

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 10

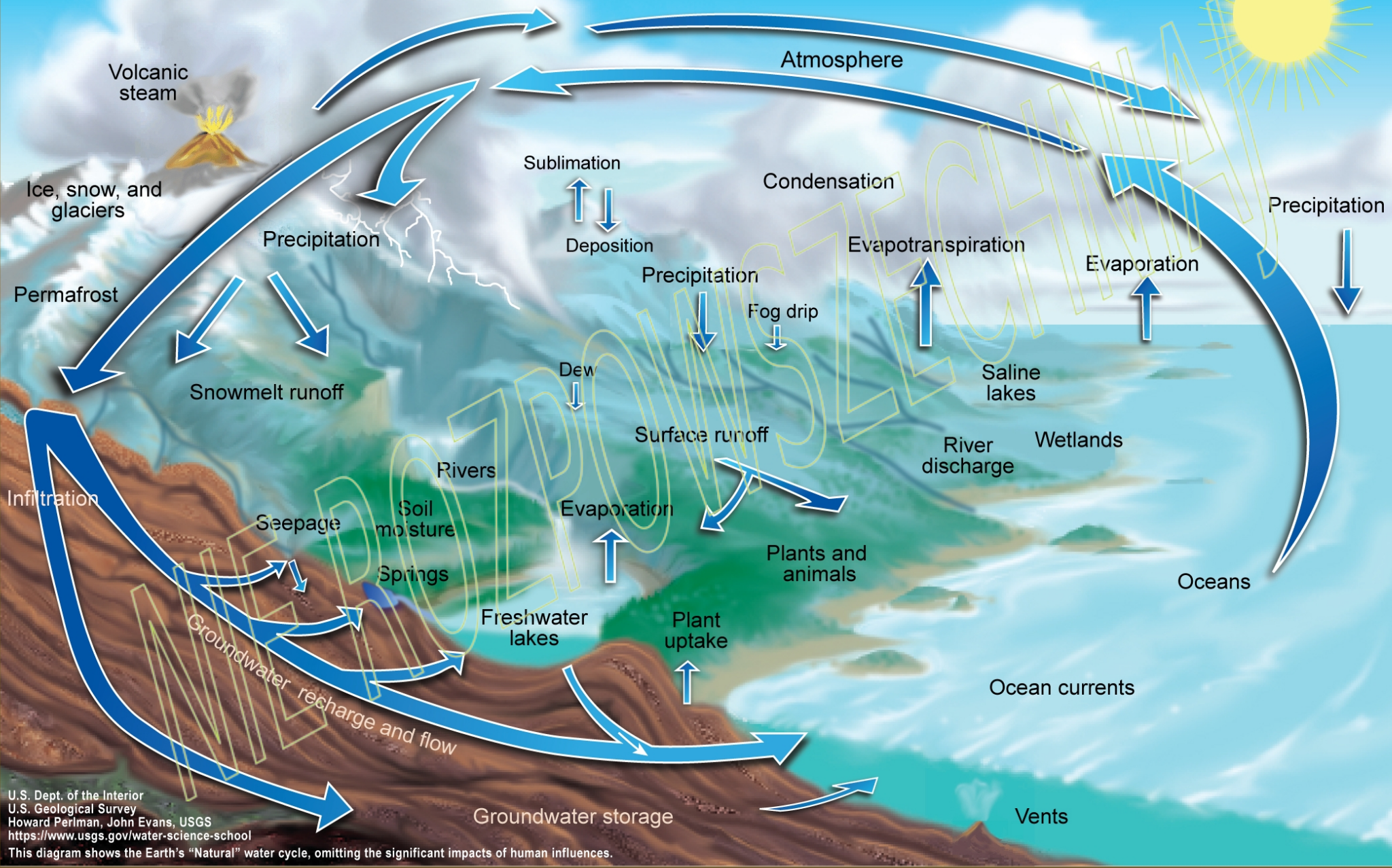
29 kwietnia, 2025

Woda – makroskopowe i molekularne środowisko życia

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

jantosi@fuw.edu.pl

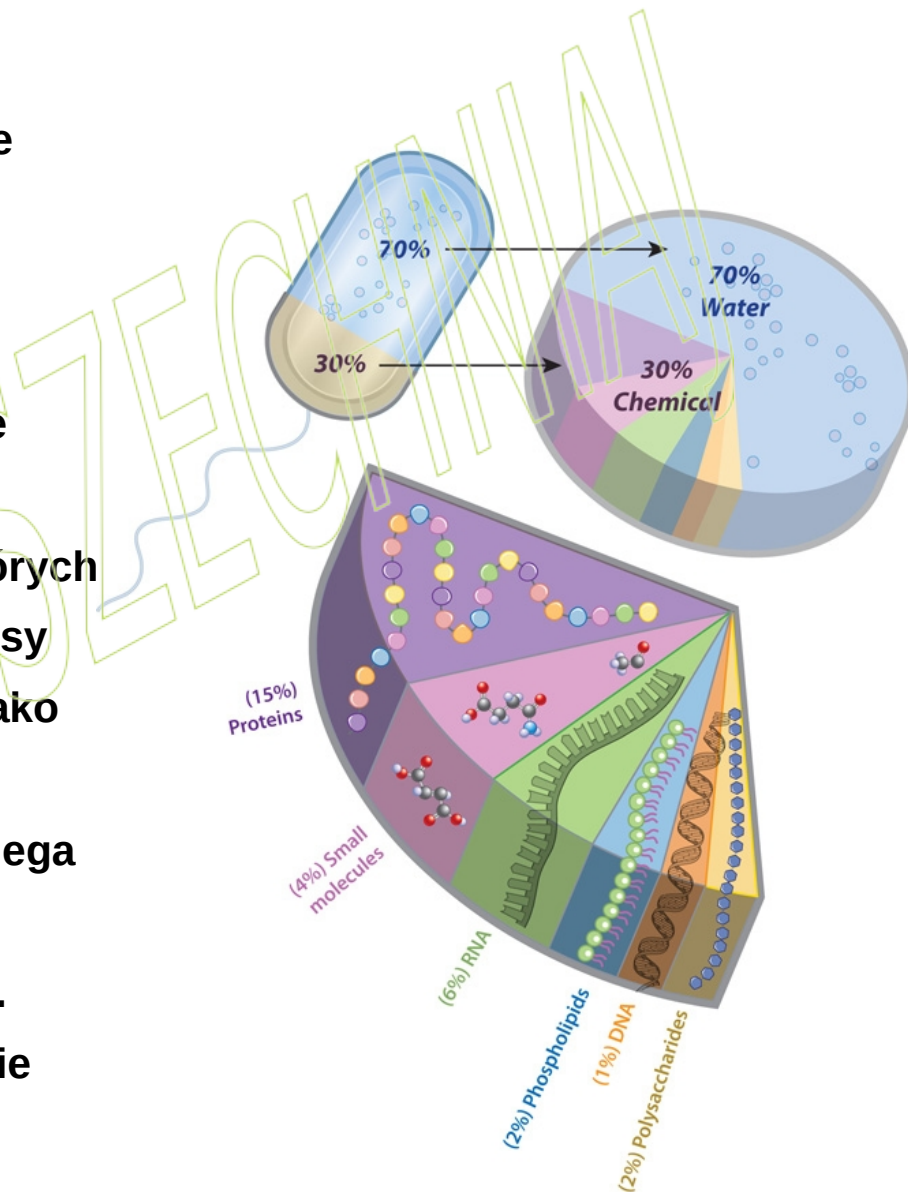
The Water Cycle

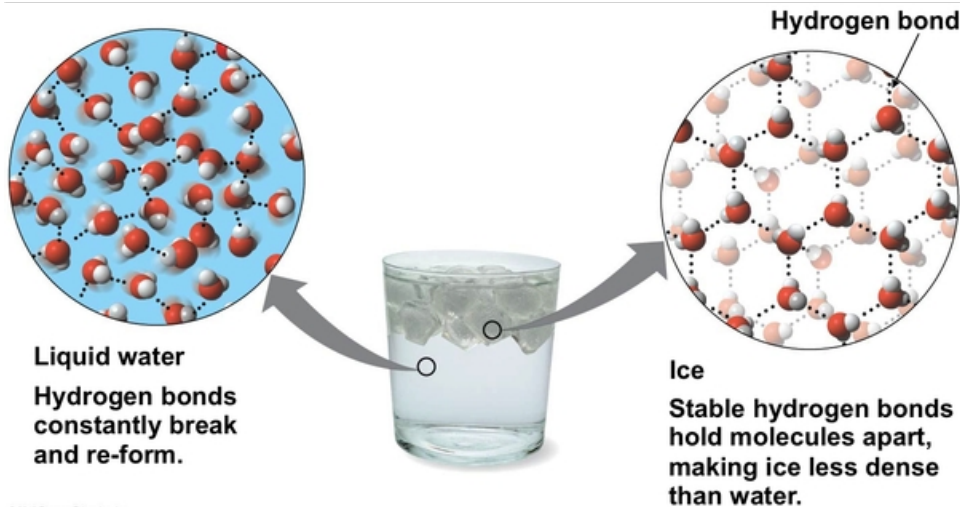


Philip Ball,

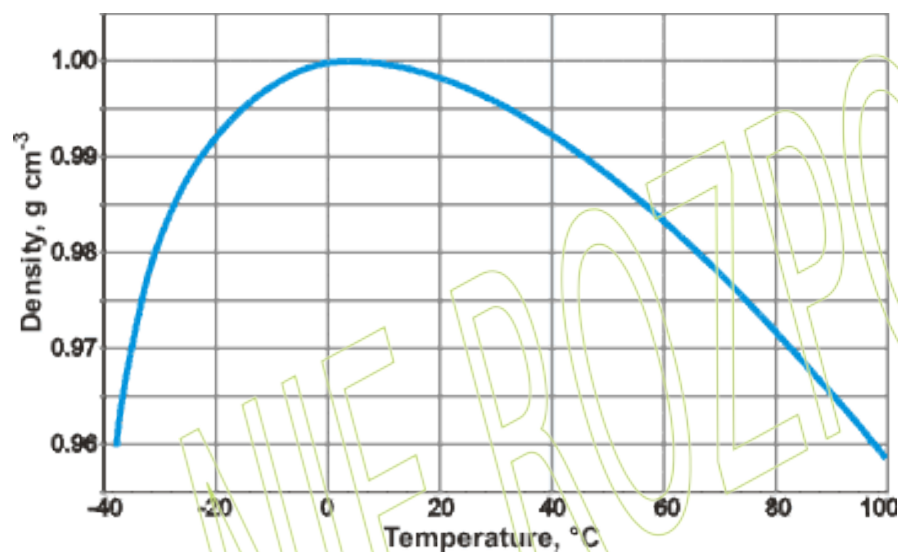
Water is an active matrix of life for cell and molecular biology,
PNAS 114:13327-13335 (2017)

Woda odgrywa różnorodne strukturalne i dynamiczne role w biologii komórki molekularnej. Warunkuje i faktycznie uczestniczy w ruchach, od których zależą interakcje biomolekularne. Jest źródłem jednej z kluczowych sił, które dyktują konformacje i asocjacje makromolekularne, mianowicie przyciąganie hydrofobowe. Tworzy niezwykle zakres struktur, z których większość jest przejściowa, które wspomagają procesy chemiczne i transferu informacji w komórce. Działa jako reaktywny nukleofil oraz donator i akceptor protonów, pośredniczy w interakcjach elektrostatycznych i podlega fluktuacjom i nagłym zmianom przypominającym przejścia fazowe, które służą funkcjom biologicznym. Czyż nie jest dość niezwykle, że pojedyncza i pozornie dość prosta substancja molekularna może dokonać wszystkich tych rzeczy? Patrząc na to w ten sposób, wydaje się, że w wodzie jest coś wyjątkowego.





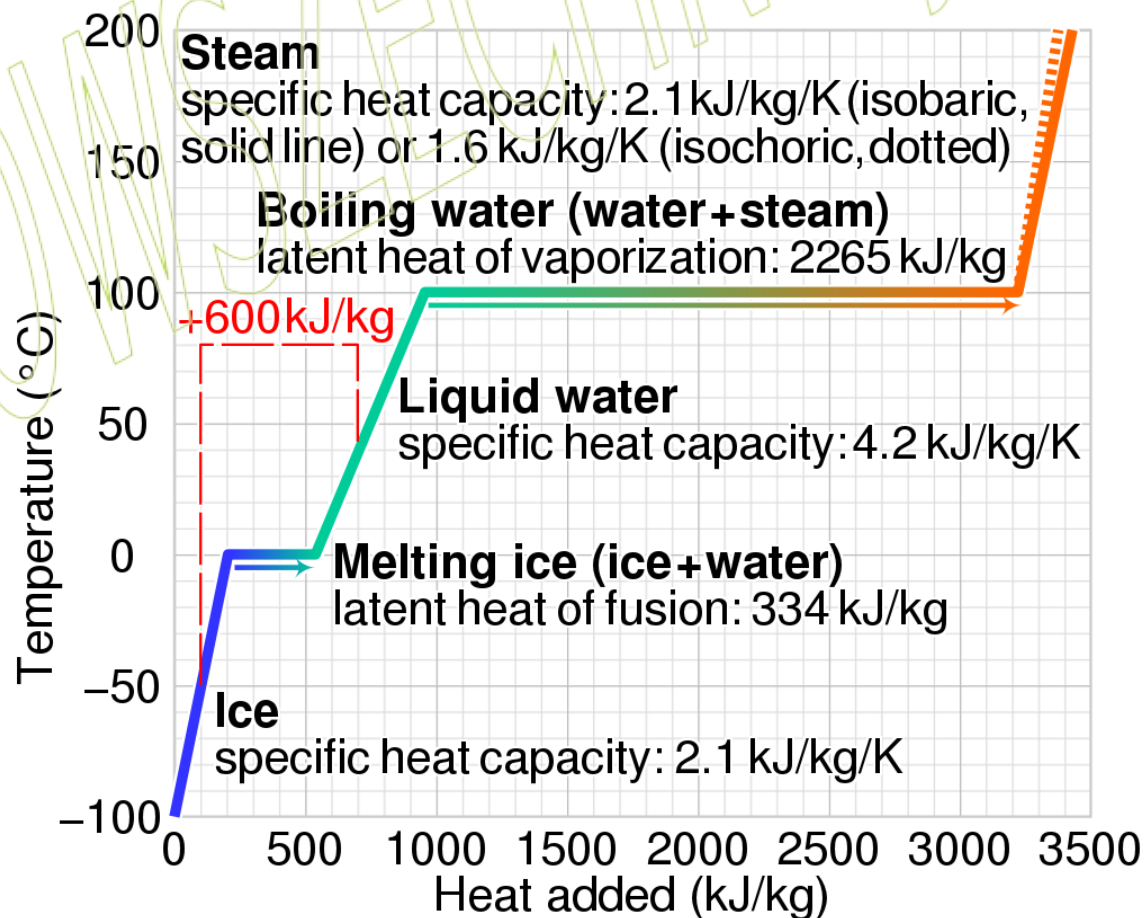
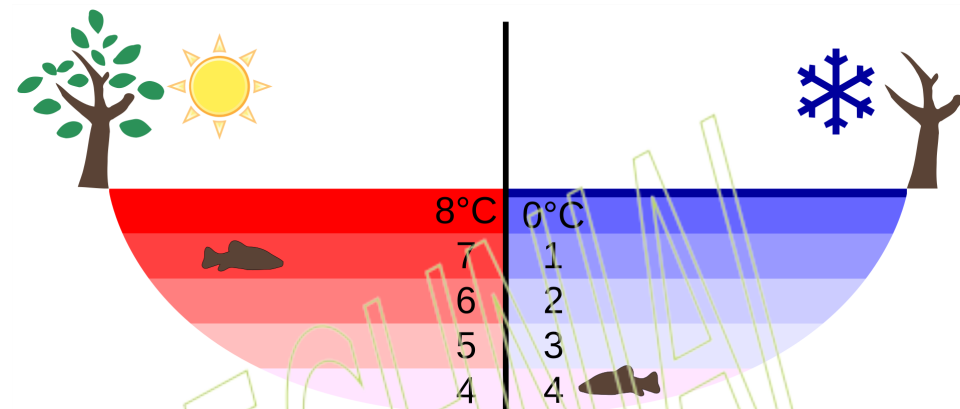
© 2013 Pearson Education, Inc.



<https://www.quora.com/>

Woda wykazuje ponad 70 anomalii w swoich właściwościach fizycznych [SCIENCE, 369, 974–979 (2020)]

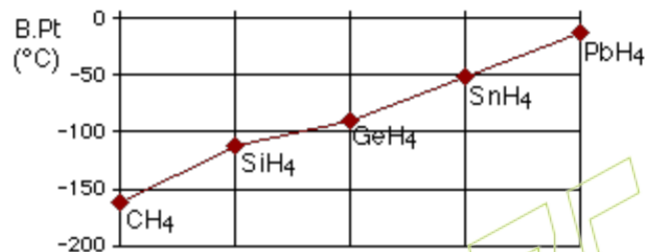
Niezwykłe właściwości wody wynikają z tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody, co prowadzi do rozległej struktury niespotykanej w innych substancjach utworzonych z małych cząsteczek o podobnej geometrii.



wikipedia

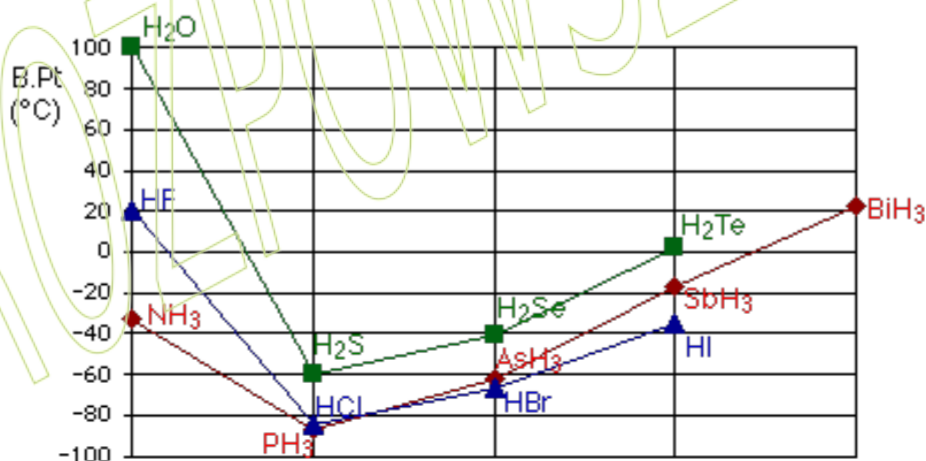
Dowody na istnienie wiązania wodorowego

Wiele pierwiastków tworzy związki z wodorem. Jeśli narysujesz wykres temperatur wrzenia związków pierwiastków grupy 4 z wodorem, zauważysz, że temperatury wrzenia rosną w miarę przechodzenia w dół grupy.

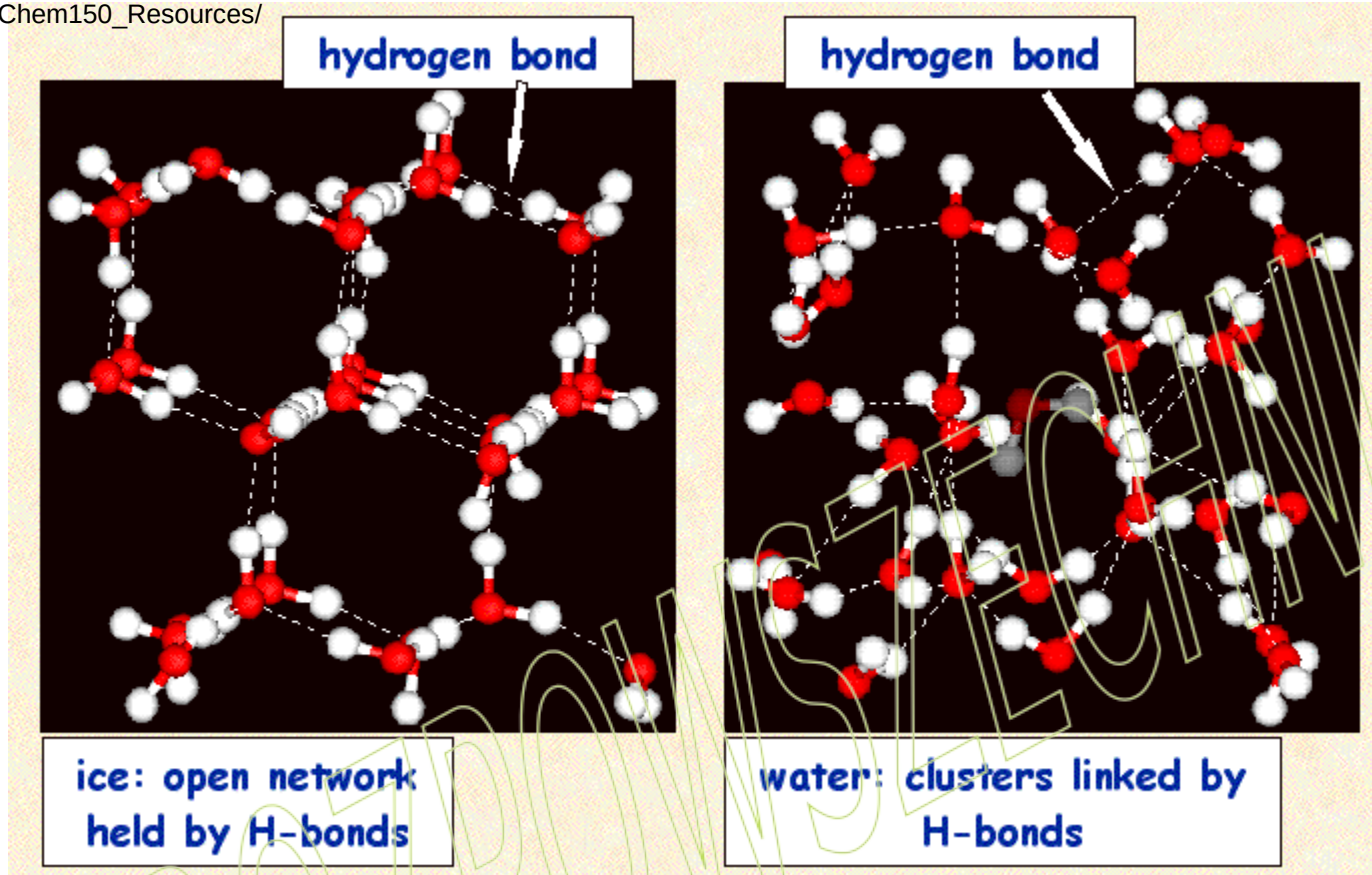


Wzrost temperatury wrzenia następuje, ponieważ cząsteczki stają się większe i mają więcej elektronów, co powoduje wzrost sił dyspersyjnych van der Waalsa.

Jeśli powtórzysz to ćwiczenie ze związkami pierwiastków z grup 5, 6 i 7 z wodorem, wydarzy się coś dziwnego. Chociaż w większości tendencja jest dokładnie taka sama jak w grupie 4 (z dokładnie tych samych powodów), temperatura wrzenia związku wodoru z pierwszym pierwiastkiem w każdej grupie jest nienormalnie wysoka.



W przypadku NH₃, H₂O i HF muszą występować dodatkowe siły przyciągania międzycząsteczkowego, wymagające znacznie większej energii cieplnej do rozerwania. Te stosunkowo silne siły międzycząsteczkowe są opisywane jako wiązania wodorowe.



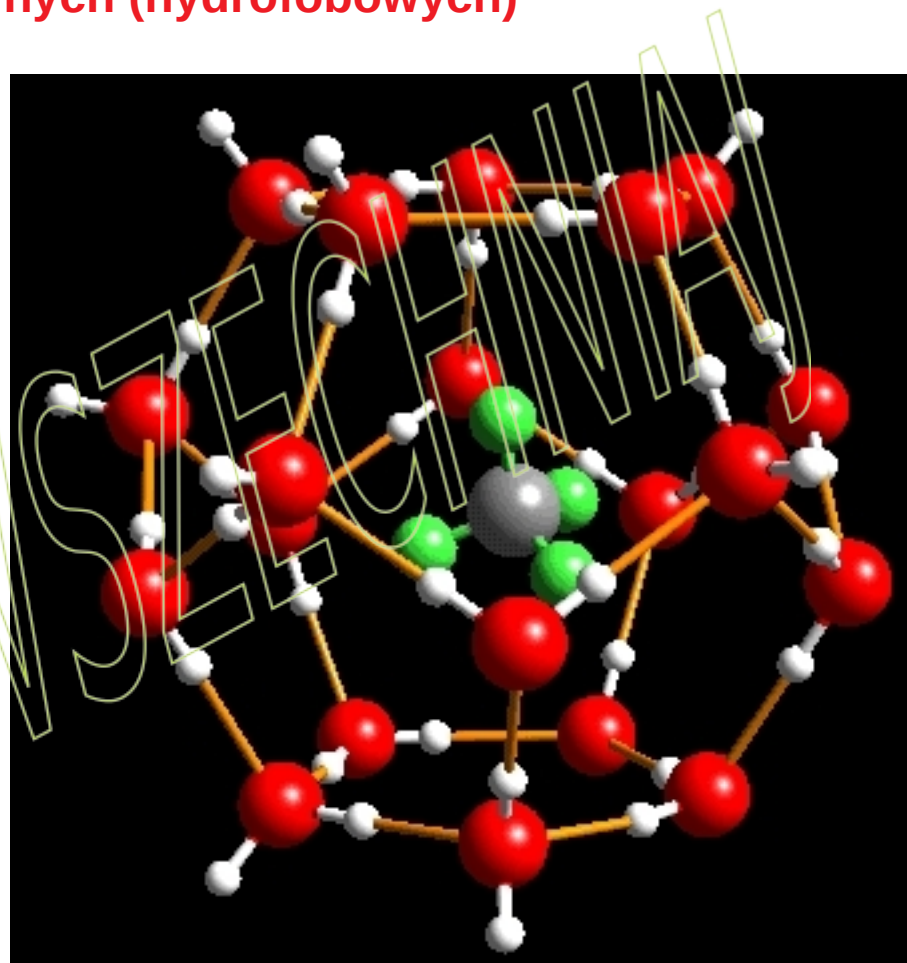
Sama natura ciekłej wody była przedmiotem sporów i kontrowersji. W wielu przypadkach spory te wynikały z długotrwałej rozbieżności między tendencją do mówienia o „strukturze wody” w kategoriach niemal krystalograficznych a uznaniem, że jest ona z natury dynamicznym bytem. Wykazano, że ciekła woda zawiera około 10% mniej wiązań wodorowych niż te w lodzie, co wskazuje, że mogą istnieć pewne cząsteczki wody o konfiguracjach niepowiązanych wiązaniami wodorowymi i/lub częściowo związanych wiązaniami wodorowymi cząsteczek wody. Ciekła woda tworzy fluktuującą sieć wiązań wodorowych, ale każde wiązanie ma średni czas życia około pikosekundy. Zasadniczo strukturę wody można postrzegać jako kompromis między otwartymi sieciami przypominającymi lód a losowym, ścisłym upakowaniem przypominającym ciecz. Termodynamika solwatacji w wodzie jest na ogół regulowana przez równowagę między oddziaływaniami entalpicznymi woda-woda i woda-substancja rozpuszczona (wiązania wodorowe, elektrostatyczne i van der Waalsa) a entropowymi konsekwencjami tworzenia i rozrywania stosunkowo uporządkowanych sieci wiązań wodorowych, uwarunkowanymi czynnikami geometrycznymi interfejsów i ewentualnie mikrośrodowiska.

Hydratacja związków niepolarnych (hydrofobowych)

Parametry charakteryzujące hydratację
na podstawie pomiarów rozpuszczalności
w 300 K

	$\Delta G^\circ/kT$	$\Delta S^\circ/k$	$\Delta H^\circ/kT$
CH ₄	3.4	-7.5	-4.1
n-C ₄ H ₁₀	3.6	-12.5	-8.9

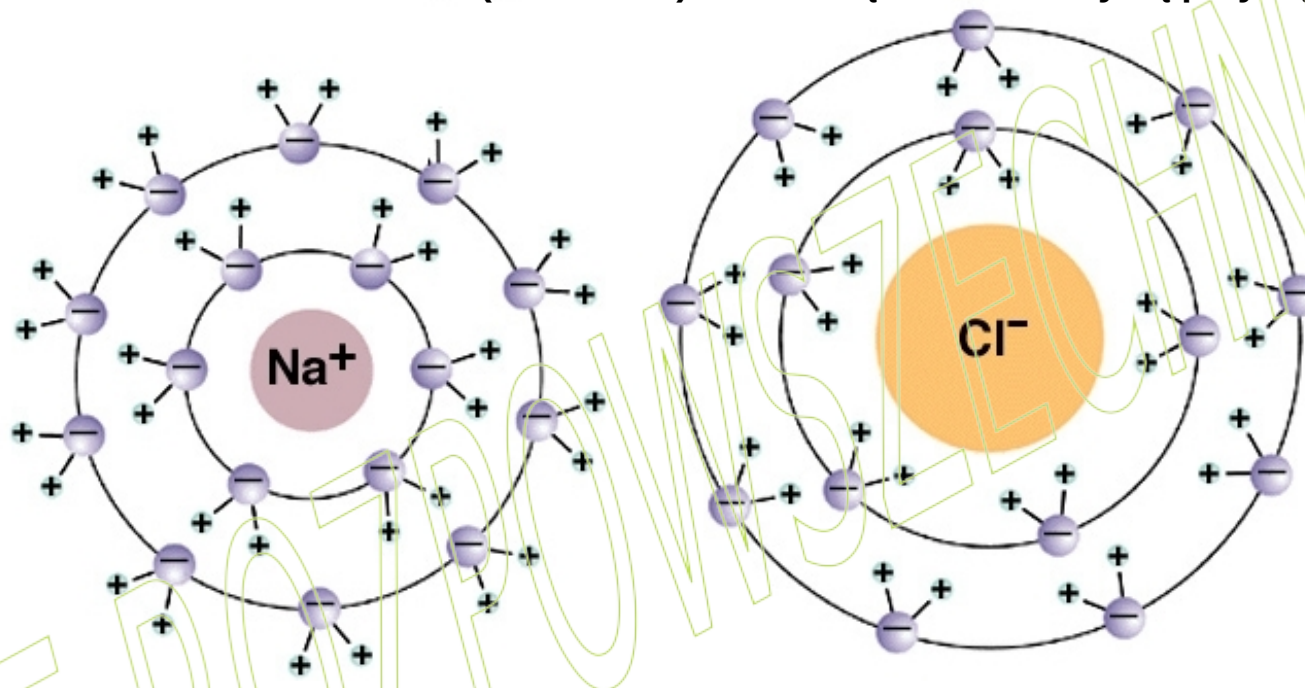
klatratowy hydrat cząsteczki metanu



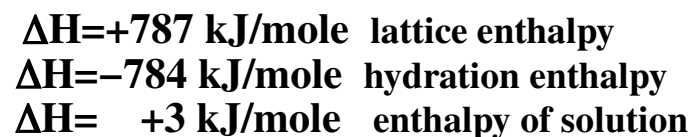
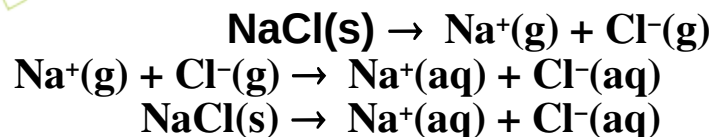
Małe hydrofobowe substancje rozpuszczone można zamknąć we wnękach, wokół których otaczające je cząsteczki wody zachowują wiązania wodorowe poprzez przegrupowanie.

Hydratacja jonów

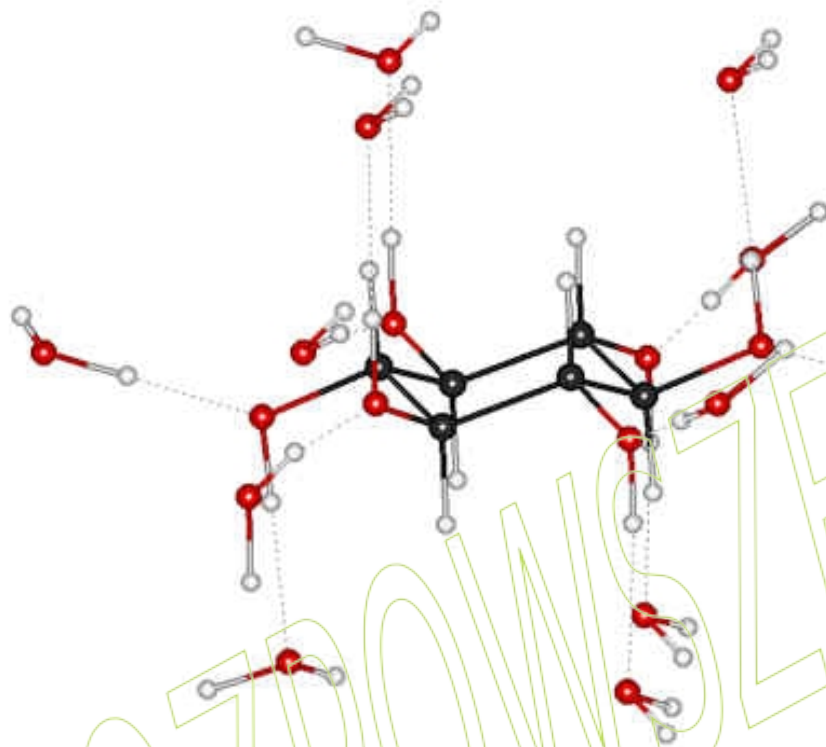
Hydratacja jonu dodatniego (po lewej) i jonu ujemnego (po prawej). Gdy jony są rozpuszczone w wodzie, przyciągają i utrzymują wokół siebie kilka dipoli wodnych pokazanych w obszarze kołowym w obszarze kołowym w środku każdej części diagramu. Ujemna (tlenowa) strona dipolowej cząsteczki wody przyciąga i jest przyciągana przez każdy jon dodatni w roztworze. Z powodu tej siły jon-dipol cząsteczki wody grupują się wokół jonów dodatnich. Podobnie dodatnie (wodorowe) końce cząsteczek wody są przyciągane przez jony ujemne.



Proces rozpuszczania ciała stałego jonowego można podzielić na dwa hipotetyczne etapy. Najpierw krystaliczna sól jest rozdzielana na jony gazowe. Energia cieplna pochłonięta, gdy jony są rozdzielane w ten sposób, nazywana jest entalpią sieci (lub czasami energią sieci). Następnie oddzielne jony są umieszczane w roztworze; to znaczy, że cząsteczki wody mogą otaczać jony. Zmiana entalpii dla tego procesu nazywana jest entalpią hydratacji. Ponieważ następuje obniżenie energii potencjalnej jonów i cząsteczek wody, energia cieplna jest oddawana, a entalpie hydratacji są niezmiennie ujemne. Energia cieplna pochłonięta, gdy substancja rozpuszczona rozpuszcza się (pod ciśnieniem 1,00 atm) nazywana jest entalpią rozpuszczania.



Hydration of polar compounds (example of inositol)



Hydratacja cukrów i związków pokrewnych zależy od równowagi między wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi a wiązaniami wodorowymi z wodą. Ta równowaga obejmuje kilka warstw hydratuujących cząsteczek wody. Niektóre cząsteczki cukru mogą pasować do struktury sieciowej ikozaedrycznych klastrów wody z wiązaniami wodorowymi, zastępując heksamery wody w formie krzesła w klastrze. Równikowe alkoholowe atomy tlenu mogą być umieszczone w podobnych pozycjach jak atomy tlenu cząsteczek wody. Taka wzmocniona sieć wokół cukrów przyczynia się do tworzenia stabilnego szklanego stanu cukru i wody oraz utrudnia proces krystalizacji podczas chłodzenia. Tak więc w przypadku scyllo-inozytolu (przedstawionego powyżej), który ma sześć takich atomów tlenu, każda grupa hydroksylowa może zarówno oddać, jak i przyjąć wiązanie wodorowe. Pozostałe cząsteczki wody zostały usunięte dla przejrzystości obrazu.

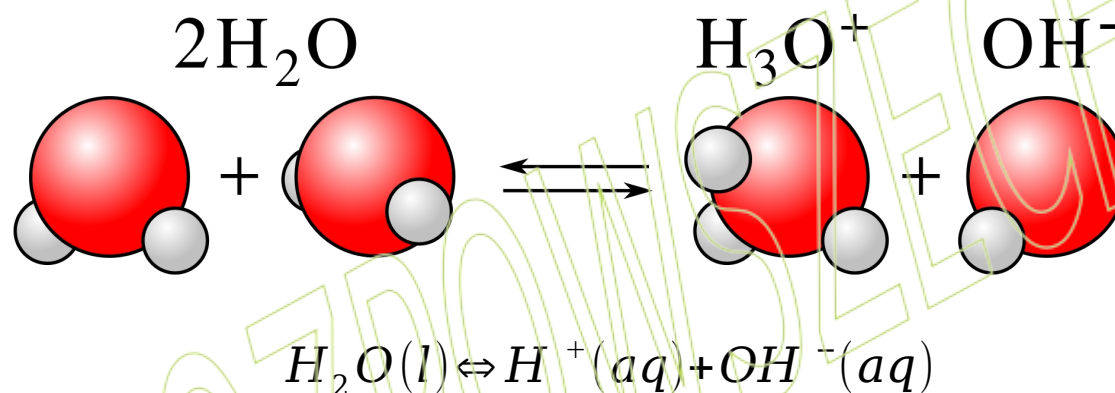
Martin Chaplin, https://water.lsbu.ac.uk/water/sugar_hydration.html

Standardowe parametry termodynamiczne rozpuszczania molowego przy średniej temperaturze

$T_m = 305.65 \text{ K}$, z zależności temperaturowej danych rozpuszczalności w wodzie:

$\Delta H^\circ = 21.81 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T_m \cdot \Delta S^\circ = -10.21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta G^\circ = 32.02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $kT(305.65 \text{ K}) = 2.543 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Spośród wszystkich możliwych reakcji chemicznych zachodzących w wodzie, najbardziej fundamentalna jest reakcja dysocjacji wody. W roztworze wodnym woda będzie się samojonizować i tworzyć jony wodorotlenkowe (OH^-) i hydroniowe (H_3O^+).



Eksperymenty pokazują, że średni czas życia pojedynczej cząsteczki przed autojonizacją wynosi około 11 godzin. Zdarzenie autojonizacji nie zostało bezpośrednio zbadane eksperymentalnie, a szybkość dysocjacji jest uzyskiwana przy użyciu stałej równowagi dysocjacji wody i szybkości znacznie szybszej reakcji rekombinacji.

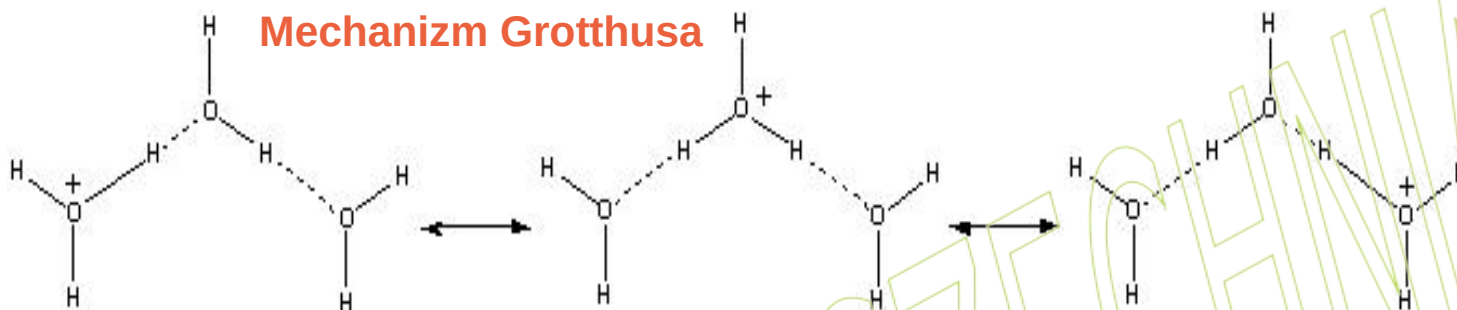
$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

Iloczyn jonowy wody

$$K_w^{25^\circ\text{C}} = 10^{-14}$$

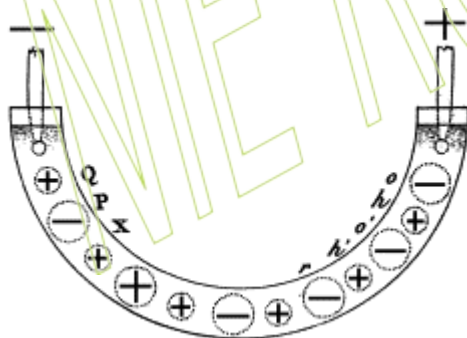
$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

Autojonizacja wody to reakcja jonizacji w czystej wodzie lub roztworze wodnym, podczas której cząsteczka wody, H_2O , traci jądro jednego ze swoich atomów wodoru, stając się jonem wodorotlenkowym, OH^- . Jądro wodoru, H^+ , natychmiast protonuje inną cząsteczkę wody, tworząc jon hydroniowy, H_3O^+ . W 1 dm wody obojętnej znajduje się średnio $2,5 \cdot 10^{16}$ jonów H^+ i tyle samo jonów OH^- . Każda cząsteczka wody dysocjuje raz na 11 godzin.



W przybliżeniu co 0,5 ms cząsteczka wody w rozpuszczalniku „łapie” proton, „zatrzymuje” go przez 1 ps, a następnie „przekazuje” go sąsiedniej cząsteczce wody (mechanizm Grotthusa, publikacja z 1806 r. W publikacji z 1806 roku, „Teoria dekompozycji cieczy przez prąd elektryczny”, Theodor Grotthuss wyjaśnił zjawisko elektrolizy wody zakładając, że atomy tlenu sąsiadujących ze sobą cząsteczek wody przekazują sobie atom wodoru. Wówczas sądzono, że cząsteczka wody to HO .

Elektroliza wody to jej dekompozycja na tlen i wodór pod wpływem przepuszczania przez nią prądu elektrycznego. W 1800 roku Alessandro Volta wynalazł baterię elektryczną, a kilka tygodni później William Nicholson i Anthony Carlisle wykorzystali ją do przeprowadzenia elektrolizy wody. Wyjaśnienie tego zjawiska stało się wyzwaniem dla najtęższych umysłów epoki.



Dyfuzja w wodzie, w polu elektrycznym

Kation	Mobilność [$\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Na^+	$0.519 \cdot 10^{-3}$
K^+	$0.762 \cdot 10^{-3}$
H^+	$3.620 \cdot 10^{-3}$

Dysocjacja cząsteczki wody w wodzie ciekłej jest podstawowym zdarzeniem w chemii kwasów i zasad, decydującym o pH wody.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

**MEASUREMENT OF pH.
DEFINITION, STANDARDS, AND PROCEDURES
(IUPAC Recommendations 2002)**

Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 11, pp. 2169–2200, 2002.

Working Party on pH

R. P. BUCK (CHAIRMAN), S. RONDININI (SECRETARY), A. K. COVINGTON (EDITOR), F. G. K. BAUCKE, C. M. A. BRETT, M. F. CAMÕES, M. J. T. MILTON, T. MUSSINI, R. NAUMANN, K. W. PRATT, P. SPITZER, AND G. S. WILSON

1.1 pH, właściwość pojedynczego jonu

Koncepcja pH jest wyjątkowa wśród powszechnie spotykanych wielkości fizykochemicznych wymienionych w Zielonej Księdze IUPAC, ponieważ pod względem definicji,

$$pH = -\log_{10} a_{H^+}$$

określa ona wielkość dla pojedynczego jonu, aktywność jonu wodorowego, która nie jest mierzalna żadną metodą termodynamicznie poprawną i wymaga konwencji do jej oceny.

2.1 Aktywność jonów wodorowych

Wartość pH została pierwotnie zdefiniowana przez Sørensen w 1909 r. w odniesieniu do stężenia jonów wodorowych (w nomenklaturze współczesnej) jako $pH = -\log_{10}(c_{H^+}/c^\circ)$ gdzie c_{H^+} jest stężeniem jonów wodorowych w mol dm^{-3} , i $c^\circ = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ jest standardową ilością stężenia. Następnie przyjęto, że bardziej satysfakcjonujące jest definiowanie pH w kategoriach względnej aktywności jonów wodorowych w roztworze

$$pH = -\log_{10} a_{H^+} = -\log_{10} \left(\frac{\gamma_{H^+} m_{H^+}}{m^\circ} \right) \quad (1)$$

gdzie a_{H^+} jest względną (na podstawie molalności) aktywnością i γ_{H^+} jest molowym współczynnikiem aktywności jonu wodorowego H^+ przy molalności m_{H^+} , m° jest standardową molalnością. Wielkość pH ma być miarą aktywności jonów wodorowych w roztworze. Jednakże, ponieważ jest ona definiowana w kategoriach wielkości, której nie można zmierzyć metodą termodynamicznie ważną, równanie 1 może być jedynie pojęciową definicją pH.

Chemiczny potencjał jonu wodoru ($H^+_{(aq)}$) rozcieńczonego w czystej wodzie

$$\mu_{H^+}(T, p, x_{H^+}) = \mu_{H^+}^{\ominus}(T, p) + \mu_{H^+}^{(m)}(T, p, x_{H^+})$$

$$a_{H^+}(T, p, x_{H^+}) \equiv \exp\left(\frac{\mu_{H^+}^{(m)}(T, p, x_{H^+})}{RT}\right) \quad (\text{Lewis})$$

$$\gamma_{H^+}(T, p, x_{H^+}) \equiv \frac{a_{H^+}(T, p, x_{H^+})}{x_{H^+}}$$

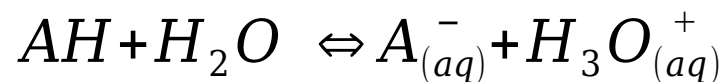
$$\mu_{H^+}(T, p, x_{H^+}) = \mu_{H^+}^{\ominus}(T, p) + RT \ln a_{H^+}(T, p, x_{H^+}) = \mu_{H^+}^{\ominus}(T, p) + RT \ln x_{H^+} + RT \ln \gamma_{H^+}(T, p, x_{H^+})$$

$$pH = -\log_{10} a_{H^+} = -\log_{10} (\gamma_{H^+} x_{H^+}) = -\log_{10} \left(\frac{\gamma_{H^+} N_{H^+}}{N_{H^+} + N_{H_2O}} \right) = -\log_{10} \left(\frac{\gamma_{H^+} N_{H^+}}{N_{H_2O}} \cdot \frac{V}{V} \right) = -\log_{10} \left(\frac{\gamma_{H^+} c_{H^+}}{c_{H_2O}} \right)$$

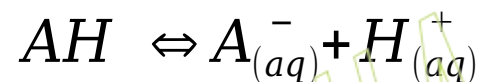
$$pH = -\log_{10} a_{H^+} = -\log_{10} \left(\frac{\gamma_{H^+} c_{H^+}}{c^{\circ}} \right) \approx -\log_{10} c_{H^+}; \quad c^{\circ} = 1 \text{ M}$$

Ponieważ $\gamma \approx 1$ dla stężeń poniżej 0.01 M, przybliżenie w powyższym równaniu, $pH \approx -\log c_{H^+}$, sprawdza się powyżej pH 2. c° jest stężeniem standardowym (Todd Silverstein, Frontiers in Molecular Biosciences, 2021)

Jonizacja kwasu



$$K_a = \frac{a_{A^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{AH} a_{H_2O}} = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[AH][H_2O]}$$



$$K_a = \frac{a_{A^-} \cdot a_{H^+}}{a_{AH}} \approx \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[AH]} = \exp\left(-\frac{\Delta G_a^o}{RT}\right)$$

$$a_\alpha = \gamma_\alpha c_\alpha \text{ vs. } a_\alpha = \gamma_\alpha x_\alpha$$

te ΔG^o mają
różne znaczenia
fizyczne

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

$$pK_a = -\log_{10}[K_a]$$

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]} \equiv pK_a + \log_{10} K_r = pK_a + \log_{10} \left(\exp\left(\frac{\Delta G_r^o}{RT}\right) \right)$$

Równanie Hendersona-Hasselbacha

Równowagi protonacyjne grup jonizowalnych w białkach



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad \wedge \quad pK_a = -\log_{10}[K_a]$$

$$\log_{10}(K_a) = \log_{10}\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right) + \log_{10}([H^+]) \Rightarrow pH = \log_{10}\frac{[A^-]}{[AH]} + pK_a$$

Równanie Hendersona-Hasselbacha

zatem $\log_{10}\frac{[AH]}{[A^-]} = pK_a - pH$; przyjmując, że $\frac{[AH]}{[A^-]} = \exp\left(-\frac{G_{AH} - G_{A^-}}{RT}\right) \equiv \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)$ (prawo Boltzmann)

otrzymujemy:

$$\log_{10}\frac{[AH]}{[A^-]} = \log_{10}\left(\exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)\right) = \frac{\log_e\left(\exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)\right)}{\log_e 10} = -\frac{\Delta G}{2.303 RT} = pK_a - pH$$

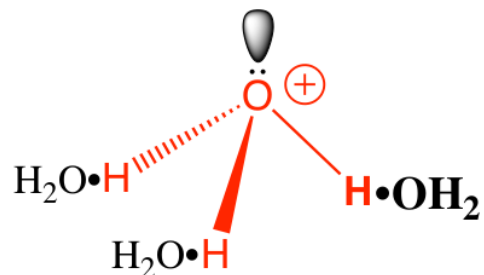
to ΔG° jest funkcją pH.

Stąd

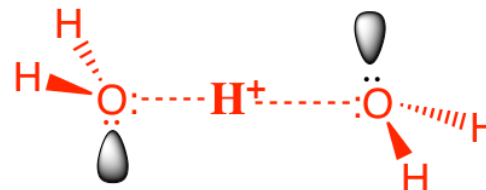
$$\Delta G = 2.303 RT (pH - pK_a)$$

$$G_{deprotonated} = 0; \quad G_{protonated} = 2.303 RT (pH - pK_a)$$

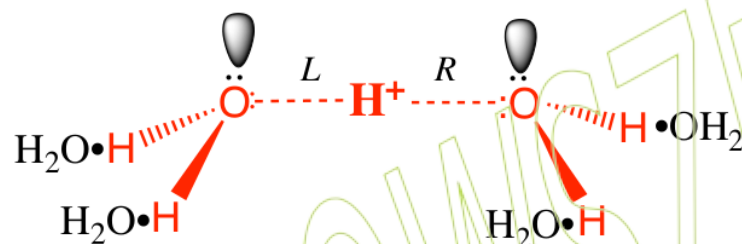
$$G(x) = 2.303 RT x (pH - pK_a)$$



A. Eigen cation: $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_3$



B. Zundel cation: $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_2$



C. Reed/Stoyanov cation: $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_4$
(*expanded Zundel*)

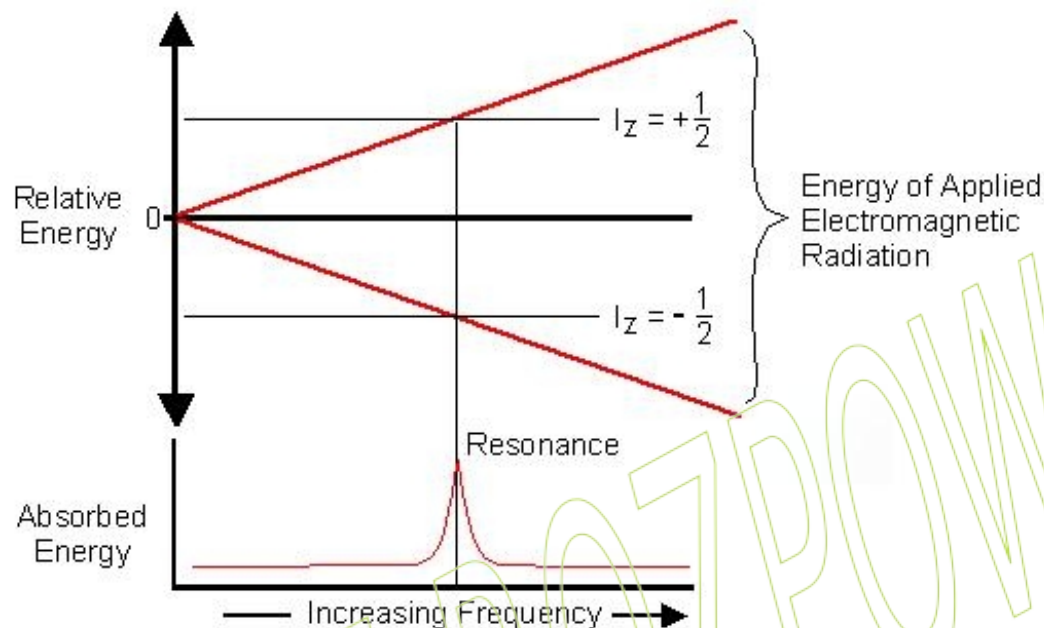
Dwie najpowszechniej akceptowane struktury $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ zostały zaproponowane w latach 60. XX wieku przez Eigena i Zundela, a obie struktury charakteryzują się więcej niż jedną wodą hydratacyjną. Kation Eigena (rysunek A) to tetrahydrat H_9O_4^+ , w którym jednostka H_3O^+ jest połączona wiązaniem wodorowym z trzema wodami w drugiej powłoce hydratacyjnej. Te wiązania wodorowe są „normalnym” typem obserwowanym w wodzie masowej i lodzie. Kation Zundela (rysunek B) to dihydrat H_5O_2^+ , w którym H^+ jest równo dzielone między dwie cząsteczki wody powłoki wewnętrznej. Dwa centralne wiązania wodorowe są symetryczne i są niezwykle krótkie i silne. Stoyanov i Reed zaproponowali heksahydrat jonu $\text{H}_{13}\text{O}_6^+$ (rysunek C) z rdzeniem wewnętrznym podobnym do Zundela (ale z dłuższymi, symetrycznymi wiązaniami wodorowymi) i czterema cząsteczkami wody połączonymi wiązaniami wodorowymi w drugiej powłoce hydratacyjnej. Ładunek +1 protonu jest zdelokalizowany w całym kompleksie heksahydratowym.

Podsumowując, zapisany jako H_3O^+ , jon hydroniowy jest użyteczną fikcją, ale jeśli to możliwe, należy go zastąpić prostym zapisem $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ jako oznaczenie kompleksu heksahydratowego.

Badanie równowag protonacyjnych w biomolekułach metodami spektroskopii NMR

<https://www.researchgate.net/publication/266562962>;

W przypadku jądra atomu wodoru, protonu, spin $I=1/2$



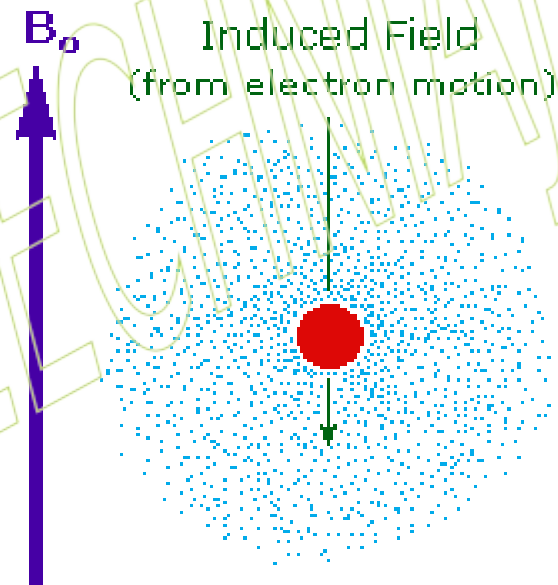
$$\Delta E = h \nu = 2 \pi \hbar \nu$$

Dla $I=1/2$ $\Delta E = \hbar \gamma H_0$

$$\nu = \frac{1}{2 \pi} \gamma H_0$$

NMR – przesunięcie chemiczne

Lokalne pole magnetyczne, któremu podlega dane jądro, różni się od pola zewnętrznego ze względu na wpływ otaczających je elektronów i innych jąder.



$$\nu = \frac{1}{2 \pi} \gamma H_{eff}$$

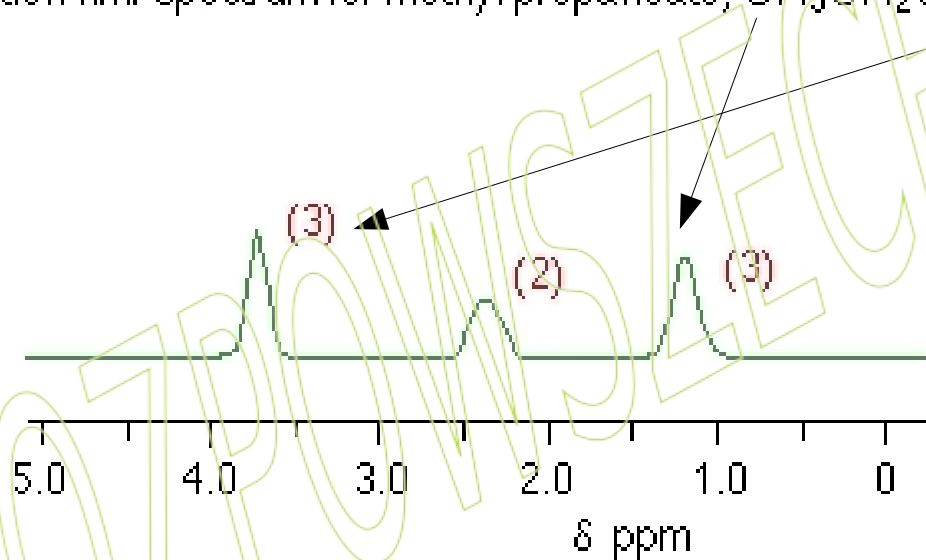
$$H_{eff} = H_0 - H_{ind} = H_0 - \sigma H_0 = H_0 (1 - \sigma)$$

$$\nu = \frac{1}{2 \pi} \gamma (1 - \sigma) H_0$$

$$\delta = \frac{\nu_{pr} - \nu_{wz}}{\nu_{wz}} \cdot 10^6 [ppm]$$

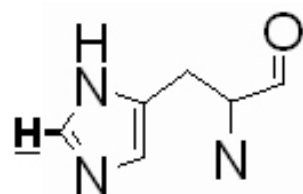
$$\delta = \frac{\nu_{pr} - \nu_{wz}}{\nu_{wz}} \cdot 10^6 [ppm]$$

low resolution nmr spectrum for methyl propanoate, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_3$

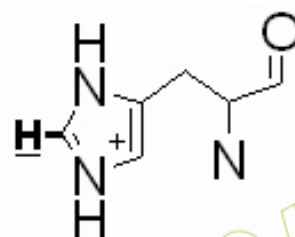


Częstotliwość rezonansowa danego jądra jest określana w odniesieniu do częstotliwości rezonansowej odniesienia wybranego związku odniesienia, np. tetrametylosilanu $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, i jest podawana jako przesunięcie chemiczne, δ .

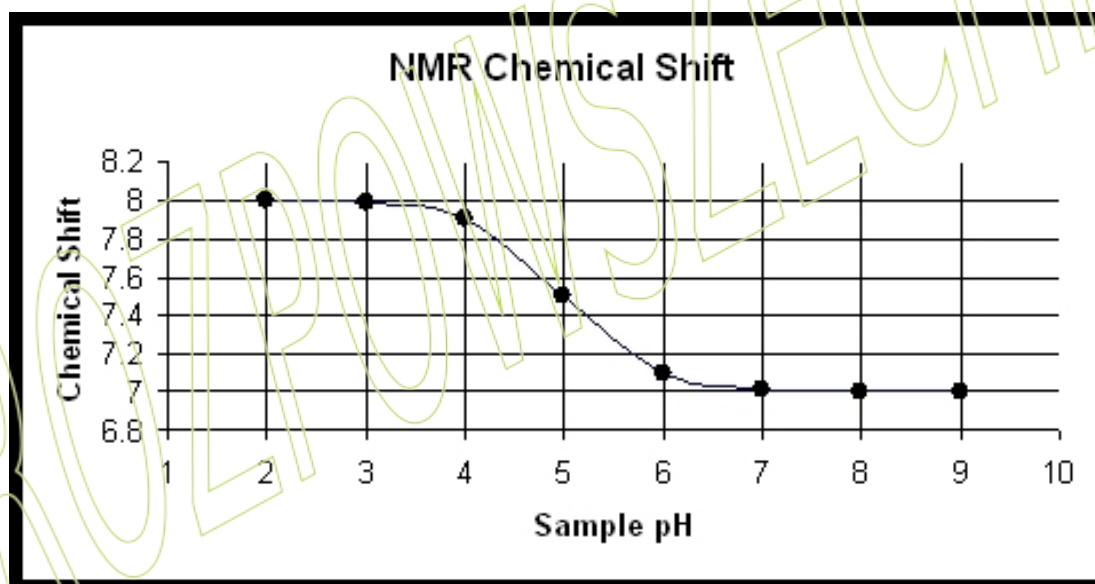
Spektroskopia NMR daje wartości pKa grup protonalnych odpowiadające warunkowi $[AH] = [A^-]$



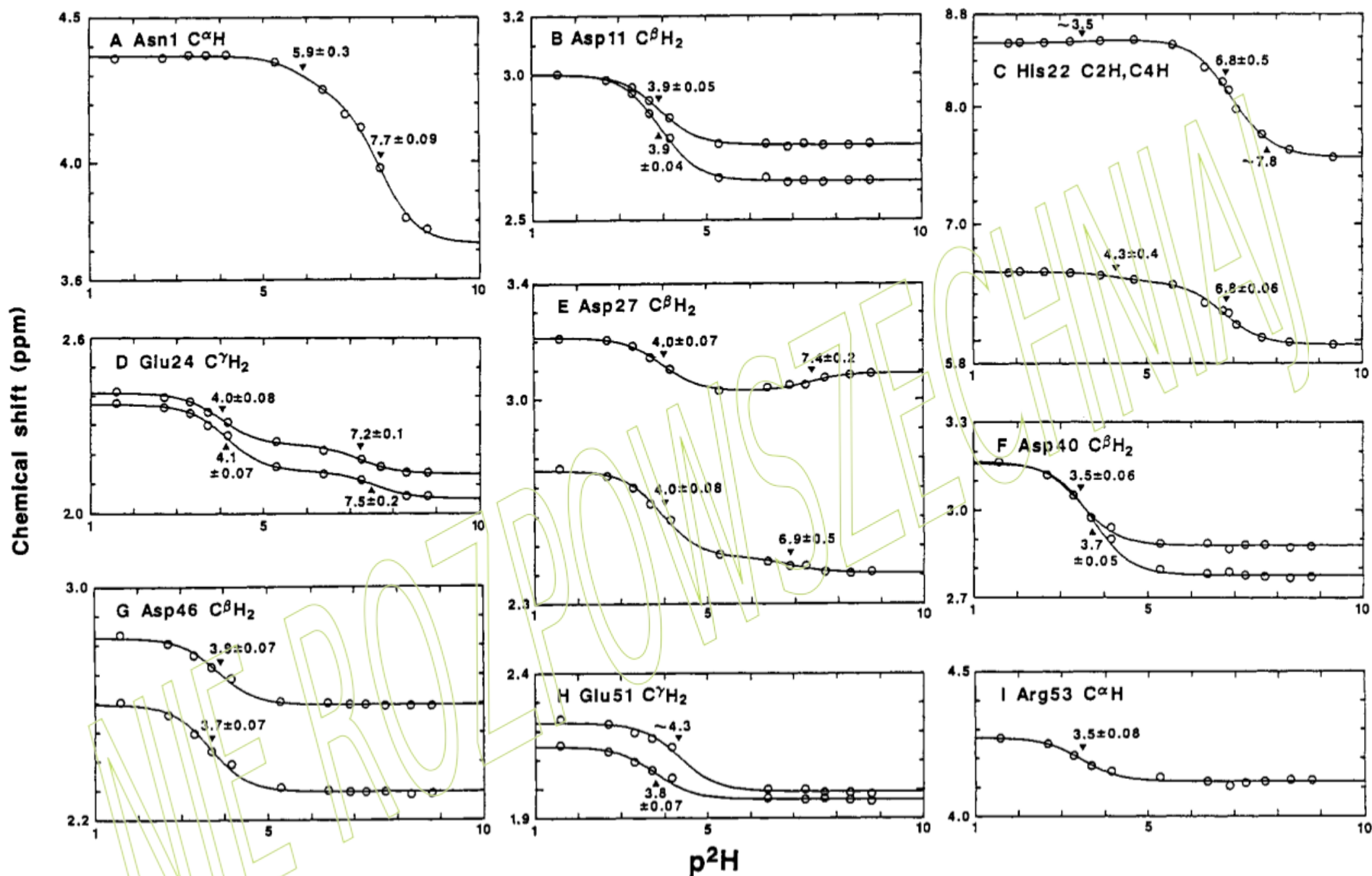
His
 $\delta=7$ ppm



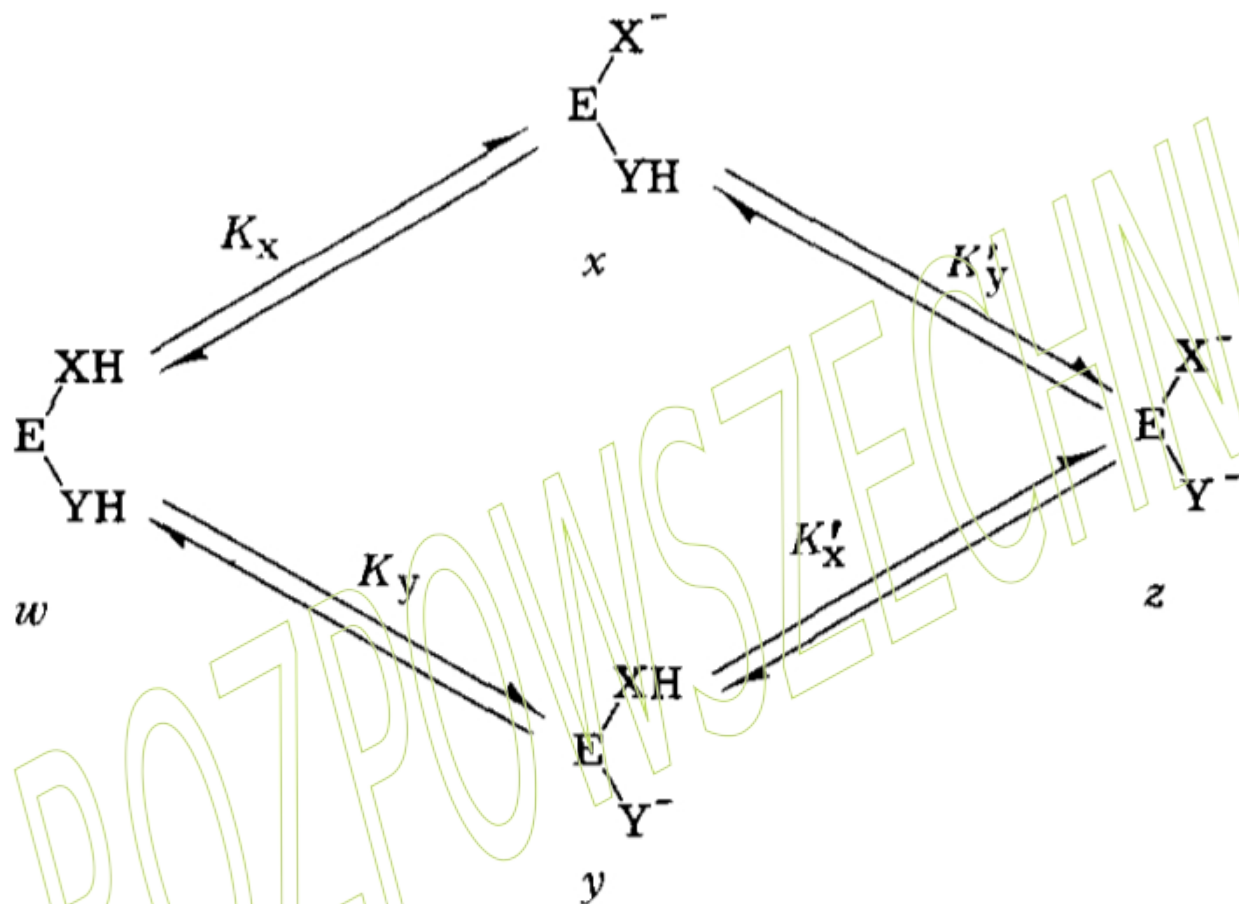
His⁺
 $\delta=8$ ppm



Jeżeli w widmie NMR cząsteczki białka możliwe jest przypisanie zarejestrowanych przesunięć chemicznych do konkretnych aminokwasów, możliwe jest miareczkowanie całej cząsteczki białka i określenie wartości pK_a kwasowych i zasadowych grup funkcyjnych.



Daisuke Kohda, Toshie Sawada, and Fuyuhiko Inagaki, Characterization of pH Titration Shifts for All the Nonlabile Proton Resonances in a Protein by Two-Dimensional NMR: The Case of Mouse Epidermal Growth Factor1, *Biochemistry* 30:4896-4900 (1991)



K. f. Tipton and H. B. F. Dixon,
Effects of pH on enzymes,
Meth. Enzymol., 63:183-234 (1979)

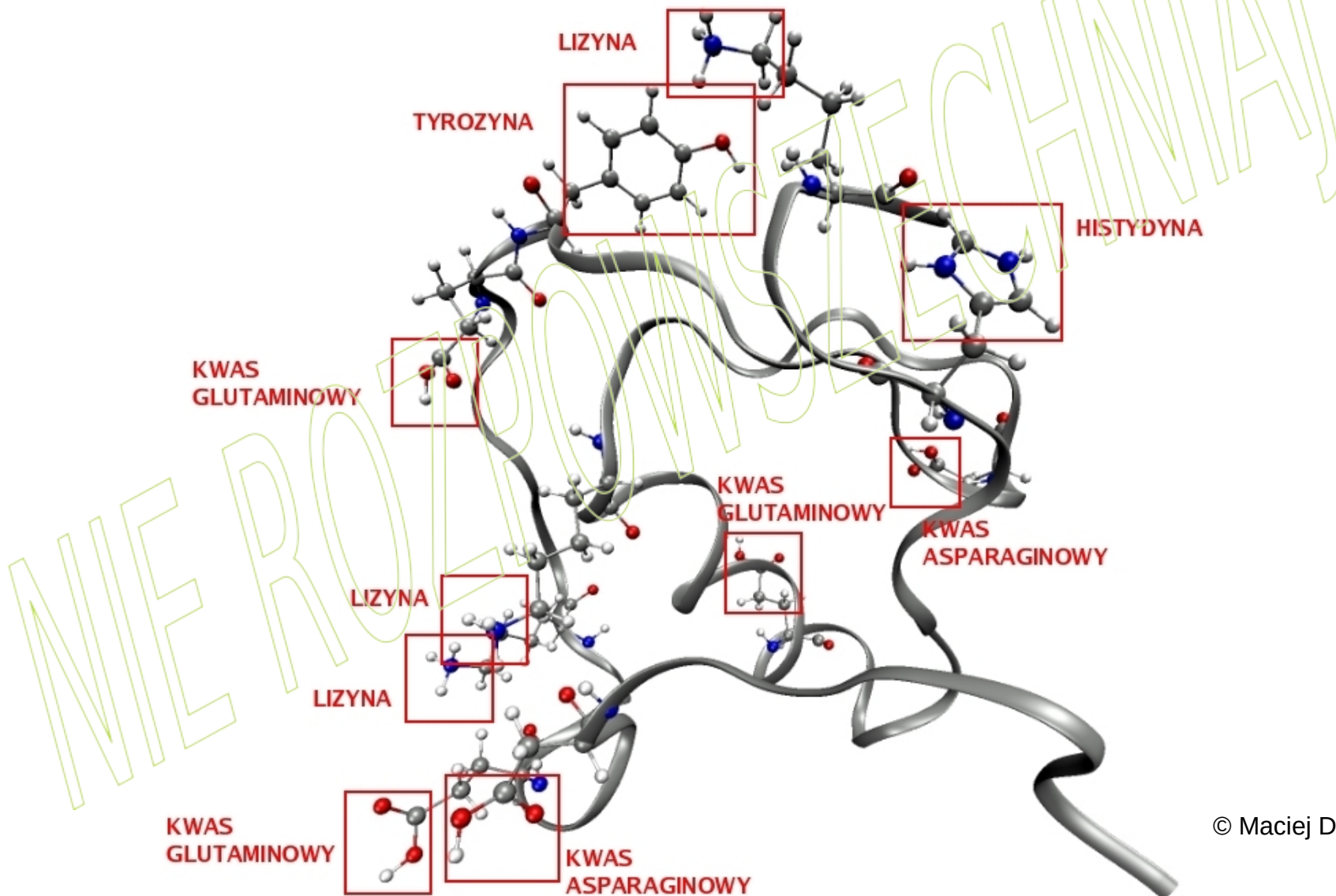
Jonizacja kwasów dwuzasadowych: istnieją cztery stałe dysocjacji kwasu i cztery poziomy energii swobodnej Gibbsa odpowiadające czterem dyskretnym stanom protonacji cząsteczki kwasu dwuzasadowego. Stała dysocjacji kwasu i w konsekwencji wartość pK_a dla danej grupy jonizowalnej zależą od stanu protonacji innych grup ze względu na ich oddziaływania, które zmieniają się wraz ze zmianą stanu protonacji grup.

Możemy formalnie rozszerzyć stosowalność wzoru $G(x)$ na cząsteczkę białka zawierającą M grup protonowalnych:

$$G(T, p, pH, x_1, x_2, \dots, x_M) = 2.303 RT \sum_{j=1}^M x_j (pH - pK_j^{(p)})$$

wektor protonacji

ale dla każdego j mamy 2^{M-1} różnych wartości $pK_j^{(p)}$. Zauważmy, że 2^{20} to ponad milion.



Wykorzystanie algorytmu Monte Carlo przedstawionego przez Metropolis i in. do wygenerowania zestawu stanów protonacji cząsteczki białka zgodnego z prawem rozkładu Boltzmann-Gibbsa

losujemy pierwszy wektor protonacji

$$\{X_{1,1}, X_{2,1}, \dots, X_{M,1}\}$$

Procedura Monte Carlo daje wartości pKa grup protonowalnych równoważne wartościom pKa otrzymywanym ze spektroskopii NMR.

obliczamy jego swobodną energię Gibbsa

$$G_1(x_{1,1}, \dots, x_{M,1}, \text{pH}, T)$$

losujemy zmiany w wektorze protonacji

$$\{X_{1,2}, X_{2,2}, \dots, X_{M,2}\}$$

obliczamy drugą swobodną energię Gibbsa

$$G_2(x_{1,2}, \dots, x_{M,2}, \text{pH}, T)$$

porównujemy G_2 i G_1

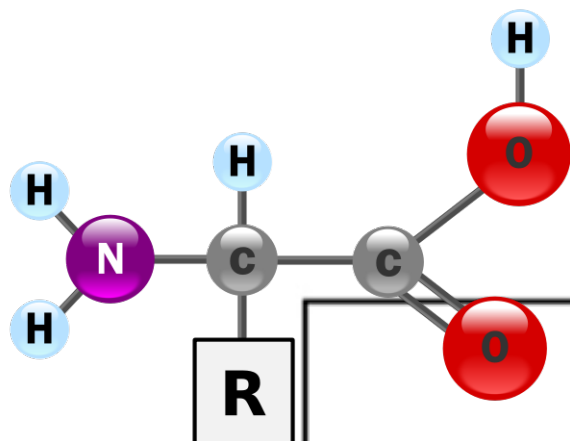
akceptacja stanu 2 gdy $G_2 \leq G_1$

akceptacja stanu 2 gdy $G_2 > G_1 \wedge \xi \in U[0, +1] \leq e^{-\frac{G_2 - G_1}{RT}}$

odrzućcie stanu 2 gdy $G_2 > G_1$ oraz $\xi > e^{-\frac{G_2 - G_1}{RT}}$ dodajemy stan 1 do listy zaakceptowanych stanów

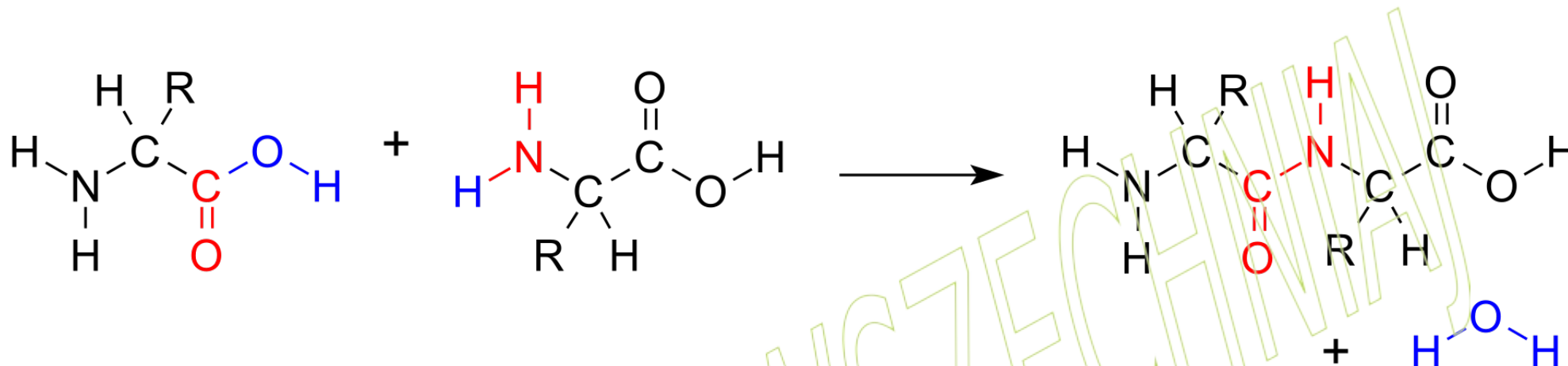
Losujemy kolejny stan protonacji, obliczamy jego swobodną energię Gibbsa i porównujemy z energią stanu zaakceptowanego w poprzednim kroku. Postępujemy analogicznie jak poprzednio, aby go zaakceptować lub odrzucić. W przypadku odrzucenia "stary" stan dopisujemy do listy zaakceptowanych stanów, a jak akceptujemy nowy stan to on jest dodawany do listy. Używamy N_{ini} pierwszych losowań do ekwilibryzacji układu, a kolejne N_{selected} losowań do wygenerowania zespołu stanów protonacji zgodnego z rozkładem Boltzmann-Gibbsa.

“model compound” pK_a's for proteins



	Amino Acid		pK _a Value	
	Name	Alpha Carboxy	+Alpha Amino	Side Chain
Non-Polar Amino Acids	Glycine	2.34	9.60	
	Alanine	2.34	9.69	
	Valine	2.32	9.62	
	Leucine	2.36	9.60	
	Isoleucine	2.36	9.68	
	Methionine	2.28	9.21	
	Phenylalanine	1.83	9.13	
	Tryptophan	2.38	9.39	
	Proline	1.99	10.60	
Polar Amino Acids	Serine	2.21	9.15	
	Threonine	2.63	9.10	
	Cysteine	1.71	10.78	8.33
	Tyrosine	2.2	9.11	10.07
	Asparagine	2.02	8.84	
	Glutamine	2.17	9.13	
Acidic Amino Acids	Aspartic Acid	2.09	9.82	3.86
	Glutamic Acid	2.19	9.67	4.25
Basic Amino acids	Lysine	2.18	8.95	10.79
	Arginine	2.17	9.04	12.48
	Histidine	1.82	9.17	6.04

Tworzenie wiązania peptydowego

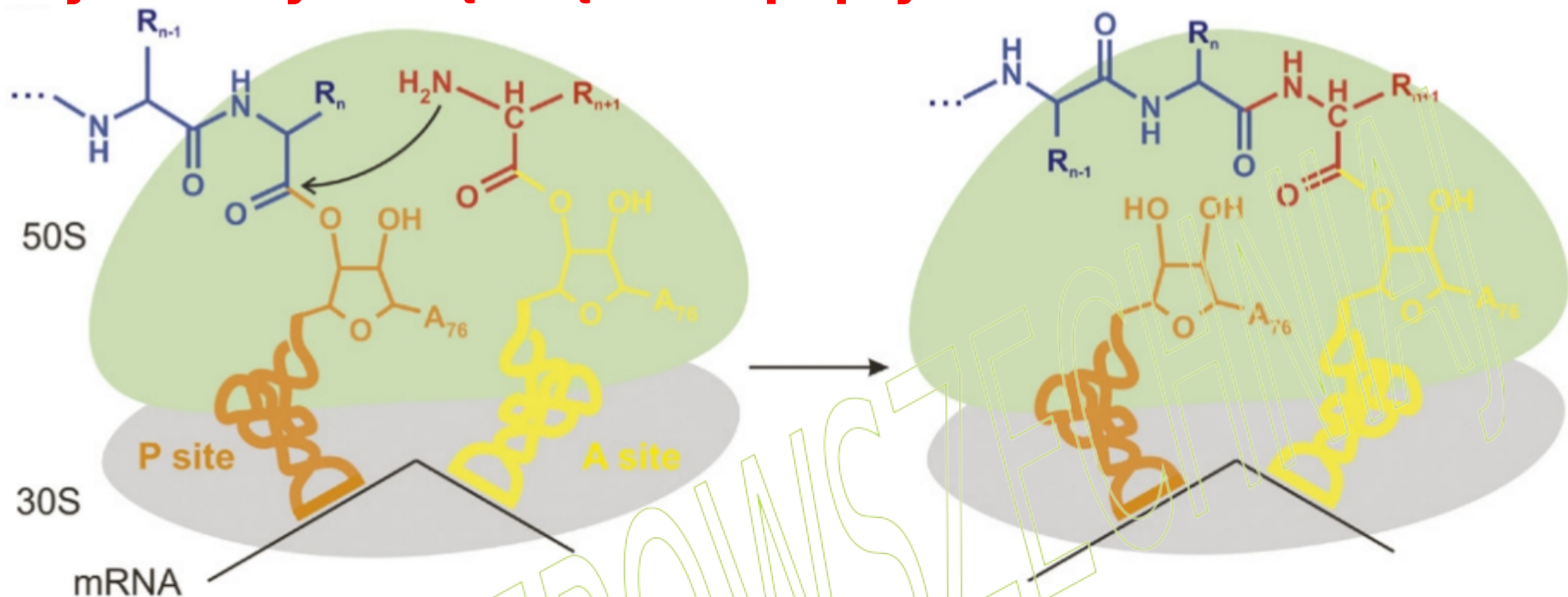


Kiedy dwa aminokwasy tworzą dipeptyd poprzez wiązanie peptydowe, jest to rodzaj reakcji kondensacji. W tego rodzaju kondensacji dwa aminokwasy zbliżają się do siebie, przy czym ugrupowanie kwasu karboksylowego niebędącego łańcuchem bocznym (C1) jednego zbliża się do ugrupowania aminowego niebędącego łańcuchem bocznym (N2) drugiego. Jeden traci wodór i tlen z grupy karboksylowej (COOH), a drugi traci wodór z grupy aminowej (NH_2). W wyniku tej reakcji powstaje cząsteczka wody (H_2O) i dwa aminokwasy połączone wiązaniem peptydowym ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Dwa połączone aminokwasy nazywane są dipeptydem.

Tworzenie wiązania peptydowego zużywa energię, która w organizmach pochodzi z ATP. Organizmy wykorzystują enzymy do produkcji peptydów nierybosomalnych, a rybosomy do produkcji białek w reakcjach różniących się szczegółami od syntezy odwodnienia.

Tworzenie wiązań peptydowych w żywych komórkach zachodzi w centrum transferazy peptydylowej (PTC) dużej podjednostki rybosomu i obejmuje przeniesienie grupy peptydylowej z peptydylo-tRNA do aminoacylo-tRNA. Pomimo licznych badań kinetycznych i teoretycznych wiele szczegółów tej reakcji pozostaje niejasnych [Chem. Pharm. Bull. 69:734-740 (2021)].

Jak rybosomy robią wiązania peptydowe?

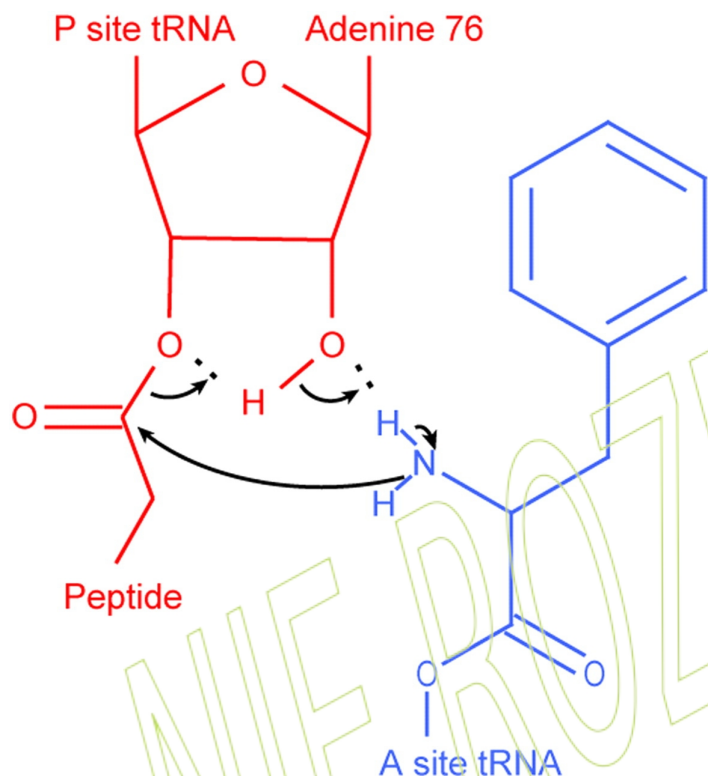


Rybosomy to maszyny molekularne syntetyzujące białka w komórce. Niedawne analizy biochemiczne i struktury krystaliczne rybosomu bakteryjnego o wysokiej rozdzielczości wykazały, że aktywne miejsce tworzenia wiązań peptydowych – centrum peptydylotransferazy – składa się wyłącznie z rRNA.

Rybosom wiąże dwa substraty tRNA, jeden z rosnącym łańcuchem peptydowym przyłączonym wysokoenergetycznym wiązaniem estrowym do jego 3' hydroksylu (peptydylo-tRNA w miejscu P, pomarańczowy), a drugi z pojedynczym aminokwasem zestryfikowanym do jego 3' hydroksylu (aminoacylo-tRNA w miejscu A, żółty). Podczas tworzenia wiązania peptydowego grupa α -aminowa aminoacylo-tRNA w miejscu A atakuje węgiel karbonylowy peptydylo-tRNA w miejscu P, tworząc nowy peptydylo-tRNA, który jest o jeden aminokwas dłuższy w miejscu A i deacylowany tRNA w miejscu P. Centrum transferazy peptydydowej znajduje się na podjednostce 50S (zielona). W podjednostce 30S (szarej) rozpoznawane są aminoacylo-tRNA zgodnie z dopasowaniem ich antykodonów do kodonu mRNA w miejscu A.

Drugą aktywnością enzymatyczną związaną z centrum peptydylotransferazy jest hydrolityczne rozszczepienie wiązania estrowego w peptydylo-tRNA podczas zakończenia syntezy białka. W przeciwieństwie do tworzenia wiązań peptydowych, które jest wewnętrzną aktywnością rybosomu i zachodzi bez czynników pomocniczych, uwalnianie peptydu wymaga wyspecjalizowanych czynników uwalniających, które rozpoznają kodony terminacyjne i promują hydrolizę peptydylo-tRNA w miejscu P.

Tworzenie wiązania peptydowego (przeniesienie peptydydu) inicjowane jest przez nukleofilowy atak grupy α -aminowej aminokwasu, estru połączonego z tRNA w miejscu A, na estrowo-karbonylowy węgiel łańcucha peptydowego połączonego z 3'-tlenem tRNA w miejscu P. Transfer peptydydu wymaga, aby grupa α -aminowa aminokwasu w tRNA w miejscu A miała ładunek obojętny, a nie w formie protonowanej NH_3^+ .



Aminoacyl-tRNA	$pK_a^{\text{aq}} *$	pK_a^{obs}
Asn-tRNA ^{Asn}	6.8	5.9 ± 0.2
Phe-tRNA ^{Phe}	7.2	6.1 ± 0.1
Ile-tRNA ^{Ile}	7.8	6.1 ± 0.2
Ala-tRNA ^{Ala}	7.9	6.3 ± 0.1
Gly-tRNA ^{Gly}	7.8	7.36 ± 0.04
Pro-tRNA ^{Pro}	8.6	7.8 ± 0.2

* pK_a of the α - NH_2 group of aa-tRNA in bulk water.

Wartości pK_a grupy α -aminowej różnych aa-tRNA w roztworze w temperaturze 20 °C ekstrapolowano ze zmierzonych wartości pK_a wolnych aminokwasów i estrów aminokwasów.

Zbadano zależność od pH **katalizowanego przez rybosomy** transferu peptydydu z fMet-tRNA^{fMet} do różnych aa-tRNA: Phe-tRNA^{Phe}, Ala-tRNA^{Ala}, Gly-tRNA^{Gly}, Pro-tRNA^{Pro}, Asn-tRNA^{Asn}, i Ile-tRNA^{Ile}, wybranych tak aby obejmowały szeroki zakres wewnętrznych (intrinsic) wartości pK_a grupy α -aminowej ich aminokwasów. Szybkości przenoszenia peptydydu były różne przy pH 7,5 i wykazywały różną zależność od pH, wyrażoną ilościowo jako wartość pH (równoważną pK_a^{obs}), przy której szybkość była równa połowie wartości maksymalnej. Uzyskane wartości pK_a^{obs} były przesunięte w dół w stosunku do wewnętrznych (intrinsic) wartości pK_a aa-tRNAs w roztworze (czyli nie na rybosomie).

Proponowany mechanizm transferu peptydydu. Nukleofilowy atak grupy α -aminowej aa-tRNA w miejscu A (niebieski, tutaj Phe-tRNA^{Phe}) na estrowo-karbonylowy węgiel peptydylo-tRNA w miejscu P (czerwony) skutkuje stanem przejściowym.