รหัสโครงการ : MRG5180197

ชื่อโครงการ : การศึกษาโครงสร้างของโปรติเอสของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

(Structural analysis of two component protease from dengue virus)

ชื่อนักวิจัย : ดร. ศรินทร์ ฉิมณรงค์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

(Dr. Sarin Chimnaronk, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University)

E-mail Address : mbscr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การเพิ่มปริมาณของไวรัสไข้เลือดออกสามารถเกิดขึ้นได้โดยอาศัยโปรติเอสของโฮสต์เซลล์และไวรัส (NS2B–NS3 protease) โดยโปรติเอสชนิดหลังมีบทบาทมากในการตัดโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจำลองตัวของไวรัส ดังนั้นกลไกดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการคิดค้นยาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อการต้านเชื้อไวรัสชนิดนี้ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาลักษณะโครงสร้างและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเชิงซ้อน NS2B–NS3 protease เนื่องจากเป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) ซึ่งยากแก่การสังเคราะห์ คือโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จะมีการ folding ไม่ถูกต้อง ปริมาณน้อย และอาจไม่มี activity ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้พัฒนา expression vector ที่สามารถใช้ในการสร้าง integral membrane protein ในเซลล์ *E. coli* รวมถึงศึกษาลักษณะโครงสร้างและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน NS2B–NS3 protease ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ เบื้องต้นได้ทำการโคลนยีนมิสทิค (Mistic), GS-linker, octahistidine และ thrombin cleavage site เข้าไปในบริเวณ multiple cloning site 1 (MCS1) ของ pETDuet™-1 vector โดยเวคเตอร์นี้มีชื่อว่า "pMHTD" จากนั้นจึงได้ทำการโคลนยีน NS2B–NS3 protease (wild type) เข้าไปใน MCS1 ของเวคเตอร์ชนิดนี้ ต่อมา NS2B–NS3 protease, A1E และ S135A ได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิค site-directed mutagenesis การสังเคราะห์โปรตีนเชิงซ้อนพบว่าโปรตีน Mistic สามารถช่วยให้ได้โปรตีนที่มีปริมาณมากอย่างเห็นได้ชัด จากนั้นโปรตีนถูกสกัดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์โดยทดสอบกับ detergent หลากหลายชนิด และพบว่า Fos-choline-14 เป็น detergent ที่ดีที่สุด Mistic และโปรติเอสเชิงซ้อนถูกแยกออกจากกันอย่างง่ายดายโดยใช้ thrombin ตามด้วยการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Nickel affinity chromatography จาก SDS-PAGE ของ wild type และ A1E พบว่ามี band ของโปรตีนที่เด่นชัดเกิดขึ้นหลาย band แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งคู่มี activity โปรติเอสเชิงซ้อนนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นโดยใช้วิธี anion exchange ตามด้วย size exclusion chromatography การศึกษาลักษณะการ folding ของโปรตีนสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค circular dichroism พบว่าโปรตีนที่ทำการสร้างขึ้นนี้มีการ folding และรูปร่างส่วนใหญ่เป็น α–helix และจากฐานข้อมูลที่บ่งชี้ว่า NS3 protease มีลักษณะรูปร่างส่วนใหญ่เป็น β–sheet ทำให้เราสามารถสันนิษฐานได้ว่า NS2B มีรูปร่างเป็น α–helix เสียส่วนใหญ่ ที่น่าสนใจไปกว่านั้นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel filtration ยังพบว่าโปรติเอสเชิงซ้อนนี้สามารถทำงานได้โดยการจัดรูปร่างเป็น trimer (trimerization) อีกด้วย จากงานวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า pMHTD expression vector ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการสังเคราะห์ NS2B–NS3 protease ได้จริงและมีปริมาณมาก อีกทั้งยังพบว่าโปรติเอสเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีการ folding ที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้ รวมถึงข้อมูลที่น่าสนใจว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถทำงานได้เมื่อประกอบกันเป็น trimer การพิสูจน์ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับข้อสันนิษฐานเหล่านี้สามารถทำได้โดยศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในเชิงลึกด้วยวิธีที่เรียกว่า X-ray crystallography ซึ่งผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาและดำเนินการต่อไปในอนาคต

The maturation of the dengue virus (DV) in host cells requires both host cellular and viral proteases for the specific post-translational processing of the viral polyprotein. Of interest, a unique dengue NS2B-NS3 protease complex is responsible for the processing of several viral nonstructural proteins in the cytoplasmic region, and therefore, this protease complex has been considered as the primary target for the development of the antiviral drug or the vaccine. Unfortunately, the atomic structure and details of the reciprocal interaction of NS2B-NS3 complex are currently not available. This is ascribed to the fact that NS2B is a membrane-integral protein, and proved to be very difficult to be expressed and purified, giving an extremely low yield. In addition, the expressed recombinant often shows the misfolding property and does not possess the activity. In this study, we have developed a new vector for the expression of the membrane protein in *E. coli* cells, and for the first time, reported the successful overexpression of dengue NS2B-NS3 protease complex in *E. coli* membrane. The new constructed vector was designated as "pMHTD" vector derived by the insertion of the *Mistic* tag fused with two GS-linkers, an octahistidine tag, and a thrombin cleavage site into the multiple cloning site **1** (MCS1) of the pETDuet™-1 vector (Novagan). Three different constructs: the wild-type, A1E, and S135A proteases were cloned into the pMHTD vector. The results show an unbiased advantage of the Mistic tag in the overexpression of the membrane protein in *E. coli* cells. We further successfully extracted NS2B-NS3 protease from the membrane using a Fos-Choline-14 detergent, and purified the protein to homogeneity by combining the thrombin protease treatment, the nickel-affinity column, the anion exchange chromatography, and the gel filtration. The purified wild-type protease complex showed strong proteolytic activity which was absent in the S135A mutant. Moreover, the circular dichroism (CD) spectrum revealed the folding of the dengue protease complex in the membrane-like environment and suggested that NS2B is a α-helical membrane protein. Unexpectedly, the gel filtration analysis implied that dengue NS2B-NS3 forms a trimeric structure in the membrane. Taken together, our developed pMHTD vector is a powerful tool for the study of the membrane protein, and we shows, for the first time, the overexpression, purification, and the oligomerization of the dengue NS2B-NS3 protease complex in the membrane environment, which is a good start point for the structural analysis using the x-ray crystallography in the near future.