

Elektrostatisk vekselvirkninger i proteiner

Her gives en kort opsummering af vores viden om protein elektrostatik og om eksperimenter som for nylig direkte har målt styrken af elektriske felter i proteiner og har bekræftet, at den dielektriske konstant af proteiner er lav.

Af Jens Erik Nielsen, Protein Design, Novozymes A/S

Elektrostatisk vekselvirkninger i proteiner og enzymer har været studeret i over hundrede år på grund af deres store indvirkning på stabiliteten og funktionen af disse biomolekyler. I de sidste 10-20 år har vi fået meget større viden om styrken af elektrostatisk kræfter i proteiner, og hvordan de påvirker industrielt vigtige enzymparametre som pH-aktivitets- og pH-stabilitetsprofiler.

Beregning af elektrostatisk vekselvirkninger

Grundlæggende set er styrken af elektrostatisk vekselvirkninger givet ved Coulombs lov:

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{q_1q_2}{r}$$

hvor ϵ_0 er permitiviteten af vakuum, ϵ er den dielektriske konstant af mediet, q_1 og q_2 beskriver størrelsen af de elektriske ladninger, og r er afstanden mellem ladningerne.

Den dielektriske konstant beskriver, hvordan mediet påvirker styrken af den elektrostatisk vekselvirkning. Et meget polariserbart solvent som vand har en høj dielektrisk konstant (ca. 80 ved 25°C) og leder ikke det elektriske felt godt, idet vandmolekylerne orienterer sig i forhold til det elektrostatisk felt. Et apolært solvent som f.eks. octanol har en lav dielektrisk konstant, hvilket giver stærkere interaktioner end de tilsvarende i vand.

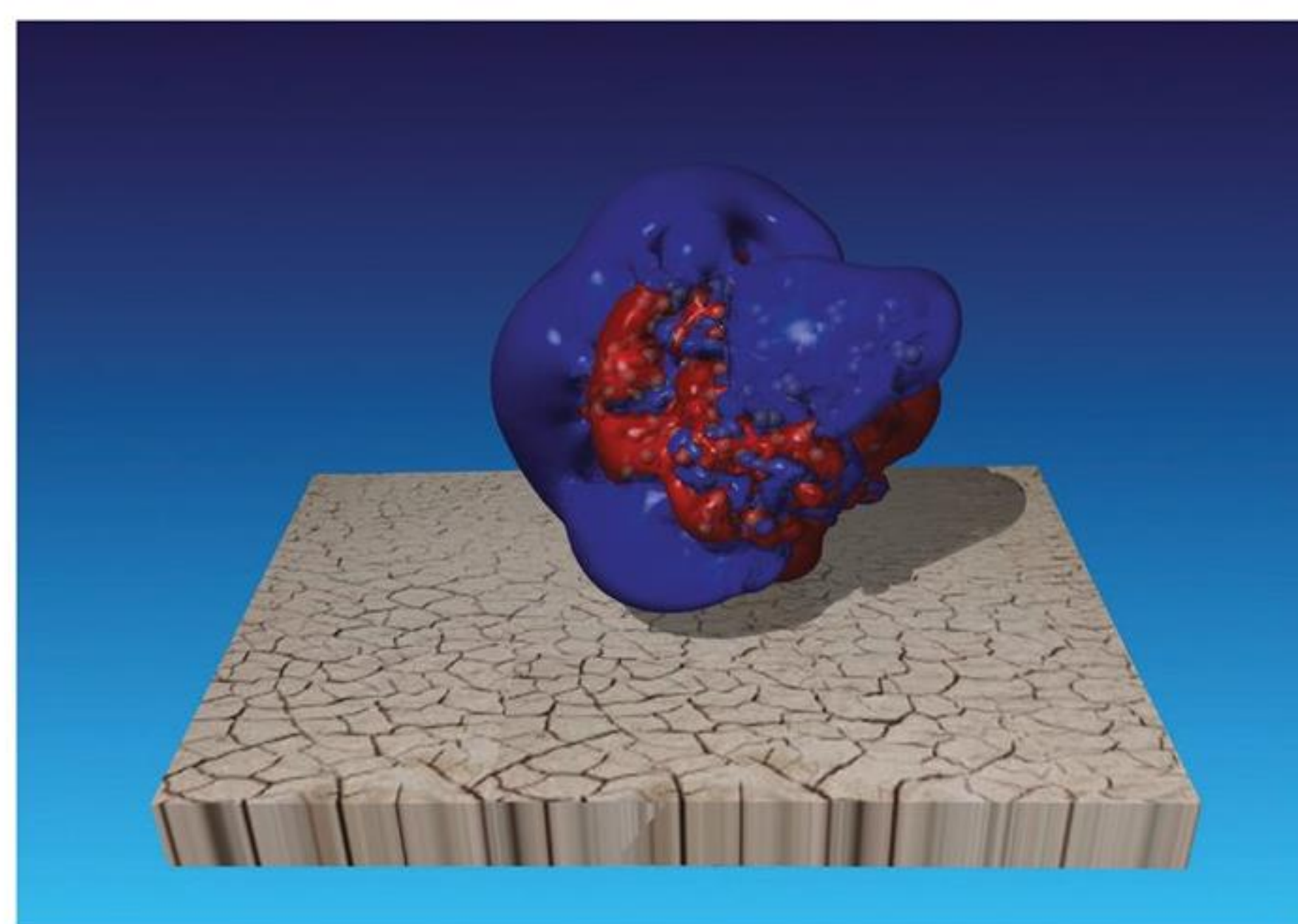
En vandig proteinopløsning kan ikke beskrives tilstrækkelig nøjagtigt som én fase med en uniform dielektrisk konstant, eftersom proteiner er mere apolære end vand, og Coulomb's lov derfor giver unøjagtige beregninger for elektriske kræfter med statisk proteinstruktur. Der er udviklet flere beregningsmetoder til at løse dette problem. De mest populære er Poisson-Boltzmann-baserede algoritmer, der typisk modellerer protein-vand systemet som et 2-fasesystem med en protein dielektrisk konstant på ca. 2-4, og en dielektrisk konstant for vandet på 80.

Der har i mange år været stor uenighed om størrelsen på den dielektriske konstant for proteiner i disse modeller. Forskellige forskningsgrupper har brugt værdier fra 2-20 i et forsøg på at reproducere eksperimentelt biofysiske karakteristika, som primært bestemmes af elektrostatisk kræfter. Disse har typisk været pK_a -værdier af titrerbare aminosyregrupper i grupper målt vha. NMR pH-titreringseksperimenter, og de har vist sig at være svære at beregne nøjagtigt.

Det elektrostatisk felt og pK_a -værdier

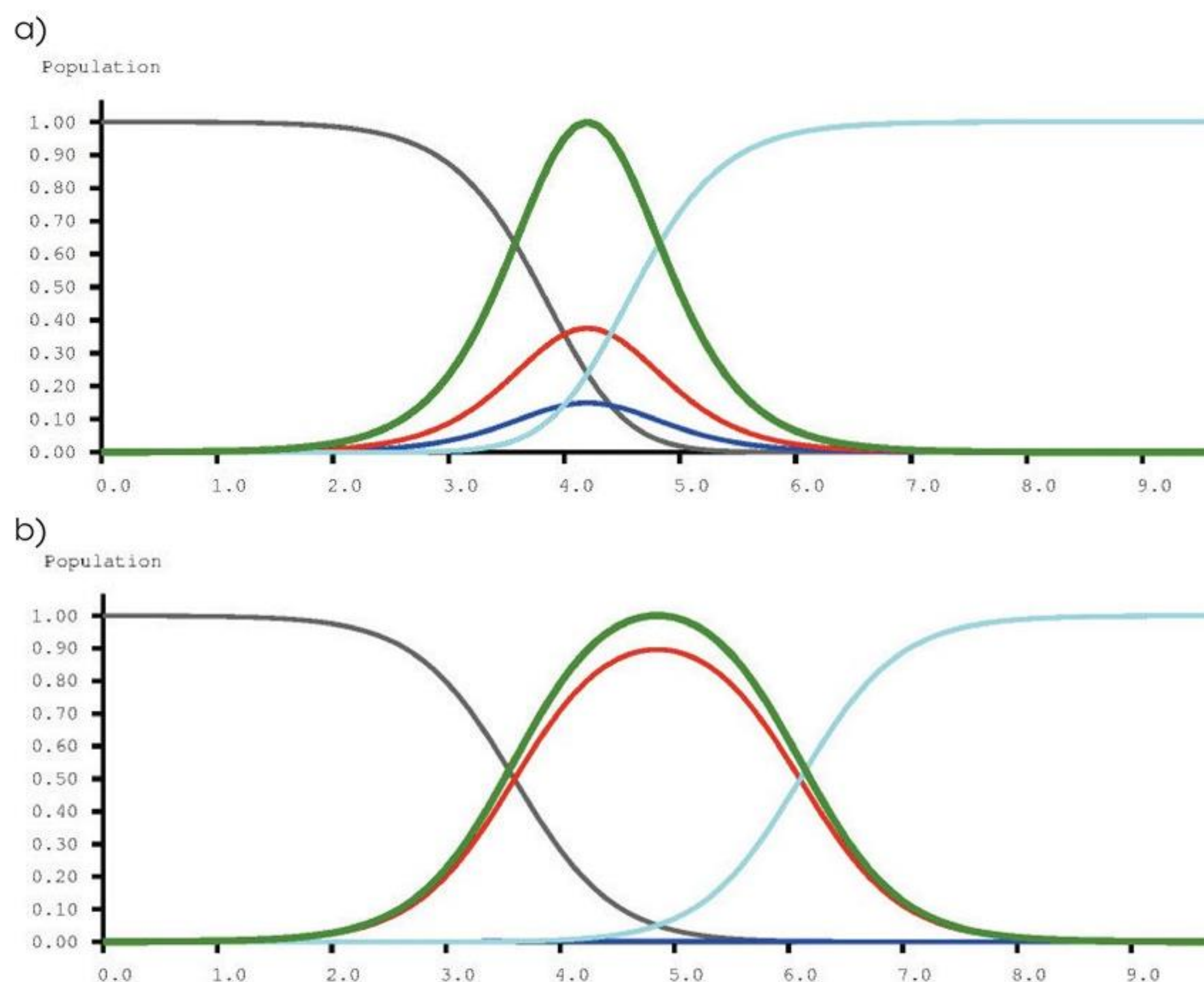
Før vi diskuterer, hvorfor pK_a -værdier er svære at beregne og hvad dette fortæller os om det elektriske felt, er det vigtigt at forstå, hvad der producerer det elektriske felt, hvordan det påvirker pK_a -værdierne i proteiner, og hvorfor pK_a -værdier er vigtige for applikationen af enzymer.

Det elektriske felt i proteiner bestemmes af ladningsfordelingen i proteinet. I klassisk fysisk forstand kan ladningsfordelingen approksimeres ved at tildele hvert eneste atom i et protein en partiel ladning. Sådanne ladningsfordelinger modellerer dipoler og formelle ladninger med god nøjagtighed, men forholder sig ikke til inducerede dipoler og højere-ordens inducerede ladningseffekter.



Figur 1. Det elektrostatisk potentiale omkring proteasen Savinase illustreret med konturer, hvor den potentielle energi af en elementarladning er hhv. -0.5 (rød) og +0.5 (blå) kJ/mol. Atomerne i proteinet kan skimtes som grå kugler gennem de elektrostatisk isopotentielle overflader.

I praksis vil man således tildele hvert atom en ladning på grundlag af et opslag i et "kraftfelt", som er udviklet til at reproducere egenskaber af aminosyrer, f.eks. disses partitioneringskoefficient i et octanol-vand-system. En backbone C=O-gruppe vil typisk have partielle ladninger af størrelsen +0.8 og -0.8, hvorimod den mindre stærke dipol i H-N-bindingen modelleres med partielle ladninger af størrelsen +0.3 og -0.3. Ved et sådant tabelopslag, ladningstildeling eller "charge assignment", kan man approksimere ladningsfordelingen af et givent protein, hvis man har en høj-opløsnings 3D-struktur af proteiner, hvori positionerne af hydrogenatomer også er bestemt.



Figur 2.

Oftest er hydrogenatomer ikke synlige i protein 3D-strukturer bestemt ved røntgenkrystallografi, og positionerne skal derfor beregnes. Ydermere er ladningsfordelingen i et protein stærkt pH-afhængig.

dette afhænger af antallet af protonerbare grupper (N) som 2^N . Eksempelvis består et middelstort enzym som en α -amylase af ca. 500 aminosyrer og ca. 130 titrerbare grupper, hvilket giver 1.4×10^{39} mulige protoneringstilstande. Direkte evaluering af

Disse to fakta komplicerer ladningstilordningen betydeligt, idet ioniseringskonstanterne (pK_a -værdierne) af de titrerbare aminosyrer (Glutaminsyre–Glu, Asparaginsyre–Asp, Histidin–His, Arginin–Arg, Lysin–Lys) til dels bestemmes af det elektriske felt i proteinet. F.eks. vil en Asp i et stærkt negativt ladet miljø have en højere pK_a -værdi, hvorimod en Asp i et positivt ladet miljø vil have en lavere pK_a -værdi.

Dvs. for at kunne bestemme det elektriske felt i et givent protein, så skal man kende pK_a -værdierne for alle de titrerbare aminosyrer i deres specifikke miljø i proteinet, samt pH-værdien der er relevant for ladningstildelingen.

Det lyder umiddelbart som et hønen-eller-ægget problem, men det kan løses elegant ved at dekomponere bidragene til det elektrostatiske felt i en pH-afhængig og en pH-uafhængig komponent. Den pH-uafhængige komponent beregnes først, hvorimod den pH-afhængige typisk bestemmes ved evalueringen af en Boltzmannsum, som summerer over alle tilgængelige protoneringstilstande i proteiner. Selv for små proteiner (100 aminosyrer) er antallet af mulige protoneringstilstande meget højt, eftersom

NEED A CREATIVE ADVISOR?

Between you and your ideas, we'll find the spark for brilliant business opportunities. From IP strategy, legal services and analysis to patents, trademarks, design and copyright, we help illuminate the vast potential in your creation. www.awapatent.com

AWAPATENT

Boltzmann-summen er selvsagt ikke mulig, men med sampling-teknikker såsom Monte Carlo eller andre approksimationer kan man finde gode løsninger på få sekunder.

pK_a-værdier og faktorer, der bestemmer disse

Af de 20 naturligt forekommende aminosyrer titrerer Arg, Asp, Cys, Glu, His, Tyr og Lys ved pH-værdier mellem 2 og 12. Ydermere vil hhv. N- og C-terminalen af proteinet titrere, og standard pK_a-værdierne er kendt for alle disse titrerbare grupper. En pK_a-værdi er et mål for energiforskellen mellem den protonerede og den uprotonerede form af en titrerbar gruppe, og denne energi bestemmes tildels af identiteten af den givne aminosyre og tildels af miljøet omkring den titrerbare gruppe som nævnt ovenfor.

En Asp har eksempelvis en pK_a-værdi på ca. 4.0 i vandig opløsning, men fikseres denne nær en negativ ion såsom en klorid-ion, vil den ufavorable elektrostatiske vekselvirkning mellem den negative ion og den negative ladning på Asp bevirke, at pK_a-værdien af Asp'en bliver forhøjet. Dette gør sig også gældende for interaktioner mellem titrerbare aminosyrer, og mellem disse og partielle ladninger og udvirker, at der er stor forskel på pK_a-værdierne på f.eks. aspartater i proteiner.

Tabel 1 viser pK_a-værdierne af de første syv titrerbare aminosyrer i Hen Egg White Lysozyme og demonstrerer, at der kan være stor forskel på standard pK_a-værdien og den faktisk målte pK_a-værdi i proteinets foldede tilstand.

Rest	Standard pK _a -værdi	pK _a -værdi i HEWL
Glu 7	4.4	2.6
His 15	6.5	5.5
Asp 18	4.0	2.8
Glu 35	4.4	6.1
Asp 48	4.0	1.4
Asp 52	4.0	3.6
Asp 66	4.0	1.2

Tabel 1.

Effekt af pK_a-værdier

Denne spredning i et proteins pK_a-værdier er andet end et kuriosum, og har en stor funktionsmæssig betydning. Der observeres bl.a. en effekt på proteinstabilitet og enzymatiske pH-aktivitetsprofiler.

Et enzym katalyserer kemiske reaktioner ved at tilvejebringe et miljø omkring det bundne substrat, således at energien af overgangstilstanden (transition state) for den kemiske reaktion nedbringes. Typisk er det en eller to specifikke protonerings-tilstande, som er katalytisk aktive, og derfor er aminosyrernes pK_a-værdier i det aktive site af stor betydning for enzymets pH-aktivitetsprofil.

I Hen Egg White Lysozyme (HEWL) er to syregrupper (Glu 35 og Asp 52) involveret i katalysen. Glu 35 skal være protoneret og Asp 52 skal være negativt ladet for, at den katalytiske reaktion kan foregå. Den katalytisk kompetente protonerings-tilstand (KKP) kan således beskrives som Glu35H, Asp52-. pK_a-værdierne for isolerede Asp og Glu sidekæder i vandig opløsning er hhv. 4.0 og 4.4, hvilket giver en meget smal pH-aktivitetsprofil for enzymet (figur 2a). I virkeligheden er pK_a-værdierne i HEWL perturbet, så enzymet er katalytisk aktivt fra pH 3-7 jf. pK_a-værdierne i tabel 1 (figur 2b).

Ændrede pK_a-værdier har også stor betydning for pH-stabilitetsprofilen af proteiner. I de fleste tilfælde er der forskel på pK_a-værdierne mellem den foldede og udfoldede tilstand af proteinet, og her observerer man typisk en stærk pH-afhængighed af proteinets stabilitet, hvor pK_a-værdierne spiller den primære rolle.

pK_a-værdier er således vigtige for et enzyms pH-stabilitets- og pH-aktivitetsprofil. De er indirekte bestemmende for, hvilke betingelser enzymet kan bruges under. Da elektrostatiske kræfter spiller en stor rolle i at bestemme et enzyms pK_a-værdier, er

det vigtigt at forstå disse, hvis man vil optimere/engineere et enzym, så det virker under specifikke industrielle betingelser.

Hvorfor er pK_a-værdier svære at beregne nøjagtigt?

Vi er nu nået tilbage til vores udgangspunkt og forklaringen på, hvorfor undertegnede og forskningsgrupper, der arbejder med proteinelektrostatik, ikke har gjort nævneværdige fremskridt de sidste 10-15 år mht. udvikling af modeller, der kan beregne protein pK_a-værdier mere nøjagtigt.

I løbet af de sidste 10 år er to nye eksperimentelle teknikker blevet udviklet til at måle det elektrostatiske felt mere direkte end det har været muligt med pK_a-værdier. Målinger baseret på pH- og ladnings-inducerede ændringer i det NMR kemiske skift og på vibrational Stark spektroskopi har vist, at det elektriske felt i proteiner modelleres bedst med en lav protein dielektrisk konstant i Poisson-Boltzmann ligningen. Dvs., at det

elektrostatiske felt er stærkt, og at pK_a-beregningsskemaer – hvis de modellerer proteiner realistisk – bør bruge en dielektrisk konstant på 2-4.

Desværre så overestimerer pK_a-beregningsskemaer de protein-inducerede ændringer i pK_a-værdier, hvis de bruger så lave dielektrisk konstanter, og vi er derfor i den situation, at korrekt modellering af det elektriske felt bevirker, at de beregnede pK_a-værdier bliver endnu værre.

En forklaring på den observation er, at andre effekter end det protein-inducere-

de elektriske felt har stor betydning for et proteins pK_a-værdier. En mulig effekt, som kan være skyld i diskrepansen, og som sjældent modelleres pga. af dens kompleksitet, er ændringerne i vandstrukturen omkring proteinet, der sker, når en aminosyre titrerer. Det har altid været velkendt, at ionisering afstedkommer ændringer i den umiddelbare vandstruktur, men man har i mange år ignoreret dette i håbet om, at en detaljeret beskrivelse af proteinstrukturen og Poisson-Boltzmann-ligningen kunne give en tilstrækkelig nøjagtig beskrivelse af de faktorer, der er vigtige for pK_a-værdier.

Med de nye data for det elektrostatiske felts styrke er det klart, at detaljeret modellering af ioniserings-inducerede ændringer i vandstrukturen bør være et fokusområde for fremtidig udvikling af algoritmer til beregning af elektrostatiske effekter i proteiner.

Selv efter ca. 100 års studie er det svært at forstå selv simple effekter som elektrostatik i proteiner, og for elektrostatik-nørder er det gode nyheder!

E-mail:

Jens Erik Nielsen: Jens.Nielsen@gmail.com

Kilder

Vibrational Stark Spectroscopy Directly Probes Electric Fields in Proteins. S Boxer, S Bagchi, SD Fried, N Levinson, M Saggu, L Xu. Biophysical Journal 104 (2), 355a.

Protein dielectric constants determined from NMR chemical shift perturbations. Predag Kukic, Damien Farrell, Lawrence P MacIntosh, Bertrand García-Moreno E, Kristine Steen Jensen, Zigmantas Toleikis, Kaare Teilum, Jens Erik Nielsen. Journal of the American Chemical Society 135 (45), 16968-16976.

The pKa Cooperative: A collaborative effort to advance structure-based calculations of pKa values and electrostatic effects in proteins. JE Nielsen, MR Gunner, E García-Moreno. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics 79 (12), 3249-3259.