

**CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF
THE DENGUE VIRUS NS3 HELICASE DOMAIN AND ANALYSIS
OF THE CATALYTIC PROPERTIES**



**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
2009**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE DENGUE VIRUS NS3 HELICASE DOMAIN AND ANALYSIS OF THE CATALYTIC PROPERTIES

RATCHANU TONGPHUNG 4837233 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : GERD KATZENMEIER, Ph.D., ALBERT
KETTERMAN, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.

ABSTRACT

Nonstructural protein 3 (NS3) of *dengue virus type 2* (DEN-2) is a multifunctional protein composed of two domains, a serine protease in the N-terminal domain (NS3pro) and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase (NTPase)/RNA helicase at the C-terminus (NS3h). NS3 plays an important role in viral replication and represents coordinated regulation of all the catalytic activities in the full-length NS3 protein. However, it still remains unclear whether enzyme activities of NS3 are functionally interdependent or modulated by interplay of the domain elements. In this study, plasmid harboring NS3 helicase domain and the NS2B hydrophilic domain linked to the NS3 full-length gene, NS2B(H)NS3FL, were constructed by PCR and restriction enzyme digestion. The two recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli*. The degraded products of protein were observed under the 79.1 kDa of NS2B(H)NS3FL at both 30° C and 37° C incubation condition. The 56.5 kDa NS3h was purified by metal chelate affinity chromatography followed by renaturation of precursors, mediated by artificial chaperone-assisted refolding which yielded the active helicase. NTPase assay based on colorimetric method with malachite reagent was performed. NTPase activity of NS3 helicase in the presence of ATP showed a higher turnover and K_m value than the reaction without ATP. The activity increased approximately 3-fold in the presence of polynucleotides. This indicates that NTPase activity of dengue NS3 can be stimulated by polynucleotide. For helicase function of NS3h, helicase assay was conducted using short internally quenched DNA oligonucleotides for the helicase. The assay was based on fluorescence release, in the presence and absence of polynucleotides. Significant fluorescence signaling increase was observed in the presence of polynucleotides. No unwinding activity was observed with addition of poly U. This indicates effect of polynucleotides on helicase activity. These results suggest the same or overlapping binding site of polynucleotide and RNA duplex on NS3 protein.

KEY WORDS : DENGUE VIRUS/NS2B-NS3/NS3 HELICASE/NTPase/HELICASE

77 pages

การสร้าง และการทำให้เอนไซม์ NS3 HELICASE จากไวรัสไข้เลือดออก ชิโรโทปี 2 บริสุทธิ์
เพื่อการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีในหลอดทดลอง

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE DENGUE VIRUS NS3 HELICASE
DOMAIN AND ANALYSIS OF THE CATALYTIC PROPERTIES

รัชну ทองผึ้ง 4837233 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : Gerd Katzenmeier, Ph.D., Albert J. Ketterman, Ph.D., ชนนท์
อังศุชนสมบัติ, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีน NS3 helicase (NS3h) ของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ชิโรโทปี 2 (DEN-2) ประกอบไปด้วย
ส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ซิริน โปรตีเอส ทางด้าน N-terminus (NS3pro) และ
ส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ RNA-stimulated nucleoside triphosphatase (NTPase)/RNA helicase
(NS3h) ทางด้าน C-terminus โปรตีน NS3 มีความสำคัญต่อกระบวนการจำลองสารพันธุกรรมของเชื้อ
ไวรัส โดยการอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ทั้งหมด แต่ยังไม่เป็นที่ทราบ
แน่ชัดว่า ส่วนที่แสดงออกซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสามนั้น ต้องการการกระตุ้นในระหว่างกันและกัน
หรือสามารถทำงานได้อย่างอิสระ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มี NS3helicase
(NS3h) โปรตีน และ NS2B(H)-NS3 ฟิวชันยีนที่ประกอบไปด้วย NS2B บริเวณที่จำเป็นสำหรับการเร่ง
ปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับ NS3 โดยเทคนิค PCR และ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดยีนสังเคราะห์ และแสดงออก
ในเชื้อ *E. coli* ซึ่งพบว่าในโปรตีน NS2B(H)NS3FL ขนาด 79.1 kDa ถูกตัดเป็นโปรตีนขนาดเล็กจำนวน
มากทั้งในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศา และ 37 องศา โปรตีนเชิงซ้อน NS3h ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยก
โครมาโตกราฟีแบบ Affinity และผ่านขบวนการคืนสภาพ (renaturation) ก่อนนำไปศึกษาปฏิกิริยาของ
เอนไซม์ NTPase ด้วยวิธีการย่อยสลายสารตั้งต้น adenosine 5'-triphosphate (ATP) ในปฏิกิริยา NTPase
ได้โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงในสารละลาย malachite green พบว่าค่า K_m และ k_{cat} ของปฏิกิริยา
เอนไซม์ NTPase ในโปรตีน NS3h เพิ่มมากขึ้น 3 เท่าในปฏิกิริยาที่มีโพลีนิวคลีโอไทด์ แสดงว่าปฏิกิริยา
NTPase ในโปรตีน NS3h สามารถถูกเร่งได้ด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ สำหรับการศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์
helicase โดยการแยกสายนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ พบว่าสามารถวัดปฏิกิริยาของ
เอนไซม์ได้ในสภาวะที่ไม่มีโพลีนิวคลีโอไทด์ และไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยา helicase ได้ในปฏิกิริยาที่
มีนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งการจับของโพลีนิวคลีโอไทด์บนเอนไซม์อาจจะ
เป็นตำแหน่งเดียวกับสายนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น