Thesis Title The Inhibition of Human Immunodeficiency Virus-1 Integration by Designed Zinc Finger Protein

Author Mr. Supachai Sakkhachornphop

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Advisor
Prof. Dr. Carlos F. Barbas, III	Co-advisor
Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Co-advisor
Prof. Thira Sirisanthana, M.D.	Co-advisor

ABSTRACT

Integration of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genome into the host chromosome is a crucial step in the HIV life cycle. The highly conserved cytosine-adenine (CA) dinucleotide sequence immediately upstream of the cleavage site is imperative for integrase (IN) activity. As this viral enzyme has an important role early stage of infection, interference with the IN substrate has become an attractive strategy for therapeutic intervention. In this study, the integrase recognition sequence at the 2-LTR-circle junctions of HIV-1 DNA was used to design a six-contiguous zinc finger protein (ZFP), namely 2LTRZFP by using zinc finger tools. The designed motif fused to green fluorescent protein (GFP) was expressed and purified from *E. coli* to determine its binding properties. The binding affinity of 2LTRZFP-GFP to its target DNA via surface plasmon resonance (SPR) was on a

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nanomolar scale. The competitive SPR indicated the 2LTRZFP-GFP specifically interacted with its target DNA. The qualitative binding activity was subsequently determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and demonstrated the aforementioned correlation. To investigate an intracellular function of 2LTRZFP-GFP, the 293T stable line of transduced with 2LTRZFP-GFP was produced and challenged with VSV-G pseudotyped lentiviral red fluorescent protein (RFP). The result demonstrated the dramatic suppression of RFP expression by 2LTRZFP-GFP. In addition, a third-generation lentiviral vector and pCEP4 expression vector were used to deliver the 2LTRZFP-GFP transgene into human T-lymphocytic cells for production of stable cell lines in long-term expression studies. These cell lines were challenged with HIV-1 $_{NL4-3}$. 2LTRZFP-GFP successfully inhibited viral integration and replication as measured by an *Alu-gag* qPCR and p24 antigen assay, respectively. These findings indicated that viral integration can be inhibited by intracellular immunization with 2LTRZFP-GFP indicating its potential for use in HIV gene therapy.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการอินทิเกรทเชื้อ เอชไอวี-1 โดยซิงก์ฟิงเกอร์โปรตีนที่ออกแบบ

ผู้เขียน นายศุภชัย ศักดิ์ขจรภพ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Carlos F. Barbas, III	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. นพ. ธีระ ศิริสันธนะ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กระบวนการอินทิเกรชั่นของเอชไอวี-1 ดีเอ็นเอ เข้าสู่โครโมโซมเจ้าบ้านโดยเอนไซม์อินทิเกรส เป็นขั้นตอนที่สำคัญในระยะแรกสำหรับการแบ่งตัวของไวรัส เอนไซม์อินทิเกรสทำการตัดดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณปลายสามไพร์มของแอลทีอาร์ เพื่อเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเจ้าบ้าน ดังนั้นการรบกวนหรือยับยั้งไม่ให้อินทิเกรสทำงานได้จึงเป็นกลยุทธ์ที่น่าสนใจในการรักษาในระดับยีน ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ใช้โมเลกุลเป้าหมายคือ ดีเอ็นเอบริเวณรอยต่อของสองแอลทีอาร์ของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 เป็นต้นแบบในการออกแบบซิงก์ฟิงเกอร์โปรตีนที่จำเพาะ ซิงก์ฟิงเกอร์โปรตีนที่ออกแบบจากซิงก์ฟิงเกอร์ทูล มีจำนวน 6 ฟิงเกอร์มีชื่อว่า 2LTRZFP โปรตีนนี้ถูกเชื่อมต่อกับโปรตีนที่เรืองแสงสีเขียว (GFP) ซึ่งสามารถเตรียมได้จากแบคทีเรียอีโคไล และทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ทำการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างซิงก์ฟิงเกอร์โปรตีนและดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยวิธีเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) โดยได้ค่าคงที่ในการเข้าจับในระดับนาโนโมลาร์ ในขณะที่วิธี คอมเพ็ททิทีฟเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ชี้ให้เห็นว่า 2LTRZFP-GFP จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ การเข้าจับกันเชิงคุณภาพระหว่างซิงก์ฟิงเกอร์โปรตีนและดีเอ็นเอเป้าหมายถูกทำการทดสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโมบิลิตี้ชิพแอสเซ (EMSA) ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับวิธีเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ ดังกล่าว เพื่อศึกษาหน้าที่ของ 2LTRZFP-GFP ภายในเซลล์ เซลล์ 293T ถูกนำส่งยีน 2LTRZFP-GFP โดยไวรัสเพื่อสร้างเซลล์ที่มีการแสดงออกของ 2LTRZFP-GFP อย่างถาวร และทำการท้าทายด้วยเชื้อวีเอสวี-จี ซูโดไทป์เลนติไวรัสที่มีโปรตีนเรืองแสงสีแดง (RFP) ผลการทดลองพบว่า 2LTRZFP-GFP ลดการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีแดง (RFP) ได้ชัดเจน ยิ่งไปกว่านั้น เลนติไวรัลเวคเตอร์และพีเซ็พโฟเวคเตอร์ถูกนำมาใช้ในการนำส่งยีน 2LTRZFP-GFP เข้าในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดที-ลิมโฟไซท์ของมนุษย์เพื่อทำการสร้างเซลล์ที่มีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงออกของ 2LTRZFP-GFP อย่างถาวร เซลล์เหล่านี้ถูกท้าทายด้วยเชื้อเอชไอวี-วัน เอ็นแอลโฟว์-ทรี พบว่า 2LTRZFP-GFP ยับยั้งกระบวนการอินทิเกรชั่นและการแบ่งตัวของไวรัสได้สำเร็จโดยวัดจาก *Alu-gag* qPCR และ p24 antigen assay ตามลำดับ การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการอินทิเกรชั่นของไวรัสสามารถถูกยับยั้งได้โดย 2LTRZFP-GFP ในเซลล์ ซึ่งแนวความคิดใหม่นี้เป็นการสร้างนวัตกรรมการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีในระดับยีนต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved