245889

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

245889

MRG5180073 ดร. พิทักษ์ เชื้อวงศ์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอ ของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอ ซินทิเทสจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์

โดย ดร.พิทักษ์ เชื้อวงศ์ และคณะ

เมษายน พ.ศ. 2554

b00251913

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245889

สัญญาเลขที่ MRG5180073

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอ ของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอ ซินทิเทสจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผู้วิจัย	สังกัด
1 ดร.พิทักษ์ เชื้อวงศ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2 ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180073

ชื่อโครงการ : การศึกษาความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอ ของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทสจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์

ชื่อนักวิจัย : 1 ดร.พิทักษ์ เชื้อวงศ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2 ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : Pitak.C@ku.ac.th, scjsv@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ: 245889

การเชื่อมต่อของกรดอะมิโนและทีอาร์เอ็นเอถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการรักษาระดับความถูกต้องของการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ ข้อมูลที่ถูกต้องซึ่งแฝงอยู่ในรูปของรหัสเบสสามตัวจะถูกถ่ายทอดไปได้ก็ต่อเมื่อโมเลกุลของทีอาร์เอ็นเอ ได้รับการต่อเชื่อมเข้ากับกรดอะมิโนที่ถูกต้อง นับถึงปัจจุบันนี้ ได้มีการค้นพบกระบวนการเชื่อมต่อของกรดอะมิโนในแบบไม่ตรงไปตรงมาหลายกระบวนการแล้ว ซึ่งหนึ่งในขั้นตอนที่พบบ่อยที่สุด คือการสังเคราะห์โมเลกุลของ Gln-tRNA^{Gln} และ Asn-tRNA^{Asn} โดยเอนไซม์กลูแทมินิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส แบบไม่จำเพาะ และ แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะ และ Asp/Glu-ADT ได้มีความพยายามเป็นจำนวนมากในการทำความเข้าใจการเกิดความไม่จำเพาะในการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ในกรณีของแอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะนั้น เอนไซม์นี้จะทำการต่อกรดอะมิโนแอสปาร์ทิก เข้ากับทีอาร์เอ็นเอแอสปาร์ทิก และทีอาร์เอ็นเอแอสปาราจีน จากนั้น โมเลกุลของทีอาร์เอ็นเอที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ถูกต้อง (Asp-tRNA^{Asn}) ก็จะถูกแก้ไขโดยเอนไซม์ Asp/Glu-ADT ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันนั้น โดยจุดกำเนิดของความไม่จำเพาะของเอนไซม์นั้น น่าจะมาจากบริเวณที่เอนไซม์จับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรทนั่นเอง ซึ่งบริเวนโดเมนที่ใช้จับกับแอนติโคดอนนั้น จัดว่าเป็นบริเวณที่สำคัญที่สุดบริเวณหนึ่ง ในการวิจัยครั้งนี้ เราได้รายงานการสลับโดเมนแอนติโคดอนของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะของแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ กับโดเมนแอนติโคดอนของแอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส และแอสปาราจินิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส จาก *Eschericia coli* โดยโปรตีนที่ได้นั้น (เรียกว่าไคเมอราดี และไคเมอราเอ็น) มีปริมาณโครงสร้างแบบทุติยภูมิที่คล้ายคลึงกับในเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะซึ่งเป็นตัวต้นแบบ โดยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของทั้งสองไคเมอริคเอนไซม์นี้ พบว่าน้อยกว่าของเอนไซม์ต้นแบบ อย่างไรก็ตาม ความชอบจับกับทีอาร์เอ็นเอแอสปาร์ทิคของไคเมอราดีนั้นมีมากกว่าของเอนไซม์ต้นแบบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโดเมนแอนติโคดอนที่มีต่อความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรท เมื่อนำโปรตีนทั้งสองไปผลิตใน *E. coli* โฮส พบว่าความเป็นพิษที่มีต่อการเจริญเติบโตของโฮสเซลล์มีความสอดคล้องกันกับประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรทของเอนไซม์ไคเมอราดี และไคเมอราเอ็น

คำหลัก : แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส, *Helicobacter pylori*, ทีอาร์เอ็นเอ

Abstract

Project Code : MRG5180073

Project Title : Investigation of tRNA Specificity for the Non-discriminating Aspartyl-tRNA Synthetase from the Human Pathogen *Helicobacter pylori*

Investigator : 1. Dr.Pitak Chuawong

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

2. Professor Dr. M.R. Jisnuson Svasti

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : Pitak.C@ku.ac.th, scjsv@mahidol.ac.th

Project Period : May 15th, 2008 to May 14th, 2010

245889

Abstract:

Aminoacylation of tRNAs is the crucial biochemical process that ensures the fidelity of protein translation. The correct message, embedded as a three letter code, in the DNA will only be translated correctly when the adaptor molecule, the tRNA, is correctly charged. To date, several indirect aminoacylation processes have been discovered. The most common ones are the synthesis of Gln-$tRNA^{Gln}$ and Asn-$tRNA^{Asn}$ via activities of the non-discriminating glutaminyl-tRNA synthetase (ND-GluRS), non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase (ND-AspRS), and the Asp/Glu-ADT. Several efforts have been made in order to unlock the peculiar tRNA specificity of the non-discriminating enzymes. In the case of ND-AspRS, the enzyme aspartylates both $tRNA^{Asp}$ and $tRNA^{Asn}$ and the mischarged Asp-$tRNA^{Asn}$ is then converted to Asn-$tRNA^{Asn}$ by the action of Asp/Glu-ADT, which coexists in the same organism containing ND-AspRS. The relaxed tRNA specificity was speculated to reside within the interface between the enzyme and tRNA substrate. Among those areas, the anticodon binding domain presents the most crucial interaction of all. Here we report the anticodon binding domain swapping between the ND-AspRS from the human pathogen *Helicobacter pylori* and those of the discriminating AspRS and AsnRS from *E. coli*. The resulting chimeras (Chimera-D for the ND-AspRS enzyme with *E. coli* AspRS anticodon binding domain and Chimera-N for the one with *E. coli* AsnRS anticodon binding domain) maintain the same secondary structure content compare to the wild-type enzyme. The catalytic activity of these chimeras is lower than the wild-type enzyme as expected. However, the preference for $tRNA^{Asp}$ in Chimera-D is a lot higher than those of wild-type enzyme, indicating the significant contribution of the anticodon binding domain toward tRNA specificity. The heterologous toxicity, when overexpressed in *E. coli* host cells, of these chimeras also correlates well with their tRNA specificity and catalytic activity.

Keywords : Aspartyl-tRNA Synthetase, *Helicobacter pylori*, tRNA

Executive summary

Aminoacylation of transfer RNAs (tRNAs) is at the heart of protein biosynthesis, a cellular process shared by all form of life on this planet.[1-3] This transformation can be accomplished by a group of enzymes called aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs). These enzymes have to accomplish a very complicated task as they have to selectively aminoacylate tRNA isoacceptor(s) with a cognate amino acid. This process represents two types of interaction in molecular biology, namely, protein (AARSs)/small molecule (amino acid) and protein (AARSs)/tRNAs interactions. Therefore, Investigation of the mechanistic details and evolutionary pattern of this group of enzymes will provide us a complete picture of the central process shared by every organism.

It had been hypothesized that there are 20 AARSs, one for each standard amino acid. However, several investigations of complete genomes of various organisms reveal a very intriguing piece of information. Some organisms, including human mitochondria, all archaea, and many pathogenic bacteria, are often missing one or two aminoacyl-tRNA synthetases, namely glutaminyl- and asparaginyl-tRNA synthetases (GlnRS and AsnRS, respectively).[3,4] The genes encoding for GlnRS and/or AsnRS are often missing in most bacteria, archaea, and organelles. In these cases, glutaminyl-$tRNA^{Gln}$ and/or asparaginyl-$tRNA^{Asn}$ must be made indirectly. These processes arise from the activity of a non-discriminating glutamyl and aspartyl-tRNA synthetase (ND-GluRS and/or ND-AspRS), which will charge glutamic acid onto both $tRNA^{Glu}$ and $tRNA^{Gln}$ and charge aspartic acid onto both $tRNA^{Asp}$ and $tRNA^{Asn}$ respectively. These observations and several other well characterized indirect aminoacylation pathways underline the importance of characterizing unexpected genetic variations in AARS as well as the novel indirect aminoacylation mechanisms.[4-32]

Not only do the AARSs catalyzed aminoacylation of the tRNAs, several alternative functions of AARSs have been reported, especially the ones with involvement in diseases and therapeutics. Some of these examples are:

1) The human lysyl-tRNA synthetase (LysRS) has been shown to interact with HIV-1 GAG protein and play a significant role in HIV-1 viral particle assembly.[33,34]

2) The non catalytic factors AIMP2/p38 and AIMP3/18, which are part of the mammalian tRNA synthetase macromolecular protein complex, are found to be potent tumor suppressors and play a critical role in the signaling pathways that are involved in cell proliferation and cell death.[35-37]

3) Recently, leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) has been shown to be a target of an antifungal agent.[38,39] The compound AN2690, a molecule in development for the

treatment of onychomycosis, inhibits yeast LeuRS by forming a stable $tRNA^{Leu}$-AN2690 adduct in the editing site of LeuRS and consequently prevents catalytic turnover. The scientific reports mentioned here truly emphasize the significance of AARSs in medical and pharmaceutical fields.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) was first isolated and successfully cultured in 1984 by Barry Marshall. This bacteriam is the causative agent behind stomach ulcers, chronic gastritis, and stomach cancer. It is worth noting that Barry J. Marshall and J. Robin Warren shared the Nobel Prize in Physiology/medicine in 2005 for their discovery of the bacterium *H. pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease.[40] The genome of *H. pylori* was completely sequenced in 1997.[41] Like some other bacteria, *H. pylori* genome lacks genes encoding for AsnRS and GlnRS. (This was the first example of a bacterium that lacked direct aminoacylation pathways for both Asn-$tRNA^{Asn}$ and Gln-$tRNA^{Gln}$.) Interestingly, the genome of this bacterium contains 2 copies of gene encoding for GluRS1 and GluRS2 and one copy of the non-discriminating AspRS (ND-AspRS). GluRS1 is a canonical, discriminating GluRS that charges $tRNA^{Glu}$ with glutamic acid. However, the role of GluRS2 is to specifically aminoacylate $tRNA^{Gln}$ with glutamic acid.[15,42,43] The mischarged Glu-$tRNA^{Gln}$ is then converted to the correctly charged Gln-$tRNA^{Gln}$ by the Asp-$tRNA^{Asn}$/Glu-$tRNA^{Gln}$ amidotransferase (Asp/Gly-Adt).[23,28,44-46] This unexpected specificity of GluRS2 in *H. pylori* leads us to further characterize the specificity and evolutionary pattern of the ND-AspRS in this pathogenic bacterium. Such information can also be used in medical and pharmaceutical sciences. Specifically, if significant structural differences can be identified between the human AspRS and the ND-AspRS from *H. pylori*, the ND-AspRS from this pathogenic bacterium could be a potential target for antibacterial drug development.