

Синтез на моделни съединения на аминоклизната реакция, протичаща в рибозомата

Станислав Байрямов

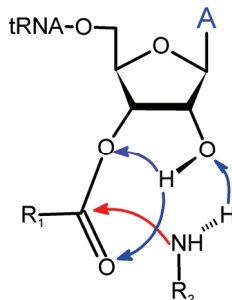
Synthesis of model compounds of the aminolysis reaction, which proceeds on ribosome: The current work describes the reaction pathways for synthesis of 2'/3'-O-acetylated 5-OTrt-nucleosides and 3'-O-acetylated 5-OTrt-2'-deoxy nucleosides as substrates for the model ribosomal reactions. For the synthesis of 5-O-tritylated nucleosides and 2'-deoxy nucleosides, author used another approaches, different from the standard ones. By the carrying out the kinetic of the model reactions, author hopes to prove the crucial role of 2'-OH group in the rate acceleration of aminolysis reaction on ribosome, as well as to obtain results according to the influence of the nature of nucleobases, during the reaction.

Key words: Model Ribosomal Reactions, Substrates, Amino Acyl-tRNA, Peptidyl-tRNA, trityl nucleosides, acylation.

ВЪВЕДЕНИЕ

По своята същност, биосинтезът на пептидна връзка в рибозомата е една аминоклиза на естер, поради което като моделни рибозомни реакции, както експериментално, така и теоретично, се изследват реакциите на аминоклиза на естери. Освен синтез на пептидна връзка, рибозомата катализира и хидролизата на пептидил-тРНК в последния стадий на трансляцията, както и реакции на алкохолиза на пептидил-тРНК^{1,2}. Това позволява за изясняването на механизма на действието на рибозомата да се изследват също и реакции на хидролиза и трансестерификация. Необходимостта от отсъствие на водни молекули в пептидилтрансферазния център³ е указание за това, че като моделни на рибозомната реакция могат да се изследват реакции, протичащи в неводна среда. Обкръжение, подобно на това на реактантите в активния център на рибозомата, може да се осигури от апротен органичен разтворител. Възможността за общ киселинно-основен катализ от функционална група в моделните реакции може да се създаде от органична база, която не може да участва в конкурентни реакции. Изследването на взаимодействията на молекулно ниво и на химичния механизъм на биологични процеси са възлов етап, от една страна, в разбирането на функционирането на живата клетка, а от друга, в разработването на лекарствени средства, целенасочено въздействащи върху тези процеси. Един от начините за изучаване на тези взаимодействия и процеси е чрез изследване на различните компоненти на клетката, на процесите с участие на нормални и модифицирани биомолекули, и др. Резултатите, получени при този подход, често пъти дават качествена оценка за влиянието на изследваните фактори и не могат еднозначно да покажат детайлния химичен механизъм на протичащите процеси. Затова широко се прилагат и алтернативни подходи, които са свързани с използване на моделни системи, позволяващи детайлно изследване на химическите взаимодействия в биологичната система и оценка на влиянието на различни химични промени върху процеса. Предложените досега механизми за каталитичното действие на рибозомата^{3,4} не могат да обяснят защо тРНК, в която отсъства 2'-хидроксилната група на 3'-крайния нуклеозиден остатък, не е активна като донор на пептиден остатък (пептидил-тРНК) за рибозомната реакция⁵⁻⁷ въпреки, че притежава значителна активност като акцептор (аминоацил-тРНК)⁸⁻¹⁰. Този експериментален факт може да намери обяснение, ако се допусне че 2'-хидроксилната група на 3'-крайния аденозинов остатък на пептидил-тРНК играе ключова роля в синтеза на пептидна връзка, катализиран от рибозомата. Известно е освен това, че промяната на 3'-крайния аденозинов остатък в донорния субстрат води до значително намаление на пептидилтрансферазната активност на рибозомата. Тези данни дават указания за възможност за вероятно анхимерно подпомагане на рибозомната

реакция от 2'-хидроксилната група на 3'-крайния аденозинов остатък на пептидил-тРНК. В случаите, при които катализът от ензим се подпомага от функционална група на субстрата е прието да се говори за "субстрат-подпомогнат катализ"¹¹. (Фиг.1).



Фиг.1: Анхимерно подпомагане на рибозомната реакция от 2'-хидроксилната група на 3'-крайния аденозинов остатък на пептидил-тРНК ("субстрат-подпомогнат катализ") по протонно-совалков механизъм.

Доказателство за такъв вид катализ е промяна в каталитичното действие на ензима след отстраняване на съответната функционална група от субстрата. Предположената от нас роля на 2'-хидроксилната група на пептидил-тРНК като протонна совалка в катализа от рибозомата не е достатъчно доказателство за ключовата роля на А76 2'-ОН на пептидил-тРНК, както и не дава напълно ясни представи за механизма, по който действа вициналната 2'-ОН група. От друга страна влиянието на нуклеобазата в А76 на пептидил-т РНК си заслужава също да бъде изследвано, за да бъде доказано комплексното многофакторно влияние в аминоклизната реакция при рибозомния протеинов синтез.

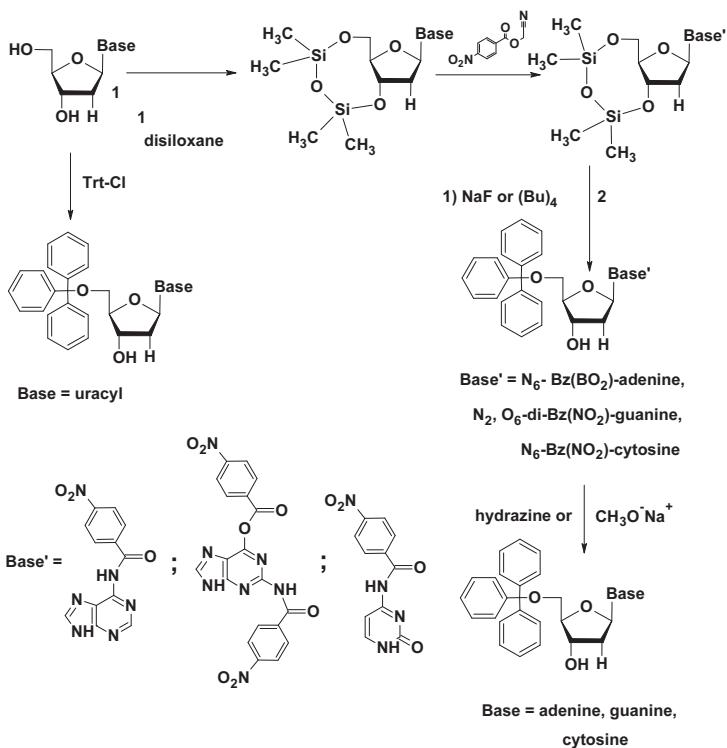
В тази връзка усилията ни бяха насочени към синтез на аминоклизиращи (лизинилиращи) и ацетилиращи производни на нуклеозидите с вариация в нуклеобазите с цел да се покаже и докаже влиянието на нуклеобазата в кинетичните експерименти на моделните реакции на вътрешномолекулна и междумолекулна аминоклиза.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Макар че относителното място на пептидилтрансферазния център в рибозомата е установено отдавна чрез използването на инхибитори на трансляцията - аналози на аминоклизиращ-тРНК, точното му разположение в голямата субединица, както и наличните рибозимни функционални групи разположени в близост до мястото, където се извършва аминоклизната реакция бяха установени след x-Ray изследванията на 50S субединицата от *Haloarcula marismortui* проведени в групата на Steitz. Макар че тези изследвания показаха начина на свързване на субстратните аналози, каталитичният механизъм използван от рибозомата остана неясен, а мутационни експерименти показаха че промяната на близкоразположените функционални групи не е фатална за работата на рибозомата. Единствената фатална за работата на рибозомата промяна всъщност е замяната или премахването на 2'-ОН от А76 на P-site тРНК.

Чрез използване на моделна диолна система, чрез теоретични и експериментални методи в наши предходни изследвания показахме, че използваният от рибозомата механизъм за синтез на пептидна връзка включва директно участие на вициналната 2'-ОН група в протонен пренос, т. е. че ролята на 2' - хидроксилната група на пептидил – тРНК вероятно е свързана с директно участие в пренос на протон по

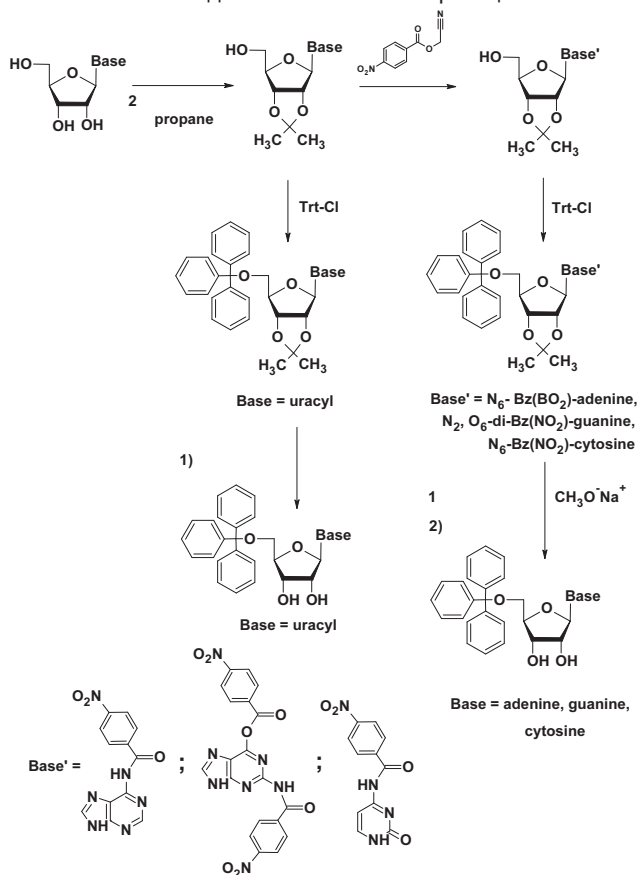
време на амиолизната реакция аналогично на втората молекула амин или вода при случаите на амиолизна реакция в разтвор. При този механизъм на протонен пренос 2'-ОН групата на А76 на пептидил - тРНК свързва атакуващата аминогрупа от новата аминокиселина на аминоацил – тРНК и 3'-О (3'-естерния кислороден атом) или напускащия 3'- оксианион. Нашите теоретични изследвания, използващи формиран етандиол като моделно съединение показаха, че от съществуващите няколко каталитични пътя за осъществяване на реакцията, най-изгоден е този, при който след атака на NH₂ групата към естерния С-атом се образува шестчленен цикъл с участие на 2'-ОН групата, която едновременно отдава протон към 3'-О (естерния кислороден атом) или към карбонилния кислород и получава в същото време протон от атакуващата аминогрупа. Допълнително значително ускоряване на реакцията може да се осъществи при депротониране на вициналната ОН-група, но това може да доведе и до ацилна миграция от 3' към 2' позиция, както и обратно.



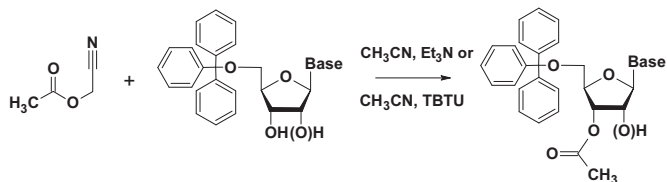
Фиг.2: Реакционна схема за синтез на 5'-О-тритилирани 2'-деокси нуклеозиди.

За синтеза на нуклеозидния компонент (тритилирането му) беше използван коренно различен от стандартния подход. Поради ниските добиви и страничните продукти при стандартното тритилиране на нуклеозидите, беше осъществена предварителна защита на съответните им хидроксилни функционални групи с цел – да се избегнат нежеланите продукти на тритилирането. При тритилирането на аденозините и деоксиаденозините производни бяха използвани различни стратегии и различни защитни групи (Фиг.2 и Фиг.3). Чистотата и добивите на крайните продукти бяха доста по-задоволителни в сравнение с тритилирането без предварителна защита.

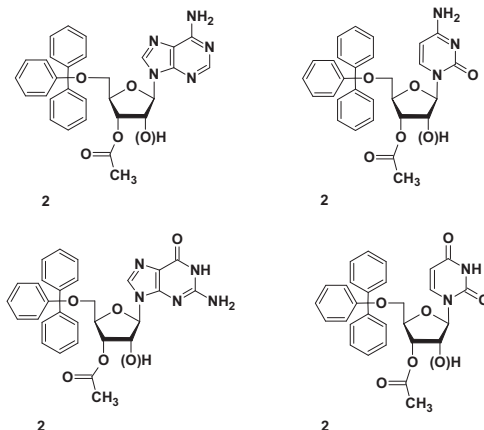
От своя страна за ацетилирането и лизилирането беше използвана методиката на Schultz и сътр. за ацилиране на захари и нуклеозиди с активирани киселинни естери (Фиг.4). Така получените моделни съединения (Фиг.5) предстои да бъдат тествани кинетично в моделната аминоклизна реакция.



Фиг.3: Реакционна схема за синтез на 5'-О-тритилирани нуклеозиди.



Фиг.4: Схема за ацетилиране на 5'-О-тритилирани нуклеозиди и 2'-деокси нуклеозиди, използвайки методиката на Schultz и сътр.



Фиг.5 Схема на моделните съединения, които предстои да бъдат кинетично тествани в моделната аминолизна реакция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощта на синтезираните субстрати предстои да бъдат направени кинетични изследвания, потвърждаващи ролята на 2'-ОН, както и установяващи дали видът на нуклеобазата оказва някакво влияние върху скоростта на протичане на аминолизната реакция, както в нашите моделни съединения, така и в пептидилтрансферазния център на рибозомата. Освен синтезираните ацетилирани нуклеозидни производни, се работи и по синтез на 2'/3'-О-лизилираните нуклеозиди, както и 3'-О-лизилирани 2'-деокси нуклеозиди.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Scolnick, E.; Milman, G.; Rosman, M.; Caskey, T. *Nature*, 1970, 225, 152 – 154.
- [2] Fahnestock, S.; Neumann, H.; Shashoua, V.; Rich, A. *Biochemistry*, 1970, 9, 12, 2477 – 2483.
- [3] Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science*, 2000, 289, 920 – 930.
- [4] Berg, J. M.; Lorsch, J. R. *Science*, 2001, 291, 203a
- [5] Quiggle, G.; K.; Kumar, G.; Ott, T. W.; Ryu, E.K.; Chladek, S. *Biochemistry*, 1981, 20, 3480 – 3485.
- [6] Chinali.; Sprinzl, M.; Parmeggiani, A.; Cramer, F. *Biochemistry*, 1974, 13, 15, 3001 – 3010.
- [7] Kravetsky A.; Kukhanova M. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1979, 23, 1 – 51
- [8] Fraser, T. H.; Rich, A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 9, 2671 – 2675.
- [9] Baksht, E.; de Goot, N.; Sprinzl, M.; Cramer, F. *Biochemistry*, 1976, 15, 16, 3639 – 3646.
- [10] Wagner, T.; Cramer, F.; Sprinzl, M. *Biochemistry*, 1982, 21, 1521 – 1529.
- [11] Dinner, A. R.; Blackburn, G. M.; Karplus, M. *Nature*, 2001, 413, 752 – 755

За контакти:

Гл. ас. д-р Станислав Байрямов, Катедра "Ремонт, надеждност и химични технологии", Русенски университет "Ангел Кънчев", тел.: 082-888 226, 082-888 459, e-mail: sbayryamov@uni-ruse.bg

Докладът е рецензиран