CONTRIBUTION OF ACTIVE SITE RESIDUES TO KEY ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS OF THE DENGUE VIRUS NS3 SERINE PROTEASE

WANISA SALAEMAE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7871-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษากรดอะมิโนบริเวณที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสจากไวรัสไข้เลือดออก (CONTRIBUTION OF ACTIVE SITE RESIDUES TO KEY ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS OF THE DENGUE VIRUS NS3 SERINE PROTEASE)

วนิศา สะแลแม 4737266 MBMG/M
วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: Gerd Katzenmeier, Ph.D., Albert Ketterman, Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสของไวรัสไข้เลือดออกเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการพัฒนายาต้านไวรัส ถึงแม้ว่าปัจจุบันมีการค้นพบโครงสร้างสามมิติและกรดอะมิโนบริเวณที่มีความสำคัญของ NS3 ซีรีนโปรตีเอสแล้วก็ตาม แต่กระบวนการทำงานในการจับจำเพาะต่อสารตั้งต้นนั้นยังมีการศึกษาไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้มุ่งเป้าหมายไปยังกรดอะมิโนบริเวณที่มีความสำคัญของโปรตีเอสจำนวน 9 ตัว บริเวณ S1 และ S2 เพื่ออธิบายปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ ซึ่งกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ S1 ได้แก่ Leu115, Asp129, Gly133, Thr134, Tyr150, Gly151, Ser163 และ Ile165 และกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ S2 ได้แก่ Asn152 โปรตีนกลายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้สร้างขึ้นโดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนดังกล่าวให้เป็น alanine ด้วยวิธี site-specific mutagenesis จากผลการวิเคราะห์ autoproteolytic cleavage ที่จุดเชื่อมระหว่าง NS2B และ NS3 ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า โปรตีน L115A D129A G133A T134A N152A S163A และ I165A แสดงความสามารถในการตัดตัวเองในระดับที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนต้นแบบ ในขณะที่โปรตีน Y150A และ G151A นั้นสูญเสียความสามารถในการตัดตัวเองเกือบทั้งหมด ค่าคงที่ทางจลศาสตร์ซึ่งวัดจากการย่อยสารตั้งต้น GRR-AMC บ่งชี้ว่า มีเพียงโปรตีน L115A เท่านั้นที่มีค่าประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าโปรตีนต้นแบบเล็กน้อย ในขณะที่โปรตีนอื่นมีค่าลดลงโดยแสดงให้เห็นว่าค่า k_{cat}/K_m ลดลงเป็นลำดับดังนี้ L115A (254.00 ± 65.08 $M^{-1}s^{-1}$) > โปรตีนต้นแบบ (220.95 ± 37.96 $M^{-1}s^{-1}$) > T134A (98.94 ± 11.67 $M^{-1}s^{-1}$) > S163A (18.61 ± 0.79 $M^{-1}s^{-1}$) > G133A (15.67 ± 1.22 $M^{-1}s^{-1}$) > D129A (5.69 ± 0.95 $M^{-1}s^{-1}$) > N152A (3.64 ± 0.60 $M^{-1}s^{-1}$) > I165A (0.46 ± 0.06 $M^{-1}s^{-1}$) ค่า K_m ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่ตำแหน่งเหล่านี้มีความสำคัญต่อการจับกับสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามโปรตีน L115A มีความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นลดลงโดยแสดงให้เห็นว่าค่า k_{cat} นั้นลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนต้นแบบ เป็นที่น่าสนใจสำหรับโปรตีน Y150A และ G151A ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ autoproteolytic cleavage นั่นคือ สูญเสียความสามารถในการตัดตัวเองเกือบทั้งหมด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากรดอะมิโนทั้งสองตำแหน่งนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อปฏิกิริยาการจับและขนาดที่พอเหมาะของเอนไซม์โปรตีเอส ผลจากการศึกษานี้ทำให้สามารถอธิบายหน้าที่ของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบตัวยับยั้งโปรตีน NS3 โดยการใช้ข้อมูลทางโครงสร้างของสารตั้งต้นดังกล่าว

133 หน้า ISBN 974-04-7871-9

CONTRIBUTION OF ACTIVE SITE RESIDUES TO KEY ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS OF THE DENGUE VIRUS NS3 SERINE PROTEASE

WANISA SALAEMAE 4737266 MBMG/M
M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
THESIS ADVISORS: GERD KATZENMEIER, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue virus NS3 protease represents an attractive target for the development of antiviral inhibitors. Although the three-dimensional structure and active sites of the NS3 protease domain have been determined, the mechanism of substrate recognition is characterized only to a limited extent. To elucidate enzyme-substrate interactions, in this study, nine residues at the S1 and S2 pockets in the active site of dengue virus protease were targeted. Residues Leu115, Asp129, Gly133, Thr134, Tyr150, Gly151, Ser163, and Ile165 at S1 and Asn152 at S2 were replaced with alanine by site-specific mutagenesis. From SDS-PAGE analysis of autoproteolytic cleavage at the NS2B/NS3 junction, compared to the wild-type, the L115A, D129A, G133A, T134A, N152A, S163A, and I165A mutants demonstrated inefficient autoprocessing to several degrees, whereas in the Y150A and G151A mutants enzyme activity appeared to be almost completely abolished. Kinetic constants obtained with GRR-AMC substrate indicate that only L115A mutant has slightly higher catalytic efficiency than wild-type, whereas the others present lower activity as shown by reduced k_{cat}/K_m in the rank order of L115A (254.00 ± 65.08 $M^{-1}s^{-1}$) > wild-type (220.95 ± 37.96 $M^{-1}s^{-1}$) > T134A (98.94 ± 11.67 $M^{-1}s^{-1}$) > S163A (18.61 ± 0.79 $M^{-1}s^{-1}$) > G133A (15.67 ± 1.22 $M^{-1}s^{-1}$) > D129A (5.69 ± 0.95 $M^{-1}s^{-1}$) > N152A (3.64 ± 0.60 $M^{-1}s^{-1}$) > I165A (0.46 ± 0.06 $M^{-1}s^{-1}$). The significant higher K_m values reveal that the mutant residues are important for binding of the substrate. However, L115A had a reduced catalytic activity similar to the others, demonstrated by lower k_{cat} value than wild-type. Interestingly, similar to autoprocessing, Y150A and G151A substitutions inactivate the enzyme; therefore both residues are critical for interaction and optimal substrate binding of the NS3 protease, respectively. These findings have defined the function of critical residues for enzymatic activity that are useful for the structural based design of NS3 inhibitors.

KEY WORDS: DENGUE VIRUS/ NS3 PROTEASE/ MUTAGENESIS/ AUTOPROCESSING/ GRR-AMC SUBSTRATE/ BINDING AFFINITY/ INHIBITOR

133 P. ISBN 974-04-7871-9