

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180073

ชื่อโครงการ : การศึกษาความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอ ของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทสจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์

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

E-mail Address : [Pitak.C@ku.ac.th](mailto: Pitak.C@ku.ac.th), [scjsv@mahidol.ac.th](mailto: scjsv@mahidol.ac.th)

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

บทคัดย่อ:

การเชื่อมต่อของกรดอะมิโนและทีอาร์เอ็นเอถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการรักษาระดับความถูกต้องของการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ ข้อมูลที่ถูกต้องซึ่งแฝงอยู่ในรูปของรหัสเบสสามตัวจะถูกถ่ายทอดไปได้ก็ต่อเมื่อโมเลกุลของทีอาร์เอ็นเอ ได้รับการต่อเชื่อมเข้ากับกรดอะมิโนที่ถูกต้อง นับถึงปัจจุบันนี้ ได้มีการค้นพบกระบวนการเชื่อมต่อของกรดอะมิโนในแบบไม่ตรงไปตรงมาหลายกระบวนการแล้ว ซึ่งหนึ่งในขั้นตอนที่พบบ่อยที่สุด คือการสังเคราะห์โมเลกุลของ Gln-tRNA^{Gln} และ Asn-tRNA^{Asn} โดยเอนไซม์กลูตามิโนิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส แบบไม่จำเพาะ และ แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะ และ Asp/Glu-ADT ได้มีความพยายามเป็นจำนวนมากในการทำความเข้าใจการเกิดความไม่จำเพาะในการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ในกรณีของแอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะนั้น เอนไซม์นี้จะทำการต่อกรดอะมิโนแอสปาร์ทิก เข้ากับทีอาร์เอ็นเอแอสปาร์ทิก และทีอาร์เอ็นเอแอสปาราจिन จากนั้น โมเลกุลของทีอาร์เอ็นเอที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ถูกต้อง (Asp-tRNA^{Asn}) ก็จะถูกแก้ไขโดยเอนไซม์ Asp/Glu-ADT ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันนั้น โดยจุดกำเนิดของความไม่จำเพาะของเอนไซม์นั้น น่าจะมาจากบริเวณที่เอนไซม์จับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรทนั่นเอง ซึ่งบริเวณโดเมนที่ใช้จับกับแอนติโคดอนนั้น จัดว่าเป็นบริเวณที่สำคัญที่สุดบริเวณหนึ่ง ในการวิจัยครั้งนี้ เราได้รายงานการสลับโดเมนแอนติโคดอนของเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะของแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ กับโดเมนแอนติโคดอนของแอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส และแอสปาราจิลทีอาร์เอ็นเอซินทิเทส จาก *Eschericia coli* โดยโปรตีนที่ได้นั้น (เรียกว่าโคเมอร่าดี และโคเมอร่าเอ็น) มีปริมาณโครงสร้างแบบทุติยภูมิที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์แอสปาร์ทิลทีอาร์เอ็นเอแบบไม่จำเพาะ ซึ่งเป็นตัวต้นแบบ โดยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของทั้งสองโคเมอริคเอนไซม์นี้ พบว่าน้อยกว่าของเอนไซม์ต้นแบบ อย่างไรก็ตาม ความชอบจับกับทีอาร์เอ็นเอแอสปาร์ทิกของโคเมอร่าดีนั้นมีมากกว่าของเอนไซม์ต้นแบบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโดเมนแอนติโคดอนที่มีต่อความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรท เมื่อนำโปรตีนทั้งสองไปผลิตใน *E. coli* โฮส พบว่าความเป็นพิษที่มีต่อการเจริญเติบโตของโฮสเซลล์มีความสอดคล้องกันกับประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะในการจับกับทีอาร์เอ็นเอสับสเตรทของเอนไซม์โคเมอร่าดี และโคเมอร่าเอ็น

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](mailto: Pitak.C@ku.ac.th), [scjsv@mahidol.ac.th](mailto: scjsv@mahidol.ac.th)

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

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 glutamyl-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