



**EXPRESSION, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF THE DENGUE VIRUS
TYPE 2 PROTEASE DOMAIN NS3(PRO)**

ROOGE SUVANASUTHI

ชื่อนี้แทนการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**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**

2001

ISBN 974-04-0262-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

R 746 e

2001

c.9

4136315 MBMG/M

: MAJOR : MOLECULAR GENETICS AND
GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR
GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

KEY WORDS

: DENGUE VIRUS SEROTYPE 2 / NS3 AND
NS2B PROTEINS / CLONING/ PURIFICATION/
C-TERMINAL POLYHISTIDINE AFFINITY TAG

**ROOGE SUVANASUTHI : EXPRESSION, PURIFICATION AND
BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE DENGUE VIRUS TYPE 2
PROTEASE DOMAIN NS3(PRO). THESIS ADVISORS : GERD KATZENMEIER,
Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT,
Ph.D. 152p. ISBN 974-04-0262-3**

Proteolytic processing of the dengue virus serotype 2 polyprotein requires the NS2B/NS3 protease complex, which is an essential component for virus replication and therefore a potential target for selective antiviral inhibitors. *In vitro* studies on the NS2B/NS3 protease complex revealed an "intrinsic" activity of the NS3 protease domain in the absence of the NS2B cofactor, with small model substrate for serine proteases. However, presence of a conserved 40 amino acid residues hydrophilic domain of NS2B resulted in a several thousand fold activation of the protease towards synthetic peptides containing dibasic cleavage sites. The results are consistent with the existence of 2 discrete conformational states of the NS3 protease, making both forms of the enzyme possible targets for the design of structure- or mechanism-based inhibitors.

In this thesis, sequences encoding the NS2B protein were obtained by restriction enzyme digestion from pUC-NS2B and subcloned in the pTH2A expression vector. In contrast to results obtained earlier with N-terminal tagged NS2B cofactor, expression of the NS2B cofactor without this tag in *E. coli* C41 was low and of poor reproducibility. The sequence encoding the NS3 protease domain was amplified by PCR and subcloned into vector pTH2A fused in frame to a C-terminal polyhistidine affinity purification tag. Upon induction, the recombinant strain *E. coli* C41 expressed the 25 kDa NS3pC protein (the NS3 protease domain with a C-terminal His-tag). NS3pC was not detected in SDS-PAGE gels, but gave a strong reactive signal in Western blots using anti-polyhistidine antiserum. NS3pC was expressed in both soluble and inclusion forms. The soluble NS3pC was partially purified, from which the total protein in the elution fraction was approximately 0.7 mg/liter of culture and the purified NS3pC from inclusion bodies was approximately 23 µg/liter of culture. The protein could be purified to apparent homogeneity by a single step affinity chromatography using elution with 500 mM imidazole under denaturing conditions in the presence of 8 M urea. The identity of the NS3pC was confirmed by N-terminal sequencing using automated Edman degradation. Attempts to detect enzymatic activity with a number of synthetic substrates, including fluorescence labeled GRR-MCA and cleavage-site derived peptides (dansyl-TTSTRR/GTGNIQ), were not successful so far, most likely due to improper refolding of the protein or drastically reduced catalytic activity of NS3pC towards these substrates in the absence of the NS2B activation cofactor.

4136315 MBMG/M

: สาขาวิชา: อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์; วท.ม.
(อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

รจ สุวรรณสุทธิ: การแสดงออก การแยกบริสุทธิ์และการศึกษาทางชีวเคมีของโปรตีเอสโดเมน NS3(pro) ของไวรัส dengue ไทป์ 2 (EXPRESSION, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE DENGUE VIRUS TYPE 2 PROTEASE DOMAIN NS3(PRO)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: Gerd Katzenmeier, Ph.D., ชาติชาย กฤคนัย, Ph.D., ชนันท อังศุรณสมบัติ, Ph.D. 152 หน้า. ISBN 974-04-0262-3

กระบวนการย่อยโปรตีนตั้งต้นของไวรัส dengue ซีโรไทป์ 2 จำเป็นต้องใช้โปรตีนเชิงซ้อน NS2B/NS3 โปรตีเอส ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังนั้นโปรตีนเชิงซ้อน NS2B/NS3 โปรตีเอสจึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการสร้างสารยับยั้งไวรัสที่จำเพาะ การศึกษาแบบ *in vitro* ของโปรตีนเชิงซ้อน NS2B/NS3 โปรตีเอสได้แสดงถึงปฏิกิริยาแบบ intrinsic ของโปรตีน NS3 ในสภาพที่ไม่มี NS2B โคแฟกเตอร์ต่อ model substrate ขนาดเล็กสำหรับ serine protease อย่างไรก็ตาม การที่มี amino acid 40 ลำดับที่เป็น hydrophilic โดเมนของ NS2B ทำให้โปรตีเอสมีปฏิกิริยาต่อเปปไทด์สังเคราะห์ที่มี dibasic cleavage site เพิ่มขึ้นหลายพันเท่า การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปร่าง 2 แบบของ NS3 โปรตีเอส เป็นเป้าหมายในการออกแบบตัวยับยั้งต่อโปรตีนชนิดนี้ได้

ยีนของโปรตีน NS2B ที่ได้มาจากการตัดพลาสมิด pUC-NS2B ได้ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pTH2A ซึ่งระดับการแสดงออกของโปรตีน NS2B ใน *E.coli* C41 ให้ผลที่ตรงข้ามกับระดับการแสดงออกของโปรตีน NS2B ที่มี N-terminal polyhistidine tag ซึ่งก็คือระดับการแสดงออกโปรตีน NS2B ที่ไม่มี polyhistidine tag มีระดับการแสดงออกต่ำกว่าโปรตีน NS2B ที่มี N-terminal polyhistidine tag ซึ่งยังต้องตรวจสอบให้ชัดเจนขึ้น ยีนของโปรตีน NS3 โปรตีเอสโดเมนได้มาจากการเพิ่มจำนวน DNA โดย PCR และนำอินไปโคลนเข้าสู่พลาสมิด pTH2A ให้ in frame กับ C-terminal polyhistidine affinity purification tag หลังจากการเหนี่ยวนำให้แสดงออกใน *E.coli* C41 จะได้โปรตีน NS3pC (NS3 โปรตีเอสโดเมนที่มี C-terminal polyhistidine tag) ที่ขนาด 25 kDa ซึ่งเมื่อตรวจหาโปรตีน NS3pC นี้ด้วย SDS-PAGE gel ปรากฏว่าไม่พบ แต่ตรวจพบได้เมื่อตรวจด้วยวิธี Western blot โดยใช้ polyhistidine antiserum จากการแยกส่วนโปรตีนที่เป็นสารละลายและโปรตีนที่เป็นผลึกแล้วนำมาตรวจสอบ พบว่าโปรตีน NS3pC ถูกแสดงออกเป็นโปรตีนทั้งแบบ โปรตีน NS3pC ที่เป็นสารละลายสามารถทำให้กึ่งบริสุทธิ์ได้ ซึ่งปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ใน elution fraction ได้ 0.7 mg ต่อ *E.coli* 1 ลิตร แต่ NS3pC ส่วนโปรตีน NS3pC ที่เป็นผลึกสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 23 µg ต่อ *E.coli* 1 ลิตร โปรตีนนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียวโดยใช้ affinity chromatography ซึ่ง NS3pC จะถูกล้างออกจาก column ด้วย 500 mM imidazole ภายใต้สภาวะ denaturing ใน 8 M urea โปรตีน NS3pC ที่ได้ ยังถูกนำไปตรวจสอบโดย N-terminal sequencing ด้วย automated Edman degradation เพื่อยืนยันว่า เป็น โปรตีน NS3pC โปรตีเอสโดเมน สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาของโปรตีน NS3pC ได้มีการนำ synthetic substrate ต่างๆมาทดสอบนั้นคือ GRR-MCA ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และ cleavage site derived peptide (dansylated-TTSTRR / GTGNIG) ซึ่งยังไม่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาของโปรตีน NS3pC ในสภาวะการทดลองที่ใช้ การที่ผลเป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการพับของโปรตีนไปอยู่ในรูปร่างที่ไม่ถูกต้องหรือการลดลงของปฏิกิริยาของ NS3pC ต่อ substrate ที่นำมาทดลองเนื่องจากไม่มี NS2B activation cofactor