

Protonvezetés fehérjében

OTKA szakmai zárójelentés
2007. február 28.

Témavezető: Maróti Péter
egyetemi tanár, a biológia tudomány doktora

Szalay László (1920-1997) professzorra emlékezve halálának 10. évfordulója alkalmából.

Ama nemes harcot megharcoltam,
futásom bevégeztem,
a hitet megtartottam.

(Pál apostolnak Timóteushoz írt leveléből)



*Dr. Szalay László (1920-1997)
egyetemi tanár, tanszékvezető (1969-1990),
a Biofizikai Tanszék megalapítója (1969)*

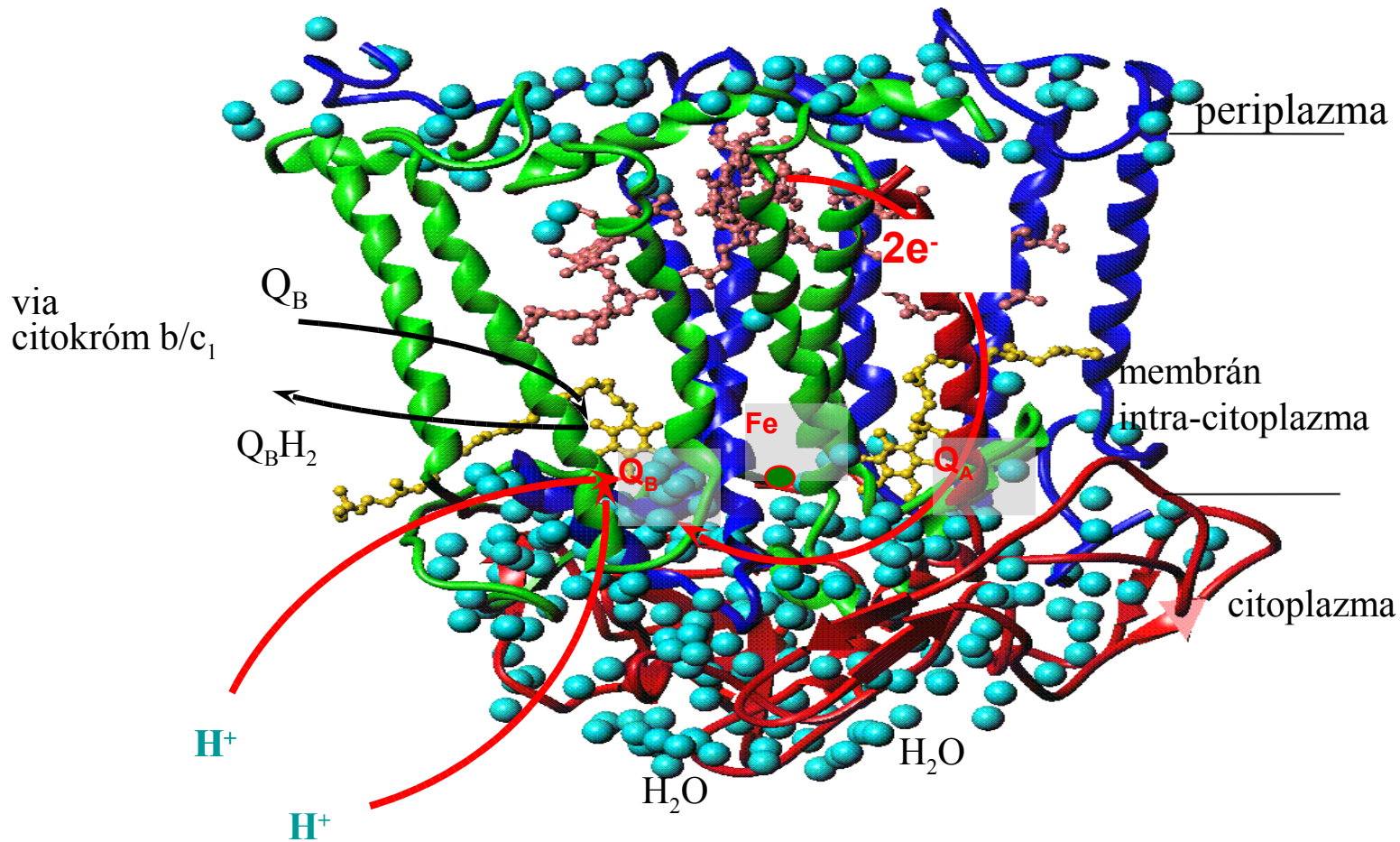
Alapkérdések

- Milyen elvek alapján alkotta meg, és hogyan működteti a Természet az élő rendszerekben (csatorna-fehérjékben, bioenergetikai fehérjékben stb.) a proton transzfert és a proton transzportot?
- Milyen szerepet játszanak a (protonált) vízmolekulák és a hidrogén hidakkal összekötött aminosavak a protonvezetésben?
- Hogyan segítik a protonvezetést a fehérje kofaktorai, a fehérje mozgása (konformáció-változása) és az elektrontranszfer (ha van)?
- Mennyire általánosíthatók az egy-egy fehérjére (esetünkben a bakteriális fotoszintézis reakciócentrumára) megismert tulajdonságok és törvényszerűségek a többi fehérjére?
- Milyen következtetések vonhatók le ezekből az ismeretekből a módosított (pl. mutáció(k)nak alávetett) ill. a mesterségesen előállított rendszerekre?

A beszámoló felépítése

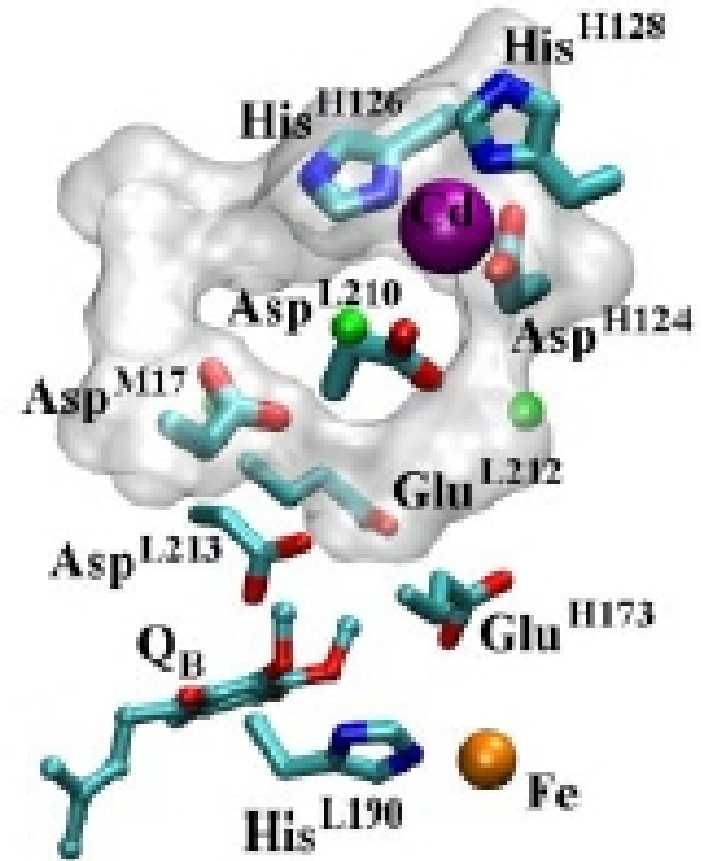
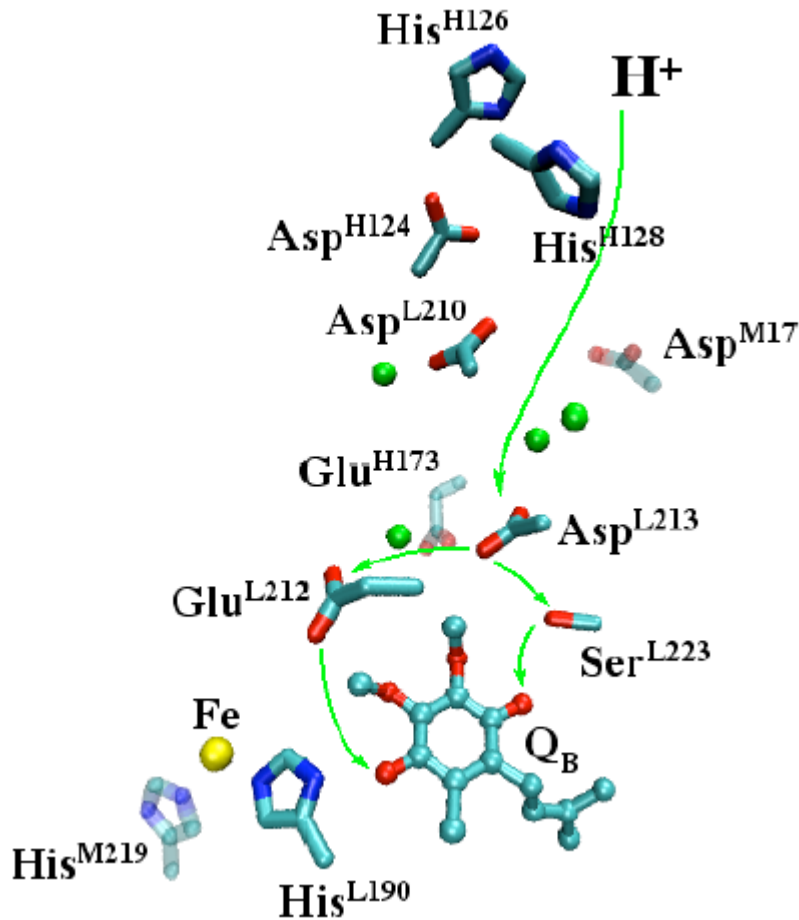
- A vizsgálódásaink közvetlen tárgya: a fotoszintetikus baktériumok reakciócentrum-fehérje rövid bemutatása
- Proton-felvétel flash hatására; egy mutáció (M266HL) kiemelése, taglalása és általánosítható tulajdonságai
- Proton-felvétel folytonos és intenzív gerjesztés hatására (fiziológiai közelítés)
- Alkalmazhatóság más, protonvezető fehérjékre
- Kiemelt eredmények (összegzés)

A reakciócentrum (RC) szerkezete és funkciója (*Rba. Sphaeroides*)



Stowell és mtsi. (1997, pdb 1AIG).

A protonok felvételének útvonalai bakteriális RC-ban.



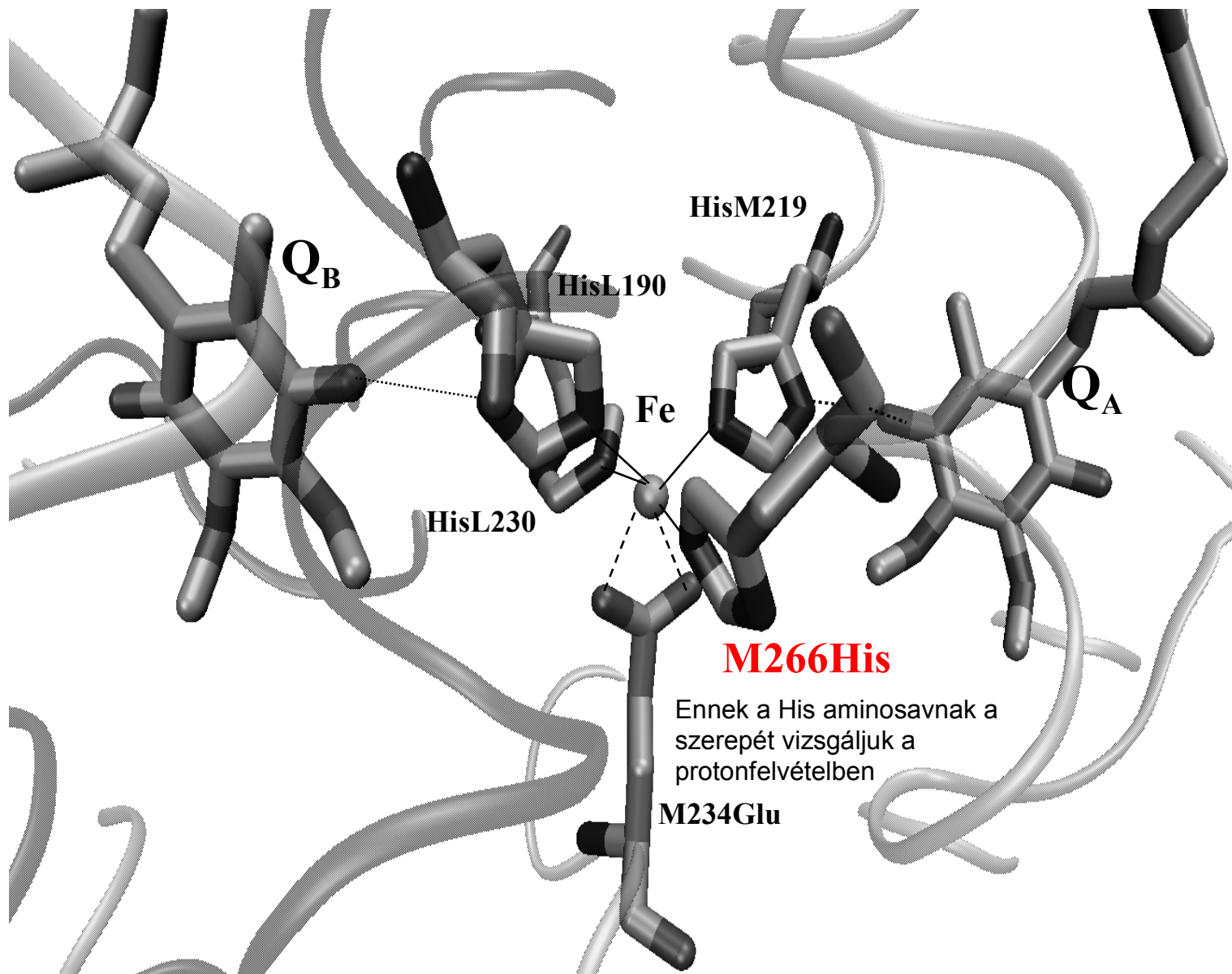
Residues HisH126, HisH128 and AspM17 are at the surface of the protein. The path from the bulk phase to AspL213 is shared by both protons delivered to Q_B . Accompanying the 1st electron to Q_B , GluL212 becomes fully protonated and subsequently donates the 2nd H^+ to Q_BH^+ , after the 2nd electron. The 1st H^+ is delivered in the Q_A^- Q_B^- state via SerL223, prior to the 2nd electron transfer. Water molecules (green) fill some but not all gaps in the putative H^+ pathway. Different positions are occupied in other structures indicating the possibility of water dynamics in the proton delivery.

The view looks down on the entrance. The *white contoured surface* encloses surface residues that define a hole sufficient for weak acid entry, AspH124, HisH126, and AspM17 (also shown in *bond mode*), and ProH172 and GlyM19 (in *contour mode only*). All other residues are buried, except HisH128. Residues are sized to indicate depth of field. The figure was prepared in VMD; structure file was 1dv3.pdb.

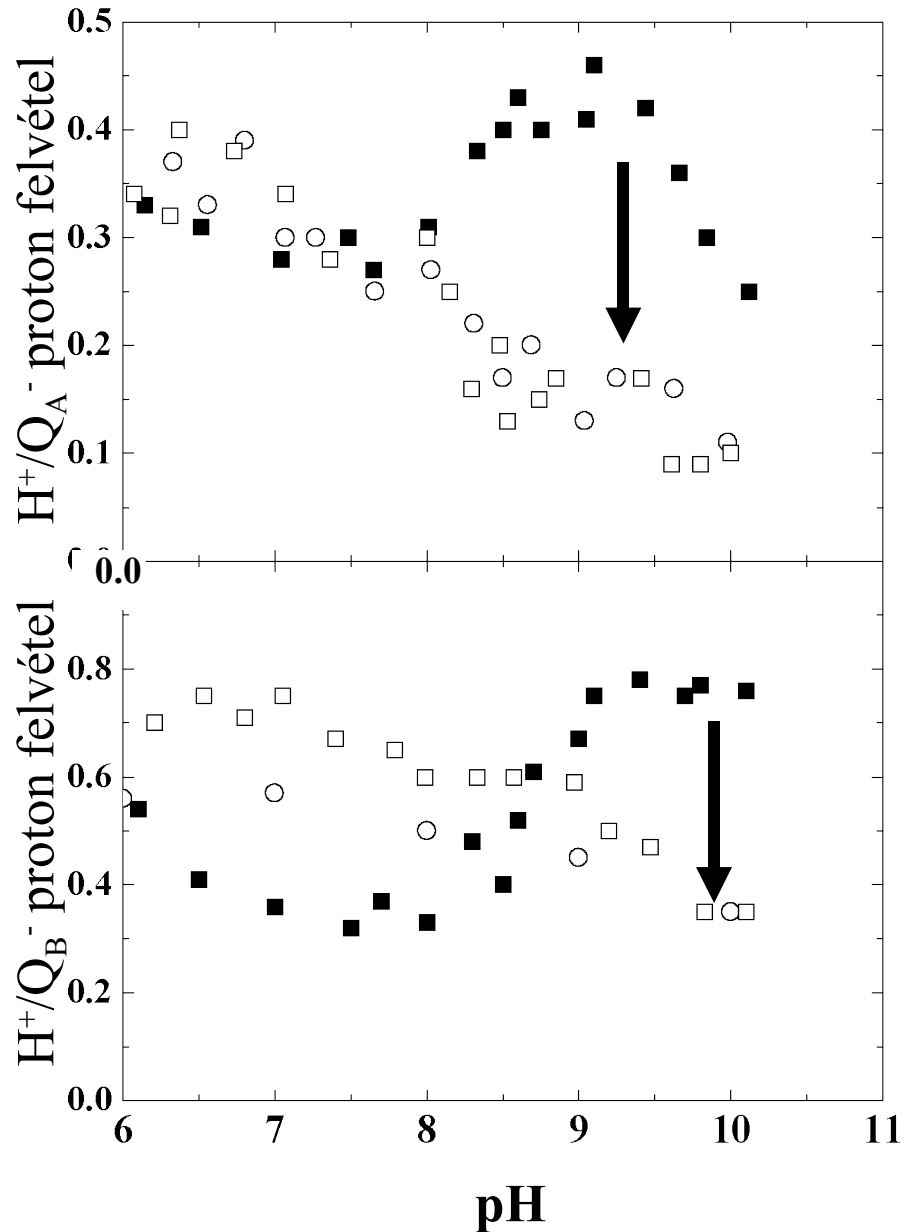
A protont a fehérjében az aminosavak és protonált vízmolekulák kiterjedt hálózata (kollektíven) veszi fel:
a „proton-szivacs” koncepció

Az elv érvényesülését itt csak egyetlen mutáció esetén mutatjuk be. Számos egyéb mutánsra is bizonyítottuk a koncepció létjogosultságát.

Vas-kinonon régió 3D szerkezete (*Rb. sphaeroides*)



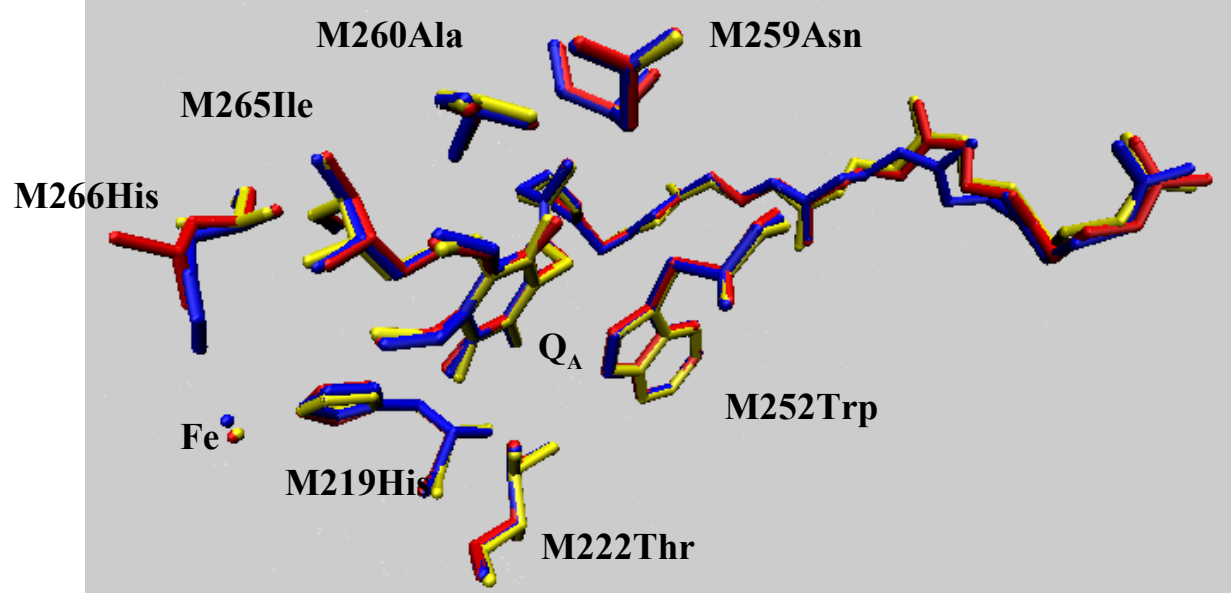
Fényindukált
protonfelvétel
sztöchiometriája
(első flash)



A mutáció
hatására a nyíllal
jelzett magas pH-
jú sáv lecsökken
(eltűnik).

Nem mutatjuk, de
hasonló változást
tapasztaltunk a
protonfelvétel
sztöchiometriája
pH-függésében
számos más
mutáció
esetében is.

Vad típus: ■, 266HA: ○, 266HL: □

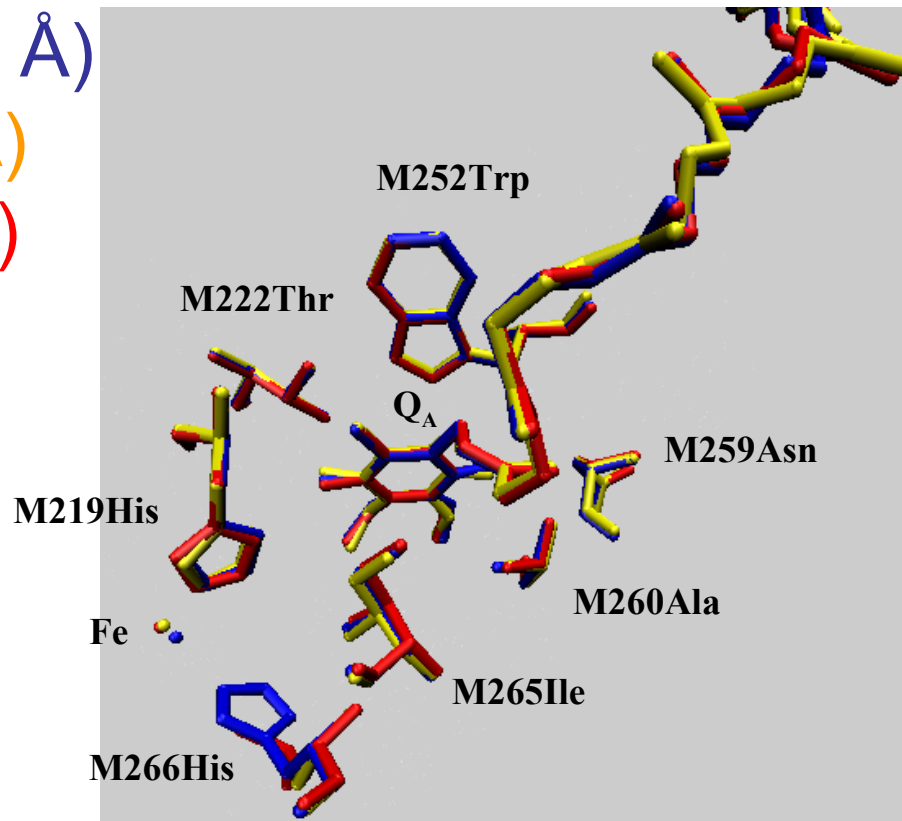


Vad típus (1,87 Å)

M266HA (2,2 Å)

M266HL (2,4 Å)

A protonfelvétel pH-
 függésében
 megfigyelt
 különbség nem
 írható a
 szerkezetben
 esetleg bekövetkező
 változás számlájára.

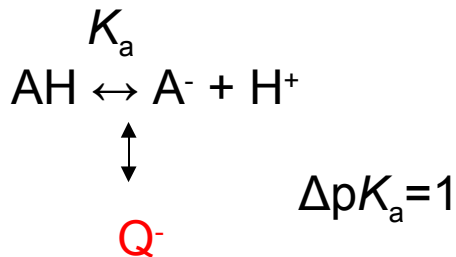
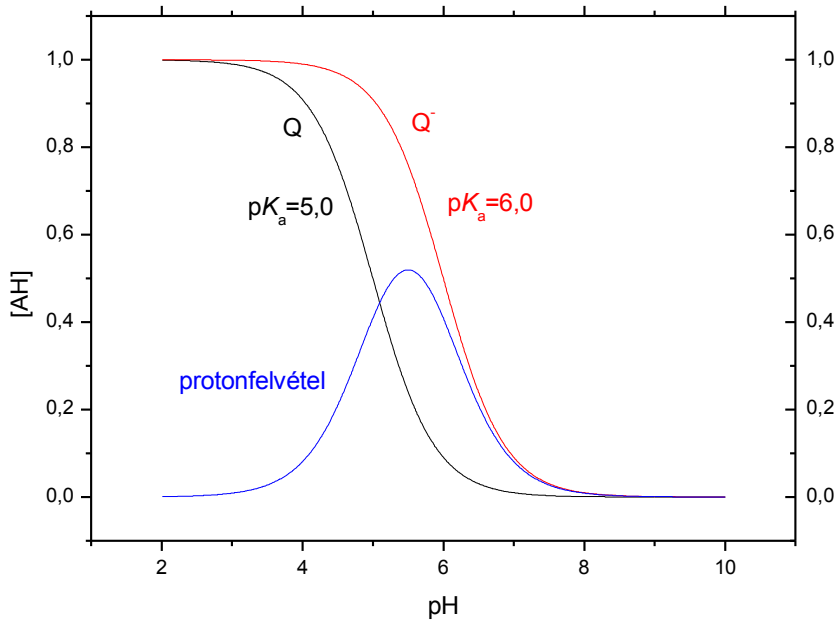


Egymásra-
 vetített Q_A
 közeli 3D
 szerkezetek
 két, a Fe
 atom körül
 elforgatott
 pozícióból

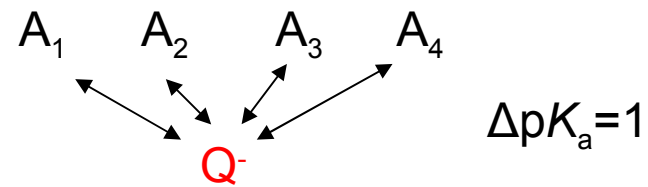
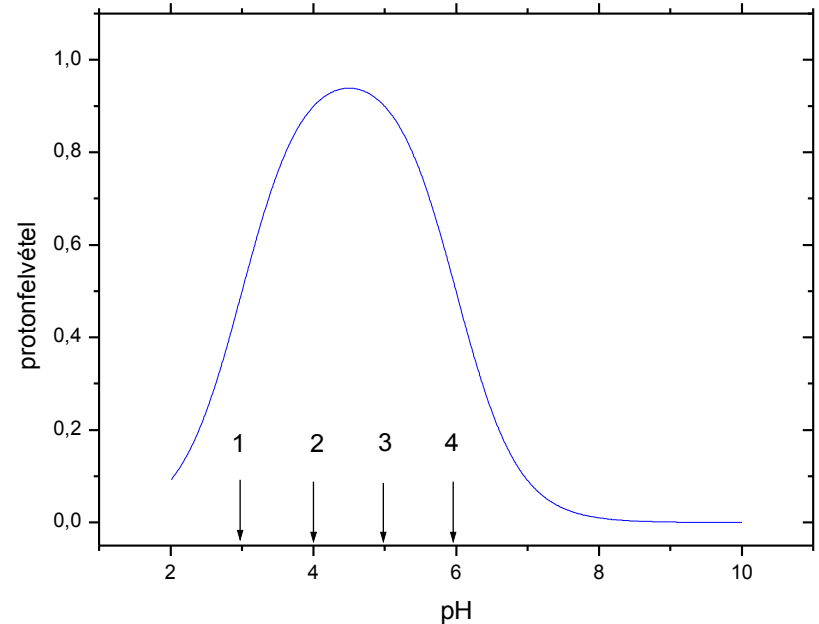
Csak a szemikinonnal (Q^-) kölcsönhatásban álló protonálható csoport(ok) protonfelvétele (modell-számítások)

Egyetlen protonálható csoport:
protonáltsági állapot és protonfelvétel.

Klasszikus Henderson-Hasselbalch összefüggés



Több (4), egymással kölcsönhatásban
nem álló protonálható csoport



mindegyik csoportra

Fenomenológiai modell kölcsönható csoportokra

Tekintsünk egy n db savmaradékból álló klasztert, amelyben a csoportok **semlegesek**, ha protonáltak, és **anionikusak**, ha deprotonáltak.

Ha nincs közöttük kölcsönhatás, akkor a csoportok saját (belső) pK_a értékei $pK_1 \dots pK_n$.

Ha 0 és 1 számokkal jelöljük a protonált, ill. a deprotonált csoportokat, akkor a klaszter tetszőleges protonációs állapotát egy bináris számmal jellemezhetjük. Pl. a {001101} kettes számrendszerbeli szám (= 13 a tízes számrendszerben) azt jelenti, hogy az $n = 6$ számú csoportból álló klaszterben az 1, 2, és 5 csoportok protonáltak (a többiek nem). A protonációs állapotok teljes száma 2^n . Egy adott pH értéken, az i -edik csoport semleges és anionikus állapotai bekövetkezési valószínűségeinek aránya

$$1 : 10^{pH - pK_i}$$

A példánkban megadott konfiguráció (sorszám 13) esetén

$$P_{13}(pH) = \frac{10^{pH - pK_3} \times 10^{pH - pK_4} \times 10^{pH - pK_6}}{D} \quad (1)$$

ahol D a minden lehetséges konfigurációra megadott számlálók összege (a valószínűség 1-re normált).

Vezessük be az elektromosan töltött csoportok közötti kölcsönhatási energiát $RT \times \ln(10) \approx 60 \text{ meV}$ egységekben: $E_{ij} = E_{ji}$. Az i -edik és a j -edik anionikus csoportok közötti kölcsönhatási energia növeli a megfelelő pK_a értékeket: $pK'_i = pK_i + E_{ij}$ és $pK'_j = pK_j + E_{ij}$ (ha csak ezen két csoport közt van kölcsönhatás). Az (1) egyenlet ekkor így alakul:

$$P_{13}(pH) = \frac{10^{(3pH - pK_3 - pK_4 - pK_6 - E_{34} - E_{36} - E_{46})}}{D} \quad (2)$$

A P valószínűség általánosítva így írható fel:

$$P_k(pH) = \frac{10^{\mathbf{B}_k \cdot (\mathbf{M}(pH) \cdot \mathbf{B}_k)}}{\sum_{i=0}^{2^n - 1} 10^{\mathbf{B}_i \cdot (\mathbf{M}(pH) \cdot \mathbf{B}_i)}} \quad (3)$$

Itt \mathbf{B}_i egy olyan vektor, amelynek i -edik eleme az i szám kettes számrendszerbeli alakja. Pl. $\mathbf{B}_{13} = (0, 0, 1, 1, 0, 1)$. $\mathbf{M}(pH)$ egy olyan $n \times n$ elemű mátrix, amelynek nem-diagonális elemei $E_{ij}/2$ és diagonális tagjai $(pH - pK_i)$. Az \mathbf{M} mátrixnak a \mathbf{B} vektorral való skaláris szorzata (kövér ponttal jelölve) figyelembe veszi valamennyi töltéspár kölcsönhatási energiáját.

Mivel a k -adik konfiguráció

$$n - \sum_{i=1}^n (\mathbf{B}_k)_i$$

számú protonálható csoportot tartalmaz (a \mathbf{B}_k vektor elemeinek összege a töltött csoportok számát adja), ezért a kötött protonok átlagos száma:

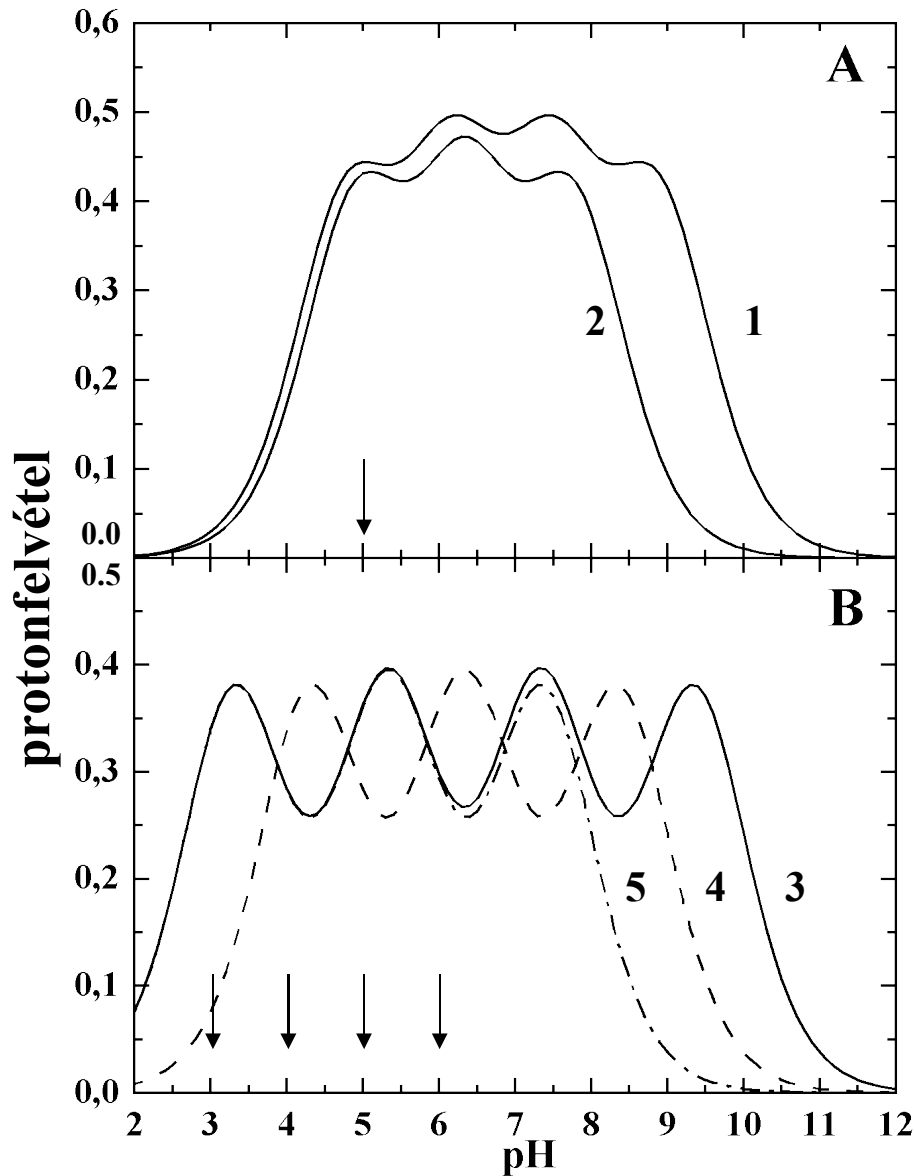
$$H(pH) = n - \sum_{k=0}^{2^n-1} \left(P_k(pH) \sum_{i=1}^n (\mathbf{B}_k)_i \right) \quad (4)$$

Ha anionikus kofaktor (pl. szemikínon Q^-) is jelen van, akkor ezzel mindegyik csoport további negatív Coulomb-kölcsönhatást (V_i) is kialakíthat, amely tovább módosítja a csoport effektív pK_a értékét: $pK_{-i} = pK_i + V_i$. A protonfelvétel sztöchiometriáját kifejező $H(pH)$ függvényt a (3) és (4) egyenletek felhasználásával kapjuk, ha a pK értékeket a Coulomb-kölcsönhatás figyelembe vételével módosítjuk:

$$U(pH) = H^-(pH) - H(pH) \quad (5)$$

Egymással és Q-szal is kölcsönhatásban álló csoportok protonfelvétele

4 csoport,
kölcsönhatási
energiák:
-60 meV
egymással,
-40 meV
Q-szal



Mindegyik csoportra a kölcsönhatás nélküli $pK_a = 5,0$

1: mind a 4 csoport jelen van

2: egy csoportot kiveszünk (3 marad)

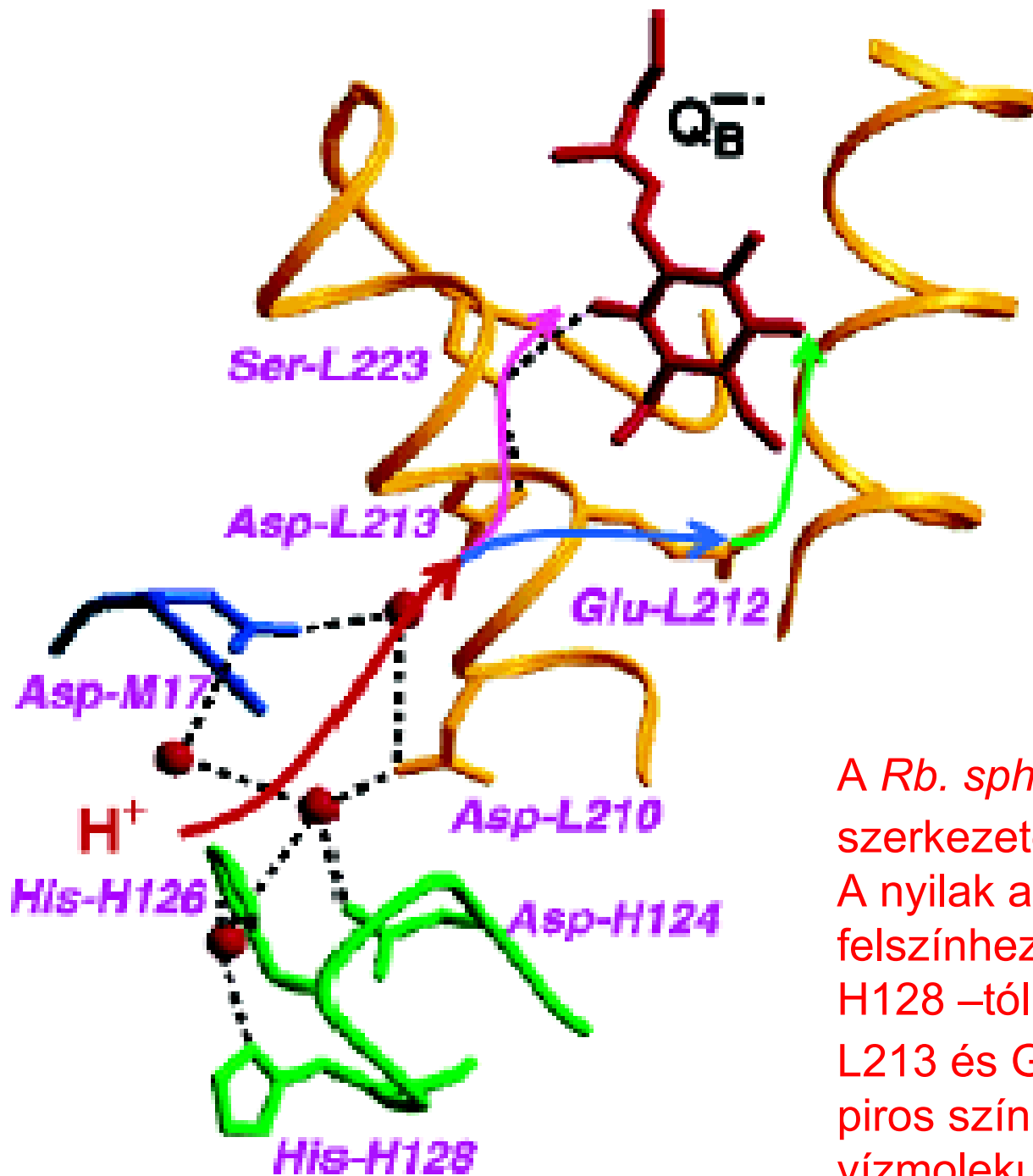
A 4 csoportnak különbözőek a kölcsönhatás nélküli pK_a értékei: 3, 4, 5 és 6.

3: mind a 4 csoport jelen van

4: a $pK_a = 3$ csoport eltávolítva

5: a $pK_a = 6$ csoport eltávolítva

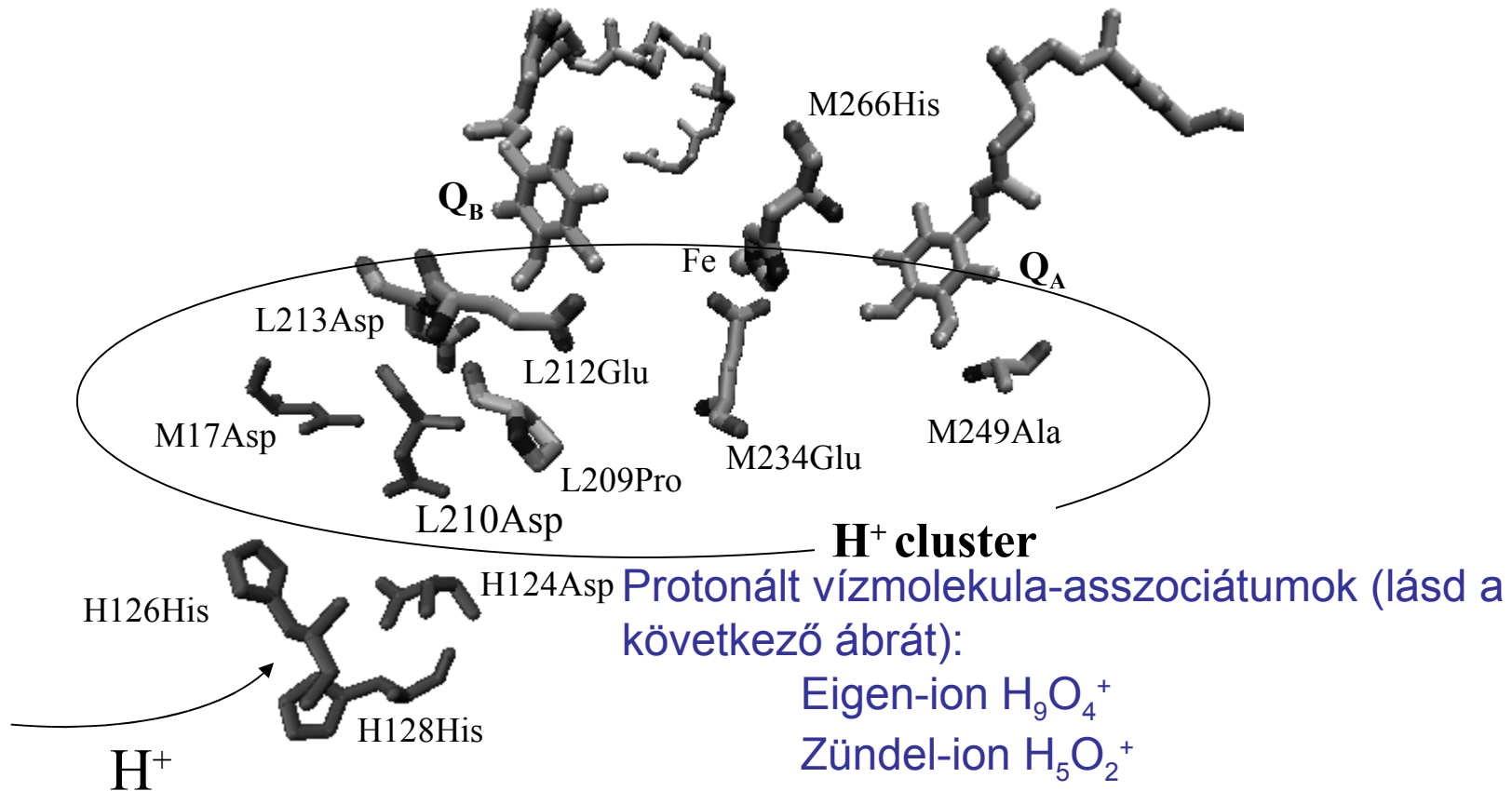
Az egységesen viselkedő klaszterre a Henderson-Hasselbalch összefüggés **formálisan** csak úgy tartható fenn, ha bevezetjük a „pH-függő pK ” kiterjesztést (fából vaskarika).



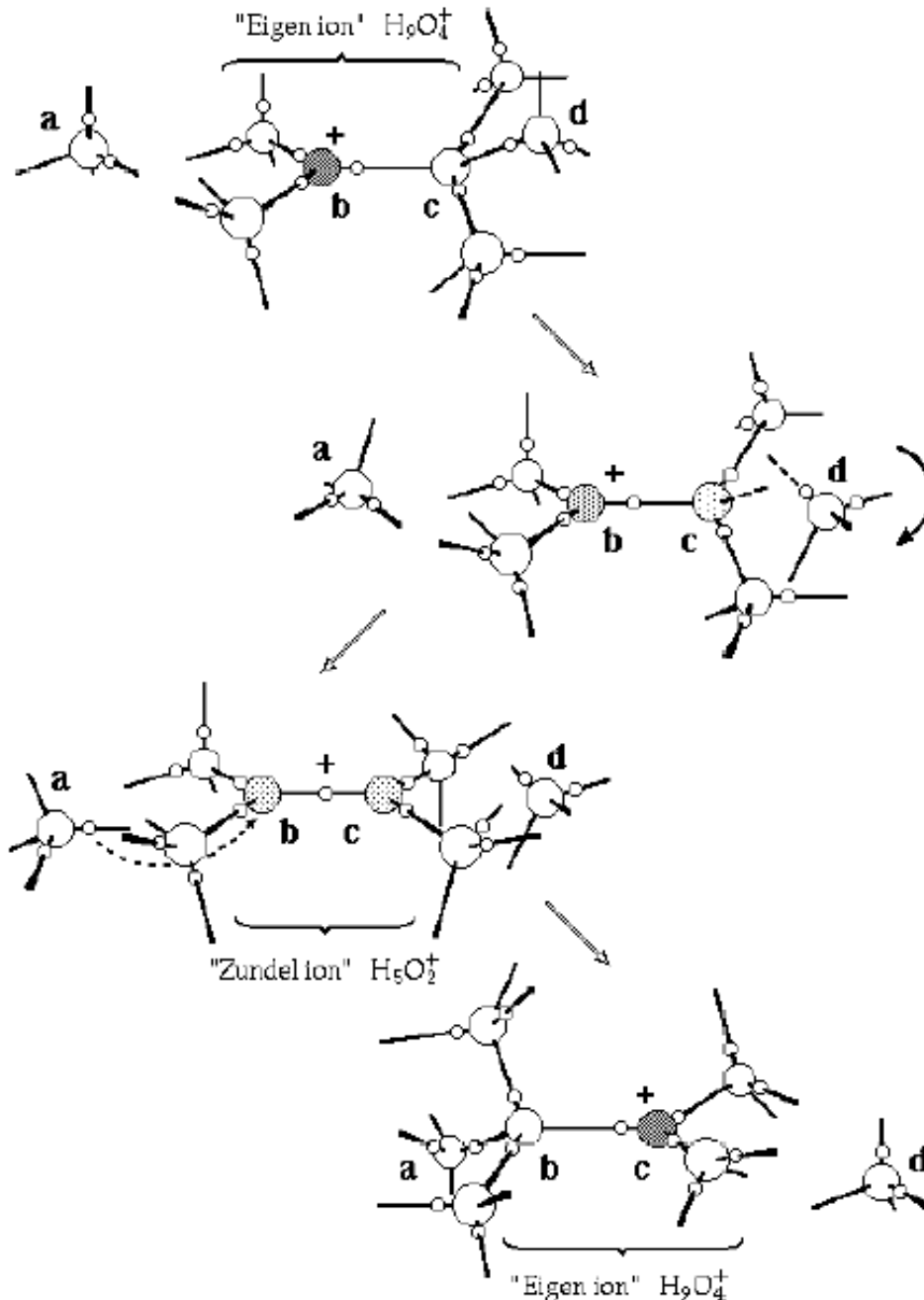
Savas csoportoknak és szerkezeti vízmolekuláknak H-hídakkal összekapcsolt rendszere (klasztere) a Q_B -hez vezető protonfelvételi úton.

A *Rb. sphaeroides* RC Q_B körüli szerkezete (PDB ID code 1AIG). A nyilak a proton útját mutatják a felszínhez közeli His-H126 és His-H128 -tól a redukált Q_B -ig az Asp-L213 és Glu-L212-en keresztül. A piros színű golyók kötött vízmolekulákat jelölnek.

A teljes citoplazmikus térre kiterjedő H⁺ klaszter: aminosavak és (protonált) vízmolekulák hálózata



Protonvezetés protonált vízmolekulákkal



From top to bottom: The **hydronium ion** (b) is almost planar and is solvated by 3 water molecules forming an **Eigen ion**, $H_9O_4^+$. Each solvating water is hydrogen bonded to approx. 3 additional neighbors – this is shown only for one solvating water (c).

A hydrogen bond in the second solvation shell (c-d) is broken and the remaining ion rearranges to yield a **Zundel ion**, $H_5O_2^+$. The excess proton fluctuates along the "proton coordinate", between the two oxygen atoms and is trapped at either one as a new hydrogen bond (here, from a to b) reforms an Eigen ion – in this case on oxygen

Kitekintés és alkalmazások más fehérjékre

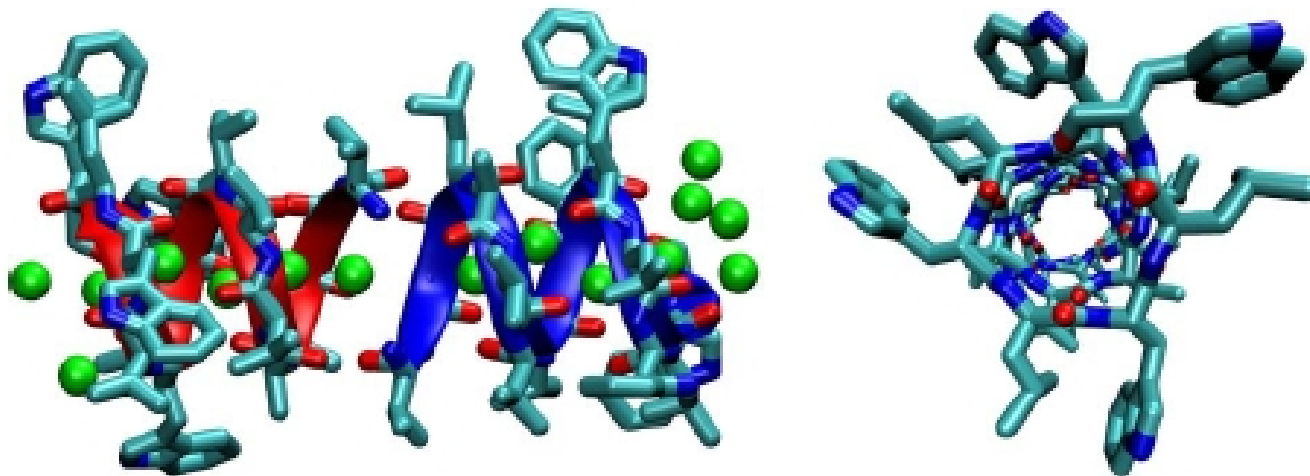
Protontranszfer a gramicidin A (gA) csatornán

The gramicidin A, an ionophorous antibiotic may come as close as we know to a proton conducting, hydrogen bonded chain with a low Born energy factor.

The experimental activation energy for H⁺ conduction in gA is quite small in good agreement with calculated proton energies relative to the bulk phase (5-7 kcal/mole, Warshel).

The proton's *exit* from the channel seems the rate limiting step, which suggests that the channel, possibly including the induced polarization of the water file, "holds on" to the proton as it tries to leave.

NMR studies have provided structural information on the conduction of **alkali metal cations** through the gA channel, which may also be relevant to understanding proton conduction. Entry to the channel is accompanied by the sequential removal of waters of hydration from the cation in three distinct steps as the ion moves from one site to the next. Ultimately, the ion is associated with only 2 waters – one ahead and one behind in the single file of the channel. In this same entrance (and exit) region of the channel, the ion has a significant electrostatic interaction with the 4 tryptophans (approx 1 k_BT per indole) that comprise a well-defined collar in the membrane headgroup region of the channel. Conceivably, this provides the interaction that limits proton exit from gA.

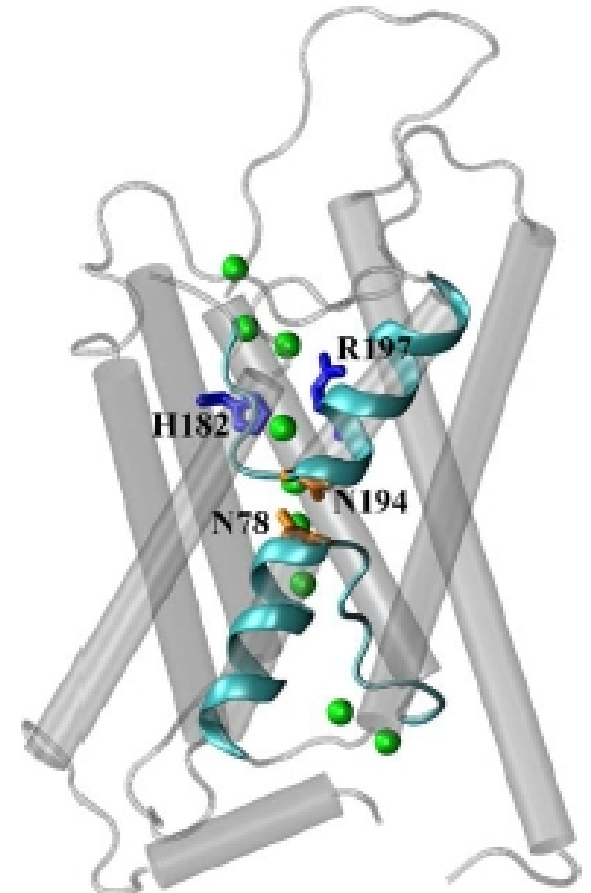


Left: longitudinal view of the head-to-head dimer, with water molecules (green) modeled in. The membrane plane is vertical. Right: view down the central pore (no waters). Note the four tryptophan residues at the C-terminal end of each monomer. The structure file, with waters placed according to a molecular dynamics equilibration, was kindly provided by Régis Pomès (Toronto, Canada). All figures were prepared in VMD.

Aquaporin

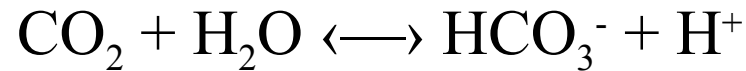
The aquaporin is a membrane protein designed to conduct water but *not protons*. Here, the water chain that spans the channel reverses the polarity of the hydrogen bonded water dipoles at the mid-point of the membrane span and this structural feature was suggested to impede proton transport by interrupting the conduction pathway. However, subsequent calculations and molecular dynamics simulations have shown that a significant contribution to the barrier for proton conduction comes from the **electrostatics** and related **desolvation penalty** for a protonic charge to penetrate into the channel interior. The relative magnitudes of these contributions are, under intense debate!

Only one monomer is shown, although aquaporins and aquaglyceroporins are homotetramers, each monomer apparently acting independently. Note the two half helices and re-entrant loops positioned quasi-symmetrically across the midpoint of the structure. The membrane plane is horizontal. Waters shown (green) are crystallographic. The **asparagines**, N78 and N194, of the two NPA sequences at the end of each half-helix, are in orange. Histidine H182 and arginine R197 provide some of the electrostatic barrier to cation passage through the channel. Structure file: 1j4n.pdb, for bovine red blood cell AQP1 at 2.2 Å.

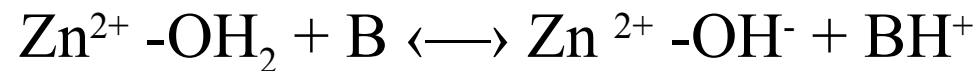


Carbonic anhydrase

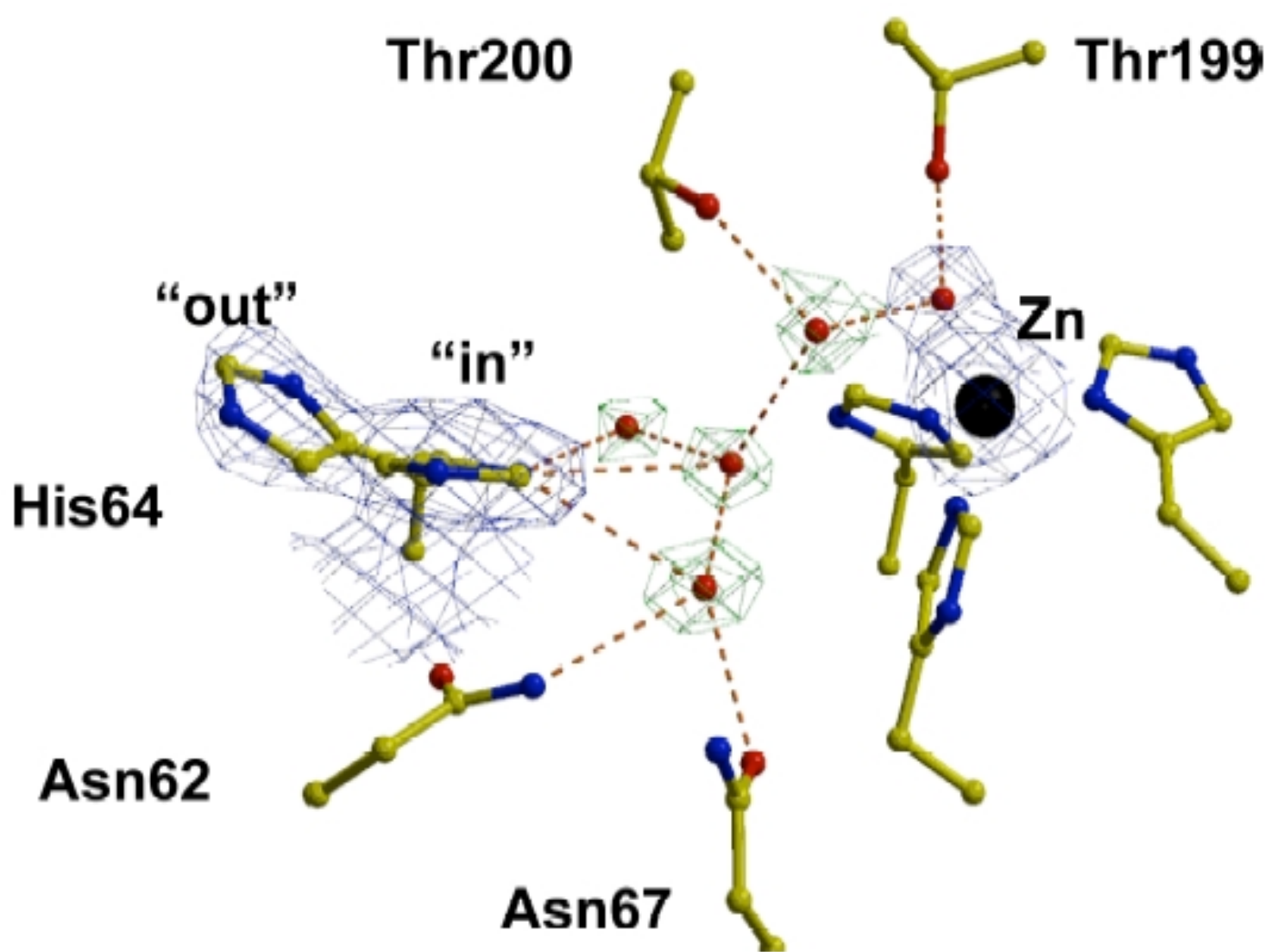
Proton transfer from active site of carbonic anhydrase: a proton is taken up (or released) as part of the stoichiometric turnover:



Somewhat surprisingly, the transport of H^+ in and out of the active site is the rate limiting step. PT occurs over a distance of 8-10 Å and is associated with the regeneration of the active site $\text{Zn}^{2+} - \text{OH}^-$ complex:



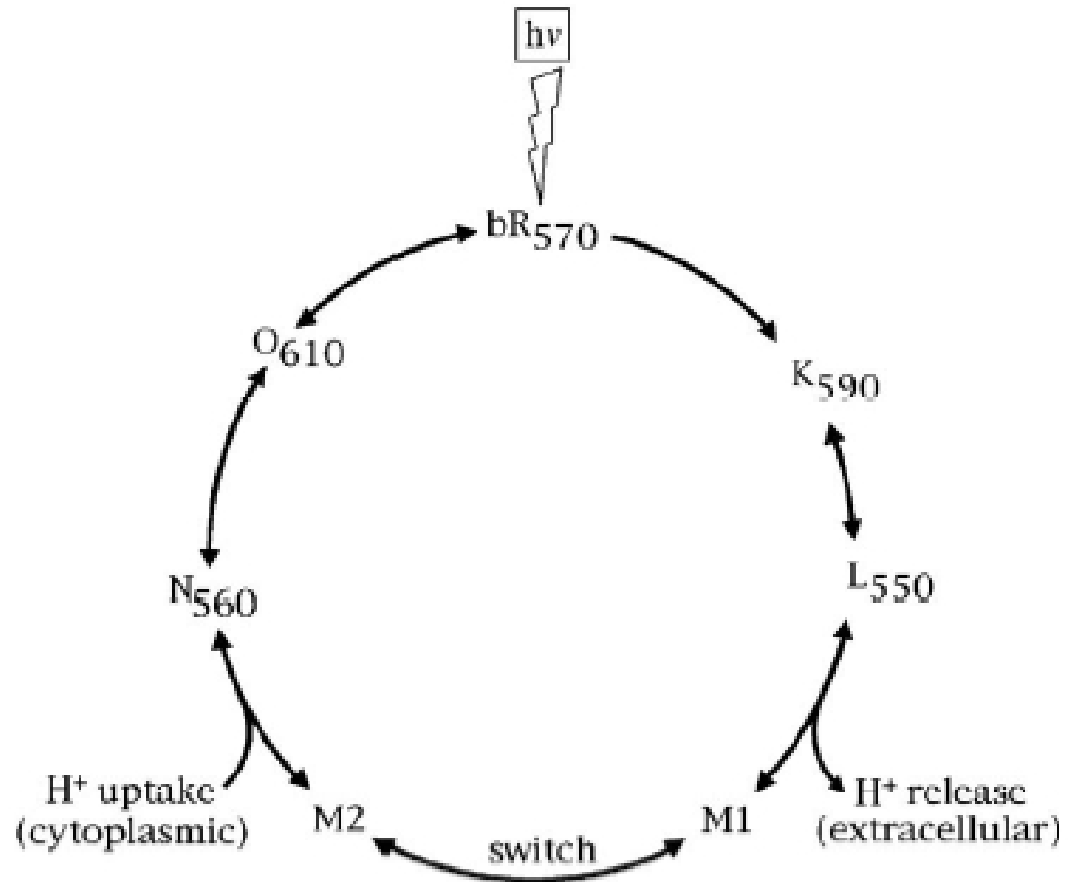
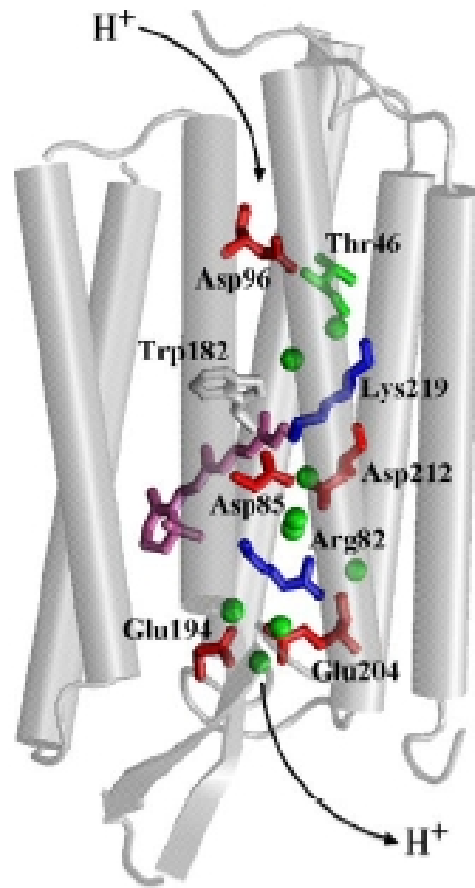
The communication between the zinc-bound water and the aqueous phase is mediated by a short chain of 2-3 water molecules and an amino acid side chain, represented by B/BH^+ , which is in contact with the bulk phase. In carbonic anhydrase II, the fastest of the many mammalian isozymes, B/BH^+ is a histidine (His64, see the structure).



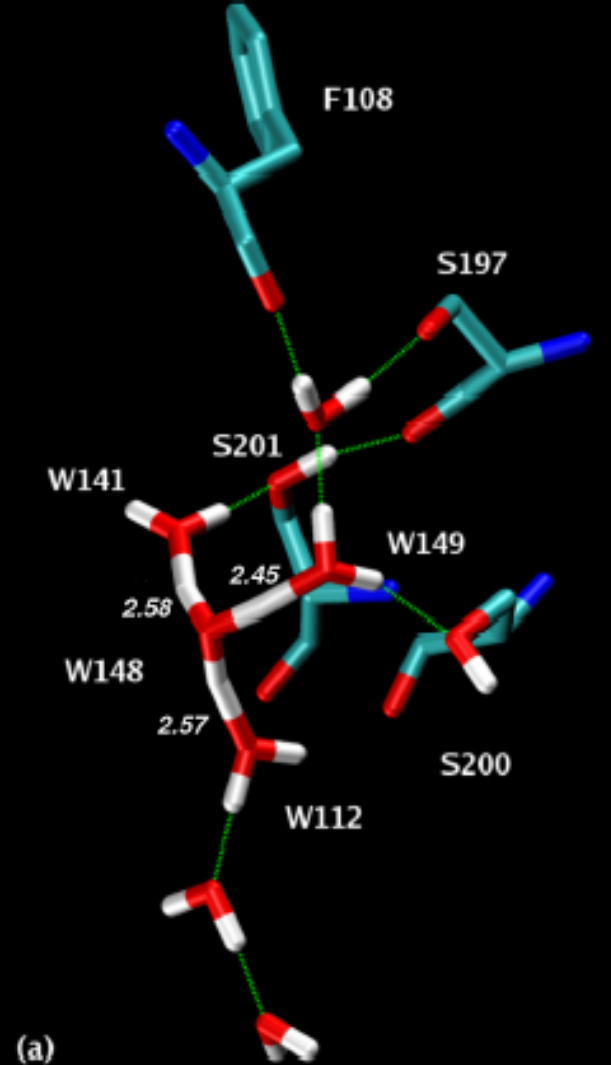
The active site
of carbonic
anhydrase II.

The reactive water/hydroxyl is bound to a zinc(II) ion (black), which is liganded by three histidines. The fourth histidine, His64, is at the entrance of the active site cleft and is observed in two distinct configurations – the “out” position is essentially in the bulk phase. Up to four additional water molecules are seen in different crystal structures, as shown, bridging the zinc-bound water and His64 in the “in” position.

Bakteriorodopsin



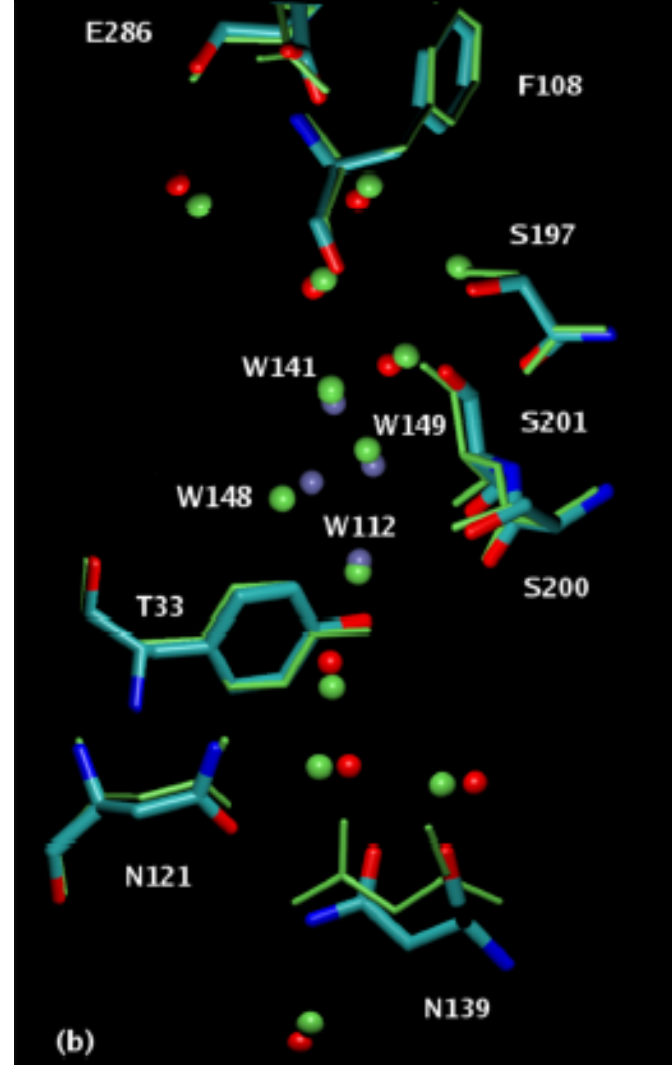
Bacteriorhodopsin (left) and its photocycle (right). The light-adapted all-trans retinal (mauve) is covalently linked to Lys216, forming a protonated Schiff base ($-\text{HC}=\text{NH}^+-$). The retinal chromophore isomerizes in less than 1 ps, and the resulting strains on the protein give rise to several early spectroscopic intermediate, at least one of which (J) is not shown. Relaxation of these strains via spectroscopic intermediates K and L cause deprotonation of the Schiff base to yield M1. The proton is released to the extracellular phase. Further relaxation completes the bond rotations in M2, which switches accessibility of the Schiff base from the extracellular to the cytoplasmic side. The Schiff base is then reprotonated by proton uptake from the cytoplasmic side. This facilitates the reisomerization back to the all-trans state. Structure file: 1c3w.pdb, at 1.55 Å.



Extra proton tárolása
a citokróm c oxidáz D
jelű proton-útvo-
nalának hidrogén-híd
hálózatában.
Protonált víz-klaszter
azonosítása.

Gregory A. Voth et al.

2007. jan. JACS



Protonált vízmolekulák H-híd hálózata.
Színezés atomok szerint: C cian; N kék;
O piros; H fehér. A H-hidak zöld vonalak.
Az O-O távolság a W148 és a többi (3)
vízmolekula között 2.58 Å, 2.57 Å és
2.45 Å.

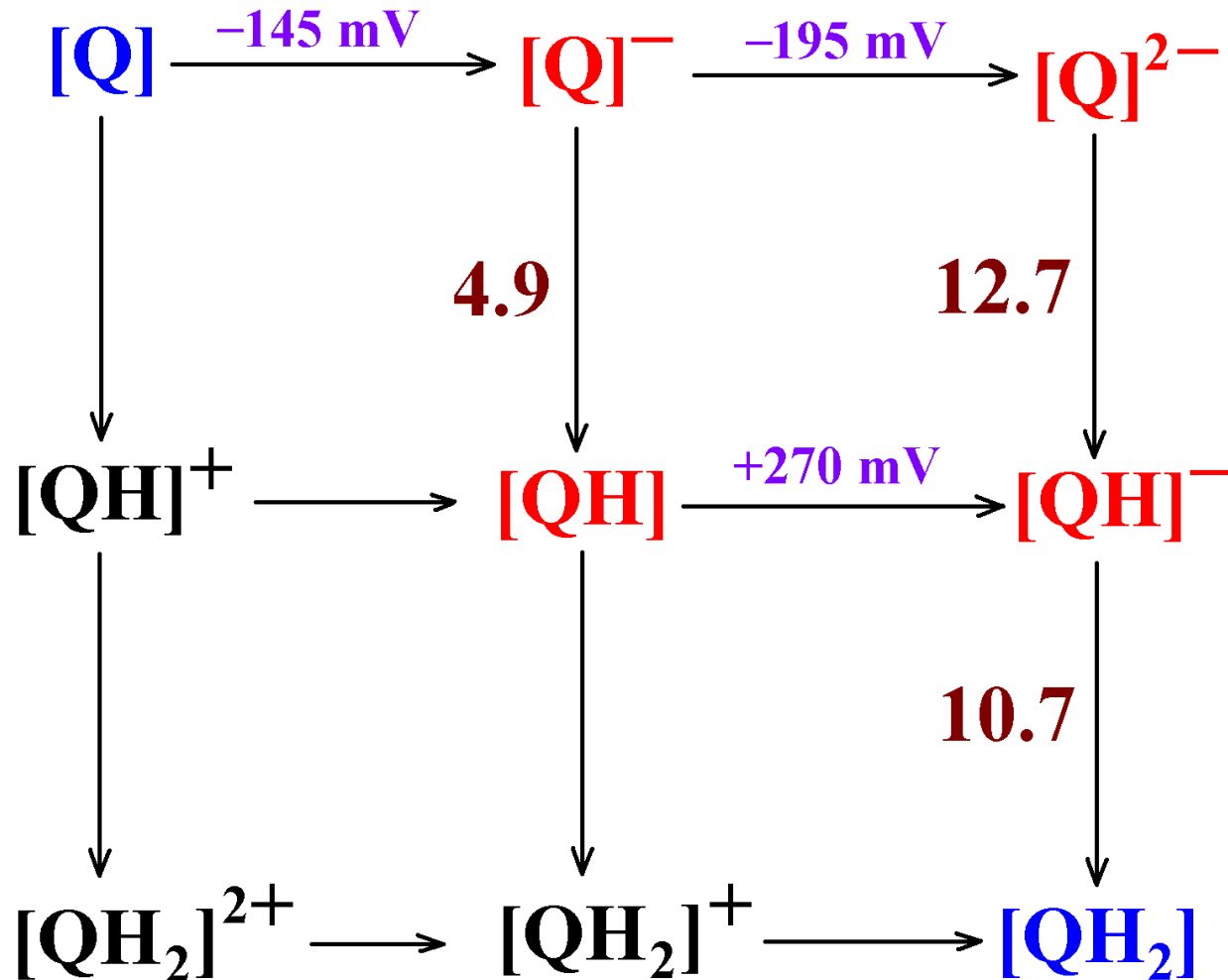
Az idő-átlagolt szerkezet és a kristályszerke-
zet átlapolása. A kristályszerkezet és a víz
oxigén atomjai zöld színűek. A szimulált
szerkezet atomjai szokásos színűek. A köz-
ponti hidronium és az első solvatációs
vízburok oxigén atomjai kiemelték és kék.

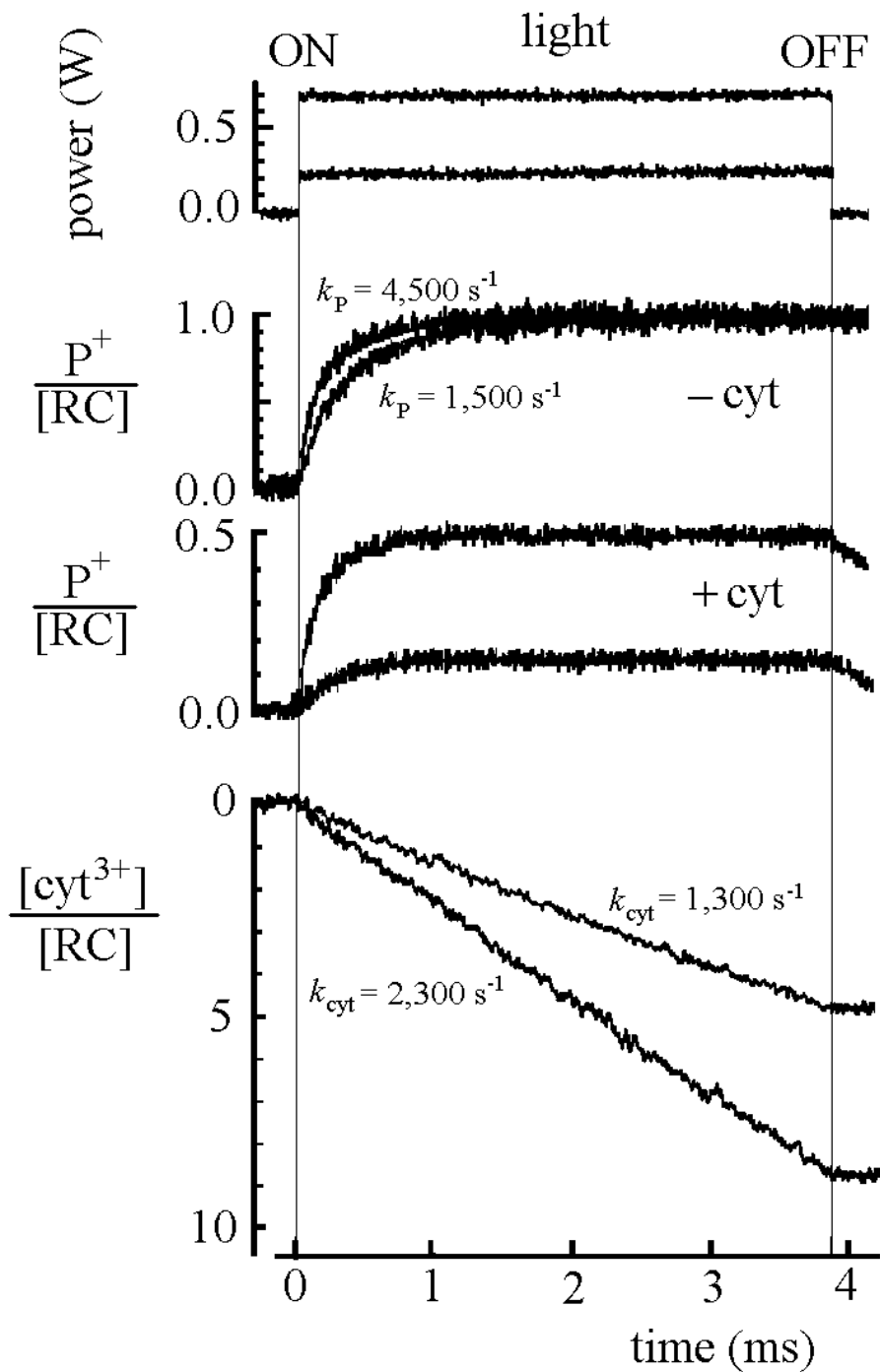
Folytonos megvilágítás,
folytonos protonfelvétel,
fotociklus.

Kofaktorok (kinonok),
elektrontranszfer és
fehérjemozgás
szerepe a protonvezetésben.

Redox and protonation states of ubiquinone
in aqueous solution, protein, organic solvent

$$\Delta G = 60 \text{ mV} \cdot (\text{pH} - \text{pK}) - nF(E_h - E_m)$$



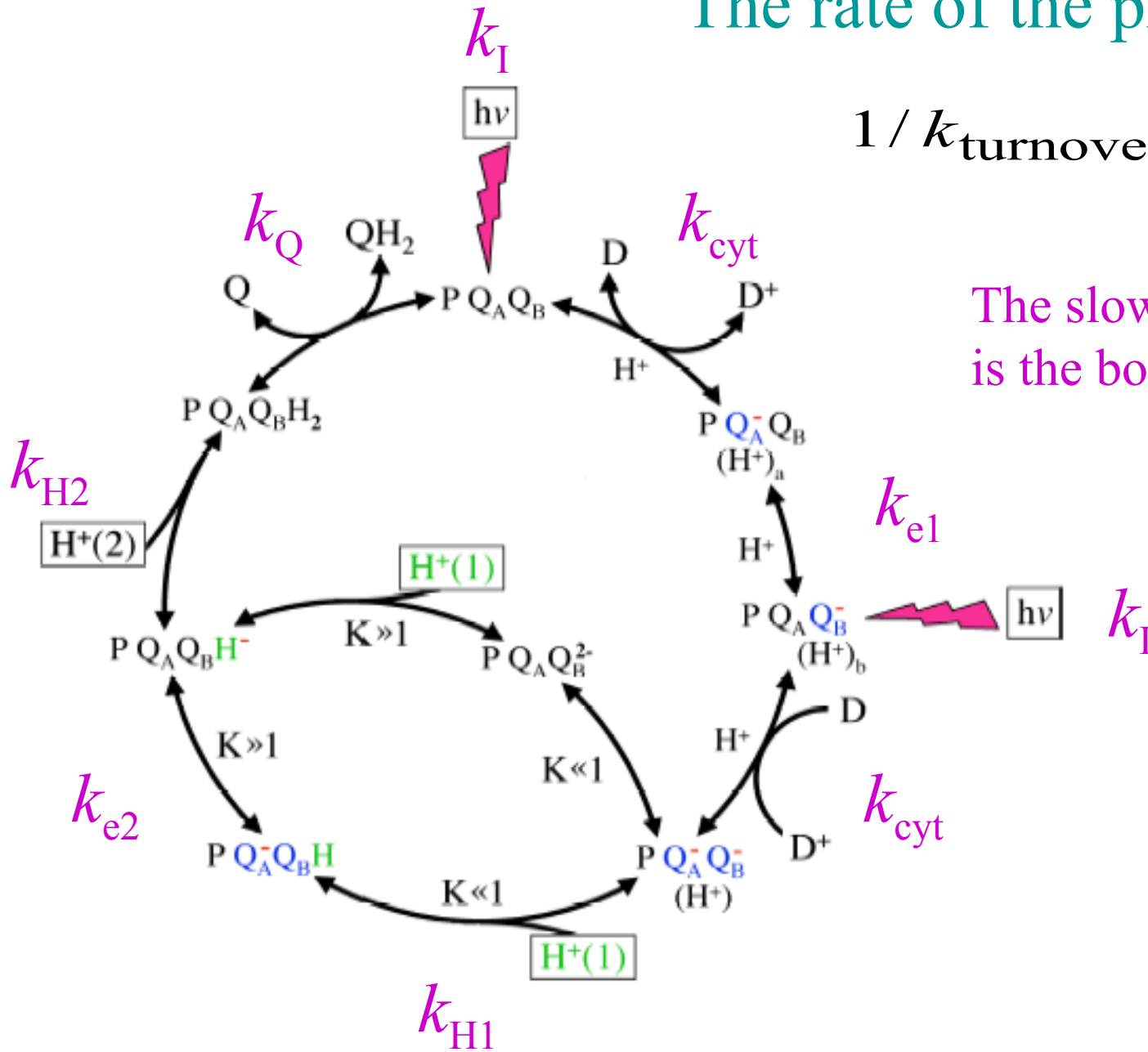


Redox changes of electron donors (P and cyt c) in RC under rectangular shape of illumination of two intensities

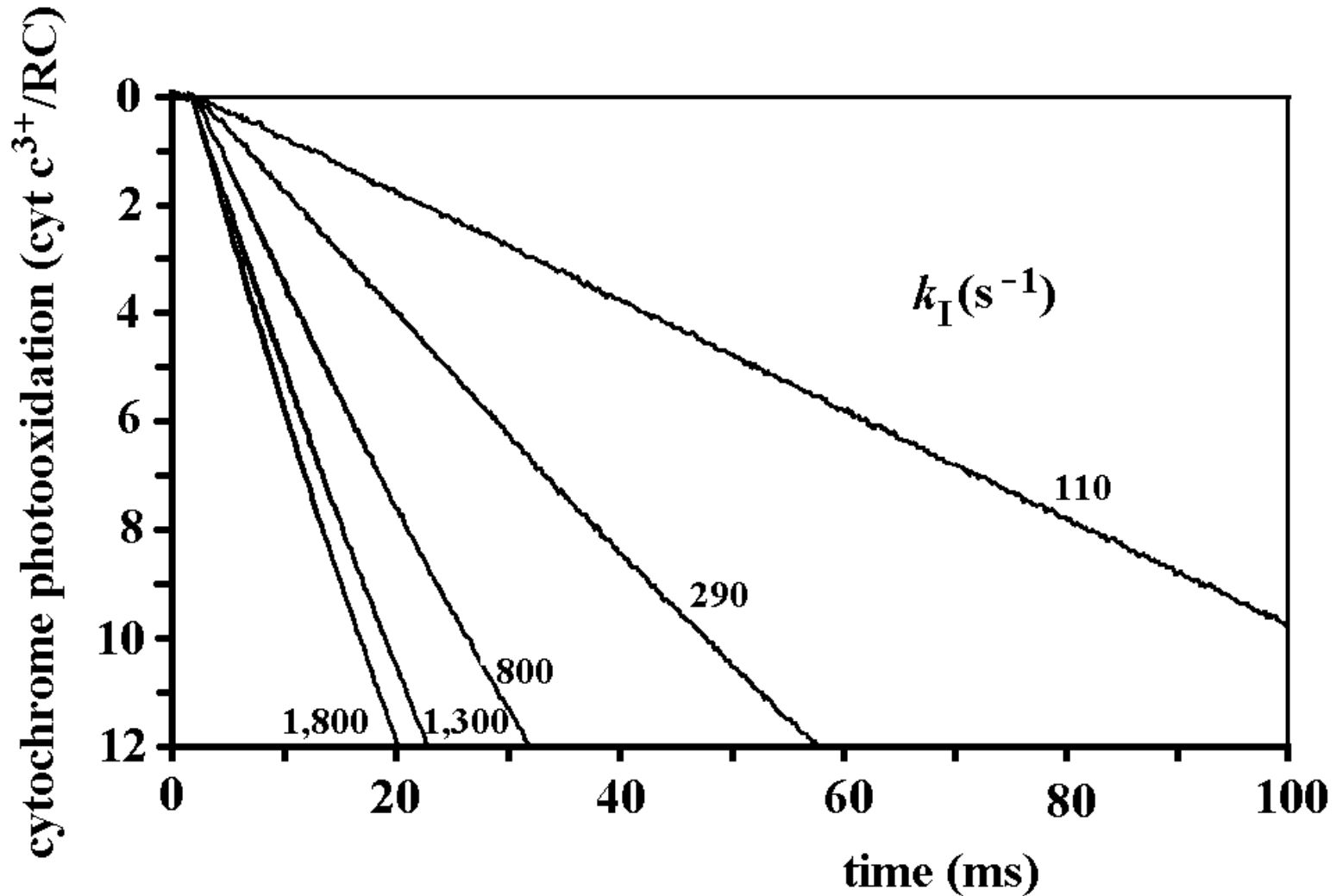
The rate of the photocycle:

$$1 / k_{\text{turnover}} = \sum_{\text{all}} 1 / k$$

The slowest process is the bottle neck.

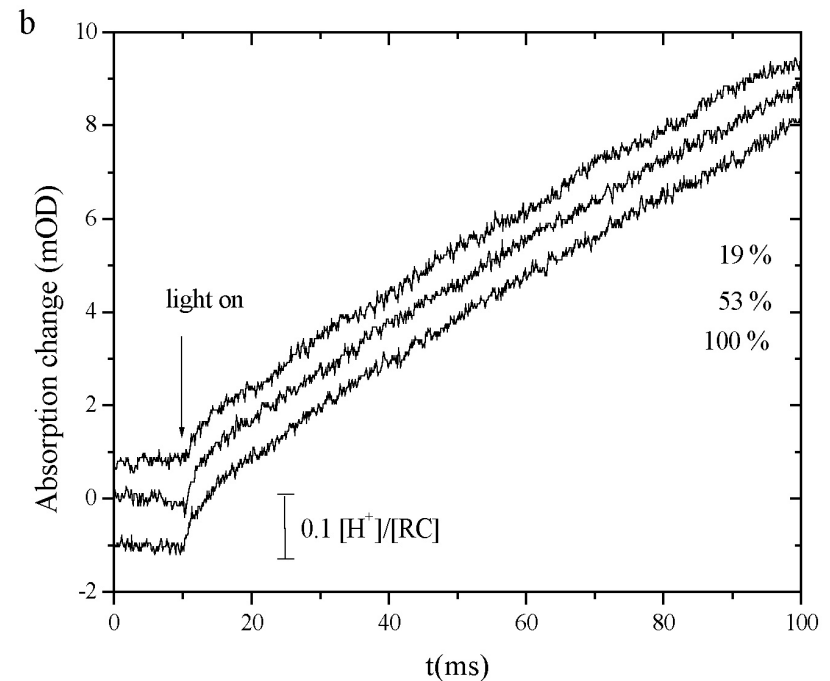
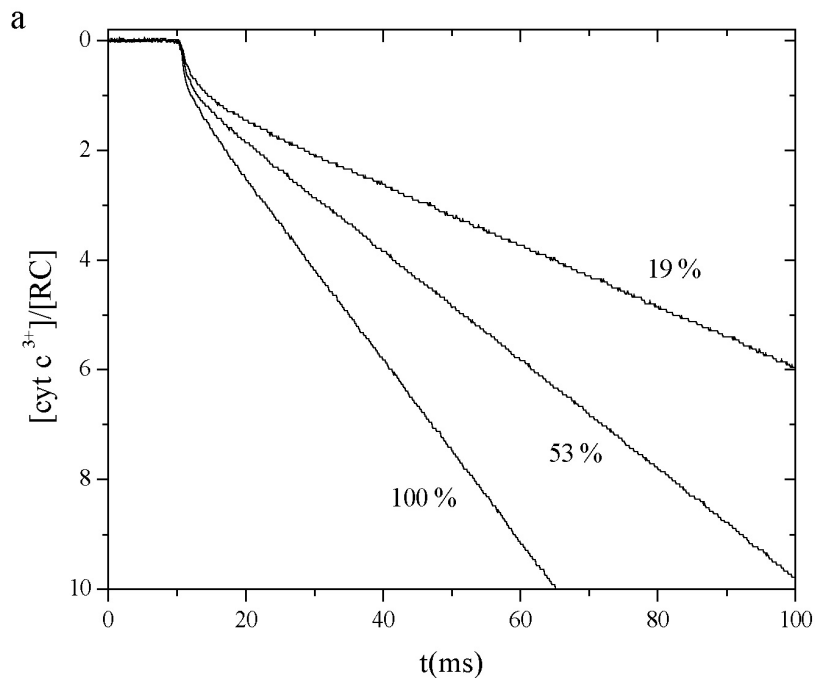


Cytochrome photo-oxidation in bacterial RC under continuous illumination: the light intensity is the rate limiting step of the turnover (wild type)



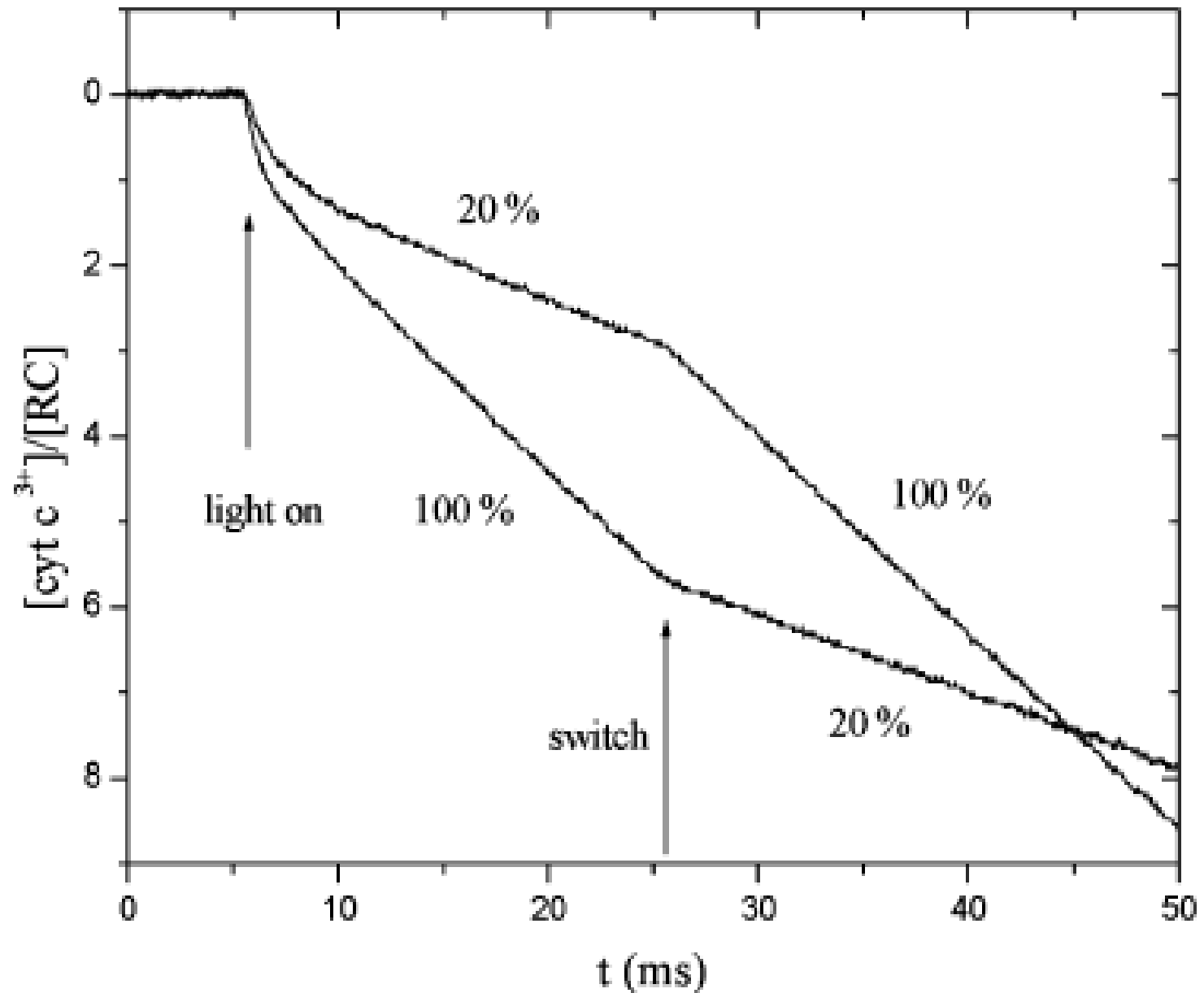
Kinetics of cytochrome photo-oxidation and H⁺-ion uptake:

not the light intensity but the proton uptake is the rate limiting
step of the turnover (inhibited proton uptake)

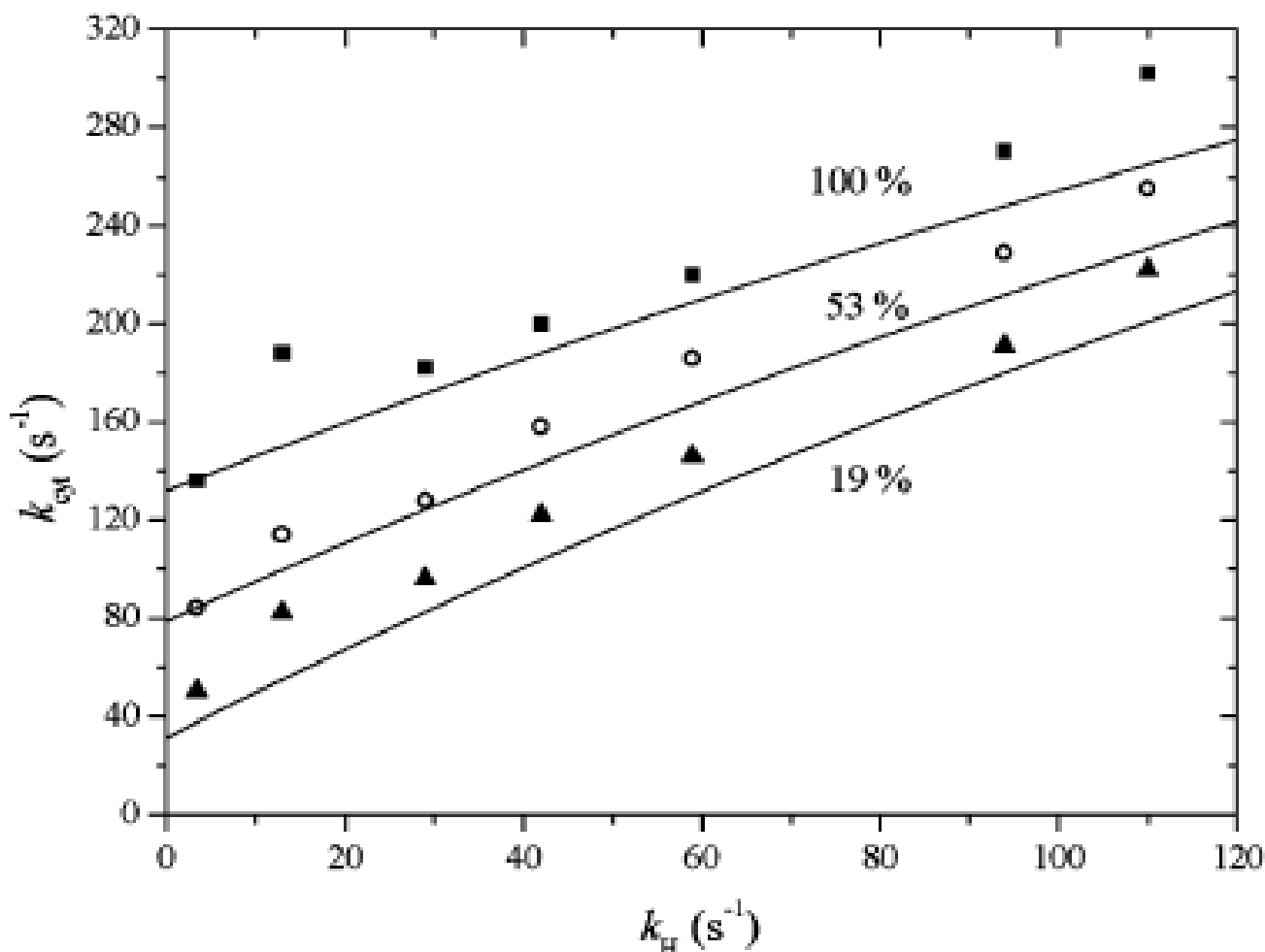


The rate of cytochrome oxidation
does depend on the light intensity,
although it should not!

Sudden switch between light intensities



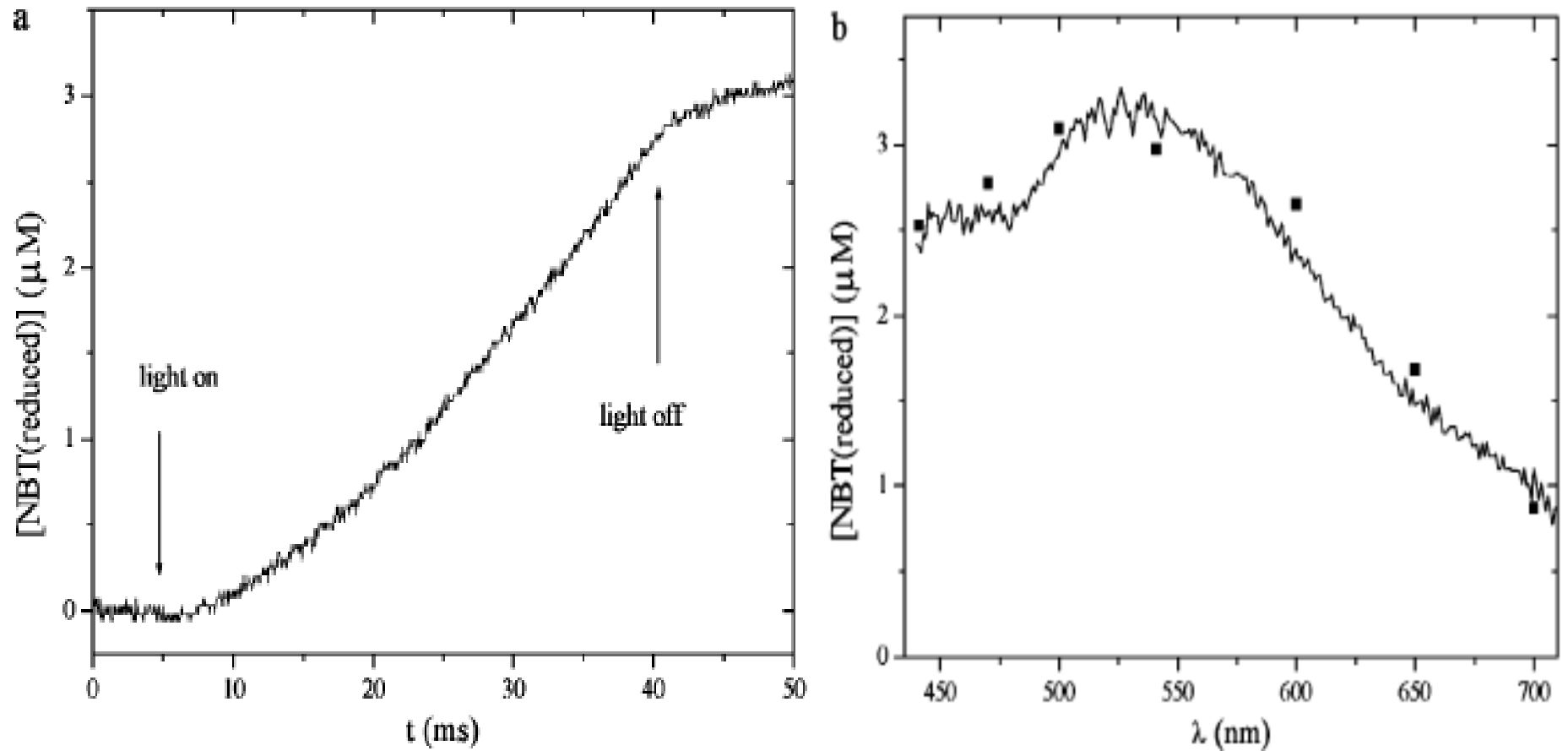
Slow down the rate of turnover of the acceptor side by inhibition of the proton uptake at different intensities of continuous illumination.



The k_H was varied by changing the pH of the solution and by use of different transition metal ions: Cd^{2+} and Ni^{2+} for adjustment of higher and lower values of k_H , respectively. The k_H remained the rate-limiting step in the photocycle in all cases

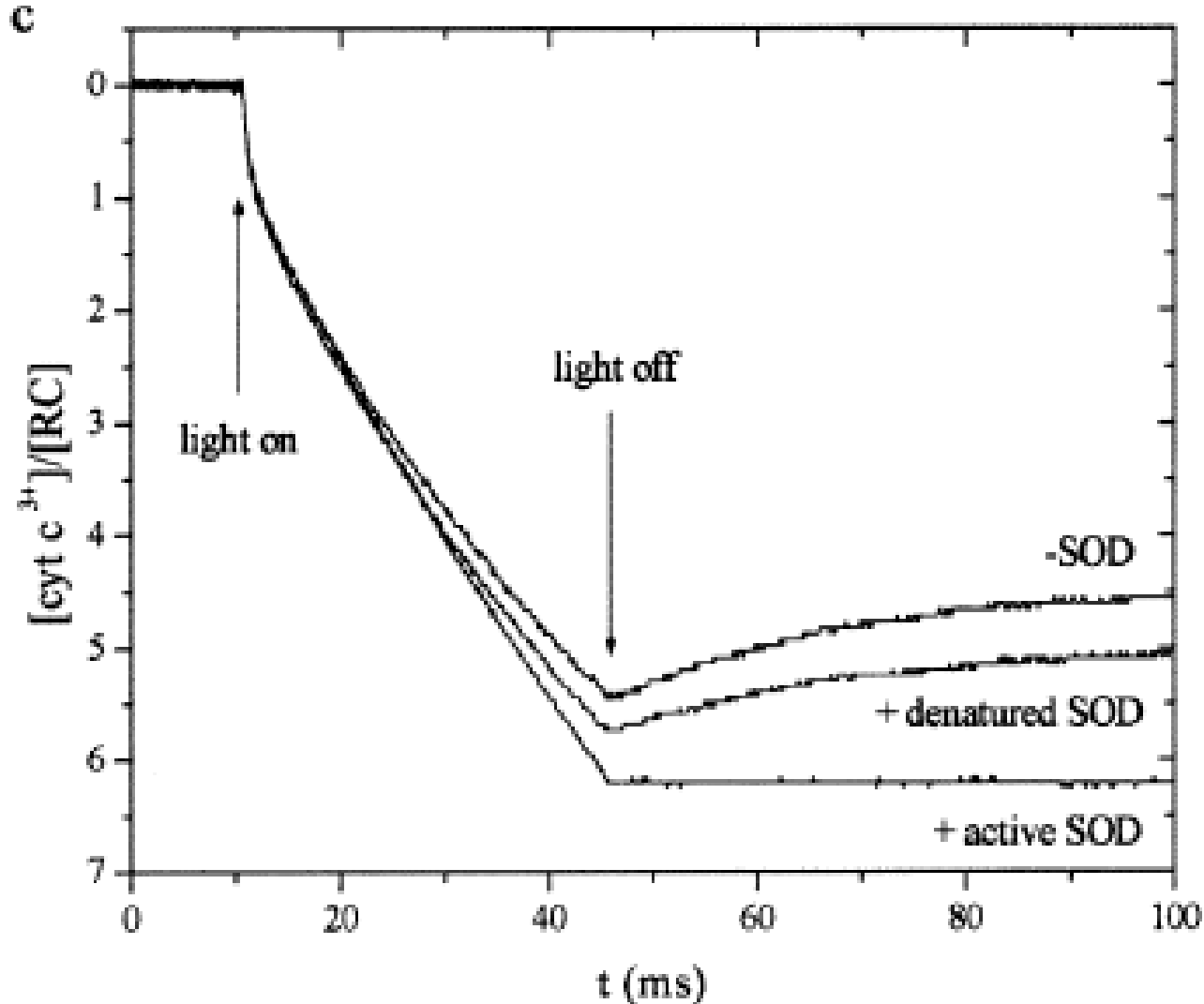
Where the electrons go?

Production of superoxide radical during the photocycle of RC of inhibited proton uptake.

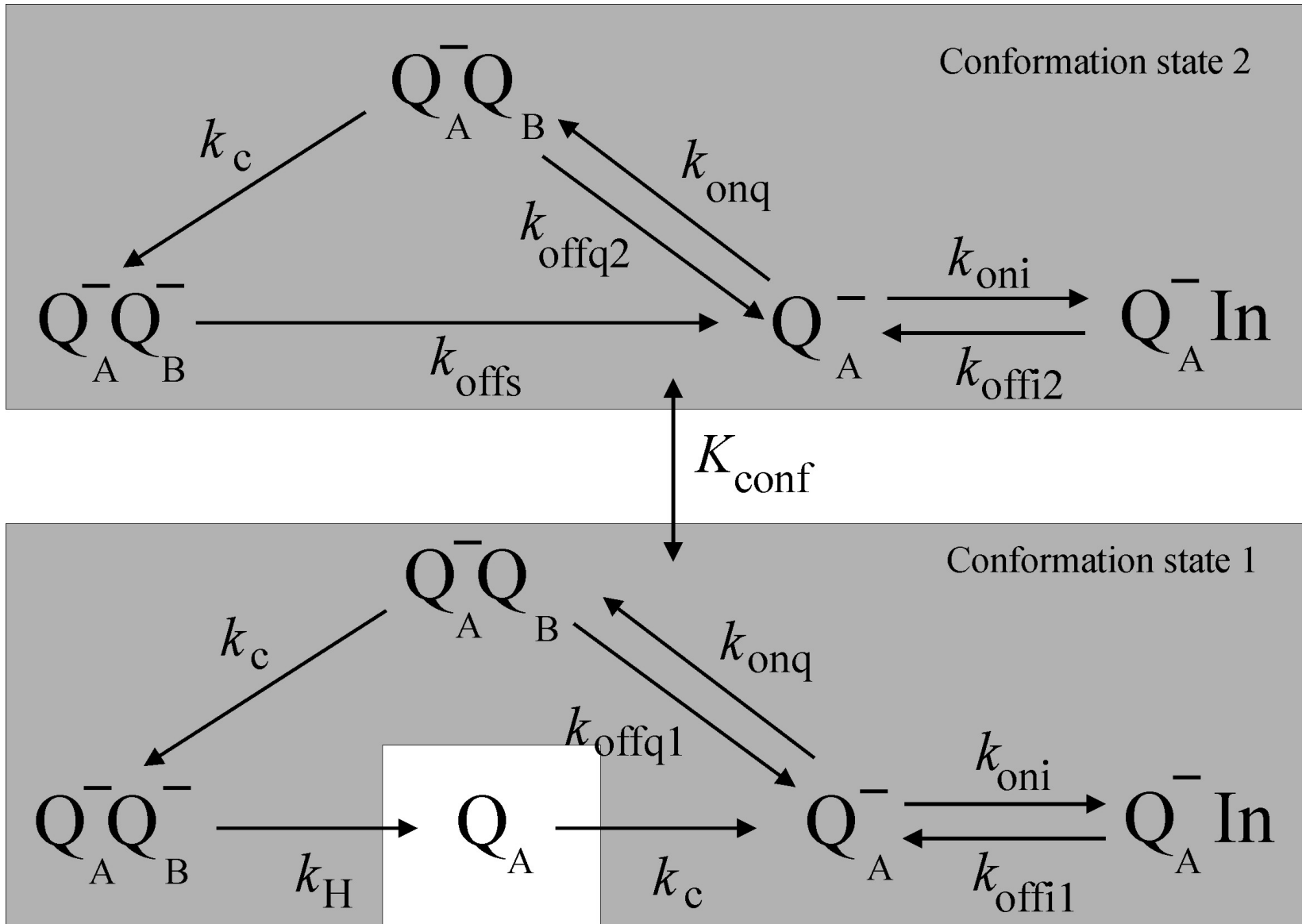


The NBT assay for superoxide synthesis was applied to determine the number of escaped electrons from the standard photocycle of the RC.

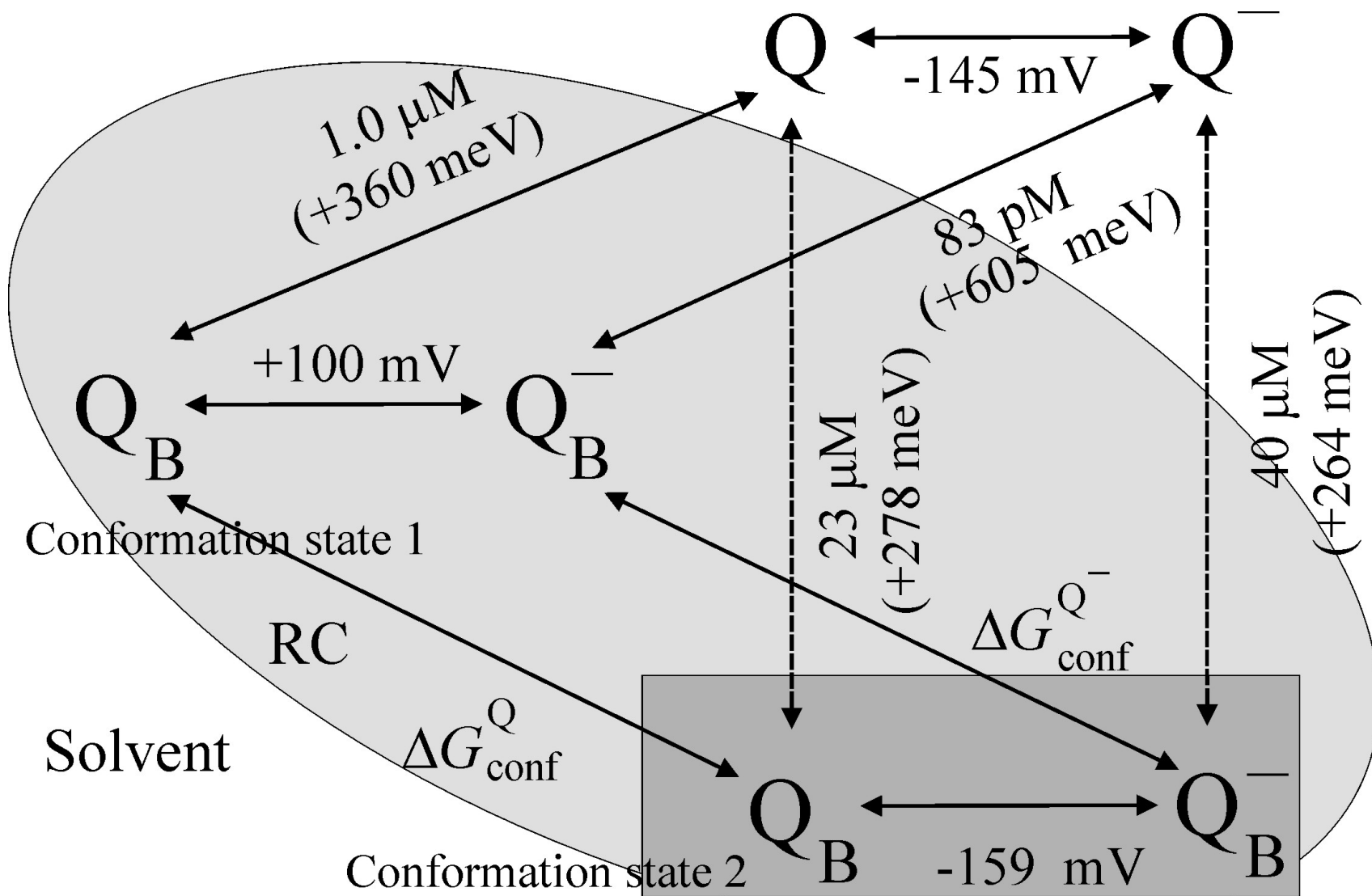
Cytochrome assay for superoxide synthesis: dark reaction due to the reduction of $\text{cyt } c^{3+}$ by superoxide radical



Extended kinetic model of the photocycle

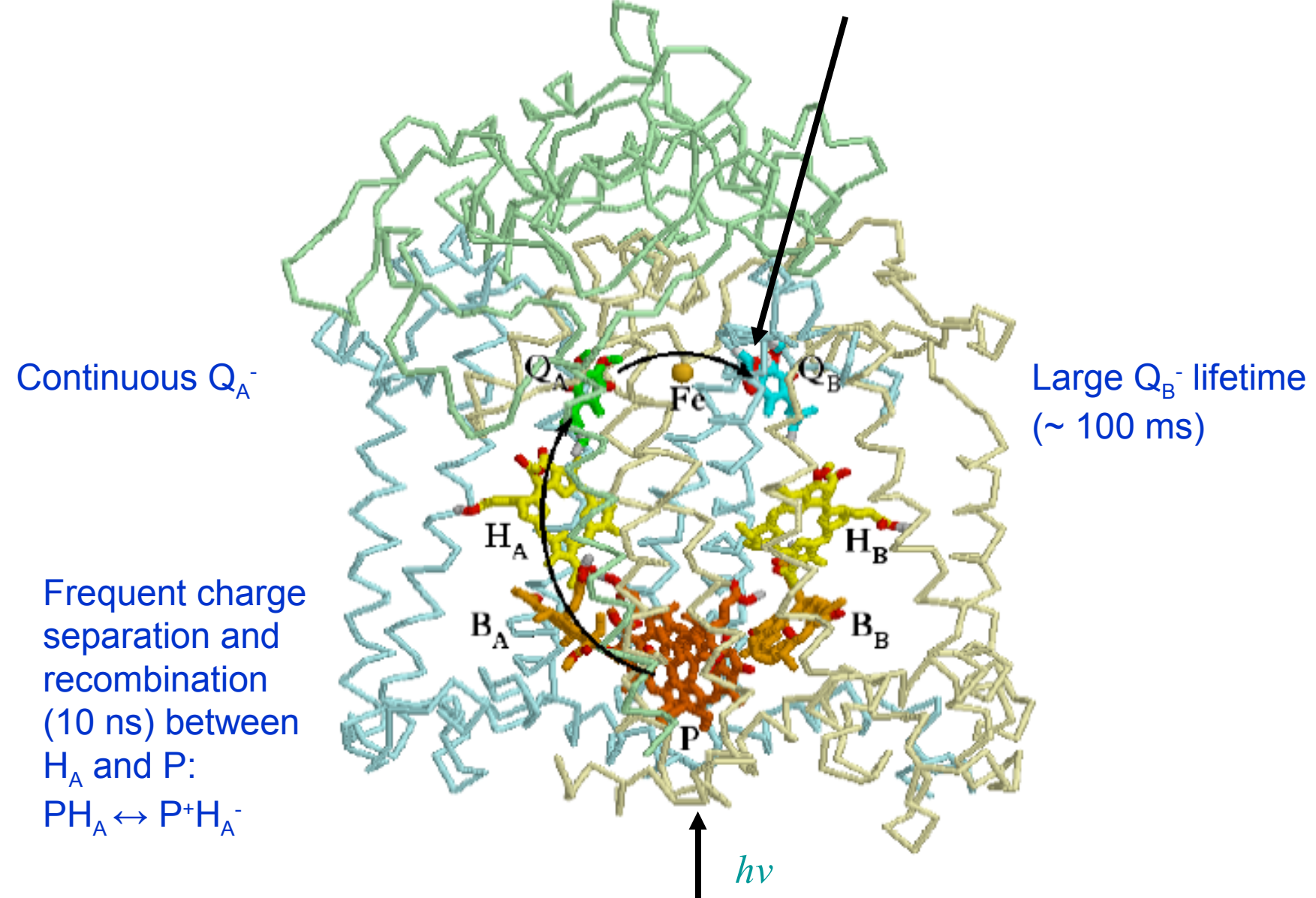


Thermodynamic model of redox changes, conformational changes and dissociation constants of quinones and semiquinones

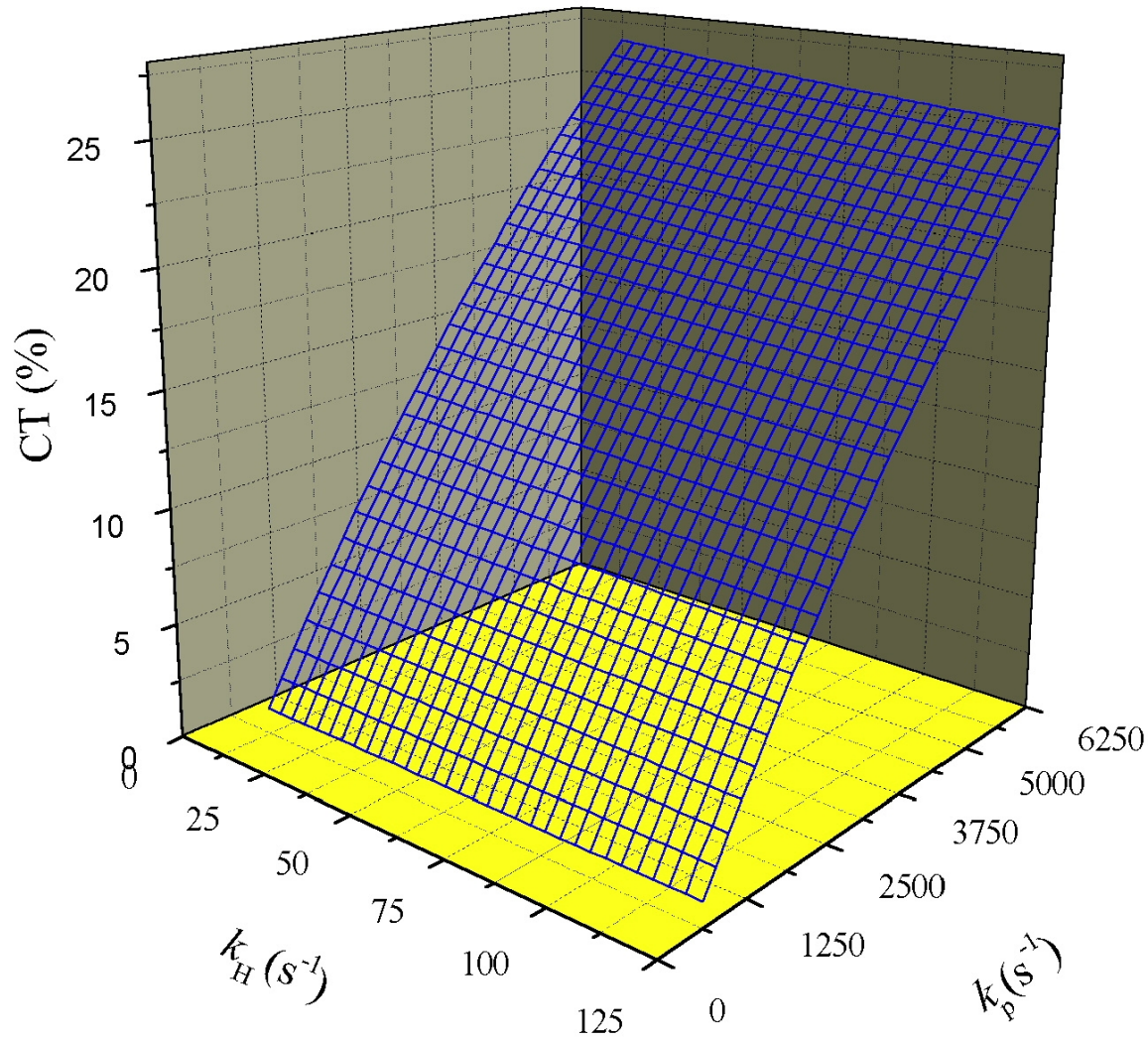


What could cause the conformational change?

Slow proton uptake



Conformational Transition



Kiemelt eredmények

- 1) A fény (szemikinin)-indukált protonfelvétel bakteriális RC-ban
aminosavak és
protonált vízmolekulák hálózatában
lejátsszódo
kollektív (együttes) és
antikooperatív (az egyik csoport protonfelvétele a
másik csoport protonfelvételének esélyét csökkenti)
folyamat.
- 2) A protonklaszter az eddig feltételezettnél lényegesen nagyobb térrészre (a fehérje teljes citoplazmikus régiójára) terjed ki.
- 3) A klaszter tagjai közötti kölcsönhatás valószínűleg nagyobb (60 meV), mint azt a Poisson-Boltzmann elektrosztatikai számítások alapján eddig feltételezték.
- 4) A protonfelvétel legmagasabb pH-jú sávja ujj-lenyomatként használható a klaszter azonosítására ill. tulajdonságainak változására.
- 5) A protontranszfer kapcsolódik a kinon redox-állapotaihoz, az elektrontranszferhez és a fehérje konformáció-mozgásához. Ezek együttesen finoman képesek hangolni a fehérjén belüli protonvezetést.
- 6) A protonklaszter-elmélet jól alkalmazható más fehérjékre (pl. citokróm oxidáz, szén-anhidráz enzim, rodopszin stb.) is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az OTKA támogatását.