ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

مکانیسم پایه رونویسی توسط RNA پلیمراز II

چکیده

آنزیم‌هایی مانند RNA پلیمراز II، رونویسی از ژنوم یوکاریوت‌ها، آرکئا باکتری‌ها و برخی از ویروس‌ها را بر عهده دارند. این آنزیم‌ها همچنین با RNA پلیمرازهای باکتریایی، کلروپلاستی و میتوکندریایی، شباهت بنیادین دارند. در این مقاله‌ی مروری ما فهرستی از مطالعات اخیر را ارائه می‌دهیم که مراحل مختلف مکانیسم رونویسی را ذکر می‌کنند و احتمالا این مکانیسم، برای اغلب RNA پلیمرازهای چند زیرواحدی، مشترک است. ما با استفاده از تلفیق اطلاعات پیرامون شیمی ساختاری و محاسباتی، تلاش کردیم تا امکان‌پذیرترین مسیر واکنش را برای مکانیسم انتقال نوکلئوتیدیل توسط دو یون فلزی نشان دهیم و نحوه‌ی کاتالیز که می‌تواند به انتقال در چرخه‌ی مکانیکی- شیمیایی کاتالیز شده توسط RNA پلیمراز II ارتباط داشته باشد؛ ارزیابی نماییم.

کلمات کلیدی: RNA پلیمراز، انتقال نوکلئوتیدیل، کاتالیز دو یون فلزی، رونویسی، دینامیک مولکولی

مقدمه

رونویسی از ژنوم سلولی در تمامی مراحل زندگی لزوما توسط آنزیم‌های اورتولوگی[1] به نام RNA پلیمراز چند زیرواحدی وابسته به DNA (RNAPs) انجام می‌شود. هسته‌ی آنزیم یوباکتریایی اولیه که توسط اشریشیا کلی بیان می‌شود؛ شامل دو زیرواحد بزرگ (β و β') که مراحل شیمیایی (تراکم NTP) و مکانیکی (انتقال) را انجام می‌دهند، سه زیرواحد کوچکتر به نام دایمر α 2 و ω که در مونتاژ آنزیم و تنظیم رونویسی نقش دارند؛ است (شکل 1A). اشکال مختلفی از هسته برای برخی از یوباکتری‌ها از جمله فرانسیلا (هترودایمرα 2 α 1 را بیان می‌کند) و باسیلوس (افزودن زیرواحد δ و جایگزین کردن زیرواحد ω) توصیف شده است؛ در حالی که در RNA پلیمرازهای هلیکوباکترها، ولباچیا و *Wolinella*، زیرواحدهای β و β' با یکدیگر ادغام شده‌اند. زیرواحد RNA پلیمراز که در ابتدا به عنوان زیرواحد γ در *Nostoc, Anabaena* و سایر سیانوباکترها شناخته شده بود؛ مشخص شد که محصول شکافت در ژن اجدادی

[1] آنزیم‌های همولوگی که بین گونه‌های مختلف وجود دارند اما عمل آنها یکسان است.

است که اورتولوگ ´β را کد می‌کند. همان شکافت در زیرواحد ´β RNA پلیمرازهای کد شده توسط پلاستید در کلروپلاست‌ها وجود دارد و هسته باکتریایی کاهش‌یافته‌ی $\alpha_2\beta\beta'$ را بیان می‌کنند (زیرواحد ω به نظر می‌رسد توسط ژنوم پلاستید تنها در جلبک ردوفیتا کدگذاری شود). به طور قابل‌توجهی، این ساختار هسته در تکوین اولیه‌ی کلروپلاست غالب است (به عنوان مثال، در اتیوپلاست)؛ در حالی که در کلروپلاست‌های بالغ، هسته بیش از 30 زیرواحد اضافی دارد. RNA پلیمرازهای میتوکندریایی عمدتا با باکتریوفاژها مرتبط هستند؛ اما ژنوم‌های میتوکندریایی نسبتا بزرگ برخی از آغازیان (به نام *Jakobidae* و *Malawimonadidae*) اورتولوگی از زیرواحدهای باکتریایی ∝، β و ´β را کد می‌کنند.

RNA پلیمرازهای هسته‌ای در یوکاریوت‌ها توسط مجموعه‌ای متشکل از حداقل سه کلاس بیان می‌شوند: RNA پلیمراز I که ژن‌های RNA ریبوزومی را رونویسی می‌کند؛ RNA پلیمراز II که سنتز RNA پیامبر و زیرمجموعه‌ای از RNA های غیرکدکننده کوچک را برعهده دارد و RNA پلیمراز III که RNA های انتقالی، 5S RNA و بسیاری از RNA غیرکدکننده‌ی کوچک را سنتز می‌کنند. RNA پلیمرازهای موجود در هر کلاس شامل بیش از 12 زیرواحد و یک هسته‌ی اورتولوگ با آنزیم‌های باکتریایی هستند: بزرگ‌ترین زیرواحدهای RNA پلیمراز II مخمر یعنی Rbp1 و Rpb2 به ترتیب با زیرواحدهای β و ´β برابر هستند؛ Rpb3 و Rpb11 اورتولوگ‌های مختلفی از زیرواحد ∝ هستند و Rpb6 اورتولوگی از زیرواحد ω است (شکل 1B). در گیاهان، تعداد RNA پلیمرازهای هسته‌ای به 5 آنزیم رسیده است؛ RNA پلیمراز IV و V با ساختار کلی RNA پلیمراز I-III منطبق هستند اما تفاوت غیرمنتظره‌ای را در هسته‌ی مکانیکی- شیمیایی نشان می‌دهند؛ در غیر این صورت در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها به طور کلی محافظت می‌شوند که همین امر سوالاتی را در مورد صلاحیت این آنزیم‌ها برای عمل به عنوان RNA پلیمرازهای واجد شرایط به وجود می‌آورد (این صلاحیت در شرایط *in vitro* اثبات شده است). ژنوم ویروس‌های بزرگ از راسته‌ی مگا ویروس‌ها، RNA پلیمرازهایی را کد می‌کنند که با RNA پلیمراز II خویشاوند هستند؛ اما تعداد زیرواحدهای آن‌ها کاهش یافته و معمولا 8 زیرواحد دارند. به طرز قابل‌توجهی، در حالی که برخی از آنزیم‌ها مانند آنهایی که در می می ویروس‌ها[1]

[1] Mimivirus

وجود دارند؛ هسته‌ی کاملا حفاظت‌شده‌ای مانند $\alpha_2\beta\beta'\omega$ دارند که اورتولوگی از Rpb 1، 2، 3/11 و 6 (همراه با همولوگ Rpb5، 9 و 10) است؛ RNA پلیمرازهای پاکس ویروس‌ها فاقد اورتولوگ آشکار هستند که نشان‌دهنده‌ی یک تغییر چشمگیر بالقوه در ساختار و مونتاژ آنزیم است. Lane و Darst بر اساس نتایجی که از تنظیم توالی در مقیاس وسیع برای زیرواحدهایی شبیه β و ´β بدست آورده بودند؛ استدلال کردند که RNA پلیمرازهای پاکس ویروس با RNA پلیمرازهای I هسته‌ای خویشاوند هستند. در نهایت، آرکئا باکترها تنها یک RNA پلیمراز دارند که از نظر اندازه (11- 13 زیرواحد) و ترکیب، مشابه با RNA پلیمراز II است: این آنزیم شامل اورتولوگ‌های Rpb1 (به دو زیرواحد تقسیم می‌شود)، 2، 8، 10 و 12 است (شکل 1C). آنالیزهای عمیق بیشتر پیرامون داده‌های ساختاری و توالی RNA پلیمرازهای باکتریایی، آرکئا باکترها و یوکاریوت‌ها توسط Cramer, Darst, Kornberg، Murakami, Yokoyama و همکارانشان ارائه شده است. در این مقاله‌ی مروری، ما بر روی مکانیسم پایه رونویسی تمرکز می‌کنیم؛ در نهایت نتایجی که از مطالعات پیرامون RNA پلیمراز II مخمر بدست می‌آیند در هنگام نیاز با داده‌های مربوط به آنزیم‌های باکتریایی تکمیل می‌شوند.

چرخه‌ی اضافه شدن نوکلئوتید

فرآیند سنتز RNA توسط RNA پلیمراز از سه مرحله‌ی مجزا تشکیل شده است: آغاز، طویل‌شدن[1] و خاتمه. دومین و طولانی‌ترین مرحله، طویل‌شدن است که یک فرآیند مکانیکی- شیمیایی تکراری می‌باشد و شامل واکنش تراکم NTP است که با افزودن یک NMP همراه با انتشار یک پیروفسفات (PPi)، RNA جدید را توسعه می‌دهد؛ سپس آنزیم به اندازه‌ی یک نوکلئوتید (nt) در طول رشته‌ی الگو جابجا می‌شود.

RNA پلیمراز شکل متفاوتی از آنزیم‌های کلاسیک Cleland است زیرا آن بعد از تولید هر محصول یعنی RNA، در هر چرخه جدا نمی‌شود؛ محصول متصل به آنزیم باقی می‌ماند و به عنوان سوبسترایی برای چرخه‌ی جدید عمل می‌کند. RNA جدید به رشته‌ی الگو DNA با طول 8-9 نوکلئوتید متصل می‌شود و هیبرید RNA-DNA را تشکیل می‌دهد که عامل اصلی تعیین‌کننده‌ی پایداری کمپلکس طویل‌شده است. طول هیبرید در طول چرخه ثابت

[1] elongation

می‌ماند: زیرا انتهای ´3 به اندازه‌ی یک نوکلئوتید طویل می‌شود و یک نوکلئوتید از انتهای ´5 هیبرید جدا شده و از طریق کانال خروج RNA خارج می‌شود. فرآیند خواندن از روی رشته‌ی الگو توسط قرار دادن مکمل واتسون کریکی در برابر NTP ورودی و نوکلئوتید الگو تنظیم می‌شود و مستلزم ذوب شدن DNA دو رشته‌ای است تا هیبرید RNA- DNA تشکیل شود. آن قطعه از DNA که به صورت محلی ذوب می‌شود؛ حباب رونویسی نامیده می‌شود و در آن طول DNA تک رشته‌ای به 11-12 نوکلئوتید می‌رسد که توسط RNA پلیمراز احاطه شده و هیبرید تشکیل می‌شود. ذوب شدن DNA در پیش‌روی RNA پلیمراز و بهم چسبیدن دو رشته‌ی DNA پشت سر آن همزمان با جابجایی آنزیم رخ می‌دهند و اگر طول رونوشت متوسط باشد؛ از نظر انرژی آزاد خنثی هستند.

جابجایی انتهای ´3 RNA را به موقعیت فعال کاتالیستی (نوکلئوفیلیک یا جایگاه i) بر می‌گرداند و آنزیم را برای پذیرش NTP بعدی محیا می‌کند؛ بنابراین ضروری است که آنزیم تنها به اندازه‌ی یک نوکلئوتید در طول DNA الگو جابجا شود. افزایش جابجایی در شرایط *in vitro* رخ می‌دهد (با افزودن NMP کونژوگه تحریک می‌شود)؛ به همین ترتیب جابجایی به سمت عقب (بازگشت) در شرایط *in vitro* و *in vivo* صورت می‌گیرد و این موضوع نشان می‌دهد که هیچ مانع فعال‌سازی قابل‌توجهی برای هر دوی این فرآیندها وجود ندارد. مکانیسم محدود کردن جابجایی آنزیم به اندازه‌ی یک نوکلئوتید، شناخته شده نیست و تا کنون جابجایی در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی (MD) بازسازی نشده است. مدل‌های کریستالوگرافی وجود دارند که ممکن است عوامل جابجایی را در برداشته باشند؛ اما چشم‌اندازهایی که آنها ارائه می‌دهند برای ساخت دینامیک مولکولی مشخص یا مکانیک مولکولی (MM) مسیر جابجایی RNA پلیمراز کافی نیستند. پیشنهاد شده است که "ورود تیروزین" (Rpb2 Tyr769) با ایجاد ممانعت فضایی از چسبیدن باز پشت سر اولین نوکلئوتید RNA ای که به سمت عقب برمی‌گردد؛ از نظر فیزیکی بازگشت را محدود می‌کند. همچنین وسوسه‌انگیز است که فرض شود قابلیت تغییر شکل پذیری[1] باصطلاح هلیکس (Rpb1 815–845)، طول دخیل در جنبه‌های مختلف چرخه رونویسی، مرحله‌ی جابجایی تک نوکلئوتیدی به سمت جلو را تعیین می‌کنند. هر دو مدل در انتظار بررسی‌های تجربی و محاسباتی بیشتر هستند. اندازه‌ی حباب رونویسی همچنین به نظر می‌رسد

[1] deformability

حتی در طول بازگشت یا افزایش جابجایی آنزیم ثابت باقی می‌ماند؛ با این وجود، حباب ممکن است با افزایش اندازه‌ی هیبرید RNA-DNA که منجر به تشکیل لوپ R می‌شود، بزرگتر شده و این شرایط به پایداری ژنوم در داخل بدن آسیب می‌رساند.

اعتقاد بر این است که تراکم NTP از طریق یک مکانیسم کلی دو یون فلزی که برای تمام نوکلئوتیدیل ترانسفرازها مشترک است؛ رخ می‌دهد، این مسئله اولین بار توسط Thomas Steitz بیان شد. ویژگی اصلی این مکانیسم، بکارگیری دو کاتیون منیزیم است که با حداقل دو زیرواحد آسپارتات واقع در جایگاه فعال به صورت هماهنگ عمل می‌کند. بر اساس این مدل کلی، اولین منیزیم (A) موجب پیشروی فرآیند دپروتونه شدن RNA 3 'OH، تسهیل حمله $3'\ O^-$ به آلفا فسفات سوبسترای NTP می‌شود که به نوبه خود موجب تشکیل پیوندهای فسفو دی استری جدید و خروج یک گروه پیروفسفات می‌شود. دومین یون منیزیم (B) در پایداری حالت گذار پنتا کووالانسی شرکت می‌کند. این مکانیسم بیشتر توسط Goldfarb و همکارانش توصیف شده است که نقش اصلی دو کاتیون منیزیم در جایگاه فعال RNA پلیمراز را در واکنش‌های دیگری که توسط این آنزیم کاتالیز می‌شوند؛ مطرح کردند: اگزو و اندو ریبونوکلئازها و اگزو و اندو پیروفسفوریلاز. هندسه‌ی دقیق واکنش با وضوح شبه‌اتمی توسعه یافت که با بررسی گسترده بیوشیمی RNA پلیمراز اشریشیاکلی مطابقت داشت. این واکنش‌ها با وجود اینکه در مسیر اصلی تراکم NTP قرار نگرفته‌اند؛ اما نقش‌های مهمی را در صحت رونویسی و فعال‌سازی مجدد کمپلکس‌های متوقف‌شده و غیره ایفا می‌کنند. RNA پلیمرازهای چند زیرواحدی دارای تریاد مشابهی از زیرواحدهای آسپارتات (Rpb1 Asp481، 483، 485) هستند که به طور دائم پیوند منیزیم A و منیزیم B با NTP را هماهنگ می‌کند و تصور می‌شود در طول هر چرخه افزودن NTP، به جایگاه فعال وارد و از آن خارج می‌شود. آنالیز ساختاری کمپلکس‌های RNA پلیمراز متصل به NTP مرزهای جایگاه فعال را افزایش می‌دهد تا تعدادی از سایر زیرواحدها را در برگیرد و در کاتالیز، هماهنگی یون‌های فلزی یا اتصال سوبسترا شرکت کند.

ترکیب جایگاه فعال و جزئیات شبکه هماهنگی/ تعامل موضوع برخی از بحث‌ها است که ناشی از عدم تجانس گاه به گاه مدل‌های ساختاری با کمپلکس‌های یکسان از نظر مکانیکی می‌باشد. جزئیات اتمی برگرفته از این مدل‌ها باید با

احتیاط در نظر گرفته شوند؛ به این معنا که مدل‌های کریستالوگرافی با توجه به ماهیت خود جایگاه غیرفعال از نظر کاتالیزوری را در نظر گرفته و از نقش میانجی‌گرهای این مسیر تقلید می‌کنند. به منظور جلوگیری از کاتالیز در بلورهای RNA پلیمراز متصل به NTP، NTP ها اغلب توسط آنالوگ‌های غیرقابل‌هیدرولیز خود (مانند مشتقات متیلن α، β GMPCPP یا AMPCPP) ارائه می‌شوند؛ در سایر موارد گروه 3' OH از RNA حذف شده است. این تغییرات به طور مستقیم بر هماهنگی RNA و یا NTP در جایگاه فعال آنزیم تاثیر می‌گذارند؛ در حالی که این تغییرات و سایر برهمکنش‌ها در معرض آرتیفکت‌های تبلور، کیفیت چگالی الکترون و وضوح ساختار محاسباتی هستند. پاتریک کرامر[1] در یکی از مقالات اخیر خود که به تغییر در حالت اتصال NTP اشاره می‌کند؛ بیان کرد که "موقعیت دقیق NTPبه طراحی تجربی بستگی دارد". این نکته بیانگر این واقعیت است که مدل‌های ساختاری کریستالوگرافیک نه تنها بینش‌های بسیار مهمی را نسبت به هندسه و دینامیک واکنش ارائه می‌دهند بلکه همچنین آرتیفکت‌های گاه به گاه که مختص راه‌اندازی آزمایشگاهی هستند؛ می‌توانند به طور چشمگیر بر تفسیر داده‌ها تاثیر بگذارند. متاسفانه محدودیت‌هایی در مورد اینکه چگونه این آرتیفکت‌ها می‌توانند از طریق پیشرفت در طراحی آزمایش‌های کریستالوگرافی اصلاح شوند؛ وجود دارد. تا کنون هیچ مدل کریستالوگرافی از خصوصیات RNA پلیمرازهای چند زیرواحدی، واکنش اضافه شدن NTP را با تمام ساختارهای موجود که بیانگر وضعیت قبل و بعد هستند؛ نشان نداده است. یک امکان جذاب برای کشف مکانیسم واکنش با استفاده از ابزارهای کریستالوگرافی، توسط کاربرد موفقیت‌آمیز کریستالوگرافی اشعه ایکس time-resolved[2] از متراکم شدن dNTP توسط DNA پلیمراز η^{60} فراهم شده است. با ساختن کاتالیست‌هایی که توسط جایگزین کردن کاتیون‌های منیزیم کاتالیزی با کاتیون‌های کلسیم خنثی تثبیت شده‌اند؛ Nakamura و همکارانش توانستند با بازگرداندن منیزیم به سیستم و توقف آن در زمان‌های مختلف با سرد کردن سریع کریستال‌ها تا 77 کلوین، dNTP را اضافه کنند. در نتیجه جزئیات جدیدی از مکانیسم این واکنش شناخته شد؛ به عنوان مثال: حضور سومین کاتیون منیزیم در جایگاه فعال آنزیم همراه با تشکیل پیروفسفات تا قبل

[1] Patrick Cramer

[2] این نوع کریستالوگرافی واکنش‌ها را در چهار بعد (x، Y، Z و زمان) مجسم می‌کند.

از این مشاهده و پیش‌بینی نشده بود. در این مورد، اطمینان در تعیین چگالی الکترونیکی واکنشگرها یا فلزات کاتالیستی به طور قابل توجهی با استفاده از وضوح بالای حدودا 1.5 آنگستروم‌ی مدل‌های کریستالوگرافی، افزایش یافته است؛ در حالی که معکوس این وضعیت برای RNA پلیمراز II درست است که در آن ساختارها به طور معمول در 3-4 آنگستروم مشخص می‌شوند. از این رو، با وجود اینکه متراکم شدن NTP توسط RNA پلیمراز II بایستی مشابه تجزیه و تحلیل کریستالوگرافی time-resolved باشد؛ جزئیات مکانیکی و اتمی دقیق این واکنش تنها با اطمینان از مدل‌هایی با وضوح کمتر از 2 آنگستروم بدست می‌آید. روش‌های مکمل، تجربی و محاسباتی، به منظور جستجوی کامل جزئیات اتمی، سینتیک و ترمودینامیک مکانیسم واکنش گسترش یافته‌اند. این نکته حائز اهمیت است که حتی قدرت قابل‌توجه محاسبات مدرن دینامیک مولکولی و مکانیک مولکولی نمی‌تواند مشکلات موجود در مدل‌های ساختاری اولیه مانند وضوح یا قدرت اصلاح ضعیف را که منجر به صلاحیت فنی آنها می‌شود اما شبیه‌سازی‌های جعلی را ارائه می‌دهند؛ برطرف کند. این واقعیت درک شده است که کیفیت "ساختارها" (مدل‌های کریستالوگرافی) با آنچه در بانک داده پروتئین[3] ذخیره شده تا حد زیادی متفاوت است (اما برای بسیاری از کاربران پایین‌دست غیرقابل‌مشاهده است)؛ همین موضوع موجب معرفی پروتکل‌های اعتبارسنجی ساختاری جدید و بهبودیافته شده است؛ در حالی که بررسی جامع و بازسازی و اصلاح ساختارها در منابعی مانند PDBREPORT (http://swift.cmbi.ru.nl/gv/pdbreport/) و PDB_REDO (http://www.cmbi.ru.nl/pdb_redo/) در دسترس هستند. این ابزارها می‌توانند به ارزیابی و انتخاب مدل‌های کریستالوگرافی کمک کنند؛ مسئله‌ی بسیار مهمی مانند استدلال‌های ساختاری (از جمله استدلال‌های محاسباتی) از بسیاری از جهات به کیفیت مدل اولیه بستگی دارد.

جایگاه فعال RNA پلیمراز

ترکیب حداقلی جایگاه فعال RNA پلیمراز II (شکل 2) همانطوری که از مدل‌های کریستالوگرافی آنزیم مشخص می‌شود؛ علاوه بر ترياد کاتالیتیک (Rpbl Asp481, 483, 485) شامل عوامل دیگری نیز است: زیرواحدهای Rpb2

[3] Protein Data Bank

Asp837 که MgB, Lys987 و Arg1020 را هماهنگ می‌کنند تا پیوندهای هیدروژنی را با تری فسفات سوبسترا تشکیل دهند؛ Rpbl His1085 به عنوان یک اسید عمومی کاندید است؛ Arg446, Asn479 و Gln1078 که با 2'OH سوبسترا پیوند برقرار می‌کنند و ممکن است در باز شناسایی NTP ها شرکت کند و Leu1081 که مجاور باز NTP قرار گرفته است. عناصر غیرپپتیدی جایگاه فعال شامل 2 یون منیزیم کاتالیتیک و نوکلئوتید الگو است که با NTP ورودی، جفت باز واتسون کریک را تشکیل می‌دهد و نوکلئوتید انتهای ´3 RNA که قبل از حمله نوکلئوفیلیک کنار باز NTP سوبسترا قرار دارد. Gln1078, Leu1081 و His1085 درون یک ماژول ساختاری متامورفیک از RNA پلیمراز احاطه شده‌اند که به اصلاح لوپ هدف (TL، زیرواحدهای Rpb1 1100-1070) نامیده می‌شود. به طور گسترده‌ای اعتقاد بر این است که TL دو کونفورماسیون الزامی اتخاذ می‌کند: کونفورماسیون باز با راس بدون ساختار در غیاب NTP و کونفورماسیون بسته که لزوما یک ساختار سنجاق سری آلفا هلیکس است و بعد از اتصال NTP سوبسترا تشکیل می‌شود (شکل 3). انتقال بین این دو کونفورماسیون لوپ هدف، یکی از تغییر شکل‌پذیرترین عناصر RNA پلیمراز است که اغلب در آنزیم‌های باکتریایی دیده می‌شود؛ در حالی که در RNA پلیمراز II مخمر این لوپ حتی در حضور سوبسترا، نمی‌تواند کونفورماسیون‌های مختلف را بگیرد. به طور قابل‌توجهی، با تاکید بر اهمیت هماهنگی صحیح فسفات توسط زیرواحدهای لوپ هدف (عمدتا His1085) در اتصال و کاتالیز، TL در این کمپلکس‌ها تمایل دارد در حضور UTP یا GTP کونفورماسیون بسته داشته باشد و زمانی که به ∝، β- مشتقات متیلن GMPCPP (شکل 3) متصل می‌شود به صورت باز باقی می‌ماند.

نقش Asn479 تغییرناپذیر در بازشناسی قند ریبوز بر اساس مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی RNA پلیمراز باکتریایی، سوالی بود که توسط کورنبرگ و همکارانش بر اساس آنالیز ساختار RNA پلیمراز II مخمر مطرح شد. اخیرا برهمکنش‌های بین 2'OH و Asn479 در کمپلکس شروع متصل به NTP آنزیم RNA پلیمراز II مشاهده شد و به دلیل غیاب 3'OH در کمپلکس‌هایی که توسط ونگ و همکارانش توضیح داده شد؛ اختلافات ظاهری توسط هماهنگی افتراقی NTP بیان شده است.

جفت‌شدن واتسون کریکی NTP ورودی و نوکلئوتیدهای DNA الگو از بیشترین اهمیت در صحت کلی رونویسی برخوردار است. با این حال، نقش کاتالیزوری این برهمکنش‌ها تا زمانی که Kellinger و همکارانش مجموعه‌ای از ایزواسترهای غیرقطبی نوکلئوتید الگو را در متراکم شدن NTP بررسی نکرده بودند؛ مشخص نشد. این آنالوگ‌های نوکلئوتیدی که از نظر اندازه همانند نوکلئوتیدهای DNA رایج هستند (1 آنگستروم) به طور کامل فاقد پذیرنده/ دهنده‌ی پیوند هیدروژنی بودند و نیاز به بررسی الگوهای پیوند متناوب/ لغزشی[۴] را از بین بردند. به طور قابل‌توجهی، حذف مکمل واتسون کریکی با NTP ورودی، ثابت تجمع پیوندی (KM) را تنها 6 برابر همراه با کاهش حدودا 5600 برابری K_{cat} کاهش داد. این اثر برجسته بر روی کاتالیز به وضوح نشان می‌دهد که مکمل واتسون کریکی با کونفورماسیون مسطح جفت DNA-NTP خود، جهت سوبسترای ورودی را برای دپروتونه شدن و حمله نوکلئوفیلیک بعدی تعیین می‌کند و دلیلی برای ورود نوکلئوتید الگو در میان عناصر کاتالیروزی جایگاه فعال RNA پلیمراز است.

مکانیسم متراکم شدن NTP

نظریه‌ی انتقال نوکلئوتیدیل توسط کاتالیز دو یون فلزی، ماهیت پذیرنده‌ی پروتون برای 3´OH و یا دهنده‌ی پروتونی مشابه برای پیروفسفات را شناسایی نکرد؛ در حالی که آزمایشات موجود مکانیسم کلی انتقال دو پروتون برای DNA و RNA پلیمرازها را نشان دادند و اشاره کردند که پیروفسفات به فرم پروتونه جایگاه فعال را ترک می‌کند. ساختارهای موجود پیوند NTP و RNA پلیمرازهای مخمر و باکتری تنها از مشارکت مستقیم زیرواحدهای خاص در کاتالیز جلوگیری می‌کنند (به عنوان مثال، آن را از جایگاه فعال خیلی دور می‌کنند) اما مکانیسم واکنش و عوامل آن را مشخص نمی‌کنند. برخی از این ساختار اخیرا در دینامیک مولکولی و سایر بررسی‌های محاسباتی مکانیسم پایه تراکم NTP مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

Zhu و Salahub با استفاده از وضوح 4.3 آنگسترومی ساختار بلوری کمپلکس طویل‌سازی RNA پلیمراز II (2nvz57) به عنوان مدل آغازین برای شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، برخی از مکانیسم‌های احتمالی دپروتونه‌شدن 3´OH را بررسی کردند. برای این منظور، آنها از میدان مغناطیسی واکنش‌پذیری مبتنی بر اصول اولیه،

[4] wobbling bonding : جفت‌شدن لغزشی جفت‌شدن بین دو جفت‌باز در مولکول‌های RNA است که از قوانین واتسون کریک تبعیت نمی‌کند.

ReaxFF، برای پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها و مدل اصلی شامل NTP ورودی، نوکلئوتید انتهای ´3 RNA، لوپ کاتالیتیک (Rpb1 481–485)، His1085 و دو زیرواحد آرژنین (766 و 1020) استفاده کردند. این مدل در شبیه سازی تغییر کلی باز در حمله‌ی نوکلئوفیلیک که در آن ´3OH به آلفا فسفات NTP ورودی حمله می‌کند و به طور همزمان توسط عمل زیرواحد کاتالیتیک یعنی Asp485 دپروتونه می‌شود؛ مورد استفاده قرار گرفت. انرژی فعالسازی برای این مسیر واکنش در 19 کیلوکالری/ مول تخمین زده شد.

در یک شبیه‌سازی دیگر (تنها شامل یک لوپ کاتالیتیک و نوکلئوتید انتهای ´3 RNA بود)، ´3OH توسط یک حلال (آب) که قبل از حمله یک نوکلئوفیل تولید می‌کند؛ دپروتونه شد. انرژی فعالسازی برای این گام تنها 7 کیلوکالری/ مول بود. تایید بیشتر سهولت این مرحله، مشاهده خوشه‌بندی مولکول‌های آب در اطراف ´3OH در شبیه‌سازی تعادل است. حمله‌ی نوکلئوفیلیک بعدی ´3O بر NTP، در 17 کیلوکالری/ مول تخمین زده شد؛ از این رو حداکثر انرژی فعالسازی را تا 2 کیلوکالری/ مول کاهش می‌دهد. به طور قابل توجهی، بدون در نظر گرفتن مسیر دپروتونه شدن، جدا شدن پیروفسفات با انرژی فعال‌سازی 23-24 کیلوکالری/ مول، به عنوان مرحله‌ی محدودکننده‌ی سرعت تعیین شد. این محاسبات خروج پیروفسفات را به فرم پروتونه شده و همچنین نقش بالقوه کمک کننده‌ی زیرواحدهای با بار مثبت در کانال ثانویه (مسیر خروج احتمالی برای پیروفسفات) را در نظر نمی‌گیرند که همین عوامل می‌توانند به طور چشمگیری ارزش عددی انرژی فعال‌سازی را تغییر دهند. مدل‌های مورد استفاده در این شبیه‌سازی‌ها نیز کاملا مختصر شده بودند و برخی از زیرواحدهای کاتالیتیکی مهم (به عنوان مثال، Asp837) را نداشتند. این موضوع بر نتایج حاصل از دپروتونه شدن ´3OH با کمک آب و همچنین شبیه‌سازی‌های حمله نوکلئوفیلی و جدایی پیروفسفات تاثیر نمی‌گذارد. در کار بعدی Salahub و همکارانش، محاسبات ReaxFF با استفاده از شبیه‌سازی‌های نظریه‌ی تابع چگالی (DFT)[5] در آنالیز جایگاه فعال RNA پلیمراز II با تمرکز بر حلقه کاتالیزوری (موتیف DFFGD) و هماهنگی منیزیم، تکمیل شدند. آنها از ساختار 3.3 آنگستروم کمپلکس طویل‌سازی RNA پلیمراز II (1i6h67) (EC) قبل از جابجایی برای ساختن مدلی از حلقه کاتالیزوری در RNA پلیمراز II فاقد RNA، اتصال به DNA و کمپلکس

[5] Density functional theory

طویل سازی قبل از جابجایی استفاده کردند؛ مدل حلقه‌ی کاتالیزوری در فرم بعد از جابجایی آنزیم با استفاده از ساختار 4.3 آنگسترومی کمپلکس طویل‌سازی متصل به UTP (1r9s69) ساخته شد. شبیه‌سازی‌هایDFT به مدل‌های اتمی 57، 91 و 108 محدود شده بودند؛ در حالی که محاسبات ReaxFF مبتنی بر مدل اتمی 250 کمپلکس طویل‌سازی بعد از جابجایی آنزیم قبلا توسعه یافته (84) و با 400 مولکول آب انجام شد. با ترکیب این روش ها، Salahub و همکارانش توانستند یک مدل تعادل از هماهنگی منیزیم و NTP در جایگاه فعال RNA پلیمراز II در محلول ایجاد کنند.

با مقایسه‌ی مدل‌های قبل و بعد از جابجایی، نویسندگان به انبساط ساختاری- انقباض حلقه کاتالیزوری در کمپلکس طویل‌سازی بسته به حضور سوبسترا NTP اشاره کردند: این حلقه به محض اتصال NTP فشرده‌تر می‌شود و بعد از تکمیل مرحله‌ی شیمیایی منبسط می‌گردد؛ در حالی که توسط شبکه‌ای منظم از پیوندهای هیدروژنی، اتصال اکسیژن کربوکسیل یک زیرواحد آسپارژین به آمید زیرواحد مجاور پایدار می‌شود. به طور قابل توجهی، انقباض حلقه کاتالیزوری توسط Vassylyev و همکارانش گزارش شده بود؛ آنها ساختارهای آپو هالوآنزیم RNA پلیمراز ترموس ترموفیلوس و پیوند هولوآنزیم با آنتی بیوتیک ریفابیوتین و ریفاپنتین را با یکدیگر مقایسه کردند و این انقباض را با حذف همزمان منیزیم کاتالیتیک از جایگاه فعال مرتبط نمودند (این تفسیر بعدا توسط Ebright و همکارانش به چالش کشیده شد). تغییر در هماهنگی منیزیم به دلیل اتصال عوامل رونویسی GreA/B (باکتری) و TFIIS (یوکاریوت) و ورود شرکای بالقوه منیزیم (هم Gre و هم TFIIS دارای اسیدآمینه های اسیدی محافظت شده هستند و بعد از اتصال RNA پلیمراز در جایگاه فعال قرار می‌گیرند) به عنوان مکانیسمی برای "تغییر"[6] جایگاه فعال از سنتز RNA به شکافت رونوشت پیشنهاد شده است. شباهت ساختاری به عوامل شکافت Gre مانند پروتئین مهاری Gfh1، توسط Darst, Vassylyev و همکارانش برای هماهنگی منیزیم در یک کنفیگوراسیون غیرفعال کاتالیتیک پیشنهاد شد (مکانیسم دیگر فعالیت Gfh1 را در مقاله Tagami و همکارانش (47) ببینید). با توجه به نقش اصلی یون‌های منیزیم در تمام

[6]remodeling

این سناریوها، تغییرات پیشنهادی در کارایی و حتی جهت واکنش کاتالیز شده توسط یک تغییر کوچک در هماهنگی منیزیم ایجاد می شوند؛ از این رو انجام تحقیقات دقیق پیرامون مکانیسم واکنش این کاتیون‌ها ضروری است.

به تازگی، کلیت طرح کاتالیز دو یون فلزی که شروع و پذیرش گسترده‌ی خود را به کار ساختارمند مدیون است؛ بر اساس داده‌های بیوشیمیایی و شبیه‌سازی‌های محاسباتی و حضور اسید آمینه هیستیدین (His1085 در RNA پلیمراز II مخمر) در جایگاه کاتالیتیک به چالش کشیده شد و ظاهرا RNA پلیمراز را به موضوع بررسی‌های اضافه در مورد عملکرد یون منیزیم دوم تبدیل می‌کند (MgB).

بررسی جامع مکانیسم کاتالیزوری RNA پلیمراز II مخمر با استفاده از ابزارهای محاسباتی توسط Maria Ramos و همکارانش انجام شده است. به منظور رسیدن به یک مکانیسم واکنش بی طرفانه، Ramos و همکارانش چهار سناریو فرضی مستقل و تمام تغییرات در کاتالیز کلی دو یون فلزی را بررسی کردند؛ اما هر یک از تغییرات هنوز هم کاندیداهای متمایزی برای دهنده و پذیرنده پروتون دارند. پاسخ این سوال که چه چیزی این کار را از سایر بررسی‌های محاسباتی مکانیسم RNA پلیمراز II جدا می‌کند؛ ترکیب شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی مبتنی بر Gromacs توسط محاسبات انرژی آزاد اختلاط ترمودینامیک (TI)، DFT و مکانیک کوانتوم هیبرید/ روش های مکانیک مولکولی (QM/MM) (DFT:PM3MM) است. این روش جامع ترکیبی یک مدل اتمی کامل با کیفیت بالاتر (قبل از متعادل کردن قطعاتی که در ساختار 3.95 آنگستروم کمپلکس طویل‌سازی متصل به NTP (2e2h) با استفاده از 2nvz و 2e2i از دست رفته بودند) را برای اجرای نظریه تابع چگالی سطح بالا و سطح پایین تر بررسی PM3MM مکانیسم کاتالیتیک بر روی مجموعه گسترده‌ای (نسبت به مطالعات قبلی) از واکنش‌دهنده‌ها (سوبسترا GTP، نوکلئوتید انتهای ´3 RNA، تتراد کاتالیتیک (Asp481, 483, 485 و 837) منیزیم A و B، His1085, Arg446, 766، 1020 و Lys967) و محاسبه مانع فعالسازی انرژی آزاد همراه با هر مکانیسم، ارائه داد. به تازگی اثر جفت باز واتسون کریکی بر روی kcat تراکم NTP مشخص شده که اهمیت الحاق نوکلئوتید DNA الگو در شبیه‌سازی‌های DFT:PM3MM را نشان می‌دهد؛ با این حال، در شبیه‌سازی اتمی کامل دینامیک مولکولی به طور ضمنی به این اثر اشاره شده است.

مکانیسم فرضی دیگری که توسط Ramos و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت شامل: 1) کاتالیز اسید- باز توسط سوبسترا $O\propto$ 2) فرضیه هیدروکسیل آزاد 3) فرضیه اتصال منیزیم A و هیدروکسیل و 4) Asp485 که به عنوان فرضیه کلی باز عمل می‌کند. تمام این مکانیسم‌ها از یک مدل $3'OH$ با هماهنگی ضعیف منیزیم A استفاده کردند؛ به طوری که شبیه‌سازی‌های مقدماتی DFT نشان دادند که دپروتونه شدن $3'OH$ با کمک هماهنگی قوی منیزیم A، محلول‌های غیرثابت با تقریبا 17 کیلوکالری/ مول انرژی بالاتر ایجاد می‌کند؛ در غیر این صورت، هماهنگی قوی $3'OH$ در طول حمله نوکلئوفیلی، به هماهنگی ضعیف تبدیل می‌شود.

اولین مکانیسم شامل دپروتونه شدن $3'OH$ توسط $O\propto$ سوبسترا (کاتالیز با استفاده از سوبسترا) که به عنوان باز عمل می‌کند و بعد از آن حمله نوکلئوفیلی بر روی آلفا فسفات و پروتونه شدن پیروفسفات توسط $O\propto$ که به عنوان اسید عمل می کند؛ رخ می دهد. جذابیت این مکانیسم در سادگی و مطابقت آن با فرضیه انتقال دو پروتون است؛ این مکانیسم واکنش که به موجب آن اختلاط ترمودینامیکی یک انرژی فعالسازی بسیار بالا برای مرحله دپروتونه شدن ایجاد می‌کند؛ انرژی فعالسازی به اندازه 34.9 کیلوکالری/ مول (نویسندگان برآورد کردند که بالاترین انرژی فعالسازی برای تراکم NTP $\leq$ 18.1 کیلوکالری/ مول است) را بین واکنش دهنده‌ها[7] و حالت انتقال به وجود می‌آورد. بر اساس محاسبات اختلال ترمودینامیک، این مکانیسم رد شده است.

دومین مکانیسم واکنش از هیدروکسیل آزاد حلال به عنوان پذیرنده پروتون برای دپروتونه شدن $3'OH$ استفاده کرد. در تخمینی که توسط Florian و همکارانش انجام شد؛ انرژی آزاد مورد نیاز برای دپروتونه شدن $3'OH$ به کمک هیدروکسیل در pH خنثی، 1.5-3 کیلوکالری/ مول بود؛ همین عامل یون هیدروکسید موجود در محلول را به جایگزین جذابی برای سوبسترای بازی تبدیل کرد. این مقدار حتی از تخمین Zhu و Salahub برای انرژی فعالسازی در دپروتونه شدن $3'OH$ توسط آب (7 کیلوکالری/ مول) کمتر است. مکانیسم واکنش بر اساس این سناریو شامل انتقال هیدروکسیل از حلال به جایگاه فعال RNA پلیمراز، دپروتونه شدن $3'OH$ توسط هیدروکسید، پروتونه شدن $O\beta$ توسط His1085 که به عنوان یک اسید عمومی عمل می‌کند و سپس حمله نوکلئوفیلی بر آلفا فسفات و خروج

[7] reactant

پیروفسفات از جایگاه فعال (شکل 4)، است. ورود هیدروکسید به جایگاه فعال در pH خنثی به نظر می‌رسد با انرژی فعالسازی 7.5 کیلوکالری/ مول مرتبط باشد؛ بالاترین انرژی فعالسازی برای کل واکنش به 9.9 کیلوکالری بر مول می‌رسد- حدود نیمی از تخمین برای مرحله محدود کننده سرعت تراکم NTP و تغییر انرژی آزاد کل 5.8- کیلوکالری/ مول است که موجب می‌شود مسیر واکنش از نظر سینتیک و ترمودینامیک امکان‌پذیر باشد.

سومین مسیر واکنش که توسط Ramos و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت؛ با فرضیه‌ی دوم مشابه بود و شامل پروتونه شدن پیروفسفات توسط His1085 است؛ اما دپروتونه شدن 3´OH توسط هیدروکسیل متصل به منیزیم A انجام شد و در عوض هیدروکسید متصل به 3´OH از حلال منتقل گردید. موقعیت هیدروکسیل در قلمرو هماهنگی منیزیم A موجب بازآرایی مجدد واکنش‌دهنده‌ها به خصوص $O_{2\beta}$ در سمت چپ قلمرو هماهنگی منیزیم می‌شود؛ در حالی که pKa $O_{1\beta}$ موقعیت تعمیم خودبخودی پروتون را از His1085 و هندسه هماهنگی منیزیم A به سوی چهار ضلعی افزایش داد. انرژی کلی سیستم هیدروکسیل هماهنگ شده توسط منیزیم 10.8 کیلوکالری/ مول بالاتر از برخی از سیستم‌ها در فرضیه دوم که حاوی هیدروکسید جداشده از منیزیم است؛ می‌باشد. سطح انرژی بالقوه برای کل واکنش، انرژی فعالسازی 31.7 کیلوکالری/ مول و تغییر کل انرژی آزاد 5.8- کیلوکالری/ مول را نشان می‌دهد. این مکانیسم از نظر ترمودینامیک با مکانیسم واکنش قبلی مشابه است؛ این مسیر به وضوح از نظر سینتیک نامطلوب است و انرژی فعالسازی 3 برابر بالاتر از واکنش هیدروکسیل آزاد (مسیر 2) را ایجاد می‌کند.

چهارمین و آخرین مکانیسم واکنش که توسط Ramos و همکارانش بررسی شد مشابه سناریوی دوم بود که در شبیه‌سازی‌های ReaxFF توسط Zhu و Salahub مدلسازی شد که در آن دپروتونه شدن 3´OH توسط زیرواحدهای کاتالیتیک Asp485 همزمان با حمله نوکلئوفیلی 3´OH به آلفا فسفات رخ می‌دهد. انرژی آزاد فعالسازی برای این واکنش به 26.2 کیلوکالری/ مول رسید که از انرژی آزاد در مکانیسم 1 و 3 پایین‌تر است؛ اما هنوز بالاتر از مسیر 2 (9.9 کیلوکالری/ مول) است و برای مرحله محدودکننده‌ی سرعت تراکم NTP (18.1 کیلوکالری/ مول) تخمین زده شده است؛ تغییر انرژی آزاد کل برای واکنش از نظر ترمودینامیک نامطلوب و 14.5 کیلوکالری/ مول بود.

آنالیزهای قبلی بر مزایای ترکیب شبیه‌سازی مولکولی با اختلاط ترمودینامیک تاکید کردند و نشان ندادند این دو روش با هم امکان رتبه‌بندی جامع مسیرهای واکنش نامطلوب را از نظر سینتیک و ترمودینامیک فراهم می‌آورند. این موضوع نشان می‌دهد که با وجود اینکه تراکم NTP در طول مسیری که در آن هیدروکسیل آزاد موجود در حلال به صورت یک باز عمل می‌کند و His1085 به عنوان اسید عمومی بهترین کاندید از نظر ترمودینامیک و سینتیک است؛ مکانیسم جایگزین نامطلوب از نظر سینتیک ممکن است فعالیت انواع آهسته RNA پلیمراز را کنترل کند و یا سرعت افزودن نوکلئوتید به کمپلکس طویل‌سازی متوقف شده را کاهش دهد.

آزاد شدن پیروفسفات و جابجایی

شبیه‌سازی دقیق تراکم NTP و تشکیل پیروفسفات که قبلا بررسی شد؛ مکانیسم انتشار پیروفسفات از جایگاه فعال را مد نظر قرار نداده است. با این حال، یک ابهام فنی مهم این است، آزاد شدن پیروفسفات نه تنها با جابجایی در فرضیه "قدرت- ضربه" (این فرضیه عمدتا بر اساس مطالعات مبتنی بر RNA پلیمرازهای تک زیرواحدی است) مرتبط نیست بلکه خواندن جایگاه فعال برای بارگذاری NTP بعدی ضروری است. RNA پلیمرازهای چند زیرواحدی از جمله RNA پلیمراز II مخمر با مکانیسم "قدرت- ضربه" عمل نمی‌کنند؛ بلکه همانند موتورهای هم‌دما[8] "گیره براون" رفتار کرده، به عقب برمی‌گردند و تنها با انرژی گرمایی در طول رشته به سوی جلو حرکت می‌کنند. بر اساس این فرضیه، آزاد شدن پیروفسفات از جابجایی جدا شده است.

با وجود حجم زیادی از اطلاعات بیوشیمی، کریستالوگرافی و بیوفیزیک، فرضیه گیره‌ی هم دما برای مکانیسم آزاد شدن پیروفسفات در سطح اتمی و مراحل جابجایی و آزاد شدن ارائه نشده است. این وقایع توسط Huang و همکارانش به وسیله‌ی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، آنها مجددا پلی‌پپتیدهای از دست رفته در ساختار 3.95 آنگسترومی کمپلکس طویل‌سازی RNA پلیمراز II مخمر (2e2h) را با استفاده از نرم‌افزار مدلسازی همولوگ SWISS-MODLE تولید کردند و با استفاده از li6h به عنوان الگو، 3´OH حذف شده از کمپلکس متصل به GTP را بازسازی نمودند. مدل اولیه برای آزاد شدن پیروفسفات توسط شکستن پیوند بین آلفا فسفات- اکسیژن در

[8] isothermal

GTP در 2e2h ساخته شد. شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GROMACS 4.5 همراه با میدان مغناطیسی AMBERO3 انجام شدند. به منظور بررسی دینامیک شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، نویسندگان مدل Markov State را برای شناسایی ترتیب چینش مولکول‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSMBuilder بکار بردند.

Huang و همکارانش در آنالیز نهایی گروهی که جایگاه فعال را ترک کرده بودند؛ به عنوان یک گروه غیرپروتونه $(Mg\text{-}PPi)^{2-}$ در نظر گرفتند و باور داشتند این فرم غالب‌تری از پیروفسفات در شرایط فیزیولوژیک است؛ این موضوع نشان می‌دهد که شبیه‌سازی‌های مقدماتی به طور متفاوتی پروتونه می‌شوند اما عملکرد مشابهی دارند. آزادشدن پیرو فسفات به صورت دستی در جهت‌های مختلف از جایگاه فعال به سوی منفذ/ کانال ثانویه منحرف شد تا مسیرهای انتشار تصادفی شبیه‌سازی شوند.

مشاهده‌ی فوری مهم که با مقایسه‌ی شبیه‌سازی‌های قبلی و بعدی ساختار شیمیایی صورت گرفت این بود که تشکیل پیروفسفات منجر به بی‌ثباتی قابل‌توجه فرم بسته‌ی لوپ هدف می‌شود. اگر نوسانات کمپلکس طویل‌سازی قبل از شبیه‌سازی زیرواحدهای راس لوپ هدف (Gln1078 به Ala1087)، کمتر از میانگین طول Rpbl بود (RMSF 0.78 آنگستروم در برابر 1.63 آنگستروم)؛ دامنه‌ی نوسانات کمپلکس همان زیرواحدها بعد از شبیه‌سازی به طور متوسط دو برابر می‌شد؛ در حالی که برای مجموعه‌ی مرجع تقریبا یکسان باقی می‌ماند. به طور قابل‌توجهی، تشکیل پیروفسفات و عدم پایداری لوپ هدف موجب از بین رفتن برهمکنش‌های بین زیرواحد Gln1078 و 3´OH سوبسترا، بین بازشناسنده ریبو Asn479 و 2' OH سوبسترا و افزایش حرکت His1085 و Phe1086 می‌شود. در واقع پیروفسفات که به عنوان هدف جدید مشاهده شد؛ با Rpb1 Lys752 و His1085 دروازه‌ی اولیه برای انتشار پیروفسفات تشکیل داد (شکل 5). شکستن پیوند لوپ هدف بسته با RNA و افزایش ناپایداری راس آن با تشکیل پیروفسفات تسریع می‌شود و احتمالا به عنوان نقطه شروعی برای تبدیل لوپ هدف به کنفیگوراسیون باز و جابجایی آنزیم عمل می‌کند. Huang و همکارانش تاکید داشتند که جابجایی را در شبیه‌سازی خود مشاهده نکردند و در تخمین آنها مقیاس زمان حذف پیروفسفات از جایگاه فعال (حدودا 1.5 میکروثانیه) چندین دامنه کوتاه‌تر از تراکم

NTP است و این موضوع دلیلی برای ارتباط انتشار پیروفسفات و جابجایی است. شبیه‌سازی انتشار پیروفسفات ارتباط قوی بین انتشار و عدم پایداری لوپ هدف بسته را نشان می‌دهد: نه تنها تشکیل پیروفسفات منجر به افزایش حرکت زیرواحدهای راس لوپ هدف می‌شود بلکه به نوبه خود حرکت ذاتی لوپ هدف به نظر می‌رسد انتقال از جایگاه هدف به وضعیت کم‌ثبات ثانویه (موقعیت hopping[9]) به سوی منفذ/ کانال ثانویه را تسریع می‌نماید. مسیر کلی انتشار پیروفسفات فرم hopping را بین چهار وضعیت کم‌ثبات که به طور متوالی از جایگاه فعال از جایگاه فعال دورتر می‌شدند؛ ایجاد کرد (شکل 5). وضعیت دروازه S1 فرم بعد از شبیه‌سازی است که در آن $(Mg\text{-}PPi)^{-2}$ برهمکنش‌هایی را با Lys752 علاوه بر برهمکنش‌های از قبل موجود با His1085 تشکیل می‌دهد. وضعیت دوم توسط حرکت $(Mg\text{-}PPi)^{-2}$ دورتر از جایگاه فعال و برهمکنش‌های اضافی با Lys619 تعریف شده است؛ در حالی که پیوندهای بین Lys572 و His1085 حفظ می‌شوند. این پیوندها در طول انتقال به وضعیت سوم (S3) که در آن $(Mg\text{-}PPi)^{-2}$ با Lys619 و Lys518 برهمکنش می‌کند؛ شکسته می‌شوند. در مرحله بعد و آخرین مرحله، قبل از انتشار $(Mg\text{-}PPi)^{-2}$ از منفذ، $(Mg\text{-}PPi)^{-2}$ به Lys620 و Lys880 متصل می‌شود. Hopping به عنوان ابزار تسهیل انتشار در امتداد فواصل به طور گسترده در آنزیم‌های DNA و RNA پلیمراز مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ از جمله انتشار از خود RNA پلیمراز.

این شبیه‌سازی‌ها همچنین نقش محرک His1085 در انتشار پیروفسفات و نقش آن در اتصال NTP و مرحله شیمی (به عنوان اسید عمومی عمل می‌کند) را برجسته می‌کنند؛ در این سیستم که در آن این آمینواسید با فنیل‌آلانین جایگزین شده بود؛ پیروفسفات تمایل داشت در جایگاه فعال به دام بیفتد. این جایگزینی‌ها می‌توانند از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گیرند: کورنبرگ و همکارانش مرگبار بودن تعویض His1085Phe و نقص شدید رونوشت تولید شده در شرایط آزمایشگاه را که در آن هیستیدین با تیروزین تعویض شده بود را گزارش کردند. در حالی که این آزمایشات بر اهمیت کاربردی زیرواحد هدف تاکید کرده بودند؛ تعویض آمینو اسید می‌تواند بر بیش از یک

[9] انتقال پروتون/ حفره/ الکترون و غیره که بعد از آن اوربیتال‌های گونه‌های مختلف در فرآیند درگیر می‌شوند؛ یعنی تمام مولکول‌هایی که بین دهنده و پذیرنده هستند.

پارامتر تاثیر بگذارد که همین امر علاوه بر کاتالیز، ساختار پروتئین، پایداری، دینامیک (آلوستری) و غیره بر نتایج آزمایش‌های ژنتیک و بیوشیمی تاثیر می‌گذارد. دستکاری‌های شیمیایی که با استفاده از شبیه‌سازی‌های QM/MM (مانند جایگزینی هیستیدین با فنیل آلانین در مدل بعد از شبیه‌سازی) انجام شده بودند؛ امکان بررسی اثرات این تعویض‌ها را بر روی هر مرحله (به عنوان مثال، انتشار پیروفسفات) به صورت جداگانه بدون تاثیر بر عوامل دیگر (مانند شیمی ساختارها) فراهم می‌کنند؛ از این رو این دستکاری‌ها نه تنها مکمل هستند بلکه به تفسیر رفتارهای پیچیده که در شرایط *in vivo* و *in vitro* مشاهده می‌َشوند؛ کمک می‌کنند. اثرات متقابل بین جابجایی، دینامیک لوپ هدف و انتشار پیروفسفات اخیرا از نظر بیوشیمیایی توسط Belogurov و همکارانش بررسی شده است. در راه‌اندازی آزمایشگاهی اولیه که با استفاده از خاموش کردن فلوروفورهای متصل به DNA الگو و بهبود تشخیص فلورسانس منتشره از پیروفسفات، امکان نظارت بر جابجایی آنزیم RNA پلیمراز اشریشیا کلی در زمان واقعی را فراهم کرد؛ نویسندگان توانستند نشان دهند که جابجایی و انتشار پیروفسفات به درون محلول در مقیاس زمانی مشابهی (به ترتیب t ½ از 7-12 میلی‌ثانیه و 6-9 میلی‌ثانیه) رخ می‌دهند؛ جابجایی یا قبل از انتشار و یا همزمان با آن انجام می‌شود. هر دو مرحله نسبت به مرحله شیمیایی با تاخیر انجام می‌شدند. Belogurov و همکارانش نیز نشان دادند که با عملکرد گیره براونی، RNA پلیمراز می‌تواند از طریق باز یا بسته‌کردن جایگاه فعال توسط لوپ هدف در جهت جابجایی حرکت کند و جایگاه فعال به نفع حرکت رو جلو آنزیم باز می‌شود. با توجه به یافته‌های Da و همکارانش که انتشار پیروفسفات را به باز بودن لوپ هدف مرتبط می‌کردند؛ می‌توان به ویژگی‌های فرضیه "قدرت- ضربه" و "گیره هم‌دما" در فعالیت پس از شبیه‌سازی RNA پلیمراز پی برد.

نتیجه‌گیری

اگرچه ممکن است به نظر برسد "مکانیسم پایه سنتز mRNA در طول رونویسی ژن از نظر ساختاری ناشناخته است"، با توجه به مطالعاتی که در اینجا بررسی شدند می‌تواند دید که همان مدل‌های کریستالوگرافی RNA پلیمراز II می‌توانند با تعدادی از مکانیسم‌های واکنش کاملا متفاوت سازگار باشند؛ از این رو می‌توان با استفاده از روش‌های مکمل مانند MD و IT، از نظر سینتیک و ترمودینامیک آنها را رده‌بندی کرد. در حقیقت، بسیاری از مکانیسم‌های

رونویسی که تا به امروز پیشنهاد شده‌اند؛ کمی بیشتر از روایت‌های شفاهی هستند و مراحل واقعی یا حدسی را بدون توجه به پارامترهای فیزیکی (مانند سطح انرژی بالقوه، مانع فعال‌سازی، سرعت اولیه برای برخورد مولکولی[10] و غیره) که سهولت آنها را تعیین می‌کنند؛ ذکر می‌نمایند. اکتشافات ساختاری و محاسباتی مکانیسم پایه رونویسی، پیچیدگی این فرآیند را روشن می‌کنند و اغلب مراحلی که کاملا درک نشده‌اند به صورت مدل فیزیکی شیمیایی با وضوح اتمی مدلسازی شده‌اند. جزئیات مکانیسم تراکم نوکلئوتید و ارتباط آن با دینامیک لوپ هدف مشخص شده‌اند و با مکانیسم جابجایی فیزیکی مرتبط می‌شوند. پایه‌های مکانیکی و ساختاری برای دینامیک فرآیند جابجایی آنزیم، برگشت به عقب، توقف[11]، شروع و خاتمه هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌اند.

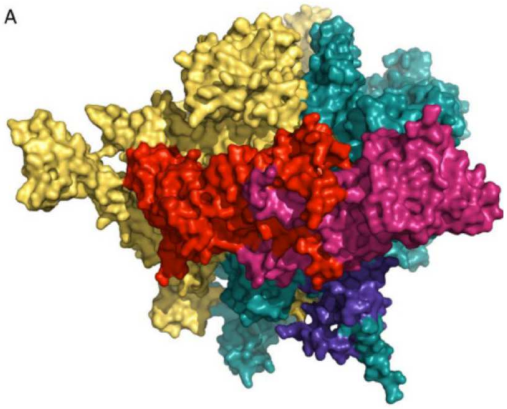
نکات برجسته

تراکم NTP توسط RNA پلیمراز II با استفاده از کاتالیز دو یون فلزی اصلاح‌شده رخ می‌دهد.

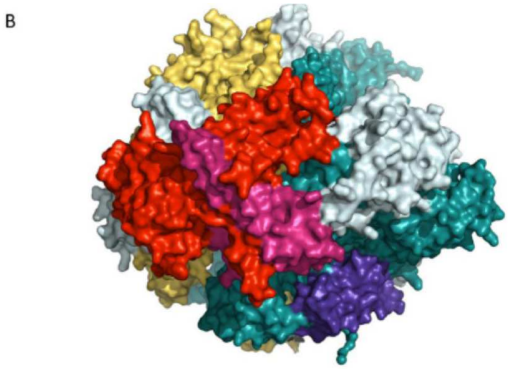
آزادسازی پیروفسفات در منفذ آنزیم و از طریق مکانیسم hopping صورت می‌گیرد.

انتشار پیروفسفات با باز شدن لوپ هدف مرتبط است.

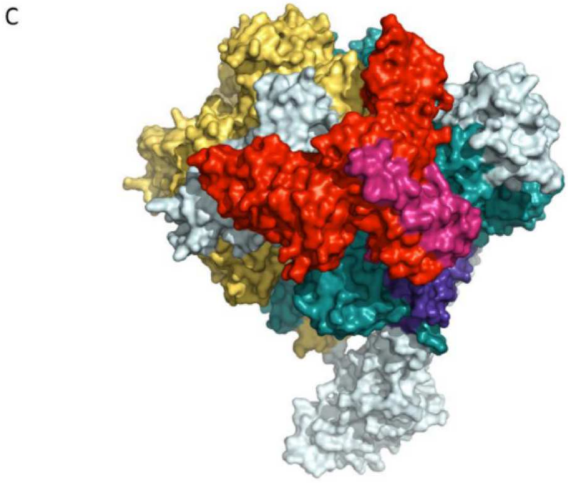
[10] molecular collisions
[11] arrest



شكل 1a



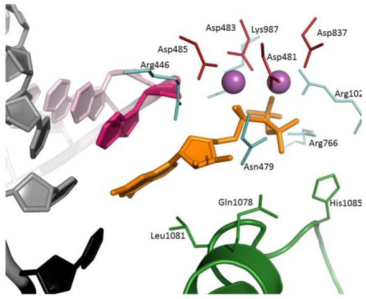
شكل 1b



شكل 1c

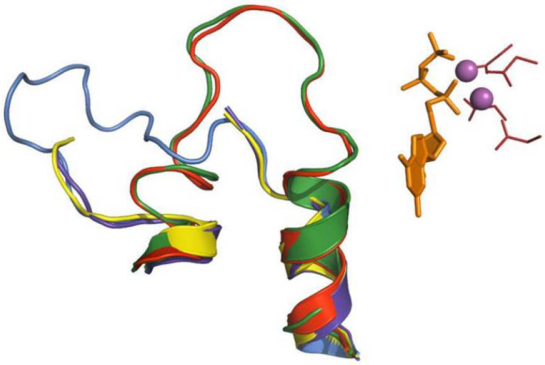
شکل 1. اورتولوگ هسته RNA پلیمراز باکتریایی در یوباکتری ها (A، 3lu0) ، یوکاریوت (B، Inik) و آرکئا (C، 3hkz)

تمام آنزیم ها مسطح هستند؛ خاکستری روشن، زیرواحدهای شبه ´β خاکستری تیره، زیرواحدهای شبه β زرد نارنجی، زیرواحدهای شبه ∝ قرمز و صورتی تیره، زیرواحدهای شبه ω بنفش آبی هستند.



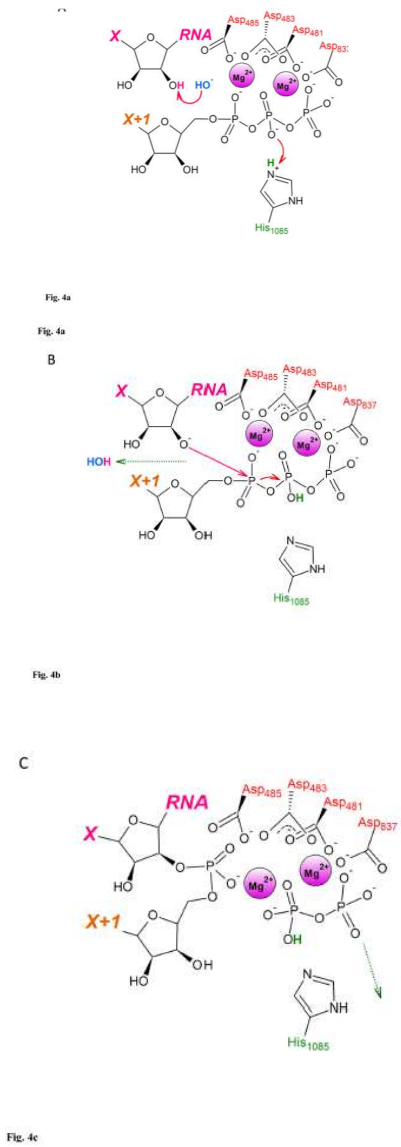
شکل 2. جایگاه فعال RNA پلیمراز II مخمر (2e2h)

DNA الگو به رنگ خاکستری است به جزء نوکلئوتید الگو که سیاه رنگ می‌باشد، RNA صورتی روشن است به جزء نوکلئوتید انتهای ´3 که صورتی تیره است. سوبسترا GTP به صورت میله‌های نارنجی است. کاتیون‌های منیزیم کاتالیتیک، کره‌های بنفش توپر هستند، تتراد کاتالیتیک (Asp481, 483, 485 و 837) به صورت میله‌های قرمز است. لوپ هدف به رنگ سبز است و زیرواحدهای Gln1078, Leu1081 و His1085 به صورت میله های سبز هستند. مابقی اسید آمینه ها به صورت میله‌های خاکستری روشن هستند.



شکل 3. واریته‌های ساختاری لوپ هدف در RNA پلیمراز II مخمر. عناصر جایگاه فعال (از 2e2h متصل به GTP) در شکل 2 نشان داده شده است (سوبستراها به صورت میله‌های نارنجی، کاتیون های منیزیم کاتالیتیک به صورت کره

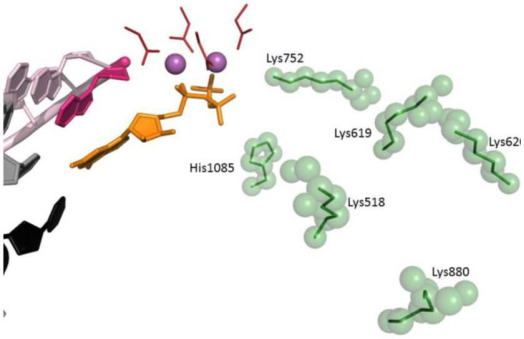
های بنفش توپر و تتراد کاتالیتیک به صورت میله‌های قرمز است). حلقه‌هایی که بر روی هم قرار گرفته‌اند؛ لوپ‌های هدف (کارتونی) در آنزیم فاقد NTP (1sfo، آبی بنفش)، 2e2j متصل به GMPCPP (زرد) و 2nvt (آبی) و 2nvz متصل به UTP (قرمز) هستند.



شکل 4. کاتالیز دو یون فلزی در تراکم NTP توسط RNA پلیمراز II مخمر

A. 3´OH RNA توسط گروه هیدروکسیل حلال دپروتونه شد؛ همانطوری که $O\beta$ سوبسترا توسط His 1085 پروتونه می‌شود. B. حمله نوکلئوفیلیک توسط $3'\ O^-$ RNA به آلفا فسفات. C. سوبسترا به صورت NMP به انتهای 3´ اضافه شد و پیروفسفات به فرم پروتونه (Mg-PPi) جایگاه فعال را ترک کرد. این تصویر از اثر Carvalho و همکارانش

اقتباس شده و مکانیسم واکنش را به صورت یک توالی از مراحل مجزا برای وضوح بیشتر و سهولت آنالیز نشان می‌دهد. آزمایشات ذخیره پروتون که توسط Castro و همکارانش گزارش شده است؛ نشان دادند که این واکنش‌ها می‌توانند در همان وضعیت انتقال مشارکتی انجام شوند.



شکل 5. مسیر hopping انتشار پیروفسفات از جایگاه فعال RNA پلیمراز II مخمر. عناصر جایگاه فعال (از پیوند 2e2h با GTP) در شکل 2 نشان داده شده است. زیرواحدهای آمینواسیدی که در تسهیل آزادسازی پیروفسفات نقش دارند به صورت میله‌های سبز با کره‌های نیمه شفاف سبز هستند.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی