Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://hdl.handle.net/11245/2.70060

File ID	uvapub:70060
Filename	Samenvatting
Version	unknown

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	PhD thesis
Title	Combinatorial RNAi against HIV-1
Author	Y.P. Liu
Faculty	AMC-UvA
Year	2009

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://hdl.handle.net/11245/1.323233

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)
(pagedate: 2014-08-18)

Samenvatting

De afgelopen 25 jaar zijn wereldwijd bijna 60 miljoen personen geïnfecteerd met het humaan immunodeficiëntie virus type 1 (HIV-1). Van deze 60 miljoen zijn tot dusver ongeveer 25 miljoen mensen overleden aan de gevolgen van het door HIV-1 veroorzaakte "acquired immune deficiency syndrome" (AIDS). Momenteel wordt een combinatie van antiretrovirale medicijnen gebruikt om een HIV-1 infectie effectief te onderdrukken in patiënten. De huidige therapie is echter duur, niet genezend en chronisch gebruik van de virusremmers is in sommige patiënten geassocieerd met een significante mate van toxiciteit. Therapietrouw van de patiënten wordt soms belemmerd door de bijwerkingen van de medicijnen. Een groot probleem is ook dat er steeds meer HIV-1 varianten ontstaan die resistent zijn tegen de huidige antivirale medicijnen. Deze resistente HIV-1 varianten kunnen vervolgens verder verspreid worden in de populatie. Het is daarom belangrijk dat er onderzoek gedaan wordt naar alternatieve of additionele therapeutische strategieën tegen HIV-1.

Een attractieve en innovatieve aanpak is door middel van gentherapie HIV-1 infecteerbare cellen resistent te maken door het in brengen van antivirale genen. Een dergelijk gentherapie heeft als potentieel voordeel dat de patiënt niet meer dagelijks medicatie nodig heeft. De recente ontdekking van RNA interferentie (RNAi) biedt een nieuwe mogelijkheid om HIV-1 replicatie via gentherapie te remmen. RNAi is een zeer potent sequentie-specifiek genregulatie mechanisme dat geactiveerd wordt door dubbelstrengs RNA. De belangrijkste moleculen van het RNAi mechanisme zijn de "small interfering RNAs" (siRNAs) en de "microRNAs" (miRNAs). Deze siRNAs en miRNAs worden in het zogenaamde "RNA-induced silencing complex" (RISC) geïncorporeerd zodat dit complex het bijpassende mRNA kan knippen en inactiveren. Intracellulaire expressie van korte RNA haarspeld structuren (short hairpin RNAs (shRNAs)) is ontwikkeld als een effectieve methode om RNAi gericht te induceren. Deze shRNAs worden door het cellulaire eiwit Dicer omgezet in siRNAs die vervolgens in RISC worden geladen om het complementaire mRNA te remmen. Gezien de efficiëntie en specificiteit van RNAi is de toepassing van een anti-HIV-1 gentherapie gebaseerd op RNAi potentieel een krachtige methode om HIV-1 infecties te remmen.

Hoewel RNAi tegen HIV-1 zeer potent en specifiek is, wordt het reeds duidelijk dat HIV-1 een moeilijk doelwit is gezien de hoge mutatiesnelheid van het virus. RNAi gericht tegen een enkele virale sequentie in het HIV-1 RNA genoom resulteert al snel in het ontstaan van virussen die aan RNAi kunnen ontsnappen. Deze varianten hebben mutaties verkregen in de target sequentie of een verandering in de locale RNA structuur waardoor het virus ongevoelig is geworden voor RNAi. Om te voorkomen dat het virus ontsnapt, zou HIV-1 tegelijkertijd op meerdere virale sequenties geremd moeten worden door het combineren van verschillende RNAi inducers. In dit proefschrift beschrijven wij de ontwikkeling van nieuwe gentherapie strategieën gebaseerd op een combinatie RNAi aanpak tegen HIV-1.

In **hoofdstuk 1** wordt een korte introductie gegeven over de opbouw, structuur en de replicatie cyclus van HIV-1. Het ziekteverloop van een HIV-1/AIDS, de huidige antiretrovirale therapieën en gentherapie toepassingen tegen HIV-1 worden beschreven. Tevens worden de werking van het cellulaire RNAi mechanisme en de diverse strategieën om RNAi te induceren behandeld.

Om een combinatie RNAi aanpak tegen HIV-1 te ontwikkelen hebben wij verlengde shRNAs, de zogenaamd "e-shRNAs", ontworpen. Deze e-shRNAs bestaan uit 2 op elkaar gestapelde shRNAs, die elk zeer potent zijn als individueel antiviraal molecuul (**hoofdstuk 2**). We hebben 2 sets e-shRNAs met verschillende lengtes gemaakt en deze getest op luciferase reporter genen en HIV-1 productie. We tonen aan dat de siRNAs afkomstig van de onderkant van het e2-shRNA molecuul efficiënt gemaakt worden en actief zijn. Het siRNA afkomstig van de bovenkant van de haarspeld wordt echter alleen geproduceerd wanneer de haarspeld een lengte heeft van minimaal 43 basen paren (bp).

Vervolgens hebben wij antivirale e-shRNAs ontworpen en getest die 3 of 4 siRNAs coderen (**hoofdstuk 3**). We laten zien dat siRNA productie en het antiviraal effect optimaal is voor een e3-shRNA van 66 base paren. Verdere extensie van de haarspeld resulteerde in een algemene afname van de RNAi activiteit. Hetzelfde geldt voor lange haarspelden die gericht zijn tegen opeenvolgende HIV-1 sequenties. Belangrijk is de observatie dat HIV-1 replicatie sterk geremd wordt in T cellen die e3-shRNA tot expressie brengen, terwijl het virus wel uitgroeit in cellen die een enkele shRNA tot expressie brengen.

In **hoofdstuk 4** hebben we een anti-HIV-1 construct ontworpen op basis van een cluster van cellulaire miRNAs. Dit construct brengt simultaan 4 verschillende siRNAs tegen HIV-1 tot expressie. We hebben de haarspelden zo ontworpen dat deze de structurele kenmerken nabootsen van de natuurlijke miRNAs. Als deze haarspeldjes gecombineerd worden in een enkel construct, zien wij de RNAi activiteit toenemen. Uiteindelijk hebben we aangetoond dat HIV-1 replicatie efficiënt geremd kan worden door de gelijktijdige expressie van 4 antivirale siRNAs vanuit een cluster van antivirale miRNAs.

Vervolgens hebben we onderzocht of antivirale miRNAs en shRNAs ook mRNAs kunnen remmen die slechts gedeeltelijk complementaire sequenties bevatten (**hoofdstuk 5**). We hebben de remming van miRNAs en shRNAs getest op wild-type HIV-1 en virussen die aan RNAi waren ontsnapt door de selectie van puntmutaties in de target sequentie. We toonden aan dat miRNAs en shRNAs in staat zijn de productie van HIV-1 varianten die mutaties coderen in het open leesraam aanzienlijk te remmen wanneer de targets aanwezig zijn in een open leesraam. Een sterkere remming werd waargenomen als de target in het 3′ uiteinde van het mRNA aanwezig was. Het remmen van meerdere imperfecte targets tegelijk resulteerde in een verhoogde inhibitie. Deze resultaten suggereren dat miRNAs of shRNA die meerdere partieel complementaire target sequenties attaqueren gebruikt kunnen worden als alternatieve RNAi strategie tegen pathogene virussen.

Voor de overdracht van RNAi remmers naar HIV-1 infecteerbare cellen is het lentivirale vector systeem een geschikte methode. Lentivirale vectoren kunnen namelijk efficiënt niet delende cellen, inclusief hematopoietische stam cellen transduceren en transgenen stabiel laten integreren in het genoom van de gastheer. De aanwezigheid van anti-HIV-1 shRNAs en miRNAs kan echter een negatief effect hebben op de lentivirale vector titers. Deze lage vector titers kunnen een klinische toepassing bemoeilijken. In **hoofdstuk 6** analyseerden we de titer reductie van lentivirale vectoren die anti-HIV-1 shRNAs of miRNAs coderen. We laten zien dat shRNAs die aangrijpen op het vector RNA genoom de vector titer sterk reduceren. Remming van het RNAi mechanisme door saturatie kan dit titer probleem voorkomen. Voor miRNA-vectoren is de grootste oorzaak voor titer reductie waarschijnlijk promoter interferentie door de aanwezigheid van een constitutieve promoter die nodig is voor de expressie van miRNAs. Bovendien zorgt de aanwezigheid van miRNAs in het vector RNA genoom voor afbraak van het vector RNA genoom door het Drosha enzym. Om titer reductie van miRNA coderende vectoren te voorkomen, kunnen derhalve het best induceerbare promoters worden gebruikt.

In **hoofdstuk 7** wordt een samenvatting gegeven van de ontwikkeling van lentivirale vectoren voor de expressie van RNAi inducers in cellen. Deze samenvatting adresseert de kritieke punten betreffende lentivirale vector productie en bediscussieert de potentie van een klinische toepassing van lentivirale vectoren voor een RNAi gebaseerde gentherapie tegen HIV-1.

In **hoofdstuk 8** bespreken we de verschillende strategieën om combinatie RNAi te gebruiken als alternatieve therapie tegen kanker en virale infecties. De meest voor de hand liggende strategie is om meerdere shRNAs via individuele cassettes tot expressie te brengen. Zoals we in dit proefschrift laten zien, zijn tevens e-shRNAs en een miRNA cluster attractieve methodes voor het efficiënt induceren van combinatie RNAi. Een andere manier om combinatie RNAi te induceren is om zogenaamde lange RNA haarspeld structuren tot expressie te brengen die mogelijk kunnen worden omgezet in meerdere siRNAs. Verder behandelen we een aantal kritieke punten zoals veiligheid en efficiëntie van combinatie RNAi voor een mogelijke klinische toepassing tegen kanker en virale infecties.