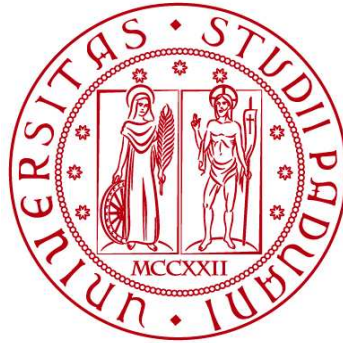


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Impiego di un promotore Pol II condizionale per
inibire la Ciclina T1 e silenziare HIV mediante
tecnologia CRISPR HIV-indotta**

Tutor: Prof.ssa Maria Cristina Parolin
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Tania Lo Duca

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. Abstract	3
2. Introduzione al problema biologico.....	5
2.1 Ciclo replicativo del Virus dell'Immunodeficienza Umana 1 (HIV-1)	
2.2 Processo infettivo e sviluppo della Sindrome dell'ImmunoDeficienza Acquisita (AIDS)	
2.3 Approcci terapeutici	
2.4 Bersaglio cellulare: la Ciclina T1	
3. Materiali e metodi	9
3.1 Sistema CRISPR/Cas9	
3.2 Vettori lentivirali: caratteristiche ed utilizzi	
3.3 Assemblaggio della CRISPR-cassette: PCR + ligazione	
3.4 Trasfezione di cellule epiteliali HeLa-CD4 ⁺ con Lipofectamina 2000	
3.5 Trasfezione di cellule T-linfoblastoidi CEM tramite elettroporazione	
3.6 Western Blot per rilevare la Ciclina T1 o la Cas9	
3.7 Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	
3.8 Infezione delle CEM con HIV-1 ceppo IIIB	
3.9 Trasduzione di cellule T-linfoblastoidi CEM	
3.10 Analisi della vitalità cellulare: Colorazione con Trypan Blue	
4. Risultati ottenuti e discussione.....	15
4.1 Unico promotore di fusione (LTRhsp) per la co-espressione di un shRNA e un mRNA	
4.2 Identificazione del gRNA migliore	
4.3 Costruzione della CRISPR-cassette	
4.4 Utilizzo del sistema CRISPR in combinazione con un trattamento antiretrovirale: Tenofovir e cellule T-linfoblastoidi CEM	
5. Conclusione	21
6. Bibliografia.....	22
7. Appendice	25

1. ABSTRACT

La tecnica di editing genomico CRISPR/Cas9 è un approccio innovativo e promettente per risolvere il problema dei *reservoirs* cellulari dopo infezione da HIV-1. Questo approccio ha come obiettivo l'inibizione della replicazione del provirus scegliendo, come bersaglio, una precisa porzione genomica della cellula infettata con lo scopo di exciderla.

L'articolo prende in considerazione un fattore cellulare indispensabile per l'espressione del provirus, la Ciclina T1, che, reclutando la RNA polimerasi cellulare, consente la trascrizione dei geni virali. Secondo gli autori, la scelta di un bersaglio cellulare al posto di uno virale è in grado di evitare l'insorgenza di "viral escape". Lo studio si basa sullo sviluppo di un sistema CRISPR, contenente un gRNA (Ciclina T1) e un mRNA (Cas9), espresso solo nelle cellule in cui è presente il genoma virale, a partire da un singolo promotore della Pol II. La strategia impiegata non ha determinato riduzioni della vitalità cellulare, in quanto altre cicline sono in grado di garantire l'espressione dei geni cellulari.

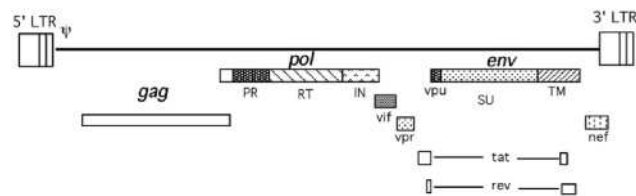
Si è osservato anche un miglioramento dell'efficienza d'inibizione della funzionalità del bersaglio mediante l'inserimento di un ribozima all'estremità 5' del trascritto, così come un prolungamento del silenziamento di HIV a seguito di trattamento con Tenofovir.

2. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO

2.1 Ciclo replicativo del Virus dell'Immunodeficienza Umana 1 (HIV-1)

HIV-1 è un virus appartenente al genere dei *Lentiviridae* della famiglia dei *Retroviridae*, al microscopio elettronico appare di forma sferica per la presenza di un envelope ricco di glicoproteine, il quale racchiude un nucleocapside dalla tipica struttura a cono. Possiede un genoma costituito da due copie di un RNA single-stranded a polarità positiva di circa 9kb, nelle quali sono contenute diverse open reading frames. Di queste, le tre denominate *gag*, *env* e *pol* sono comuni a tutti i *Retrovirus* e caratterizzano il ciclo replicativo di questa famiglia; mentre le altre (open reading frames parzialmente sovrapposte) codificano geni accessori e sono specifiche per *Retrovirus* ad alta complessità, come HIV-1, conferendone proprietà adattative e promuovendone la persistenza nelle cellule ospiti. La presenza di sequenze accessorie simili nel virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV), suggerisce un possibile evento di salto di specie dopo zoonosi da parte di primati dell'Africa.

Alle due estremità del genoma a RNA sono presenti delle regioni ripetute (R), la R al 5' è seguita da una particolare sequenza detta U5, mentre quella al 3' è preceduta da una sequenza detta U3. Quando il genoma è integrato (quindi in



Rappresentazione schematica del genoma provirale

forma di DNA), le estremità saranno costituite invece delle sequenze dette Long-Terminal Repeats (LTRs), entrambe costituite da U3-R-U5. Questo evento di duplicazione di U3 e U5 è permesso dal particolare meccanismo di retrotrascrizione ed integrazione del genoma virale nel cromosoma ospite.

La glicoproteina gp120, codificata da *env* e presente in grande quantità sulla superficie del virione, si lega con alta affinità al recettore di membrana plasmatica CD4 situato su linfociti T helper e monociti/macrofagi; subisce quindi un cambio conformazionale che le permette l'esposizione di alcuni epitopi necessari all'interazione con il co-recettore (CCR5 o CXCR4). Avviene quindi la fusione tra membrana cellulare ed envelope virale, con conseguente entrata del nucleocapside nella cellula ospite. Il primo evento che segue la spogliazione è la retrotrascrizione del genoma nel citoplasma. Questo infatti, nonostante sia a polarità positiva, non funziona da messaggero, ma necessita di un intermedio a DNA per essere integrato nel DNA cromosomico della cellula ospite e poi replicato. La reazione è catalizzata dalla retrotrascrittasi (RT), un enzima ottenuto dal processamento della poliproteina codificata dal gene *pol* e complessato nel nucleocapside nel ciclo virale precedente assieme alle altre proteine derivate dallo stesso gene: una integrasi (IN) e una proteasi (PR). L'integrasi medierà l'integrazione del cDNA virale nel genoma ospite tramite il riconoscimento di specifiche sequenze nelle LTR. A questo punto i geni virali vengono espressi assieme a quelli cellulari e si verifica la sintesi delle proteine accessorie precoci: Tat, Rev e Nef.

Tat è un trans-attivatore essenziale della trascrizione, senza la sua presenza l'infezione non sarebbe produttiva, questo infatti interagisce con cofattori cellulari per stabilizzare la RNA polimerasi cellulare e, riconoscendo il suo sito specifico nel TAR-loop della LTR al 5' del provirus, favorisce la trascrizione dell'intero genoma. Nelle fasi precoci i trascritti sono sottoposti a diversi eventi di splicing che permettono l'espressione di Rev (regolatore dell'espressione delle proteine vitali) e Nef (fattore negativo); quest'ultima è una proteina associata alle membrane plasmatica e nucleare che riduce l'espressione di proteine cellulari, conferendogli un importante ruolo nella virulenza. Rev, come Tat, è essenziale per l'espressione delle proteine virali: agisce da trans-attivatore a livello post-trascrizionale legandosi alla sua sequenza di riconoscimento RRE (Rev-response element), posta nel gene *env* in trascritti cosiddetti "unspliced" e "partially spliced" per facilitarne l'uscita dal nucleo e permettere l'espressione di proteine strutturali dal trascritto intero e non strutturali tardive dal trascritto "partially spliced". Questa proteina quindi controlla il rapporto tra trascritti interi e trascritti che subiranno uno o più eventi di splicing, regolando in modo indiretto anche la quantità di se stessa e di Tat.

La particella virale viene quindi assemblata a livello della membrana plasmatica grazie all'associazione delle poliproteine Gag-Pol e Gag (costituita dalle proteine di matrice -MA-, del nucleocapside -NC- e del capsido -CA-), e al riconoscimento della sequenza di packaging Ψ , presente solo nell'RNA messaggero "full-length", il quale costituirà il genoma del nuovo virione. Il rilascio è accompagnato dall'azione della proteasi, la quale regola il processamento proteolitico dei precursori Gag e Gag-Pol nelle loro componenti: il virione in questo stadio si dice maturo. In conclusione, le proteine Gag, Env, Pol e le accessorie Tat e Rev sono indispensabili per la replicazione virale, la loro assenza non consente un'infezione produttiva; mutazioni nelle restanti accessorie (Nef, Vif, Vpr e Vpu) comportano effetti diversi in base alle condizioni sperimentali.

2.2 Processo infettivo e sviluppo della Sindrome dell'ImmunoDeficienza Acquisita (AIDS)

È possibile suddividere il decorso dell'infezione cronica da HIV-1 in diversi stadi, in base al rapporto che instaura il virus con l'ospite. Per le prime settimane si vede la presenza principalmente di ceppi R5-tropici, ossia che riconoscono come co-recettore il recettore delle chemochine CCR5 presente sulla superficie dei monociti/macrofagi. Questo particolare tropismo permette un'ampia distribuzione del virus nell'organismo che, assieme alla sua caratteristica di non formare sincizi cellulari e dall'aver una bassa velocità di replicazione, comporta un'elevata viremia e un transiente calo del numero di linfociti T CD4⁺. Questa fase di infezione acuta può essere asintomatica o presentare sintomi clinici simil-influenzali, in ogni caso l'individuo è altamente contagioso. Le prime settimane sono anche oggetto di attivazione del sistema immunitario adattativo, in cui si vede la produzione di anticorpi e di linfociti T CD8⁺ (citotossici) specifici che riportano la viremia a livelli basali, con conseguente recupero della conta di linfociti T CD4⁺. Il secondo stadio viene denominato latenza clinica e può

perdurare per 5-10 anni, in questo periodo il virus ha una minima replicazione nei tessuti linfatici che comporta la lenta eliminazione dei linfociti T CD4⁺.

L'AIDS è invece la malattia che caratterizza il terzo stadio e si sviluppa quando la conta dei linfociti T CD4⁺ scende in modo considerevole sotto i livelli fisiologici, portando l'individuo ad immunodeficienza; come sintomi tipici della malattia si hanno lo sviluppo di tumori rari, malattie neurologiche o infezioni opportunistiche da microrganismi normalmente gestiti efficientemente dal sistema immunitario dell'ospite. Negli individui con una progressione della malattia più rapida si è visto che gli isolati virali in questo stadio risultano essere per la maggior parte X4-tropici, riconoscono quindi come co-recettore il recettore delle chemochine CXCR4 (presente sui linfociti T CD4⁺), hanno una rapida replicazione e causano la formazione di sincizi multinucleati, con conseguente malattia più aggressiva.

La trasmissione del virus avviene principalmente per via sessuale, tramite secrezioni genitali, per la presenza del virus nei macrofagi mucosali. Data la diffusione del virus nel sangue, anche questo tessuto è oggetto di trasmissione tra individui; può essere per contatto accidentale da personale sanitario, trasfusioni e trapianti d'organo, oppure per utilizzi di siringhe contaminate nel caso di utilizzatori di droghe per via endovenosa. È anche possibile una trasmissione verticale dalla madre al feto per via transplacentare, oppure dalla madre al neonato durante il parto o l'allattamento.

2.3 Approcci terapeutici

Una delle principali caratteristiche di HIV-1 è la sua grande abilità nell'eludere le difese immunitarie dell'ospite, divenendo così un patogeno estremamente difficile da eliminare. Questa particolarità è dovuta in parte alla sua grande variabilità genetica: la retrotrascrittasi non ha attività di "proofreading", viene prodotta quindi una grande percentuale di progenie virale contenente mutazioni puntiformi (in particolare nel gene *env*), le quali permettono di sfuggire al riconoscimento specifico da parte dell'immunità e comportano un'eterogeneità significativa negli isolati di HIV-1, anche in uno stesso individuo. Un altro fattore che permette il cosiddetto "viral escape" è la presenza di HIV-1 sotto forma di provirus all'interno di linfociti T quiescenti e macrofagi: il sistema immunitario non ha modo di riconoscere le cellule che presentano il virus integrato, quindi questo può continuare a replicare indisturbato. La presenza di queste "quasispecie" virali e il fatto che il virus circolante possa essere mutato rispetto a quello presente in forma integrata, rende molto insidioso lo sviluppo sia di terapie mirate all'eliminazione del patogeno che a vaccini che prevenano l'infezione.

L'avvento della HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) e della successiva cART (combination Anti-Retroviral Therapy) ha permesso di trasformare l'infezione da HIV-1 da malattia progressiva con esito fatale, a patologia cronica monitorabile. Si tratta di una combinazione di farmaci i quali agiscono in varie fasi del ciclo replicativo di HIV-1 per bloccare la sua replicazione, questi andranno ad eliminare il virus circolante portando la viremia a valori non tracciabili, limitando quindi sia la diffusione del virus tra individui, che lo sviluppo dell'AIDS. Questi farmaci non possono agire sulle cellule contenenti

il provirus (i cosiddetti *reservoirs*), condizione che potrebbe determinare un'eventuale ripresa del titolo virale qualora si interrompesse la terapia o venissero a formarsi ceppi farmaco-resistenti. Per questi motivi, per il fatto che i farmaci potrebbero causare tossicità nel lungo periodo e per l'insorgenza di comorbidità non-AIDS correlate ad HIV-1 negli anziani sieropositivi, negli ultimi anni sono stati studiati degli approcci alternativi per tentare di eliminare i *reservoirs* cellulari.

Due approcci che sono stati utilizzati sono lo “shock and kill” e il “block and lock”. Il primo consiste nella riattivazione del virus latente per poter uccidere in modo mirato le cellule che lo esprimono, non c'è però la sicurezza di eliminare effettivamente tutti i reservoirs; il secondo invece prevede il blocco della trascrizione del virus tramite modificazioni epigenetiche a livello del suo promotore, approccio risultato più promettente in quanto si è visto il silenziamento del virus anche in assenza di cART. Nonostante questi risultati, la strategia che sembra essere la più incoraggiante è la terapia genica, prima effettuata con sistemi di editing genomico ZFN e TALEN, ora principalmente tramite la tecnologia CRISPR/Cas9.

Per terapia genica si intende la modifica genetica delle cellule dell'ospite per debellare l'infezione o limitarne la progressione. In questo ultimo caso si sono visti esperimenti di modifica genetica *ex vivo* di cellule staminali ematopoietiche provocando la delezione CCR5 Δ 32, la quale impedisce un'entrata *de novo* del virus nelle cellule, in modo da limitare la progressione dell'AIDS nei pazienti ed evitare la diffusione del virus ad altri individui. Approcci che mirano ad essere utilizzati *in vivo* sono la diretta delezione di sequenze fondamentali (LTRs o geni funzionali) del provirus, con l'accortezza di effettuare due tagli nel suo genoma, dato che uno solo potrebbe portare allo sviluppo di resistenze; oppure la modifica mirata di geni cellulari implicati nel ciclo replicativo o nella latenza, di questi ultimi non si ha ancora una conoscenza approfondita.

2.4 Bersaglio cellulare: la Ciclina T1

I ricercatori, in questo studio, utilizzano la tecnologia CRISPR/Cas9 per bersagliare un gene cellulare la cui proteina è implicata nella trascrizione del provirus: la Ciclina T1, reclutata alla LTR dal fattore virale Tat. Il ruolo fondamentale di Tat nella trascrizione dei geni virali è dato dal fatto che questa proteina lega la sua sequenza di riconoscimento TAR localizzata nel loop in formazione al 5' durante l'inizio di trascrizione dell'RNA virale, il suo legame favorisce la fase di allungamento della trascrizione del provirus grazie al reclutamento in quella regione della Ciclina T1. La Ciclina a sua volta fa parte, assieme alla CDK9 (chinasi ciclina-dipendente), di un complesso eterodimerico chiamato P-TEFb. Questo fosforila il fattore di allungamento negativo NELF, e il dominio C-terminale della RNA polimerasi II; permettendo così il rilascio del promotore e rendendo la polimerasi competente per la trascrizione dell'intero genoma virale.

La strategia adottata è stata quindi quella di rimuovere una parte del gene della Ciclina T1 nel tentativo di bloccare l'espressione del virus. Per un risultato

ottimale è necessario che l'excisione del gene sia la più mirata possibile, in modo da evitare effetti off-target nelle cellule; per questo motivo si è adottato un sistema CRISPR/Cas9 condizionale, presente come unica unità trascrizionale e integrato all'interno del genoma ospite grazie all'utilizzo di vettori lentivirali. La CRISPR-cassette comprende un guide-RNA complementare ad una regione del gene della T1 e l'mRNA della Cas9, entrambi controllati da un unico promotore condizionale, il quale media l'espressione del sistema solo nelle cellule che contengono il provirus.

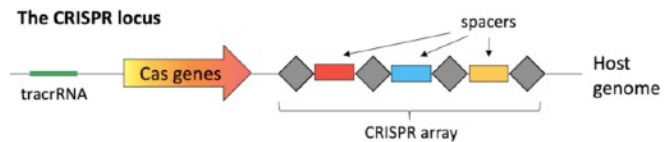
Il secondo aspetto da tenere in considerazione è il ruolo del gene cellulare nel suo contesto fisiologico, c'era il rischio infatti che la delezione della Ciclina T1 andasse ad inficiare la normale trascrizione dei geni cellulari. In realtà questo non succede, nel lavoro in analisi e in studi precedenti si è visto che la cellula può adoperare altre cicline per formare il complesso P-TEFb, sebbene la cinetica di trascrizione sia più veloce con CDK9/T1 piuttosto che con CDK9 associata ad altre cicline, la vitalità cellulare non viene influenzata dalla rottura del gene. T1 è invece fondamentale per la trascrizione del virus per entrambi i meccanismi Tat-dipendente e Tat-indipendente (mediata da fattori di trascrizione cellulari), la sua soppressione ha portato quindi al successo l'esperimento con la quasi completa inibizione della replicazione del virus.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Sistema CRISPR/Cas9

Le Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) sono un gruppo di sequenze (chiamate appunto repeats, 28-37pb), presenti in modo endogeno in alcuni batteri, altamente conservate e ripetute, separate tra loro da sequenze variabili derivanti da DNA esogeno (chiamate spacers, 21-72pb). L'insieme di queste sequenze prende il nome di CRISPR-array il quale, sotto il controllo trascrizionale della sequenza leader ricca di A-T, rappresenta un vero e proprio meccanismo di immunità adattativa sviluppato in eubatteri ed archea nei confronti di elementi genetici invasivi, quali plasmidi dannosi o virus: il DNA esogeno che entra nella

cellula verrà lesionato e non sarà più in grado di replicare. L'array è spesso accompagnato da geni codificanti le CRISPR-associated proteins (*cas*), inoltre il numero di loci



Rappresentazione schematica del locus CRISPR
(Immagine da: Magro G. et al, Pathogens, 10, 2021)

CRISPR presenti è molto variabile e dipende dalla specie.

L'integrazione del DNA esogeno è un evento mediato dalle proteine Cas1 e Cas2 al primo incontro con un nuovo fago (o plasmide); il meccanismo molecolare non è ancora stato caratterizzato nel dettaglio, ma è stato osservato che le nuove sequenze (protospacer) vengono riconosciute dalla presenza di sequenze di 2-5nt situate a monte o a valle delle stesse, queste vengono chiamate PAM (Protospacer

Adjent Motif). Al secondo incontro con il fago, l'intero array viene trascritto per formare il pre-crRNA (CRISPR-RNA immaturo), alle sue repeats si appaiano per parziale complementarità i tracrRNA (crRNA trans-attivatori), il cui gene è esterno al locus CRISPR, in modo tale da creare dei tratti di RNA double-stranded. Il dsRNA viene riconosciuto e processato dalla RNasi III batterica e gli ibridi crRNA/tracrRNA formano un complesso con la Cas9. L'ibrido è quindi in grado di guidare la Cas9 fino alla sequenza di DNA esogeno complementare al crRNA, la proteina riconosce la presenza di PAM (di sequenza NGG), apre l'elica di DNA e taglia entrambi i filamenti a livello di 3nt a monte di essa.

Il meccanismo sopra descritto caratterizza il sistema CRISPR/Cas di Tipo II, oggetto di ingegnerizzazione per l'impiego come tecnica mirata di editing genomico: una volta fornito l'RNA guida, composto dalla fusione di crRNA e tracrRNA in un unico gRNA, è sufficiente l'azione della sola Cas9 per ottenere la rottura del DNA in un punto specifico. Al contrario, i Tipi I e III necessitano di complessi multiproteici più complessi e meno agevoli per l'ingegnerizzazione, quindi non sono utilizzati per questa tecnica. Il knock-out del gene target sarà dato dal fatto che le cellule eucariotiche utilizzano il meccanismo del non-homologous end-joining (NHEJ) per riparare il danno causato dalla Cas9, comportando perciò una delezione o un frameshift della sequenza codificante. È inoltre possibile eseguire il knock-in mirato sfruttando il meccanismo di homologous-direct recombination (HDR) in presenza di un DNA donatore adatto.

3.2 Vettori lentivirali: caratteristiche ed utilizzi

I lentivirus sono degli ottimi vettori per veicolare materiale genetico sia nelle cellule ad attiva proliferazione, che in cellule quiescenti. Sono molto utilizzati nell'ambito della terapia genica, in quanto sono ampiamente ingegnerizzabili, flessibili e possono contenere una buona quantità di materiale. Inoltre, possono mediare l'integrazione del materiale genetico in siti intra- o intergenici del cromosoma ospite senza essere autonomi nella replicazione, garantendo così un'espressione stabile dei geni esogeni. Un possibile svantaggio nell'utilizzo di questa tecnica è il fatto che i lentivirus mediano un'integrazione non mirata del materiale genetico nel cromosoma ospite, che potrebbe portare ad eventi di mutagenesi inserzionale.

Inizialmente, gli esperimenti di questo lavoro si sono condotti utilizzando plasmidi compatibili con la tecnologia lentivirale, ma veicolati tramite trasfezioni transienti. Questi presenteranno tutte le sequenze necessarie per la loro replicazione nella cellula, ma non saranno integrati nel cromosoma ospite finché non avviene la mediazione da parte del lentivirus. I vettori plasmidici in studio vengono incorporati nei virioni assieme ad altri vettori contenenti geni codificanti le componenti strutturali della particella virale e geni per la retrotrascrizione del vettore di interesse, presenti nel virione sotto forma di RNA single-stranded.

La produzione delle particelle lentivirali ricombinanti è stata effettuata tramite trasfezione di cellule della linea 293T con i vettori adatti. Questa è una linea cellulare efficientemente trasfettabile derivata da cellule embrionali renali umane e che consente la produzione di alti titoli virali, quando utilizzata per produrre

retrovirus. Sono state quindi co-trasfettate queste cellule con i plasmidi di packaging pCHGP-2 (che fornisce i geni *gag-pol*), pCMV-VSV-G (per una pseudotipizzazione del vettore con la glicoproteina di superficie VSV-G) e pCMV-Rev (che fornisce il gene *rev*), assieme ad uno solo dei diversi vettori contenenti i geni da integrare. I supernatanti sono stati raccolti dopo 24h e 48h, filtrati e concentrati nelle proporzioni desiderate.

3.3 Assemblaggio della CRISPR-cassette: PCR + ligazione

Per creare i costrutti contenenti le sequenze di interesse, è stata utilizzata una strategia di ligazione basata su ampliconi generati da PCR molto precise. Il primo template è il plasmide LTRhsp70-shRNA (ottenuto da un precedente studio) da cui è stato amplificato, con primer appositi, il promotore di fusione LTRhsp70 e la minima sequenza di poliadenilazione (mpolyA); il pLentiCRISPR-gRNA-2 (vettore con il gRNA selezionato come migliore) è stato invece il template per l'amplificazione del gRNA-2. Dato che la Taq DNA polimerasi genera prodotti ad estremità piatte, la sola ligazione dei tre set di frammenti genererà un pool di molecole con diverse combinazioni di ampliconi legati tra loro, in quanto non è possibile imporre alcuna direzionalità o specificità di legame; è stato quindi necessario effettuare due reazioni di ligazione successive, ognuna seguita dall'amplificazione della combinazione di interesse. Si è quindi ottenuto prima il frammento LTRhsp70-gRNA-2, e successivamente LTRhsp70-gRNA-2-mpolyA.

Il frammento LTRhsp70-gRNA-2-mpolyA è stato poi digerito alle estremità con gli enzimi di restrizione XpnI e XbaI (grazie al fatto che l'amplificazione è stata condotta utilizzando primers contenenti siti di riconoscimento per queste endonucleasi), per essere poi clonato in modo direzionato nel vettore pLentiCRISPR-gRNA-2, anch'esso digerito con gli stessi enzimi. La reazione vede quindi la rimozione delle componenti U6-gRNA-EFS dal vettore costitutivo e l'inserimento dell'amplicone a monte del gene *cas9*. Tra mpolYA e *cas9* è inoltre presente la sequenza CCACC, un forte sito di inizio della traduzione, mantenuto per assicurare un'alta efficienza della reazione stessa. Per garantire l'esportazione dal nucleo dell'mRNA della Cas9, è stata mantenuta anche la sequenza di poliadenilazione (pA) a valle del gene *cas9*. D'ora in avanti ci si riferirà al costrutto LTRhsp70-gRNA-2-mpolyA-Cas9-pA con il nome LTRhsp-CRISPR.

Con lo stesso metodo, sono stati generati anche i vettori contenenti un ribozima a monte del gRNA (LTRhsp-MzCRISPR e LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR); le reazioni di PCR e ligazioni successive si sono svolte utilizzando dei primers che al 5' fornissero la sequenza dei ribozimi. L'utilizzo di LTRhsp-CRISPR come template, ha invece consentito lo sviluppo dei vettori con delezione, a livello della LTR, dei siti di riconoscimento per i fattori di trascrizione cellulari NF-kB e SP1.

3.4 Trasfezione di cellule epiteliali HeLa-CD4⁺ con Lipofectamina 2000

Per trasfezione si intende la procedura per il quale viene veicolato acido nucleico esogeno all'interno di cellule accettrici. Per questo lavoro, in più esperimenti è stata effettuata una trasfezione transiente di plasmidi in colture cellulari differenti di cellule HeLa-CD4⁺, utilizzando Lipofectamina 2000 in Opti-MEM I: una

formulazione contenente lipidi cationici e neutri (helper) che formano liposomi unilamellari contenenti l'acido nucleico e prodotti tramite tecniche di cavitazione fisica, ad esempio il sonificatore. Queste strutture permettono di neutralizzare la carica negativa del plasmide, la quale verrebbe contrastata da quella della membrana plasmatica, con lo scopo di facilitare l'entrata del genoma esogeno nella cellula di mammifero. L'impiego di questa tecnica ha dimostrato una buona efficienza anche nella penetrazione del DNA esogeno nel nucleo, rendendolo quindi disponibile all'apparato trascrizionale cellulare.

Per questo processo, è stato prima diluito 1µg di DNA plasmidico in Opti-MEM I (terreno che permette di aggiungere meno siero nella coltura cellulare), per poi essere unito alla Lipofectamina 2000, anch'essa diluita nelle proporzioni dettate dal protocollo. Si assembla quindi la soluzione di trasfezione e la si aggiunge al terreno di crescita delle cellule, si procede infine con incubazione a 37°C per i giorni designati ai relativi esperimenti.

Per l'analisi, è stata impiegata una piastra da colture cellulari da 6 pozzetti, ognuno di questi (con una confluenza cellulare del 60%) ha ricevuto come DNA plasmidico uno solo dei vettori in analisi, in aggiunta ad un plasmide di controllo dell'avvenuta trasfezione: pHIV-7-GFP, codificante una proteina fluorescente verde (la GFP) che permette di visualizzare le cellule che hanno assunto il DNA. Un quarto pozzetto ha ricevuto invece il solo pHIV-7-GFP, fungendo da controllo negativo per ognuno degli esperimenti di trasfezione.

3.5 Trasfezione di cellule T-linfoblastoidi CEM tramite elettroporazione

Per quanto riguarda le trasfezioni transienti nella linea cellulare T-linfoblastoide, i vettori vengono inseriti per elettroporazione con il Neon NxT Electroporation System di ThermoFisher Scientific. Come per le cellule HeLa-CD4+, il plasmide pHIV-7-GFP è stato inserito congiuntamente in ogni coltura come controllo dell'avvenuta trasfezione, e in una coltura separata come controllo negativo per le analisi e per il calcolo dell'efficienza della trasfezione stessa.

L'elettroporazione è una tecnica di natura fisica che consente di permeabilizzare la membrana plasmatica al materiale genetico da inserire: vengono imposti degli impulsi elettrici che destabilizzano la membrana e ne aprono dei pori transienti del diametro di alcuni nanometri. Con il giusto voltaggio, i vettori riescono ad attraversare questi pori ed entrare nelle cellule. Il numero dei passaggi che vengono aperti dipende dal voltaggio, tuttavia, questo non dovrà essere eccessivamente elevato altrimenti si rischierebbe di permeabilizzare la membrana in modo stabile, alterando così l'omeostasi cellulare e portando alla morte la cellula stessa.

3.6 Western Blot per rilevare la Ciclina T1 o la Cas9

I livelli di Ciclina T1 o della Cas9 nelle colture cellulari trasfettate sono stati analizzati a 8 giorni post-trasfezione mediante Western Blot, una tecnica che combina il potere risolutivo dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide, con la specificità di interazione tra antigene e anticorpo in una soluzione proteica complessa. Questa, infatti, prevede per prima cosa la corsa elettroforetica

dell'estratto totale delle proteine, in presenza di SDS, a seguire il suo trasferimento su una membrana immobilizzante (per mantenere la forma e il livello di diffusione acquisiti) e infine l'incubazione con anticorpi specifici per rilevare la posizione della proteina di interesse. È un metodo semi-quantitativo perché permette di determinare la concentrazione della proteina target dopo costruzione di una retta di taratura, con lo svantaggio che, oltre ad una certa soglia di concentrazione, la differenza non è più rilevabile, in quanto la banda non restituisce più un segnale proporzionale alla quantità di proteina contenuta.

Si è ottenuto quindi l'estratto delle proteine totali dalle colture cellulari e ne si è determinata la concentrazione tramite il metodo del BCA (acido bicinconinico), il quale è molto sensibile, veloce e permette di misurare la concentrazione in un range da 20µg/mL a 2.000µg/mL alla temperatura di 37°C. La reazione avviene in condizioni alcaline e porta alla formazione di complessi di colorazione violetto che assorbono a 592nm, la quantità di prodotto rilevato con lo spettrofotometro è proporzionale alla concentrazione proteica.

Una volta ottenuta la concentrazione dell'estratto proteico è possibile eseguire le corrette diluizioni per la preparazione dell'elettroforesi SDS-PAGE e il successivo blotting, ossia il trasferimento della corsa sulla membrana di PVDF. Segue la fase di blocco dei siti della membrana che potrebbero interagire in modo aspecifico con l'anticorpo, tramite aggiunta di una soluzione di blocking al 10%; per concludere, si effettua l'incubazione overnight della membrana con una soluzione di anticorpi primari specifici per la Ciclina T1 o la Cas9 e per la α -tubulina, infine una soluzione di blocking al 5%.

La rilevazione è stata effettuata tramite chemiluminescenza con l'utilizzo di Chemidoc di Bio-Rad: l'anticorpo secondario anti-rabbit/anti-mouse coniugato con la perossidasi di rafano è stato aggiunto alla membrana in presenza di luminolo, H₂O₂ e ossigeno atmosferico. L'ossidazione del luminolo dalla perossidasi produce una certa quantità di luce, rilevabile dal detector. La quantificazione delle rispettive proteine e la normalizzazione sulla α -tubulina è stata effettuata con il software Quantity One, sempre di Bio-Rad.

3.7 Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

È una tecnica immunoenzimatica molto sensibile che permette di rilevare ed identificare, in modo qualitativo e quantitativo, una sostanza specifica all'interno del campione biologico anche in quantità molto ridotte, in questo caso si tratta della proteina del capsido virale p24.

Esistono diversi protocolli per questo test, i ricercatori hanno utilizzato il kit della ditta ZeptoMetrix Corp per effettuare il "sandwich" ELISA: metodica adatta per analizzare le miscele complesse derivate da estratti cellulari. Il protocollo prevede l'immobilizzazione di anticorpi specifici per la p24 sul fondo del micropozzetto, l'aggiunta del campione biologico ed infine un lavaggio per eliminare interazioni aspecifiche; solo le proteine virali, se presenti, andranno a legarsi agli anticorpi posizionati. Successivamente, si aggiungono un secondo anticorpo specifico per p24 coniugato con biotina e una molecola chimerica formata da streptavidina e perossidasi di rafano. Il forte legame tra biotina e streptavidina consente,

all'aggiunta dei substrati della perossidasi, di quantificare la presenza di p24 nell'estratto proteico in modo analogo a quanto succede con il Western Blot.

3.8 Infezione delle CEM con HIV-1 ceppo IIB

Per testare la valenza dei risultati anche in un modello fisiologicamente più rilevante, sono state infettate 3×10^6 cellule di linea cellulare T-linfoblastoide (CEM), cellule immature della linea dei linfociti T, con il ceppo virale di HIV-1 IIB, un ceppo solitamente utilizzato nei laboratori con un unico tropismo per il co-recettore CXCR4. L'infezione è stata condotta in presenza di Polybrene (bromuro di esadimetrina), un polimero cationico che aumenta l'efficienza di infezione di cellule di mammifero da parte dei retrovirus, grazie al fatto che maschera le cariche negative che porterebbero ad una certa repulsione tra virione e superficie cellulare. Dopo 24h le cellule sono state centrifugate, risospese in un terreno di crescita completo e fatte proliferare per 12 giorni, durante i quali i livelli di p24 sono stati analizzati ogni 72h per monitorare il decorso dell'infezione. Le cellule sono state infine separate in diverse aliquote da 10^6 cellule l'una.

3.9 Trasduzione di cellule T-linfoblastoidi CEM

Per trasduzione si intende il trasferimento di materiale genetico esogeno in una cellula mediante l'impiego di un virus. In questo studio, sono stati utilizzati dei lentivirus per consentire l'integrazione dei geni di interesse nel cromosoma della cellula ospite, in modo tale da analizzare gli effetti della presenza stabile del sistema CRISPR/Cas9 condizionale in cellule T-linfoblastoidi.

I lentivirus sono stati aggiunti ad una molteplicità di infezione pari a 100 ai terreni di coltura delle CEM precedentemente infettate e lasciati agire per 24h; in base all'esperimento, il terreno è stato poi sostituito con uno fresco o con uno contenente il farmaco antiretrovirale Tenofovir. Per gli esperimenti condotti con Tenofovir, dopo 3 giorni il terreno è stato nuovamente sostituito con uno fresco, senza farmaco.

3.10 Analisi della vitalità cellulare: Colorazione con Trypan Blue

Il Trypan Blue (TB) è un colorante organico idrofilico (anionico), il cui cromoforo è il gruppo azoico (-N=N-) legato ai due lati da gruppi aromatici. Questo composto è in grado di penetrare nelle membrane danneggiate delle cellule morte e legare le proteine citoplasmatiche, dando una colorazione blu intenso al citoplasma di queste cellule; le cellule vive e sane hanno la membrana intatta, quindi il colorante non può entrare e il loro citoplasma rimane chiaro.

La tecnica prende anche il nome di "colorazione per esclusione", in quanto vengono evidenziate le cellule morte. È veloce, facile, economica e la conta può essere effettuata dall'operatore tramite l'utilizzo di una Camera di Burker e un microscopio ottico, oppure tramite contatori di cellule automatici; gli autori dell'articolo hanno utilizzato il TC20 Automated Cell Counter di Bio-Rad.

Per prima cosa, le cellule, che crescono adese al pozzetto, vengono messe in sospensione tramite trattamento con TE (Tripsina-EDTA) e TNS (Soluzione di

Neutralizzazione della Tripsina). La tripsina è un enzima digestivo che taglia le proteine: concentrazioni e tempi di reazione appropriati permettono di tagliare solo quelle proteine adibite all'adesione al pozzetto; l'EDTA è un chelante che aumenta l'efficienza della tripsina tramite il sequestro degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , i quali potrebbero mascherare i siti di taglio sui bersagli. Il TNS viene aggiunto subito dopo il TE per inattivare l'enzima ed evitare danni alle cellule.

Successivamente, le cellule vengono risospese in una matrice senza siero, questo perché il TB ha un'affinità maggiore per le proteine del siero rispetto a quelle citoplasmatiche, la matrice potrebbe quindi assumere un colore troppo scuro che non permetterebbe una conta accurata. Si aggiungono concentrazioni adeguate di TB a temperatura ambiente e la sospensione viene caricata nelle camere di conta adatte per TC20; conteggi dopo 3-5min dall'aggiunta del colorante non sono più significativi in quanto le cellule vengono velocemente danneggiate dallo stesso. Infine, per determinare la vitalità, si calcola la percentuale di cellule vive sul totale delle cellule contate.

4. RISULTATI OTTENUTI E DISCUSSIONE

4.1 Unico promotore di fusione (LTRhsp) per la co-espressione di un shRNA e un mRNA

Come accennato nell'introduzione, la trascrizione efficiente dei geni del provirus avviene grazie al riconoscimento del TAR-loop da parte di Tat, generato in prossimità della sequenza LTR prima della pausa trascrizionale. Questo promotore è stato quindi sfruttato per esprimere uno short-hairpin RNA (shRNA) che potesse funzionare da guide-RNA nel sistema di editing genomico CRISPR/Cas9, in modo condizionale solo nelle cellule infettate da HIV-1. Il problema di questo approccio è che nel trascritto completo viene mantenuto il TAR-loop al 5', il quale causa una minor efficienza d'azione dello shRNA. È stato quindi generato un promotore di fusione composto dalle sequenze di regolazione di LTR (quindi sempre attivabile in modo condizionale), ma con il core promoter del promotore heat-shock 70 (hsp70) di *Drosophila*. Questo consentirà il posizionamento del complesso di allungamento a valle del TAR-loop per permettere la sintesi di un trascritto che abbia come prima base la base +1 dello shRNA, eliminando perciò la sequenza aggiuntiva al 5'. La fusione dei due è stata resa possibile in quanto presentano sequenze simili fiancheggianti il TATA-box, hanno cinetica simile quando attivati ed inoltre sono entrambi regolati dal complesso P-TEFb. Il sistema è stato ideato in un precedente articolo [10] e clonato in un plasmide denominato LTRhsp70-shRNA.

Essendo più sicura di un'espressione del sistema tramite medicinali, si vuole mantenere l'espressione condizionale di CRISPR/Cas9 anche per quanto riguarda la componente da tradurre, ossia il gene della Cas9. Per fare ciò, i ricercatori sfruttano un sistema osservato in diverse specie virali, nelle quali si utilizzano sequenze di poliadenilazione multiple per generare diversità a partire da un'unica cassetta trascrizionale. Viene generato quindi un costrutto con una minima sequenza di poliadenilazione (mpolyA) tra la regione che trascrive lo shRNA e

quella per il gene *cas9*: una parte dei trascritti la utilizzerà come terminazione, un'altra parte la leggerà per terminare alla fine del gene della Cas9, dove ci sarà una sequenza di terminazione più efficiente (pA).

4.2 Identificazione del gRNA migliore

L'efficienza dell'editing genomico con la tecnica CRISPR dipende da diversi fattori legati al gRNA utilizzato; è quindi importante trovare la sequenza che massimizzi l'efficienza di taglio e minimizzi gli effetti off-target. I fattori da tenere in considerazione sono: la composizione nucleotidica vicino al sito PAM, la struttura epigenetica sul sito target e in sua prossimità, la percentuale di CG del filamento di gRNA e sue strutture secondarie.

Dal collegamento web allegato nei metodi dell'articolo, si vede come i ricercatori abbiano utilizzato GenScript per disegnare sei possibili gRNA che bersagliassero in modo univoco un esone del gene *CCNT1* umano, alcuni per il filamento senso e altri per il filamento antisense. Per ognuno è stato calcolato lo score di taglio corretto (on-target score) e quello di taglio scorretto (off-target score), sono stati selezionati i tre gRNA con lo score totale più alto. Questi sono stati poi acquistati dal laboratorio sotto forma di vettori lentivirali (pLenti), contenenti il gRNA ed il gene codificante la proteina Cas9 sotto il controllo trascrizionale di due promotori ubiquitari diversi. Per trascrivere il gRNA si utilizza il promotore dello small-nuclear RNA-U6 (un non-coding RNA del complesso dello spliceosoma), riconosciuto dalla RNA pol III; mentre il trascritto della Cas9 è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore di EFS (una proteina che funge da adattatore in complessi di trasduzione del segnale), riconosciuto dalla RNA pol II.

Vengono quindi trasfettate colture di cellule epiteliali HeLa-CD4⁺ mediante la procedura descritta nei metodi di questo elaborato, dove i tre vettori lentivirali sono i plasmidi pLentiCRISPR-gRNA-1, pLentiCRISPR-gRNA-2 e pLentiCRISPR-gRNA-3 selezionati; per ognuna è stato poi analizzato il livello di soppressione della Ciclina T1 con Western Blot, normalizzato su α -tubulina. Per valutare se fosse presente un'effettiva correlazione tra soppressione della T1 e l'inibizione del virus è stata effettuata una seconda trasfezione, con la stessa combinazione di plasmidi, ma in colture di cellule HeLa-CD4⁺ presentanti un'infezione cronica di HIV-1. Dopo 6 e 8 giorni post-trasfezione sono stati prelevati i supernatanti delle cellule infettate per analizzare la quantità di proteina p24 (proteina del capsido virale, CA) tramite test ELISA, questa proteina fornisce un'affidabile indicazione sulla quantità di virus presente.

Dalla *Figura 1 dell'articolo in appendice* sono riportati i risultati relativi a questi primi esperimenti. Dal *Grafico A* si osserva che la soppressione della ciclina avviene per tutti e tre i vettori, ma risulta maggiore quando utilizzato il plasmide contenente il gRNA-2, arrivando fino a ~50% di soppressione. Inoltre, il *Grafico B* dimostra la correlazione di queste soppressioni con l'inibizione della sintesi di HIV-1, in quanto sono presenti quantità inferiori di p24 per tutti e tre i vettori rispetto al controllo. Anche in questo caso il gRNA-2 ha prodotto i risultati migliori, comportando la soppressione del ~96-98% del virus, rispetto al controllo,

al sesto e ottavo giorno post-trasfezione. È importante considerare che il plasmide ha un'emivita di circa 6 giorni nella cellula; i dati relativi all'inattivazione di p24 si riferiscono quindi a momenti in cui il plasmide non era più presente nelle cellule, dimostrando che l'effetto della soppressione permane anche quando l'espressione del sistema CRISPR/Cas9 non è più attiva.

4.3 Costruzione della CRISPR-cassette

Per limitare al massimo gli eventi di taglio off-target che potrebbero verificarsi con l'utilizzo di promotori costitutivi che esprimano il sistema CRISPR, i ricercatori hanno sviluppato una strategia che consente l'espressione sia del gRNA che dell'mRNA della Cas9 a partire da un unico promotore condizionale: LTRhsp precedentemente descritto. Per evitare, inoltre, che il sistema condizionale avesse una debole espressione nelle cellule non infettate a causa di eventi di trascrizione Tat-indipendenti, si sono costruiti altri due vettori contenenti delezioni di siti di legame per fattori trascrizionali cellulari presenti in LTR: NF-kB e SP1.

Sono stati fatti quindi dei confronti tra trasfezioni, sia di cellule HeLa-CD4⁺ infettate che non infettate, con i plasmidi LTRhsp-CRISPR, LTRhsp(Δ NF-kB)-CRISPR (non contenente i due siti di legame di NF-kB), LTRhsp(Δ SP1)-CRISPR (non contenente i tre siti di legame di SP1) e il controllo pHIV-7-GFP; i risultati sono riportati nel *Grafico B - Figura 2 dell'articolo in appendice* (riportato a lato), il quale descrive i dati relativi ad un Western Blot condotto su Cas9 e normalizzato su α -tubulina.

Si nota come l'assenza dei siti per NF-kB inibisca completamente l'espressione della Cas9 anche nelle cellule infettate, dimostrando che questo è un sito fondamentale anche per la trascrizione Tat-dipendente. Al contrario, la delezione dei siti per SP1 favorisce una non desiderata minima espressione della Cas9 nelle cellule non infettate; per questi motivi i successivi esperimenti hanno continuato a svolgersi con il vettore LTRhsp-CRISPR.

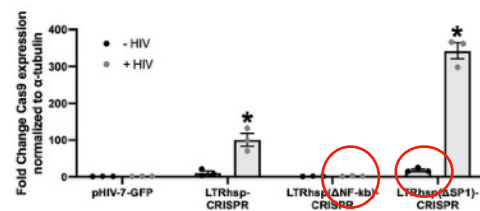


Grafico B - Figura 2 articolo in appendice

Una volta testato il promotore condizionale per l'espressione corretta della Cas9, è necessario verificare che adempia agli obiettivi per i quali è stato formulato: si vuole quindi capire se effettivamente LTRhsp-CRISPR inattivi la ciclina solo nelle cellule contenenti l'infezione. Per l'analisi, vengono effettuate nuove trasfezioni transienti seguite dall'estrazione delle proteine totali per osservare i livelli di inibizione della Ciclina T1 valutando la sua presenza mediante Western Blot normalizzato su α -tubulina.

Si confrontano quindi i livelli di T1 sia per quanto riguarda il promotore condizionale che per quello costitutivo (in parallelo al controllo negativo con pHIV-7-GFP), per entrambe le colture di cellule HeLa-CD4⁺ infettate e non infettate. Dai *Grafici C e D - Figura 2 dell'articolo in appendice* (riportati sotto) si osserva che effettivamente si ha inibizione della T1, nelle cellule infettate, da

parte di entrambi i promotori (*Grafico C*); tuttavia, in quelle non infettate il promotore di fusione LTRhsp non si attiva (*Grafico D*), la soppressione della ciclina in queste colture è, come atteso, solo da parte del promotore costitutivo.

Il costrutto LTRhsp-CRISPR è stato pertanto testato per valutare l'efficienza di inibizione di HIV-1 tramite test ELISA condotto contro la proteina capsidica p24, analogamente a quanto effettuato in precedenza.

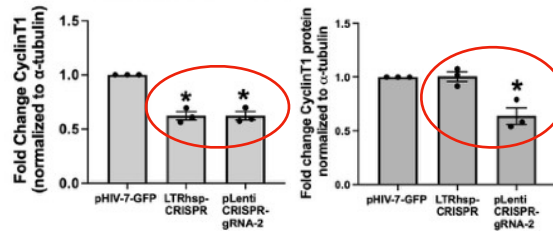


Grafico C - Figura 2
articolo in appendice

Grafico D - Figura 2
articolo in appendice

Dal confronto della parte relativa a pLentiCRISPR-RNA-2 del *Grafico B - Figura 1* con il *Grafico E - Figura 2 dell'articolo in appendice* si osserva che l'efficienza di inibizione del virus con l'espressione del sistema costitutivo è significativamente maggiore rispetto a quella data dal condizionale, con una diminuzione della stessa da ~98% a ~75%, rispetto al controllo, all'ottavo giorno post-trasfezione. Questo è probabilmente dato dal fatto che, al contrario del promotore costitutivo che richiama la RNA pol III, il promotore di fusione richiama la RNA pol II, la quale media la formazione del cap-5' nei trascritti che sintetizza, con conseguente esportazione dal nucleo; il problema sta nel fatto che, mentre l'mRNA deve essere efficacemente esportato per la sua traduzione in Cas9, il gRNA deve rimanere nel nucleo per potersi appaiare alla sequenza di CCNT1 e quindi mediarne il knock-out.

Per consentire la diversa localizzazione dei trascritti espressi da un unico promotore, i ricercatori inseriscono un ribozima *cis-acting* tra il promotore e la sequenza di gRNA: si tratta di una versione modificata del ribozima denominato "hammerhead", la quale taglia il legame fosfodiesterico in prossimità della sequenza 5'-NXX-3' (dove in N può esserci qualsiasi nucleotide, mentre in X non può esserci G), mediando l'eliminazione del cap-5' solo in una proporzione dei trascritti. Questa versione è denominata minizyme, in quanto contiene una sequenza più breve dell'originale in prossimità del sito catalitico, la quale determina una minor frequenza di taglio del ribozima stesso. Un controllo sviluppato per osservare il rapporto ottimale tra trascritti a cui viene mantenuto e a cui viene tagliato il cap-5', è stato tramite la formulazione di un secondo ribozima, più debole del minizyme per il fatto che riconosce una sequenza di taglio non canonica (NUG). I vettori con i ribozimi sono denominati rispettivamente LTRhsp-MzCRISPR e LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR.

I livelli di p24 sono stati monitorati con test ELISA ogni 72h per 12 giorni, dopo trasfezione transiente in cellule HeLa-CD4⁺ infettate con i tre vettori. Dal *Grafico C - Figura 3 dell'articolo in appendice* si osserva come tutti e tre i sistemi CRISPR inibiscano p24 in modo significativo rispetto al controllo, ma i due con il ribozima mostrano un piccolo, ma presente, miglioramento; tra loro due invece non si osservano differenze significative.

Alla fine di ogni esperimento sopra descritto, si è effettuata l'analisi della vitalità cellulare, tramite colorazione con Trypan Blue, per verificare che non ci fossero effetti dannosi o tossici dopo soppressione della Ciclina T1 nelle cellule. In nessun caso si è osservata una diminuzione della vitalità o del numero di cellule vive presenti, risultato molto rilevante perché consente di porre le basi per ottimizzare la strategia ed applicarla su sistemi fisiologicamente più prossimi ai bersagli, *in vivo*, di HIV-1. Uno svantaggio che si trova nella tecnica di colorazione per esclusione è quello di essere poco accurata e con risultati variabili, per questo motivo si sarebbero potute utilizzare altre tipologie di saggi di vitalità, ad esempio il saggio MTT oppure il CellTiter-Glo. Questi ultimi misurano l'attività metabolica delle cellule, quindi vanno a contare direttamente le cellule vitali.

Il saggio MTT è uno dei saggi più utilizzati per determinare la vitalità delle cellule per la sua facilità e velocità nell'utilizzo, per la sua alta sensibilità e rendimento. Il Tiazolo Blu (MTT) è un composto eterociclico aromatico idrosolubile e di colore giallo, quando inserito nel terreno si ha la scissione dell'anello per riduzione da parte della succinato deidrogenasi, enzima mitocondriale che fisiologicamente converte il succinato in fumarato durante il Ciclo di Krebs; è quindi un buon indicatore dello stato di salute della cellula. Il prodotto della riduzione è il formazano, un colorante viola insolubile che si deposita nelle cellule e viene successivamente ri-solubilizzato con isopropanolo o altri solventi per misurarne l'assorbanza (e quindi la concentrazione) mediante spettrofotometro.

Per quanto riguarda il CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, la reazione è ad opera della luciferasi, enzima tipico di insetti come le lucciole, il quale è responsabile della produzione di bioluminescenza a partire dal suo substrato luciferina. In presenza di Mg^{2+} , ATP e ossigeno molecolare infatti, l'enzima ossida la luciferina e rilascia fotoni (luce). Questo è tra i metodi più veloci, con 10min di incubazione è infatti possibile ottenere un bagliore stabile e misurabile dal luminometro. Si evince quindi che la quantità di luce prodotta sarà direttamente proporzionale alla quantità di ATP disponibile per la funzionalità dell'enzima, lo stesso ATP prodotto dalle cellule vive presenti; la correlazione tra luminescenza e numero di cellule è quindi lineare.

4.4 Utilizzo del sistema CRISPR in combinazione con un trattamento antiretrovirale: Tenofovir e cellule T-linfoblastoidi CEM

Una volta provata l'efficacia del sistema nelle cellule HeLa-CD4⁺, è necessario testarla anche in un modello fisiologicamente più rilevante. A tale scopo sono state utilizzate cellule T-linfoblastoidi (CEM), queste sono state infettate con il ceppo virale di HIV-1 IIB, come descritto nei metodi di questo elaborato, è seguita poi l'elettroporazione dei quattro vettori (tre cassette-CRISPR e il controllo negativo pHIV-7-GFP) e il monitoraggio dei livelli di p24 con un test ELISA ogni 72h; i risultati si possono osservare nel *Grafico A - Figura 4* e nel *Grafico A - Figura 5 dell'articolo in appendice*. In entrambi si vede la soppressione del virus per tutti e tre i costrutti CRISPR; nel primo, tuttavia, si registra una ripresa del titolo virale già dal nono giorno. Secondo i ricercatori, la causa di questo potrebbe essere l'infezione *de novo* di quelle cellule che non erano

riuscite ad incorporare il plasmide durante la trasfezione; qui la Cas9 non medierà la soppressione della Ciclina T1, quindi il genoma del provirus potrà essere trascritto e portare al rilascio di particelle virali da parte di queste cellule.

Per questo motivo, il secondo grafico si riferisce alla condizione sperimentale successiva, i cui valori di p24 sono rilevati da cellule che hanno subito un trattamento con il farmaco antiretrovirale Tenofovir per i primi 3 giorni post-elettroporazione. Essendo un inibitore della trascrittasi inversa, il farmaco eviterà le infezioni *de novo* delle cellule prive dei vettori, ma non influirà sull'espressione dei geni virali nelle cellule già infettate. Per queste condizioni, la soppressione del virus risulta dell'85-90%, rispetto al controllo, fino al 21esimo giorno, momento in cui viene terminato l'esperimento. Il contributo di Tenofovir nell'aumentare l'efficacia d'inibizione del virus si osserva anche nella colonna riferita a pHIV-7-GFP+Tenofovir, in cui c'è una significativa differenza di quantità di p24 dal nono al quindicesimo giorno.

Anche per questi due esperimenti viene svolta l'analisi della vitalità cellulare con colorazione per esclusione (*Grafici B - Figure 4 e 5 dell'articolo in appendice*), rispettivamente al giorno 12 e al giorno 21, riconfermando la non tossicità del sistema per la vitalità delle cellule.

Come ultimo disegno sperimentale, una condizione fisiologicamente più rilevante è la veicolazione dei geni esogeni tramite lentivirus ricombinanti, proprio come si svolgerebbe in un modello *in vivo*, sempre in presenza di trattamento con

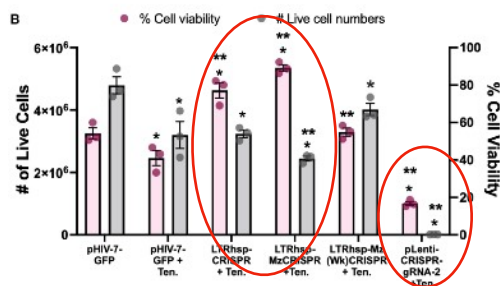


Grafico B - Figura 6 articolo in appendice

Tenofovir. I lentivirus medieranno l'integrazione dei transgeni nel genoma delle cellule, permettendo così di testare l'effetto della presenza del sistema nel contesto cellulare nel lungo periodo. Come si vede dal *Grafico B - Figura 6 dell'articolo in appendice* (riportato a lato), in questo modello la vitalità cellulare e il numero di cellule vive sono fortemente influenzate dalla tipologia di vettore veicolato con il lentivirus. Si

osserva un miglioramento della vitalità cellulare, rispetto al controllo, delle CEM trasdotte con LTRhsp-CRISPR o LTRhsp-MzCRISPR, probabilmente per la minor presenza di virus circolante; il minor numero di cellule vive riscontrate con questi vettori, rispetto al controllo, fa riferimento invece alla cinetica più lenta con cui le cellule si replicano, determinata dalla sostituzione della Ciclina T1 con altre cicline nel complesso P-TEFb. Il vantaggio è anche dato dal fatto che il sistema è auto-limitante, si attiva infatti con l'interazione Tat-T1, quindi la soppressione della ciclina porterà al silenziamento del sistema e ad una significativa limitazione degli effetti off-target.

L'entità degli effetti off-target causati dall'espressione costitutiva del sistema CRISPR si può apprezzare nelle CEM trasdotte con il pLentiCRISPR-gRNA-2,

questo gruppo è infatti caratterizzato da un bassissimo numero di cellule vive e con una vitalità ridotta, a rispecchiare l'elevata mortalità cellulare.

Per quanto riguarda invece i livelli di soppressione del virus (*Grafico A - Figura 6 dell'articolo in appendice*), si vede una differenza significativa tra i valori riferiti al vettore senza il ribozima da quelli che invece lo presentano, cosa non osservata invece negli esperimenti precedenti con le CEM. I lentivirus, infatti, mediano la veicolazione nel nucleo di un numero limitato di copie genomiche (2-10 copie), rendendo quindi fattore limitante la quantità di gRNA che effettivamente sarà trattenuta nell'organello per garantire il riconoscimento della sequenza bersaglio; non è invece limitante quando si utilizza l'elettroporazione, i vettori che raggiungono il nucleo sono in gran numero (50-75.000 copie) e la quantità di RNA guida che vi permane è sufficiente per far funzionare il sistema. I risultati migliori si sono ottenuti con LTRhsp-MzCRISPR (in combinazione con Tenofovir), in quanto l'elevata vitalità cellulare è associata a valori di p24 non rilevabili dal giorno 12 al giorno 21, con una lieve ripresa del titolo virale al giorno 24 comunque statisticamente minore rispetto agli altri sistemi CRISPR.

5. CONCLUSIONE

Con questo lavoro si è dimostrata l'efficacia del silenziamento di HIV-1 tramite soppressione di un fattore cellulare necessario per la replicazione del virus stesso, ponendo le basi per una possibile futura terapia *in vivo* che possa funzionare in assenza dell'assunzione a vita di medicinali antiretrovirali. Viene dimostrato anche che l'espressione controllata e condizionale della tecnologia di modifica genomica CRISPR/Cas9 è in grado di effettuare il knock-out di una sequenza bersaglio, senza alterare le funzionalità della cellula.

Nell'introduzione si sono visti i possibili approcci per silenziare HIV-1 ed evitare eventi di "viral escape" verificabili nel caso in cui si andassero ad eseguire tagli sul genoma del provirus, in quanto eventi di NHEJ potrebbero ripristinare una sequenza ancora codificante per una proteina virale funzionante, ma con mutazioni che non la rendono più riconoscibile dal gRNA. Motivo per il quale gli autori dell'articolo hanno utilizzato, come bersaglio, un gene cellulare. È stato tuttavia pubblicato nello stesso periodo un secondo lavoro (Dash PK et al, *CRISPR editing of CCR5 and HIV-1 facilitates viral elimination in antiretroviral drug-suppressed virus-infected humanized mice*, PNAS, 120, 2023) in cui si osserva, *in vivo*, una parziale eliminazione dei *reservoirs* dal tessuto linfoide e dal sistema nervoso centrale nel 58% dei topi trattati. In questo studio è stata utilizzata una double-CRISPR, in cui viene generata la delezione CCR5 Δ 32 nel gene ospite seguita dalla lesione della regione LTR-Gag del provirus, in presenza di un iniziale trattamento cART.

Nonostante i risultati promettenti, la principale limitazione di questi studi è la non-cellulo-specificità del sistema: per quanto la tecnologia funzioni nei *reservoirs* in cui riesce ad inserirsi, le cellule che contengono il provirus non sono direttamente riconoscibili dai vettori virali utilizzati, quindi ne rimarrà una parte che potrebbe portare ad un recupero del titolo virale dopo cessazione della terapia.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. **HIV-1 replication cycle**. Clin Lab Med. 2002 Sep;22(3):611-35. doi: 10.1016/s0272-2712(02)00015-x. PMID: 12244589.
- [2] De Grazia S., Ferraro D., Giammanco G., **Microbiologia e microbiologia clinica. Per le professioni sanitarie e odontoiatria. Terza edizione**. Pearson, Milano, 2021, pp. 177-181
- [3] Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. **Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications**. Methods. 2004 Jun;33(2):95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. PMID: 15121163.
- [4] Taylor SC, Posch A. **The design of a quantitative western blot experiment**. Biomed Res Int. 2014;2014:361590. doi: 10.1155/2014/361590. Epub 2014 Mar 16. PMID: 24738055; PMCID: PMC3971489.
- [5] Strober W. **Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability**. Curr Protoc Immunol. 2015 Nov 2;111:A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. PMID: 26529666; PMCID: PMC6716531.
- [6] <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it>
- [7] <https://sirion-biotech.com/viral-vectors/lentivirus>
- [8] Barrangou R, Marraffini LA. **CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity**. Mol Cell. 2014 Apr 24;54(2):234-44. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011. PMID: 24766887; PMCID: PMC4025954.
- [9] Magro G, Calistri A, Parolin C. **Targeting and Understanding HIV Latency: The CRISPR System against the Provirus**. Pathogens. 2021 Sep 28;10(10):1257. doi: 10.3390/pathogens10101257. PMID: 34684206; PMCID: PMC8539363.
- [10] Unwalla HJ, Li MJ, Kim JD, Li HT, Ehsani A, Alluin J, Rossi JJ. **Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA**. Nat Biotechnol. 2004 Dec;22(12):1573-8. doi: 10.1038/nbt1040. Epub 2004 Nov 28. PMID: 15568018.

A conditional RNA Pol II mono-promoter drives HIV-inducible, CRISPR-mediated cyclin T1 suppression and HIV inhibition

Srinivasan Chinnapaiyan,¹ Maria-Jose Santiago,¹ Kingshuk Panda,¹ Md. Sohanur Rahman,¹ Jessica Alluin,² John Rossi,² and Hoshang J. Unwalla¹

¹Department of Immunology and Nanomedicine, Institute of Neuroimmune Pharmacology, Herbert Wertheim College of Medicine, Florida International University, Miami, FL 33199, USA; ²Beckman Research Institute of the City of Hope National Medical Center, Monrovia Biomedical Research Center MBRC, 1218 S. Fifth Av., Monrovia, CA 91008, USA

Gene editing using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) targeted to HIV proviral DNA has shown excision of HIV from infected cells. However, CRISPR-based HIV excision is vulnerable to viral escape. Targeting cellular co-factors provides an attractive yet risky alternative to render viral escape irrelevant. Cyclin T1 is a critical modulator of HIV transcription and mediates recruitment of positive transcription elongation factor-b (P-TEFb) kinase for transcriptional elongation. Hence, a CRISPR-mediated cyclin T1 inactivation will silence HIV transcription, locking it in an inactive form in the cell and thereby serving as an effective antiviral and possibly effecting a functional cure. However, cellular genes play important roles, and their uncontrolled inhibition can promote undesirable effects. Here, we demonstrate a conditional inducible RNA polymerase II (RNA Pol II) mono-promoter-based co-expression of a CRISPR system targeting cyclin T1 from a single transcription unit. Co-expression of guide RNA (gRNA) and CRISPR-associated protein (Cas9) is observed only in HIV-infected cells and leads to sustained HIV suppression in stringent chronically infected cell lines as well as in T cell lines. We further show that incorporation of *cis*-acting ribozymes immediately upstream of the gRNA further enhances HIV silencing.

INTRODUCTION

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein (Cas) systems have been extensively used for loss-of-function research as well as therapeutic disease to modulate disease outcomes. CRISPR has been employed for gene editing, epigenetic modulation, or transcriptional control (using modified Cas9 activators). CRISPR depends on complementarity between the guide RNA (gRNA) sequence and the DNA sequence to hybridize and direct Cas9-mediated cleavage of double-stranded DNA. Even though hybridization of the ~20 bp region between the gRNA and the target DNA is necessary for CRISPR-mediated cleavage, unregulated CRISPR expression can lead to off-target effects,^{1–4} resulting in genetic mutations that can cause loss of gene function, leading to carci-

nogenesis or toxicity. Moreover, all expression systems to date produce gRNAs from RNA polymerase III (RNA Pol III)-based promoters, resulting in uncontrolled overexpression of gRNAs that can also mediate antisense effects on cellular RNAs due to partial complementarity further contributing to off-target effects. While constitutive expression is acceptable for gene editing in functional genomic studies, therapeutic applications of CRISPR require temporal, conditional, or cell-type-specific CRISPR expression. Several drug-inducible systems have been reported that regulate transcriptional and post-transcriptional Cas9 expression (for review, see Zhang et al.⁵). Some studies have attempted inducible Tet-ON and Tet-OFF RNA Pol II promoters for temporal control of Cas9 expression.⁶ Yet, others have used Cre-based transcriptional regulation.⁷ These systems always involve RNA Pol II-mediated inducible Cas9 expression while retaining RNA Pol III-mediated constitutive gRNA expression, thereby requiring separate transcriptional units. While a drug-inducible system provides temporal control in a research setting, it is not suitable in a therapeutic setting, as every cell harboring the CRISPR system would express Cas9 (and the constitutively expressed gRNA) upon administration of the drug. Conditional or cell-type-specific expression has distinct advantages in that the expression system can be triggered only in specific cells or tissues under certain conditions, thereby allowing greater flexibility in targeting genes that can otherwise have important roles in cellular homeostasis. In this article, we demonstrate an RNA Pol II mono-promoter-based conditional CRISPR expression system that co-expresses a gRNA and Cas9 from a single expression cassette to effect negative feedback silencing of HIV.

The advent of combined antiretroviral therapy (cART) has led to a dramatic decline in morbidity and mortality from HIV/AIDS.

Received 5 January 2022; accepted 13 April 2023;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.04.011>.

Correspondence: Hoshang J. Unwalla, PhD, Department of Immunology and Nanomedicine, Institute of Neuroimmune Pharmacology, Herbert Wertheim College of Medicine, Florida International University, 11200 SW 8th Street, AHC-1 # 421, Miami, FL 33199, USA.
E-mail: hunwalla@fiu.edu



However, cART is unable to eradicate HIV due to established HIV reservoirs. HIV replication persists even in presence of suppressive cART.^{8,9} Moreover, a recent paradigm-shifting single genome study shows that the “silent majority” of the HIV reservoir harbors transcriptionally active HIV that continuously adapts to suppressive factors, allowing the reservoir to survive, proliferate, and persist even with suppressive cART.^{10,11} These transcriptionally active reservoirs can express viral proteins like Tat and gp120 even with suppressive cART, leading to pleiotropic effects. This is one of the primary causes of non-AIDS comorbidities of HIV. A number of cell types can serve as HIV reservoirs in diverse tissues namely resting CD4+ T cells, macrophages, astrocytes, and microglia.¹² While CRISPR-mediated HIV excision has shown promise, its application is stymied by some of the same limitations with previous gene therapy approaches targeting the viral RNA/genome, namely mutations within the hybridization and cleavage sites.¹³ Targeting cellular co-factors critical to HIV replication remains the most attractive (to prevent HIV escape) yet risky strategy (due to cellular roles of these genes) to cure HIV or effect long-term suppression.

Positive transcription elongation factor-b (P-TEFb), a heterodimer of CDK9 and cyclin T1, serves as a master regulator of HIV transcription. HIV Tat recruits P-TEFb, which phosphorylates negative elongation factor (NELF) and the C-terminal domain of RNA Pol II to overcome promoter proximal pausing and make the polymerase elongation competent.¹⁴ Viral reactivation by Tat-dependent and Tat-independent means requires cyclin T1-mediated CDK9 recruitment.¹⁵⁻¹⁹ Hence, P-TEFb kinase-mediated phosphorylation of RNA Pol II serves as a master switch to turn on HIV replication, and inhibition of P-TEFb blocks HIV replication.²⁰⁻²² In our earlier reports, we have shown that an HIV long-terminal repeat (LTR)-minimal hsp70 fusion promoter can co-express a small RNA (small hairpin RNA [shRNA]) and a protein (RevM10).²³ In this study, we report that our HIV LTR-hsp70 fusion promoter directs HIV-inducible co-expression of gRNA and Cas9 from a single cassette. As proof of concept, we show that a CRISPR system targeting the HIV cellular co-factor cyclin T1 is expressed (and mediates Cyclin T1 inactivation) only in HIV-infected cells. This results in sustained suppression of HIV without affecting cell viability. We further demonstrate that inserting *cis*-acting ribozymes to remove the 5-methyl guanosine cap on gRNAs further improves efficacy and duration of HIV silencing. We posit that the gRNA and Cas9 expression would be self-limiting, as the CRISPR expression system also depends on Tat-cyclin T1 interaction. Once cyclin T1 is eliminated, transcription from both the proviral DNA as well as the fusion promoter would cease.

RESULTS

HIV Tat interacts with cyclin T1 to recruit CDK9 to the paused RNA Pol II, and this interaction is considered both necessary and sufficient for HIV transcription.²⁴⁻²⁷ CRISPR efficiency depends on several factors including nucleotides near the protospacer-adjacent motif (PAM) site and the epigenetic assembly at or near the target site.^{28,29} Moreover, the G-C percentage and secondary structures of

the gRNA itself can play an important role in determining efficiency of CRISPR-mediated genome editing.²⁸

To screen an effective editing site, we tested three different gRNA sequences designed by Genescript, gRNA-1, gRNA-2, and gRNA-3, which were purchased as lentiviral vector clones (pLentiCRISPR-gRNA-1, pLentiCRISPR-gRNA-2, or pLentiCRISPR-gRNA-3). A U6 promoter drives RNA Pol III-mediated gRNA expression with an RNA Pol II EFS promoter drives Cas9 expression. The three cyclin T1 gRNAs were tested individually in transient transfection assays in HeLa cells for their ability to inactivate cyclin T1 (lentiviral vector pHIV-7-GFP,^{23,30} as control). 8 days post-transfection, total protein was analyzed for cyclin T1 by western blot analyses. pLentiCRISPR-gRNA-2 showed the best cyclin T1 inactivation (Figure 1A). Next, we determined if the extent of cyclin T1 inactivation correlates to HIV inhibition. For these experiments, we used more stringent post-infection models. Chronically HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with either pHIV-7-GFP (control) or individually with pLentiCRISPR-gRNA-1, pLentiCRISPR-gRNA-2, or pLentiCRISPR-gRNA-3. pHIV-7-GFP also served as an index of transfection efficiency. Experiments were allowed to proceed for 8 days to allow cyclin T1 inactivation to have a measurable effect on HIV p24 levels. Culture supernatants were analyzed on days 6 and 8 post-transfection by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for HIV p24, a reliable indicator of HIV infection. Experiments were terminated on day 8, and cell viability and the number of live cells were determined. All three gRNAs suppressed HIV, with pLentiCRISPR-gRNA-2 showing the best suppression (Figure 1B). A ~96%–98% suppression of HIV is observed on days 6 and 8 post-transfection for p-LentiCRISPR-gRNA-2.

HIV suppression was observed 8 days following transfection, by which time the transfected plasmid would have been eliminated from the cultures, suggesting that cyclin T1 inactivation can lead to HIV silencing even after CRISPR expression has ceased. While P-TEFb is a heterodimer of CDK9 and cyclin T1, targeting cyclin T1 has distinct advantages in that CDK9 can partner with other cyclins, namely cyclin T2A, cyclin T2B, and cyclin K, and provide redundancy for cellular transcription by P-TEFb.^{17,31,32} However, cyclin T1 is critical for Tat-mediated recruitment of P-TEFb. Other reports have also shown that cyclin T1 silencing does not adversely affect cell viability.^{20,33} Our data agree with these observations in that cyclin T1 suppression did not affect the percentage of cell viability even after 8 days (Figure 1C). However, there was a noticeable difference in the number of viable cells in all pLentiCRISPR-gRNA transfections (Figure 1C).

To mitigate any deleterious effects of uncontrolled CRISPR expression on cellular homeostasis, we designed a self-limiting RNA Pol II-based, HIV-inducible CRISPR expression system for CyclinT1 inactivation only in HIV infected cells. We had previously reported that an HIV LTR-minimal *Drosophila* hsp70 fusion promoter drives HIV-inducible expression of small RNA molecules like small hairpin RNAs (shRNAs).³⁰ The shRNA expression system utilizes a minimal polyadenylation (mpolyA) signal sequence reported by Xia et al. to

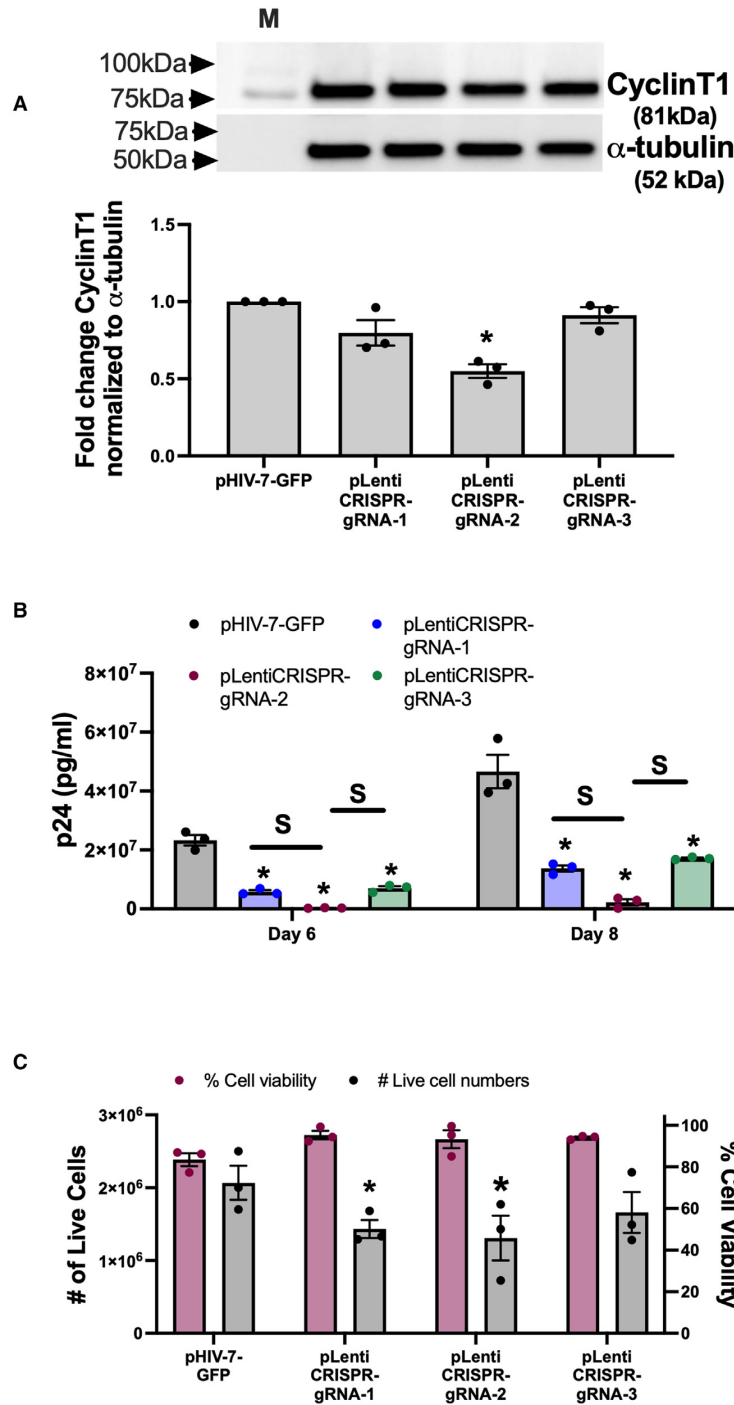


Figure 1. Screening effective gRNA target sites for cyclin T1 editing: HeLa cells were transfected with pLentiCRISPR-gRNA-1, pLentiCRISPR-gRNA-2, or pLentiCRISPR-gRNA-3 using lipofectamine 2000 as described in methods

Our previously reported lentiviral vector pHIV-7-GFP was transfected as control.^{23,30} 8 days post-transfection, total protein was isolated and analyzed for cyclin T1 protein levels using western blot analyses. pLentiCRISPR-gRNA-2 demonstrates maximal cyclin T1 suppression (A). HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with pLentiCRISPR-gRNA-1, pLentiCRISPR-gRNA-2, or pLentiCRISPR-gRNA-3. At designated time points, culture supernatants were collected and analyzed for HIV p24. All three gRNAs demonstrate HIV suppression, with pLentiCRISPR-gRNA-2 demonstrating maximal suppression at both time points (B). Cells were trypsinized, followed by trypsin neutralization buffer. Cells were washed to remove trypsin and resuspended in DMEM 10% FBS. The total number of live cells and percentage of viability were determined by trypan blue staining as described in [materials and methods](#). Cyclin T1 knockdown does not affect the percentage of cell viability. However, we observed a statistically significant decline in the number of live cells with all pLentiCRISPR-gRNAs, including our most efficient pLentiCRISPR-gRNA-2 (C). *n* = mean ± SEM from 3 independent experiments. *, significant from control; S, significant from each other (*p* < 0.05).

terminate transcription of the small RNA molecules.³⁴ We had further exploited the transcriptional readthrough of the weak mpolyA signal sequence for co-expressing an shRNA and GFP or the antiviral transdominant RevM10 protein, thereby effecting a co-expression of small RNA and a protein only in HIV-infected cells from a single transcriptional cassette.²³ We adapted this system for HIV-inducible expression of gRNA and Cas9 protein. We employed precise PCR-based cloning and ligation strategies to clone gRNA-2 immediately downstream of the minimal *Drosophila* hsp70 promoter such that transcription of gRNA begins from +1 of the minimal *Drosophila* hsp70 promoter. The fusion promoter-gRNA-mpolyA cassette was then inserted upstream of the Cas9 open reading frame (ORF) in the pLentiCRISPRV2, while deleting the U6 gRNA expression cassette and the EFS promoter, to generate a LTRhsp-CRISPR (LTRhsp-gRNA-mpolyA-Cas9pA) cassette (Figure 2A). The HIV LTR contains two nuclear factor κ B (NF- κ B) and three SP1 sites each within the LTR that may lead to Tat-independent and consequently leaky CRISPR expression. We tested NF- κ B (LTRhsp(Δ NF- κ B)-CRISPR) or SP1 site (LTR(Δ SP1)-CRISPR) deletion versions of our fusion promoter for HIV-inducible Cas9 expression. HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with our LTRhsp-CRISPR (or the Δ NF- κ B or Δ SP1 mutants). Uninfected HeLa-CD4 cells were transfected identically for comparison. LTRhsp-CRISPR demonstrates Cas9 expression only in HIV-infected HeLa cells and not in uninfected HeLa cells (Figure 2B). Deleting the NF- κ B sites completely abolishes Cas9 expression from the fusion promoter, suggesting that NF- κ B may be essential for transcription from the fusion promoter even in the presence of HIV Tat. We found detectable Cas9 expression in uninfected HeLa-CD4 cells transfected with LTR(Δ SP1)-CRISPR, suggesting that deleting SP1 sites promotes leaky expression from the fusion promoter (Figure 2B). Hence, we restricted future experiments to the LTRhsp-CRISPR construct.

Next, we tried to determine if HIV-inducible gRNA and Cas9 expression from LTRhsp-CRISPR translates to conditional cyclin T1 inactivation only in HIV-infected cells. HIV-infected HeLa-CD4 cells (HeLa-CD4 cells as uninfected controls) were transfected with our LTRhsp-CRISPR. Separately, pLentiCRISPR-gRNA-2 was transfected for comparison. 8 days post-transfection, experiments were terminated, and total protein was analyzed for cyclin T1 suppression by western blot analysis. pLentiCRISPR-gRNA-2 suppressed cyclin T1 protein levels in both infected and uninfected HeLa-CD4 cells, while LTRhsp-CRISPR demonstrates cyclin T1 suppression only in HIV-infected HeLa-CD4 cells. No suppression of cyclin T1 is observed by LTRhsp-CRISPR in uninfected HeLa-CD4 cells (Figures 2C and 2D). To determine the extent of LTRhsp-CRISPR efficacy for HIV suppression, we transiently transfected HIV-infected HeLa-CD4 cells with LTRhsp-CRISPR (pHIV-7-GFP as control). LTRhsp-CRISPR showed ~75% suppression of HIV p24 (Figure 2E). However, the suppression efficacy was lower than that observed with the constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2 (Figure 1B).

One of the limitations of our expression system is a paradox where the gRNA must be retained in the nucleus while the Cas9 mRNA must be

exported to the cytoplasm for translation. mRNA processing of RNA Pol II-based transcripts results in addition of the 5' cap to all mRNAs, which facilitates their nuclear export and translation. Hence for gRNAs, which require nuclear retention, the 5'-methyl guanosine cap must be removed for nuclear retention. Conversely, Cas9-expressing mRNA needs to retain the cap for nuclear export. However, LTRhsp-CRISPR would generate 5'-cap transcripts for both gRNA and Cas9, leading to much of the gRNA being exported from the nucleus to the cytoplasm, thereby decreasing CRISPR efficacy. To overcome this limitation and to improve HIV suppression, we inserted a *cis*-cleaving ribozyme, previously reported by us,^{35,36} immediately upstream of the gRNA (Figure 3A). The *cis*-cleaving ribozyme would remove the 5' cap from a proportion of transcripts, thereby increasing nuclear retention of the gRNA. It is necessary to ensure that a proportion of transcripts, especially the Cas9 mRNA, still retain the 5' cap for cytoplasmic export and Cas9 expression. We used modified hammerhead ribozymes called minizymes to attenuate the ribozyme efficacy (LTRhsp-MzCRISPR). Minizymes are variants of hammerhead ribozymes in which stem II has been replaced by a shorter linker sequence.³⁷ Like hammerhead ribozymes, they target the NUX site (X = A, U, or C). They demonstrate lower RNA cleavage efficiency compared with full-length hammerhead ribozymes. We also designed LTRhsp-CRISPR with a weaker version of the minizyme (LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR) that uses a non-canonical cleavage site (X = G) to determine the optimal balance between cap retention and cap removal for maximal CRISPR efficiency. The lower activity of minizymes would mediate cap removal and nuclear retention of a proportion of the transcripts including the gRNA, while the uncleaved transcripts with an intact 5' cap would be exported to the cytoplasm for Cas9 translation. Figure 3B shows a schematic of the *cis*-cleaving ribozymes and cleavage upstream of the gRNA to remove the 5' cap. Next, we tested LTRhsp-MzCRISPR and LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR for their ability to suppress HIV in HIV-infected HeLa-CD4 cells. LTRhsp-CRISPR was transfected for comparison. Culture supernatants were collected every 72 h and analyzed for p24 analysis as an index of HIV infection. LTRhsp-MzCRISPR and LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR show some improvement in HIV suppression compared with the original LTRhsp-CRISPR (Figure 3C). After 12 days, experiments were terminated, and cell viability and live cell numbers were determined. We did not observe any differences in cell viability or number of live cells with our HIV-inducible CRISPR constructs (Figure 3D). This is in line with other reports also demonstrating that cyclin T1 silencing does not adversely affect cell viability.^{20,33} This demonstrates that embedding ribozymes in our RNA Pol II CRISPR cassette improves its efficacy.

To investigate the potential of this system in a more physiologically relevant post-infection model CEM T cell lines were infected with the X4-tropic HIV IIIB strain. The infection was allowed to proceed for 12 days. HIV p24 levels were monitored to follow the progress of infection. Following 12 days of infection, infected cultures were divided into different experimental sets and then electroporated with either the original LTRhsp-CRISPR or the minizyme-embedded construct

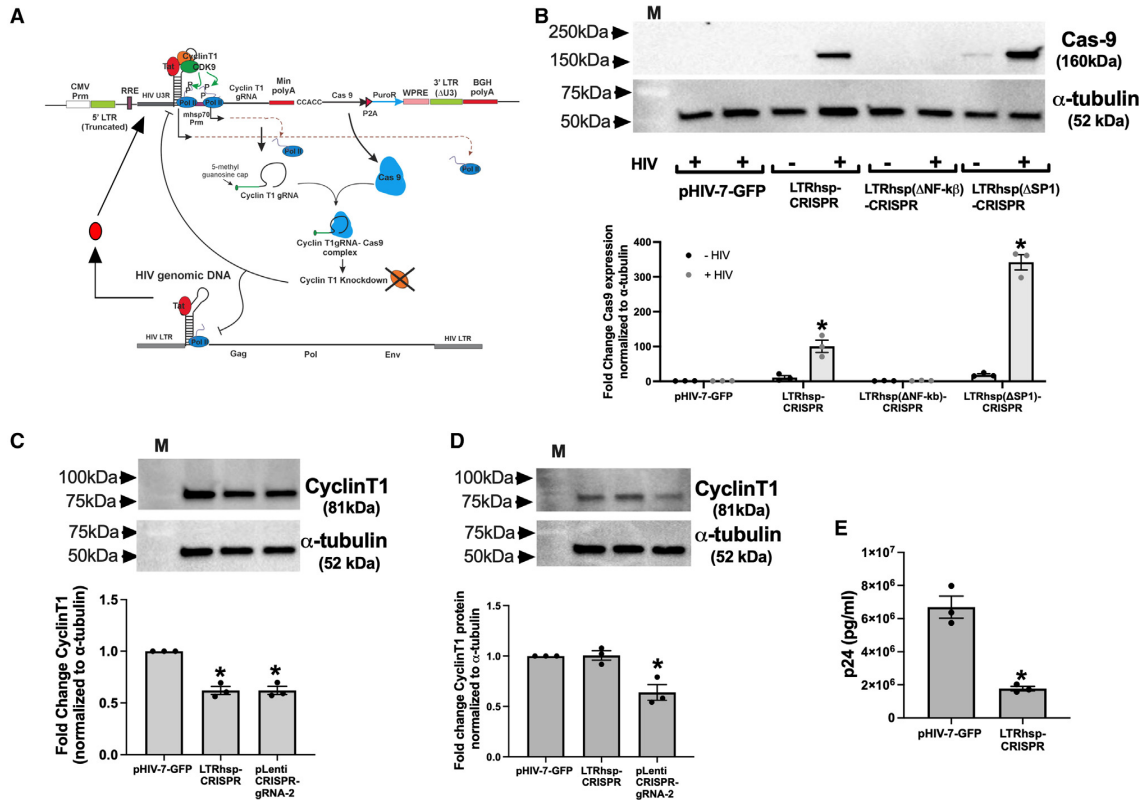


Figure 2. HIV LTR-hsp70 fusion promoter demonstrates HIV-inducible co-expression of cyclin T1-targeting gRNA and Cas9

(A) Schematic of LTRhsp-CRISPR cassette (not drawn to scale): in presence of HIV Tat, P-TEFb kinase is recruited to the HIV LTR-minimal *Drosophila* hsp70 fusion promoter, inducing transcription from both promoters. Most of the transcription from the minimal hsp70 promoter will terminate at the minimal polyA to express the cyclin T1-targeting gRNA-2, while transcriptional readthrough will encode the Cas9. The strong eukaryotic translation initiation signal CCACC ensures that the first ATG after this sequence is used for translation initiation. Given the critical importance of cyclin T1 for P-TEFb recruitment by HIV Tat, inactivation of cyclin T1 will irreversibly block all transcription from HIV locking it in a transcriptionally inactive state. Since the fusion promoter also requires Tat-cyclin T1 interaction for co-expression of cyclin T1 gRNA and Cas9, once cyclin T1 is knocked down, transcription from both the HIV proviral DNA as well as the fusion promoter will be completely inhibited, possibly affecting a functional cure and limiting any further expression from the fusion promoter. (B) Uninfected HeLa-CD4 cells or HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with LTRhsp-CRISPR or the NF- κ B or SP1 deletion mutants, (LTRhsp(Δ NF- κ B)-CRISPR or LTRhsp(Δ SP1)-CRISPR respectively). 72 h post-transfection, total protein was isolated and analyzed for Cas9 expression by western blot analyses. HIV LTR-hsp70 fusion promoter demonstrates Cas9 expression only in HIV-infected HeLa-CD4 cells and not in uninfected HeLa-CD4 cells, demonstrating HIV-inducible expression. No expression of Cas9 is observed in LTRhsp(Δ NF- κ B)-CRISPR-transfected uninfected or HIV-infected HeLa-CD4 cells, suggesting that NF- κ B sites are important for transcription of Cas9 from the fusion promoter even in the presence of HIV Tat. Some expression is observed in uninfected HeLa-CD4 cells transfected with LTRhsp(Δ SP1)-CRISPR, suggesting that deleting the SP1 sites promotes leaky transcription from the fusion promoter. (C and D) Uninfected or HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with LTRhsp-CRISPR or the constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2. 6 days post-transfection, total protein was isolated and analyzed for cyclin T1 suppression by western blot analyses. Both LTRhsp-CRISPR and pLentiCRISPR-gRNA-2 demonstrate cyclin T1 suppression in HIV-infected HeLa-CD4 cells (C). However, only the constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2 demonstrates cyclin T1 suppression in uninfected HeLa-CD4 cells. LTRhsp-CRISPR does not suppress cyclin T1 in uninfected HeLa-CD4 cells, demonstrating HIV-inducible cyclin T1 knockdown from our fusion promoter (D). (E) HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with LTRhsp-CRISPR as described in the [materials and methods](#). Cells were washed four times to remove any residual HIV p24 and resuspended in fresh DMEM with 10% FBS. On day 6 post-infection, culture supernatants were collected and analyzed for HIV p24 by ELISA. LTRhsp-CRISPR suppresses HIV p24 in our stringent model of HIV infection. n = mean \pm SEM from 3 independent experiments. *, significant from control ($p < 0.05$).

LTRhsp-MzCRISPR or LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR. Lentiviral vector pHIV-7-GFP was electroporated as control and also allowed us to follow electroporation efficiency. The infection was allowed to proceed for a further 12 days, and culture supernatants were collected every

3 days for p24 analyses. We observed HIV silencing by all three CRISPR constructs that persist up to 12 days post-electroporation (Figure 4A). However, maximal suppression was observed on day 6, followed by a progressive increase in viral output on days 9 and 12 with

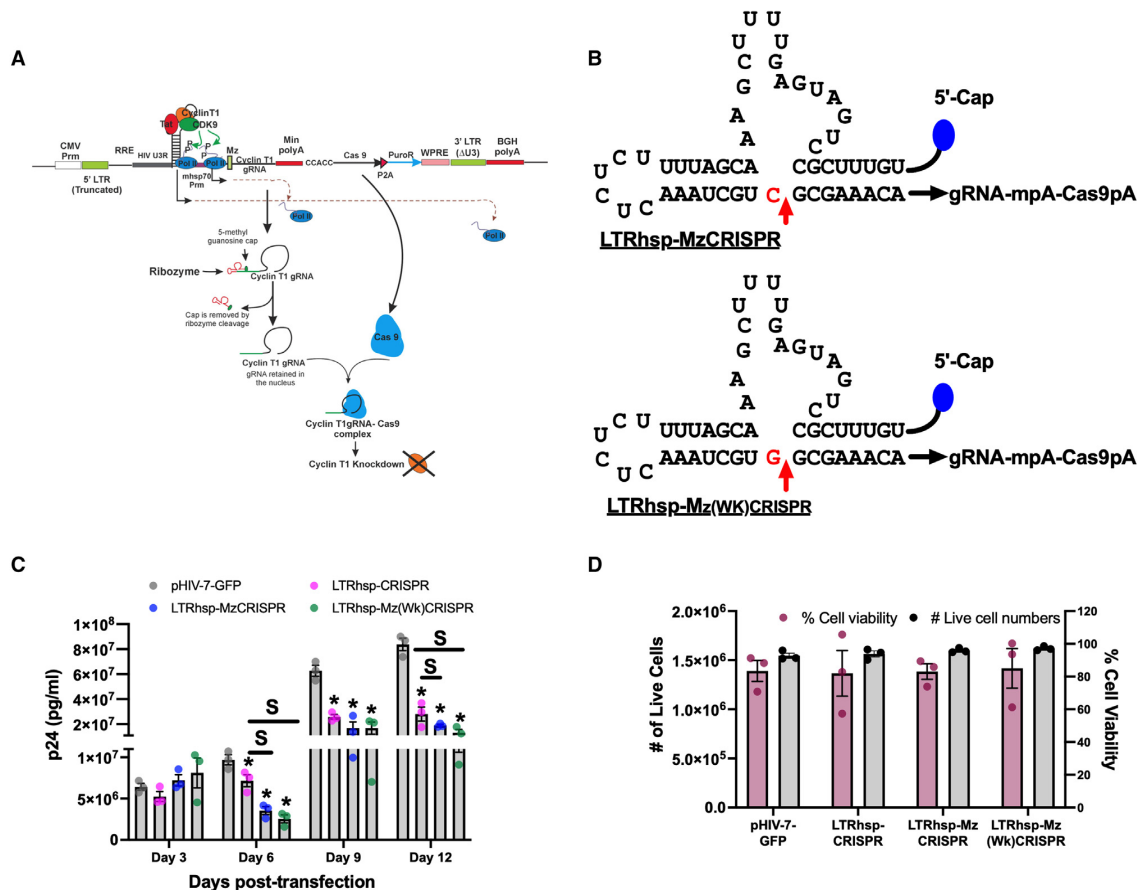
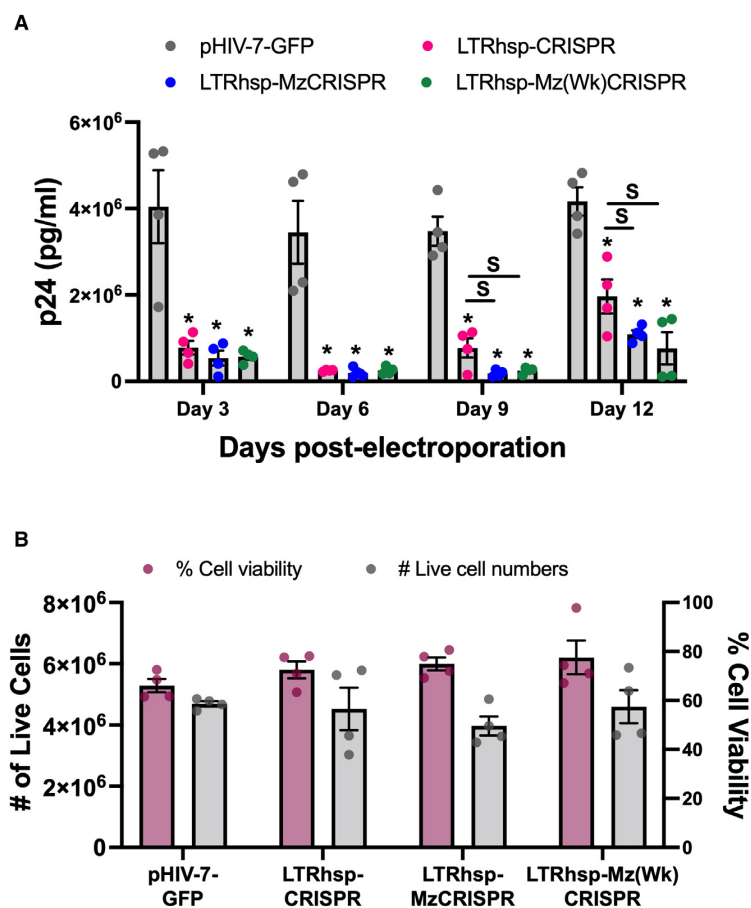


Figure 3. *Cis*-cleaving minzymes improve RNA Pol II CRISPR-based HIV suppression

(A) Schematic of LTRhsp-CRISPR minzyme-embedded variants. In the original clone (Figure 2A), co-expression of cyclin T1 gRNA and Cas9 results in cyclin T1 gRNA with a 5-methyl guanosine cap, which can export the gRNA from the nucleus to the cytoplasm. This can lead to suboptimal CRISPR-mediated knockdown of cyclin T1. Embedding a *cis*-acting minzyme just downstream of the transcriptional start such that it would cleave the 5' cap will result in cap removal and retention of the gRNA in the nucleus. The weak ribozyme will ensure that part of the RNA retains the cap while some of the RNA is exported to the cytoplasm to express the Cas9 protein. (B) A schematic representation of the *cis*-cleaving minzyme-embedded variants and cleavage site upstream of the gRNA to remove the 5' cap and improve RNA Pol II CRISPR efficacy. Hammerhead ribozymes can cleave any RNA as long as the ribozyme arms can hybridize with the target RNA, and the target contains an NUX triplet where N = A, G, C, or U and X = A, U, or C for optimal cleavage. LTRhsp-MzCRISPR recognizes a canonical GUC cleavage site, while LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR recognizes a weaker non-canonical GUG cleavage site. (C and D) HIV-infected HeLa-CD4 cells were transfected with LTRhsp-MzCRISPR or LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR. Transfection with the lentiviral backbone pHIV-7-GFP was used as control and to monitor transfection. Transfection with LTRhsp-CRISPR was used for comparison. To mimic a more physiological setting, only the transfection medium was replaced with fresh DMEM with 10% FBS. At designated time points, culture supernatants were collected and analyzed for HIV p24. Both ribozyme *cis*-cleaving minzyme-embedded variants demonstrate slightly improved HIV suppression compared with LTRhsp-CRISPR (C). Following 12 days of transfection, experiments were terminated, and cell viability was determined. LTRhsp-CRISPR or the minzyme-embedded LTRhsp-MzCRISPR or LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR did not affect cell viability and demonstrated similar live cell counts. $n = \text{mean} \pm \text{SEM}$ from 3 independent experiments. *, significant from control; S, significant from each other ($p < 0.05$).

only 53% HIV silencing observed on day 12. Both minzyme-embedded constructs demonstrated slightly better efficacy of HIV silencing compared with the original LTRhsp-CRISPR. Differences in HIV suppression between the minzyme constructs were not statistically significant. Cell viability and cell numbers were determined on day 12

using trypan blue staining. Figure 4B shows that HIV-inducible CRISPR constructs did not demonstrate any decrease in cell viability or the number of live cells. One of the limitations of any DNA delivery in *in vitro* experiments is that the best reagents do not allow 100% transfection of cells. This would allow *de novo* infection of



untransfected/unelectroporated cells in a post-infection model and a progressive rebound in viral titers over time. To circumvent this problem, we attempted electroporation in combination with an initial 3 day treatment with the anti-HIV retroviral tenofovir. Tenofovir inhibits reverse transcription (and hence *de novo* infection) but will not affect HIV output from cells that are already infected. Following electroporation in post-infection CEM cells, Tenofovir was added to the culture media. On day 3, culture medium was replaced with fresh medium without tenofovir, and CEM cells were propagated in the absence of tenofovir for the remainder of the experiment. Figure 5A shows that a single electroporation of our HIV-inducible CRISPR systems when used in combination with an initial tenofovir treatment demonstrates 85%–95% suppression of HIV up to day 21 compared with pHIV-7-GFP alone. pHIV-7-GFP along with tenofovir treated shows a viral rebound by day 6. Using this combinatorial approach, we did not detect any difference in HIV suppression between our constructs with and without ribozyme inserts. Figure 5B shows that CEM cells electroporated with HIV-inducible CRISPR constructs showed comparable cell viability

Figure 4. HIV-inducible CRISPR systems demonstrate sustained HIV suppression in T cell lines

CEM T cells were infected with HIV IIIIB strain as described in the materials and methods. A million cells each from this infection were used for electroporation with LTRhsp-MzCRISPR or LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR using the Neon electroporation kit as described in the materials and methods. Electroporation with the lentiviral vector pHIV-7-GFP was used as control and to monitor transfection efficiency. All three HIV-inducible CRISPR systems demonstrated HIV suppression that persisted up to 12 days post-electroporation. The original LTRhsp-CRISPR demonstrated maximum suppression by day 6, followed by a progressive increase in viral output on days 9 and 12 with only a 53% HIV suppression observed on day 12. Both minizyme-embedded constructs demonstrate slightly better efficacy compared with the original LTRhsp-CRISPR (A). On day 12, experiments were terminated, and cell viability was determined by trypan blue staining as described in the materials and methods. HIV-inducible CRISPR systems did not affect the percentage of cell viability or the number of live cells (B). $n = \text{mean} \pm \text{SEM}$ from 4 independent experiments. *, significant from control; S, significant from each other ($p < 0.05$).

and number of live cells to tenofovir alone- and lentiviral vector alone-transduced cells.

While electroporation or naked DNA-based delivery would result in elimination of the CRISPR plasmid from the cells in a few days, in a physiological setting, our CRISPR constructs may need to be delivered using viral vectors. All CRISPR constructs including pHIV-7-GFP and the constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2 were packaged as lentiviral vectors using the approach described by us.^{23,30} Post-infection model of CEM cells was generated as described above. Cells were transduced with pHIV-7-GFP or the CRISPR constructs at 100 MOI. After 24 h, medium was changed to fresh medium containing tenofovir. 3 days post-transduction, the medium was replaced with fresh medium without tenofovir, and CEM cells were propagated in the absence of tenofovir for the remainder of the experiment. Culture supernatants were collected at designated time points. As seen in Figure 6A, lentiviral-based delivery enhances the HIV silencing by our HIV-inducible CRISPR system compared with electroporation- or transfection-based delivery. LTRhsp-CRISPR and LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR demonstrate comparable silencing (~90% HIV suppression) up to day 24. LTRhsp-MzCRISPR-transduced cells demonstrated the best suppression, with HIV p24 becoming undetectable by day 12 and remaining undetectable until day 21. The constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2 demonstrated undetectable HIV on days 21 and 24. However, this was most likely due to extensive cell death in this group (Figure 6B). LTRhsp-CRISPR and LTRhsp-MzCRISPR improved cell viability

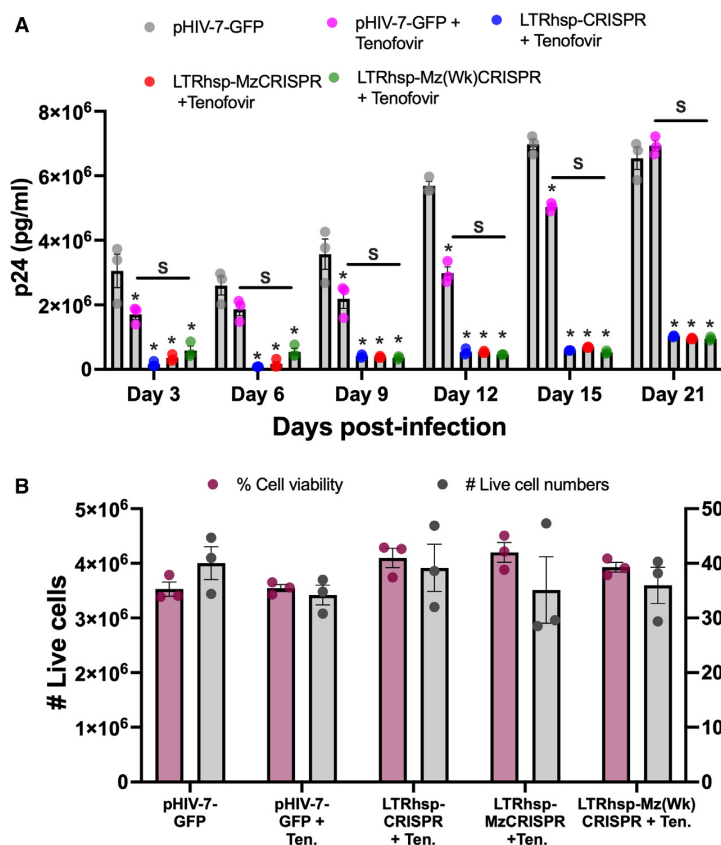


Figure 5. HIV-inducible CRISPR systems demonstrate prolonged and sustained HIV suppression in T cell lines when used in combination with initial antiretroviral treatment

CEM T cells were infected with HIV IIIB strain as described in the [materials and methods](#). Cells were electroporated with LTRhsp-CRISPR, LTRhsp-MzCRISPR, or LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR using the Neon electroporation kit as described in the [materials and methods](#). After 24 h, medium was changed to fresh medium containing tenofovir (5 μ M). Electroporation with the lentiviral vector pHIV-7-GFP was used as control and to monitor transfection efficiency. One set of infected cells was electroporated with pHIV-7-GFP and treated with tenofovir alone to compare HIV suppression by tenofovir. Medium was changed following 3 days, fresh medium without tenofovir was added, and the experiment was allowed to proceed for 21 days. At designated time points, HIV p24 was quantitated by ELISA as an index of viral replication. All three HIV-inducible CRISPR systems demonstrated HIV suppression (85%–90%) that persisted up to 21 days following a single electroporation of the inducible CRISPR plasmids. No differences were observed in suppression by minizyme constructs and the original LTRhsp-CRISPR (A). On day 21, experiments were terminated, and cell viability was determined by trypan blue staining as described in the [materials and methods](#). HIV-inducible CRISPR systems did not affect the percentage of cell viability or the number of live cells (B). $n = \text{mean} \pm \text{SEM}$ from 3 independent experiments. *, significant from control; S, significant from each other ($p < 0.05$).

over controls. However, they did show a small, but statistically significant, decrease in the number of live cells.

DISCUSSION

In this article, we provide proof of concept demonstrating an RNA Pol II mono-promoter-single transcription unit-based conditional CRISPR expression system using our previously reported HIV LTR-minimal Drosophila hsp70 fusion promoter.²³ Using this expression system, we demonstrate conditional CRISPR expression that inhibits cyclin T1 and mediates HIV silencing. Given the propensity of HIV to mutate and escape gene therapy approaches directed against the viral genome, knocking down cellular co-factors remains an attractive approach if the knockdown is restricted only to HIV-infected cells. P-TEFb kinase-mediated phosphorylation of RNA Pol II serves as a master switch to turn on HIV replication.^{20–22} P-TEFb is a heterodimer of CDK9 and one of the regulatory cyclins. Cyclin T1 is one of four regulatory cyclins (cyclin T1, -T2a, -T2b, or -K) that bind to and activate CDK9.^{17,31,32} However, HIV-mediated recruitment and activation of CDK9 specifically requires cyclin T1, and knocking down either component has been shown to inhibit HIV transcription.^{20,21} While CDK9 inhibitor Flavopiridol has already shown

clinical efficacy in non-small cell lung cancer without any adverse effects,³⁸ we chose to target the cyclin T1 partner instead of CDK9 as CDK9 can partner with other cyclins, thereby providing redundancy for cellular transcription by P-TEFb.^{17,31,32} This would mitigate any toxicities associated with cyclin T1 inactivation. Cyclin T1 is critical for HIV transcription by both Tat-dependent and Tat-independent mechanisms.^{16–19,24} This criticality for HIV transcription and redundancy for cellular transcription makes cyclin T1 an attractive target to silence HIV proviral DNA.

We first selected the best cyclin T1-targeting gRNA in chronically HIV-infected HeLa-CD4 cells. These cells can be considered ideal for pilot testing of therapeutics as most, if not all, cells harbor the provirus and express microgram quantities of HIV p24 output. In line with other reports,^{20,33} we did not observe any change in the percentage of cell viability, possibly due to redundancy of CDK9 for other cyclin partners.^{17,31,32} However, we did observe a statistically significant decrease in the number of live cells with constitutive expression of our most effective CRISPR cassette. Surprisingly while the western blot provided ~50% knockdown, this translated to over 90% suppression of HIV. This confounding observation can be partly explained due to normalization. We observed that expression of normalizing control (α -tubulin) also dovetails to some extent with that of cyclin T1.

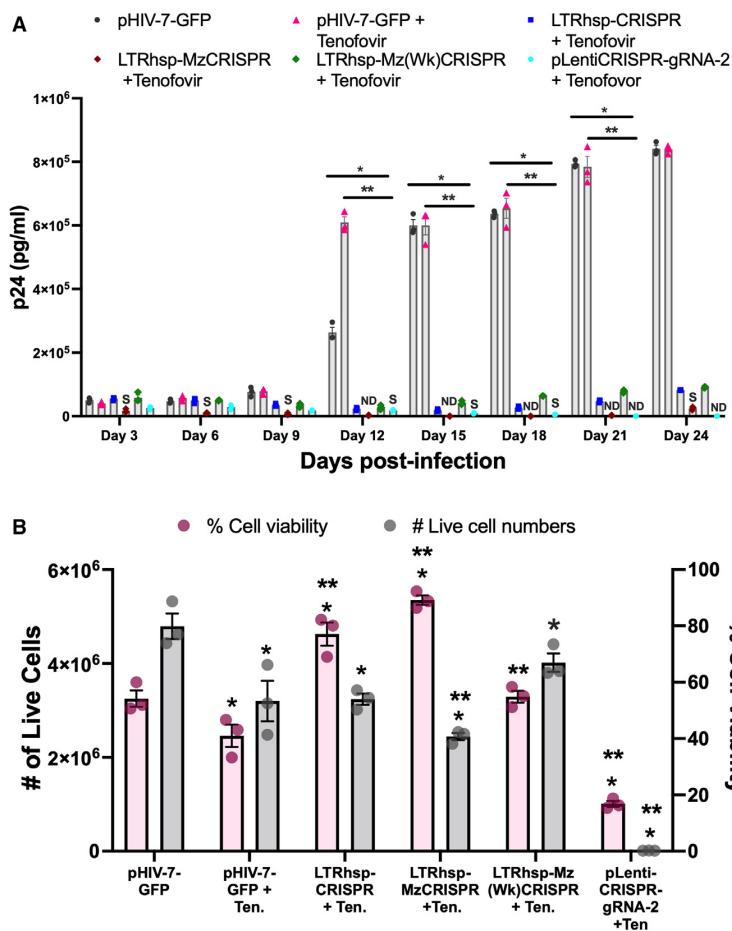


Figure 6. HIV-inducible CRISPR systems were packaged, as lentiviral vectors demonstrate prolonged and sustained HIV suppression in T cell lines when used in combination with initial antiretroviral treatment

CEM T cells were infected with HIV IIIIB strain as described in methods. All CRISPR constructs including pHIV-7-GFP and the constitutive pLentiCRISPR-gRNA-2 were packaged as lentiviral vectors. (A) Cells were transduced with HIV-7-GFP or the CRISPR constructs at 100 MOI. After 24 h, medium was changed to fresh medium containing tenofovir (5 μ M). 3 days post-transduction, the medium was replaced with fresh medium without tenofovir, and CEM cells were propagated in the absence of tenofovir for the remainder of the experiment. Culture supernatants were collected at the designated time points. Lentiviral vector-based delivery significantly enhances the suppressive effects of our HIV-inducible CRISPR system compared with electroporation- or transfection-based delivery. LTRhsp-CRISPR and LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR demonstrated comparable suppression (~90% HIV suppression) up to day 24. LTRhsp-MzCRISPR-transduced cells demonstrated the best suppression, with viral titers becoming undetectable by day 12 and remaining undetectable until day 21. The constitutively expressed LentiCRISPR-gRNA-2 demonstrated undetectable HIV on days 21 and 24. However, this was most likely due to extensive cell death in this group (B). LTRhsp-CRISPR and LTRhsp-MzCRISPR improved cell viability over controls. However, they demonstrated some decrease in the number of live cells. n = mean \pm SEM from 3 independent experiments. *, significant from control; **, significant from pHIV-7-GFP + tenofovir; S, significant from all other CRISPR constructs; ND, not detectable ($p < 0.05$).

Upon normalisation, this manifests as a decrease in observed suppression. We also observed this decrease with another normalizing control (β -actin; data not shown). It is also possible that cyclin T1 suppression leads to decreased infectivity of the released virus by altering cellular factors that facilitate the next round of viral infection. Indeed, a genome-wide screen for positive and restrictive factors regulating HIV-1 replication concludes that potentially 2,410 protein-coding genes (9.5% all human genes) may be involved in the replication of HIV.³⁹ The experiments required to identify this factor(s) are beyond the scope of this article.

In our earlier report, we had demonstrated HIV-inducible co-expression of a small RNA (shRNA) and a protein (RevM10).²³ We adapted our fusion promoter small RNA-protein co-expression system²³ for co-expression of gRNA and Cas9. We show that Cas9 expression is restricted to HIV-infected HeLa-CD4 cells. In our previous reports with the fusion promoter co-expressing anti-HIV shRNA and RevM10, we had observed a very faint band of RevM10 mRNA in

the absence of HIV in our northern blot analyses.²³ It is possible that overexpression of our blots may show a similar faint band in uninfected HeLa-CD4 cells. However, this does not translate to cyclin T1 inactivation in these cells, suggesting that low-level leakiness, if any, does not mediate functional effects. A characteristic feature of RNA Pol II transcription is the addition of a 5' cap to all transcripts that is essential for mRNA nuclear export. This can diminish CRISPR efficacy by limiting gRNA availability within the nucleus. To circumvent this limitation, we incorporated weak (and weaker) *cis*-cleaving ribozymes to excise the 5' cap from the gRNA from a proportion of transcripts to increase nuclear retention of gRNA.

All CRISPR constructs silenced HIV in transient transfection or electroporation assays. The minizyme-incorporated CRISPR constructs demonstrated a small but statistically significant improvement in the extent of HIV silencing, following a single transfection in our post-infection models with HIV-infected HeLa-CD4 cells and CEM T-cells. However, this was offset by a viral rebound by day 9 in

HIV-infected HeLa-CD4 cells and by day 12 in CEM T cells. We posited that this could be due to virus release and *de novo* infection from untransfected or unelectroporated cells. To inhibit *de novo* infection during treatment and to prolong HIV silencing, we included an initial 3 day treatment with the reverse transcriptase inhibitor tenofovir in combination with our CRISPR constructs. We observed a sustained 85%–90% suppression in p24 output for 21 days following a single electroporation with our CRISPR cassettes with no effects on cell viability. Since plasmid DNA is eliminated by cells within 6 days, a sustained suppression up to 21 days suggests that cyclin T1 inactivation prevents further HIV transcription even after the CRISPR constructs are eliminated from cells. When the CRISPR constructs were delivered by lentiviral vector-based transduction, the differences in suppression by LTRhsp-MZCRISPR versus other HIV-inducible CRISPR constructs became more evident. We believe this is due to differences in copy numbers of CRISPR constructs delivered by transfection/electroporation versus lentiviral transduction. Transfection/electroporation has been shown to deliver anywhere between 75 and 50,000 copies per cell.⁴⁰ On the other hand, transduction is known to deliver anywhere between 2 and 10 copies. Hence, with transduction, the available gRNA within the nucleus becomes a limiting step for CRISPR efficacy. LTRhsp-MzCRISPR demonstrated the best suppression with undetectable HIV p24 by day 12 up to day 21. LTRhsp-MzCRISPR and LTRhsp-CRISPR also improved the percentage of cell viability over controls (vector alone/vector alone + tenofovir). However, we also observed a small but statistically significant decrease in the number of live cells with LTRhsp-MzCRISPR when compared with vector alone-/vector alone + tenofovir-treated cells. This paradox can be explained by differences in the transcriptional kinetics of CDK9/cyclin T1 and CDK9 with other cyclin partners. CDK9/cyclin T1 complexes have slightly higher activity compared with CDK9/cyclin T2a and CDK9/cyclin T2b complexes.³¹ We anticipate this difference to be nominal and do not believe this will affect cellular homeostasis. On the contrary, the constitutively expressed LentiCRISPR-gRNA-2-transduced CEM cells demonstrated extensive cell death. It is possible that this effect is due to unregulated expression of Cas9 rather than a side effect of cyclin T1 inactivation. This is because transient delivery approaches using electroporation, where the plasmid DNA is expected to be eliminated from cells by day 5, did not show similar cellular toxicity in cells electroporated with the constitutively expressed pLentiCRISPR-gRNA-2. At least one report has shown that constitutive Cas9 expression, even when delivered by lentiviral vector, is toxic to hematopoietic stem cells.⁴¹ This shows that unregulated long-term CRISPR expression can lead to toxicity and cell death.

We believe that further optimization for *in vivo* delivery with respect to a combinatorial approach using appropriate viral vectors, concurrent antiretroviral therapy, and/or latency reactivating agents can silence HIV in reservoirs, possibly effecting a functional cure. At the most, we anticipate that silencing HIV transcription will decrease expression of viral proteins like Tat, nef, and HIV gp120 from these reservoirs, thereby mitigating the development of non-AIDS comorbidities. To our knowledge, there is only one other report of an HIV-inducible CRISPR system in which Kaminski et al. expressed Cas9

from a truncated HIV LTR.⁴² In this system, only Cas9 expression is HIV inducible, while the multiplexed gRNAs targeting HIV LTR are expressed from a constitutive RNA Pol III promoter. We do not know the long-term effects of constitutive gRNA expression in the cells given that these RNAs can also serve in an antisense role or for transcriptional gene silencing due to partial hybridization with other cellular RNAs or promoter regions of genes. Inducible gRNAs could provide a level of safety that may be required for long-term treatment of HIV-1. Our RNA Pol II expression system can also be adapted to target HIV with multiple gRNAs by inserting *cis*-acting ribozymes between two contiguous gRNAs targeting HIV proviral DNA itself at two distinct sites to prevent viral escape.

MATERIALS AND METHODS

Cyclin T1 CRISPR gRNAs

Three gRNA sequences targeting cyclin T1 were obtained from Genscript (<https://www.genscript.com/gRNA-detail/904/CCNT1-CRISPR-guide-RNA.html>). The CCNT1 (Cyclin T-1) CRISPR gRNA sequences from Genscript were designed to efficiently target the CCNT1 gene with minimal risk of off-target Cas9 binding elsewhere in the genome using the approach described by Sanjana et al.⁴³ CCNT1 gRNA sequences, 5'-AATAGCCCATCCCGTCGTTT-3' (pLentiCRISPR-gRNA-1), 5'-TCCACGCCAAAACGACGGGA-3' (pLentiCRISPR-gRNA-2), and 5'-CTACCTCACTTCTAGTATC-3' (pLentiCRISPR-gRNA-3), were obtained pre-cloned in the pLentiCRISPRv2 plasmid (Genscript Biotechnology), in which the gRNAs were expressed from the U6 promoter and Cas9 was expressed from the EFS promoter, with the lentiviral LTR polyA signal sequence serving as transcriptional termination for Cas9. All work was performed with required Institutional Biosafety approvals from the Florida International University IBC committee.

HIV-inducible RNA Pol II expression constructs

Construction and characteristics of the LTR-minimal hsp70 promoter have been previously reported.^{23,30} Briefly, the ecdysone and glucocorticoid response elements upstream of the minimal *Drosophila* hsp70 promoter component were removed from the pIND vector (Invitrogen) and replaced with the HIV-1 LTR up to and including the transactivation response element. The HIV LTR-hsp70 fusion promoter was PCR amplified using an HIV LTR 5-primer (HU-1: 5'-CCGGTACCTGGAAGGGCTAATTTGGTCC-3') and hsp70 promoter 3' primer (HU-2: 5'-GAGGCGCTTCGTCTACGGA-3') from the LTRhsp-shRNA plasmid reported by us earlier.³⁰ The gRNA-2 (comprising the guide and scaffold region) sequence was PCR amplified using flanking primers (HU-3: 5'-GAAACACCGTCCACGCCAAACG-3' and HU-4: 5'-CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCA-3') based on a sequence provided by Genscript. The PCR products were kinased and blunt-end ligated to each other, and the ligated product was PCR amplified using HU-1 and HU-4 to obtain the LTRhsp-gRNA fragment. The mpolyA signal sequence was likewise PCR amplified from the LTRhsp-shRNA plasmid using primers flanking mpolyA, HU-5: (5'-CTAGAAGTAGTAATAAAGG-3'), and HU-6 with an XbaI site: (5'-TCTAGATCTAGACGCGGCCGCACAC-3'). The PCR product was kinased and ligated to the LTRhsp-gRNA fragment, and the ligated product was reamplified using HU-1 and HU-6. The

resulting PCR product with KpnI and XbaI terminal sites was digested with KpnI and XbaI and ligated in a similarly digested pLentiCRISPRV2-gRNA-2. This substitutes the U6 gRNA expression cassette and the EFS promoter upstream of Cas9 with the LTRhsp-gRNA-mpolyA to obtain LTRhsp-CRISPR. A strong eukaryotic translation initiation site CCACC serves as a Kozak sequence immediately upstream of Cas9 in the vector and ensures appropriate Cas9 translation initiation. LTRhsp(Δ NF- κ B)-CRISPR and SP1 sites LTRhsp(Δ SP1)-CRISPR were generated by PCR-based deletion of the NF- κ B or SP1 sites in the HIV LTR using LTRhsp-CRISPR as template. Ribozyme insertions were done by sequential PCRs and ligations mentioned below.

PCR for MzgRNA-mpolyA

Step 1: PCR with 5' primer HU-23: (5'-TTCGAAACGATTTTCTCTCAAATCGTCGCGAAACACCGTCCACGCCAAAACG-3') and HU-6 creates a fragment with part of the ribozyme with gRNA and mpolyA.

Step 2: PCR with 5' primer HU-24 having an EcoRI site (5'-CCGAATTCTGTTTCGCCTGATGAGTTTTCGAAACGATTTCTCTCAAATCG-3') and HU-6 generates MzgRNA-mpolyA ribozyme with the minimal polyA with a 5'-EcoRI site.

PCR for LTRhsp70 fusion promoter with a 3'-EcoRI site

LTRhsp fusion promoter is amplified using HU-1 above and HU-7 (HU-2 with 3'-EcoRI site).

Both PCR products are digested with EcoRI and ligated. Following ligation, the entire LTRhsp-MzCRISPR is amplified using primers HU-1 and HU-6.

The LTRhsp-MzCRISPR is then digested with KpnI and XbaI and then ligated in similarly digested LTRhsp-CRISPR. This substitutes LTRhsp-gRNA-mpolyA with LTRhsp-MzgRNA-mpolyA in pLentiCRISPR.

For LTRhsp-Mz(Wk)CRISPR

In pLentiCRISPR, identical steps are used except that HU-23 primer is substituted with HU-21 primer containing the weak GUG site (5'-TTCGAAACGATTTCTCTCAAATCGTGGCGAAACACCGTCCACGCCAAAACG-3'). HU-24 is a common primer that amplifies both the partial forms of the weak and the strong ribozyme to generate the full forms. Note that the weak and strong ribozymes differ by only one nucleotide. All PCR amplifications were performed using the high-fidelity Vent polymerase (NEB #M0254S).

Cell culture experiments

HeLa-CD4 and HIV-infected HeLa-CD4 cells were obtained from NIH AIDS Reagent Program (cat #153 and cat #1301, respectively) and maintained in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS). The human T cell line CEM was maintained in RPMI medium 1640 (GibcoBRL) supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10% (vol/vol) FBS. For all plasmid transfections in HeLa cells (infected/uninfected), cells were

grown to 60% confluence in a 6-well plate, and 1 μ g plasmid DNA was complexed with lipofectamine 2000 in OPTIMEM according to manufacturers' protocol. Plasmid transfections in CEM cells were done by electroporation using the Neon electroporation system and kit (Thermo Fisher Scientific, cat #MPK1025) using a protocol standardized for CEM cells by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). At designated time points, culture supernatants were collected for HIV p24 analysis as an index of HIV infection. The lentiviral backbone plasmid pHIV-7-GFP reported by us^{23,30} was transfected as control for all transfection experiments.

HIV-1 antiviral assay

Culture supernatants were collected on designated days, and HIV p24 viral antigen was measured from cultured supernatants using the p24 ELISA kit (ZeptoMetrix, cat #0801200) according to the manufacturer's protocol.

Cell viability assay

Trypan blue staining was used to determine viability and live cell counts for HeLa cells (infected/uninfected) as well as CEM T cells. For HeLa cells, the cells were trypsinized with TE and TNS, cells were resuspended in growth medium, and 10 μ L suspension was mixed with an equal volume of trypan blue and loaded onto counting slides (Bio-Rad, cat #1450011). Cells were counted within 10 s of trypan blue staining by the TC20 Automated cell counter (Bio-Rad). For CEM T cells, 10 μ L culture suspension was mixed with an equal volume of trypan blue and loaded onto counting slides, and cells counts were determined using the TC20 Automated cell counter within 10 s of trypan blue staining.

Infection of CEM cells

To infection 3×10^6 CEM cells were infected with 100 ng p24 equivalent of X4-tropic viral strain HIV IIIB and 2 mg/mL polybrene. After 24 h, cells were centrifuged, and medium was replaced with 5 mL complete growth medium and allowed to propagate in a T-25 culture flask for 12 days. Every 72 h culture supernatant was collected and analyzed for HIV p24 to monitor infection. Cells were then divided into aliquots of 10^6 infected cells in RPMI with 10% FBS media devoid of antibiotics before electroporation or transduction with each CRISPR construct (lentiviral vector as control). Electroporation was performed using the Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific) using a protocol standardized by the manufacturer for CEM cells (voltage: 1,230 V; width: 45 ms; pulses: 1). Following electroporation, cells were resuspended in RPMI with 10% FBS in a 24-well plate. After O/N incubation, the medium was replaced with complete medium including antibiotics. For experiments involving tenofovir, tenofovir (5 μ M), based on Musumeci et al.,⁴⁴ was added immediately following infection and retained for 3 days in the culture media.

Packaging of CRISPR lentivirus

293T cells were used for the lentiviral vector packaging and cultured in a 100 mm culture dish up to 80% confluency. Cells were co-transfected with 9 μ g lentiviral vector plasmid pHIV-7-GFP or lentiviral vector plasmids with an appropriate insert such as pLTRhsp-CRISPR,

pLTRhsp-MzCRISPR, pLTRhsp-Mz(Wk)CRISPR, pLentiCRISPR-gRNA-2, pCHGP-2 (7.5 μ g), pCMV-VSV-G (4.5 μ g), and pCMV-Rev (3.5 μ g) using the calcium phosphate precipitation kit (Thermo Fisher Scientific, cat #440052; manufacturer's instructions) as described by us before.^{23,30} 6 h after transfection, the culture medium was replaced, and supernatants were collected at 24 and 48 h. The collected supernatants were pooled together and passed through a 0.45 μ m filter. Virus preparation was concentrated by mixing with filtered 40% PEG solution followed by chilling at 4°C incubation for 24 h. Virus was pelleted by centrifugation at 1,650 g/20 min. Concentrated virus preparation was aliquoted and stored at -80°C until further use.

Determination of lentiviral vector titers

p24 levels in 10 μ L virus preparation for all lentivirus preparations was determined including HIV-7-GFP. Separately, 10 μ L HIV-7-GFP lentivirus was used to transduce HeLa cells, and infectious vector titers were determined by flow cytometry. The p24 levels corresponding to the HIV-7-GFP titer in 10 μ L was then used to extrapolate and calculate virus titers in other lentiviral preparations. For transduction, infected CEM T cells were transduced with HIV-7-GFP or the CRISPR constructs at 100 MOI. After 24 h, medium was replaced with fresh medium containing tenofovir. On day 3, culture supernatants were collected, and fresh medium without tenofovir was added. Experiments were allowed to proceed in the absence of tenofovir, and culture supernatants were collected at the designated time points.

Western blot

Cells were lysed with RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer (Thermo Fisher Scientific, cat #89901) with protease inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific, cat #78429). The protein concentration was determined by the method of BCA protein assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, cat #23225) in accordance with the manufacturer's instructions. Equal amounts of total protein were loaded onto 4%–20% precast polyacrylamide gel (Bio-Rad, cat #4568094) and run at 100 V. After protein was separated, it was transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Afterward, the transfer blot was blocked by 10% blocking solution for 1 h. Then, the blot was incubated overnight in primary antibodies CRISPR-Cas9 (1:1,000; Thermo Fisher Scientific, cat #MA1-202), cyclin T1 (1:1,000; Cell Signaling, cat #81464), and α -tubulin (1:1,000; Cell Signaling, cat #2125), with 5% blocking solution. After incubation, the blot was washed with TBS-T and incubated for 1 h with horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit/anti-mouse secondary antibody, which was diluted 1:2,500 with 1% blocking solution. The blotted protein bands were detected in Chemidoc (Bio-Rad) using supersignal west femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific, cat #34095) following the kit manufacturer's recommendations. The blotted protein was quantified using the Quantity One software system (Bio-Rad), and values are normalized to α -tubulin.

Statistical analysis

Unless otherwise mentioned, data were expressed as mean \pm SEM from at least 3 different experiments. The data were subjected to sta-

tistical analysis using unpaired t tests or ANOVA followed by Tukey Kramer honestly significant difference test for multiple comparisons as appropriate. The significance was considered at the level of $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

This proposal was supported by the Department of Defense office of the Congressionally Directed Medical Research Programs grant DM171044, and NIH grants R01 HL147715 and R01 HL158316-A1 to H.J.U.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.C. prepared the manuscript and performed the experiments. M.-J.S., K.P., M.S.R., J.A., and H.J.U. performed experiments. J.R. helped with experimental planning. H.J.U. designed and cloned the fusion promoter and the minizyme variants, performed experiments, and handled overall planning and design of the project.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., and Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* *41*, 9584–9592.
- Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Malagon-Lopez, J., Topkar, V.V., Aryee, M.J., and Joung, J.K. (2017). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat. Methods* *14*, 607–614.
- Wang, Y., Wang, M., Zheng, T., Hou, Y., Zhang, P., Tang, T., Wei, J., and Du, Q. (2020). Specificity profiling of CRISPR system reveals greatly enhanced off-target gene editing. *Sci. Rep.* *10*, 2269.
- Zhang, X.H., Tee, L.Y., Wang, X.G., Huang, Q.S., and Yang, S.H. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e264.
- Zhang, J., Chen, L., Zhang, J., and Wang, Y. (2019). Drug inducible CRISPR/cas systems. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *17*, 1171–1177.
- González, F., Zhu, Z., Shi, Z.D., Lelli, K., Verma, N., Li, Q.V., and Huangfu, D. (2014). An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *15*, 215–226.
- St-Onge, L., Furth, P.A., and Gruss, P. (1996). Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res.* *24*, 3875–3877.
- Buzón, M.J., Massanella, M., Llibre, J.M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M.C., Gatell, J.M., Domingo, P., Paredes, R., Sharkey, M., et al. (2010). HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat. Med.* *16*, 460–465.
- Hatano, H., Strain, M.C., Scherzer, R., Bacchetti, P., Wentworth, D., Hoh, R., Martin, J.N., McCune, J.M., Neaton, J.D., Tracy, R.P., et al. (2013). Increase in 2-long terminal repeat circles and decrease in D-dimer after raltegravir intensification in patients with treated HIV infection: a randomized, placebo-controlled trial. *J. Infect. Dis.* *208*, 1436–1442.
- Collora, J.A., and Ho, Y.C. (2022). The loud minority: transcriptionally active HIV-1 infected cells survive, proliferate, and persist. *Cell* *185*, 227–229.
- Einkauf, K.B., Osborn, M.R., Gao, C., Sun, W., Sun, X., Lian, X., Parsons, E.M., Gladkov, G.T., Seiger, K.W., Blackmer, J.E., et al. (2022). Parallel analysis of transcription, integration, and sequence of single HIV-1 proviruses. *Cell* *185*, 266–282.e15.
- Alexaki, A., Liu, Y., and Wigdahl, B. (2008). Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* *6*, 388–400.

13. Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., Wainberg, M.A., and Liang, C. (2016). CRISPR/Cas9-Derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep.* *15*, 481–489.
14. Schiralli Lester, G.M., and Henderson, A.J. (2012). Mechanisms of HIV transcriptional regulation and their contribution to latency. *Mol. Biol. Int.* *2012*, 614120.
15. Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A., and Rana, T.M. (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J. Biol. Chem.* *275*, 34314–34319.
16. Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B.M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* *8*, 327–337.
17. Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* *92*, 451–462.
18. Kim, Y.K., Mbonye, U., Hokello, J., and Karn, J. (2011). T-cell receptor signaling enhances transcriptional elongation from latent HIV proviruses by activating P-TEFb through an ERK-dependent pathway. *J. Mol. Biol.* *410*, 896–916.
19. Tyagi, M., Pearson, R.J., and Karn, J. (2010). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J. Virol.* *84*, 6425–6437.
20. Chiu, Y.L., Cao, H., Jacque, J.M., Stevenson, M., and Rana, T.M. (2004). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1). *J. Virol.* *78*, 2517–2529.
21. Biglione, S., Byers, S.A., Price, J.P., Nguyen, V.T., Bensaude, O., Price, D.H., and Maury, W. (2007). Inhibition of HIV-1 replication by P-TEFb inhibitors DRB, seliciclib and flavopiridol correlates with release of free P-TEFb from the large, inactive form of the complex. *Retrovirology* *4*, 47.
22. Imai, K., Asamitsu, K., Victoriano, A.F.B., Cueno, M.E., Fujinaga, K., and Okamoto, T. (2009). Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J.* *276*, 7124–7133.
23. Unwalla, H.J., Li, H.T., Bahner, I., Li, M.J., Kohn, D., and Rossi, J.J. (2006). Novel Pol II fusion promoter directs human immunodeficiency virus type 1-inducible coexpression of a short hairpin RNA and protein. *J. Virol.* *80*, 1863–1873.
24. Garber, M.E., Wei, P., and Jones, K.A. (1998). HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* *63*, 371–380.
25. Mancebo, H.S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., and Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev.* *11*, 2633–2644.
26. Zhou, Q., Chen, D., Pierstorff, E., and Luo, K. (1998). Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *EMBO J.* *17*, 3681–3691.
27. Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (1999). Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 7791–7796.
28. Liu, X., Homma, A., Sayadi, J., Yang, S., Ohashi, J., and Takumi, T. (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* *6*, 19675.
29. Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., and Root, D.E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* *32*, 1262–1267.
30. Unwalla, H.J., Li, M.J., Kim, J.D., Li, H.T., Ehsani, A., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2004). Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1573–1578.
31. Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* *12*, 755–762.
32. Fu, T.J., Peng, J., Lee, G., Price, D.H., and Flores, O. (1999). Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* *274*, 34527–34530.
33. Ramakrishnan, R., Yu, W., and Rice, A.P. (2011). Limited redundancy in genes regulated by Cyclin T2 and Cyclin T1. *BMC Res. Notes* *4*, 260.
34. Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., and Davidson, B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* *20*, 1006–1010.
35. Unwalla, H.J., and Rossi, J.J. (2012). Screening effective target sites on mRNA: a ribozyme library approach. *Methods Mol. Biol.* *848*, 329–336.
36. Unwalla, H.J., Li, H., Li, S.Y., Abad, D., and Rossi, J.J. (2008). Use of a U16 snoRNA-containing ribozyme library to identify ribozyme targets in HIV-1. *Mol. Ther.* *16*, 1113–1119.
37. Persson, T., Hartmann, R.K., and Eckstein, F. (2002). Selection of hammerhead ribozyme variants with low Mg²⁺ requirement: importance of stem-loop II. *Chembiochem* *3*, 1066–1071.
38. Shapiro, G.I., Supko, J.G., Patterson, A., Lynch, C., Lucca, J., Zaccarola, P.F., Muzikansky, A., Wright, J.J., Lynch, T.J., Jr., and Rollins, B.J. (2001). A phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* *7*, 1590–1599.
39. Lever, A.M.L., and Jeang, K.T. (2011). Insights into cellular factors that regulate HIV-1 replication in human cells. *Biochemistry* *50*, 920–931.
40. Cohen, R.N., van der Aa, M.A.E.M., Macaraeg, N., Lee, A.P., and Szoka, F.C., Jr. (2009). Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J. Contr. Release* *135*, 166–174.
41. Yu, K.R., Corat, M.A., Metais, J.-Y., and Dunbar, C.E. (2016). The cytotoxic effect of RNA-guided endonuclease Cas9 on human hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). *Mol. Ther.* *24*, S225–S226.
42. Kaminski, R., Chen, Y., Salkind, J., Bella, R., Young, W.B., Ferrante, P., Karn, J., Malcolm, T., Hu, W., and Khalili, K. (2016). Negative feedback regulation of HIV-1 by gene editing strategy. *Sci. Rep.* *6*, 31527.
43. Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* *11*, 783–784.
44. Musumeci, G., Bon, I., Lembo, D., Cagno, V., Re, M.C., Signoretto, C., Diani, E., Lopalco, L., Pastori, C., Martin, L., et al. (2017). M48U1 and Tenofovir combination synergistically inhibits HIV infection in activated PBMCs and human cervicovaginal histocultures. *Sci. Rep.* *7*, 41018.