

Thesis Title The Interference of Human Immunodeficiency Virus
Assembly and Maturation by Ankyrin Repeat Proteins

Author Ms. Sawitree Nangola

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

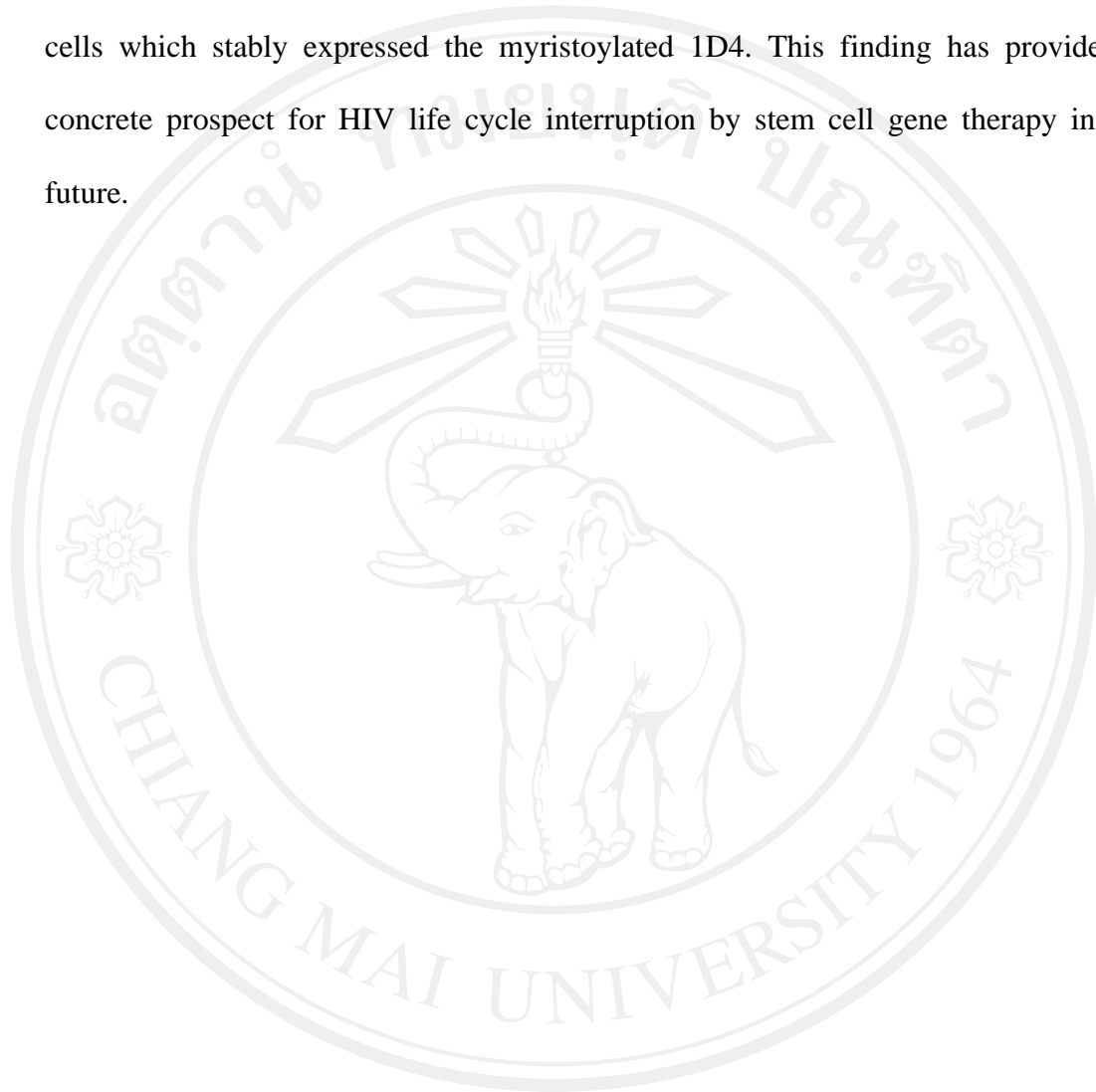
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Advisor

Prof. Dr. Philippe Minard Co-advisor

ABSTRACT

Presently, the standard regimen for antiretroviral treatment is highly active antiretroviral therapy (HAART). However, this strategy inherits the well-known side effects and is prone to promote the HIV drug-resistant strains. As a consequence, gene therapy has been introduced as an alternative approach. In this study, we aimed to discover the novel protein-based agents for intervening viral replication by gene-targeting procedure. Regarding the efficient folding dynamic in cytoplasm, ankyrin repeat protein was considered to be a candidate scaffold. Several engineered ankyrin binders specific to HIV MA-CA domain were successfully retrieved from the ankyrin-displayed phage library. Three positive clones with high binding activity by ELISA were selected for further analyzing their binding property in soluble form. The best binder, 1D4, recognized its epitope located on CA domain as shown by Western immunoblotting and ELISA. The affinity of 1D4 against H₆MA-CA was 0.45 μ M with one to two moles of target molecule determined by isothermal titration calorimetry

(ITC). Although 1D4 exhibited no effect on viral maturation as verified by an ELISA-based HIV protease assay technique, it disturbed the viral assembly process in Sup-T1 cells which stably expressed the myristoylated 1D4. This finding has provided a concrete prospect for HIV life cycle interruption by stem cell gene therapy in the future.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การรบกวนการประกอบอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส
ภูมิคุ้มกันเสื่อมในมนุษย์ด้วยโปรตีนแองไครินรีพิท

ผู้เขียน

นางสาวสาวิตรี นงอลา

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Prof. Dr. Philippe Minard อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ปัจจุบันยาต้านไวรัสสูตร highly active antiretroviral therapy (HAART) ถือเป็นมาตรฐานในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี อย่างไรก็ตามแนวทางการรักษานี้มีผลทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ป่วย และมีแนวโน้มทำให้เกิดการกลายพันธุ์อันนำมาสู่ปัญหาของการดื้อยาได้ การรักษาระดับยีนส์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือทำการค้นหาโปรตีนชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสโดยอาศัยหลักการรักษาด้วยยีนส์ โดยการนำโปรตีนแองไครินซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถจับกับโปรตีนในไซโทพลาสซึมของเซลล์มาใช้ในการศึกษา โปรตีนแองไครินที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีนเมทริกซ์และแคปซิดของเชื้อเอชไอวี (HIV MA-CA) ได้ถูกคัดเลือกจากแองไครินไลบรารีที่สร้างขึ้นโดยอาศัยเทคนิคเฟจดีสเพลย์ จากนั้นโคลนที่ให้ผลในการจับที่ดีที่สุดจำนวน 3 โคลนได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปผลิตเป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำสำหรับนำมาทดสอบคุณสมบัติเฉพาะด้วยเทคนิคต่างๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโคลนที่มีความสามารถดีสุดคือโคลน 1D4 ซึ่งมีความจำเพาะต่อส่วนแคปซิดของเชื้อไวรัส (CA) ดังแสดงผลด้วยวิธีเวสเทิร์นอิมมูโนบลอตติง และ อีไลซ่า นอกจากนี้โคลน 1D4 ยังถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติการจับกับโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี isothermal titration calorimetry (ITC) พบว่ามีค่าความสามารถในการจับในระดับ $0.45 \mu\text{M}$ และมีสัดส่วนในการจับกับ HIV MA-CA เป็นหนึ่งต่อสอง จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเอสด้วยวิธีอีไลซ่า ถึงแม้ว่าแองไครินโคลน 1D4 จะไม่สามารถขัดขวางการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ แต่ผลการทดลองที่น่าสนใจคือเมื่อทดสอบความสามารถในการรบกวนการประกอบอนุภาคของไวรัสในเซลล์ พบว่าเซลล์ Sup-T1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนแองไครินโคลน 1D4 ที่ผิวด้านในของเซลล์สามารถลดการสร้างอนุภาคไวรัสใหม่หลังจากมีการทำให้ติดเชื้อ

ไวรัสได้อย่างชัดเจน การค้นพบในครั้งนี้มีนัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้ในการรบกวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วยการรักษาระดับยีนส์ในเซลล์ต้นกำเนิดต่อไปในอนาคต



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Titre de la thèse Interférences avec l'assemblage et la maturation du
Virus de l'Immunodeficiency Humaine (VIH) par des
protéines à motifs répétés

Auteur Mademoiselle Sawitree Nangola

Diplôme Ph.D. (Sciences de la Vie et de la Santé)

Thesis en co-tutelle: Chiang Mai University et
Université Paris XI

Thèse Comité Consultatif

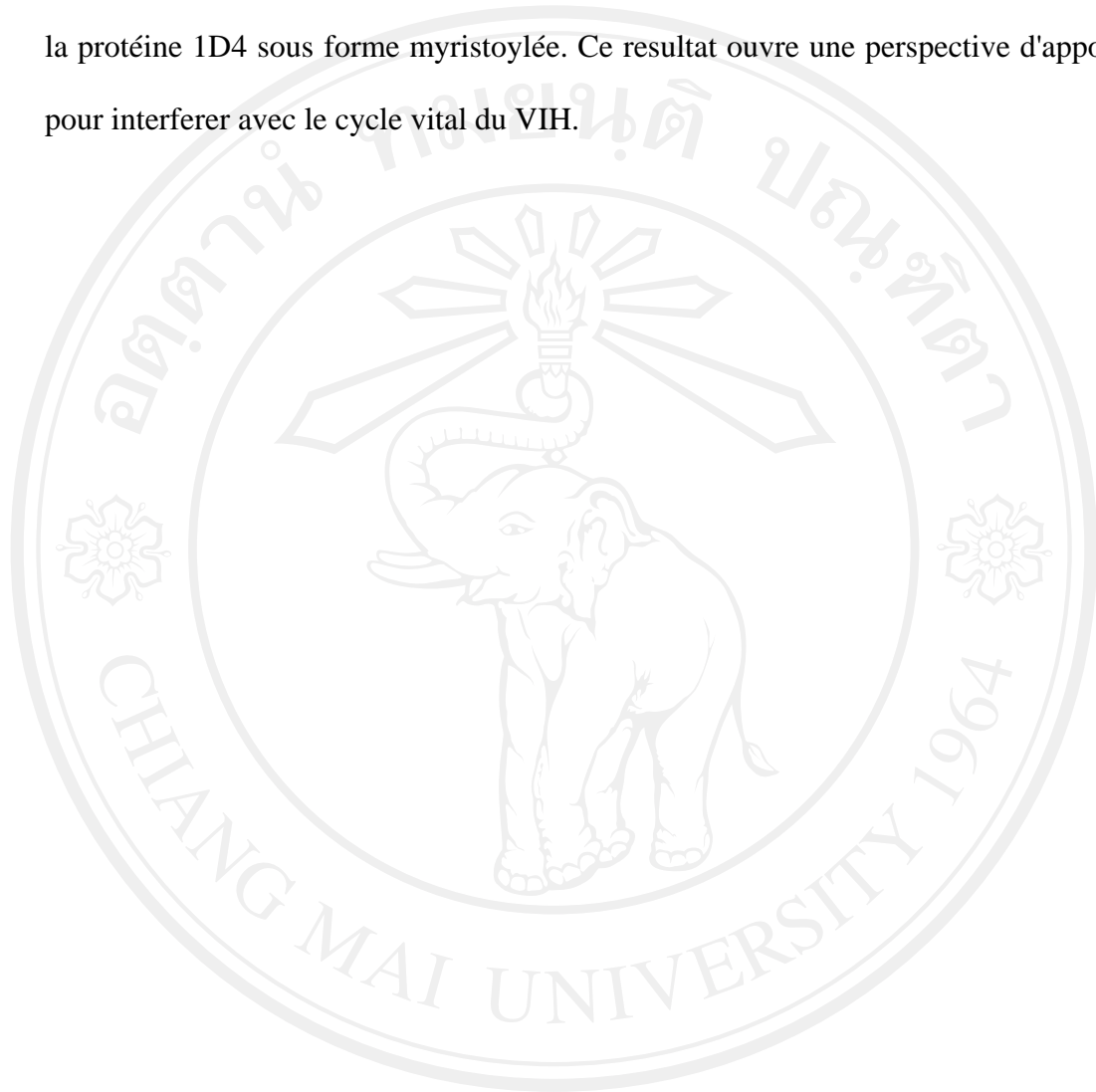
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Président

Prof. Dr. Philippe Minard Membre

RÉSUMÉ

Le but de ce travail est de découvrir des nouvelles protéines susceptibles d'interférer avec le cycle vital du virus VIH. De par leur repliement, les protéines à motifs ankyrines peuvent constituer une ossature protéique très bien adaptée à cet objectif. Plusieurs interacteurs spécifiques de la protéine MA-CA du VIH ont été sélectionnés par exposition sur phage à partir d'une bibliothèque de variants d'ankyrines. Trois protéines isolées ont été produites à partir de clones ayant une forte activité de liaisons. Le meilleur interacteur protéique (1D4) interagit avec un épitope situé sur le domaine CA. La constante de dissociation entre 1D4 et la protéine MACA a été déterminée par Calorimétrie de titrage isotherme et est égale à $0,45\mu\text{M}$. La protéine 1D4 n'a pas d'effet détectable sur la maturation virale suivie par une

technique ELISA de dosage de la Protease du VIH. En revanche, cette protéine interfere avec l'assemblage viral dans des cellules Sup-T1 qui exprime de façon stable la protéine 1D4 sous forme myristoylée. Ce resultat ouvre une perspective d'apchoe pour interferer avec le cycle vital du VIH.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved