THE INHIBITION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 INTEGRATION BY DESIGNED ZINC FINGER PROTEIN

SUPACHAI SAKKHACHORNPHOP

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
AUGUST 2011

THE INHIBITION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 INTEGRATION BY DESIGNED ZINC FINGER PROTEIN

SUPACHAI SAKKHACHORNPHOP

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

AUGUST 2011

THE INHIBITION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 INTEGRATION BY DESIGNED ZINC FINGER PROTEIN

SUPACHAI SAKKHACHORNPHOP

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE

EXAMINING COMMITTEE

..... CHAIRPERSON
Prof. Kiat Ruxrungtham, M.D.

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Bruce E. Torbett

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana

..... MEMBER
Prof. Dr. Watchara Kasinrerk

..... MEMBER
Prof. Thira Sirisanthana, M.D.

THESIS ADVISORY COMMITTEE

..... ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana

..... CO-ADVISOR
Prof. Dr. Carlos F. Barbas, III

..... CO-ADVISOR
Prof. Dr. Watchara Kasinrerk

..... CO-ADVISOR
Prof. Thira Sirisanthana, M.D.

19 August 2011

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis arose on several years of research that has been done since I came to Assoc. Prof. Dr. Chatchai's Lab. By that time, I have worked with a great number of people whose contribution in assorted ways on this research road. This thesis would not have been possible unless all these special people and funding. It is a pleasure to convey my gratitude to them all in my acknowledgments.

First and foremost, I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana for giving me the opportunity to be a Ph.D student in his laboratory. He provided me the supervision, advice, and excellent guidance, valuable suggestions, extraordinary experiences and many encouragements from the very early stage throughout the period of study including to obtain the financial support from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D program. His truly scientist intuition has made him as a constant oasis of ideas and passions in science, which exceptionally inspire and enrich my growth and maturation.

It has been an honor to be a member for 6 months in laboratory of Prof. Dr. Carlos F. Barbas, III, my co-advisor at the Skaggs Institute for Chemical Biology and the Departments of Molecular Biology and Chemistry, the Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA, for working on zinc finger protein and lentiviral vector technology. I am extremely grateful to thank for his help in providing me with excellent guidance, constructive suggestions and comments, and kind supports throughout my study, and revision of my manuscripts. I'm also thankful for Dr. Beatriz Gonzalez Alonso, Roberta Fuller, Thomas Gaj and Mishelle McClanahan-

Shinn for technical assistance and everybody in this laboratory for their warm friendship and kind help during working in La Jolla.

My deepest gratitude goes to my co-advisor, Prof. Dr. Watchara Kasinrerk, for his valuable suggestions kindly provide some monoclonal antibodies, and equipments throughout my thesis. I would also like to thank members in this laboratory for their friendship, kindness, and contributions for technical supports.

For the continued supports from master degree through Ph.D. program, I would like to express my sincere gratitude to my co-advisor, Professor Thira Sirisanthana, for his kindness, encouragement, valuable suggestions, providing the financial support from the Fogarty AIDS International for Research and Training Program, the Fogarty International Clinical Research Training for Scholars and Fellows Program, Johns Hopkins University, and support the construction and facilities for viral culture experiments at the Research Institute for Health Sciences (RIHES), Chiang Mai University. I am particularly indebted to thanks Mr. Rassamee Keawvichit, Mrs. Kanlaya Wongworapat, and all the staff in clinical laboratory of the RIHES for their kind help and support in viral load assay. I appreciate Mr. Peter Lange, Mrs. Paphawadee Damrongmanee, and all staff of administrative office, and extend thanks a librarian, Ms. Tippawan Kunkaew, for the best service, their friendship.

For the assistance to access the BIACORE 2000TM biosensor, my grateful thanks go to Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert, Faculty of Medicine, Chiang Mai University and thank to Mr. Kanchanok Kodchakorn for technical support.

The Faculty of Allied Health Science, Chulalongkorn University and Rushmore Precision co., Ltd, have been a source to acquire many high quality

pictures by a confocal laser scanning microscope LSM 700 (Carl Zeiss MicroImaging, Germany) and ZEN 2010 software.

Warm friendship, suggestions, and kind assistance from Asst. Prof. Dr. Khajornsak Tragoolpua, Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda and sisters of lineage student code: Lect. Dr. Nutjeera Intasai and Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul were appreciated in deepest in my mind.

I thank to Mr. Wutigri Nimlamool, Mr. Somphot Saoin, Dr. Sawitree Nangola, and all the staff in Assoc. Prof. Dr. Chatchai's Lab for kind helps, warm friendship. I have appreciated to Mrs. Kongkham Kruawan for her kindness in providing lunch boxes every day. The best services in official document preparations were obtained by kindness and friendship of Mrs. Tuanjai Ponsung. Thank you so much.

This work was supported by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D program (grant number PHD/0112/2550), the Fogarty AIDS International for Research and Training Program, Johns Hopkins University, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) of the National Science and Technology Development Agency, Thailand, and the U.S. National Institutes of Health grant GM065059 (CFB), and the National Research University Project under Thailand's Office of the Higher Education Commission for partial financial support.

The proof of English usage in this thesis was mainly from the valuable help of Assoc. Prof. Dr. Bruce E. Torbett an invited committee from the Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA.

Finally, I deeply express my special thanks to my parents, and my sister Tassanee Sakkhachornphop as a second mom to take care my family throughout my time in USA. Indispensably, I thanks to my wife Pranee Sakkhachornphop, son N' Angpao, and daughter N' Imm for their love, patience, understanding, and encouragement.

Supachai Sakkhachornphop

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

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.

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

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

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	Percent
α	Alpha
β	Beta
Ψ	Psi-sequences
°C	Degrees Celsius
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Alu	*Arthrobacter luteus*
BBQ	BlackBerry Quencher
bp	Base pair (s)
BSA	Bovine serum albumin
CA	Capsid protein
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD4	Cluster of differentiation 4
cDNA	Complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
cPPT	Central polypurine tract
C_ts	Cycle thresholds
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
Cys	Cysteine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium

DNA	Deoxyribonucleic acid
ds-DNA	Double-stranded DNA
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr virus
E. coli	*Escherichia coli*
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ENV	Envelope
ERD	ERF repressor domain
FAM	6-carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum
FP	Fusion protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAG	Group specific antigens
GFP	Green fluorescent protein
gm	Gram (s)
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hr	Hour (s)
HIV	Human Immunodeficiency virus-1
His	Histidine
HCl	Hydrochloric acid

HRP	Horseradish peroxidase
HSCs	Hematopoietic stem cells
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl β-*D*-thiogalactopyranoside (IPTG)
kb	Kilo base pair (s)
KCl	Potassium chloride
Kd	Dissociation constant
kDa	Kilodaltons
KRAB	Kruppel associated box
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucine
LTR	Long terminal repeat
M	Molar (s)
MA	Matrix protein
mAb	Monoclonal antibody (-ies)
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
$MgCl_2$	Magnesium Chloride
min	Minute (s)
ml	Milliliter (s)
MOI	Multiplicity of infection
mPGK	Murine phosphoglycerate kinase
Mw	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride

NaN_3	Sodium azide
NaOH	Sodium hydroxide
NC	Nucleocapsid protein
NEF	Negative Regulatory Factor
ng	Nanogram (s)
NLS	Nuclear localization signal
NNRTIs	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
nm	Nanometer (s)
nM	Nanomolar (s)
NRTIs	Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors
OD	Optical density
OriP	Origin of replication
PBS	Phosphate buffered saline
PBS	Primer binding site
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phenylalanine
pI	Isoelectric point
PICs	Preintegration complexs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
POL	Polymerase
PPT	Polypurine tract
PRIs	Protease inhibitors
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RCL	Replication competent lentiviruses

RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RRE	Rev-responsive element
RT	Reverse transcriptase
S	Second (s)
scFv	Single-chain variable fragments
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIN	Self-inactivating
siRNAs	Small interfering RNAs
shRNAs	Short hairpin RNAs
SPR	Surface plasmon resonance
ss-DNA	Single-stranded DNA
TAT	Transactivator of transcription
TBP	TATA-box binding protein
TSO	Target site overlap
Tyr	Tyrosine
µg	Microgram (s)
µl	Microliter (s)
µm	Micrometer (s)
µM	Micromolar (s)
V	Volt (s)

VIF	Viral infectivity factor
VPR	Viral protein R
Vpu	Viral protein U
VSV-G	Vesicular stomatitis virus G glycoprotein
V/V	Volume /Volume
WHO	World Health Organization
WPRE	Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element
W/V	Weight/Volume
ZFP	Zinc finger protein
$ZnSO_4$	Zinc sulfate