Българска Академия на Науките
Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия

Мирослав Ангелов Рангелов

Участие на вициналнa хидроксилна група в биосинтеза на пептидна връзка в рибозомата - моделни изследвания

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"
научна специалност "Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества", 01.05.10

Научен ръководител: ст. н.с. I ст. дхн Димитър Петков

СОФИЯ, 2008 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Колоквиума "Структура и функция на белтъци, пептиди и ензими" при ИОХ ЦФ - БАН на заседание от 02.04.2008г.

Дисертационният труд съдържа 183 печатни страници, 2 таблици, 16 схеми и 86 фигури. Цитирани са 256 литературни източника.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 09.06.2008 г. от 14 ч. в зала "Акад. Богдан Куртев" на ИОХ ЦФ - БАН, бл. 9 на заседание на СНС по органична химия и органична технология при ВАК.

Материалите по защитата се намират на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХ ЦФ - БАН, ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 9.

1. Увод

Възникването на живота най-вероятно е следствие от дълга редица химични процеси , движени от енергията в околната среда на древната земя и ограничено от физичните условия на същата тази околна среда. За да възникне животът, е необходимо да се случат голям брой важни процеси като синтез на подходящи мономери (аминокиселини и нуклеотиди), полимеризацията им и репликация на полимерите, която да дава достатъчно точни копия на оригиналните молекули. Една от най-важните цели на всички изследвания е да се идентифицират важните събития в еволюцията на протеиновия синтез - от неуправлявани аминокиселинни последователности, зависещи от вътрешни фактори като мономерната концентрация, наличието на енергия и съединенията на формиращия се полимер, до насочвана отвън аминокиселинна последователност. За да се постигнат тези цели са правени множество опити да се синтезират полипептиди от техните мономери при условия, наподобяващи условията на древната земя. При повечето от тези експерименти аминокиселините се активират посредством естерификация, фосфорилиране и присъствие на двувалентни йони като Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} и Ni^{2+}, но дизайнът на ефективни експерименти, както и интерпретацията на резултатите, са сериозно затруднени от липсата на подробна информация за метода на синтеза на пептидна връзка, ползван от съвременните организми.

2. Цели и задачи

Въпреки огромното количество експериментални данни за рибозомалния синтез на пептидна връзка каталитичният механизъм на рибозомата остава неясен, но има еднозначни експериментални данни за необходимостта от вицинално разположена хидроксилна група спрямо атакуваната от амина естерна група за протичането на аминолизния процес в рибозомата. Поради това целта на настоящия дисертационен труд е:

Да се оценят възможностите за участие на вицинално разположена хидроксилна група като катализатор на процеса чрез моделни рибозомомиметични реакции.

За тази цел са изследвани *in-silico* следните реакции:

1) Амонолиза на ацетилкатехол
2) Амонолиза на формилетандиол
3) Амонолиза на ацетилетандиол
4) Амонолиза на тетрахидрофуран-3,4-диол

3.Теоретично моделиране на механизмите

Различни възможни механизми за протичане на реакциите на амонолиза или аминолиза (без участие на катализатори, съседни групи или молекули) са представени на схема 1. На тази схема преходните състояния са показани в синьо, цвитерйоните интермедиати са в червено, а реактантите, продукти и интермедиат са в черно. Най-простият вариант за протичане на реакцията е едностадиен механизъм за получаване на продуктите през преходно състояние **TSc**. Реакцията може да протече и по двустадиен механизъм с междинно формиране на "неутрален" не-цвитерйонен интермедиат **I** и включва преходни състояния **TS1** и **TS2**. Останалите механизми минават през цвитерйони и може да се очаква да са предпочетени в полярни разтворители (вода, метанол), но не и в активния център на рибозомата.

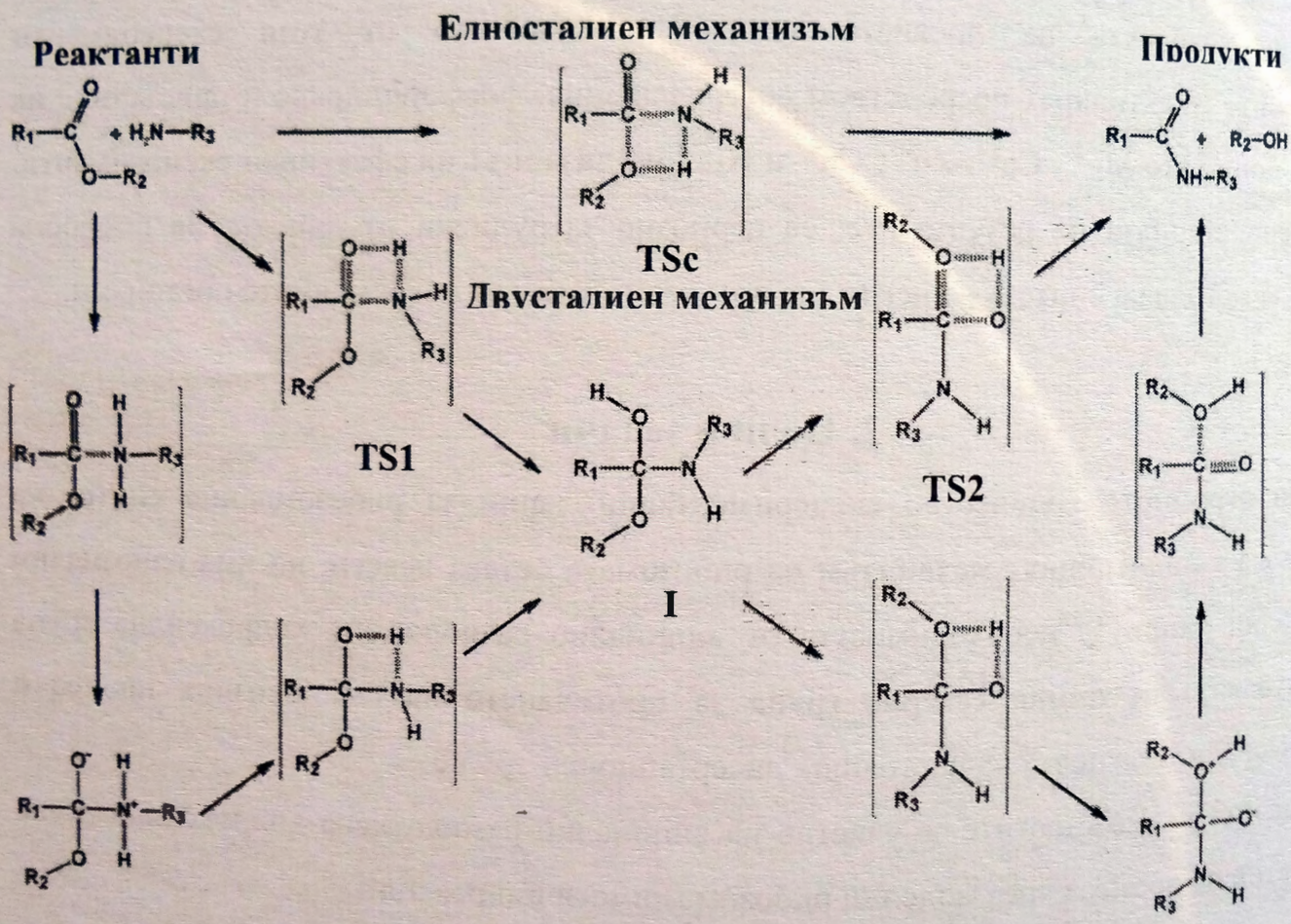


Схема 1. Варианти за протичане на аминолизната реакция без участието на киселини или основи катализиращи протонните преноси

Двустадийният механизъм включва образуването на незареден интермедиат **I** през преходното състояние **TS1**. В това преходно състояние азотният атом от молекулата на амина атакува карбонилния въглероден атом, при което се извършва и съгласуван пренос на протон от аминогрупата към карбонилния кислороден атом. Разпадането на интермедиата **I** и образуването на продуктите се извършва през второ преходно състояние **TS2**, при което

разкъсването на естерната C-O връзка е съпроводено с пренос на протона, свързан с бившия карбонилен кислороден атом Oc към етерния кислороден атом.

3.Методи на работа и анализ на резултатите

Използвани изчислителни процедури

При изследванията на амонолиза на ацетилфенол и ацетилкатехол оптимизацията на структурите на ниво HF с базисен набор 6-311++G** както и *Single Point* енергията на ниво MP2/6-311++G**//HF/6-311++G** са направени на програмния пакет GAMESS версия 6 при стандартните за програмния пакет критерии за конвергиране, а останалите оптимизации (HF/6-31G*, B3LYP/6-31+G) на геометрии са направени на програмния пакет GAUSSIAN98W също при стандартните за програмния пакет критерии за конвергиране. При оптимизациите с GAMESS, като метод за оптимизация е използвана на квадратична апроксимация, а при GAUSSIAN98W - RFO/Berni. Аналитичните втори производни на енергията по геометричните координати, необходими за охарактеризирането на преходните структури са направени с програмния пакет, на който е извършена оптимизацията на структурата при същия метод и базисен набор. Преходните структури бяха идентифицирани по наличието на една и само една отрицателна собствена стойност в матрицата на силовите константи и чрез геометричен анализ на компонентите на собствения вектор на тази отрицателна собствена стойност.

При изследването на реакцията на амонолиза на ацетилкатехол и ацетилфенол енергията на преходните структури, интермедиатите и продуктите е спрямо сумата на енергиите на разделените реактанти. Енергията на реакцията също е пресметната спрямо сумата от енергията на разделените продукти. Бариерите при преходните състояния **TS1** и **TSc** (виж секция 2.2.3) са пресметнати спрямо реактантите, а енергията на бариера при **TS2** е пресметната спрямо геометрично най- близкия интермедиат.

За краткост при коментарите върху енергията на преходните структури, тези с по-ниска енергия ще бъдат наричани "по-стабилни" и обратното, като в текста кавичките няма да бъдат поставяни с уговорката, че се подразбират.

При формилетандиолния и тетрахидрофурандиолния модел всички оптимизации на стационарни точки бяха извършени с програмния пакет GAUSSIAN98W с минимизиращи алгоритми RFO/Berni и EF (Eigenvector Following).

Карбонилният въглероден атом в реактанта е прохирален и след нуклеофилната атака на амоняка се формира хирален интермедиат, което обуславя два реакционни пътя единия с R, а другия с S интермедиати. Но R- и S- структурите на интермедиата, както и преходните

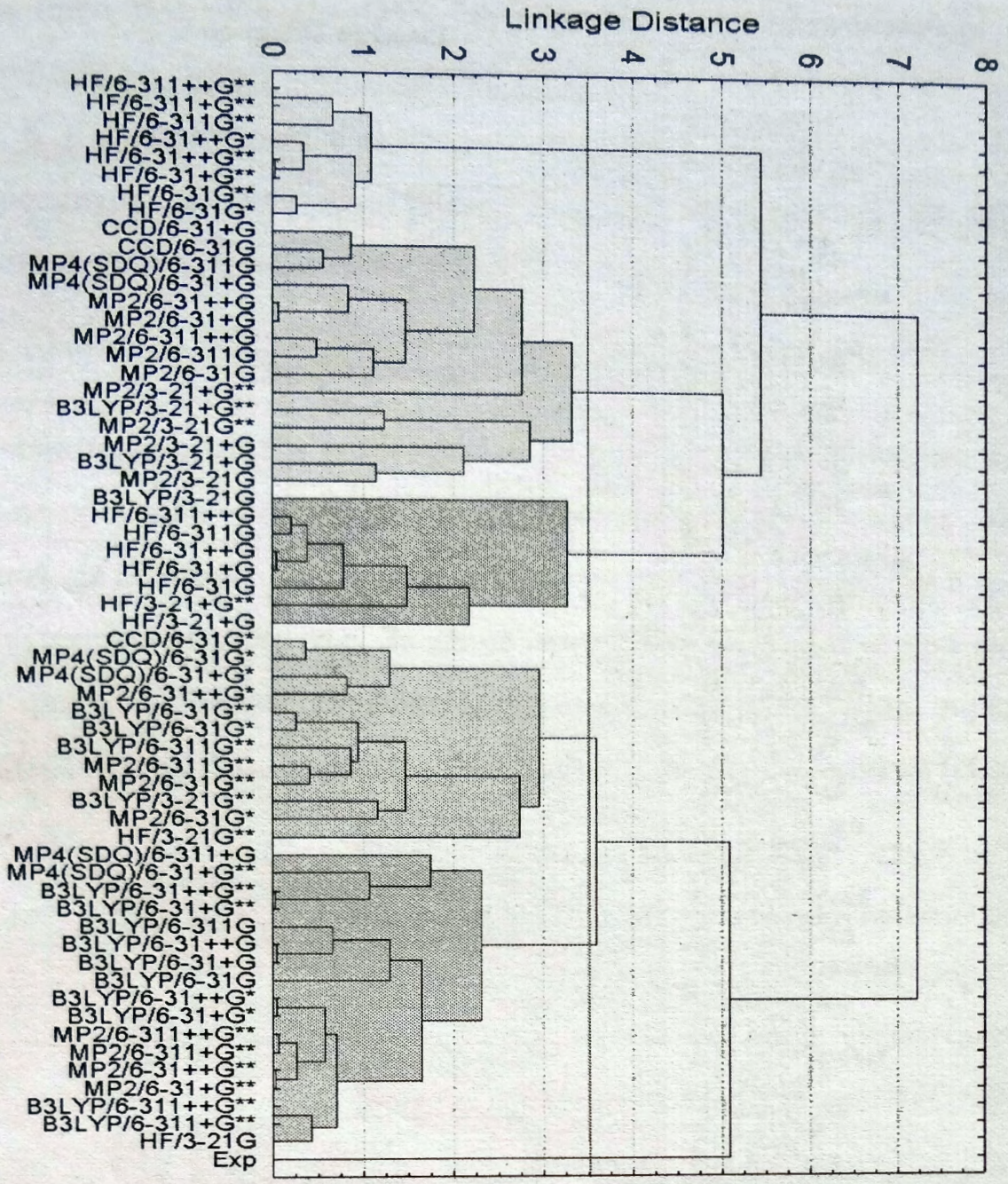
структури при про-R и про-S атака са енантиомери и следователно са с еднаква енергия, поради което тук са разгледани само R-интермедиати и преходни структури при pro-R атака.

Избор на метод и базисен набор

За избора на метод и базисен набор бяха направени геометрични оптимизации на мравчена киселина и на димера на мравчената киселина, за чиито геометрии има точни експериментални данни. Беше пресметната и ΔG на реакцията на амонолиза на мравчена киселина, за която също има точни експериментални данни. Пресмятанията включваха геометрична оптимизация на структурите при всеки метод/базисен набор и следващо пресмятане на матрицата на аналитичните силови константи и термохимията с програмния пакет GAUSSIAN98W. Тези пресмятания бяха направени с 60 комбинации метод/базисен набор, като използваните методи са HF, MP2, B3LYP, MP4(SDQ) и CCD. Получените данни бяха подложени на клъстерен и каноничен анализ със софтуерния пакет STATISTICA6.0.

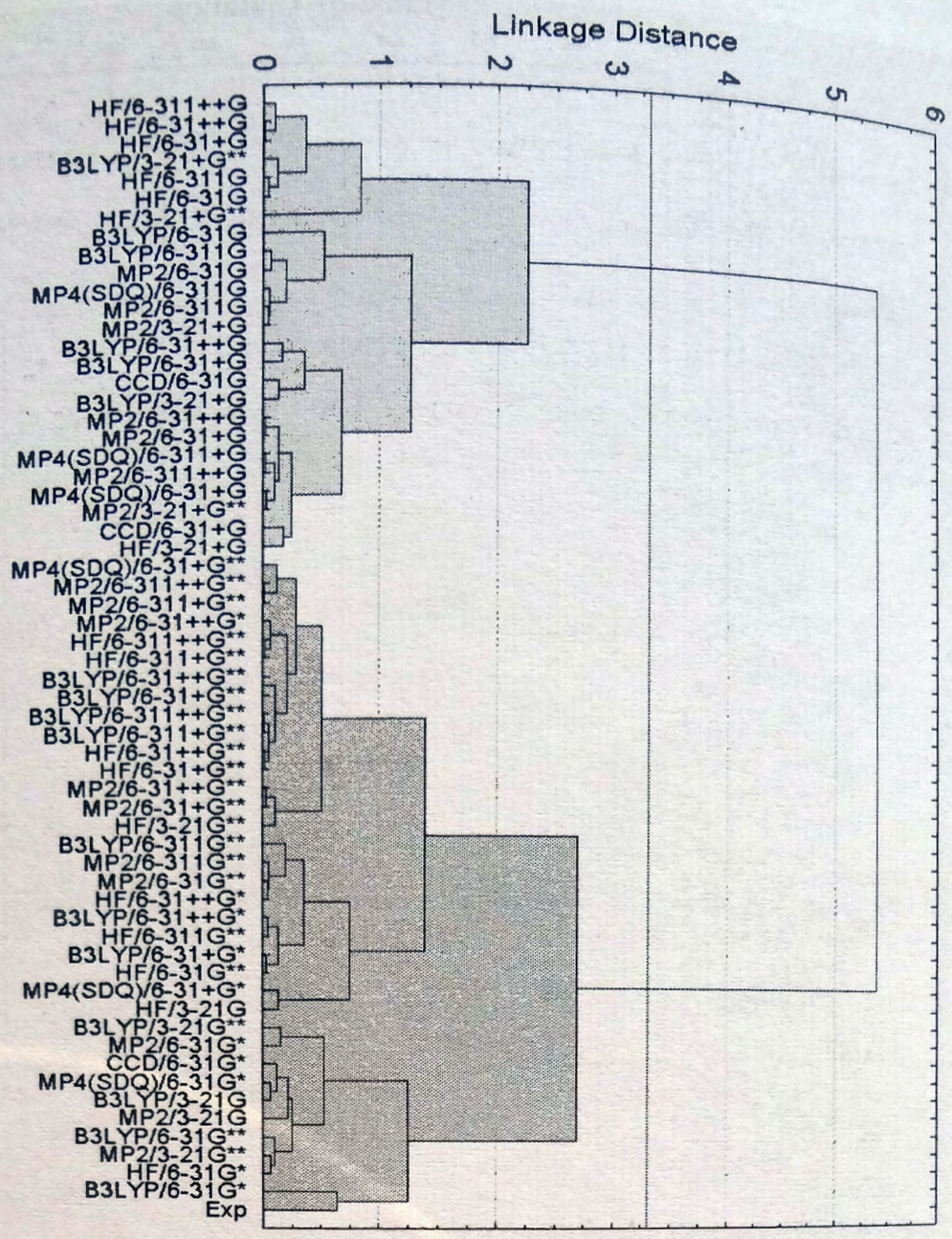
При клъстерния анализ като правило за свързване е използвано правилото на пълната връзка, като мярка за разстояние е използвано евклидово разстояние, а данните са стандартизирани. Червената линия на дендрограмите определя разтоянието определено от експерименталната грешка в експерименталните данни.

От дендрограмата за грешките в описанието на геометриите на мравчена киселина и нейния димер (Фигура 1) се вижда, че експерименталните данни са свързани с два клъстера съдържащи главно B3LYP, MP2 и MP4 методи с базисни набори с поляризационни функции (в лилаво и червено) като основната разлика между тях е наличието (клъстера в червено) или отсъствието (клъстера в лилаво) на дифузни функции. Експерименталните данни са далеч от останалите три клъстера. Единият от тези клъстери съдържа главно методи, отчитащи електронната корелация, но с базисни набори без поляризационни функции или с поляризационни функции, но с малко примитиви (3-21) (в зелено) Останалите два клъстера съдържат метода HF, но с наличие (в жълто) или отсъствие (в синьо) на поляризационни функции в базисните набори. Като се вземе предвид изчислителното време необходимо на различните методи и силната необходимост от поляризационни функции поне върху тежките атоми, за коректно описание на геометриите на структурите и на водородните връзки като оптимален метод може да се избере B3LYP с базисен набор 6-31G*.



Фигура 1. Дендрограма от клъстерен анализ на изследваните методи при класификатори грешките в описанието на геометриите на мравчена киселина и нейния димер

От дендрограмата за грешките в описанието на термохимията на реакцията на амонолиза на мравчена киселина, представена на Фигура 2, се вижда, че методите и базисните набори могат да се разделят на два клъстера разликата, между които отново е в наличието (клъстера в червени) или отсъствието (клъстера в зелено) на поляризационни функции в базисния набор. Тъй като експерименталните данни влизат в клъстера с базисни набори включващи поляризационни функции, то за коректно описание на термохимията на реакцията е необходимо те да бъдат включени в базисния набор.



Фигура 2. Дендрограма от клъстерен анализ на изследваните методи при класификатори грешките в описанието на термохимията на реакцията на амонолиза на мравчена киселина

Избраният от предишния клъстерен анализ метод (B3LYP/6-31G*) тук е най-близкият до експерименталните данни метод.

Поради необходимостта от сравнения на енергиите между реакции с неутрални молекули и аниони, за точното описание на които, дифузните функции са от особена важност ние избрахме като метод B3LYP/6-31+G*.

Всички коментари върху геометрията на структурите при формилетандиолния модел, както и при тетрахидрофурандиолния модел и всички цитирани стойности за дължини на връзки, междуатомни разстояния и ъгли се отнасят за геометрии, оптимизирани на ниво B3LYP/6-31+G*. От друга страна, поради нуждата от коректно описание на бариерите на реакцията и определянето на енергията на преходни структури до голяма степен разкъсани връзки между протон и тежък атом, най-ниските по енергия структури за всички реакционни пътища при амонолизата на формилетандиол и формилтетрахидрофурандиол са оптимизирани

допълнително на ниво B3LYP/6-31++G**. На всички такива оптимизирани структури са пресметнати матриците на аналитичните силови константи и свободната Гибсова енергия при 1 атм. и 298.15 К в съответствие с имплементираните в GAUSSIAN98W термохимични изчислителни процедури. Всички коментари, свързани с енергиите на структурите от реакционните пътища на реакцията са базират на тези изчисления.

Конформационно търсене

За да се изясни механизмът и енергетиката на реакцията е необходимо да се проверят всички възможни преходни структури и интермедиати принадлежащи на различните реакционни пътища, да се отсеят преходните структури с най-ниска енергия и съответно да се определи най-нискоенергетичният път. За да се осъществи тази задача при амонолизата на формилетандиол ние използвахме конформационно търсене, чрез което определихме най-нискоенергетичните пътища. Това търсене е базирано на следния алгоритъм (сСхема 2).

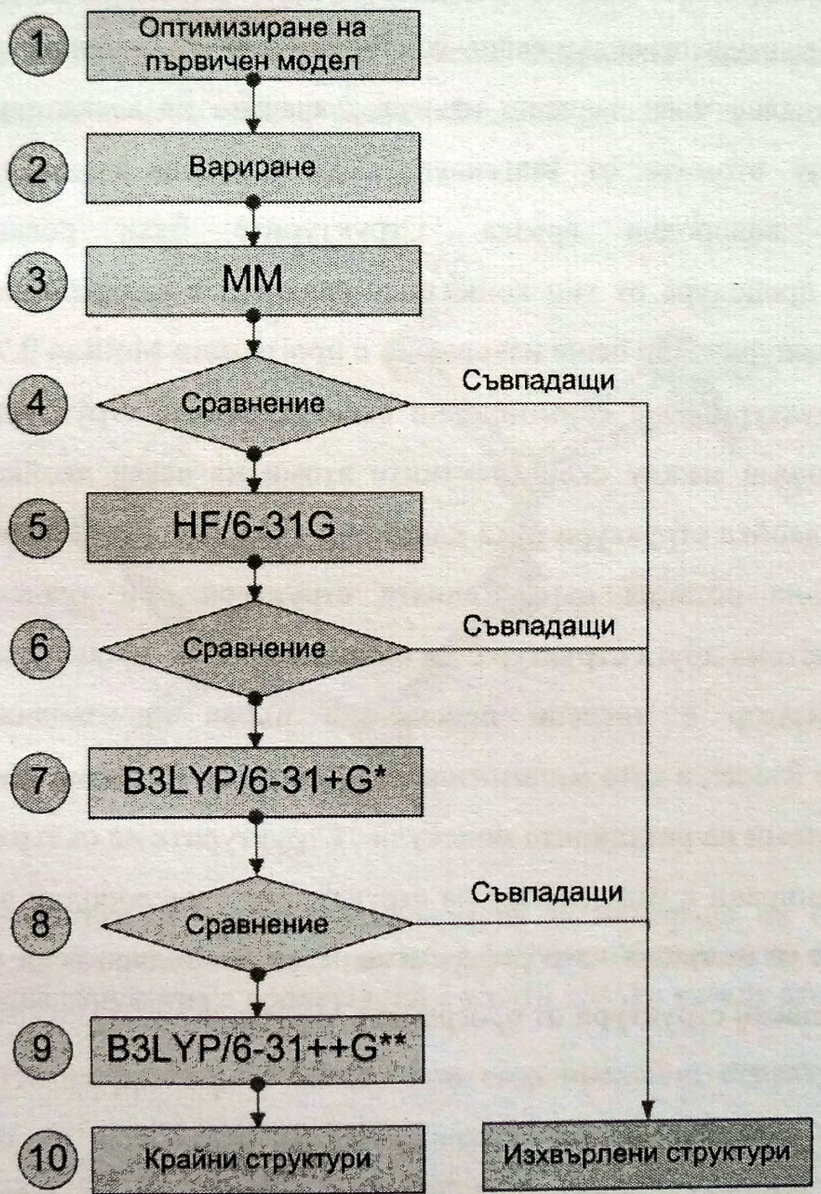


Схема 2. Алгоритъм използван за получаването на крайния набор структури при формилетандиолния модел

Първата стъпка в използвания алгоритъм е оптимизиране на структурите на напълно перипланарните конформации на интермедиатите и описаните в литературата четирицентрови преходни структури на ниво HF/6-31G за едностадийния и двустадийния механизъм. При втората стъпка бяха генерирани серии от модифицирани структури на получените в първата стъпка преходни структури и интермедиати чрез ротация през 10 градуса на диедричните ъгли N-C-Oe-C1 (само за **TS1** и интермедиата), C-Oe-C1-C2, Oe-C1-C2-Ov и C1-C2-Ov-Hv (използваната нотация е показана на Схема 3), които не участват в цикъла формиращ се при преноса на протон. По този начин бяха формирани 1000 първични структури за преходните състояния **TSc** и **TS2** и 10000 първични структури за **TS1** и интермедиата поради допълнителния ъгъл N-C-Oe-C1. Генерирането на тези структури беше извършено с включения в програмата MolRan0.7.1 модул за конформационно вариране. Получените структури бяха релаксирани с помощта на модифицирано ММ силово поле без оптимизация на атомите, участващи в цикъла формиращ се при преноса на протон. Тъй като интерес представляват структурите съдържащи водородни връзки в силовото поле беше добавен малък експоненциален член зависещ от изчисляваните на всяка стъпка при релаксацията разстояния между атомите от вициналната хидроксилна група и евентуалните други участници във водородна връзка. Структурите бяха релаксирани посредством оптимизационна процедура от тип конюгиран градиент с аналитични първи производни на полето. Тази процедура също беше извършена с програмата MolRan 0.7.1. От получените след релаксацията структури бяха елиминирани еквивалентните структури чрез изчисляване на RMS на разстоянията между еквивалентните атоми на всяка двойка структури. При тази процедура всяка двойка структури бяха наложени една върху друга чрез прилагането на една транслация и една ротация върху едната структура при транслирана в центъра на координатната система друга структура. За оптимизационна процедура беше използван квази нютонов оптимизатор с числено пресмятани първи производни чрез полиномиална екстраполация по Ridder, а като минимизираща функция е ползвано RMS разстоянието между еквивалентните атоми на различните молекули . Структурите не съдържащи водородна връзка също бяха елиминирани с изключение на структурите с кислородни атоми на диола в транс положение, които са ползвани като референтни. Тази процедура беше извършена с модула за премахване на еднакви структури от програмата MolRan 0.7.1.

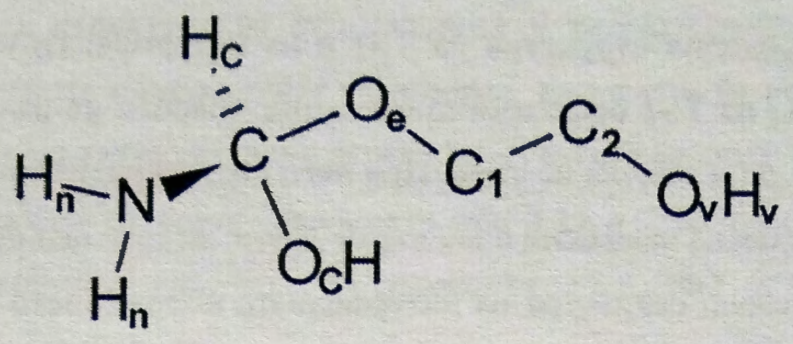
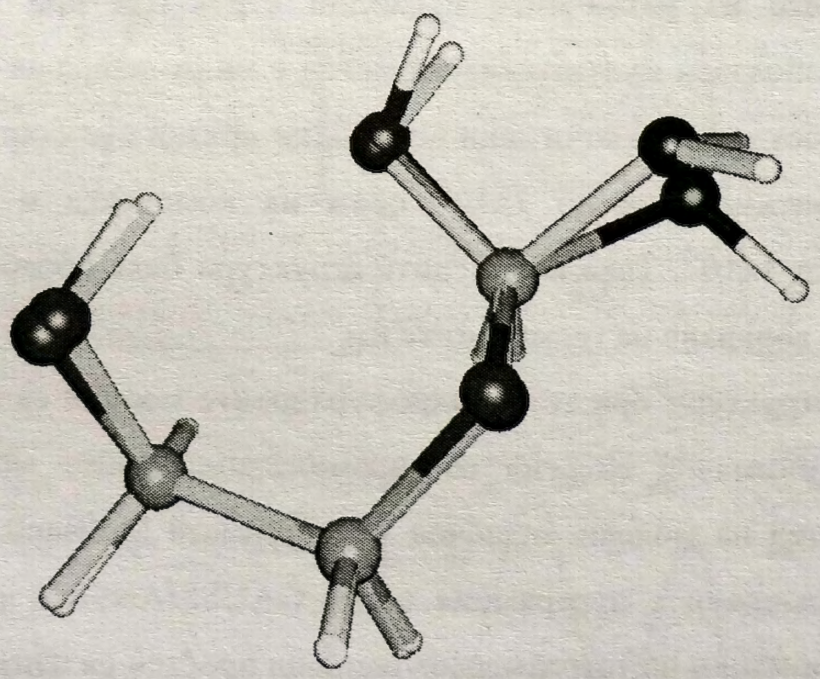


Схема 3 . Използвани означения представени при атомите на тетраедричния интермедиат

Останалите неидентични структури на интермедиатите и преходните структури бяха оптимизирани без ограничения в геометрията на ниво HF/6-31G с програмния пакет GAUSSIAN98W. Получените след тази оптимизация структури отново бяха подложени на сравнение една с друга по описаната по-горе процедура и идентичните структури отново бяха премахнати. Останалите крайни структури бяха оптимизирани с програмния пакет GAUSSIAN98W на ниво B3LYP/6-31+G*, а от получените след оптимизацията структури отново бяха премахнати идентичните. На получените преходни структури бяха пресметнати аналитичните матрици на силовите константи и беше направена геометрична проверка на компонентите на преходния вектор. Както беше обяснено по-горе, най-ниските по енергия структури бяха оптимизирани и на ниво B3LYP/6-31++G**.



Фигура 3. Графичен резултат от описаната процедура за намиране на геометрично най-близкия интермедиат до определена преходна структура (варираната по положение и преходен вектор преходна структура е представена с жълти връзки между атомите)

Поради сложността на преходния вектор при тези преходни структури и промяната атомите, върху които са основните му компоненти по протежение на реакционната координата, IRC търсене не може да стигне до стабилните структури, между които е разположена преходната структура. Поради това, за намиране на интермедиатите, до които

стигат различните преходни структури на **TS1** и на интермедиатите, от които се получават преходните структури на **TS2** беше използван метод подобен на използвания при отсяването на подобните структури и описан по-горе. При него структурите от всяка двойка интермедиат - преходна структура бяха наложени една върху друга. За тази цел при транслирана в центъра на координатната система структура на интермедиата положението на преходната структура беше варирано чрез прилагането на една транслация и една ротация върху преходната структура, а също така и самата преходна структура беше варирана чрез прилагане на преходния и вектор умножен по вариационен коефициент върху атомите и. За оптимизационна процедура отново беше използван квази-нютонов оптимизатор с числено пресмятани първи производни чрез полиномиална екстраполация по Ridder, а като минимизираща функция беше ползвано RMS разстоянието между еквивалентните атоми на различните молекули (Фигура 3. Тази процедура също беше извършена с програмата MolRan0.7.1.

При проверка на геометричната близост на структурите оптимизирани на B3LYP/6-31+G* и на B3LYP/6-31++G** се оказа, че те са много близки, както предрича и клъстерния анализ (Фигура 1) - RMS разликите в междуатомните разстояния на еквивалентни структури оптимизирани на тези две нива са около 0.025 Å.

За намирането на различните преходни структури при шестцентровите преходни състояния беше използван мултикомплекс метод с минимизираща функция от модифицирано ММ силово поле без членове отчитащи водородни връзки със стартов изстрел от $2^{N/5}$ начални структури и с оптимизация до $1x10^{-4}$ обем на комплекса и до вариация на обема в мултикомплекса от $1x10^{-3}$. Така получените структури бяха обработени по описания по-горе алгоритъм, но без вариране на геометриите им .

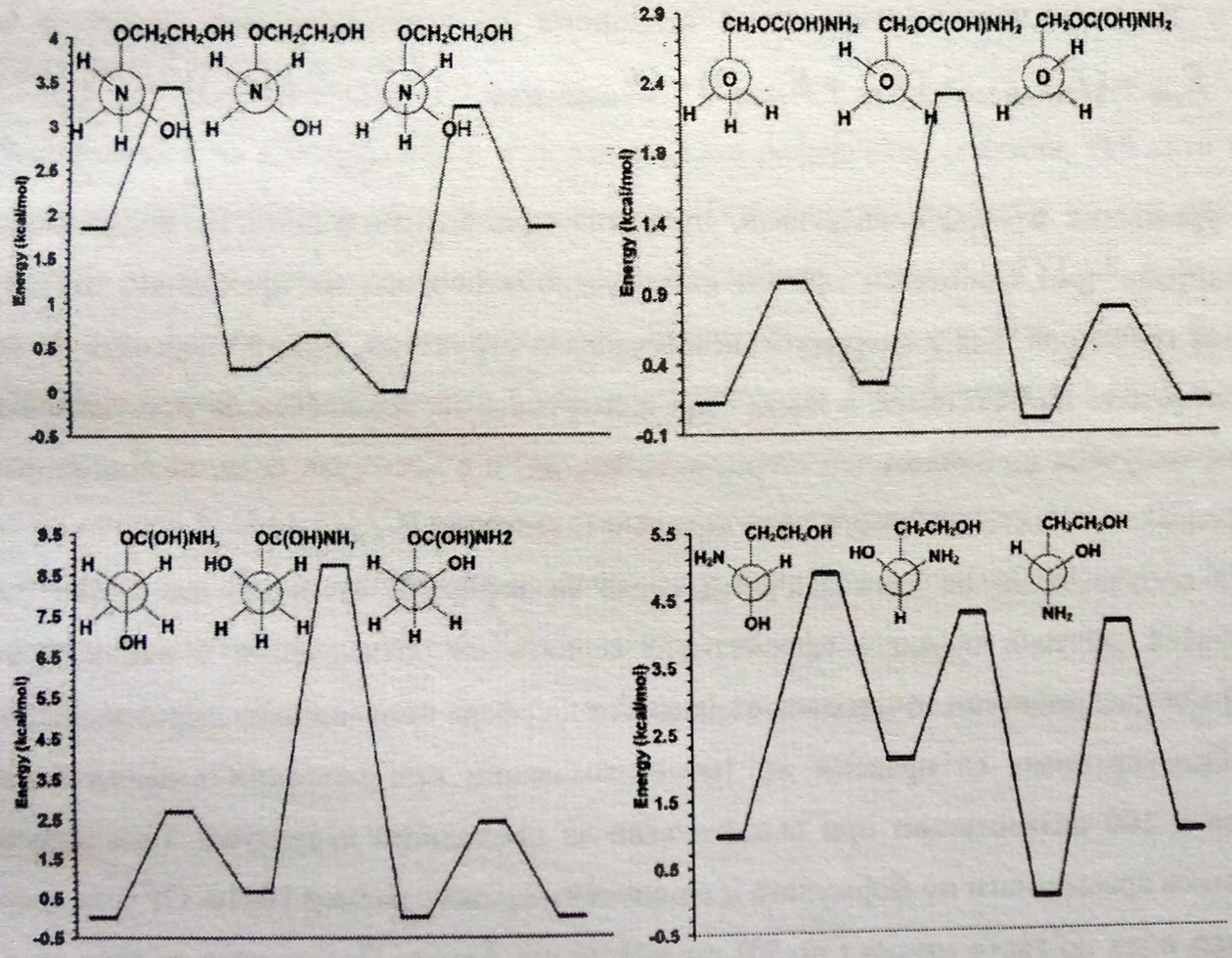
Изходните структури при тетрахидрофурановите модели са построени по аналогия със структурите с минимална енергия от формилетандиолните модели чрез използване на емпиричен строител на модели, включен в програмата MolRan0.7.1. Получените първични модели са оптимизирани с програмния пакет GAUSSIAN98W на ниво B3LYP/6-31+G*, а различните конформации на тетрахидрофурановия пръстен са направени като отражения през равнина на екзо и ендо атомите от първичните модели.

Крайните получени преходни структури са идентифицирани при намиране на една и само една отрицателна собствена стойност в матрицата на аналитичните силови константи и са потвърдени с геометричен анализ на компонентите на собствения вектор на тази собствена стойност, както и с IRC анализ във възможната за него дължина от реакционния път, както в посоката на реактантите, така и в посоката на продуктите.

Енергиите на всички структури за етандиолните и тетрахидрофурановите модели са пресметнати спрямо енергиите на изходните комплекси. Енергията на реакцията е изчислена като разлика между комплексите формирани между реактантите от една страна и комплексите формирани между продуктите от друга. Бариерите при **TS1** и **TSc** преходните състояния са пресметнати спрямо изходния комплекс, а бариерът при **TS2** е пресметнат спрямо геометрично най-близкия интермедиат.

Тестово изследване на ротационните бариери при интермедиатите

Ротационните бариери между конформациите на интермедиатите не са изчислявани, тъй като според много автори те са много по-ниски от бариерите, определени от преходните състояния, при които има разкъсване и образуване на връзки, и поради това ротационните бариери не влияят на реакционната кинетика. Все пак за да се провери дали това е в сила и в изследваните от нас системи, за интермедиата при амонолиза на формилетандиол са изчислени бариерите при ротация около четири диедрични ъгъла - около връзките N-C, Oc-C, C-Oe и C-C.(Фигура 4).



Фигура 4. Енергетичен профил (изчислен на ниво B3LYP/6-31+G*) за ротацията около различни диедрични ъгли в интермедиата показан на Схема 3 (a) ротация на амино групата (ъгъл Oe-C-N-Ha) (b) ротация на виционалната хидроксилна група (ъгъл C1-C2-Ov-Hv) (c) ротация около ъгъл Oe-C1-C2-Ov (d) ротация около N-C-Oe-C1

Както може да се очаква, най-високият бариер е при ротация около C1-C2 връзката в етандиолната част поради стеричното пречене между хидроксилните групи, когато те са в синперипланарна конформация. Въпреки че най-високият бариер в този случай е 8.7 kcal/mol, преходът между трите конформации на интермедиата при тази ротация може да бъде осъществен лесно през двата по-ниски ротационни бариера от около 2.6 kcal/mol (Фигура 4) долу в ляво). Най-ниските бариери по реакционния път на амонолиза на формилетандиол са над 20 kcal/mol и са значително по-високи от ротационните (Фигура 4).

Оценка на каталитичния ефект от допълнителна водородна връзка

Тъй като катализа представлява промяна на бариера на реакция, за да се установи каталитичния ефект на даден фактор е необходимо да се установи предизвикваната от него разликата между промяната на енергията в реактантите и промяната на енергията в преходните структури. Поради това за да се оцени каталитичния потенциал на водородна връзка е изчислена разликата във енергията на взаимодействието на акцептора на протон и водна молекула като протонодонор по следната формула

$$E_{cat} = (E_{TS+H2O} - (E_{TS} + E_{H2O})) - (E_{initial+H2O} - (E_{initial} + E_{H2O})) \qquad (1)$$

В това уравнение E_{TS+H2O} е енергията, получена при оптимизацията на водна молекула, позиционирана чрез единия си протон към протоноакцептора на преходната структура с фиксирана геометрия. E_{TS} е енергията на преходната структура, E_{H2O} е енергията на водата, $E_{initial}$ е енергията на реактанта, а $E_{initial + H2O}$ е енергията на комплекса на реактанта с водна молекула, получена по аналогичен начин като E_{TS+H2O} и с молекула вода, позиционирана по същия начин със същите стойности на ъглите A и D като при E_{TS+H2O}.

За получаването на каталитичната карта са варирани стъпково два ъгъла (единия диедричен) и по този начин е пресметната серията от оптимизации с водни молекули ориентирани към различни точки от повърхността на сфера описана около протоноакцептора. За подобно картиране са правени по 100 оптимизации при различни ъгли за началната структура и 100 оптимизации при същите ъгли за преходната структура. Така получените стойности са пресметнати по формулата и е получена мрежа с размер 10x10. От тези енергии е формирана нова по-гъста мрежа (50x50) по метода на Akima. Получените от тази тримерна интерполация стойности след NURBS интерполация са използвани за директно представяне в графичен вид или за създаването на цветова карта, начертана върху изчисляваната част от сферата.

4. Използвани модели

4.1 Ацетилкатехолен и ацетилфенолен модели

На схема 4 е представен реакционният механизъм на амонолиза на ацетилфенол, като за амонолизата на ацетилфенол, ацетилкатехол и аниона на ацетилкатехола са разгледани едностадиен и двустадиен механизъм за протичане на реакцията.

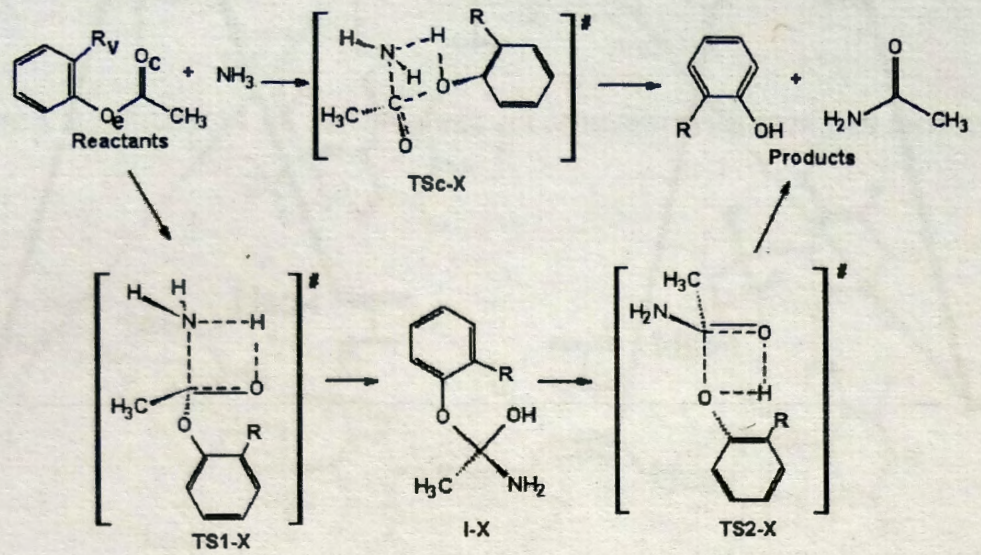
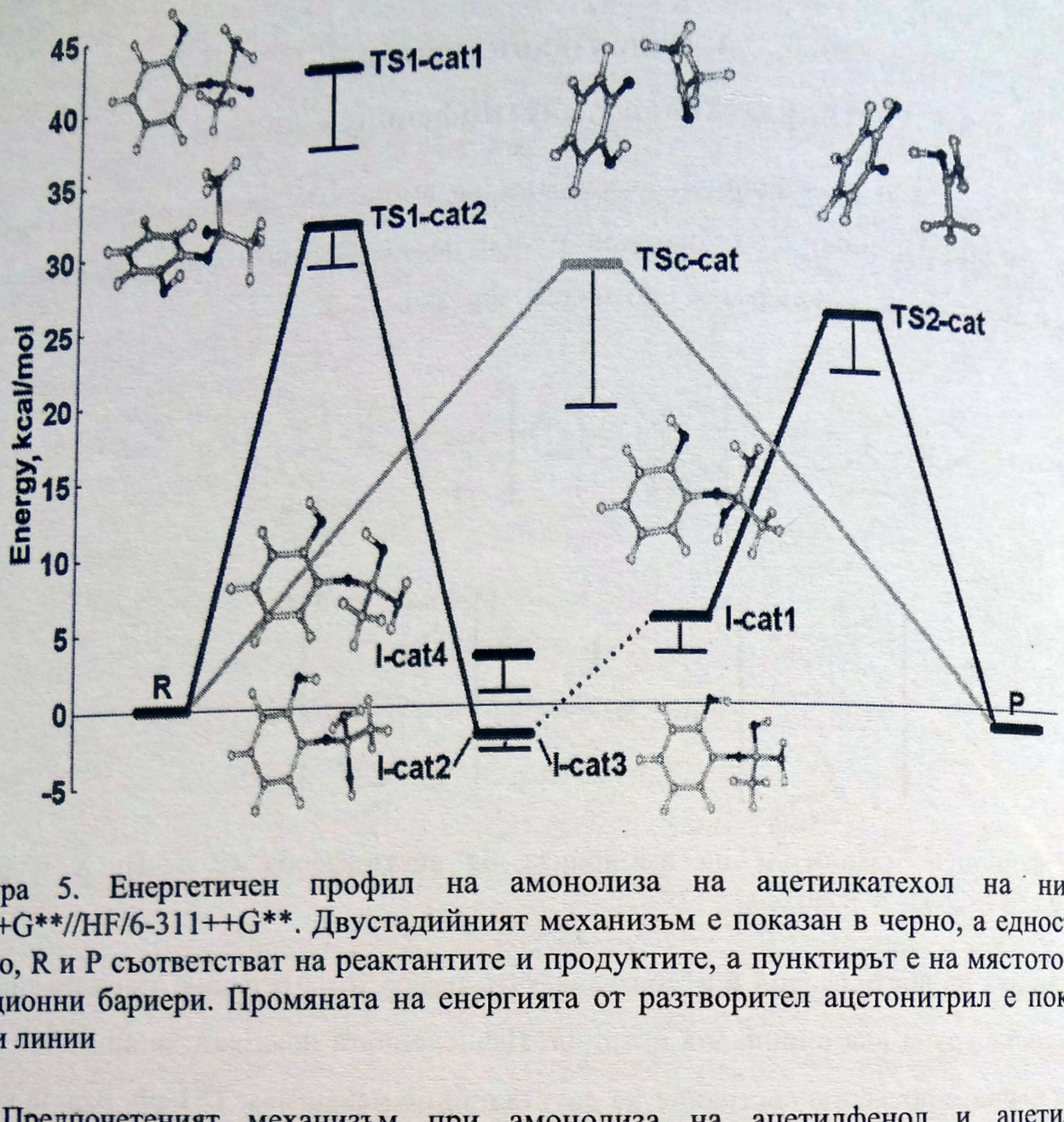


Схема 4. Реакционен механизъм на амонолиза на ацетилфенол (R = H; X = ph) и ацетилкатехол (R = OvH, X = cat)

Амонолизата на ацетилфенол е използвана като референтна реакция, тъй като при нея няма хидроксилна група във вицинална позиция. Изчисленията показват, че при преходната структура на първото преходно състояние на двустадийния механизъм **TS1-ph**, новата връзка N-C е почти формирана, а карбонилният въглерод е с геометрия много близка до тетраедричната, като бившата връзка $C=O_c$ е удължена до 1.32 Å спрямо 1.18 Å в реагента ацетилфенол. В тази структура протонният пренос е затруднен от сравнително малкия ъгъл на пренос на протон $N\text{-}H\text{-}O_c$ (115°), докато оптималният ъгъл е в интервала 160° - 180. Четирите атома, участващи в образуващите се и разкъсващите се връзки в тази структура (C_c, N, O_c, и H от амоняка) са почти копланарни. Карбонилният въглероден атом е извън равнината на ароматния пръстен, (64°), което възпрепятства **π**-спрежението на реакционния център с бензеновото ядро



Фигура 5. Енергетичен профил на амонолиза на ацетилкатехол на ниво MP2/6-311++G**//HF/6-311++G**. Двустадийният механизъм е показан в черно, а едностадиинят - в сиво, R и P съответстват на реактантите и продуктите, а пунктирът е на мястото където има ротационни бариери. Промяната на енергията от разтворител ацетонитрил е показана с по-тънки линии

Предпочетеният механизъм при амонолиза на ацетилфенол и ацетилкатехол е едностадийният с реакционни бариери съответно 30.2 и 28.0 kcal/mol изчислени на ниво MP2/6-311++G**//HF/6-311++G**. Наличието на о-ОН група при ацетилкатехола слабо стабилизира, с 4.4 (4.1) kcal/mol, първото преходно състояние на двустадийния механизъм **TS1-cat** в сравнение с **TS1-ph**. Стабилизацията на преходната структура при едностадийния механизъм **TSc-cat** е два пъти по-слаба, с 2.2 (2.0) kcal/mol, а стабилизацията на **TS1-cat2** спрямо изомерната структура на това преходно състояние **TS1-cat1** е 10.6 (10.2) kcal/mol. Това може да се отдаде на типа водородни връзки защото при интермедиатите **I-cat1** и **I-cat3** същите водородни връзки водят до подобна промяна в енергията.

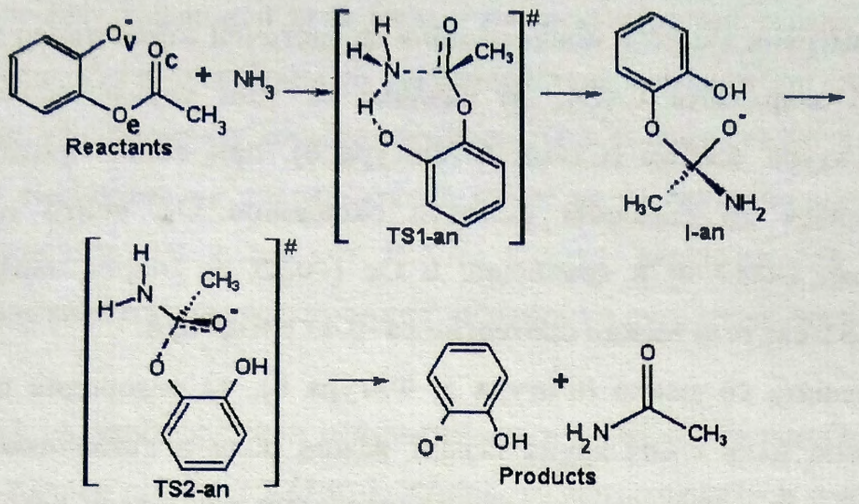
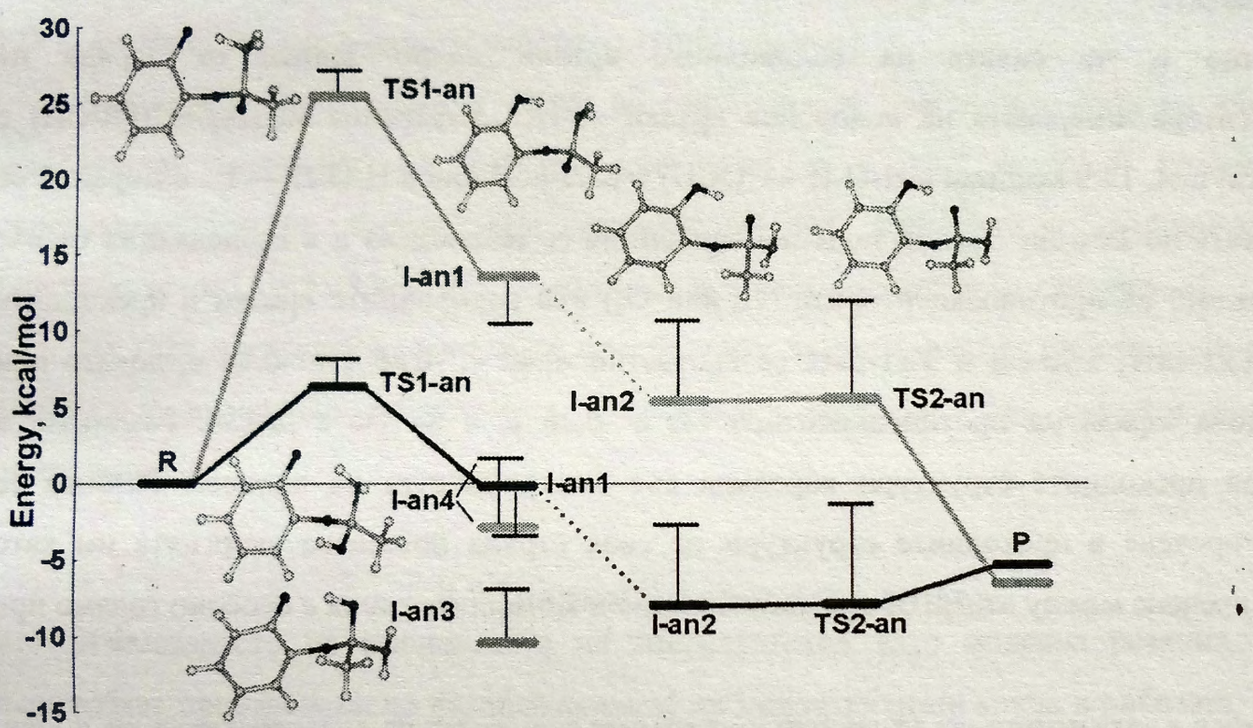


Схема 5 . Реакционен механизъм на амонолиза на моноацетилкатехол анион



Фигура 6. Енергетичен профил на амонолиза на ацетилкатехолмоноанион на нива MP2/6-311++G**//HF/6-311++G** (в черно) и HF/6-311++G** (в сиво), R и P съответстват на реактантите и продуктите, а пунктирът е на мястото, където има ротационни бариери. Промяната на енергията от разтворител ацетонитрил е показана с по-тънки линии

Както може да се очаква, поради наличието на депротонирана хидроксилна група на вицинална (орто) позиция спрямо реакционния център, намерените структури на преходните състояния и интермедиатите при амонолизата на ацетилкатехол моноанион се различават значително от тези при ацетилфенола и ацетилкатехола. Както е известно, о-ОН групата е по-слаб протоноакцептор от карбонилния кислороден атом Ос и не може да откъсне протон от амоняка при атаката му само при повишаващата се по време на атаката киселинност на протоните при азотния атом. В случая на депротонирана о-ОН обаче (о-оксианион) преходни структури с протонен пренос към карбонилния кислороден атом Ос подобни на **TS1-ph** и

TS1-cat не са намерени въпреки повишаващия се частичен отрицателен заряд при Oc поради разкъсването на π-връзката C=Oc. За разлика от тези случаи обаче, тук бе намерена преходната структура **TS1-an** (Схема 5 ,Фигура 6), при която протон от молекулата на амоняка се пренася до съседния фенолен оксианион O_v, който има много по-голям отрицателен заряд (-0.47 e) в сравнение с Oc (–0.25 e) според зарядите по Löwdin. За сравнение при **TS1-cat** тези заряди съответно са -0.43 e и -0.48 e.

От изчисленията се вижда (Фигура 5, Фигура 6), че водородни връзки със съседната депротонирана или цяла o-OH група играят важна роля в стабилизацията на преходните структури и интермедиатите. Тези вътрешномолекулни водородни връзки обаче могат да са каталитично значими само ако са по-силни в преходните структури в сравнение с реактантите и интермедиатите.

Известно е, че силата на водородните връзки силно зависи от заряда на протоноакцептора. Енергията на водородна връзка -O-H…..неутрална молекула (Ph-OH) е около 5.5 kcal/mol, 19.9 kcal/mol в H-O-H --- $^-OCH_3$ и 23.3 kcal/mol в H-O-H --- F^-. Базирайки се на изчислените по Löwdin заряди подобна тенденция се наблюдава и в изследвания от нас случай. Зарядите на протоноакцепторите (O_e или O_c) във водородните връзки в преходните структури **TS1-cat1, TSc-cat** и **TS1-cat2** са съответно -0.43 e, -0.55 e и -0.44 e, докато при ацетилкатехола заряда на протоноакцептора Oc е -0.26 e, а на Oe е -0.134. Разликата в зарядите при преходните структури корелира със синхронността на процеса. Разбира се стеричното пречене в преходните структури от своя страна повишава енергията им като стеричното пречене между атоми от ароматното ядро и метилната група е особено голямо при **TS1-cat1**.

Най-силен е каталитичният ефект при преходните структури на ацетилкатехолния анион, където най-силната водородна връзка е формирана благодарение на отрицателния заряд на протоноакцепторния кислороден атом. За разлика от случаите на амонолиза на ацетилфенол и ацетилкатехол, при ацетилкатехол моноанионът е предпочетен вариант на двустадийния механизъм. Енергията на преходната структура в скоростопределящия етап на анионния механизъм **TS1-an** е по-ниска от енергиите на преходните структури от първите преходни състояния на стадийните механизми при ацетилфенол **TS1-ph** и ацетилкатехол **TS1-cat2** съответно с 29.3 (31.5) и 24.9 (27.4) kcal/mol.

От резултатите може да се заключи, че влиянието на o-OH през ароматното ядро върху реакционния център може да се пренебрегне, тъй като всички намерени преходни структури са късни по отношение на тетраедризирането на карбонилния въглерод (геометрията му е близка до sp^3). Това до голяма степен изключва конюгация с π-електроните от ароматното

ядро. Освен това големият торзионен ъгъл между равнината на ароматния пръстен и C-O_c връзката също възпрепятства π-електронното взаимодействие с ароматната система.

Поради това, че влиянието на ароматното ядро не е голямо, резултатите получени с моделната система - амонолиза на ацетилкатехол могат да се екстраполират като вероятен механизъм при аминолиза на пептидил tRNA, където амонолизната реакция ще е подпомогната от вициналната на реакционния център хидроксилна група от 3'-крайния аденозин.

При амонолизата на ацетилкатехол нейонизираната о-ОН група понижава енергията на скоростопределящия бариер само с 2.2 (2.0) kcal/mol, но йонизирането и води до драматично ускоряване на реакцията и смяна на реакционния механизъм. В този случай енергията на скоростопределящия бариер намалява с 21.7 (21.2) kcal/mol спрямо нейонизирана о-ОН и 23.9 (23.2) kcal/mol спрямо о-деокси субстрата (ацетилфенол).

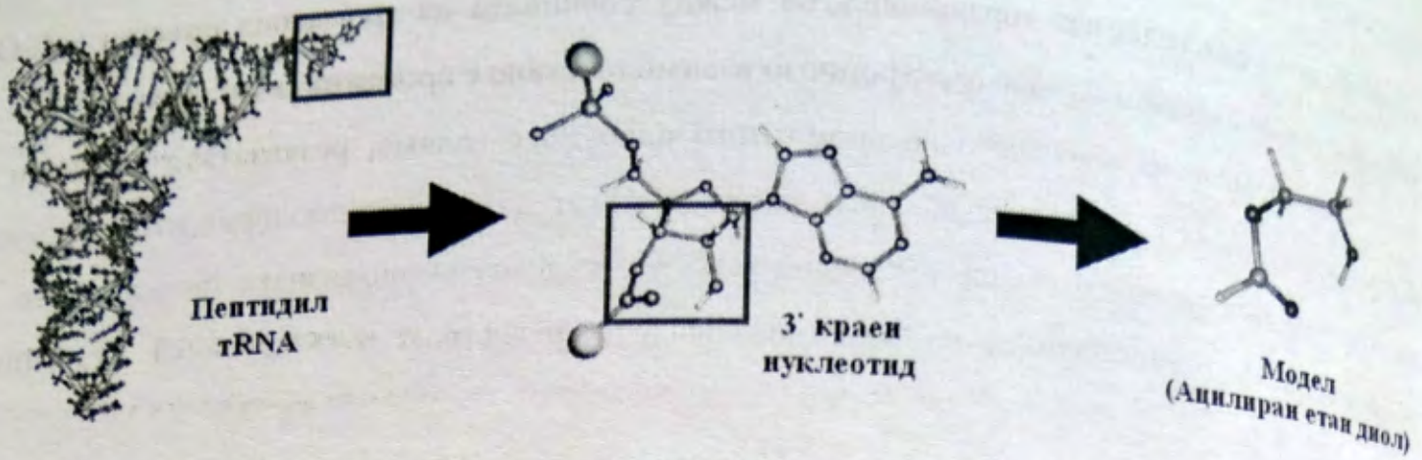
Въпреки неблагоприятния ефект на разтворителя при амонолизата на ацетилкатехол моноаниона енергията на бариера при него е с 10.2 kcal/mol по-ниска спрямо скоростопределящия бариер при амонолизата на субстрата с нейонизирана о-ОН (ацетилкатехол) и с 11.3 kcal/mol по-ниска от о-деокси субстрата (ацетилфенол).

От тези изчисления може да се предположи, че оптималният рибозомален каталитичен механизъм включващ вициналната хидроксилна група изисква нейното предварително депротониране.

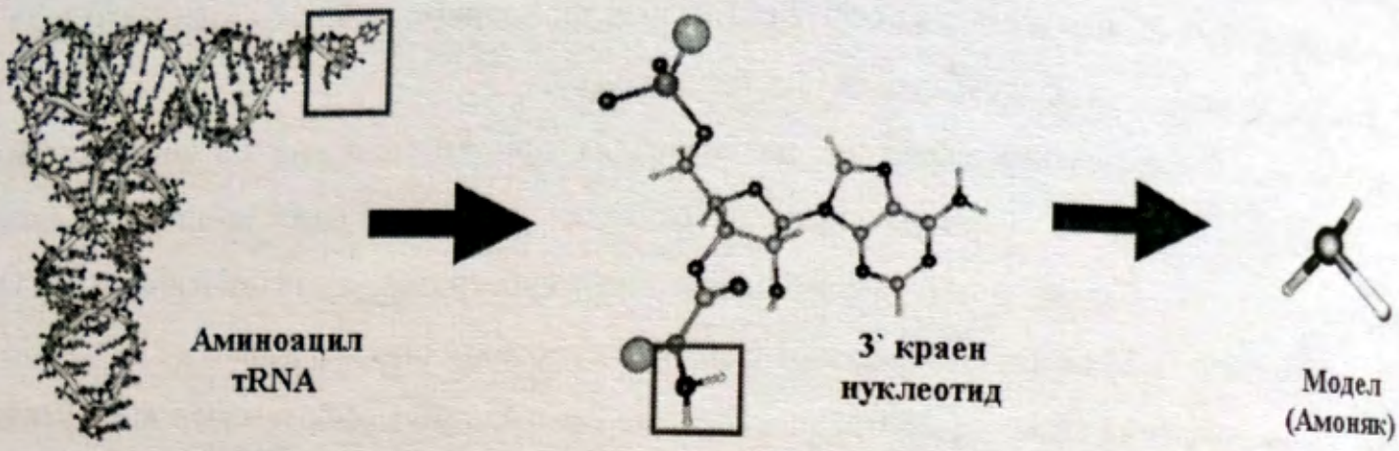
4.2 **Формилетандиолен модел**

Използването на амонолизата на ацетилкатехол като моделна реакция, въпреки че наподобява пространствено разположението на хидроксилната група в рибозата, поставя под въпрос влиянието на по-голямата конформационна твърдост на хидроксилните групи при предходния модел при пренасянето на заключенията от модела към рибозомата. За да избегнем този проблем, ние изследвахме и друга моделна реакция.

Новата моделна реакция отново наподобява реакцията между 3' крайните нуклеотиди на транспортните РНК-и при срещата им във вътрешността на рибозомата. При формирането на модела на субстрата формално сме "изрязали" фрагмента от пептидил тРНК ограден в червено в средата на Фигура 7. Този фрагмент съдържа най-близо разположената до реакционния център функционална група (ОН), а за формирането на модела на реагента сме опростили атакуващата аминогрупа на 3' крайния аминоацилиран нуклеозид до амоняк, поради това че около него няма близко разположени функционални групи (ограден в червено в средата на Фигура 8.



Фигура 7. Опростяване на субстрата до модел. В средната фигура останалата част от tRNA е представена със зелено а останалата част от полипептида в жълто



Фигура 8. Опростяване на реагента до модел. В средната фигура останалата част от tRNA е представена със зелено а останалата част от аминокиселината в синьо

Нашето изследване за възможни преходни структури и интермедиати при наличие на хидроксилна група разположена вицинално спрямо атомите от реакционния център при амонолизата на моноацилиран етандиол показа два варианта за участието на ОН групата в аминолизния процес. Първият вариант е чрез стабилизация на преходните структури и интермедиатите чрез формиране на вътрешномолекулни водородни връзки по време на реакцията подобно на ацетилкатехолния модел, описан в секция 4.1. В този случай реакционният път и топологията на преходните структури не е променена спрямо реакцията на субстрат без вицинална хидроксилна група - преходните структури остават четирицентрови. Това вътрешномолекулно влияние на вициналната ОН група е подобно на наблюдаваното при моноацилиран катехол. Комбинаториалното търсене на стационарни точки по протежение на реакционните пътища път в присъствие на вицинална хидроксилна група доведе до намирането на втори тип участие на тази група в аминолизния процес. В преходните структури от този тип ОН групата участва пряко в преноса на протон, приемайки протон от протонодонор и отдавайки своя протон на протоноакцептор. За разлика от предишния вариант за участие на вициналната ОН група, при този, преходните структури се трансформират в шестчленни (хексагонални) поради участието на Ov и Hv атомите в

реакционния център. И при двата типа катализ от вицинална хидроксилна група интермедиатите, формирани при двустадийния механизъм са еднакви. Очевидно подобен тип преходни структури са невъзможни при липса на вицинална хидроксилна група, но могат да се образуват при добавяне на протонодонорни/акцепторни молекули (като вода, амоняк, амин, алкохол и други), които в този случай ще са катализатори.

Както и в случая с катехол, и тук са изследвани реакционният механизъм и енергетиката на реакцията и при депротонирана вицинална хидроксилна група

Механизми TS[4]

Аминолизна реакция през 4-центрови преходни структури

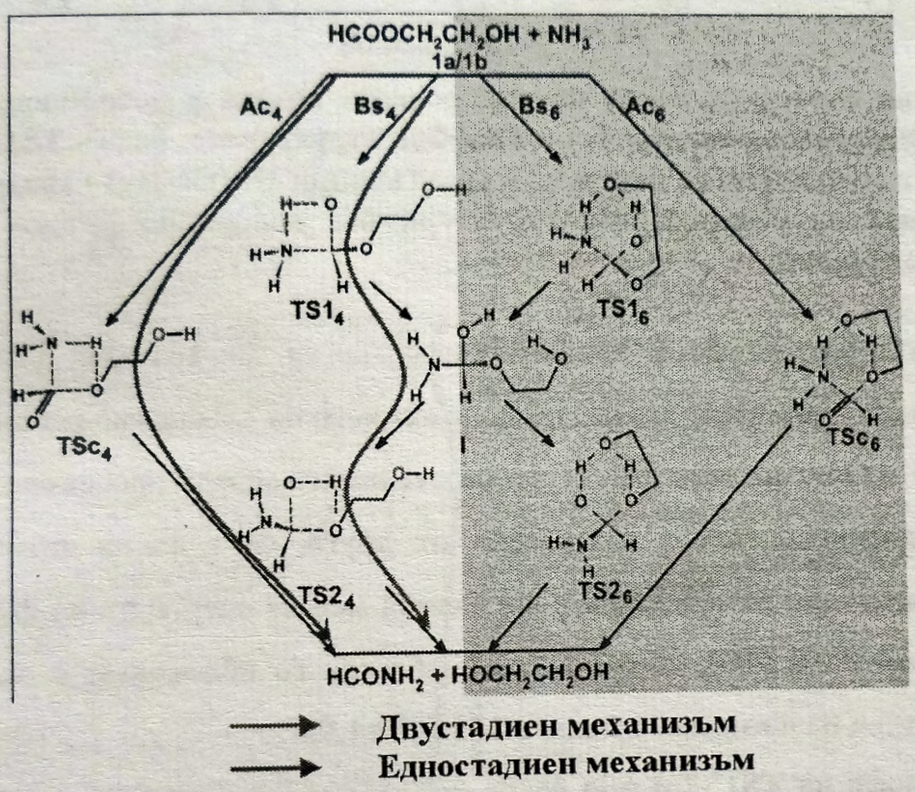
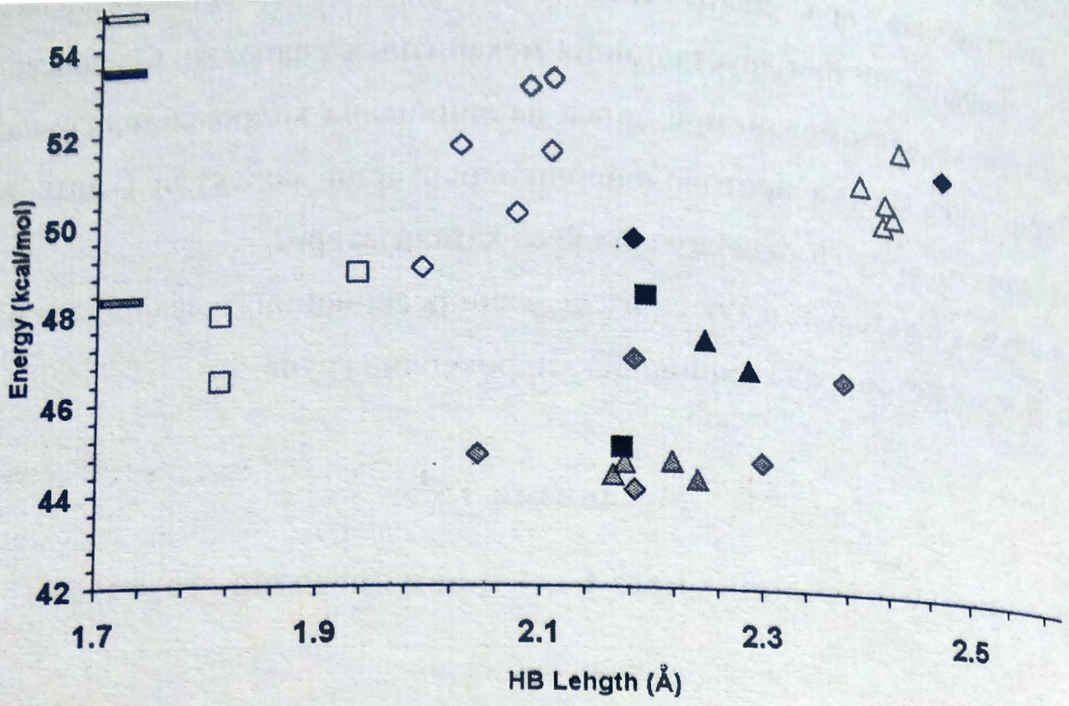


Схема 6. Реакционни механизми през 4-центрови преходни структури при амонолиза на формилетандиол. Не разглежданите тук преходни структури са в сиво



Фигура 9. Енергия спрямо дължина на водородната връзка в четирицентровите преходни структури. Черните символи отговарят на **TSc^4-2ol** структурите; бели - **TS1^4-2ol**; сиви - **TS2^4-2ol**. Структурите с HB(Oe-Hv) са показани с триъгълници HB(Oc-Hv) - квадрати; HB(Ov-Ha) - ромбове. Енергията на референтните структури без водородни връзки е показана като правоъгълници до ординатата

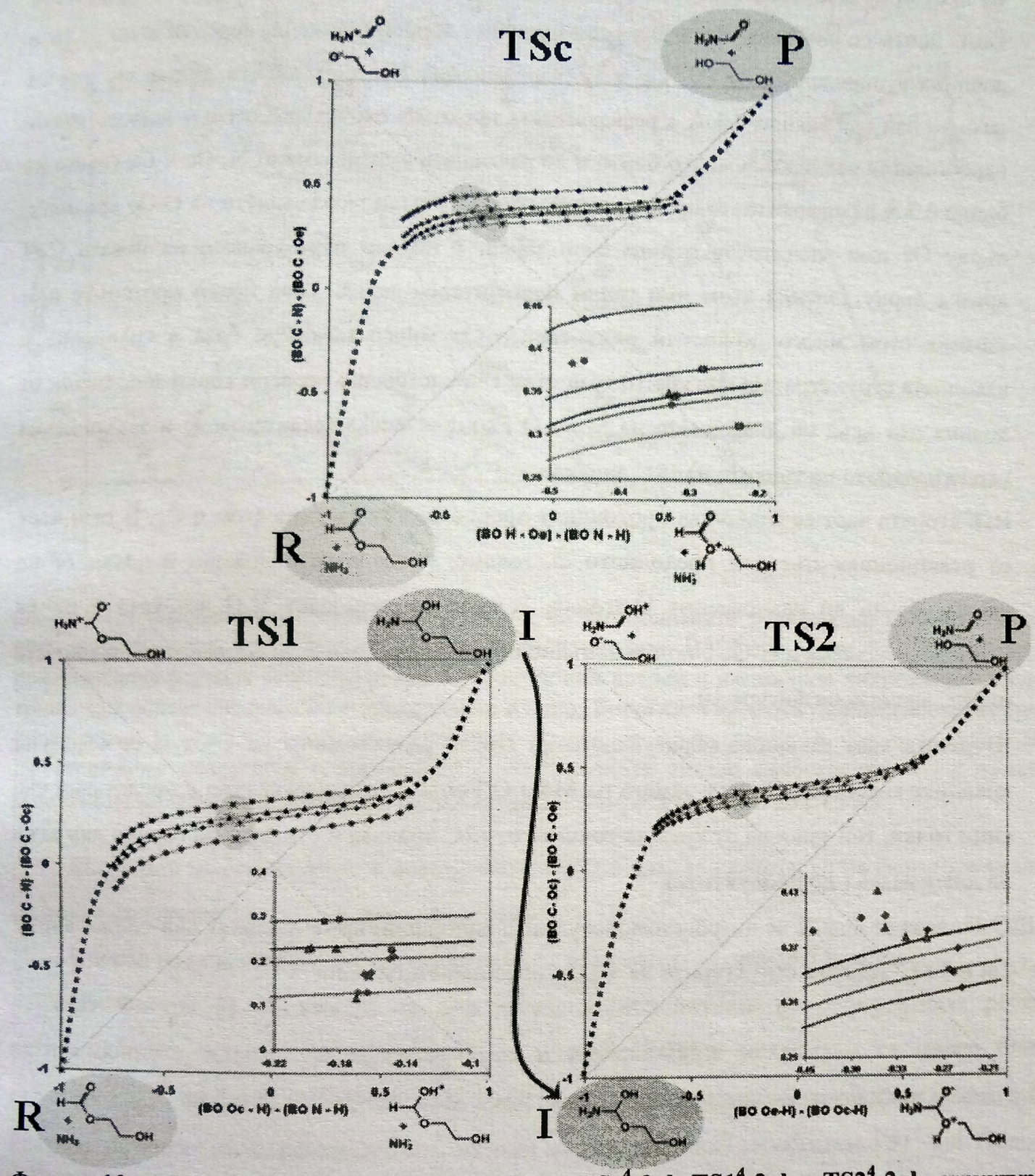
Представените на Фигура 9 двойки конформации на **TSc^4-2ol**, съдържащи еднакви водородни връзки, се различават главно по положението на C2 спрямо равнината, дефинирана от атомите Oe, C1 и Ov. При тези структури разстоянията между протонодонора и протона от една страна и протоноакцептора и протона от друга, са в тясна антибатна зависимост R^2=0.9857. Същевременно се забелязва и корелация между енергията на структурата и ъгъла на протонен пренос R^2=0.9444, като по-големите ъгли го облекчават с около 2 kcal/mol за градус. Средният ъгъл на протонен пренос е 125.61° ±1.95°.

При структурите на **TS1^4-2ol** има слаба корелация между ъгъла на протонен пренос и разстоянието между преместванията протон и протоноакцептора R^2 = 0.8496, като по-малките разстояния са свързани с по-голям ъгъл. Трябва да се отбележи, че тук ъгълът на протонен пренос варира много малко, средно той е 112.87°, като всички ъгли лежат в диапазона ±1.23° около него. Средно енергията им е 51.40 kcal/mol, което е с 3.34 kcal/mol по-ниско от референтната структура.

При **TS2^4-2ol** средният ъгъл на протонен трансфер е 129.50°, като всички ъгли са в интервала от –1.65 до +1.95 около средния ъгъл. Този ъгъл тук е най-голям от трите типа преходни структури и вероятно това е една от причините тези преходни структури да са с най-ниска енергия.

Редът на нарастване на средните стойности на ъгъла на протонен трансфер при различните типове преходни структури съвпада с реда на намаляване на средната енергия на

тези преходни структури. При всички преходни структури атомите участващи в образуването и късането на връзки са разположени планарно.

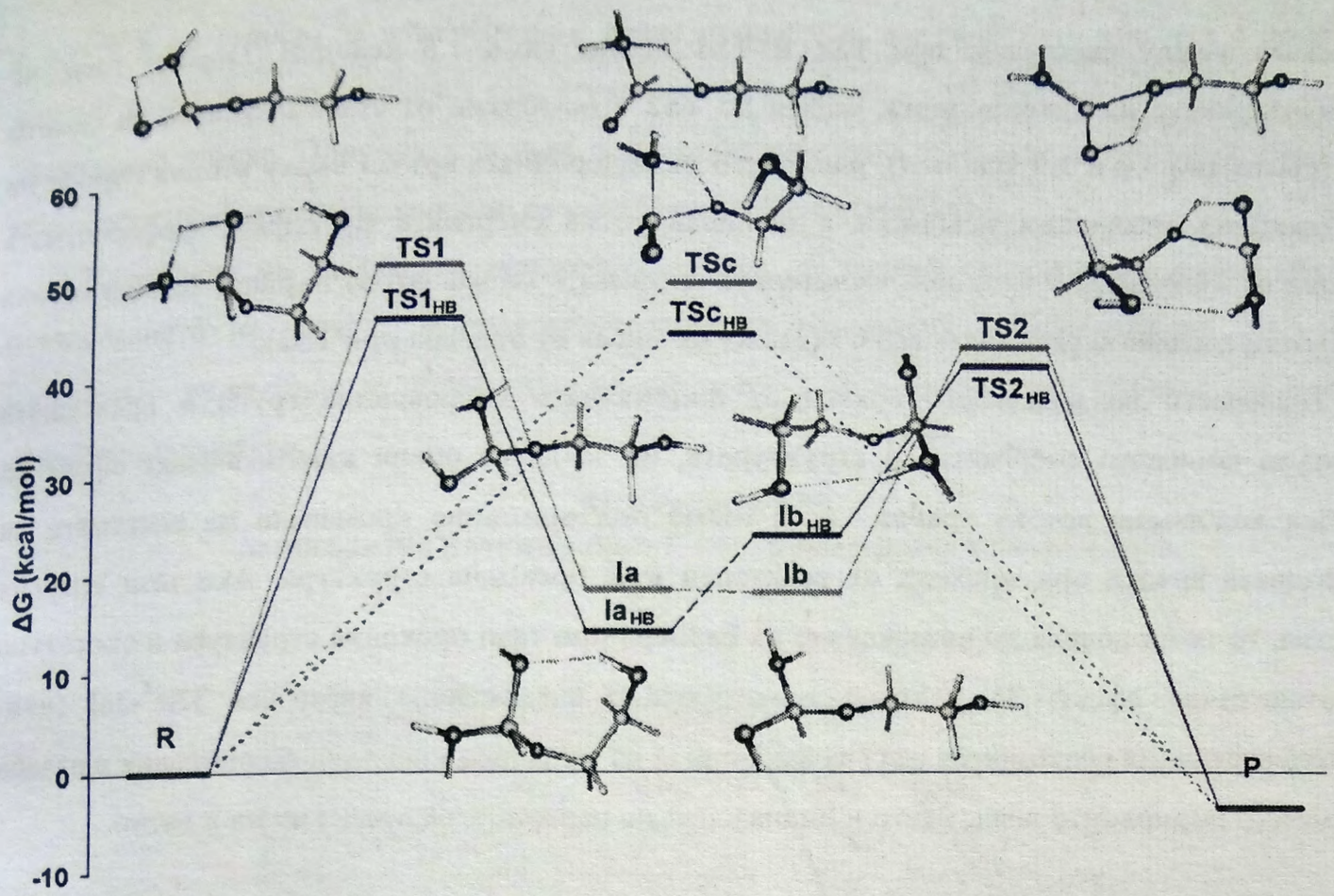


Фигура 10. More O'Ferral – Jencks диаграма за **TSc[4]-2ol, TS1[4]-2ol** и **TS2[4]-2ol** структурите (B3LYP/6-31+G*). В малката фигура структурите без водородна връзка са представени с кръгчета; структурите с HB(Oe-Hv) - с триъгълници; HB(Oc-Hv) - с квадрати; HB(Hn-Ov) - с ромбове. В голямата фигура преходните структури са представени със звездички; структурите от IRC със съответните символи от малката фигура.

От точките на IRC се вижда, че атаката на амоняка към карбонилната група грубо може да се раздели на 3 части:

- В първата част от атаката на азотния атом към карбонилния въглероден атом пре
на протон практически не е започнал. Новата връзка C-N почти се образува и вр
Oe-C почти се разкъсва. В началото на тази част карбонилният въглероден атом ле
равнината определена от Oe, Oc и H (карбонилния H атом), докато в края му т
намира над нея (около 0.3 Å в референтната преходна структура), като в същото в
карбонилния въглерод е много близо и до равнината определена от N, Oc и Oe (съш
около 0.3 Å в референтната преходна структура). Поради разкъсването на C-Oe връз
върху Oe има значителен отрицателен заряд, а поради образуването на новата
връзка върху азотния атом има голям положителен заряд. Това прави протоните
азотния атом много по-кисели и съответно Oe много по-добра база в сравнени
изходната структура. На фигура 10 този етап е представен с червени точки започващ
долния ляв ъгъл на диаграмата на More O'Ferral – Jencks (реактантите) и завършв
около началото на точките на IRC анализа.
- Във втората част се извършва протонният пренос между азотния атом и Oe. В тази
от реакционния път е и преходното състояние, което е разположено в началото
частта, близо до равновесния диагонал. В края на тази част N-H връзката е по
напълно разкъсана и H-Oe е почти напълно образувана. Този етап е представен с точк
от IRC анализа на фигура 10
- В третата част завършва образуването на N-C и разкъсването на C-Oe и се образ
крайният комплекс. На диаграмата на More O'Ferral – Jencks този етап е представен
сини точки, той започва от края на точките от IRC анализа и стига до до горния ляв ъ
на диаграмата (до продуктите).

От IRC анализа се вижда че вътрешномолекулните водородни връзки влияят най-силно вър
TSc^4-2ol и **TS1^4-2ol** като структурите на **TS1^4-2ol** са най-синхронни



Фигура 11. Енергетичен профил и структури на амонолизната реакция на формилетандиол при тетрагонални преходни структури изчислени при B3LYP/6-31++G**. Енергията на референтната реакция (със структури без водородни връзки и вицинална хидроксилна група в транс положение спрямо Oe) е представена в сиво. Енергията на най-стабилните структури на преходните състояния - тези с водородна връзка са представени в черно (суфикс HB). Двустадийния механизъм е представен с непрекъсната линия; едностадийния - с пунктир. Местата на ротационните бариери са представени с тирета (ΔG при 298.15 K)

Енергията на структурите е пресметната спрямо изходен комплекс на формилетандиола с амоняк съдържащ две водородни връзки (Hn-Oc и Hv-N).

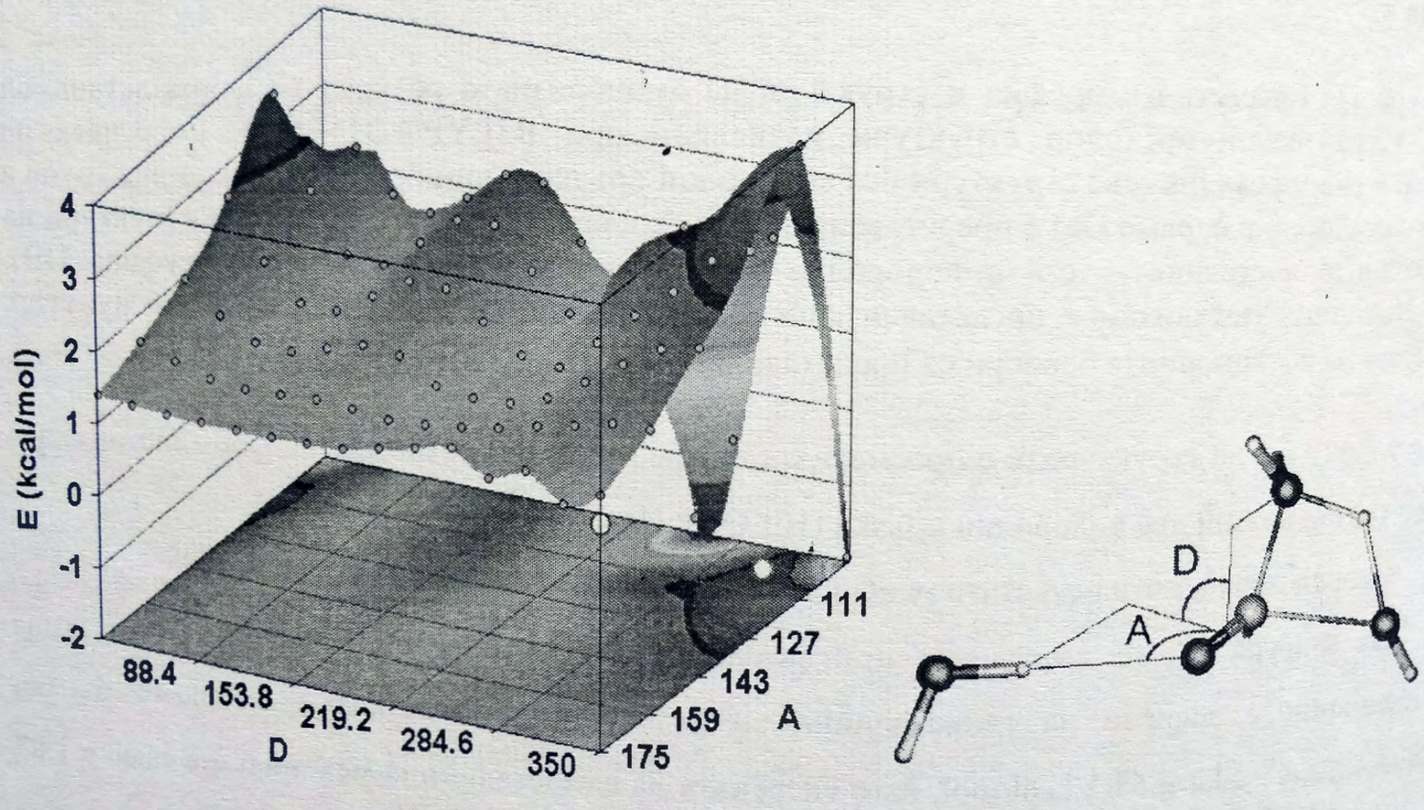
Според получените резултати реакцията е слабо екзергонична (3.7 kcal/mol).

От Фигура 11 се вижда, че при реакционните пътища на референтната реакция активационните енергии на едностадийния и двустадийния механизъм са много близки съответно $\Delta G^{\#}$, 49.4 и 51.3 kcal/mol, като енергията на едностадийния механизъм е само с 1.87 kcal/mol по-ниска от скоростопределящия етап на двустадийния механизъм **TS1^{4}-2ol**. Подобна предпочетеност на едностадийния механизъм като при референтната амонолизна реакция е намерена и при амонолизата на ацетилфенол и катехол, но при тях разликата между енергиите на **TSc-cat** и **TS1-cat** е по-голяма (5.4 kcal/mol при ацетилфенол и 3.2 kcal/mol за ацетилкатехол при изчисления на ниво MP2/6-311++G**//HF/6-311++G**).

Формирането на водородни връзки с вициналната хидроксилна група стабилизира структурите на преходните състояния **TSc** и **TS1** съответно с 5.1 и 5.5 kcal/mol, или свободната енергия на активиране на реакцията се редуцира до ΔG# = 44.3 kcal/mol, като

разликата между бариерите при **TSc** и **TS1** остава само 1.6 kcal/mol. Поради това, че стабилизирането на интермедиата, водещ до **TS2** е по-голямо от стабилизацията на самото **TS2** (съответно 4.0 и 1.9 kcal/mol), влиянието на водородната връзка върху втория бариер на двустадийния механизъм всъщност е повишаване на енергията му спрямо референтната реакция от 24.9 до 27.0 kcal/mol. Отчетената промяна е малка затова първият бариер остава скоростопределящ за реакцията (28.6 kcal/mol по-висок от бариера при **TS2**).

Наличието на водородни връзки от вициналната хидроксилна група в преходната структура понижава енергията на структурата, но за да се оцени каталитичният ефект на подобна водородна връзка трябва да се вземе под внимание промяната на енергията на водородната връзка при прехода от реактанти към преходна структура. Ако тази енергия нараства, то тя би довела до понижаване на бариера при тази преходна структура и съответно до каталитичен ефект. За целта е конструирана каталитична карта на **TSc^4-2ol** (най-нискоенергетичния реакционен път) за амонолиза на мравчена киселина по описания в раздел 3.1.5 метод. Варираните ъгли, както и диапазонът на вариране, са представени в дясно.



Фигура 12. Каталитична карта на **TS1**при амонолиза на мравчена киселина на ниво HF/6-31G* Положението на вициналната хидроксилна група в структурите на аналогичното преходно състояние при амонолиза на формилетандиол с водородна връзка от типа Oc-Hv са нанесени като бели точки

От каталитичната карта на първата преходна структура от двустадийния процес при амонолизата на мравчена киселина се вижда, че каталитичен ефект от водородна връзка при тази преходна структура максимално може да бъде около 4 kcal/mol. Преходната структура при съгласуваното преходно състояние с минимална енергия на формиетандилната амонолиза

е почти в оптимално за каталитичния ефект положение, но енергията при нея е понижена спрямо референтната преходна структура със 7.22 kcal/mol (ΔE B3LYP/6-31++G**) което е значително повече. Причината за това повишение вероятно се дължи на образуваните в тази преходна структура две водородни връзки (между Hn-Ov и Hv-Oc).

Наличието на катализ от водородни връзки до голяма степен може да се обясни с повишаването на заряда в протоноакцепторния компонент от водородната връзка при частичното разкъсване и образуване на връзките в преходната структура в сравнение с изходната структура.

Механизми TS[6]
Аминолизна реакция през 6-центрови преходни структури

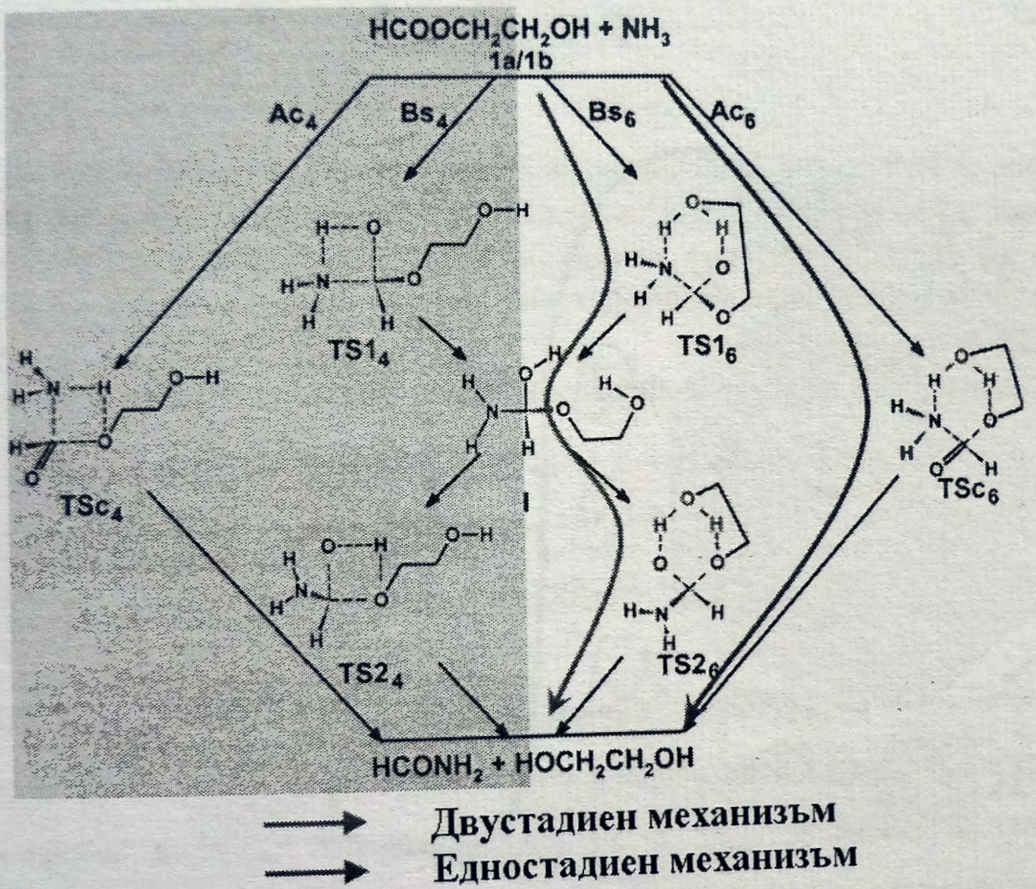
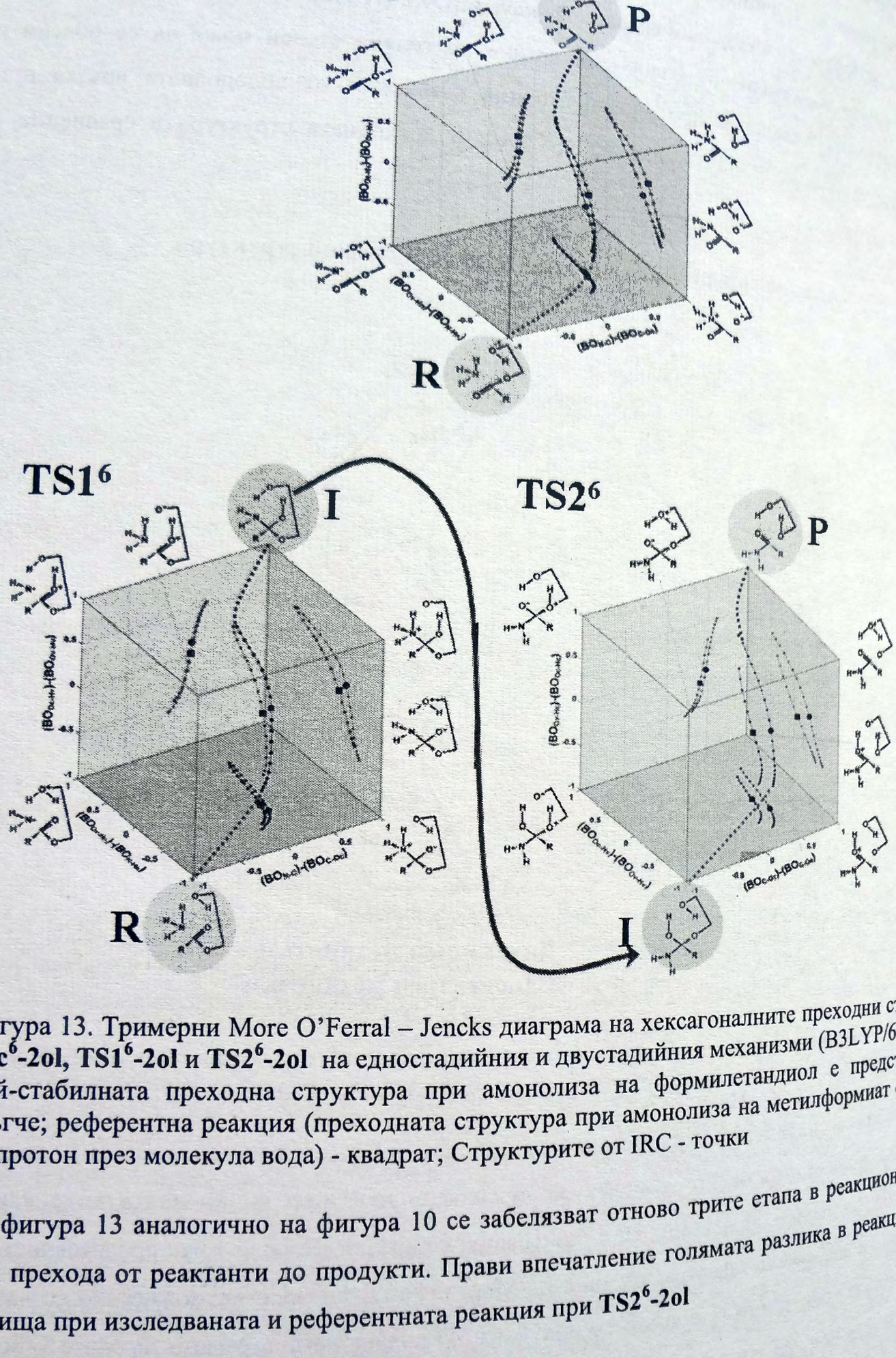


Схема 6. Реакционни механизми през 6-центрови преходни структури при амонолиза на формилетандиол. Не разглежданите тук преходни структури са в сиво.

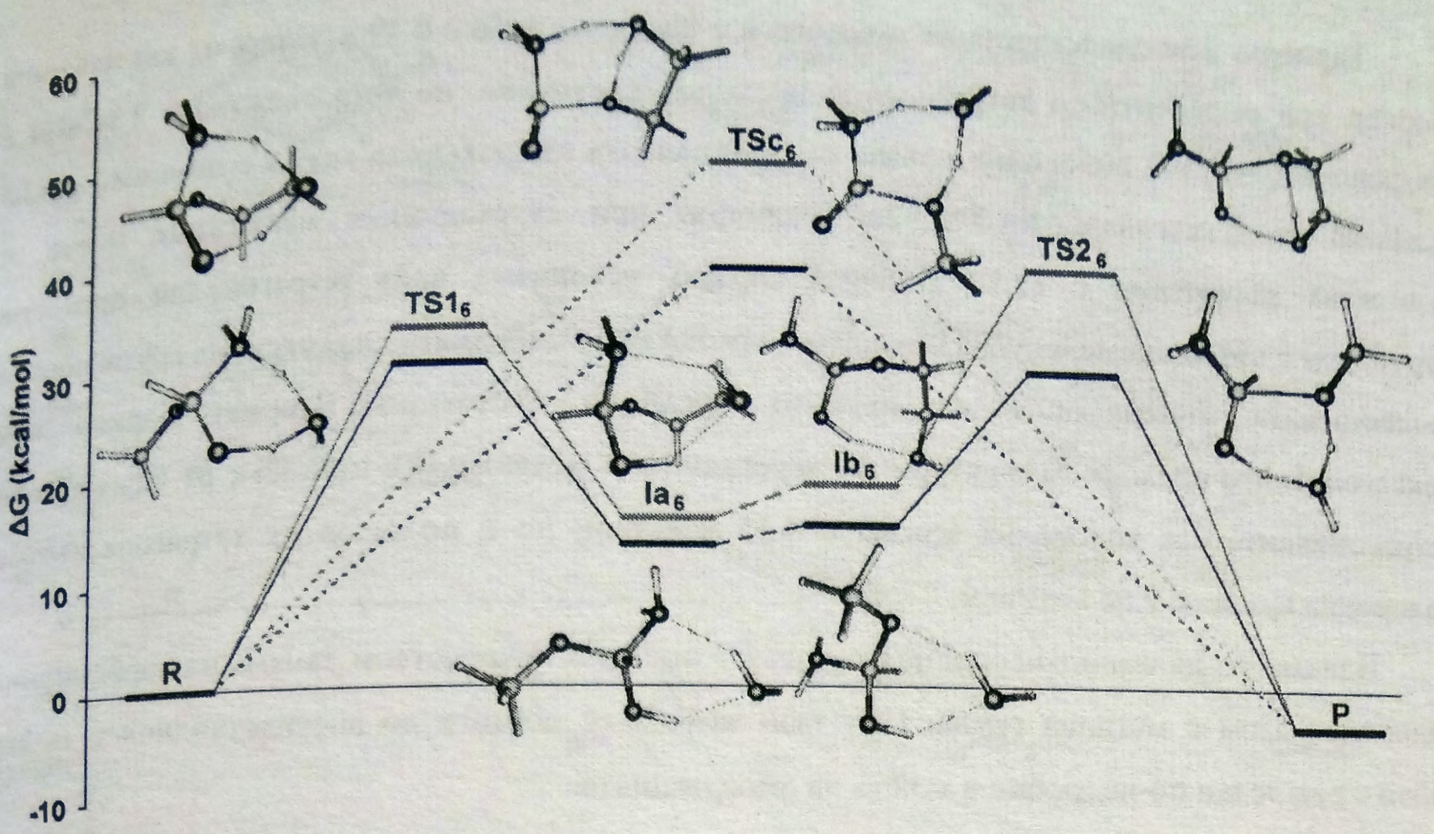
При хексагоналните преходни структури, при които протонът на нуклеофила се пренася чрез посредничеството на втора молекула нуклеофил или през вициналната хидроксилна група, има три двойки образуващи се и разкъсващи се връзки. Поради това, представянето на промените в класическа диаграма от типа на More O'Ferral-Jencks е възможно ако се добави допълнителна координати при което се получава 3D аналог на диаграмата на More O'Ferral-Jencks. В така получената диаграма липсва координатата на енергията, подобно на описаните по-горе диаграми на More O'Ferral-Jencks, а преходната структура е представена като точка в

тримерното пространство на съставните координата описващи трите двойки разкъсващи се и образуващи се връзки.



Фигура 13. Тримерни More O'Ferral – Jencks диаграма на хексагоналните преходни структури **TSc⁶-2ol, TS1⁶-2ol** и **TS2⁶-2ol** на едностадийния и двустадийния механизми (B3LYP/6-31+G*). Най-стабилната преходна структура при амонолиза на формилетандиол е представена с кръгче; референтна реакция (преходната структура при амонолиза на метилформиат с пренос на протон през молекула вода) - квадрат; Структурите от IRC - точки

На фигура 13 аналогично на фигура 10 се забелязват отново трите етапа в реакционния път при прехода от реактанти до продукти. Прави впечатление голямата разлика в реакционните пътища при изследваната и референтната реакция при **TS2⁶-2ol**



Фигура 14. Енергетична диаграма и структури при амонолизната реакция на формилетандиол при хексагонални преходни структури изчислени с B3LYP/6-31++G**. Енергията на референтната реакция (протонен пренос през молекула вода) е представена в черно; а механизмът с протонен пренос през Ov – в сиво; двустадийният механизъм - непрекъсната

При реакционните пътища с хексагонални преходни структури най-ниска енергия има двустадийният механизъм (Фигура 14), чиято енергия е с 15.49 kcal/mol по-ниска от тази на едностадиния механизъм. При двустадийния механизъм **TS1^6-2ol** е с по-ниска енергия от **TS2^6-2ol** с 5.81 kcal/mol, а първият бариер е по-висок от втория с 12.86 kcal/mol поради високата енергия на интермедиата **Ib$_6$** (18.68 kcal/mol).

При протонен пренос през водна молекула всички структури са с по-ниска енергия в сравнение със структурите с протонен пренос през вициналната хидроксилна група. И при катализ през молекула вода, с най-ниска енергия е двустадийният механизъм, като скоростопределящ е първият стадий, който е с 3.48 kcal/mol по-нисък от аналогичния бариер при диолния естер. При сравнение на преходните структури с протонен пренос през молекула вода спрямо тези с протонен пренос през вициналната хидроксилна група, най-малка е разликата между първите преходни състояния на двустадийния механизъм, енергията на **TS2^6-H$_2$O** е по-ниска при пренос през водна молекула с 9.77 kcal/mol, а най- голяма е разликата при **TSc^6-H$_2$O** – 10.05 kcal/mol. Вторият бариер намалява с 6.00 kcal/mol поради стабилизация на интермедиата при протонен пренос през молекула вода. И в двата случая реакциите са екзергонични с Гибсови енергии 3.67 при пренос през OvHv и 3.60 kcal/mol при пренос през молекула вода.

Бариерът при едностадийния механизъм е по-висок само с 0.49 kcal/mol от аналогичния бариер при референтното тетрагонално преходно състояние, но тетрагоналното **TSc^4-2ol** с вътрешномолекулна водородна връзка от вициналната хидроксилна група е по-ниско с 4.68 kcal/mol от хексагоналното **TSc^6-2ol**. Бариерът при двустадийния механизъм, обаче се понижава значително с 17.86 kcal/mol спрямо механизма през тетрагонални преходни структури с вътрешномолекулна водородна връзка от вициналната хидроксилна група поради съществената стабилизация на първото преходно състояние. Вторият бариер при хексагоналните преходни структури на двустадийния механизъм е по-нисък от бариера при тетрагоналните без водородна връзка с 4.35 kcal/mol, но е по-висок от тетрагоналните с водородна връзка с 7.66 kcal/mol.

Влиянието на аминокиселинния остатък е оценено посредством замяна на карбонилния водороден атом с метилна група. При тази замяна се достига до ацетилетандиолен модел който е разгледан по-подробно в текста на дисертацията.

Подобно на изследването за ацетилкатехол, и при формилетандиол разгледахме възможността за катализ от депротонирана вицинална ОН група. Поради наличието на депротонирана хидроксилна група на вицинална позиция спрямо реакционния център, най-ниските по енергия структури на преходните състояния и интермедиатите при амонолиза на моноформилетандиол моноанион се различават съществено от тези при нейонизиран моноформилетандиол (Схема 7). Преходните състояния с протонен пренос към етерния или карбонилния естерни кислородни атоми се наблюдават само при структури с депротонирана хидроксилна група, разположена максимално далеч от реакционния център (вициналните кислородни атоми са антиперипланарни).

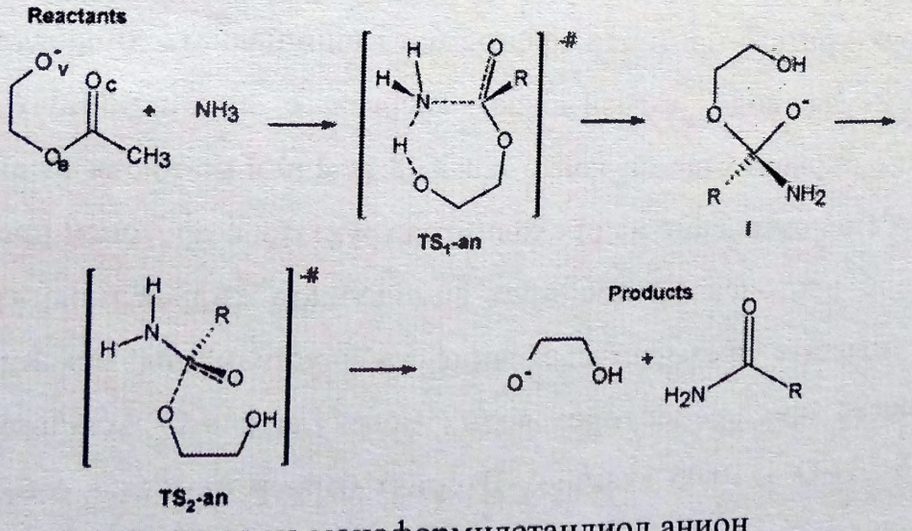
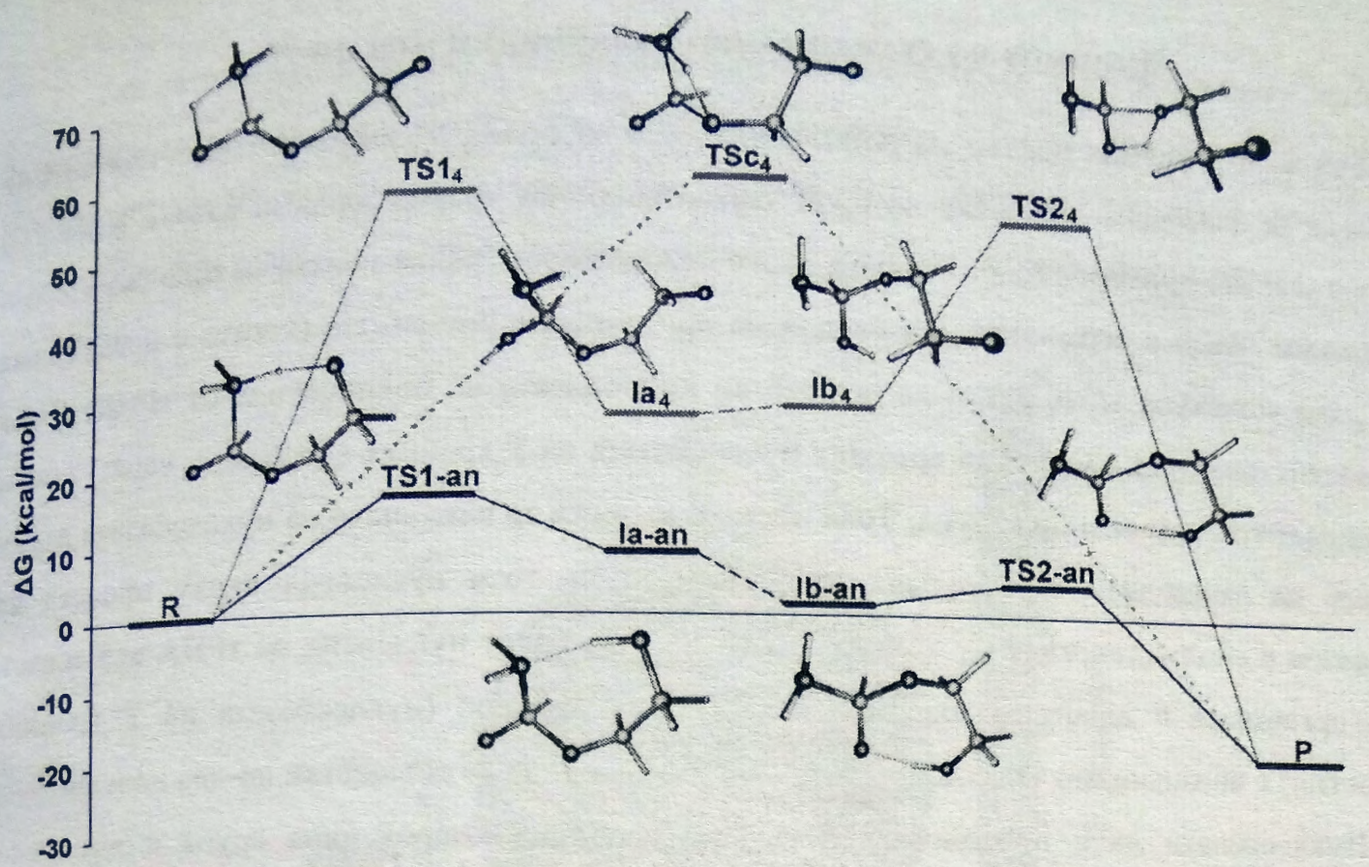


Схема 7. Механизъм на амонолиза на моноформилетандиол анион



Фигура 15. Енергетична диаграма и структури за амонолизната реакция на моноформилетандиол анион изчислени при B3LYP/6-31++G**. Реакцията без участие на вициналната депротонирана хидроксилна група е представена в сиво; реакцията с участие на вициналната депротонирана хидроксилна група - черно; двустадийният механизъм - непрекъсната линия; едностадииният - пунктир; местата на ротационните бариери - тирета (ΔG при 298.15 K)

При двустадиен механизъм с първи етап включващ протонен пренос от амоняка към Ov (**TS1-2ol-an**) бариерите са много по-ниски от тези при референтната реакция. Енергията на **TS1-2ol-an** е 16.11 kcal/mol, което е с 35.2 и 33.33 kcal/mol по-ниско от **TS1^4-2ol-an** и **TSc^4-2ol-an** на референтната реакция. Тук много по-ниската енергия е резултат както от много по-добрия протоноакцептор, така и от много по-големия ъгъл на протонен пренос, 168°, спрямо тетрагоналните преходни структури с вътрешномолекулни водородни връзки. Това преходно състояние е по-ниско съответно с 29.75 и 28.16 kcal/mol за двустадийния и едностадийния механизъм. Второто преходно състояние е с още по-ниска енергия, 4.26 kcal/mol, по-ниска с 11.85 kcal/mol от енергията на първото преходно състояние. Вторият бариер е с височина 2.71 kcal/mol и е значително по-нисък от първия и от аналогичните бариери при тетрагоналните преходни състояния със и без вътрешномолекулна водородна връзка.

Спрямо хексагоналните преходни състояния този механизъм е предпочетен с 17.34 kcal/mol, като вторият бариер е по-нисък с 17.88 kcal/mol. Реакцията е екзергонична с 19.22 kcal/mol.

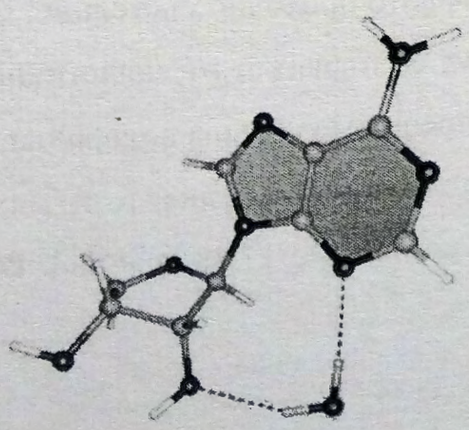
Влияние на съседни протонодонорни центрове

Въпреки че в активния център на рибозомата няма свободни молекули вода, остава открит въпросът за наличието на малко на брой здраво свързани чрез водородни връзки молекули вода с околните протонодонори и силни протоноакцептори. Такива молекули вода биха могли да участват освен в терминиращия стадии на протеиновия био-синтез (когато е необходима поне една молекула вода, която да осъществи хидролизата на полипептида от тРНК) и във взаимодействия чрез водородни връзки с нуклеобазата на 3' крайния аденозин и евентуално с 2' вициналната хидроксилна група. Това поставя въпроса за влиянието на нуклеобазата върху процеса на аминолиза. В подкрепа на влиянието на този нуклеотид върху процеса на аминолиза е еволюционният му консерватизъм - 3' крайният нуклеотид на тРНА във всички живи организми е аденозин. Взаимодействието на аденина (нуклеобазата на 3' крайния нуклеотид) с вициналната хидроксилна група е възможно да се осъществи по-два начина:

1) Нуклеобазата да е протоноакцептор. При свободна хидроксилна група е възможно образуването на водородна връзка между N3 атома на нуклеобазата и OvHv според описани в литературата и наши изчисления. Подобна водородна връзка реално ще изключи взаимодействието между реакционния център и вициналната хидроксилна група при много от четирицентровите преходни структури, при които OvHv е протонодонор, и е невъзможна при шестцентровите преходни структури.

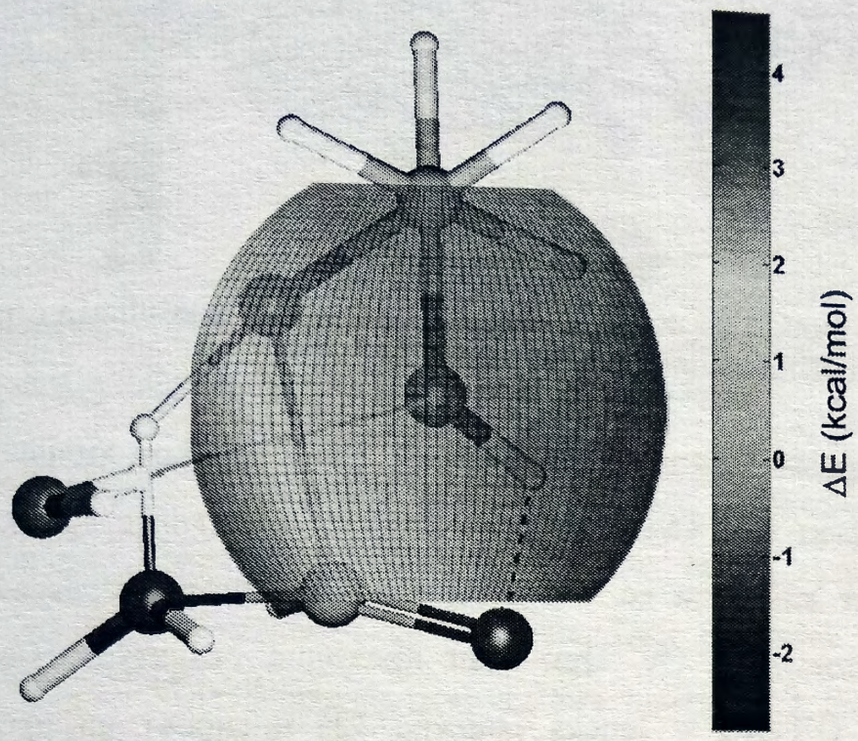
2) Нуклеобазата да е протонодонор. При неенолизирана нуклеобаза това взаимодействие е невъзможно поради липсата на протон при N3 атома.

Много по-вероятно е образуването на водородна връзка с посредничеството на една здраво свързана молекула вода между нуклеобазата и OvHv, каквито случаи има описани във връзка с каталитичната активност на рибозимите. При всички случаи най-близкият до вициналната хидроксилна група кандидат за взаимодействие чрез водородни връзки (пряко при енолизация или непряко чрез посредник молекула вода) е собствената нуклеобаза на 3' терминалния нуклеотид - аденина.



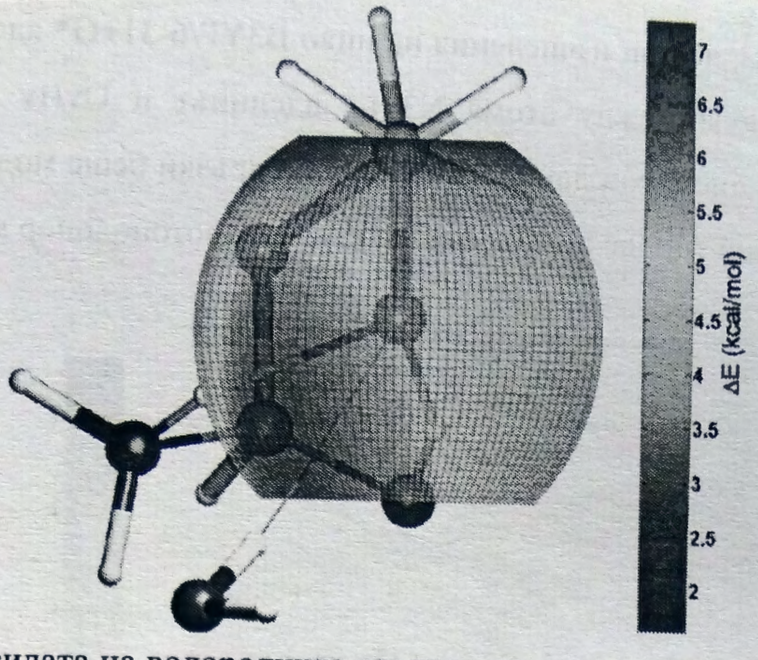
Фигура 15. Комплекс между аденозинов аналог и молекула вода при B3LYP/6-31+G*

Тъй като се оказа, че при изчисления на ниво B3YP/6-31+G* аденозина може стабилно да свърже молекула вода между атома N3 на аденинът и OvHv (Фигура 15), подобно взаимодействие на позициониран донор на водородни връзки беше моделирано с каталитични карти на Ov при различни типове преходни структури с протонодонор молекула вода.



Фигура 16. Разлика в силата на водородните връзки между изходната структура и преходната **TSc^4-2ol** структура с най-ниска енергия (предпочетен механизъм при четирицентровите преходни структури)

При преходната структура с най-ниска енергия при **TSc^4-2ol** (Фигура 16) водородната връзка образувана от водната молекула с Ov допълва системата на другите две водородни връзки (Oc-Hv и Hn-Ov) на атомите от реакционния център. Повишаването на енергията когато водната молекула е близо до азотния атом се дължи до голяма степен на формираната с водната молекула допълнителна водородна връзка между протон, свързан с азотния атом и кислородния атом на водата. Втората водородна връзка заедно с по големите частични заряди в преходната структура, поради по голямата и несинхронност, могат да обяснят и двойно по-големия каталитичен ефект при **TSc^4-2ol** в сравнение с **TS1^4-2ol**



Фигура 17. Разлика в силата на водородните връзки между изходната структура и преходната **TS1^6-2ol** структура с най-ниска енергия

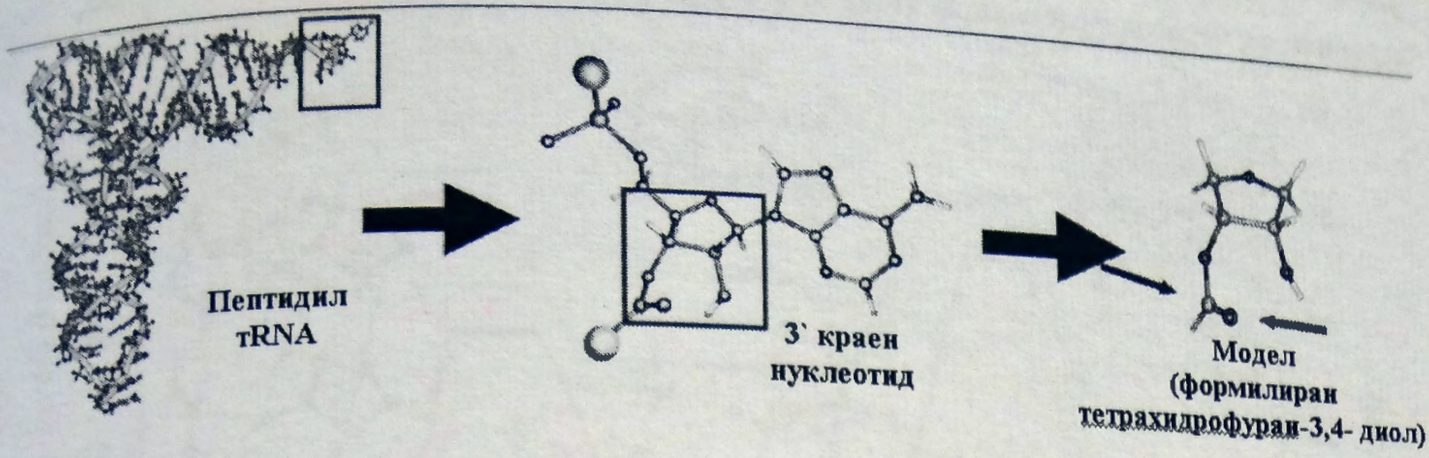
Водородната връзка между молекула вода и вициналната хидроксилна група води до голям каталитичен ефект при **TS1^6-2ol** (Фигура 17), който може да достигне до 7 kcal/mol. Подобен голям ефект може да се обясни с несинхронното образуване и разкъсване на връзките между протоните и Ov. При тази преходна структура, както се вижда от 3d диаграмата на More O'Ferral – Jencks (фигура 13) преносът на протона от амонячната молекула още е в ранен стадий, а протонът на вициналната хидроксилна група до голяма степен е пренесен към Oc. Това предполага натрупване на голям отрицателен заряд в Ov в сравнение с изходния комплекс, което води до много по-силни взаимодействия на водата с преходната структура отколкото с изходната структура.

От каталитичните карти се вижда, че позиционирана спрямо вициналния кислород водородна връзка би имала най-голямо влияние при скоростопределящия етап на реакцията - шестцентровите преходни структури на **TS1^6-2ol** като каталитичният и ефект би могъл да достигне над 7 kcal/mol.

5.4 Тетрахидрофурандиолен модел

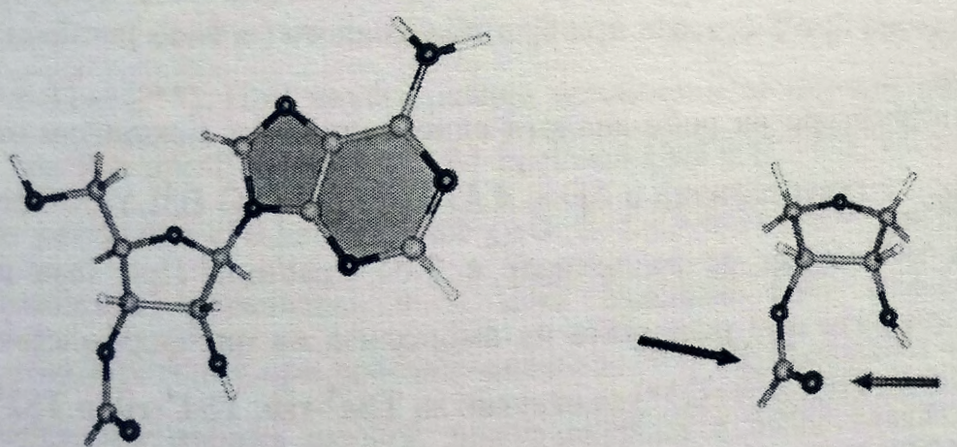
Поради малкия си размер и лекотата на работа с него формилетандиолният модел позволява множество числени експерименти за уточняване на фини ефекти върху скоростта на реакцията, но най-съществения му недостатък е изключването на рибозния пръстен на 3' крайния аденозин от него. Влиянието на рибозния пръстен върху реакцията може да се сведе до два главни ефекта - силно ограничаване на конформационната подвижност на вициналните кислородни атоми от една страна и стерично пречене между атомите от реакционния център и рибозния пръстен. Затова, за да се установи влиянието на вициналната хидроксилна група при

реакция на амонолиза в една система по-близка до реалната, като субстрат е използван моноформилиран тетрахидрофуран-3,4-диол (Фигура 19).



Фигура 18. Опростяване на субстрата до модел. В средната фигура останалата част от tRNA е представена със зелено а останалата част от полипептида в жълто

Този субстрат се различава от първоначалната система (аденозин) по липсата на 5' хидроксиметилната група и нуклеобазата, но притежава почти същите конформационни характеристики на тетрахидрофурановия си пръстен. При рибозата 5' хидроксиметилната група е геометрично много отдалечена от рекционния център и е разположена от другата страна на "равнината" на рибозния пръстен. Аналогично на нея, аномерният въглероден атом (C1') свързващ нуклеобазата е геометрично много отдалечен и също е разположен от другата страна на "равнината" на рибозния пръстен.

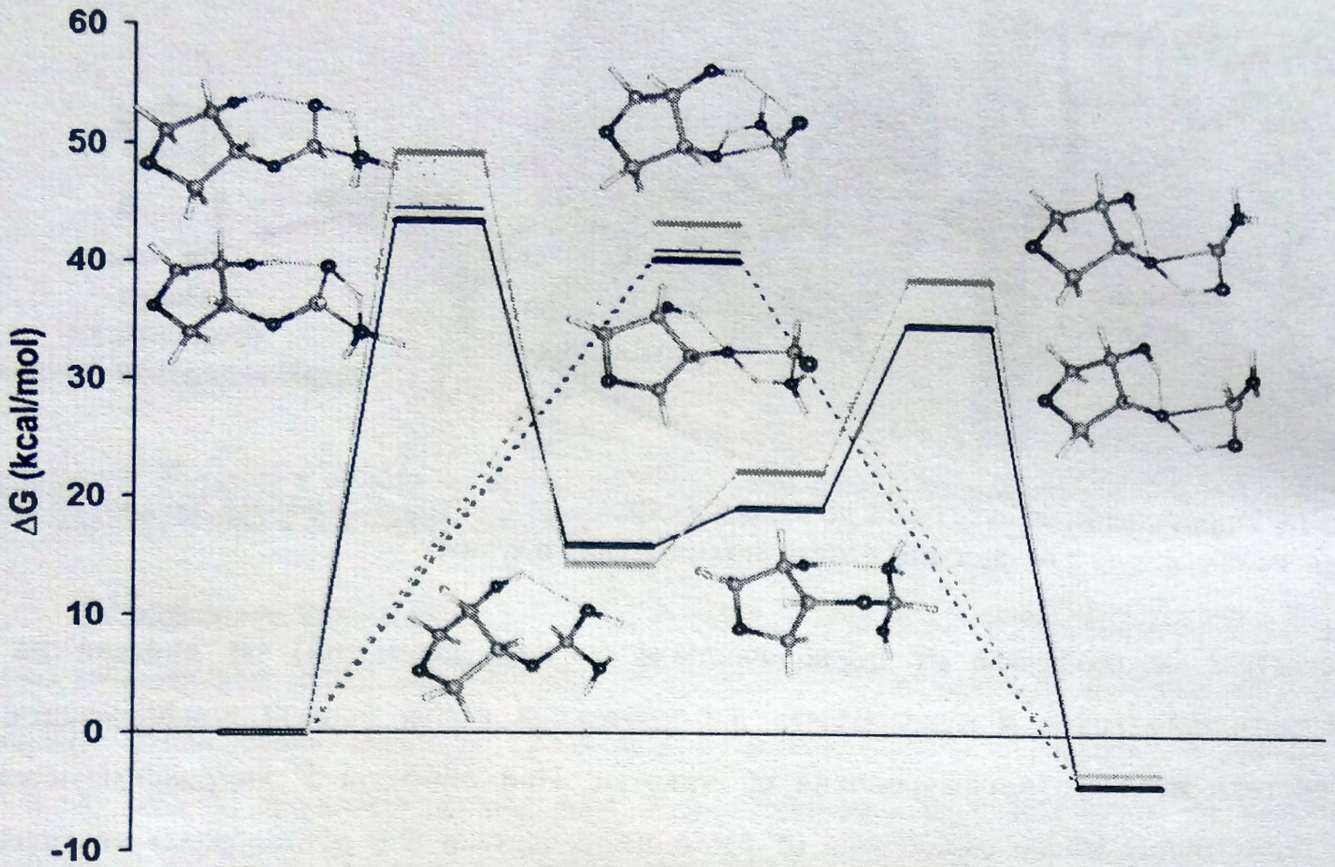


Фигура 19. Структури на 3'формилиран аденозин (ляво) и моделната система (дясно)

За да се опрости анализът на резултатите, употребената по-надолу номерация на субстрата е по аналогия с нуклеозидната номерация.

С цел оценка влиянието на вициналната хидроксилна група като референтни системи са ползвани 2' деокси-аналогът, при който липсва 2' хидроксилната група и арабино-аналогът, при който вициналните хидроксилни групи са разположени антиперипланарно. Посоките на атака спрямо рибозния пръстен са описани спрямо положението на най-близкия до

атакуващия амоняк въглероден атом на тетрахидрофурановия пръстен при номерация като при рибозния пръстен. На Фигура 19 в дясно със синя стрелка е отбелязана атаката от 5' страната, а с червена е отбелязана атака от 2' страната.

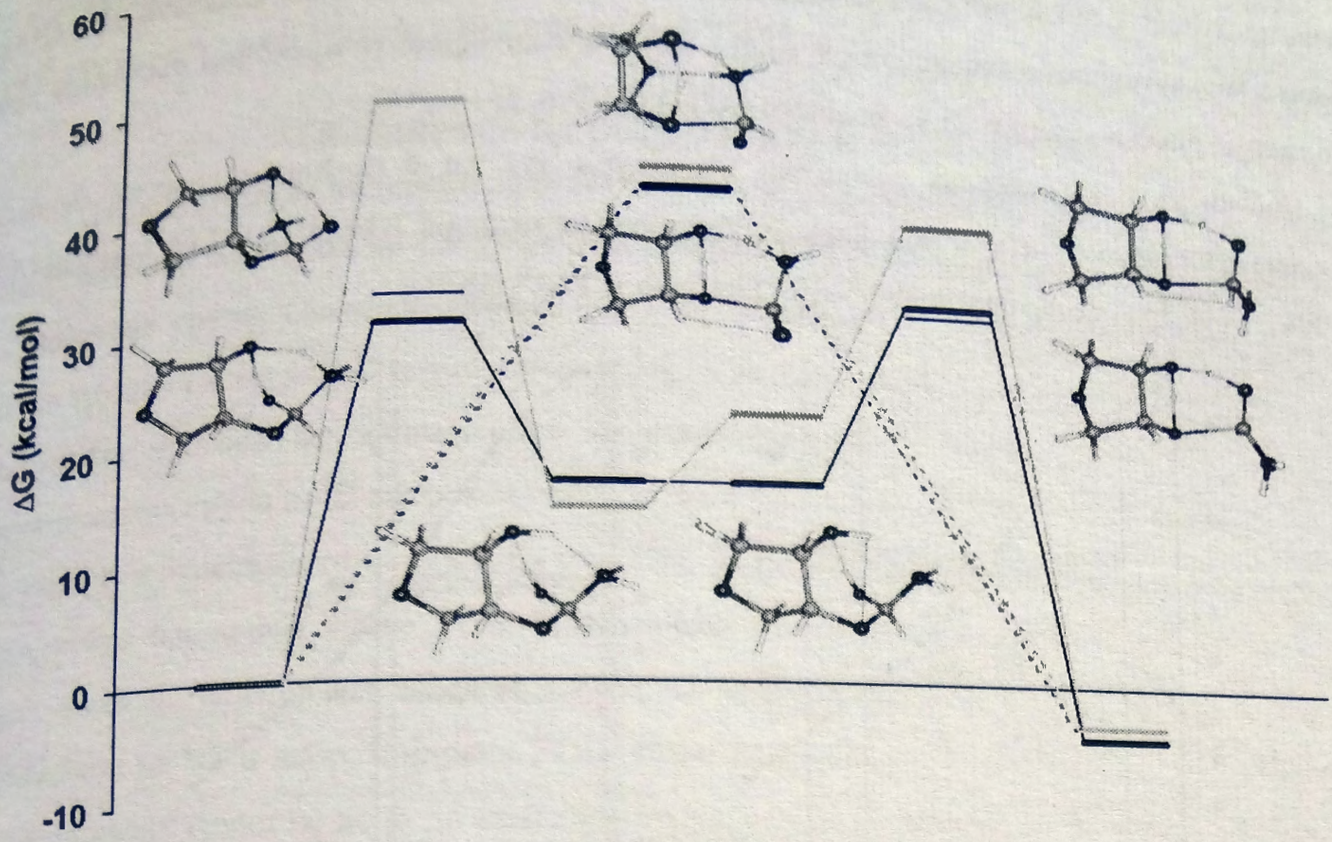


Фигура 20. Енергии на четирицентровите преходните структури при амонолиза на рибо-аналога. Енергиите на преходните структури при про-S атака са представени с удебелени линии а енергиите на преходните структури при про-R атака са представени в с тънки линии, двустадийния механизъм е представен с плътни линии а едностадийния с пунктир. Като референтна реакция е представена про-S атаката при арабино-аналога (в сиво)

При 4-центровите преходни структури на рибо-аналога едностадийният механизъм отново е предпочетен. Реакцията отново е екзергонична с ΔG = 4.43 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**). Бариерите на двустадийния механизъм се различават с 3.04 kcal/mol. При тази реакция бариерите са по-ниски от бариерите при реакцията на амонолиза на цис-формилетандиол с 3.45, 2.06 и 5.72 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) съответно за **TSc^4-rib**, **TS1^4-rib** и **TS2^4-rib**.

Енергията на най-нискоенергетичните преходни структури при рибо-аналога съответно за **TSc^4-rib**, **TS1^4-rib** и **TS2^4-rib** са с 3.45, 2.06 и 5.37 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) по-ниски от аналогичните преходни структури при формилетандиолния модел.

Най-голямата разлика в енергиите при преходните структури различаващи се по типа атака (ако не се вземе предвид възможността за образуване на водородна връзка при про-S атаката при арабино-аналога) се наблюдава при рибо-аналога и е в полза на про-S атаката при **TS1^4**, но в механизма с най-нисък бариер **TSc^4** разликата е едва 0.44 kcal/mol и е в полза на про-R атаката.



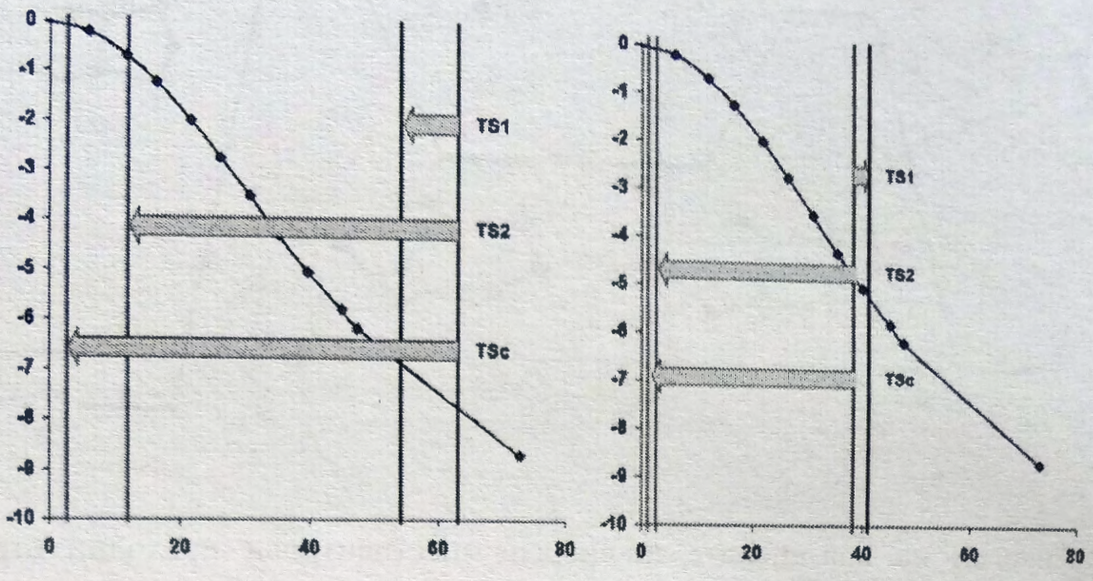
Фигура 21. Енергии на най-ниските по-енергия шестцентрови преходни структури при амонолиза на рибо-аналога; енергиите на преходните структури при про-S атака са представени с удебелени линии а енергиите на преходните структури при про-R атака са представени с тънки линии, двустадийният механизъм е представен с плътни линии а едностадийният - с пунктир. Като референтна реакция е представена про-S атаката при арабино-аналога (в сиво)

При шестцентровите преходни състояния предпочетеният тип атака при едностадийния механизъм е про-R, който е предпочетен спрямо про-S с 0.44 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**). При двустадийния механизъм за първото преходно състояние разликата между про-R и про-S атаката е 2.44 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) в полза на про-S, а при второто разликата е 0.85 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) в полза на про-R атаката. Тук едностадийният механизъм е с 2.05 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) по-ниско от референтната реакция при арабино-аналога. При двустадийния механизъм скоростопределящ е бариерът при първия стадий, чиято енергия е 30.33 kcal/mol и е с 18.15 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) по-ниска от аналогичния бариер при арабино-аналога. Бариерът при второто преходно състояние е 14.85 kcal/mol (спрямо интермедиата) и е по-нисък от първия бариер с 15.48 kcal/mol. Разликата между енергията на преходните структури на двустадийния механизъм е 1.29 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) (между про-S за **TS1^6-rib** и про-R за **TS2^6-rib**). Тук по-високата енергия на втория стадий вероятно се дължи отново на неизгодния петчленен цикъл, през който се пренася протонът между Ov и Oe.

Разликата между шестцентровото и четирицентровото преходни състояния на рибо-аналога е 13.47 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**). Разликата в енергиите между най-ниските по

енергия преходни структури при **TS2^4-rib** и **TS2^6-rib** е 3.99 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**). Разликата между скоростопределящите стапи на 4- и 6-центровите преходни състояния при амонолиза на рибо-аналога е 28.95 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**).

Най-ниските по енергия преходни структури тук са с по-ниски енергии от най-нискоенергетичните структури при формилетандиолния модел с 7.14, 3.12 и 7.66 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) съответно за **TSc^6-rib**, **TS1^6-rib** и **TS2^6-rib**.



Фигура 22. Промяна на торзионните ъгли при прехода от реактанти към шестцентрови преходни структури за формилетандиолния модел (ляво) и рибо-аналога (дясно). Ъгълът в реактантите е представен с червено, в **TS1^6** в синьо, в **TS2^6** в зелено а в **TSc^6** в лилаво. Тези ъгли са представени върху данните от IRC при ротацията на торзионния ъгъл Oe- C1-C2-Ov в интермедиата. (торзионен ъгъл в градуси по абсцисата и енергия в kcal/mol по ординатата)

От Фигура 22 се вижда че при диолния модел промяната на диедричния ъгъл Oe- C1-C2-Ov при прехода от реактанти към преходни структури води до загуба на енергия поради голямото стерично пречене между Oe и Ov в синперипланарно положение (Фигура 4). Промяната при **TS1^6-2ol** е най-малка, което е в съгласие с най-ниската му енергия. При тетрахидрофурановия пръстен обаче този торзионен ъгъл е много по-малък в реактантите, което изисква по-малка енергия за промяната на ъгъла от реактанти до преходни. Поради това по-ниските енергии при рибо-аналога в сравнение с формилетандиолния модел могат да се отдадат на начална дестабилизация на реагента (субстрата).

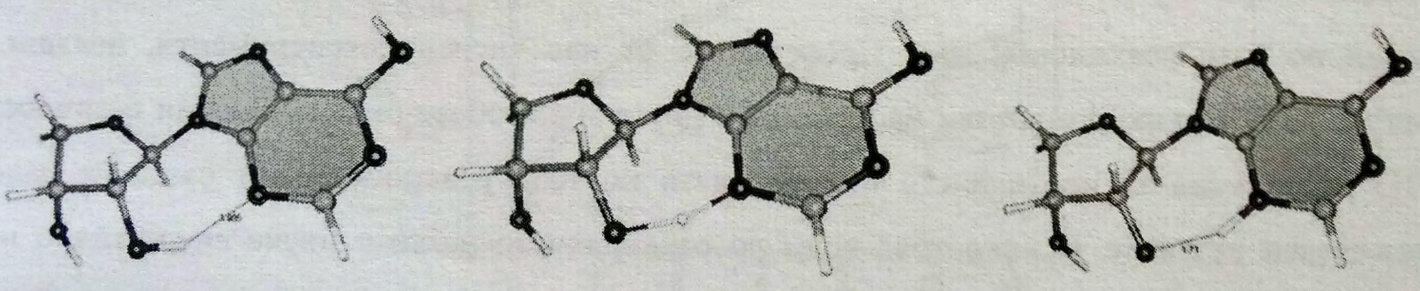
Най-ниските по енергия преходни структури при рибо-аналога, сравнени с преходните структури от реакцията на амонолиза на метилформиат с протонен пренос през молекула вода са с по високи енергии съответно с 2.91, 0.36 и 2.11 за **TSc^6-rib**, **TS1^6-rib** и **TS2^6-rib** kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**). Тук прави впечатление много малката разлика в скоростопределящите бариери на реакцията с протонен пренос през молекула вода и реакцията с протонен пренос през вициналната хидроксилна група, което предполага почти еднакво ефективен катализ през молекулата вода и през вициналната хидроксилна група.

Най-голямата разлика при типа атака тук е при скоростопределящия първи стадии на **TS1^{6}-rib** където про-S атаката е предпочетена с 2.44 kcal/mol.

Обобщение на резултатите и заключение

От резултатите, получени при катехолния и формилетандиолния модел се вижда, че ускорението на реакцията на амонолиза на естера е най-голямо при депротонирана вицинална хидроксилна група. Осъществяването на този механизъм в рибозомата обаче е свързан с много трудности. На първо място стои въпросът за наличието на достатъчно силна база, която да отцепи протона от вициналната хидроксилна група. Поради това, че най-близката функционална група до 2' хидроксилната група е N3 на нуклеобазата, единствено тя би могла да участва в отцепването на протона от 2'OH. За съжаление обаче, тя не е достатъчно силна база, което проличава както от литературните данни за pKa на N3, така и от числените експерименти, целящи да открият стабилна електронеутрална структура с протонирана нуклеобаза на N3 и депротонирана 2'OH. Дори координацията и с различни метални йони и функционални групи не води до стабилна структура. Следователно единствената възможност остава участието на нуклеобазата в реакцията като протонодонор и протоноакцептор, аналогично на хистидина при сериновите протеази.

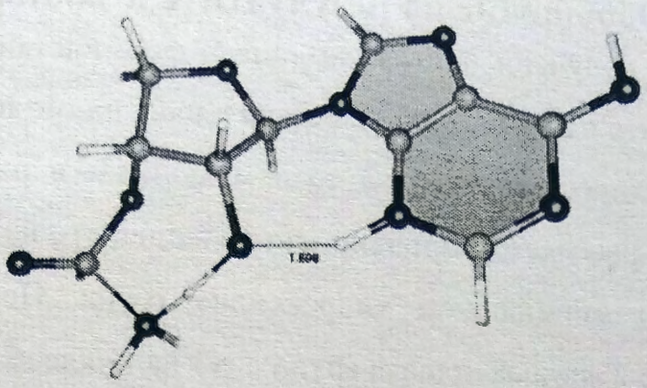
За проверка на тази теза беше разгледана възможността за отцепване протона на 2'OH групата от N3 атома на аденина при неговото предварително йонизиране чрез отцепване на протон от N6. Резултатите от изчисления на ниво HF/6-31+G* показват бариер при преноса на протон от 11.69 kcal/mol (ΔE HF/6-31+G*) (Фигура 23), който води до продукт с депротонирана вицинална хидроксилна група и протонирана при N3 нуклеобаза с енергия по-висока от изходната с 8.80 kcal/mol (ΔE HF/6-31+G*).



Фигура 23. Изходна структура, преходна структура и продукт при преноса на протон от вициналната хидроксилна група към нуклеобазата

Тези резултати показват, че аденозинът може да изпълнява ролята на хистидина при тази реакция. Преходна структура със съгласуван пренос на протон от атакуващ амоняк към Ov и на Hv от 2'OvHv към депротонираната нуклеобаза не беше намерен, но структурата на преходното състояние с пренос на протон от амоняка към Ov, следващ след преноса на протон

от Ov към N3 на нуклеобазата беше намерена и е много подобна на аналогичната преходна структура при етандиолния модел (Фигура 24).



Фигура 24. Преходна структура при атака на амоняк при депротонирана O2'

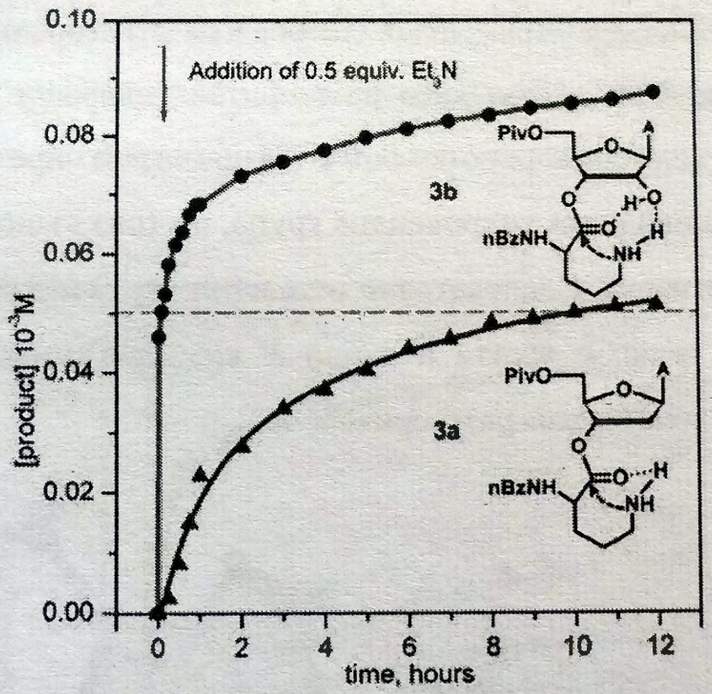
Тъй като вероятността за съгласуване на процеса с трети протонен пренос от аденина към депротониращата го база е много малка, то енергетичната бариера на тази реакция (при предварително депротонирана нуклеобаза) ще се определя от атаката на амина/амоняка, която при формилетандиолния модел е 16 kcal/mol и предполага много бърза реакция.

От всички кристалографски данни за рибозомата най-точните са с ПМцн в пептидилтрансферазния център. Този антибиотик е аналог на аминоацилирана 3'тРНА с тази разлика, че съдържа амидна, а не естерна връзка на 3' място на аденозина. От данните от рентгеноструктурния анализ се вижда, че аденинът на пуромицина е разположен близо до Г2618 и У2620, които, обаче, от своя страна са разположени далеч от йонизирани фосфатни групи. Поради тази им отдаленост те не могат да изпълнят ролята на силни бази способни да отцепят протон от аденина, което е необходимо за осъществяването на аминолизната реакция по този реакционен път. Проведените от нас числени експерименти, целящи да проверят дали водородни връзки на аденина с други нуклеобази биха повишили базичността на N3 достатъчно за протичането на реакцията по този реакционен път също не дадоха положителен резултат. Всичко това води до отхвърлянето на този иначе енергетично най-изгоден реакционен път до откриването на подходяща по сила и разположение база в пептидилтрансферазния център на рибозомата.

Големите стабилитетни константи на голямата субединица на рибозомата с аналози на тетраедричния интермедиат говорят за неговото присъствие в реакционния път на рибозомалната пептидилтрансферазна реакция. Обратното противоречи на *комбинаториалната теория* за еволюцията на градивните елементи при живите системи, тъй като няма нужда от подобно здраво свързване в случаи, че подобен интермедиат не се образува в естествения реакционен път. Това отхвърля вариантите за използван от рибозомата

едностадиен механизъм на ацилен пренос, както при четирицентровите, така и при шестцентровите преходни структури.

От друга страна, при четирицентровите преходни структури бариерът при едностадийните механизми е съизмерим или по-нисък от бариера при двустадийните механизми, дори при наличието на вътрешномолекулни водородни връзки, които не водят до драстични стабилизации на преходните структури. Тъй като всяка дългоеволюирала комбинаториална по природата си система, при необходимост от избор на два еднакви по енергия пътя би избрала по-простия, който тук е едностадийният механизъм (в някои случаи дори с по ниска енергия), следва, че рибозомата не би използвала и стадийните механизми през четирицентрови преходни структури и те могат да се отхвърлят като малко вероятни. Вариантът за осъществяване на реакцията е използване на двустадийния механизъм през шестцентрови преходни структури с протонен пренос през вициналната хидроксилна група. Тези резултати са подкрепени от експериментални данни за лактамизация на трифлуороацетат на 2'/3'-O-(α-N-p-нитробензоил орнитинил) 5'-O-пивалоил аденозин **3b** и деоксиаденозин **3a** до α-N-p-нитробензоил цикличен орнитин след прибавяне на 0.5 еквивалента Et_3N при 25°C в ацетонитрил (Фигура 25). От фигурата се вижда значителното забавяне на реакцията при използване на деокси аналога.



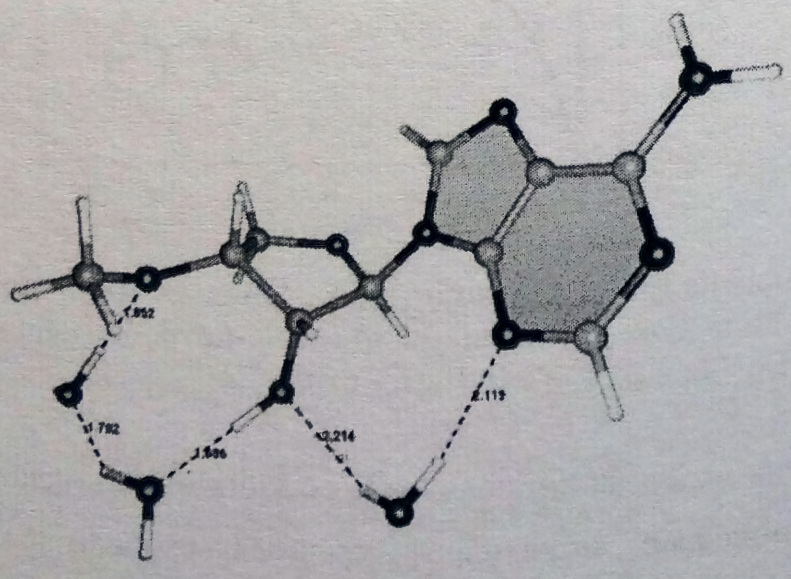
Фигура 25. Лактамизация на трифлуороацетат на 2'/3'-O-(α-N-p-нитробензоил орнитинил) 5'-O-пивалоил аденозин **3b** и деоксиаденозин **3a** до α-N-p-нитробензоил цикличен орнитин след прибавяне на 0.5 eqv. Et_3N при 25°C в сух ацетонитрил.

При най-близкия модел на аминолизната реакция във вътрешността на рибозомата - амонолиза на формилиран тетрахидрофурандиол, скоростопределящият етап при шестцентровите преходни структури е само с 0.36 kcal/mol (ΔG B3LYP/6-31++G**) по-висок от аналогичния етап при амонолиза на метилформиат с катализ от молекула вода. За разлика

от реакцията във вода, където концентрацията на вода не може да бъде повече от 55.55M, ефективната концентрация на една вицинална група може да бъде хиляди, което би довело до много по-висока скорост на амонолизната реакция при протонен пренос през вицинална хидроксилна група в сравнение с реакцията във вода. От друга страна, както се вижда от каталитичните карти, позиционирана водородна връзка с вициналния кислороден атом може силно да понижи бариера на реакцията. Изследване на енергиите на енолизация на нуклеобазите обаче показа една от най-високите енергии за енолизация на аденина -32.2 kcal/mol (ΔE B3LYP/6-31+G*). От тези резултати следва, че поради малката вероятност за енолизация, наличието на молекула здраво свързана вода между вициналния кислород и N3 на аденина би довело до този голям каталитичен ефект.

Ацетилетандиолният модел показва, че ефектът на нарастващата полипептидна верига е повишаване на бариера, но и допълнително раздалечава енергията на четирицентровите от шестцентровите реакционни пътища.

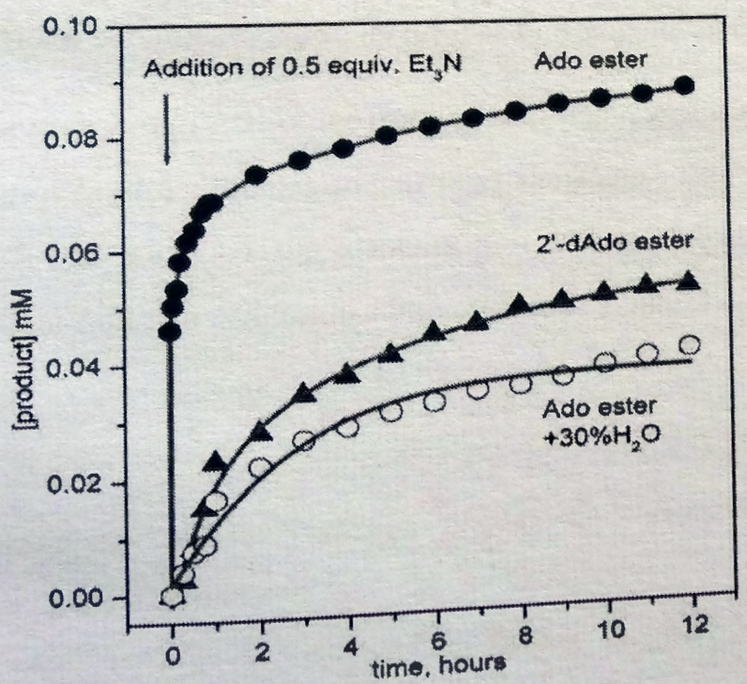
Остава въпросът защо реакцията не протича в цитозола, при условие, че активните за катализа групи не са в рибозомата и неспецифичните ефекти на водата като разтворител ускоряват реакцията допълнително. Тук за реакционните пътища през йонизиран вицинален кислороден атом има ясен отговор - в цитозола липсва силната база, но за съжаление тя не е намерена и в пептидилтрансферазния център. Насока към отговора на този въпрос е и фактът, че неспецифичните ефекти на водата като разтворител ускоряват аминолизата с протонен пренос през молекула вода повече отколкото аминолизата през преходни структури с протонен пренос през вициналната хидроксилна група, но това също не води до протичане на аминолизна реакция в цитозола. Следователно отговорът вероятно се крие в солватационната клетка около тРНК (по точно в частта и около 3' крайния аминоацилиран аденозин) и в специфичните ефекти на водата като разтворител.



Фигура 26. Част от хидратната обвивка при модел на ациладенозина

Оптимизирането на модел на ациладенозина (Фигура 26) с три молекули вода показва че вициналната хидроксилна група взаимодействия чрез водородни връзки с две молекули вода. Тук водородната връзка на 2'O с протоноакцепторната молекулата вода е много по-здрава от водородната връзка между кислородните атоми в диолната система. По този начин включването на 2'OH в мрежа от водородни връзки с водните молекули възпрепятства участието и в системата за пренос на протон, необходима за осъществяването на най-нискоенергетичните шестцентови преходни структури. От друга страна, за да протече нуклеофилната атака хидратната клетка около атакуващата аминогрупа също трябва да се разруши за да се десолватира електронната двойка на амина, което също е свързано със загуба на енергия.

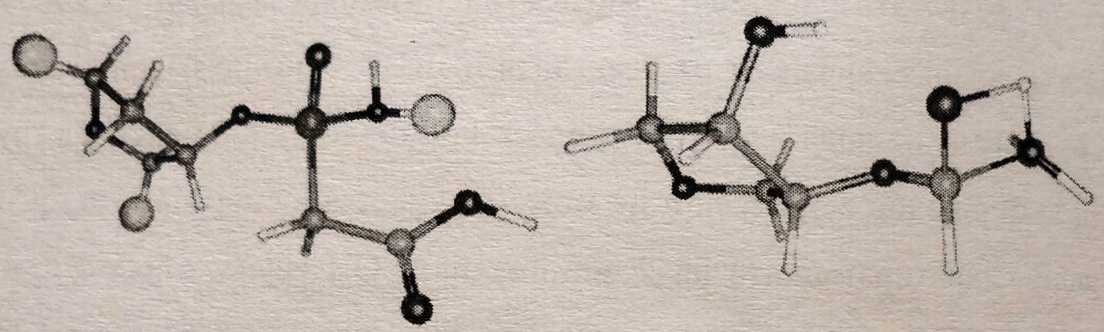
Тези резултати за подкрепени от експериментални данни за лактамизация на трифлуороацетат на 2'/3'-O-(α-N-p-нитробензоил орнитинил) 5'-O-пивалоил аденозин и деоксиаденозин до α-N-p-нитробензоил цикличен орнитин след прибавяне на 0.5 еквивалента Et_3N при 25°C в сух ацетонитрил и в ацетонитрил с 30% вода (Фигура 27). Тези експериментални резултати показват мигновена аминолиза след освобождаването на аминогрупата в половин еквивалент от реактанта и значително по-бавна реакция при деокси аналога. При прибавяне на вода в ацетонитрила 2' вициналната хидроксилна група се свързва с водородни връзки с водни молекули и не може да участва в системата за пренос на протон. Вероятно поради хидратиратацията на 2' вициналната OH група, атаката към карбонилния атом от посоката на 2' е силно затруднена и скоростта на реакцията е по-ниска дори от тази на 2'деокси субстрата.



Фигура 27. Лактамизация на трифлуороацетат на 2'/3'-O-(α-N-p-нитробензоил орнитинил) 5'-O-пивалоил аденозин (●) и деоксиаденозин (▲) до α-N-p-нитробензоил цикличен орнитин след прибавяне на 0.5 eqv. Et_3N при 25°C в сух ацетонитрил (●) и в ацетонитрил с 30% вода (○).

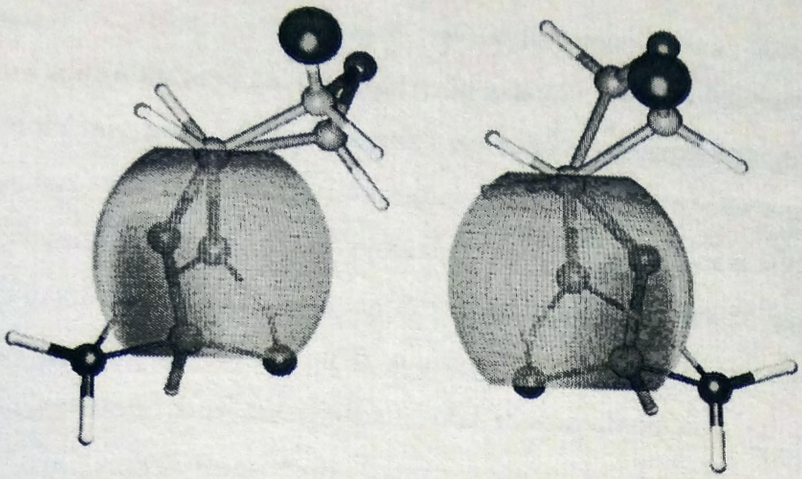
Трябва да вземе предвид и по-слабата водородна връзка между диолния фрагмент и молекула амин от една страна и диолния фрагмент и молекула вода от друга. Например, при моделна система от етандиол с молекула вода или молекула метиламин при структури с протонодонор етандиол енергията на водородната връзка е 3.34 и 6.22 kcal/mol (ΔE B3LYP/6-31++G**), съответно за метиламина и водата.

От публикуваните от Schmeing и съавтори данни се вижда, че комплексът между S аналога на тетраедричния интермедиат и рибозомата има много по-голяма стабилитетна константа в сравнение с комплекса между рибозомата и R аналога на тетраедричния интермедиат (Фигура 28). Авторите отдават това по-здраво свързване на оптимизиран към про-S атака интериор на реакционния център в рибозомата. Разликата между про-R и про-S атаката при най-ниските по енергия преходни структури в скоростопределящия етап при рибо-аналога е само 2.44 kcal/mol, но макар и малка е с предпочетеност към про-S атаката, както е установено в рибозомата.



Фигура 28. Хиралният център на използвания от Schmeing и съавтори аналог на S тетраедричен интермедиат и про-S структура от **TS1^4-rib**. Непредставените на фигурата фрагменти от модела на Schmeing и съавтори са представени със жълти сфери

На Фигура 29 са представени получените про-R и про-S каталитични карти за първото преходно състояние при шестцентровите преходни структури при амонолизата на формилетандиол насложени върху най-ниските по енергия про-R и про-S шестцентрови структури на първото преходно състояние при амонолиза на рибо-аналога.



Фигура 29. Каталитични карти при про-R при про-S атаката за шестцентровите преходни структури при модела - амонолиза на формилетандиол наложени върху про-R при про-S преходните структури с най-ниска енергия на същото преходно състояние. Мястото където при реалната система е прикачен аденина е представено със синя сфера.

От тях се вижда много по-неизгодната спрямо положението на нуклебазата посока на водородната връзка при про-R преходната структура. От това следва, че наличието на свързана между Ov и N3 на аденина молекула вода може да доведе до допълнителна стабилизация на про-S преходната структура с около 5 kcal/mol (от енергиите в каталитичните карти).

Изводи

1. С нови моделни системи – мимики на аминолизната реакция водеща до синтеза на пептидна връзка в рибозомата (ацетилфенол, ацетилкатехол, ацетилетандиол, формилетандиол и формилирани хидрокситетрахидрофурани), са потвърдени изводите от предходни изследвания, че некатализираната реакция на амонолиза на естери протича преимуществено по едностадиен механизъм. В изследваните модели разликата в енергетичните бариери за едностадийния и двустадийния механизъм е минимална (1 - 5 kcal/mol).
2. Участието на нейонизирана вицинална хидроксилна група в стабилизацията на моделираните преходни състояния чрез допълнителни водородни връзки понижава минимално енергетичните бариери (с 2 - 7 kcal/mol) и вероятно не може да осигури рибозомния каталитичен ефект.
3. Намерен е нов реакционен път за амонолиза на формилетандиол и формилиран тетрахидрофуран-2,3-диол, катализирана от вициналната хидроксилна група, която участва в преноса на протон в реакционния център през хексагонални преходни структури. При новия реакционен път двустадийният механизъм е предпочетен пред

едностадийния, като енергетичният бариер на процеса спрямо некатализирана реакция е понижен с над 15 kcal/mol. Анализът на реакционния път в отделните етапи на реакцията, основан на нов тип тримерни диаграми на More O'Ferral – Jencks, показва, че във всеки етап първоначално се преструктурират връзките между тежките атоми (C, N, O), а след това се осъществява протонният пренос.

4. Енергетичният бариер на процеса на амонолиза се понижава значително и при депротонирана вицинална хидроксилна група в ацетилкатехол и формилетандиол, благодарение на нов реакционен път, включващ протонен пренос към формирания оксиден анион. Спрямо хексагоналните преходни състояния този механизъм е предпочетен с около 17 kcal/mol. Макар че това е най-изгодният реакционен път остава открит въпросът как може да се осъществи депротонирането на вициналната OH група в пептидилтрансферазния център в рибозомата.
5. При нейонизирана вицинална хидроксилна група наличието на разтворител понижава бариерите за амонолиза с около 5 – 10 kcal/mol. При депротонирана вицинална хидроксилна група и пренос на протон към нея влиянието на разтворителя е много по-малко. Това предполага малки неспецифични влияния на групите от пептидилтрансферазния център върху амонолизната реакция.
6. При амонолиза на формилиран цис-тетрахидрофуран-2,3-диол (модел на формилирана рибоза) про-S атаката на амоняка е предпочетена, което съвпада с експериментално определената предпочетеност на атаката в рибозомата.
7. Анализът на структурата на пептидилтрансферазния център и на резултатите за всички реакционни пътища предполагат, че използваният от рибозомата механизъм с участието на вицинална хидроксилна група при синтез на пептидна връзка е двустадийният механизъм през 6-центрови преходни структури с директно участие на вициналната 2'OH група в протонния пренос като водородна връзка с молекула вода може да понижи допълнително енергията на скоростопределящия етап.

Списък на научните публикации по дисертацията

The syn-oriented 2-OH provides a favorable proton transfer geometry in 1,2-diol monoester aminolysis: Implications for the ribosome mechanism
Rangelov MA, Vayssilov GN, Yomtova VM, Petkov DD *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 4964 (2006)

Theoretical study of the o-OH participation in catechol ester ammonolysis
Rangelov MA, Vayssilov GN, Yomtova VM, Petkov DD Org. & *Biomol. Chem.* **3**: 737 (2005)

Разултати от дисертацията са докладвани на :

3-ти Български Пептиден Симпозиум Паничище, България (2002) (доклад)

Humboldt Research Conference on Computational Chemistry (2002), Veliko Turnovo, Bulgaria (постер)

Third Humboldt Conference on Computational Chemistry (2006), Varna, Bulgaria (постер)