

Vands pakning omkring biomolekyler

Vands struktur omkring peptider og større proteiner spiller en afgørende rolle for deres biologiske funktion. Derfor er det vigtigt at undersøge, hvad der gør vand så specielt for biologiske processer.

Af Michael Bache og Henrik Bohr, CERE, Institut for Kemiteknik, DTU

Der er i de seneste år fremkommet mange nye teorier for vand i væskefasen blandt to forskellige densiteter af vand, og vand med to forskellige kiraliteter i hydrogenmolekylets kernespin. Det centrale er dynamikken i hydrogenbindingen. Hydrogenbindingen er svagere end en kovalent binding, men skifter væsentligt hurtigere med 100 milliarder gange per sekund i gennemsnit. Dette er formentlig grundlaget for, at vand har en afgørende betydning for biomolekyler funktion i biologiske processer, hvor vand har egenskaber, som ingen anden solvent ville kunne udfylde. Disse egenskaber inkluderer en frossen isfase med lavere tæthed, meget stor varmekapacitet, høj opløselighed, høj dielektricitetskonstant, stor lydbølgeudbredelse, stor diffusion mv. Disse egenskaber er alle vigtige for liv på vores planet.

Hydrogenbindingsnetværk

I fast form har vand omkring 20 forskellige krystallinske strukturer. Også i flydende form kan hydrogenbindingen skabe en flygtig lokal molekylestruktur. Denne molekylestruktur kan antage forskellige former, herunder en tetrahedra pyramidestruktur og en hexagonal

struktur. Der er endvidere spekulationer om større semistabile ansamlinger af vandmolekyler (figur 1).

Tetrahedra klyngestrukturen er en ud af mange måder, som vandmolekylerne kan være organiseret i. En anden organisering af vand er den hexagonale struktur. Disse klynger er igen bundet sammen i større sammenhængende strukturer ved hjælp af hydrogenbindinger. I væskefasen er det mere uklart, om vand antager globale strukturer, end det er i isfasen, men lokalt er vand domineret af tetrahedra strukturer, hvor et vandmolekyle er hydrogenbundet til fire nabomolekyler, og hvor udartningen er bestemt af hydrogenbindingsstyrken. Denne styrke er næsten lineært relateret til elektrontætheden omkring hydrogenbindingen.

Der er forskellige teorier om vands hydrogenbindinger i den lokale struktur i væskefasen. Den gængse teori er, at vandmolekyler er bundet til de fire nærmeste nabovandmolekyler med lige stærke h-bindinger, to donorbindinger og to modtagerbindinger i en tetragonal struktur. En anden teori beskriver en mere filamentagtig struktur, hvor hvert vandmolekyle kun kan danne to stærke hydrogenbindinger, nemlig en donorbinding og en modtagerbinding til andre omkringværende vandmole-

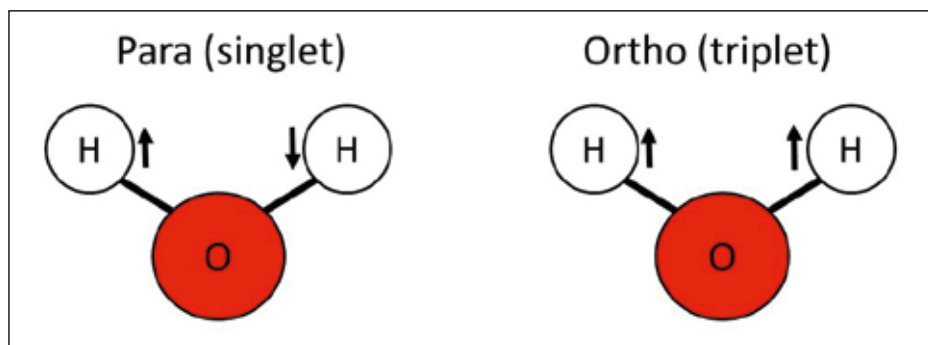
kyler, hvilket resulterer i en mere lineær struktur. For at afgøre den lokale struktur, kan man forsøge at finde det gennemsnitlige antal hydrogenbindinger per vandmolekyle i en vandmolekylegruppe. Det er imidlertid ikke nemt at undersøge eksperimentelt, da hydrogenbindinger dannes og brydes op til 100 milliarder gange i sekundet. Men man kan lave en molekylær dynamik-simulering af den lokale struktur for vand i væskefasen, og den viser, at i den gennemsnitlige lokale struktur er tetrahedra-formen ret udbredt, og antallet af hydrogenbindinger per vandmolekyle ligger mellem to og fire, med henholdsvis to stærke og to svage hydrogenbindinger. Det faktum, at der er to svage hydrogenbindinger, giver vand den typiske fleksibilitet og samtidig mulighed for elektrisk ledning [1].

To densiteter af vand

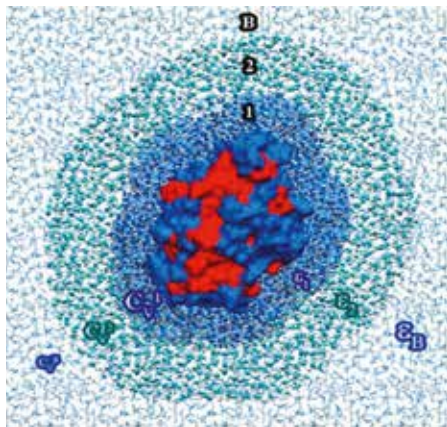
Siden opdagelsen af røntgen blev gjort af Wilhelm Röntgen, er der spekuleret på tilstedeværelsen af to forskellige densiteter af vand i væskefasen. I de sidste to årtier har eksperimenter på underafkølet vand med kraftig femtosekund røntgenspektroskopi fastslået, at der er to lokale molekylære densitetsfaser i flydende vand med 20 procent forskelle i densitet. Dette er senest efterprøvet ved



Figur 1. Venstre: Foreslået tetrahedra molekylestruktur af vand. Midt: Iskristaller fra en grotte. Højre: Hexagonal molekylestruktur af vand (Wikipedia).



Figur 2. Ortho (venstre), para (højre) kerne spin



Figur 3. Vand omkring lysozyme-proteinet. Det primære protein hydreringslag (1) og det sekundære lag (2) med to forskellige di-elektricitets konstanter ϵ_1 og ϵ_2 , og så et lag med frie vandmolekyler (B) [12]

almindelig nærinfrarød spektroskopi af vand ved stuetemperatur, og resultaterne indikerer, at det er sandsynligt, at vand ved stuetemperatur faktisk også består af to typer af væske, der fluktuerer i pakning og densitet. Det er stadig uvist, hvad dette betyder for biomolekyler, men idet biologien er udviklet fra det flydende vand, må man formode, at den er i stand til at udnytte denne lokale vandmolekylære densitetsforskel [2,3,4].

Ortho/para kernespin isomere i vandmolekylet

Vand kan findes i to spin isomere på grund af hydrogenkerners kernespin, svarende til spin-parring af de to hydrogenprotoner i hvert vandmolekyle. Sædvanligvis er vandmolekylets symmetri bestemt ud fra dets elektroniske bindingsstruktur (se figur 2).

Den symmetri, der er tale om her, gælder kernespin for brintatomerne i vand, og den skyldes primært, at den samlede bølgefunktion for de to kernespin i hydrogen skal være anti-symmetrisk ifølge kendte spin-/statistikregler. Det medfører, at en lige funktion af spinkombinationer (op-op, ned-ned, op-ned + ned-op) multipliceres med en anti-symmetrisk angulært-moment bølgefunktion, som giver total spin 1

(ortho-tilstand) og et magnetisk kvantetal $m=1$ eller 0 (figur 2). Omvendt medfører en ulige funktion af spinkombinationen (op-ned - ned-op), der multipliceres med en symmetrisk angulært-moment bølgefunktion, et total spin på 0 (para-tilstand) og et magnetisk kvantetal $m=0$.

Som set i antal af spinkonfigurationer, er der tre gange så mange ortho-tilstande (75 procent) som para-tilstande (25 procent). Ortho-tilstanden kan påvirkes af et magnetisk felt (for $m=1$ tilstand), mens para-tilstanden er næsten upåvirkelig af et magnetisk felt. Derfor er der udviklet en teknik til at separere de to kernespin-tilstande. Det kan gøres ved en magnetisk hexapol-fokusering, der separerer $m=1$ tilstandene fra $m=0$ tilstandene [2].

Der kan komme interessante anvendelser ud af sådan en separation. Det er blandt andet vist, at reaktionskinetik for diazenylium ioner (N_2H^+) processen forløber 23 procent hurtigere med vand i para-tilstanden end i ortho-tilstanden, hvilket kan forklares ved, at ortho-tilstanden spinner hurtigere end para-tilstanden og dermed nedsætter reaktionsmuligheden for vand i ortho-tilstanden [5,6,7].

Kernespin relaxsation i vand

Den vigtige kommunikation i vandet omkring et biomolekyle er blandt andet styret af protonkernernes spin-magnetiske dipolmomenter og dermed af hydrogenbindinger og hydrogen netværk. Ønsker man at studere dette, kan man bruge kernemagnetisk resonans (NMR) til at undersøge de forskellige vandlag omkring biomolekylet. Her vil spin-tinger magnetisk relaxsationstid (T_R) af hydrogenkernen i vandet omkring et stort biomolekyle indikere, hvor kraftigt vandet er bundet til proteinet [8].

Man kan således dele vandet op i sektioner omkring proteinet som 1. sektionen med bundet, begravet vand ved proteinet i op til 10 Ångstrøm med relaxsationstider af ordenen $T_R = 2 \times 10^{-12}$ s, 2. sektionen med overfladevand med relaxsationstider af ordenen $T_R = 1.5 \times 10^{-9}$ s og fri vand

som "bulk" med $T_R = 4 \times 10^{-8}$ s, (se figur 3). Dette viser, at vandet, bundet af det undersøgte biomolekyle, har en mere fastlåst dynamik set i spin-magnetiske relaxsationstider, der rækker flere nanometer væk fra biomolekylet [8].

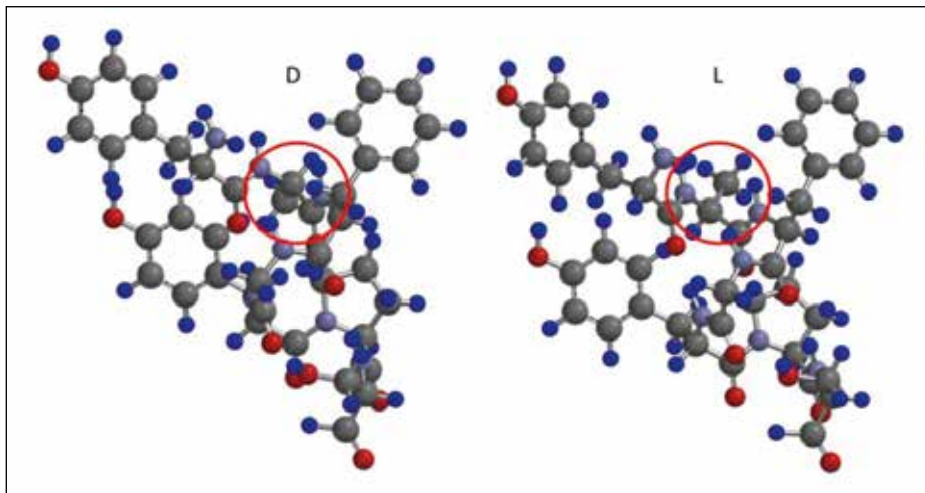
Tunneleringseffekter i vandmolekyler

Ved tunneleringseffekter følger et atom ikke de gængse atomistiske beregninger, men er i stand til at "hoppe over" de beregnede energibarrierer. Hvis man binder seks hexagonalt orienterede vandmolekyler i en Beryl-krystal, kan man observere, at vandet har delokaliserede protoner. Denne viden er væsentlig for forståelsen af vand indesluttet i proteiner. Tunnelleffekten af vands protoner kan således have en afgørende effekt i vand omkring og i et protein og i enzymatiske processer [8,9,10].

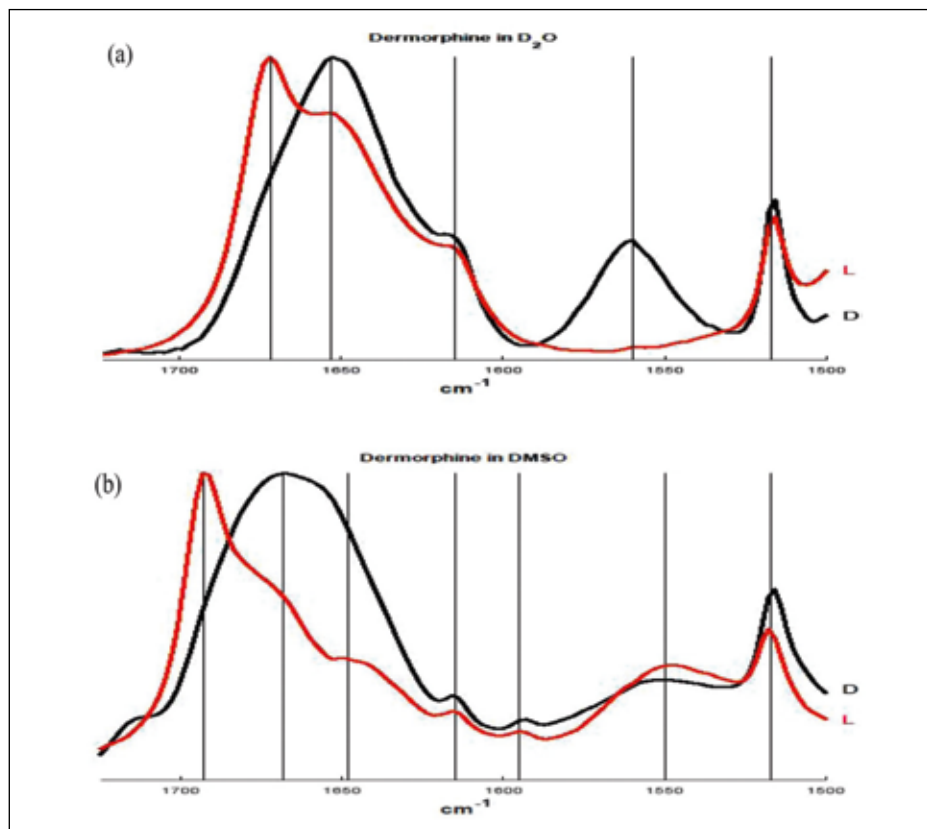
Pakning af vandmolekyler omkring biomolekyler

Vandmolekylers pakning omkring peptider og proteiner har stor betydning for disses biologiske funktion. Et godt eksempel er peptider med smertedæmpende egenskaber som opiat peptider. For nogle år tilbage blev der isoleret diverse peptider fra huden af en giftig grøn frø (Phyllomedusa) fra Amazonjunglen i Sydamerika. Af disse peptider udviser dermorphin stor selektivitet overfor $my(\mu)$ opioid-receptoren. I dermorphin er et enkelt højrehåndet alanin aminosyre (D), substitueret i stedet for den sædvanlige venstrehåndede alanin (L) som nummer to i sekvensen af syv aminosyrer i et kort opiat peptid for $my(\mu)$ -opioid receptoren (figur 4). Kun D-alanin dermorphin har en 30-50 kraftigere virkning end almindelig morfin, mens L-alanin derimod ingen virkning har på $my(\mu)$ -receptoren.

Normalt skyldes disse forskelle, at de to kirale versioner har en forskellig 3-dimensional struktur, der umuliggør docking af den ene analog på $my(\mu)$ -receptoren. I dermorphin-tilfældet er docking-mekanismen ikke forstået. Vi var derfor interesserede i at undersøge, om vands pakning omkring peptidet kunne spille en rolle. Derfor undersøgte vi, om infrarød spektroskopi kunne belyse forskellen mellem D og -alanin dermorphin. Her er det dog meget svært at skelne kirale strukturer fra hinanden, da der er tale om spejlsymmetri, hvor ens atomer har byttet plads som i tilfældet med højre- og venstrehåndede aminosyrer. Det er muligt at vise strukturforskelle ved hjælp af polariseret lys eller,



Figur 4. De to former af dermorphin morfin analog. Venstre: D- alanin dermorphin, højre: L-alanin dermorphin.



Figur 5. Absorption af infrarød stråling af to forskellige chirale dermorphin peptider i tungt vand. Forskellen ses kun, når dermorphin peptidet er opløst i vand (øverst) og ikke andre opløsningsmidler (nederst).

som her, at opløse peptidet i væsker med forskellig polaritet, dvs. væsker med forskellig dielektricitetskonstant, som peptidet er omgivet af.

I øverste del af figur 5 er vist den ændrede absorption af højre og venstre enantiomere i de forskellige væsker. Her undersøges absorptionen for henholdsvis vand og kloroform. Kun vand udviser en stor forskel mellem venstre- og højre-isomere, som derfor giver et fingerpeg om forskellen i binding til opiat receptoren, idet vand er mediet (solventen) i den

ekstracellulære interaktion. For normale, venstrehåndede aminosyrer vil sidekæderne stikke ud alternerende med hver anden til den modsatte side. Når en højre aminosyre optræder, går den pågældende aminosyre til samme side, og det skaber så en lokal "pukkel", hvor de tre aminosyrer ligger til samme side og binder derved vand (se figur 4). Dette forklarer nok ikke hele forskellen mellem D- og L-alanin dermorphin-aktivitet, men en undersøgelse af vandets pakning omkring peptidet er et skridt nærmere [11].

Vands rolle i biologien

Vandmolekylet har en symmetri klasse, der er udledt af spejl- og rotations-symmetrien. Det har stor betydning for dens atomare geometri og dens IR, NIR, X-ray og Raman spektrum. Disse spektre giver væsentlige informationer om vandmolekylet, men det giver ikke information om hydrogenbindingers kollektive fænomener eller en eventuel effekt fra vands hydrogenbindingsnetværk.

Der er lavet teorier om, hvordan kommunikation mellem biomolekyler kan foregå ved hjælp af hydrogenbindinger. Disse er meget dynamiske og kan ændres i tid ved at "tændes" og "slukkes" omkring et kompleks. De kan også induceres ved elektriske felter og ved elektromagnetiske bølger. Kollektive koordinater kan beskrive den asymmetri, som en sådan induktion skaber. En Markov-proces kan beskrive en sådan kommunikationsbølge. Ved ligand-receptor systemet, kan det være væsentligt med en kommunikation i vand for at lede liganden, for eksempel et peptid hen imod dens tilhørende receptor-molekyle [12,13].

Idet hydrogenbindingen er relativ svag (cirka 23 kcal/mol) og kortlivet (cirka 10 pico-sekunder) er der betydelige tekniske udfordringer i at kortlægge deres dynamik og deres subtile indbyrdes netværk. Kovalente bindinger er velbeskrevet i kvantemekanik, men udfordringen ved simulering af hydrogenbindingen er, at det beregnes som mange-legeme-teori med feedback-effekter og derfor er omkostningsfuld i molekylærdynamiske beregninger.

I spektroskopi er det også svært at skelne hydrogenbindingssignalet fra biomolekyler noget kraftigere kovalente og ion-bindinger. Det seneste årti har dog budt på fremskridt takket være bedre gallium arsenid-baserede detektorer, og idet der er kommet mere fokus på vands rolle. Vand betragtes nu mere som en aktiv medspiller i biomolekyler funktion snarere end blot et opløsningsmiddel. Hvis det fremover fastlægges, at de svage hydrogenbindinger danner et dynamisk netværk omkring biomolekyler, ville det udvide den nuværende strukturelle analyse med en analyse af vandets dynamik omkring biomolekylet. Dette kan meget vel vise sig at være en væsentlig viden inden for medico-, kemi- og bioteknologibranchen. [14,15,16].

E-mail:

Michael Bache: mbac@kt.dtu.dk

Henrik Bohr: hbohr@dtu.dk

Referencer

1. Haigang Lu et al., "Hydrogen-bond network and local structure of liquid water: An atoms-in-molecules perspective", J. of Chemical. Phys. **129**, 124512 (2008); doi: 10.1063/1.2985605.
2. Pettersson, L.G.M., Harada, Y., Nilsson, A., 2019. Do X-ray spectroscopies provide evidence for continuous distribution models of water at ambient conditions? PNAS, **116**(35), 17156-17157 (2019).
3. Kyung Hwan Kim, Anders Nilsson et al, Experimental observation of the liquid-liquid transition in bulk supercooled water under pressure. Science 370, 978-982 (2020).
4. P. Renati et al. Temperature dependence analysis of the NIR spectra of liquid water confirms the existence of two phases, one of which is in a coherent state, J. of Molecular Liquids **292**, 111449 (2019).
5. Thomas Engel, "Quantum Chemistry & Spectroscopy", 3rd ed., 2012, Chicago, USA, and Georgios M Kontogeorgis and Georgios K Folas, "Thermodynamical models for industrial applications", John Wiley & Sons, 2009.
6. Daniel A. Horke et al., "Separating para- and ortho-water." Angewandte Chemie, Int. ed. 53 (44) 11965-11968, (2014).
7. A. Kilaj et al., "Observation of different reactivities of para and ortho-water towards trapped diazenylium ions", NATURE Communication, (2018) **9**: 2096.
8. B. Solna, P. Champion et al., "Wide-dynamical-range kinetic investigations of deep proton tunneling in proteins", NATURE Chemistry **8**, 874-880 (2016).
9. Kolesnikov, Alexander & Reiter, George & Choudhury, Narayani & Prisk, Timothy & Mamontov, Eugene & Podlesnyak, Andrey & Ehlers, George & Seel, Andrew & Wesolowski, David & Anovitz, Lawrence. (2016). "Quantum Tunneling of Water in Beryl: A New State of the Water Molecule". Physical Review Letters. 116. 10.1103/PhysRevLett.116.167802.
10. Richardson J.O., Pérez C., Lobsiger S., Reid A.A., Temelso B., Shields G.C., Kisiel Z., Wales D.J., Pate B.H., Althorpe S.C. Concerted hydrogen-bond breaking by quantum tunneling in the water hexamer prism. Science. 2016 Mar 18;351(6279):1310-3. doi: 10.1126/science.aae0012. PMID: 26989250.
11. M. Bache, K. Stibius et al. "Vibrational spectra and conformations for chiral opiates in changing solvents", Applied Spectroscopy Reviews, doi: 10.1080/05704928 (2020).
12. Saumyak Mukherjee, Sayantan Mondal, and Biman Bagchi, "Distinguishing dynamical features of water inside protein hydration layer: Distribution reveals what is hidden behind the average", J. Chem. Phys. **147**, 024901 (2017) doi.org/10.1063/1.4990693.
13. Anna Kuffel, "How water mediates the long-range interactions between remote protein molecules", Phys. Chem. Chem. Phys., vol. **19**, issue 7, pp. 5441-5448.
14. A. Krin, C. Perez, P. Pinacho et al. Structure Determination, Conformational Flexibility etc. Chemistry- a European journal, **24**(3), 721-729 (2018).
15. Päslock, Christopher; Schäfer, Lars V., Heyden, Matthias; Atomistic characterization of collective protein-water-membrane dynamics; 2019 Phys. Chem. Chem. Phys. https://dx.doi.org/10.1039/C9CP00725C.
16. Alexei A. Kananenka, J.L. Skinner. "Unusually strong hydrogen bond cooperativity in particular (H₂O)₂₀ clusters" Phys. Chem. Chem. Phys., 2020, **22**, 18124-18131; https://doi.org/10.1039/D0CP02343D.



DSK Hackathon 2022

A 2-day hackathon organized by the Danish Chemometric Society in collaboration with the Danish Data Science Academy and IDA Kemi. Participants must be BSc, MSc, PhD students or Postdocs - and a data science/AI related study background is highly recommended.

1st and 2nd of October 2022, Lyngby

Read more: www.ida.dk/arrangementer/345635.

dsk.2022

As a participant to dsk.2022, you have the possibility to listen to interesting lectures on all levels from applications to advanced chemometrics. This year, we will focus on design of experiments, machine learning and applied chemometrics. And, of course, dsk.dating, where you will have the opportunity to speed date other chemometricians - getting to know them, increase your network, and maybe initiate a new project.

3rd and 4th of November 2022, Middelfart

Read more: www.ida.dk/arrangementer/345633.

Ingeniørforeningen, IDA | Kalvebod Brygge 31-33 | 1780 København V
Tlf.: 33 18 46 34, Anne Dalgaard | website: ida.dk | e-mail: ada@ida.dk



Nyttig viden fra TechMedia

HUSK

**Dansk Kemi
kan også
læses online**

Få besked hver gang
en ny udgave er
tilgængelig.

**Tilmeld dig på
TechMedia.dk**