung der kleinen RNAs wurde mittels des Bioanalyser bestätigt, welcher RNA um ca. 20bp detektieren konnte. Eine qRT-PCR mit spezifischen SIV-miR-TARPrimern (Stem-Loop-Assay; Chen et al., 200x) zeigte eine erhöhte Expression der SIV-miR-TAR in der SIV_{mac239}-infizierten Probe.

Da eine Nebenreaktion mit genomischer Virus-RNA in der miRNA-Fraktion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die Aufreinigung mittels *gag* spezifischer qRT-PCR überprüft. Es konnte keine *gag*-Transkripte oder Bruchstücke detektiert werden. Aufgrund des Vergleiches der SIV-infizierten Probe mit uninfiziertem Zellkulturüberstand wurden medium bedingte Verunreinigungen der Proben, wie z. B. FCS, ausgeschlossen. Es ist jedoch in Betracht zuziehen, dass eine Infektion Stress für die Zellen bedeutet und nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben dem Virion Vesikel aufgereinigt worden sind, die stress- und nicht infektionsbedingt produziert wurden. Auch haben Mikrovesikel eine Rolle in der Immunaktivierung (Admyre et al., 2006; Raposo et al., 1996), der intrazellulären Kommunikation (McLauchlan et al., 1992) sowie in der Immunsuppression (Dukers et al., 2000), was durch die Infektion angeregt wurde. Es ist bekannt, dass Mikrovesikel kleine RNAs wie miRNAs einschließen, welche anschließend mit aufgereinigt wurden. Mikrovesikel sind unter anderem für den Transport von funktionellen miRNAs verantwortlich (Pegtel et al., 2010). Somit ist es möglich, dass die detektierte RNA nicht ausschließlich aus dem aufkonzentrierten Virion stammt, sondern in Vesikel eingeschlossene kleine RNAs ebenfalls aufgereinigt und detektiert wurden.

Bei der Detektion der SIV-miR-TAR kann nicht ausdrücklich diskriminiert werden, ob sich die miRNA im Virion oder aber in einem Vesikel integriert und somit transportiert wird. Aufgrund der Größe der Vesikel und Exosome in Vergleich zum Virion ist die Aufreinigung von reinem Virion schwierig (Cantin et al., 2008).

Es wurden verschiedene Ansätze publiziert, wie z. B die Aufreinigung von Virionen über Optiprep Gradienten (Cantin et al., 2008) oder Isolation der Exosome und Mikrovesikel, welche jedoch aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Da in beiden, Virion und Vesikeln, miRNAs eingeschlossen werden können, kann der Einschluss der miRNA in allen Vesikelformen (Virion, Exosom und/oder Microvesikel) unterschiedliche wie auch gleiche Aufgaben erfüllen. Aufgrund der Lage der miRNA in

der für die Transkription wichtigen TAR-Region im Virus besteht die Möglichkeit, dass die SIV-miR-TAR ebenfalls eine Rolle in der Transkription spielt. So könnte die detektierte miRNA SIV-miR-TAR eine wichtige Rolle in der Replikation des SI-Virus spielen. Zudem könnte sie durch die Bindung an das virale Genom eine inhibierende Wirkung haben.

Trotzdem zeigt eine Überexpression in den Zielzellen C8166 und CEMx174 keine Unterschiede in der Replikation von SIV_{mac239}. Allerdings ist hierbei keine Isolierung der Virionen erfolgt, sodass keine Aussage über ein erhöhtes Vorkommen/ Einschließen der SIV-miR-TAR in die Vesikel getroffen werden kann. Auch wurde mit dem Zellkulturüberstand keine Reinfektion oder IPAP durchgeführt, sodass ebenfalls keine Aussage über eine erhöhte Infektiosität der Virionen gemacht werden kann. Da die Kurven der transgenen Zellen parallel zu der Kontrolle verlaufen, ist jedoch nicht von einer erhöhten Infektiosität auszugehen.

Auch ist durch das Vorhandensein der SIV-miR-TAR-5p im Virion und/oder Vesikel in Betracht zu ziehen, dass die SIV-miR-TAR somit *in vivo* in Zellen sein kann und dort Funktionen haben kann, welche nicht durch SIV infiziert werden können. Daher wäre eine Analyse verschiedener Zelltypen und Geweben sicherlich von großem Interesse, konnte aber aufgrund der begrenzten Zeit nicht in dieser Arbeit untersucht werden.

6 Zusammenfassung

2013 sind ca. 1,5 Millionen Menschen weltweit an den Folgen von AIDS gestorben. 2,1 Millionen Menschen infizierten sich neu mit HIV. Somit ist AIDS und HIV eine der gefährlichsten Krankheiten unserer Zeit (UNAIDS/WHO, 2013). Um neue Therapien gegen AIDS und HIV zu entwickeln wurden verschiedenste Ansätze, wie der RNAi-Mechanismus, untersucht. RNAi ist ein Genregulations-Mechanismus, dessen Aufgabe die Regulation von zellulärer Genexpression ist (beschrieben in He et al., 2004). Mediatoren der iRNA sind meist microRNAs (Hutvanger et al., 2002). MicroRNAs (miRNAs) sind kleine einzelsträngige RNAs, die durch Inhibition der Translation oder Degradation von Ziel-mRNAs ein wichtiges Hilfsmittel bei der posttranskriptionellen Regulation von Zellfunktionen (Liu et al., 2011) sind. Die Regulation von verschiedenen miRNAs konnte bereits in HIV-1 infizierten Zellen nachgewiesen werden (Sun et al. 2011). Neben zellulären miRNAs haben auch virale miRNAs einen Einfluss auf die Translation von zellulärer und viraler mRNA. SIV als naher Verwandter des HI-Virus eignet sich besonders gut, um viral kodierte miRNAs *in vitro* und *in vivo* auch im Verlauf einer Infektion zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden die Identifizierung einer SIV_{mac239} kodierten miRNA sowie deren Charakterisierung und *in vivo*-Analysen durchgeführt. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden C8166 und CEMx174 Zellen mit SIV_{mac239} infiziert (MOI 0,01). Der Infektionsverlauf wurde mittels des TZM-bl Tests und Immuno-Peroxidase Anti-Peroxidase Assays (IPAP) nachgewiesen. Die Virusreplikation wurde durch SIV-gag-spezifischen Primer mit Hilfe der qRT-PCR detektiert. Anschließend wurden sowohl aus den infizierten Zellen, als auch den Zellkulturüberständen kleine RNAs, wie miRNAs isoliert. Es zeigte sich, dass SIV_{mac239} eine RNA mit 22bp Länge synthetisiert. Diese konnte unter Verwendung zweier spezifischer miRNA-Assays detektiert werden. Das 3'-Ende der kleinen RNA konnte an der Base 802 des SIV_{mac239}-Genoms bestimmt werden. Die detektierte miRNA liegt somit in der TAR-Region des SIV_{mac239}-Genoms und wurde SIV-miR-TAR-5p benannt. Die Expression im Verlauf einer Infektion zeigte einen stetigen Anstieg der RNA bis Tag 8 nach der Infektion und einem anschließenden Abfall.

Eine Überexpression in transgenen Zelllinien zeigte keinen Einfluss der SIV-miR-TAR in der Virusreplikation oder in der Apoptose der Zellen. Eine anti-apoptotische Wirkung konnte in HIV-miR-TAR transduzierten Zellen ebenfalls nicht nachgewiesen und bestätigt werden. Infektionen der transgenen Zelllinien mit Deletions-Mutanten VLPs zeigten keine Komplementierung der SIV-miR-TAR-5p und ebenfalls keinen Einfluss der SIV-miR-TAR-5p in der SI-Virusreplikation. Eine Isolation von Virionen aus dem Zellkulturüberstand ergab, dass die SIV-miR-TAR-5p in Mikrovesikeln (Virion und/oder Exosomen etc.) eingeschlossen wird. Eine erste *in vivo*-Pilotstudie mit 3 infizierten und 4 uninfizierten Rhesusaffen zeigte eine signifikante Erhöhung der Expression der SIV-miR-TAR in infizierten CD4⁺-Zellen.

Im Weiteren sollte die genaue Funktion und *in vivo* Lokalisation ergründet werden, um einem weiteren Einblick und die mögliche therapeutische Relevanz der SIV-miR-TAR-5p abschätzen zu können.

7 Abstract

Micro RNAs (miRNAs) are small (approx. 20 nucleotides) non coding RNAs that can regulate gene expression posttranscriptionally by binding to mRNA. In humans, different roles for miRNA have been identified at the level of cell cycle, proliferation, differentiation, innate immune signalling and antiviral mechanisms. miRNAs can influence pathogenesis of viral infections including influenza, herpes viruses and HIV. HIV for example modulates levels of several miRNAs at various time points after infection but is itself also regulated by host miRNAs. The simian immunodeficiency virus (SIV) is excellent for the study of viral infections and host responses to infection.

In order to assess the potential role of miRNAs in regulating infection of the simian immunodeficiency virus (SIV), in this thesis I used two different Human T cell leukemia cell lines named C8166 and CEMx174. Viral infection and viral titer measurement was analysed using the TZM-bl-assay and immuno-peroxidase anti-peroxidase-assay. Virus replication was detected via qRT-PCR using SIV-gag-specific primers. Small RNAs were isolated from cell culture supernatant and cells infected with SIV.

Using two specific miRNA-qRT-PCR assays we could show, that SIV_{mac239} synthesizes a small, 22bp long RNA. This miRNA is located at the TAR region of SIV_{mac239} and 3'-ends at base 802. We named it SIV-miR-TAR-5p.

During infection the SIV-miR-TAR-5p was significantly increased until day 8 post infection, thereafter the expression of SIV-miR-TAR-5p decreased again. Interestingly, overexpression of SIV-mir-TAR-5p in transgenic cells revealed no influence at virus replication or apoptosis. Although Klase et al. could show an anti-apoptotic effect of the HIV-miR-TAR, we did not detect any anti-apoptotic properties in HIV1-mir-TAR transduced cells. Using different SIV_{mac239}- Δ R variants were not able to detect a complementation or an influence on the infection. Furthermore we could isolate virions of the cell culture supernatant and could show for the first time that SIV-miR-TAR-5p is included in microvesicles, like virions or exosomes. A first *in vivo*-pilot study, using 3 infected and 4 non infected rhesus monkeys, showed a significant increase of SIV-miR-TAR-5p expression in infected monkeys.

8 Bibliografie

8.1 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: 284-291.

Admyre, C., Johansson, S. M., Paulie, S. & Gabrielsson, S. (2006) Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* 36: 1772-1781.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K., Raff, M. & Walter, P. (2001) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-Vch, 69469 Weinheim.

Amen, M. A. & Griffiths, A. (2011) Identification and expression analysis of herpes B virus-encoded small RNAs. *J Virol* 85: 7296-7311.

Andersen, J. L., Le Rouzic, E. & Planelles, V. (2008) HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85: 2-10.

Andersson, M. G., Haasnoot, P. C., Xu, N., Berenjian, S., Berkhout, B. & Akusjarvi, G. (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79: 9556-9565.

Aparicio, O., Carnero, E., Abad, X., Razquin, N., Guruceaga, E., Segura, V. & Fortes, P. (2010) Adenovirus VA RNA-derived miRNAs target cellular genes involved in cell growth, gene expression and DNA repair. *Nucleic Acids Res* 38: 750-763.

Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I. & Fortes, P. (2006)

- Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol* 80: 1376-1384.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. & Bartel, D. P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64-71.
- Bannwarth, S. & Gatignol, A. (2005) HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* 3: 61-71.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F. et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
- Bennasser, Y., Le, S. Y., Benkirane, M. & Jeang, K. T. (2005) Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22: 607-619.
- Bennasser, Y., Le, S. Y., Yeung, M. L. & Jeang, K. T. (2004) HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology* 1: 43.
- Bennasser, Y., Yeung, M. L. & Jeang, K. T. (2006) HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem* 281: 27674-27678.
- Berkhout, B. (1992) Structural features in TAR RNA of human and simian immunodeficiency viruses: a phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res* 20: 27-31.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11: 50-55.
- Bixby, J. G., Laur, O., Johnson, W. E. & Desrosiers, R. C. (2010) Diversity of envelope genes from an uncloned stock of SIVmac251. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 1115-1131.

- Bourinbaiar, A. S. (1994) The ratio of defective HIV-1 particles to replication-competent infectious virions. *Acta Virol* 38: 59-61.
- Boyce, M. & Roy, P. (2007) Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. *J Virol* 81: 2179-2186.
- Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L. & Gruber, J. (2011) Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Res* 39: 675-686.
- Brandt, S., Grunwald, T., Lucke, S., Stang, A. & Uberla, K. (2006) Functional replacement of the R region of simian immunodeficiency virus-based vectors by heterologous elements. *J Gen Virol* 87: 2297-2307.
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. & Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34: 263-264.
- Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H. G. & Fuller, S. D. (2003) Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* 22: 1707-1715.
- Broder, S. & Gallo, R. C. (1984) A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* 311: 1292-1297.
- Bünthe, H. & Bünthe, K. (2004) *Das Spektrum der Medizin: Illustriertes Handbuch von den Grundlagen bis zur Klinik*. Schattauer GmbH, Hölderlinstr. 3, 70174 Stuttgart, Germany, Stuttgart, Germany.
- Bushman, F. D. (2002) Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol* 261: 165-177.
- Cantin, R., Diou, J., Belanger, D., Tremblay, A. M. & Gilbert, C. (2008) Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 338: 21-30.

Carletti, F., Bordi, L., Chiappini, R., Ippolito, G., Sciarrone, M. R., Capobianchi, M. R., Di Caro, A. & Castilletti, C. (2007) Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. *Am J Trop Med Hyg* 77: 521-524.

Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K. & Kleiman, L. (2002) Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J Virol* 76: 13111-13115.

Checkley, M. A., Luttge, B. G. & Freed, E. O. (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410: 582-608.

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R. et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179.

Chen, M., Granger, A. J., Vanbrocklin, M. W., Payne, W. S., Hunt, H., Zhang, H., Dodgson, J. B. & Holmen, S. L. (2007) Inhibition of avian leukosis virus replication by vector-based RNA interference. *Virology* 365: 464-472.

Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. & Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744.

Childs, G., Fazzari, M., Kung, G., Kawachi, N., Brandwein-Gensler, M., McLemore, M., Chen, Q., Burk, R. D., Smith, R. V. et al. (2009) Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 174: 736-745.

Cho, W. C. (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 6: 60.

Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S. et al. (2005) miR-15 and miR-16 induce

apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944-13949.

Clapham, P. R. & McKnight, A. (2002) Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* 83: 1809-1829.

Cliffe, A. R., Nash, A. A. & Dutia, B. M. (2009) Selective uptake of small RNA molecules in the virion of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 83: 2321-2326.

Coburn, G. A. & Cullen, B. R. (2002) Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 76: 9225-9231.

Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Sanchez del Cojo, M., Mateos, E. & Alcami, J. (2010) Dual role of host cell factors in HIV-1 replication: restriction and enhancement of the viral cycle. *AIDS Rev* 12: 103-112.

Coley, W., Van Duyne, R., Carpio, L., Guendel, I., Kehn-Hall, K., Chevalier, S., Narayanan, A., Luu, T., Lee, N. et al. (2010) Absence of DICER in monocytes and its regulation by HIV-1. *J Biol Chem* 285: 31930-31943.

Conticello, S. G., Harris, R. S. & Neuberger, M. S. (2003) The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* 13: 2009-2013.

Corbeil, J., Sheeter, D., Genini, D., Rought, S., Leoni, L., Du, P., Ferguson, M., Masys, D. R., Welsh, J. B. et al. (2001) Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4⁺ T cells. *Genome Res* 11: 1198-1204.

Cullen, B. R. (1998) HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93: 685-692.

Cullen et al. (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16: 861-865.

Cullen et al. (2006) Viruses and microRNAs. *Nat Genet* 38 Suppl: S25-30.

Cullen et al. (2009) Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 457: 421-425.

Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M. & Desrosiers, R. C. (1985) Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228: 1201-1204.

Das, A. T., Klaver, B. & Berkhout, B. (1998) The 5' and 3' TAR elements of human immunodeficiency virus exert effects at several points in the virus life cycle. *J Virol* 72: 9217-9223.

Derdowski, A., Ding, L. & Spearman, P. (2004) A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* 78: 1230-1242.

Dictor, M., Lindgren, S., Bont, J., Anzen, B., Lidman, K., Wallin, K. L., Naver, L., Bohlin, A. B. & Ehrnst, A. (2001) HIV-1 in placentas of untreated HIV-1-infected women in relation to viral transmission, infectious HIV-1 and RNA load in plasma. *Scand J Infect Dis* 33: 27-32.

Dolken, L., Perot, J., Cognat, V., Alioua, A., John, M., Soutschek, J., Ruzsics, Z., Koszinowski, U., Voinnet, O. & Pfeffer, S. (2007) Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation. *J Virol* 81: 13771-13782.

Dukers, D. F., Meij, P., Vervoort, M. B., Vos, W., Scheper, R. J., Meijer, C. J., Bloemena, E. & Middeldorp, J. M. (2000) Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165: 663-670.

Ercoli, L., Sarmati, L., el-Sawaf, G., Cochi, S., Lanti, T., Iudicone, P., Guglielmetti, M., Giannini, G., Galluzzo, C. et al. (1995) Plasma viremia titration and RNA quantitation in ICD-p24 negative HIV type-1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1203-1207.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in

Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811.

Forrest, A. R., Kanamori-Katayama, M., Tomaru, Y., Lassmann, T., Ninomiya, N., Takahashi, Y., de Hoon, M. J., Kubosaki, A., Kaiho, A. et al. (2010) Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. Leukemia 24: 460-466.

Frankel, A. D. (1992) Activation of HIV transcription by Tat. Curr Opin Genet Dev 2: 293-298.

Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem 67: 1-25.

Freed, E. O. (2001) HIV-1 replication. Somat Cell Mol Genet 26: 13-33.

Anonymous (2002) Viral late domains. J Virol 76: 4679-4687.

Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res 19: 92-105.

Fu, H. J., Zhu, J., Yang, M., Zhang, Z. Y., Tie, Y., Jiang, H., Sun, Z. X. & Zheng, X. F. (2006) A novel method to monitor the expression of microRNAs. Mol Biotechnol 32: 197-204.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J. et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 224: 500-503.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M. et al. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature 397: 436-441.

Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., Greene, B. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M. & Hahn, B. H. (1992) Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. Nature 358: 495-499.

- Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H. N. & Chen, J. (2004) Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8676-8681.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. & Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305: 1425-1431.
- Göttlinger, H. (2001) HIV-1 Gag: a Molecular Machine Driving Viral Particle Assembly and Release. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 02-2877.
- Gottwein, E. & Cullen, B. R. (2008) Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe* 3: 375-387.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
- Grewe, B. & Uberla, K. (2010) The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *J Gen Virol* 91: 1893-1897.
- Griffiths-Jones, S. (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342: 129-138.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A. J. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140-144.
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. & Kay, M. A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537-541.

-
- Grundhoff, A., Sullivan, C. S. & Ganem, D. (2006) A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *Rna* 12: 733-750.
- Guan, Y., Diallo, K., Detorio, M., Whitney, J. B., Liang, C. & Wainberg, M. A. (2001) Partial restoration of replication of simian immunodeficiency virus by point mutations in either the dimerization initiation site (DIS) or Gag region after deletion mutagenesis within the DIS. *J Virol* 75: 11920-11923.
- Gursansky, N. R., Searle, I. R. & Carroll, B. J. (2011) Mobile MicroRNAs Hit the Target. *Traffic*.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M. & Berkhout, B. (2007) RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25: 1435-1443.
- Haffar, O. & Bukrinsky, M. (2005) Nuclear translocation as a novel target for anti-HIV drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 41-50.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hancock, M. H., Tirabassi, R. S. & Nelson, J. A. (2012) Rhesus cytomegalovirus encodes seventeen microRNAs that are differentially expressed in vitro and in vivo. *Virology* 425: 133-142.
- Harrich, D. & Hooker, B. (2002) Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Rev Med Virol* 12: 31-45.
- Harrich, D., Ulich, C. & Gaynor, R. B. (1996) A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* 70: 4017-4027.
- Harrington, R., Wu, L., Pullen, H. & Emerman, M. (2000) Direct detection of infectious HIV-1 in blood using a centrifugation-indicator cell assay. *J Virol Methods* 88: 111-115.

- Hayes, A. M., Qian, S., Yu, L. & Boris-Lawrie, K. (2011) Tat RNA silencing suppressor activity contributes to perturbation of lymphocyte miRNA by HIV-1. *Retrovirology* 8: 36.
- He, Q. Q., Gu, S. X., Liu, J., Wu, H. Q., Zhang, X., Yang, L. M., Zheng, Y. T. & Chen, F. E. (2011) Structural modifications of quinolone-3-carboxylic acids with anti-HIV activity. *Bioorg Med Chem* 19: 5039-5045.
- Held, D. M., Kissel, J. D., Patterson, J. T., Nickens, D. G. & Burke, D. H. (2006) HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers. *Front Biosci* 11: 89-112.
- Henao-Mejia, J., Liu, Y., Park, I. W., Zhang, J., Sanford, J. & He, J. J. (2009) Suppression of HIV-1 Nef translation by Sam68 mutant-induced stress granules and nef mRNA sequestration. *Mol Cell* 33: 87-96.
- Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C. G., Fehr, C., Junemann, C. & Niepmann, M. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* 27: 3300-3310.
- Hill, M., Tachedjian, G. & Mak, J. (2005) The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* 3: 73-85.
- Hirsch, M. & Curran, J. (1990) *Human Immunodeficiency viruses*, 4th ed. ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Hofacker, I. L. (2009) RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 12: Unit12
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7276-7280.
- Houzet, L., Yeung, M. L., de Lame, V., Desai, D., Smith, S. M. & Jeang, K. T. (2008) MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology* 5: 118.

- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G. & Zhang, H. (2007) Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 13: 1241-1247.
- Hunt, R. D., Blake, B. J., Chalifoux, L. V., Sehgal, P. K., King, N. W. & Letvin, N. L. (1983) Transmission of naturally occurring lymphoma in macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5085-5089.
- Hussain, M. & Asgari, S. (2010) Functional analysis of a cellular microRNA in insect host-ascovirus interaction. *J Virol* 84: 612-620.
- Hussain, M., Taft, R. J. & Asgari, S. (2008) An insect virus-encoded microRNA regulates viral replication. *J Virol* 82: 9164-9170.
- Hussain, M., Torres, S., Schnettler, E., Funk, A., Grundhoff, A., Pijlman, G. P., Khromykh, A. A. & Asgari, S. (2011) West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.*
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. & Zamore, P. D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838.
- Hutvagner, G. & Zamore, P. D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060.
- Imig, J., Motsch, N., Zhu, J. Y., Barth, S., Okoniewski, M., Reineke, T., Tinguely, M., Faggioni, A., Trivedi, P. et al. (2011) microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res* 39: 1880-1893.
- Iorio, M. V., Casalini, P., Piovan, C., Di Leva, G., Merlo, A., Triulzi, T., Menard, S., Croce, C. M. & Tagliabue, E. (2009) microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* 69: 2195-2200.
- Jacque, J. M., Triques, K. & Stevenson, M. (2002) Modulation of HIV-1

replication by RNA interference. *Nature* 418: 435-438.

Johnson, T. & Nath, A. (2011) Immune reconstitution inflammatory syndrome and the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 24: 284-290.

Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577-1581.

Jover-Gil, S., Candela, H. & Ponce, M. R. (2005) Plant microRNAs and development. *Int J Dev Biol* 49: 733-744.

Kannagi, M., Yetz, J. M. & Letvin, N. L. (1985) In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7053-7057.

Karn, J. (1999) Tackling Tat. *J Mol Biol* 293: 235-254.

Anonymous (2000) Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

Kaul, D., Ahlawat, A. & Gupta, S. D. (2009) HIV-1 genome-encoded hiv1-mir-H1 impairs cellular responses to infection. *Mol Cell Biochem* 323: 143-148.

Kaup, F. J., Bingger, K., Matz-Rensing, K., Stahl-Hennig, C., Schneider, T. & Hofmann, P. (2003) [Electron microscopic investigation of CD4+ lymphocyte cell line C8166 after infection with simian immunodeficiency virus (SIV)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110: 142-146.

Keele, B. F., Van Heuerswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V. et al. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.

Kirchhoff, F. (2010) Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell Host Microbe* 8: 55-67.

Klase, Z., Kale, P., Winograd, R., Gupta, M. V., Heydarian, M., Berro, R., McCaffrey, T. & Kashanchi, F. (2007) HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol Biol* 8: 63.

Klase, Z., Winograd, R., Davis, J., Carpio, L., Hildreth, R., Heydarian, M., Fu, S., McCaffrey, T., Meiri, E. et al. (2009) HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology* 6: 18.

Kleiman, L. (2002) tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* 53: 107-114.

Kleiman, L. & Cen, S. (2004) The tRNALys packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1776-1786.

Kleiman, L., Jones, C. P. & Musier-Forsyth, K. (2010) Formation of the tRNALys packaging complex in HIV-1. *FEBS Lett* 584: 359-365.

Klotman, M. E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. & Wong-Staal, F. (1991) Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5011-5015.

Krebs, F. C., Hogan, T. H., Quiterio, S., Gartner, S. & Wigdahl, B. (2002) Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

Krengel, U. (1988) Einführung in die Wahrscheinlichkeitstheorie und Statistik. Verlag Friedrich Vieweg & Sohn, Braunschweig/Wiesbaden.

Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. & Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685-689.

Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S. T.

- & Ghoshal, K. (2006) Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 99: 671-678.
- Lalonde, M. S., Lobritz, M. A., Ratcliff, A., Chamanian, M., Athanassiou, Z., Tyagi, M., Wong, J., Robinson, J. A., Karn, J. et al. (2011) Inhibition of both HIV-1 reverse transcription and gene expression by a cyclic peptide that binds the Tat-transactivating response element (TAR) RNA. *PLoS Pathog* 7: e1002038.
- Lamers, S. L., Fogel, G. B. & McGrath, M. S. (2010) HIV-miR-H1 evolvability during HIV pathogenesis. *Biosystems* 101: 88-96.
- LANL, H. D. (2011) HIV Sequence Database. Los Alamos National Security, LLC, for the U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration.
- Lasser, C., Eldh, M. & Lotvall, J. (2012) Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp*.
- Leavitt, A. D., Rose, R. B. & Varmus, H. E. (1992) Both substrate and target oligonucleotide sequences affect in vitro integration mediated by human immunodeficiency virus type 1 integrase protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 66: 2359-2368.
- Lecellier, C. H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A. & Voinnet, O. (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308: 557-560.
- Lee, C. T., Risom, T. & Strauss, W. M. (2006) MicroRNAs in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78: 129-139.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P. & Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20: 500-505.
- Lee, N. S. & Rossi, J. J. (2004) Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res* 102: 53-58.

Letvin, N. L., Daniel, M. D., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Hunt, R. D., Waldron, L. M., MacKey, J. J., Schmidt, D. K., Chalifoux, L. V. & King, N. W. (1985) Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230: 71-73.

Letvin, N. L., Eaton, K. A., Aldrich, W. R., Sehgal, P. K., Blake, B. J., Schlossman, S. F., King, N. W. & Hunt, R. D. (1983) Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2718-2722.

Levy, J. A. (2011) Virus-host interactions in HIV pathogenesis: directions for therapy. *Adv Dent Res* 23: 13-18.

Levy, J. A., Scott, I. & Mackewicz, C. (2003) Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin Immunol* 108: 167-174.

Lewis, G. D. & Metcalf, T. G. (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 54: 1983-1988.

Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J. et al. (2005) Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11: 944-951.

Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. (2004) APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14: 1385-1391.

Lim, H. G., Suzuki, K., Cooper, D. A. & Kelleher, A. D. (2008) Promoter-targeted siRNAs induce gene silencing of simian immunodeficiency virus (SIV) infection in vitro. *Mol Ther* 16: 565-570.

Lin, J. & Cullen, B. R. (2007) Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* 81: 12218-12226.

Linß, W. F., J (1998) *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie,*

mikroskopische Anatomie. de Gruyter Lehrbuch, Berlin.

Liu, Z., Wei, S., Ma, H., Zhao, M., Myers, J. N., Weber, R. S., Sturgis, E. M. & Wei, Q. (2011) A Functional Variant at the miR-184 Binding Site in TNFAIP2 and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Carcinogenesis*.

Lochmatter, D. & Mullis, P. E. (2011) RNA interference in mammalian cell systems. *Horm Res Paediatr* 75: 63-69.

Loveday, E. K., Svinti, V., Diederich, S., Pasick, J. & Jean, F. (2012) Temporal and strain-specific host microRNA molecular signatures associated with swine-origin H1N1 and avian-origin H7N7 influenza A virus infection. *J Virol*.

Lu, S. & Cullen, B. R. (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* 78: 12868-12876.

Mak, J. & Kleiman, L. (1997) Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* 71: 8087-8095.

Malim, M. H. (2009) APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 675-687.

Mariani, R., Chen, D., Schrefelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H. & Landau, N. R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114: 21-31.

Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9: 1398-1403.

Martinez, M. A., Clotet, B. & Este, J. A. (2002) RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol* 23: 559-561.

McCarthy, M., He, J. & Wood, C. (1998) HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia. *J Neurovirol* 4: 80-89.

McCaskill, J. S. (1990) The equilibrium partition function and base pair binding

probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers* 29: 1105-1119.

McLauchlan, J., Addison, C., Craigie, M. C. & Rixon, F. J. (1992) Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology* 190: 682-688.

Millar, A. A. & Waterhouse, P. M. (2005) Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct Integr Genomics* 5: 129-135.

Montag, J., Hitt, R., Opitz, L., Schulz-Schaeffer, W. J., Hunsmann, G. & Motzkus, D. (2009) Upregulation of miRNA hsa-miR-342-3p in experimental and idiopathic prion disease. *Mol Neurodegener* 4: 36.

Montagnier, L. & Clavel, F. (1994) Human immunodeficiency viruses. Academic Press, London.

Murphy, F. A., Folks, T. M. & Lairmore, M. D. (1990) Prospects for a human immunodeficiency virus/AIDS vaccine. *Dev Biol Stand* 72: 3-15.

Nakayama, E. E. & Shioda, T. (2012) TRIM5alpha and Species Tropism of HIV SIV. *Front Microbiol* 3: 13.

Neely, L. A., Rieger-Christ, K. M., Neto, B. S., Eroshkin, A., Garver, J., Patel, S., Phung, N. A., McLaughlin, S., Libertino, J. A. et al. (2007) A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol* 28: 39-48.

Neri, F., Giolo, G., Potesta, M., Petrini, S. & Doria, M. (2011) CD4 downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is dispensable for optimal output and functionality of viral particles in primary T cells. *J Gen Virol* 92: 141-150.

Noble, P. B. & Cutts, J. H. (1967) Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 8: 110-111.

Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J.,

-
- Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P. & Sharp, P. A. (2002) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8: 681-686.
- Ochieng, W., Sauermann, U., Schulte, R., Suh, Y. S., Kim, K. S., Sung, Y. C., Hunsmann, G., Stahl-Hennig, C. & Sopper, S. (2009) Susceptibility to Simian immunodeficiency virus ex vivo predicts outcome of a prime-boost vaccine after SIVmac239 challenge. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 162-169.
- Omoto, S., Ito, M., Tsutsumi, Y., Ichikawa, Y., Okuyama, H., Brisibe, E. A., Saksena, N. K. & Fujii, Y. R. (2004) HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* 1: 44.
- Onafuwa-Nuga, A. A., King, S. R. & Telesnitsky, A. (2005) Nonrandom packaging of host RNAs in moloney murine leukemia virus. *J Virol* 79: 13528-13537.
- Ono, A. & Freed, E. O. (1999) Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J Virol* 73: 4136-4144.
- Anonymous (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13925-13930.
- Orlik, J. (2009) The role of microRNAs in SIV and HIV infection.
- Ouellet, D. L., Plante, I., Barat, C., Tremblay, M. J. & Provost, P. (2009) Emergence of a complex relationship between HIV-1 and the microRNA pathway. *Methods Mol Biol* 487: 415-433.
- Ouellet, D. L., Plante, I., Landry, P., Barat, C., Janelle, M. E., Flamand, L., Tremblay, M. J. & Provost, P. (2008) Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res* 36: 2353-2365.
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257-1260.

- Pant, S., Hilton, H. & Burczynski, M. E. (2012) The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*.
- Paul, C. P., Good, P. D., Li, S. X., Kleihauer, A., Rossi, J. J. & Engelke, D. R. (2003) Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol Ther* 7: 237-247.
- Pavon-Eternod, M., Wei, M., Pan, T. & Kleiman, L. (2010) Profiling non-lysyl tRNAs in HIV-1. *Rna* 16: 267-273.
- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T. & Middeldorp, J. M. (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6328-6333.
- Peterlin, B. M. & Price, D. H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23: 297-305.
- Peters, G. G. & Hu, J. (1980) Reverse transcriptase as the major determinant for selective packaging of tRNA's into Avian sarcoma virus particles. *J Virol* 36: 692-700.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S. et al. (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2: 269-276.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D. et al. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-736.
- Piguet, V. & Trono, D. (1999) A Structure-function analysis of the Nef Protein of Primate Lentiviruses. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
- Plaisance-Bonstaff, K. & Renne, R. (2011) Viral miRNAs. *Methods Mol Biol*

721: 43-66.

Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B. & Kabat, D. (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 2855-2864.

Purzycka, K. J. & Adamiak, R. W. (2008) The HIV-2 TAR RNA domain as a potential source of viral-encoded miRNA. A reconnaissance study. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 511-512.

Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T. & Gray, R. H. (2000) Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 342: 921-929.

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. & Geuze, H. J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-1172.

Reed, L. J. & Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 27: 493-497.

Richt, J. A., Lager, K. M., Clouser, D. F., Spackman, E., Suarez, D. L. & Yoon, K. J. (2004) Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 16: 367-373.

Roberts, A. P., Lewis, A. P. & Jopling, C. L. (2011) The Role of MicroRNAs in Viral Infection. *Prog Mol Biol Transl Sci* 102: 101-139.

Rudensey, L. M., Papenhausen, M. D. & Overbaugh, J. (1993) Replication and persistence of simian immunodeficiency virus variants after passage in macaque lymphocytes and established human cell lines. *J Virol* 67: 1727-1733.

Salahuddin, S. Z., Markham, P. D., Wong-Staal, F., Franchini, G.,

Kalyanaraman, V. S. & Gallo, R. C. (1983) Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes. *Virology* 129: 51-64.

Salter, R. D., Howell, D. N. & Cresswell, P. (1985) Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21: 235-246.

Sandefur, S., Smith, R. M., Varthakavi, V. & Spearman, P. (2000) Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* 74: 7238-7249.

Sano, M., Kato, Y. & Taira, K. (2006) Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Lett* 580: 1553-1564.

Sayed, D. & Abdellatif, M. (2011) MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 91: 827-887.

Schopman, N. C., Willemsen, M., Liu, Y. P., Bradley, T., van Kampen, A., Baas, F., Berkhout, B. & Haasnoot, J. (2011) Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Res.*

Schroder, A. R., 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: 521-529.

Schultheiß, T. (2009) Charakterisierung mukosaler Immunantworten im SIV-Makaken-Modell für AIDS. Georg-August-Universität, Göttingen. p. 185.

Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M. E., Ghedin, E. et al. (2004) Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 9: 2388-2413.

Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. & Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58-63.

Seo, G. J., Chen, C. J. & Sullivan, C. S. (2009) Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology* 383: 183-187.

Seo, G. J., Fink, L. H., O'Hara, B., Atwood, W. J. & Sullivan, C. S. (2008) Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol* 82: 9823-9828.

Shaw, G. M., Hahn, B. H., Arya, S. K., Groopman, J. E., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. (1984) Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 226: 1165-1171.

Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 646-650.

Skalsky, R. L. & Cullen, B. R. (2010) Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol* 64: 123-141.

Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839.

Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Demuth, M., Johnston, I. C., Dorries, R. & ter Meulen, V. (1997) Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* 29: 351-362.

Suhasini, M. & Reddy, T. R. (2009) Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res* 7: 91-100.

Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M. & Ganem, D. (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435: 682-686.

Sullivan, C. S., Sung, C. K., Pack, C. D., Grundhoff, A., Lukacher, A. E.,

Benjamin, T. L. & Ganem, D. (2009) Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* 387: 157-167.

Sumner-Smith, M., Roy, S., Barnett, R., Reid, L. S., Kuperman, R., Delling, U. & Sonenberg, N. (1991) Critical chemical features in trans-acting-responsive RNA are required for interaction with human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol* 65: 5196-5202.

Sun, G., Li, H., Wu, X., Covarrubias, M., Scherer, L., Meinking, K., Luk, B., Chomchan, P., Alluin, J. et al. (2011) Interplay between HIV-1 infection and host microRNAs. *Nucleic Acids Res.*

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B. & Rigoutsos, I. (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455: 1124-1128.

Teo, I., Choi, J. W., Buttigieg, K. & Shaunak, S. (2005) Short communication: pitfalls of culturing C8166 cells in serum-free media. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 246-248.

Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y. L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P. et al. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315: 1579-1582.

Uberla, K., Stahl-Hennig, C., Bottiger, D., Matz-Rensing, K., Kaup, F. J., Li, J., Haseltine, W. A., Fleckenstein, B., Hunsmann, G. et al. (1995) Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8210-8214.

Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M. & Cullen, B. R. (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454: 780-783.

Van Maele, B. & Debyser, Z. (2005) HIV-1 integration: an interplay between

HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* 7: 26-43.

Varble, A., Chua, M. A., Perez, J. T., Manicassamy, B., Garcia-Sastre, A. & tenOever, B. R. (2010) Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11519-11524.

Vella, S., Galluzzo, M. C., Giannini, G., Pirillo, M. F., Andreotti, M., Tomino, C., Fragola, V., Bucciardini, R., Ricciardulli, D. et al. (2000) Plasma HIV-1 copy number and in vitro infectivity of plasma prior to and during combination antiretroviral treatment. *Antiviral Res* 47: 189-198.

Volonte, F., Piubelli, L. & Pollegioni, L. (2011) Optimizing HIV-1 protease production in *Escherichia coli* as fusion protein. *Microb Cell Fact* 10: 53.

von Bubnoff, A. (2011) Researchers identify host restriction factor that is target of Vpx. *IAVI Rep* 15: 21.

Wainberg, M. A., Gu, Z., Gao, Q., Arts, E., Geleziunas, R., Bour, S., Beaulieu, R., Tsoukas, C., Singer, J. & Montaner, J. (1993) Clinical correlates and molecular basis of HIV drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6 Suppl 1: S36-46.

Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. & Shafer, R. W. (2007) Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 17: 1195-1201.

Wang, C., Shangguan, L., Kibet, K. N., Wang, X., Han, J., Song, C. & Fang, J. (2011) Characterization of microRNAs Identified in a Table Grapevine Cultivar with Validation of Computationally Predicted Grapevine miRNAs by miR-RACE. *PLoS One* 6: e21259.

Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. & Galas, D. J. (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38: 7248-7259.

Waschbisch, A., Atiya, M., Linker, R. A., Potapov, S., Schwab, S. & Derfuss, T. (2012) Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression

in relapsing remitting multiple sclerosis. PLoS One 6: e24604.

Weiss, R. (1993) Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. Plenum Press, New York.

Wiegand, H. L. & Cullen, B. R. (2007) Inhibition of alpharetrovirus replication by a range of human APOBEC3 proteins. J Virol 81: 13694-13699.

Wilk, T., Gross, I., Gowen, B. E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R., Krausslich, H. G., Boulanger, P. & Fuller, S. D. (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. J Virol 75: 759-771.

Williams, K. C. & Burdo, T. H. (2009) HIV and SIV infection: the role of cellular restriction and immune responses in viral replication and pathogenesis. Apmis 117: 400-412.

Witwer, K. W., Watson, A. K., Blankson, J. N. & Clements, J. E. (2012) Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients. Retrovirology 9: 5.

Wong-Staal, F. (1991) The AIDS virus. What we know and what we can do about it. West J Med 155: 481-487.

Workenhe, S. T., Kibenge, M. J., Iwamoto, T. & Kibenge, F. S. (2008) Absolute quantitation of infectious salmon anaemia virus using different real-time reverse transcription PCR chemistries. J Virol Methods 154: 128-134.

Wu, Y. (2004) HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. Retrovirology 1: 13.

Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L. & Schuster, P. (1999) Complete suboptimal folding of RNA and the stability of secondary structures. Biopolymers 49: 145-165.

Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. G. (1998) The antigenic structure of the HIV

gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393: 705-711.

Xiao, C. & Rajewsky, K. (2009) MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136: 26-36.

Xu, N., Segerman, B., Zhou, X. & Akusjarvi, G. (2007) Adenovirus virus-associated RNAII-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes. *J Virol* 81: 10540-10549.

Yamamoto, T., Omoto, S., Mizuguchi, M., Mizukami, H., Okuyama, H., Okada, N., Saksena, N. K., Brisibe, E. A., Otake, K. & Fuji, Y. R. (2002) Double-stranded nef RNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication. *Microbiol Immunol* 46: 809-817.

Yeung, M. L., Bennasser, Y., Watashi, K., Le, S. Y., Houzet, L. & Jeang, K. T. (2009) Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Res* 37: 6575-6586.

Yu, Q., Landau, N. & König, R. (2003) Vif and the Role of Antiviral Cytidine Deaminases in HIV-1 Replication. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

Zeng, Y. & Cullen, B. R. (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280: 27595-27603.

Zhang, C., Rasmussen, C. & Chang, L. J. (1997) Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 230: 103-112.

Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., San Juan-Vergara, H., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R. F. & Mohapatra, S. S. (2005) Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 11: 56-62.

Zimmerman, C., Klein, K. C., Kiser, P. K., Singh, A. R., Firestein, B. L., Riba, S. C. & Lingappa, J. R. (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415: 88-92.

Zuker, M. & Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9: 133-148.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1–1: Globale Verbreitung von HIV Infektionen.....	1
Abb. 1.1–2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen SIV und HIV.....	3
Abb. 1.1–3: Schematische Gegenüberstellung der Genome von HIV-1 und SIV _{mac}	4
Abb. 1.1–4: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von RT- SHIV.	4
Abb. 1.1–5: Schematische Genkarte von SIV _{mac239}	5
Abb. 1.1–6: Schematische Darstellung eines HI-Virus.....	7
Abb. 1.1–7: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von HIV/SIV. Erklärung siehe Text (modifiziert nach Alberts et al., 2001).....	9
Abb. 1.2–1: Biogenese und Funktion von zellulären miRNAs.	11
Abb. 1.2–2: Mögliche Funktionen viraler miRNAs.....	12
Abb. 1.2-3: Schematische Struktur der HIV-1 LTR.	16
Abb. 1.2-4: Ansicht der Strukturen von HIV-2 TAR (A) und HIV-1 TAR RNA Sequenz (B).	16
Abb. 4.1–1: Exemplarische Darstellung der Probenentnahme während eines Infektionsversuchs.	60
Abb. 4.1–2: Licht-Mikroskopische Aufnahmen von C8166 Zellen im Verlauf einer Infektion mit SIV _{mac239}	60
Abb. 4.1–3: Kinetik einer SIV _{mac239} -Infektion von C8166 Zellen.....	62
Abb. 4.1–4: Kinetik einer SIV _{mac239} -Infektion von C8166-Zellen unter der Zugabe von uninfizierten Zellen.	63
Abb. 4.1–5: SIV _{mac239} -Kinetik der B/T Hybrid-Zelllinie CEMx174 in Viruskopien/mL.	64
Abb. 4.1–6: Kinetik einer SIV _{mac239} -Infektion von CEMx174 Zellen unter Zugabe von uninfizierten Zellen.	65
Abb. 4.1–7: Vergleich der HIV-1 Replikation in Zeitverlauf einer Infektion von C8166 sowie von CEMx174.	67
Abb. 4.1–8: Vergleich der Viruskopien zum Virustiter im Verlauf einer SIV _{mac239} - Infektion von C8166-Zellen.....	69

Abb. 4.1–9: Bestimmung der Viruskopien und des Virustiters im Verlauf einer SIV _{mac239} -Infektion von CEMx174-Zellen.....	70
Abb. 4.2–1: Vorhergesagte pre-miRNA mit zwei möglichen miRNAs.	72
Abb. 4.2–2: Validierung der hsa-miR-16 als "housekeeping" miRNA in verschiedenen Experimenten.	73
Abb. 4.2–3: Größenauftrennung der amplifizierten hsa-miR-16.	74
Abb. 4.2 – 6: Auftrennung der qRT-PCR Amplifikationsprodukte des Poly-Adenylierungs-Assays.	77
Abb. 4.2–7: Das Sequenzierergebnis zeigt die erwartete pre-miRNA und ein Fragment.....	78
Abb. 4.2–8: Mögliche Sekundärstruktur der sequenzierten 80bp Probe.	79
Abb. 4.2–9: Verwendete Primer zum Nachweis der SIV-miR-TAR-5p.	80
Abb. 4.2–10: qRT-PCR Ergebnisse und Auftrennung der Produkte der Primer SIV-miR-86-11, SIV-miR-86-13 und SIV-miR-86-17.	81
Abb. 4.2–11: Sequenzen des 150 bp Produktes aus dem Poly-Adenylierungs-Assay zum Nachweis der SIV-miR-TAR-5p.....	82
Abb. 4.2–12: Spezifität des Stem-Loop-Assays zum Nachweis von SIV-miR-TAR-5p.....	83
Abb. 4.2–13: Expression der SIV-miR-TAR-5p im SIV _{mac239} Infektionsexperiment.	84
Abb. 4.3–1: Ektopische Expression der pre-SIV-miR-TAR (SIVTAR) und pre-HIV-miR-TAR (HIVTAR).	85
Abb. 4.3–2: SIV _{mac239} Replikation in transgenen Zelllinien.	87
Abb. 4.3–3: Sekundärstruktur der mutierten R-Region (A) im Vergleich zur Wildtyp (B) R-Region von SIV _{mac239}	88
Abb. 4.3–4: Infektion der SIVTAR und HIVTAR transgenen Zelllinie C8166 mit SIV-R-Region Δ 7-defizienten <i>virus-like-particles</i> (VPLs).	89
Abb. 4.3–5: Bestimmung des prozentualen Anteils an infizierten Zellen.	91
Abb. 4.4–1: Pilotstudie zur Regulation der SIV-miR-TAR-5p in vivo.	92
Abb. 4.5–1: Charakterisierung der isolierten RNA aus Zellkulturüberstand von SIV _{mac239} -infizierten und uninfizierten Zellen mittels Bioanalyser.	97
Abb. 4.6–1: Nachweis der SIV-miR-TAR in der miR-Fraktion von isolierter Virus-RNA.	99
Abb. 5.2–1: Sekundärstrukturen der TAR Regionen von HIV-1, HIV2, SIV _{CPZ} , SIV _{AGM} und SIV _{mac239}	104

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1-1: Verwendete Geräte	21
Tab. 2.2-1: Verwendete Arbeitsmittel	22
Tab. 2.3-1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	23
Tab. 2.4-1: Verwendete Kits	25
Tab. 2.5-1: Verwendete Enzyme	26
Tab. 2.6-1: Antikörper zur Bestimmung des SIV-Titers mittels IPAP	26
Tab. 2.7-1: Primer zur Bestimmung der viralen RNA	27
Tab. 2.7-2: cDNA-Synthese Primer des Poly-Adenylierungs Assay	27
Tab. 2.7-3: Zur Detektion der miRNAs im Poly-Adenylierungs Assay mittels qRT-PCR	27
Tab. 2.7-4: cDNA-Synthese Primer des Stem-Loop-Assays	28
Tab. 2.7-5: qRT-PCR Primer des Stem-Loop-Primers	28
Tab. 2.7-6: Primer zur Sequenzierung der Plasmide pGEM-T easy und pJet 1.2	29
Tab. 3.1-1: Verwendete Zelllinien	30
Tab. 3.1-2: Kulturmedien zur Kultivierung von Suspensionszellen	31
Tab. 3.9-1: Reaktionsbedingungen für PCR	48
Tab. 3.10-1: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR zur Bestimmung der viralen RNA-Genomkopien	50
Tab. 3.10-2: Reaktionsansatz des SYBR-Green Master Mix	50
Tab. 3.10-3: Reaktionsansatz des <i>TaqMan</i> Master Mix	51
Tab. 3.10-4: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR für miRNAs	51
Tab. 3.14-1: Bakterienstämme	55
Tab. 3.17-1: Verwendete Computerprogramme und ihre Anwendungsbereiche	58
Tab. 4.5-1: Vergleich der Nukleotidkonzentrationen in isolierten Proben im Vergleich zur erwarteten Menge an Nukleinsäuren durch genomische Virus RNA	94
Tab. 4.5-2: Ergebnisse der Detektion von Viruskopien im aufkonzentrierten Zellkulturüberstand und der Menge der erwarteten viralen RNA	95

Tab. 4.5-3: Ergebnis des Verdauens der isolierten Probe aus SIVmac239- infizierten Zellkulturüberstand von C8166-Zellen.....	96
Tab. 4.5-4: Vergleich der RNA-Konzentrationen detektiert im Qubit (picogreen) und mittels NanoDrop.....	98

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Dipl. Biol. Wiebke Pauline Ibing geboren am 25.09.1978, versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 28.03.2015

Wiebke Ibing

Wiebke Pauline Ibing

25.09.1978

Geburtsdatum

Bad Soden

Geburtsort

ledig

Familienstand

Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Diplom Biologin
Tierärzthelferin

Ausbildungshintergrund

Molekular Biologie
Proteinbiochemie
Virologie
in vivo Versuche

Spezialgebiet

Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE

Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Projektleiter
Gefäßbiologisches Labor
Klinik für Gefäß-und Enovaskularchirurgie
Uniklinik Düsseldorf

September 2012- heute

Gastwissenschaftler
Deutsches Primatenzentrum GmbH
Leibniz-Institut für Primatenforschung
Abteilung Infektionsmodelle

Mai 2011 – August 2012

Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Deutsches Primatenzentrum GmbH
Leibniz-Institut für Primatenforschung
Abteilung Infektionsmodelle

Jan. 2008- März 2011

„Differenzielle Expression von microRNAs unter
SIV-Infektion *in vivo* und *in vitro*“

Thema

“Strong mucosal immune responses in SIV infected
macaques contribute to viral control and preserved
CD4+ T-cell levels in blood and mucosal tissues”

Tina Schultheiss, Reiner Schulte, Ulrike Sauermann, Wiebke Ibing
and Christiane Stahl-Hennig; *Retrovirology* 2011, **8**:24

wissenschaftliche Publikationen

SIV_{mac239} includes tRNAs in the virion
M.Brameier, W. Ibing, K. Höfer and D. Motzkus
In preperation

SIV_{mac239} encodes a miRNA in the TAR Region
W. Ibing, C. Stahl-Hennig and D. Motzkus
In preperation

Poster:

“The role of hsa-miR-424 -106b*, -1234 during
SIV-infection *in vitro*”

W. Ibing, J. Orlik, G. Salinas- Riester, L. Opitz, J. Montag, M. Curth
and D. Motzkus; 4th European Congress of Virology, April 2010, Italien

Diplomandin im Forschungszentrum Jülich GmbH,
Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Complex Systems
Strukturbiochemie (ICS-6) **Jan. 2007- Sep. 2007**

„Expression und Reinigung des HIV-1 Proteins vif“ Thema

Bakterienkultur
Proteinreinigungsmethoden
Western Blot
Proteincharakterisierung
Ligandenbestimmung
allgemeine molekularbiologische Arbeiten
Methodenspektrum

Studium der Biologie **Okt. 2002 – Sep. 2007**
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Schulbildung

Ausbildung zur Tierärzthelferin 1999 - 2002
(Frau Dr. Niehof-Oellers, Düsseldorf)

allgemeine Hochschulreife 1998
(Riesener Gymnasium, Gladbeck)

Studentische Tätigkeiten, sonstige Nebentätigkeiten

Studentische Mitarbeit 2007 - 2008
im Forschungszentrum Jülich GmbH,
Institut für Neurowissenschaften und Biophysik (INB-2)

Tierärzthelferin 2006 - 2008
Tierarztpraxis Allerheiligen
in Neuss

Verkaufsassistentin bei Manufactum 2003 - 2006
in Düsseldorf

Sonstige Kenntnisse

Sicherheit in der Gentechnik (§15 Gen TSV)

Führungskompetenz für Betreuer

Gute wissenschaftliche Praxis

1st Leibniz Association Post Doc Retreat (Life Sciences)

6th Göttinger Symposium Tuberculosis in
Nonhuman Primates

Schutz und Vermarktung von Forschungsergebnissen
am DPZ

Kommunikationstraining der Klaus Tschira Stiftung

Weiterbildungen

Deutsch: Muttersprache

Englisch: fließend

Sprachen

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Professor Hubert Schelzig und Professor Dieter Willbold für die Übernahme und Betreuung meines Themas. - 1000 Dank für die Unterstützung, das Entgegenkommen und die Spontanität.

Dr. Dirk Motzkus, Dr. Judith Montag und Dr. Christiane Stahl-Hennig danke ich für die Betreuung und Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit und die Möglichkeit meine Arbeit bei Euch im Labor machen zu können.

Den spitzen TAs und ehemaligen TAs des DPZ der Abteilung Infektionsmodelle, besonders Mareike, Uli, Sabine und Georgia danke ich für die aufmunternde Worte und die Unterstützung auch wenn es im Labor mal nicht so gelaufen ist wie ich es wollte oder mir vorgestellt hatte.

Bei Dr. Tina S, Dr. AC Schmädicke, PhD Kelly da Costa, Dr. Katharina Raue möchte ich mich herzlich für das tolle Arbeitsklima im Doktoranden Raum und auf dem Flur, das Grillen, die Cocktails, die Gespräche, die Aufmunterung, die Überzeugungsarbeit und überhaupt Alles bedanken. – Ihr seid toll!

Dr. Bianka Mussil, Dr. Reiner Schulte danke für die Aufnahme in die „WG“ Karl-Schwarzschild-Weg 6 und die ausführlichen FACS Erklärungen –Auch wenn ich wahrscheinlich nie wieder an einem LSR2 sitzen werde – es macht doch immer Eindruck - und ich kann Kompensieren ☺!!

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ebenfalls für die Unterstützung, die nervigen Fragen, die Tritte und das „Ins-Gewissen-Reden“ ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nie zum Abschluss gebracht hätte – auch wenn ihr mir zwischenzeitlich ziemlich auf die Nerven gegangen seit– Ihr habt ja Recht.

Von Herzen danke ich Gustav und Julia für ihre Mühen, die Zeit und das nerdige Inhaltsverzeichnis – vielen, vielen Dank.

Tobias Stiefeling mochte ich besonders für seine Unterstützung, die Ruhe und sein Verständnis danken – Sorry für die zum Teil sehr, sehr schlechte Laune meinerseits...

Last but not least möchte ich mich ganz herzlich bei allen Korrekturlesern bedanken. - Ich weiß das war nicht einfach.