

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 13

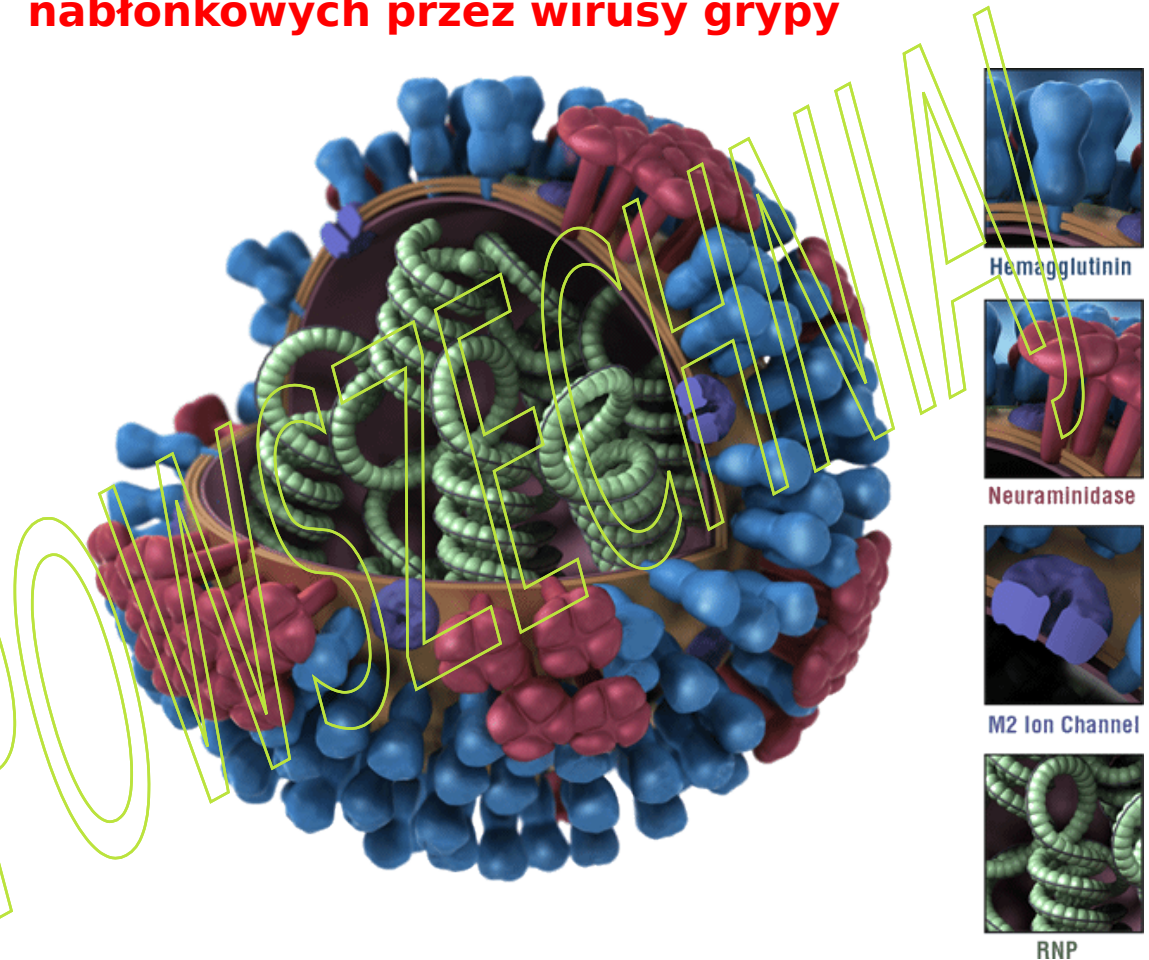
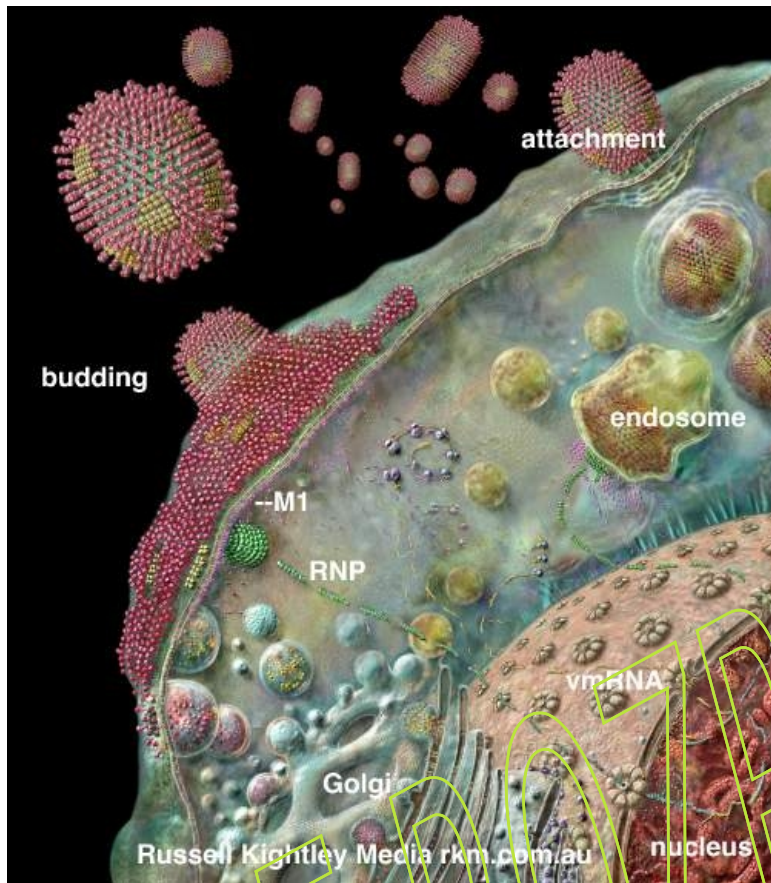
20 maja, 2025

Procesy biomolekularne zależne od pH

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

Zależne od pH mechanizmy infekcji komórek nabłonkowych przez wirusy grypy

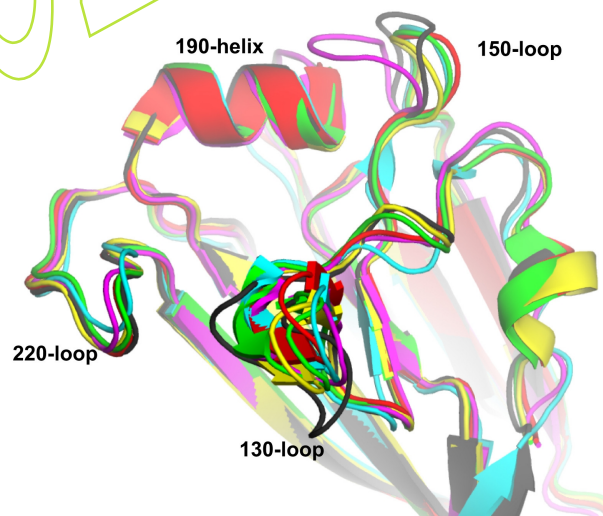
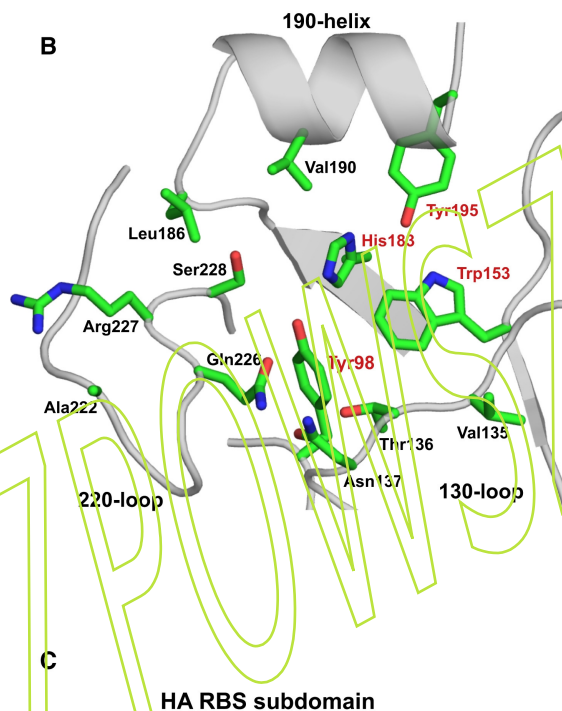
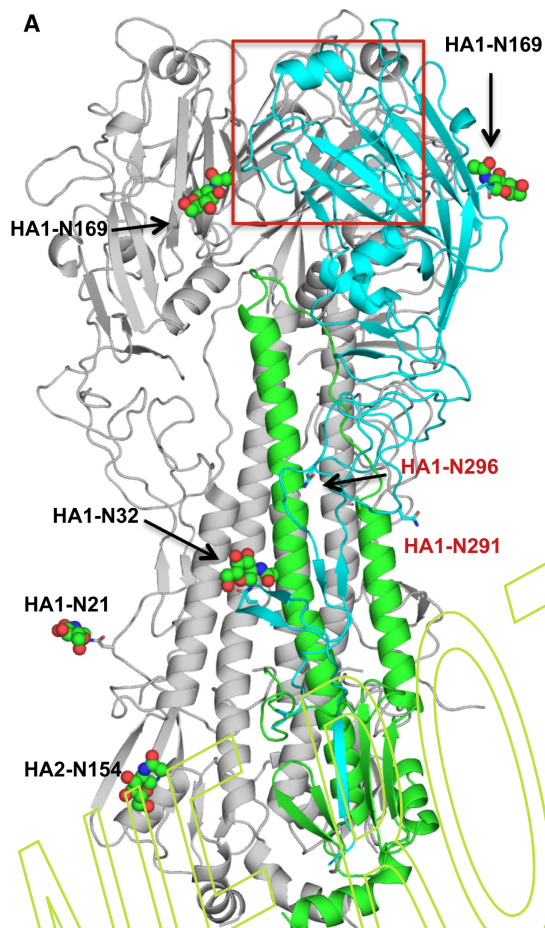


Wirusy grypy zbudowane są z dwudziestościennej kapsydu białkowego otoczonego błoną lipidową. W błonie osadzone są kolce dwóch białek: hemagglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA). Membrana zawiera również białko transbłonowe M2, które tworzy małe kanały protonowe w otocze wirusa. Jedną z jego poznanych funkcji jest zrównoważenie pH w poprzek błony wirusa podczas wnikania do komórki.

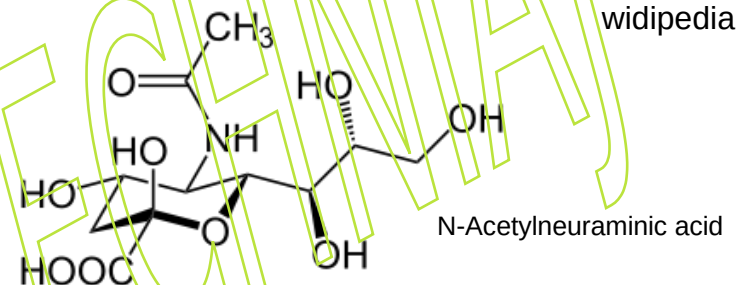
Genom wirusa grypy A składa się z ośmiu segmentów jednoniciowego RNA znajdujących się w kapsydie w postaci pojedynczych kompleksów rybonukleotydów w kształcie pręcika (RNP). Każdy RNP zawiera wirusowy RNA, wirusową polimerazę i liczne kopie wirusowej nukleoproteiny (NP). HA i NA są kodowane przez dwa oddzielne fragmenty wirusowego RNA.

hemaglutynina

W biologii molekularnej hemaglutynina jest glikoproteiną, która powoduje aglutynację lub zlepianie się czerwonych krwinek (RBC).



Hemaglutynina grypy (HA) jest homotrimeryczną glikoproteiną występującą na powierzchni wirusów grypy. Zapewnia część ich zakaźności.



Struktura krystaliczna HA szczepu H6N1 Tajwan

A) Schematyczne przedstawienie trimeru H6 HA. Jeden protomer jest zabarwiony na niebiesko i zielono dla podjednostek HA1 i HA2, a miejsce wiązania receptora (RBS) jest zaznaczone czerwonym prostokątem. N-glikany, które można modelować na mapach gęstości elektronowej, przedstawiono jako zielone kule, a odpowiadające im asparaginy są pokazane w modelu wiązań i wskazane przez czarne strzałki. Dwa inne potencjalne miejsca glikozylacji (Asn291 i Asn 296) zaznaczono na czerwono.

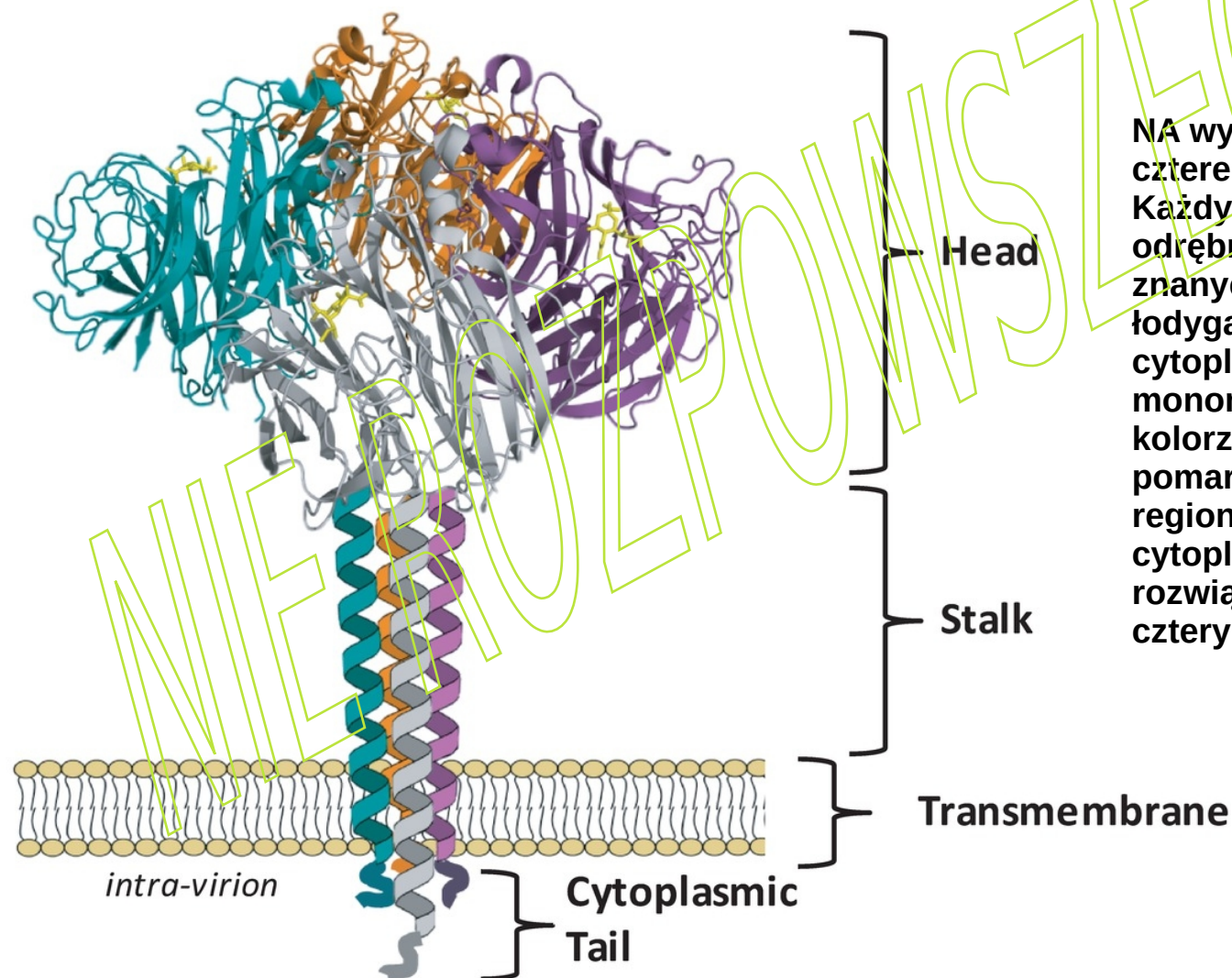
(B) Schematyczne przedstawienie RBS H6 HA z pałeczkami reprezentującymi reszty kluczowe do wiązania receptora (pokolorowane na zielono i oznakowane). Cztery wysoce konserwatywne reszty w RBS są oznaczone na czerwono. H6 RBS zawiera Val w pozycji 190 i Ser w pozycji 228.

(C) Superpozycja subdomen RBS H6 HA (czarna) i pandemicznej H1 (żółta), H2 (czerwona), H3 (cyjan), A/Vietnam/1203/2004 H5 (zielona) i A/Shanghai/2/2013 H7 (magenta) HA.

Dojrzałe białko HA jest odpowiedzialne za przyłączenie wirusa do jego naturalnych receptorów, którymi są końcowe kwasy sialowe (kwas N-acetyloneuraminowy [NeuAc]) na glikoproteinie i glikolipidach komórki gospodarza oraz za fuzję otoczki wirusa z komórką gospodarza w niskim pH po zakwaszeniu endosomu.

neuraminidaza

Enzymy neuraminidazy (Sialidaza, NA) to enzymy hydrolazy glikozydowej, które rozszczepiają (przecinają) wiązania glikozydowe kwasów neuroaminowych. Występuje w wirusach grypy. Enzym ten umożliwia wirusom opuszczenie zainfekowanych komórek, powodując uszkodzenie ich błon. Umożliwia także przyczepienie się wirusa do błony komórkowej, co ułatwia penetrację do wnętrza komórki. Neuraminidaza ma duże powinowactwo do kwasu sialowego receptorów błonowych.

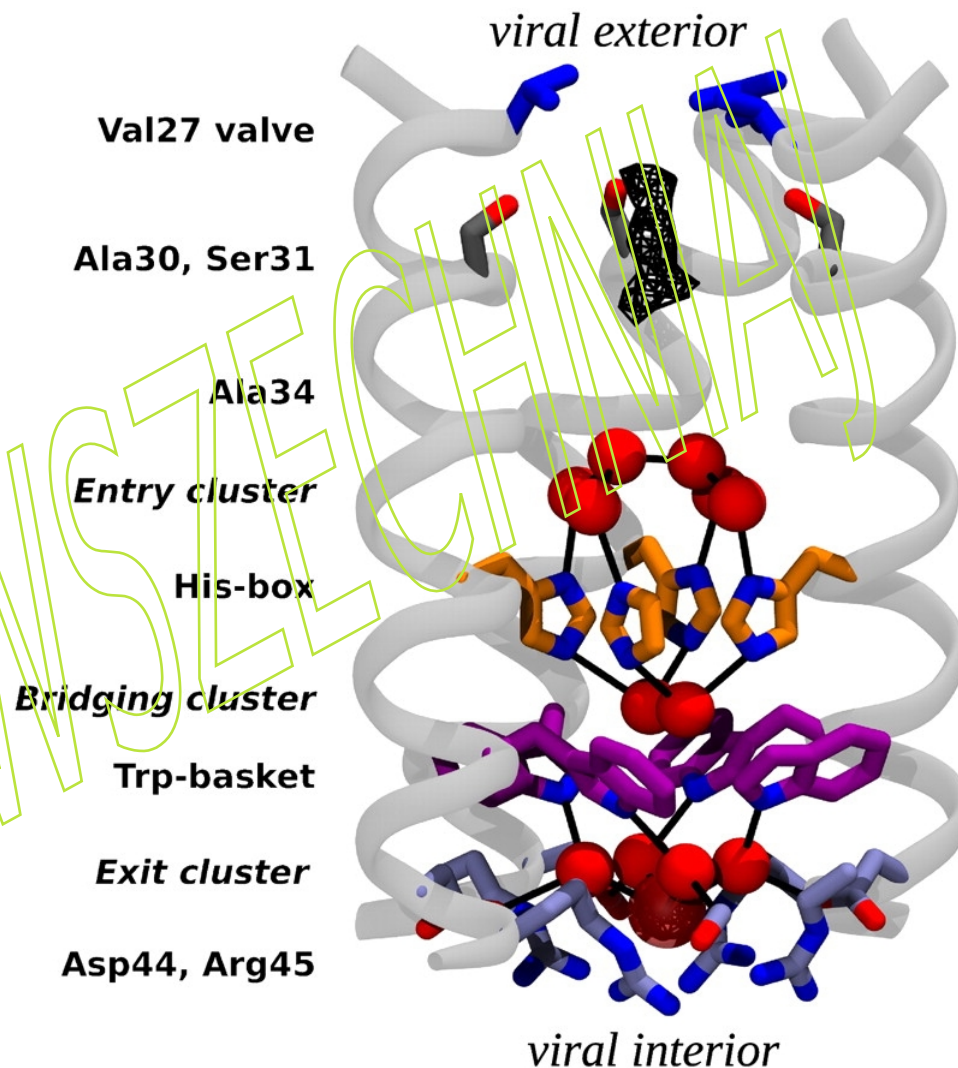


NA występuje w postaci tetrameru czterech identycznych monomerów. Każdy monomer składa się z czterech odrębnych domen strukturalnych znanych jako głowa katalityczna, łodyga, region transbłonowy i ogon cytoplazmatyczny. Poszczególne monomery domeny głównej pokazano w kolorze zielonym, szarym, fioletowym i pomarańczowym. Struktury łodygi NA, regionu transbłonowego i ogona cytoplazmatycznego nie zostały jeszcze rozwiązane i są tutaj przedstawione jako cztery helisy alfa.

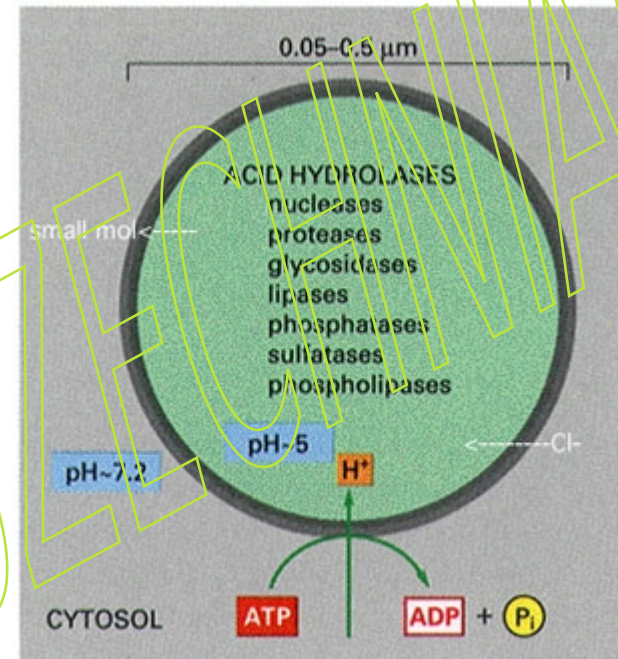
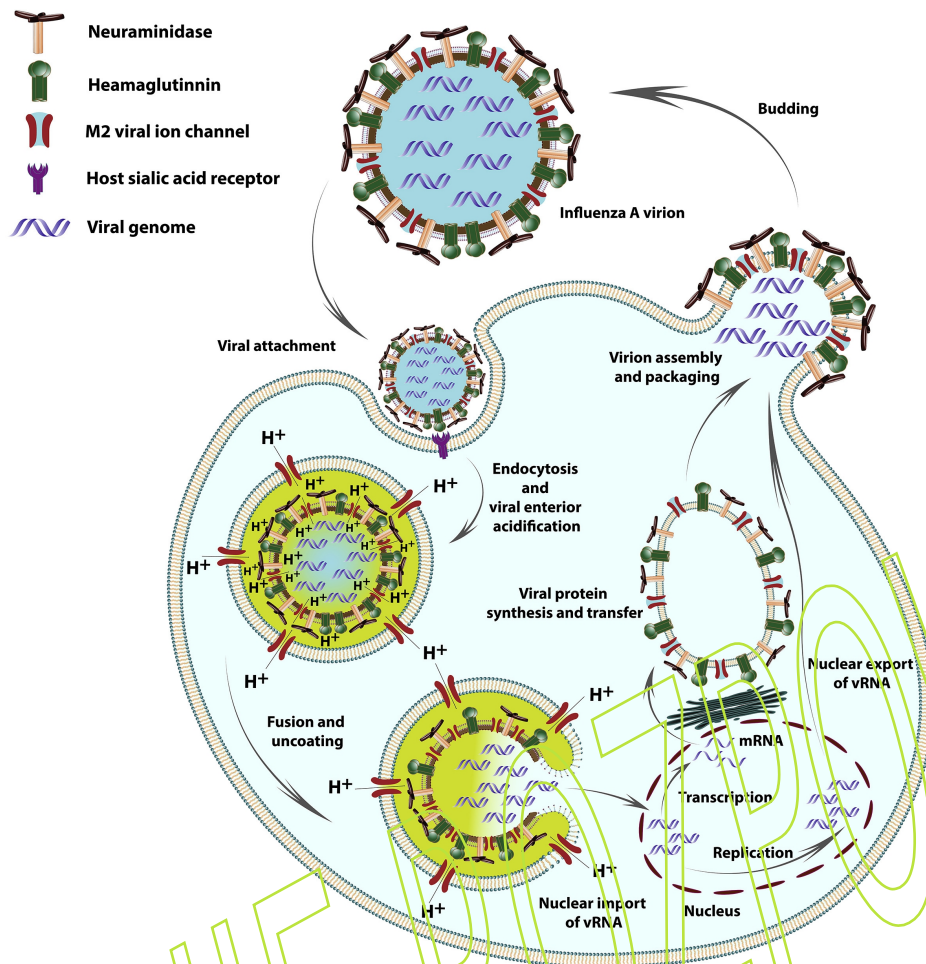
Białko transmembranowe M2

Białko M2 jest selektywną wobec protonów wiroporyną, integralną częścią otoczki wirusowej wirusa grypy A. Sam kanał jest homotetramerem (składa się z czterech identycznych jednostek M2), gdzie jednostkami są helisy stabilizowane dwoma wiązaniami disiarczkowymi (M2TM'). M2 umożliwia jednokierunkowy (wektorowy) strumień protonów przez błonę wirusa w odpowiedzi na niskie pH na zewnątrz wirusa. Przewodnictwo protonowe białka M2 wirusa grypy A jest niezbędne do replikacji wirusa.

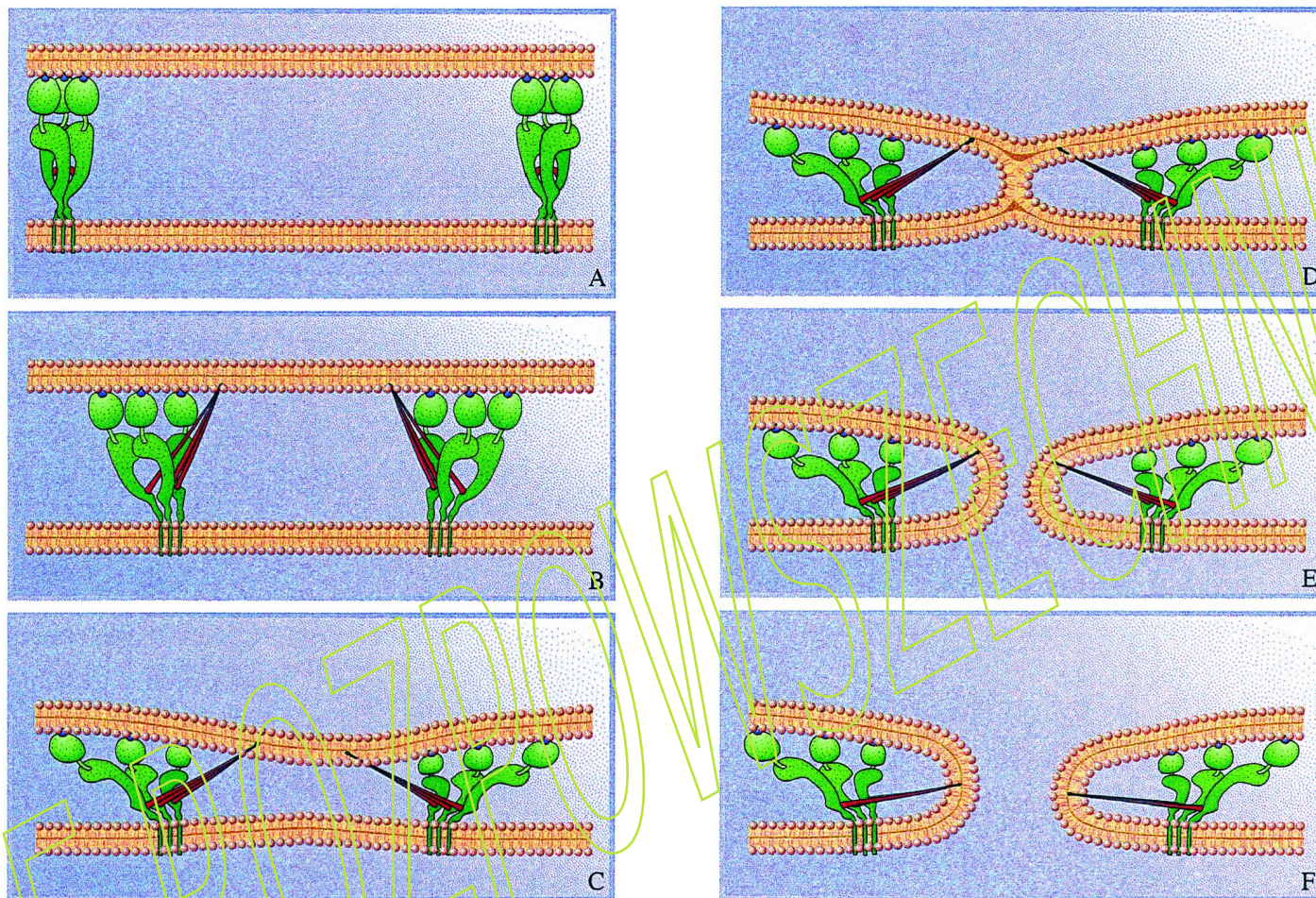
PNAS 107:15075-15080 (2010)



Struktura M2TM'. (A) Szkielet trzech monomerów jest narysowany w kolorze jasnoszarym, a grupy łańcuchów bocznych wyściełających pory są pokazane w postaci pałeczek. Od N-końca (na zewnątrz wirusa) do C-końca (wewnątrz wirusa) są to: zastawka Val27 (niebieski), Ser31 (ciemnoszary), His-box (pomarańczowy), koszyk Trp (fioletowy) i pole Asp/Arg (jasnoniebieskie). Cząsteczki wody należące do klastrów wejściowych, mostkowych i wyjściowych są reprezentowane przez **czzerwone kule**. Czarne linie wskazują zaobserwowane wiązania H woda-białko. Najwyższy dimer wód w klastrze wejściowym występuje w dwóch prawie jednakowo częstych konfiguracjach w sieci krystalicznej, powiązanych obrotem o 90° w dół centralnej osi kanału. Na rysunku pokazano tylko jedną z dwóch orientacji. W klastrze wyjściowym pięta cząsteczka wody ma większy promień. Model szkieletowy przedstawia obszar szczytowy rozproszonej gęstości elektronów wykrytej tuż pod zastawką Val27.



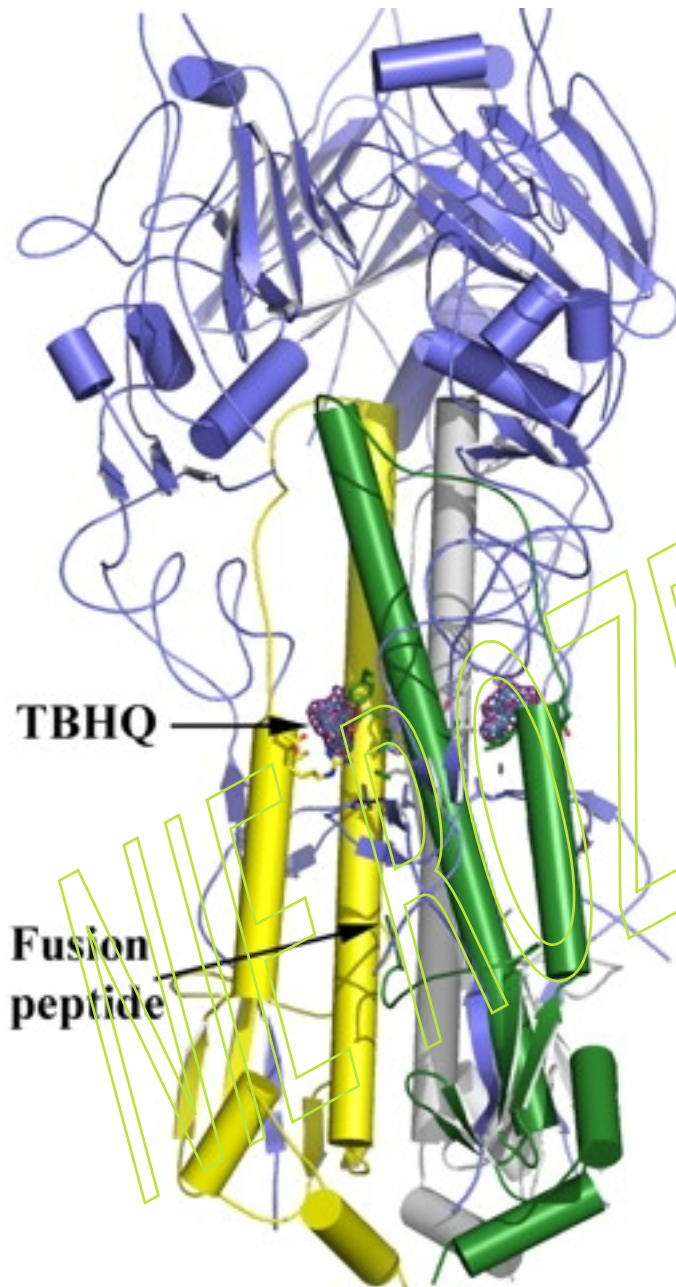
Wirusy grypy wiążą się poprzez hemaglutyninę z cukrami kwasu sialowego na powierzchni komórek nabłonkowych, zazwyczaj w nosie, gardle i płucach ssaków oraz jelitach ptaków. Po rozszczepieniu hemaglutyniny przez proteazę komórka importuje wirusa na drodze **endocytozy**. Endocytoza prowadzi do utworzenia endosomu, pęcherzyka związanego z błoną, w którym znajduje się cząsteczka wirusa. Po wejściu wirusa, M2 ulegający ekspresji na błonie wirionu transportuje protony z endosomów komórki gospodarza w celu zakwaszenia wnętrza wirionu. Obniżone pH endosomu powoduje masową zmianę konformacyjną w HA, czyniąc go aktywnym fuzynie, a tym samym sprzyjając łączeniu się pomiędzy otoczką wirusa a błoną endosomalną. Wirusowe rybonukleoproteiny (vRNP) przedostają się do cytozolu i są importowane do jądra, gdzie następuje replikacja. Wejście wirusa grypy do komórek docelowych ma stosunkowo krótkie okno czasowe, następuje dopiero po przybyciu cząstek zakaźnych do endosomu i wymaga zakończenia, zanim wirus wejdzie w kontakt z hydrolazami lizosomalnymi.



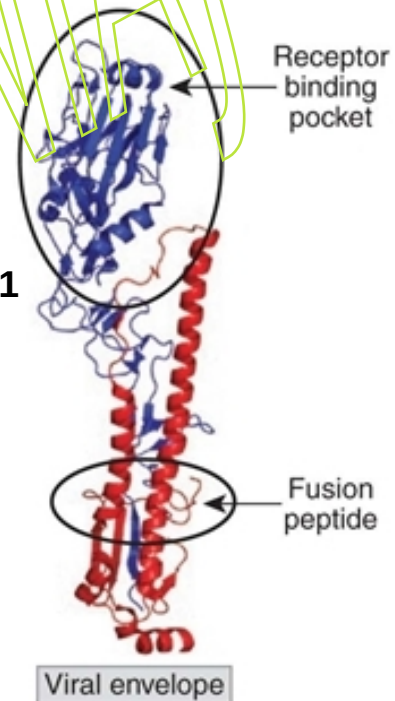
Model mechanizmu fuzji błonowej za pośrednictwem hemaglutyniny (HA) wirusa grypy. Specyficzne wiązanie HA grypy (kolor zielony) zachodzi poprzez interakcje domen kulistych HA (HA1) z resztami kwasu siałowego zlokalizowanymi na glikoproteinach lub glikolipidach błony docelowej przy obojętnym pH (niebieskie kropki, A). Przy niskim pH wyzwalana jest zmiana konformacyjna HA, co skutkuje ekspozycją hydrofobowego N-końcowego peptydu HA2 i jego projekcją w kierunku błony docelowej na końcu nowo utworzonej długiej helisy (czerwona) i jednoczesnym (częściowym) otwarciem trimer (B). Oprócz zmiany konformacyjnej per se aktywne HA są gromadzone razem, skupiając się w „miejscu fuzji” (B, C). Dalsze oddzielenie „główek” HA1 i nachylone ustawienie HA przy niskim pH spowodowałoby zbliżenie do siebie dwóch dwuwarstw (C). Początkowe łączenie błon obejmuje lipidowy związek pośredni z mieszaniem zewnętrznych listków obu dwuwarstw (hemifuzja, D). Ostatecznie etap hemifuzji przekształci się w pojedynczy jednowarstwowy obszar kontaktu, który później zapadnie się w mały por fuzyjny (E). Dalsze powiększenie porów (F) jest prawdopodobnie spowodowane działaniem peptydu fuzyjnego. Należy zauważyć, że peptyd obecnie praktycznie odwrócił swoją początkową orientację przy niskim pH.

Glikoproteina błonowa hemaglutyniny (HA) wirusa grypy jest trimerelem identycznych podjednostek utworzonych z dwóch polipeptydów połączonych mostkami dwusiarczkowymi: HA1 dalszego od błony i mniejszego, bliższego do błony HA2, połączonych pojedynczym wiązaniem dwusiarczkowym.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:14306-14313, 1997



Struktura monomeru hemaglutyniny. Każdy monomer składa się z dwóch segmentów, HA1 (niebieski) i HA2 (czerwony), które obejmują peptyd fuzyjny. Obszar zawierający miejsca antygenowe, region wywołujący większość przeciwciał neutralizujących, zakreślono na górze struktury, z miejscem wiązania ligandu wskazanym strzałką.

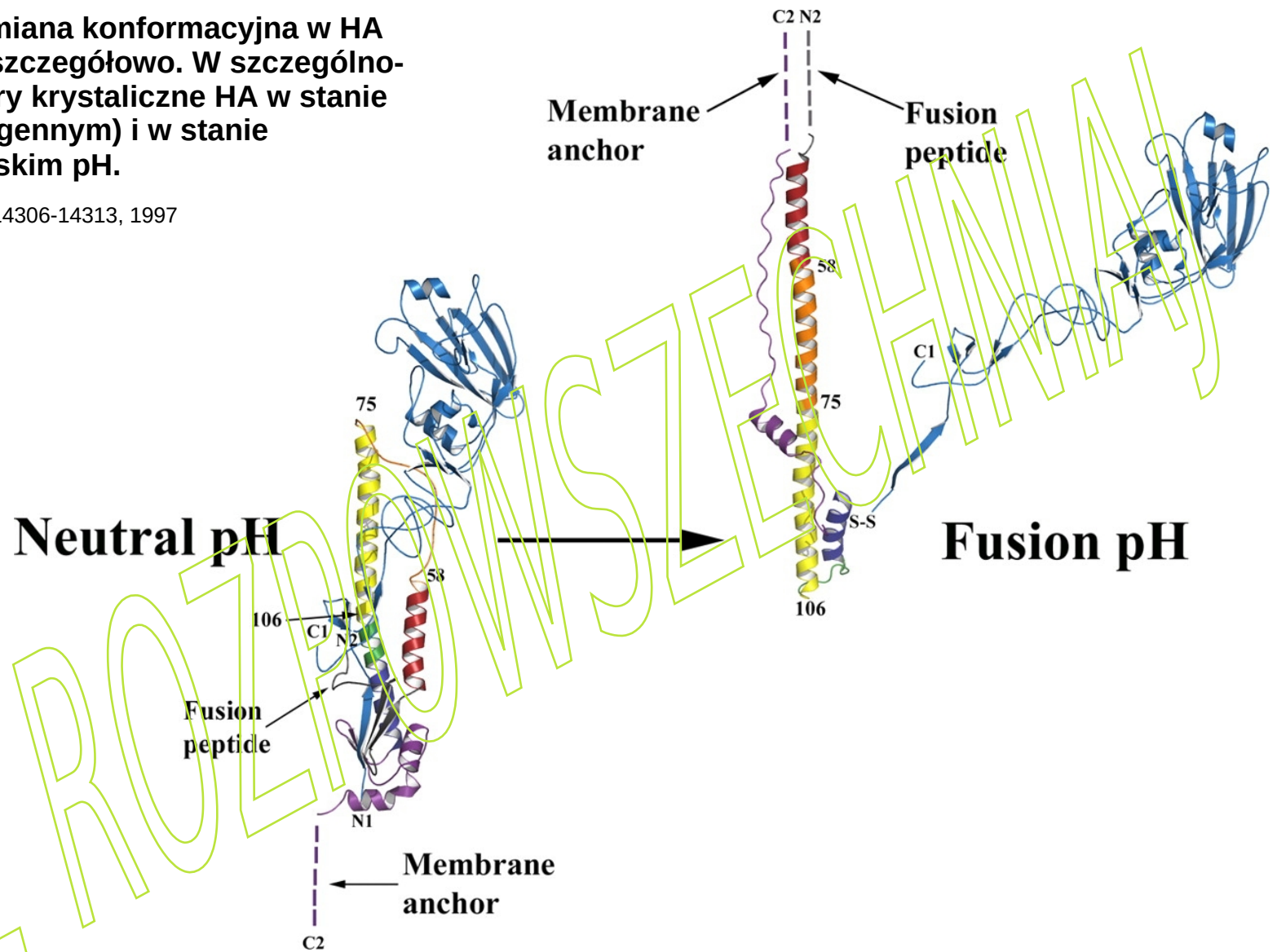


Nature Structural & Molecular Biology, 16:233-234, 2009

Reprezentacja trimery hemaglutyniny w kompleksie ze znanym inhibitorem fuzji błon i zakaźności wirusa, tert-butylohydrochinonem (TBHQ). Pokazuje, że inhibitor wiąże się w hydrofobowej kieszeni utworzonej na styku monomerów HA. Zajęcie tego miejsca przez TBHQ stabilizuje strukturę obojętnego pH poprzez interakcje między podjednostkami i wewnątrz podjednostek, które prawdopodobnie hamują przegrupowania konformacyjne wymagane do fuzji błony.

Wywołana kwasem zmiana konformacyjna w HA jest rozumiana dość szczegółowo. W szczególności określono struktury krystaliczne HA w stanie natywnym (tj. nefuzogennym) i w stanie przekształconym o niskim pH.

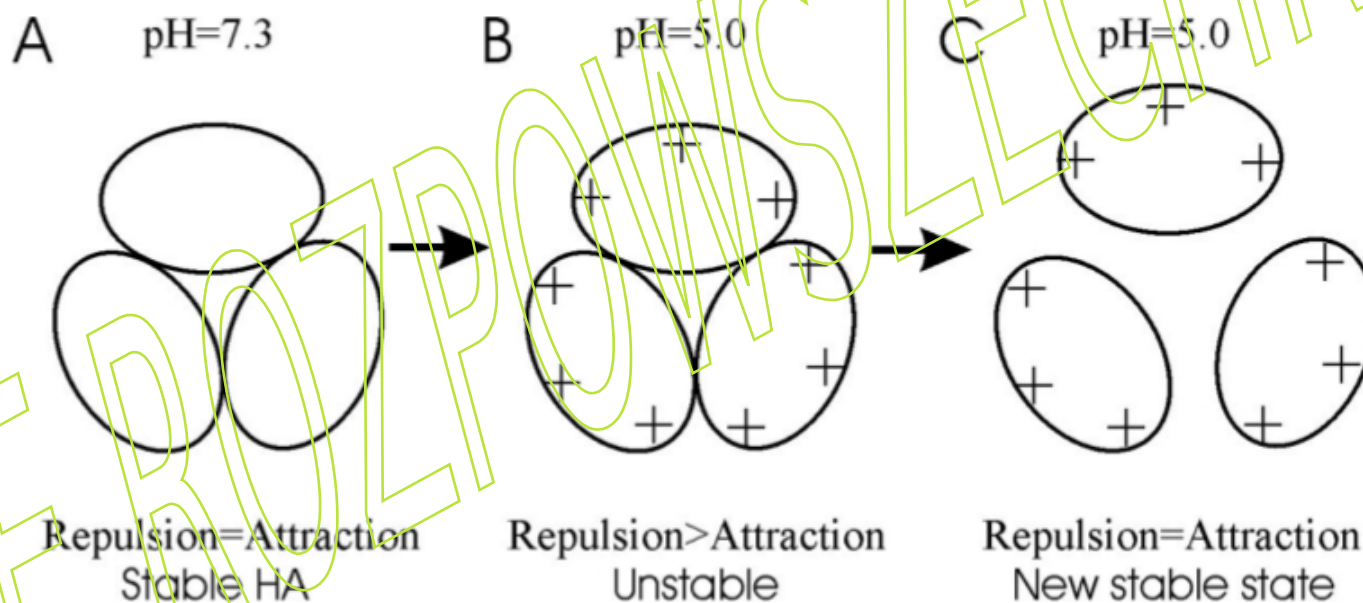
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:14306-14313, 1997



Schematy struktury podjednostki trimeru HA przy obojętnym pH (po lewej) i po inkubacji przy pH fuzji (pH 5,0, 20°) (po prawej). Połączone mostkiem dwusiarczkowym łańcuchy polipeptydowe, HA1 i HA2, są odpowiednio polokorowane na niebiesko i wielobarwnie. Ich końce N i C są oznaczone odpowiednio N1, C1 i N2, C2.

Protonacja i stabilność domeny globularnej hemaglutyniny wirusa grypy

Model przedstawiony w Biochimica et Biophysica Acta, 1376:147-154, 1998 sugeruje oddzielenie „główek” HA1 przed fuzją membrany. Huang i współpracownicy sugerują, że w warunkach pH-temperatura typowych dla zmiany konformacyjnej HA i fuzji błonowej dysocjacja podjednostek HA1 jest spowodowana wzmożonym protonowaniem podjednostek HA1, co prowadzi do wzrostu dodatniego ładunku wypadkowego tych podjednostek i z kolei do osłabionego przyciągania między nimi.

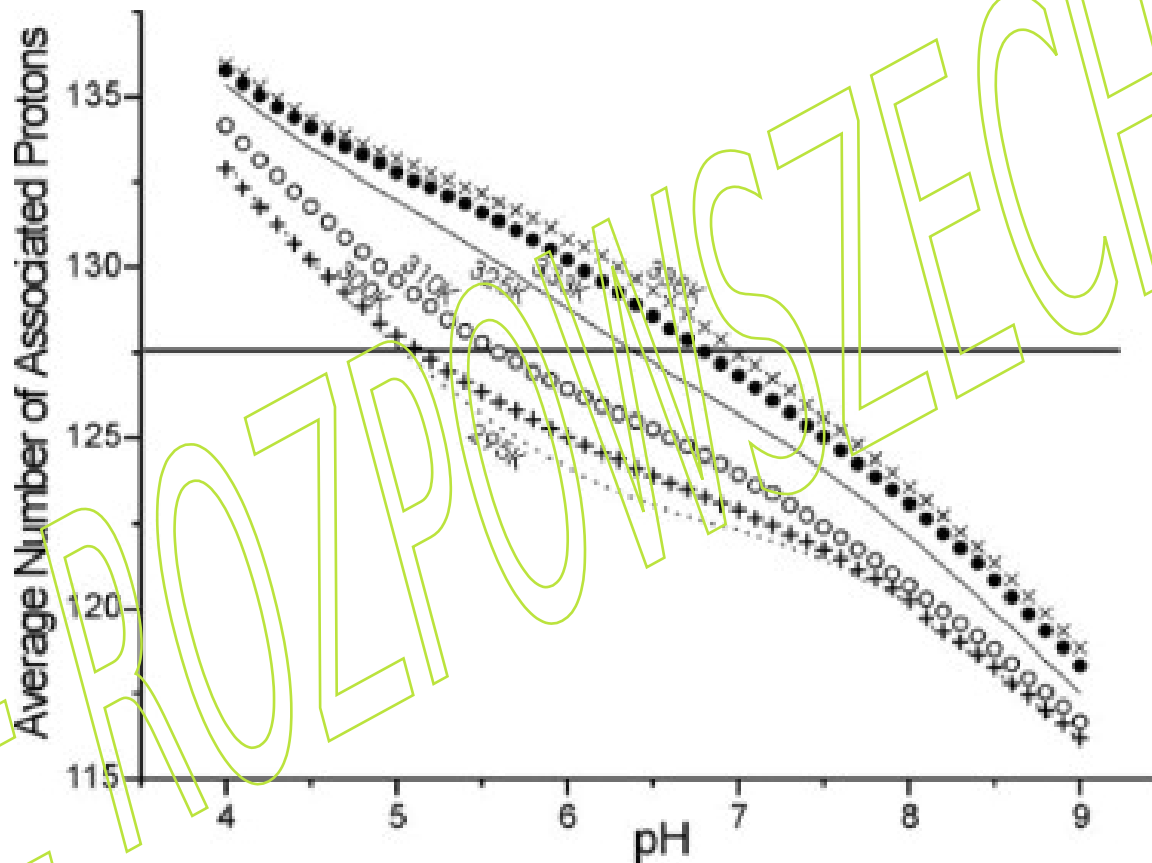


Częściowa dysocjacja domeny HA1 wywołana niskim pH. (A) Widok z góry domeny HA1 stabilnej trimerycznej ektodomeny HA przy obojętnym pH; (B) Wzmocnione protonowanie domeny HA1 wystawionej na działanie rozpuszczalnika osłabia przyciąganie pomiędzy trzema podjednostkami HA1 przy niskim pH; (C) Nowy stabilny stan domeny HA1 po jej częściowej dysocjacji przy niskim pH jest zdeterminowany równowagą pomiędzy siłami przyciągającymi i odpychającymi.

Q. Huang, R. Opitz, E. W. Knapp, and A. Herrmann, Biophysical Journal, 82: 1050-1058, 2002

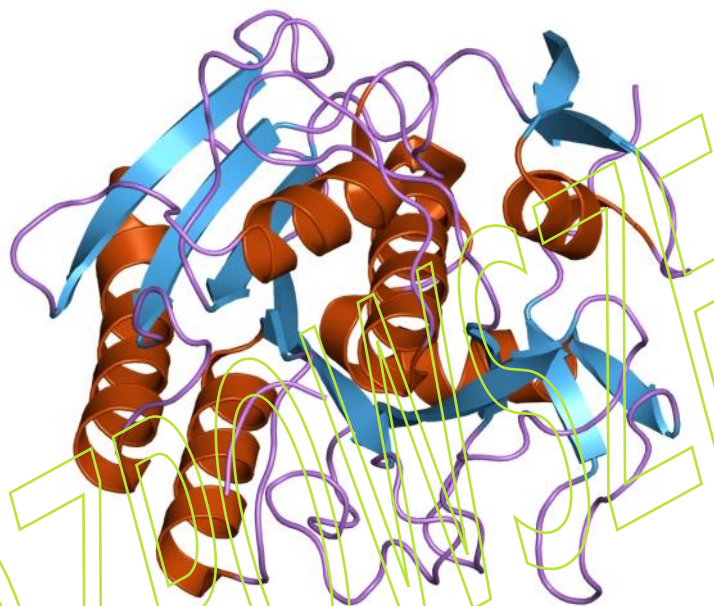
Teoretyczne przewidywanie stanu protonowania hemaglutyniny w funkcji pH i temperatury

Kierując się hipotezą, że zwiększone protonowanie podjednostki HA1 odgrywa zasadniczą rolę w zmianie konformacyjnej, zbadaliśmy, w jaki sposób ten stopień protonowania zależy od pH i temperatury.



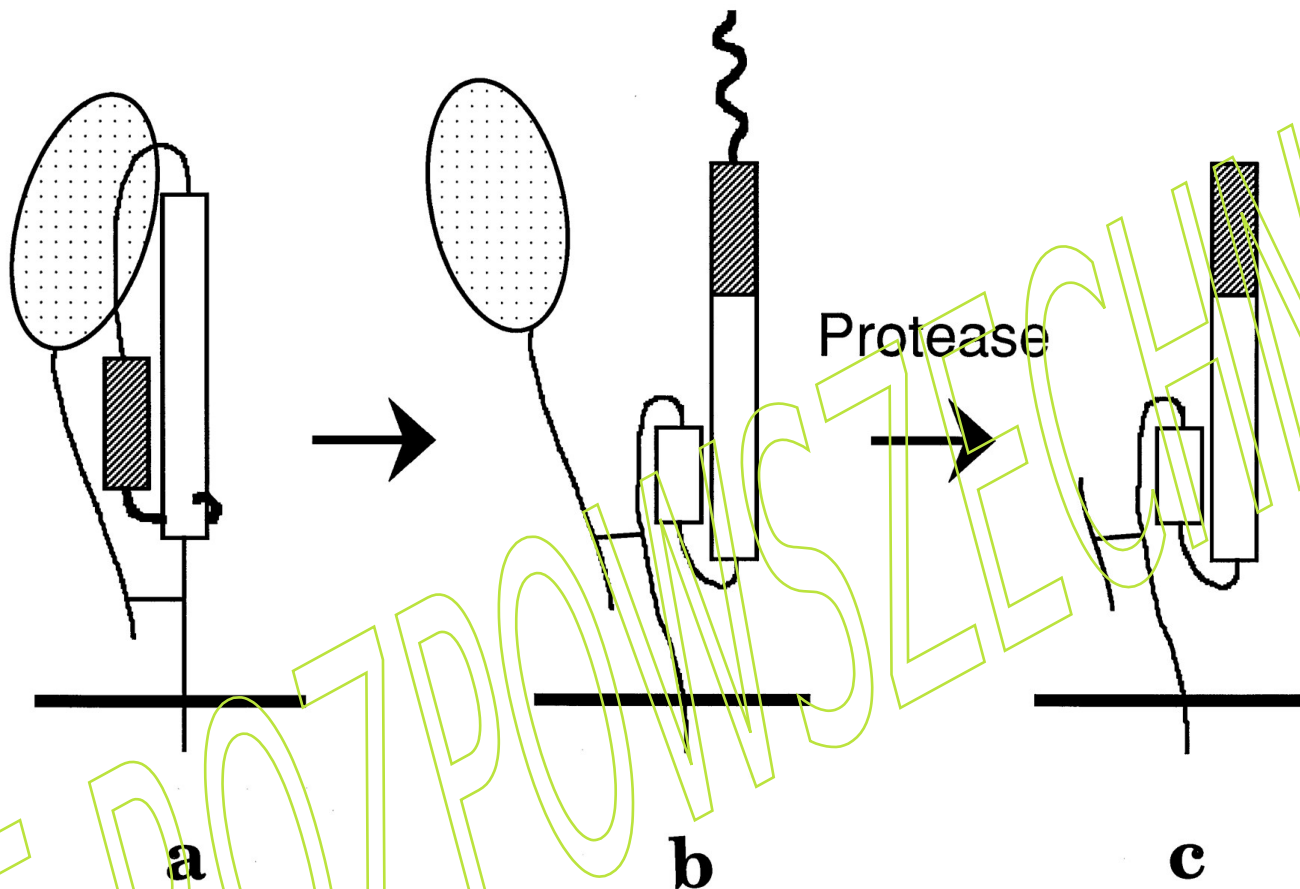
Średnia liczba protonów związanych z domeną HA1 w różnych warunkach pH i temperatury. Linia prosta na rysunku wskazuje wartość średniej liczby związanych protonów przy $\text{pH} = 5,1$ i $T = 300 \text{ K}$, która wynosi 127,63. Za pomocą tej linii pokazano wartości pH, wynoszące odpowiednio 5,0, 5,7, 6,5, 6,9 i 7,1, w których domena HA1 ma podobne wartości średniej liczby związanych protonów w temperaturach $T = 295 \text{ K}$, 310 K , 325 K , 333 K i 338 K . Zwykle w temperaturze pokojowej potencjał fuzyjny HA jest aktywowany przy kwaśnym pH pomiędzy $\text{pH} 5$ i $\text{pH} 6$. Średnia liczba protonów związanych z domeną HA1 w temperaturze 300 K i $\text{pH} 5,1$ odpowiadająca $\sim 127,6$ (patrz linia prosta na rysunku) wzrasta w odniesieniu do warunków nefuzogenicznych ($\text{pH} 7,3$, 300 K).

Proteinaza K jako narzędzie do badania stabilności białek: test proteolizy w celu określenia zmian konformacyjnych



W biologii molekularnej proteinaza K jest szerokospektralną serynową proteazą. Enzym ten został odkryty w 1974 roku w ekstraktach grzyba *Engyodontium album* (dawniej *Tritirachium album*). Proteinaza K jest w stanie trawić włosy (keratynę), stąd nazwa „Proteinase K”. Dominującym miejscem rozszczepienia jest wiązanie peptydowe sąsiadujące z grupą karboksylową aminokwasów alifatycznych i aromatycznych z zablokowanymi grupami alfa-aminowymi. Jest powszechnie stosowana ze względu na swoją szeroką specyficzność. Ten enzym należy do rodziny peptydaz S8 (subtilisin). Masa cząsteczkowa proteinazy K wynosi 28 900 daltonów (28,9 kDa).

Próbki wirusa grypy typu A inkubowano przez 15 minut w warunkach eksperymentalnych, rozcieńczano i neutralizowano do warunków standardowych za pomocą 0,5 M Tris, pH 8, a następnie trawiono proteinazą K (stosunek proteinazy K do HA wagowo 1:1) przez 1–4 godziny w temperaturze pokojowej. Białka wirusa i fragmenty białek rozdzielano za pomocą 12% i 14% żeli poliakrylamidowych, odpowiednio w warunkach nieredukujących i redukujących.



Schemat testu proteazy na zmianę konformacyjną HA. W jednym monomerze trimeru HA polipeptyd HA1 (nakrapiana kulka i linia ciągła) jest połączony z polipeptydem HA2 wiązaniem disiarczkowym. Polipeptyd HA2 przechodzi przez błonę wirusową (na dole) raz i obejmuje region peptydu fuzyjnego. (a) Natywny HA jest odporny na proteolizę. (b) Zmiana konformacyjna: HA1 dysocjuje od górnej części HA2, a peptyd fuzyjny jest wypychany na górną część cząsteczki. (c) Proteoliza konformacji fuzogenicznej: część HA1 i peptydu fuzyjnego HA2 ulega proteolitycznej degradacji, pozostawiając większość HA2 połączoną wiązaniem disiarczkowym z fragmentem HA1. W rezultacie polipeptydy HA1 i HA2 są mniejsze, a różnicę tę można wykryć metodą SDS/PAGE i immunoblotu.

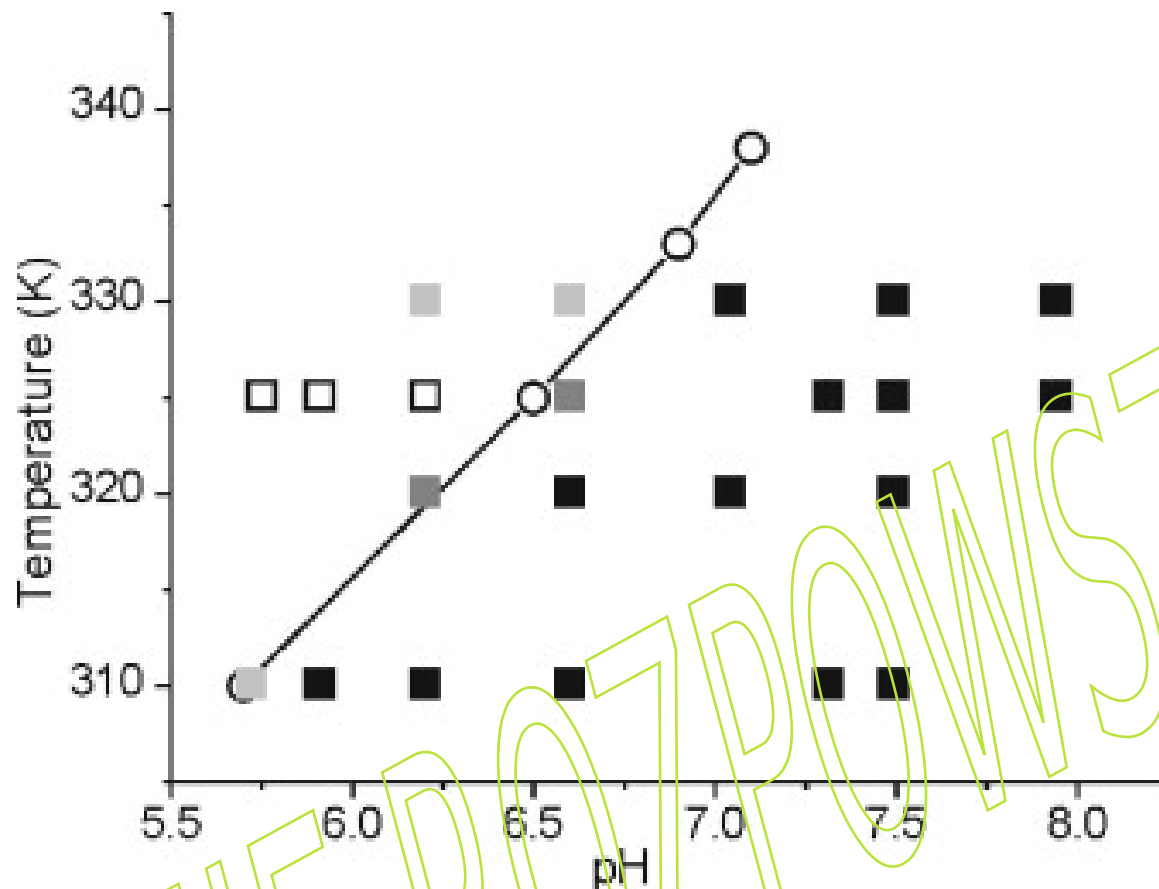


TABLE 4 Conformational change of HA of X31 from the native conformation to a proteinase K-sensitive state

Temperature (K)	pH	α
310.15	5.72	0.39
	5.91	0.86
	6.20	1.02
	6.60	1.16
	7.31	1.07
	7.49	1.00
	6.20	0.51
	6.60	0.80
	7.04	0.80
	7.49	1.00
320.15	5.75	0.0
	5.91	0.06
	6.20	0.09
	6.60	0.76
	7.31	1.06
	7.49	1.16
	7.94	1.00
	6.20	0.28
	6.60	0.43
	7.04	1.11
325.15	7.49	0.97
	7.94	1.00
330.15		

Względna ilość HA odpornego na proteolizę, α , dla danej temperatury i pH.

Zmiana konformacyjna HA ze szczepu X31 wirusów grypy, z konformacji natywnej do stanu odpornego na proteinazę K jako funkcji pH i temperatury. Przejście konformacyjne przesuwają się do wyższych progów pH wraz ze wzrostem temperatury. Względna ilość rozszczepionego HA, α , jest pokazana w zależności od pH i temperatury za pomocą kwadratów (patrz tabela). W przypadku prezentacji graficznej wartości z $\alpha \geq 0,8$ są uważane za reprezentujące konformację odporną na proteolizę (pełne czarne kwadraty), z $\alpha \leq 0,2$ jako stan wrażliwy na proteolizę (puste kwadraty), a wartości z $0,5 < \alpha < 0,8$ i $0,2 < \alpha \leq 0,5$ odzwierciedlają obszar przejścia (odpowiednio szare i jasnoszare kwadraty). Otwarte kółka i linie odpowiadają przewidywanej zależności pH-temperatury od określonego stopnia protonacji domeny HA1 pokazanej linią prostą na rysunku na slajdzie 11.

Identification of a pH sensor in influenza hemagglutinin using X-ray crystallography

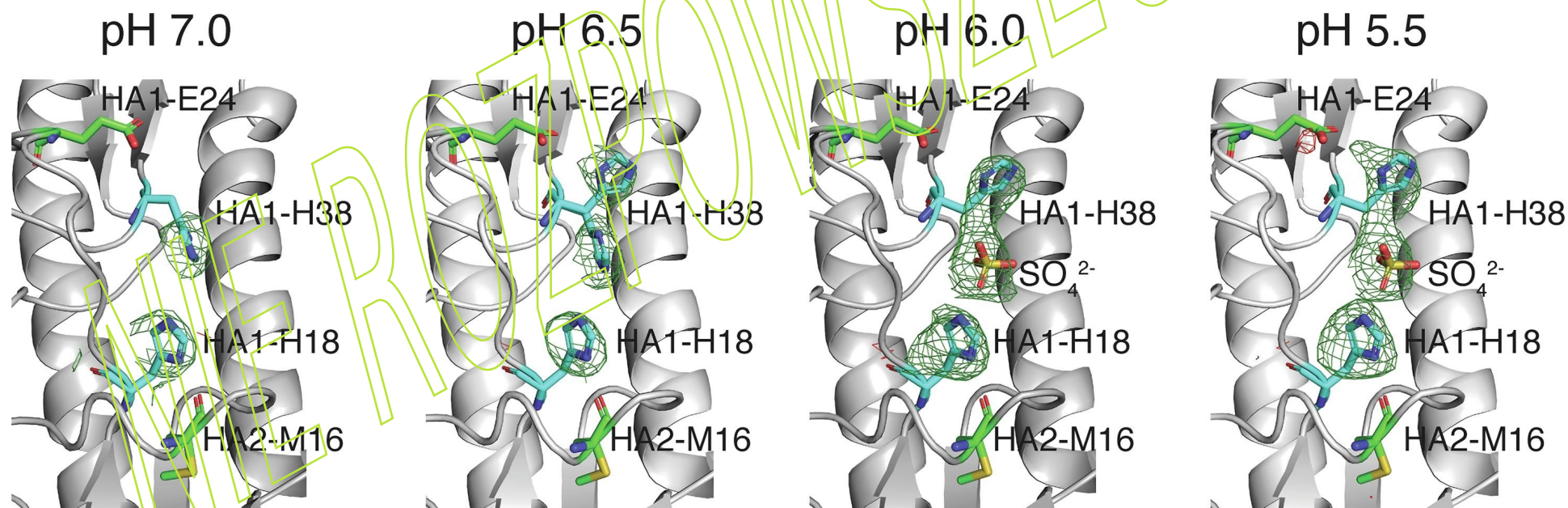
Aleksandar Antanasijevic, Matthew A. Durst, Arnon Lavie , Michael Caffrey
J. Struct. Biol. 209:107412/1-5 (2020)

Hemaglutnina (HA) pośredniczy w przedostawaniu się wirusa grypy poprzez serię zmian konformacyjnych wywołanych niskim pH endosomu. Rezydium lub kombinacja rezydów działających jako czujniki pH nie zostało jeszcze w pełni ustalone. W tej pracy testujemy wpływ pH na strukturę H5 HA poprzez namaczanie HA skrytalizowanego przy pH 6,5 w szeregu buforów o niższym pH, naśladując warunki panujące w endosomie. Odkryliśmy, że HA1-H38, konserwatywny w grupie 1 HA, ulega uderzającej zmianie w konformacji łańcucha bocznego, co przypisujemy jego protonowanie i odpychanie kationów z konserwatywnymi HA1-H18. Praca ta sugeruje, że krystalografię rentgenowską można zastosować do badania zmian konformacyjnych wywołanych przez pH na małą skalę, dostarczając cennych informacji na temat lokalizacji czujników pH w HA. Co ważne, zaobserwowana zmiana w konformacji HA1-H38 jest kolejnym dowodem na to, że indukowane przez pH zmiany konformacyjne HA są wynikiem serii zdarzeń protonacyjnych w konserwatywnych i niekonserwatywnych czujnikach pH.

HA jest syntetyzowany jako białko prekursorowe HA0, a następnie jest rozszczepiany przez proteazy komórkowe, tworząc kompleks połączony wiązaniami dwusiarczkowymi składający się z HA1, podjednostki wiążącej receptor, i HA2, podjednostki pośredniczącej w fuzji błony.

H5 w tym artykule oznacza wirusy ptasiej grypy A(H5) (szczep H5).

Struktury dla H5 HA przy pH 5,5, 6,0, 6,5 i 7,0 rozwiązano przy rozdzielczości odpowiednio 2,30, 2,11, 2,39 i 2,79 Å. Ogólnie rzecz biorąc, stwierdzono, że te 4 struktury są bardzo podobne. Jednakże dogłębne porównanie 4 struktur ujawnia dowody na jeden ważny efekt związany z wrażliwością na pH, który obejmuje parę konserwatywnych histydyn występujących na granicy faz pomiędzy podjednostkami HA1 i HA2 (a także w pobliżu peptydu fuzyjnego). Przy pH 7,0 HA1-H18 tworzy wiązanie wodorowe z głównym łańcuchem karbonylowym HA2-M16. Ta interakcja ustawia pierścień imidazolowy HA1-H18 w kierunku łańcucha bocznego HA1-H38. W strukturach o pH 6,0 i pH 5,5 obserwuje się rotację $\sim 120^\circ$ łańcucha bocznego HA1-H38 wokół wiązania C_α - C_β . Zatem przy niższych wartościach pH łańcuch boczny HA1-H38 jest teraz skierowany w stronę przeciwną do łańcucha bocznego HA1-H18. Przy niższym pH łańcuch boczny HA1-H38 jest stabilizowany w nowej konformacji poprzez oddziaływanie elektrostatyczne z grupą karboksylową HA1-E24 (tj. stabilizujące oddziaływanie kation-anion). Dodatkowo wzrost ładunku dodatniego tego miejsca przy niskim pH przyciąga ujemnie naładowaną grupę siarczanową (z roztworu krio). Co ważne, struktura przy pH 6,5 wychwytuje oba stany histydyny w tym przejściu. W szczególności łańcuch boczny HA1-H38 występuje w dwóch konformerach (skierowanych w stronę i od HA1-H18) z obłożeniem $\sim 50\%$.

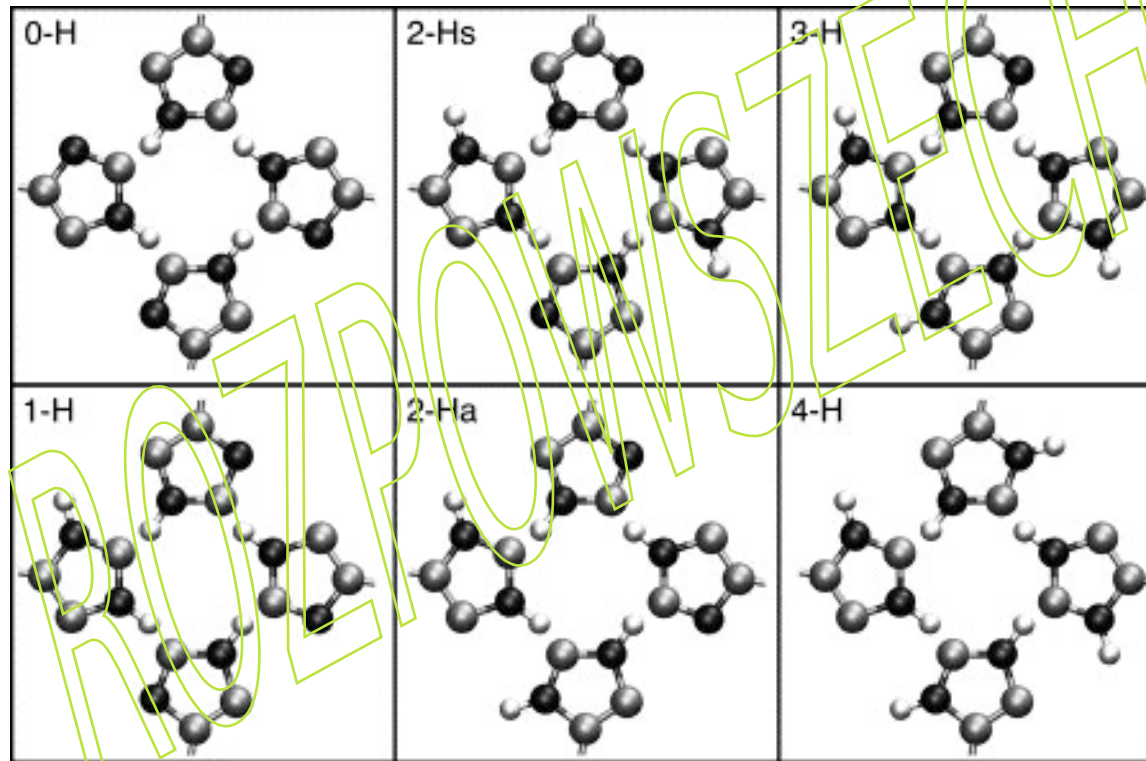


Rotacja łańcucha bocznego HA1-H38 indukowana przez pH. Struktury (z gęstościami elektronowymi) klastra histydynowego w czterech strukturach H5 HA określono po zamrożeniu kryształów za pomocą roztworów kriogenicznych przy różnym pH (odpowiednie pH pokazano w prawym górnym rogu każdej struktury). Mapy różnicowe $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ pokazano dla każdej struktury, z poziomem konturu na poziomie $2,5 \sigma$ (siatka) dla wybranych atomów. W tych strukturach najbliższe zbliżenie HA1-H18 do HA1-H38 wynosi 4,7 Å przy pH 7,0 i 7,8 Å przy pH < 6,5.

Jak pH otwiera kanał H^+ : mechanizm bramkowania M2 wirusa grypy A

Tetrameryczne białko M2 wirusa grypy A to kanał H^+ bramkowany przez pH, zawierający cztery histydyny jako jedyne grupy ulegające jonizacji w porach.

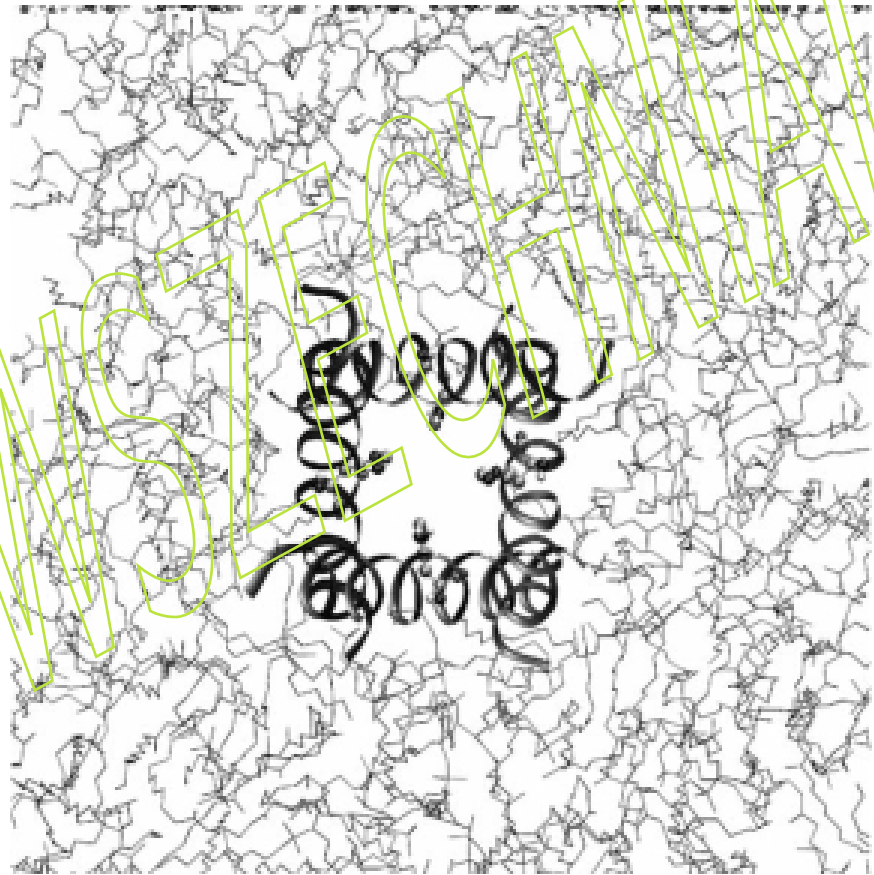
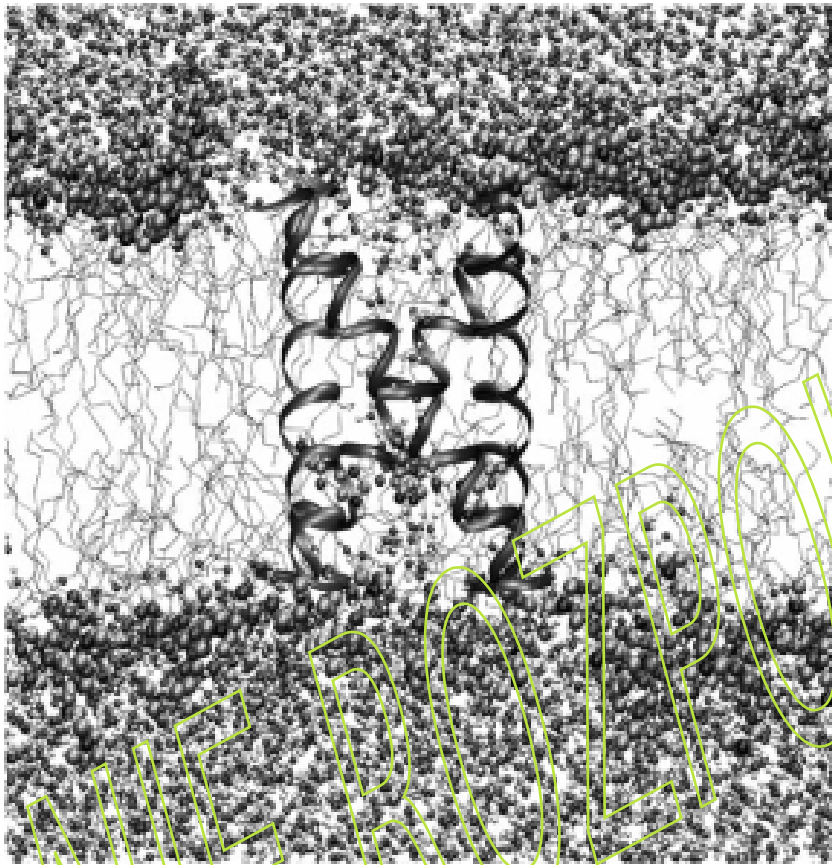
Autorzy zbadali stabilność i dynamikę wszystkich sześciu możliwych stanów protonowania białka, wykorzystując dynamikę molekularną.



Schematyczne przedstawienie 2D sześciu możliwych stanów protonowania czterech reszt histydynowych kompleksu tetramerycznego kanału $M2H^+$ wirusa grypy A. 2-Hs i 2-Ha są kompleksami z dwiema biprotonowanymi resztami histydyny, odpowiednio w konfiguracjach symetrycznych i asymetrycznych.

Itamar Kass and Isaiah T. Arkin,
How pH Opens a H^+ Channel: The Gating Mechanism of Influenza A M2
Structure 13:1789-1798 (2005)

Jak pH otwiera kanał H⁺: mechanizm bramkowania M2 wirusa grypy A

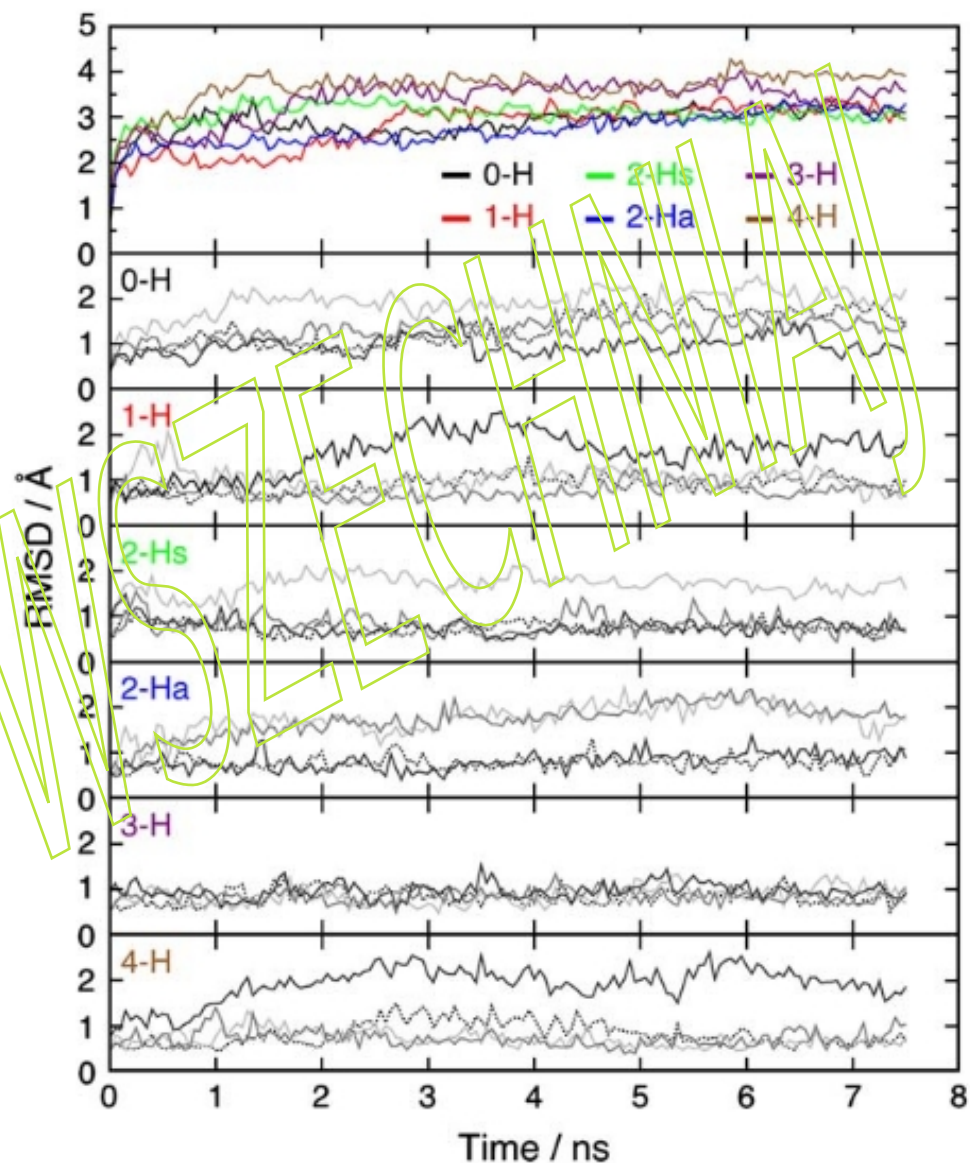


Dwa prostopadłe widoki systemu symulacyjnego dla kompleksu M2. Pierścienie histydynowe pokazano w reprezentacji CPK. Ustalona eksperymentalnie struktura domeny transbłonowej M2 została osadzona w dwuwarstwie lipidowej złożonej ze 128 cząsteczek lipidu dimirystoilofosfo-choliny. Całość dwuwarstwy została następnie zsolwatowana przez 3687 cząsteczek wody z odpowiednią liczbą kationów Na⁺, aby zneutralizować ładunek układu. Stan protonowania His37 dostosowano w celu symulacji każdego z sześciu różnych stanów protonowania kompleksu. Po relaksacji układu przeprowadzono trajektorię dynamiki molekularnej dla każdego układu przez okres 7,5 ns w celu zbadania właściwości układu.

Jak pH otwiera kanał H⁺: mechanizm bramkowania M2 wirusa grypy A

Analiza C_α-rmsd kompleksów M2 podczas 7,5 ns symulacji dynamiki molekularnej.

Obliczono średnie kwadratowe odchylenia atomów C_α białka (C_α-rmsd) w stosunku do początkowej struktury w czasie trwania symulacji. Wszystkie sześć stanów uprotonowania wykazuje wzrost C_α-rmsd na samym początku (pierwsze 100 ps). W ostatnich 4.5 ns symulacji osiągane są wartości plateau C_α-rmsd, między 2,5 Å a 4 Å. Największe strukturalne przegrupowania w stosunku do konfiguracji początkowych są widoczne w stanach protonacji 3-H i 4-H. Jest to prawdopodobnie spowodowane odpychaniem elektrostatycznym między naładowanymi resztami histydyny, których nie ma w modelu początkowym, skonstruowanym tylko z neutralnych histydyn i odpowiadającemu zamkniętej formie kanału. **Struktura ta uzyskana została metodami NMR w stanie stałym** (Nishimura i in., *The closed state of a H⁺ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR*, *Biochemistry* 41, 13170-13177, 2002; PDB entry 1NYJ).



Górny panel: C_α-rmsd całego kompleksu tetramerycznego względem struktury określonej metodami spektroskopii NMR w cieple stałym (Nishimura i in., 2002) dla każdego z indywidualnych układów protonacji, jak wskazano. Czarny, 0-H; czerwony, 1-H; zielony, 2-Hs; niebieski, 2-Ha; fioletowy, 3-H; brązowy, 4-H (patrz Rysunek slajd 26). Sześć dolnych paneli przedstawia C_α-rmsd każdej z indywidualnych helis ze struktury NMR w stanie stałym.

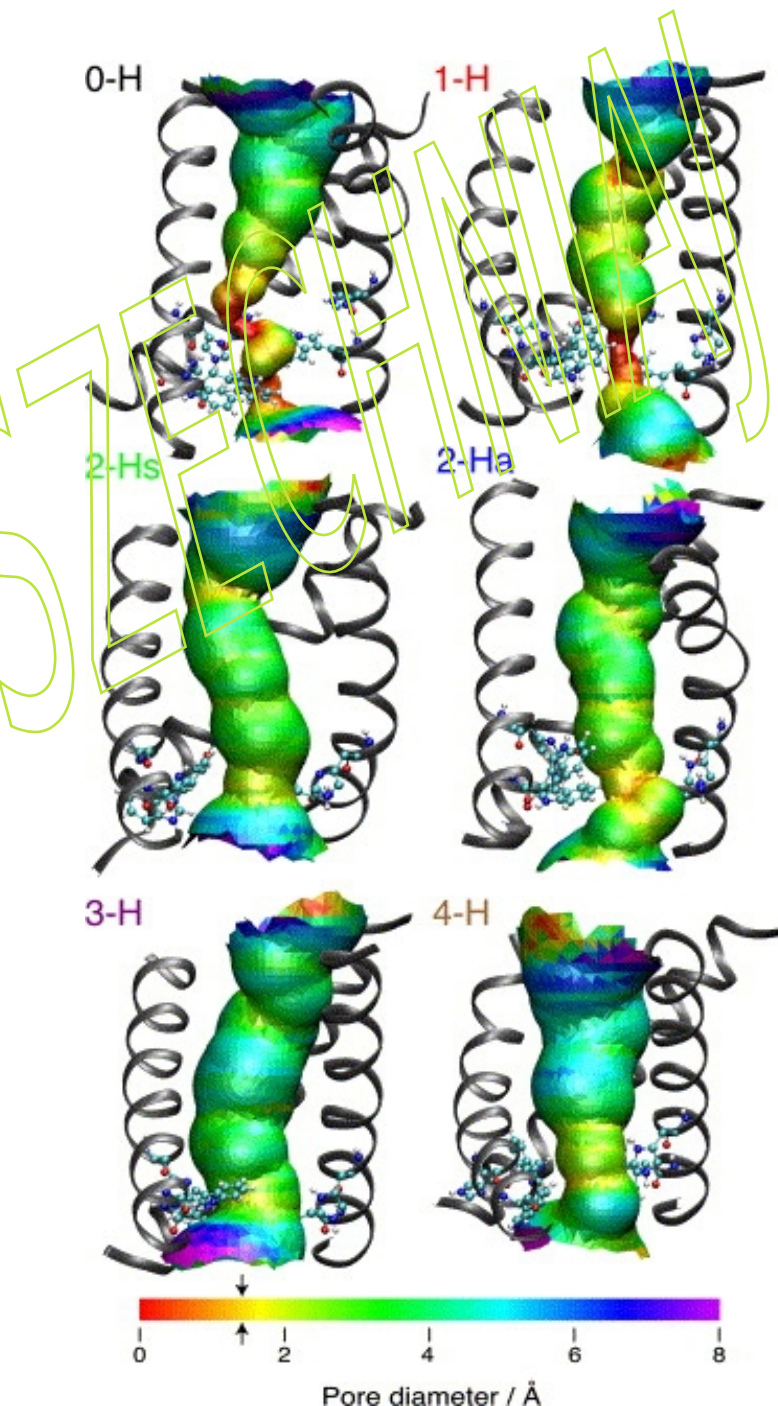
Jak pH otwiera kanał H⁺: mechanizm bramkowania M2 wirusa grypy A

Reprezentacja wielkości porów struktury średniej czasowej (w stanie produktywnym symulacji) różnych stanów protonacji M2.

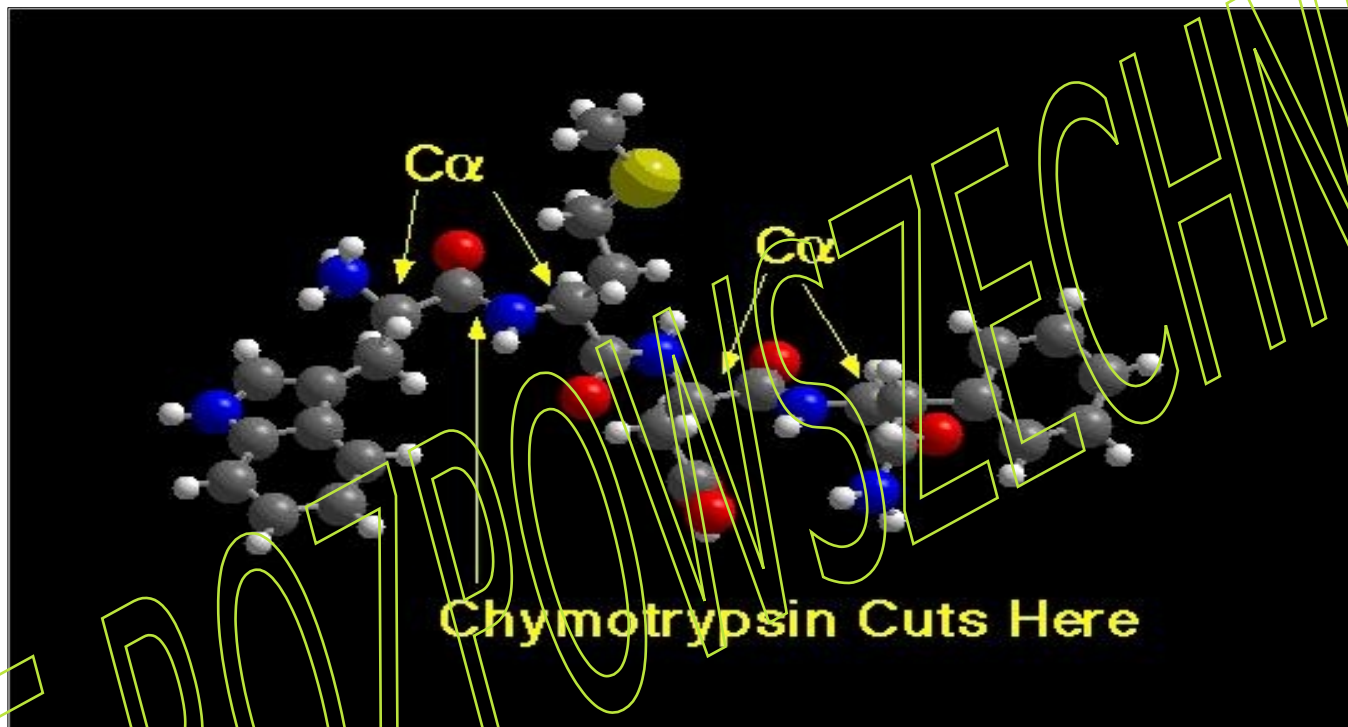
His37 i Trp41 pokazano w reprezentacji ball-and-stick. Dla przejrzystości usunięto jedną z czterech helis. Kodowanie kolorami jest zgodne z legendą znajdującą się na dole. Strzałki w legendzie kolorów przedstawiają promień cząsteczki wody przy 1,41 Å.

Istnieją znaczne różnice pomiędzy promieniami porów dla różnych stanów protonacji w obszarze pierścienia histydynowego. Najmniejsze promienie minimalne, 0,65 i 0,94 Å, występują odpowiednio dla układów 0-H i 1-H w pobliżu His37. Natomiast promienie dla stanów protonacji 2-Hs, 2-Ha, 3-H i 4-H w tym samym miejscu wynoszą odpowiednio 2,7, 1,9, 2,9 i 2,6 Å. Ponieważ promień van der Waalsa cząsteczki wody wynosi 1,41 Å, na podstawie samej struktury białka można stwierdzić, że woda nie może przeniknąć przez kanał, jeśli nie zawiera dwóch lub więcej biprotonowanych reszt histydyny.

W układach z dwiema lub więcej naładowanymi histydynami woda przenika przez cały kanał i może podtrzymywać formowania się ciągłego “łańcucha” H⁺ umożliwiając w ten sposób transport jonów protonowych poprzez mechanizm Grotthusa.

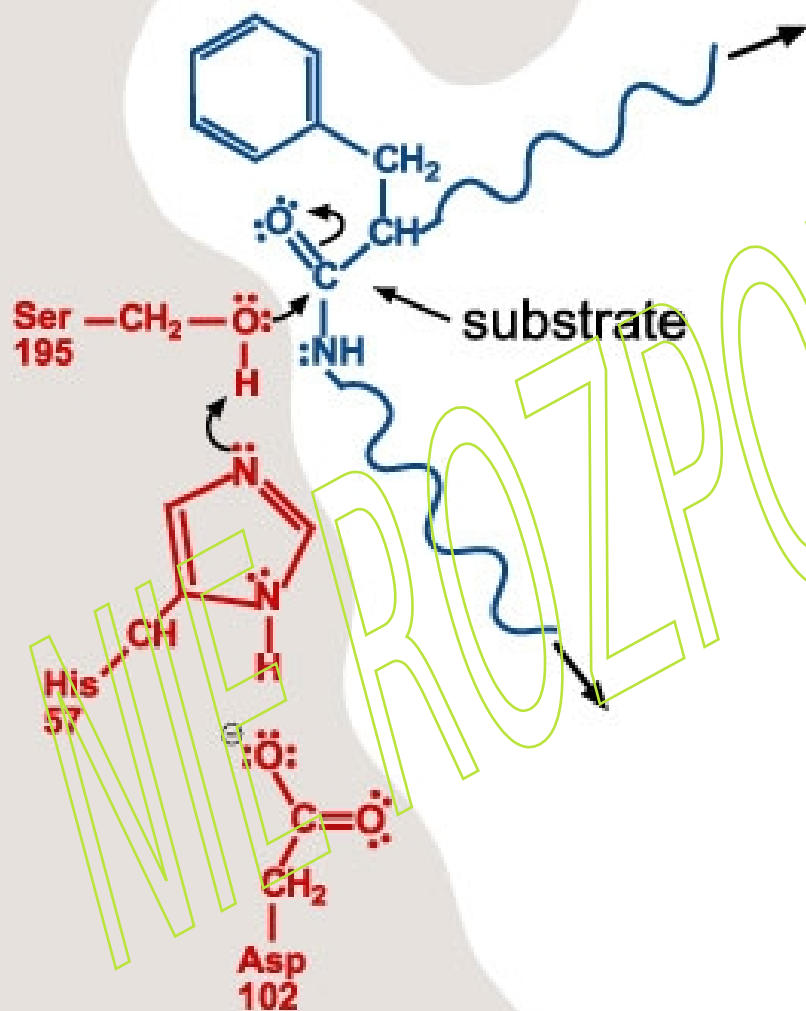


Hydroliza białek przez α -chymotrypsynę



Chymotrypsyna jest enzymem trawiennym ssaków. Hydrolizuje wiązania peptydowe. Działa selektywnie na wiązania po stronie karboksylowej aminokwasów aromatycznych i tych z dużymi grupami hydrofobowymi (np. metionina). Jest proteazą serynową, jej centrum aktywne składa się z histydyny, kwasu asparaginowego i seryny. Obok seryny znajduje się niepolarna „kieszka” wiążąca hydrofobową grupę boczną aminokwasu, po której następuje rozszczepienie wiązania peptydowego przez enzym.

enzyme active site



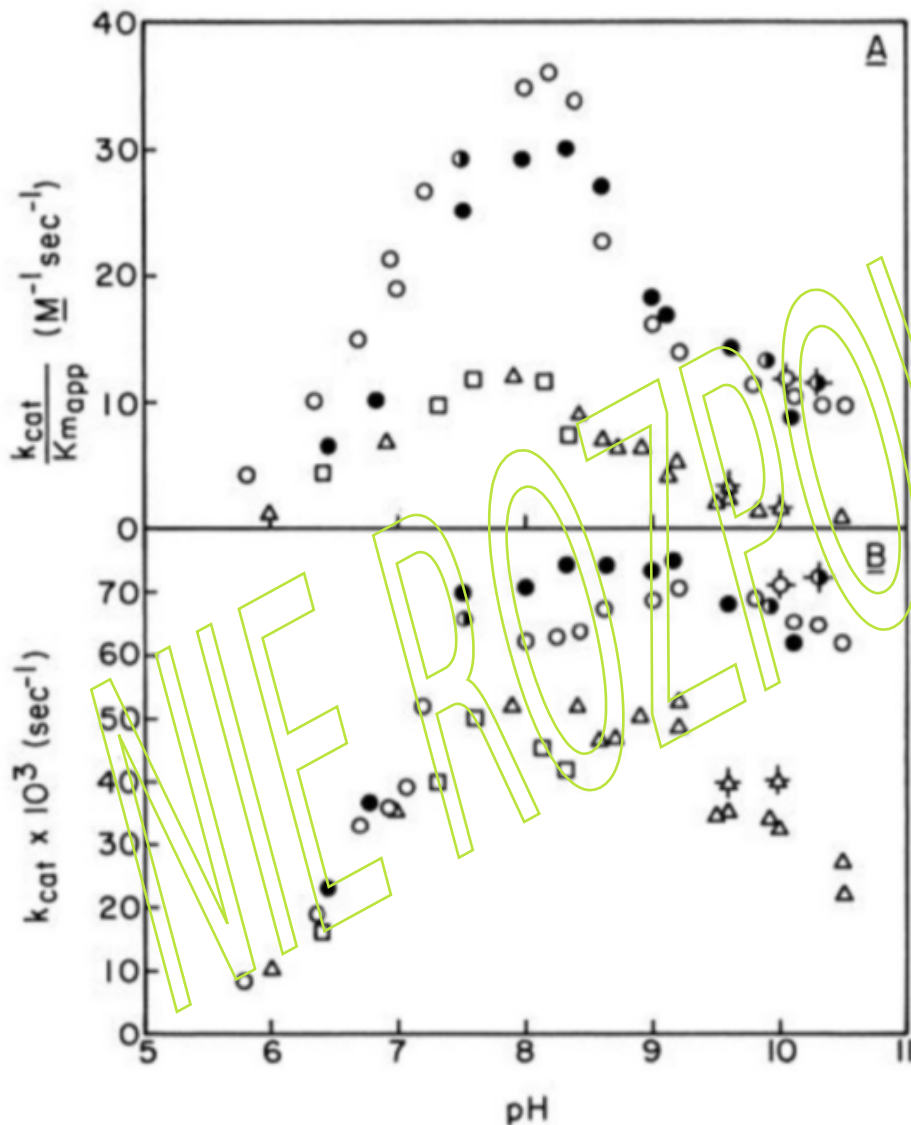
Etap 1: Substrat polipeptydowy przemieszcza się do miejsca aktywnego enzymu. Kształt, rozmiar i sekwencja aminokwasów miejsca aktywnego chymotrypsyny pozwalają tej części enzymu związać część polipeptydu, który ma niepolarne łańcuchy boczne, takie jak te występujące w fenyloalaninie. Gdy polipeptyd znajdzie się w miejscu aktywnym, jon H^+ przemieszcza się z aminokwasu seryny w pozycji 195 (Ser-195) sekwencji aminokwasowej enzymu do aminokwasu histydyny w pozycji 57 (His-57). Atom tlenu w grupie hydroksylowej seryny tworzy następnie wiązanie kowalencyjne z węglem jednego z wiązań peptydowych substratów, przesuwając dwa elektrony z jednego z wiązań podwójnych, tworząc samotną parę.

Chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of N-acetyl-L-tryptophanamide (ATA)

Albert Himoe, Paul C. Parks and George P. Hess

J. Biol. Chem. 242:919-929 (1967)

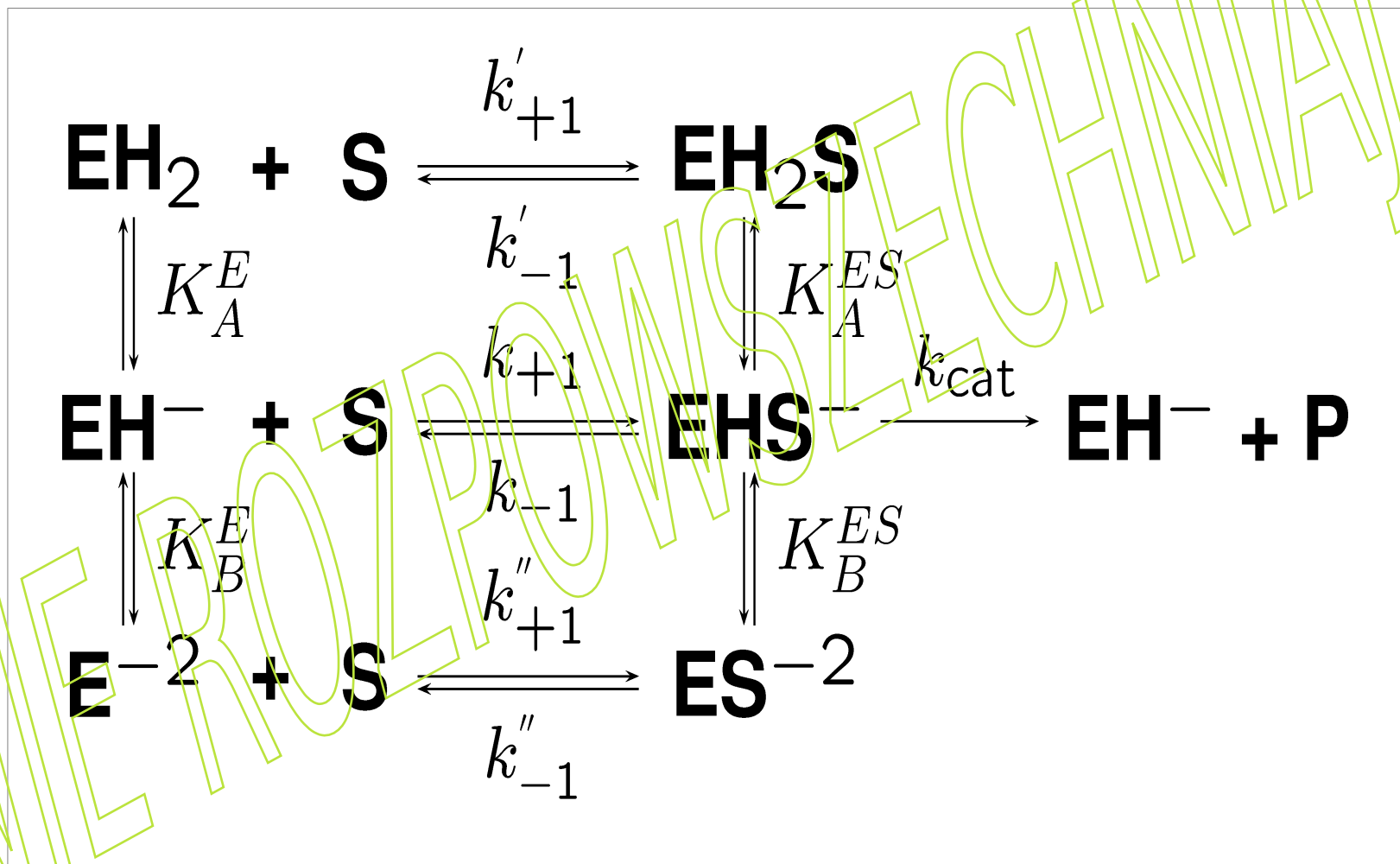
Metoda: pomiar absorpcji



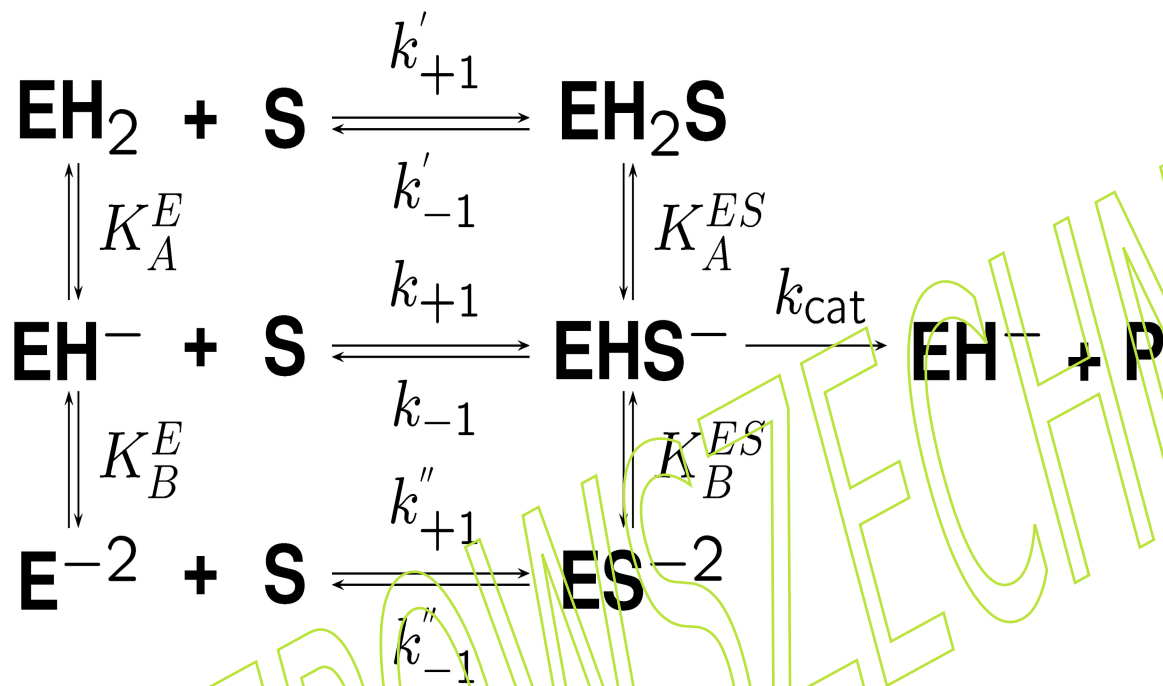
Profil aktywności w funkcji pH przedstawiony na rysunku daje dwie wartości pK_a charakteryzujące chymotrypsynę: $pK_{a1} = 6.7$ i $pK_{a2} = 9.6$. Później ustalono, że pK_{a1} jest wyłącznie wynikiem wzrostu k_{cat} ze wzrostem pH, podczas gdy pK_{a2} wynika zarówno ze wzrostu K_M jak i zmniejszania się k_{cat} ze wzrostem pH [Kahana and Shalitin, Isr. J. Chem. 12, 573-589 (1974)]. Bazując na znajomości struktury i mechanizmu katalitycznego chymotrypsyny, możemy postawić hipotezę, że His-57 znajdująca się w miejscu aktywnym miareczkuje się z $pK_{a1} = 6.7$, podczas gdy jej N-końcowa Ile-16 miareczkuje się z $pK_{a2} = 9.6$: His-57 musi być zdeprotonowana, aby katalizować jako zasada nukleofil Ser-195-OH, podczas gdy N-końcowa Ile-16 musi zostać być uprotonowana, aby utworzyć kluczowy mostek solny, który utrzymuje niezablokowaną szczelinę wiązania substratu i stabilizuje optymalną pozycję Asp-194, Ser-195 i inne ważne pobliskie reszty w miejscu aktywnym.

Zależność działania enzymu od pH

(dwie grupy protonowalne w centrum aktywnym)



$$v = \left(\frac{d[P]}{dt} \right) = k_{\text{cat}} [EHS^-]$$



$$K_A^E = \frac{[\text{EH}^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2]} \quad K_A^{ES} = \frac{[\text{EHS}^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2\text{S}]}$$

$$K_B^E = \frac{[\text{E}^{-2}][\text{H}^+]}{[\text{EH}^-]} \quad K_B^{ES} = \frac{[\text{ES}^{-2}][\text{H}^+]}{[\text{EHS}^-]}$$

$$[\text{E}]_o = [\text{EH}_2] + [\text{EH}^-] + [\text{E}^{-2}] + [\text{EH}_2\text{S}] + [\text{EHS}^-] + [\text{ES}^{-2}]$$

$$[\text{EH}_2] = \frac{[\text{EH}^-][\text{H}^+]}{K_A^E} \quad [\text{EH}_2\text{S}] = \frac{[\text{EHS}^-][\text{H}^+]}{K_A^{ES}}$$

$$[\text{E}^{-2}] = \frac{[\text{EH}^-]K_B^E}{[\text{H}^+]} \quad [\text{ES}^{-2}] = \frac{[\text{EHS}^-]K_B^{ES}}{[\text{H}^+]}$$

$$[\text{E}]_o = \frac{[\text{EH}^-][\text{H}^+]}{K_A^E} + [\text{EH}^-] + \frac{[\text{EH}^-]K_B^E}{[\text{H}^+]} + \frac{[\text{EHS}^-][\text{H}^+]}{K_A^{ES}} + [\text{EHS}^-] + \frac{[\text{EHS}^-]K_B^{ES}}{[\text{H}^+]}$$

$$[E]_o = \frac{[EH^-][H^+]}{K_A^E} + [EH^-] + \frac{[EH^-]K_B^E}{[H^+]} + \frac{[EHS^-][H^+]}{K_A^{ES}} + [EHS^-] + \frac{[EHS^-]K_B^{ES}}{[H^+]}$$

↓

$$[E]_o = [EH^-] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H^+]} \right) + [EHS^-] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} \right) \equiv [EH^-]\alpha + [EHS^-]\beta$$

$$\frac{d[EHS^-]}{dt} = -(k_{cat} + k_{-1})[EHS^-] + k_{+1}[EH^-][S] = 0 \Rightarrow [EHS^-] = \frac{[EH^-][S]}{K_M}$$

$$[EH^-] = \frac{[E]_o - [EHS^-]\beta}{\alpha}$$

$$[EHS^-] = \frac{\frac{[E]_o - [EHS^-]\beta}{\alpha} [S]}{K_M} \Rightarrow [EHS^-] = \frac{[E]_o [S]}{K_M \alpha + [S] \beta}$$

$$v = \left(\frac{d[P]}{dt} \right) = k_{cat} [EHS^-] = k_{cat} \cdot \frac{[E]_o [S]}{K_M \alpha + [S] \beta}$$

$$v = \left(\frac{d[P]}{dt} \right) = k_{cat} [EHS^-] = k_{cat} \cdot \frac{[E]_o [S]}{K_M \alpha + [S] \beta}$$

$$\alpha = \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H^+]} \right) \quad \beta = \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} \right)$$

$$v = k_{cat} \cdot \frac{[E]_o [S]}{K_M \cdot \alpha + [S] \cdot \beta} = \frac{\frac{k_{cat} \cdot [E]_o}{\beta} \cdot [S]}{\frac{K_M \cdot \alpha}{\beta} + [S]} \equiv \frac{\frac{V_{max}}{\beta} [S]}{\frac{K_M \cdot \alpha}{\beta} + [S]} \equiv \frac{\tilde{V}_{max} \cdot [S]}{[S] + \tilde{K}_M}$$

$$\tilde{V}_{max} = \frac{V_{max}}{\beta} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} \right)} \quad \tilde{K}_M = \frac{K_M \cdot \alpha}{\beta} = \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^E} + \frac{K_B^E}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_A^{ES}} + \frac{K_B^{ES}}{[H^+]} \right)}$$