

Análisis de la interacción de la prolina con moléculas del solvente mediante cálculos cuánticos ab-initio

Herrera, Fernando E. ¹; Pujato, Mario A. ¹; Sferco, Silvano J. ^{1,2}

1-Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.

2- INTEC (CONICET - UNL), Guemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina. e-mail: herrera367@hotmail.com

RESUMEN: Se analizó la interacción de la prolina con moléculas de agua mediante cálculos cuánticos ab-initio, teniendo en cuenta distintos sistemas moleculares: prolina neutra con dos moléculas de agua, zwitterión con dos moléculas de agua, y prolina neutra con los iones hidronio e hidroxilo. Se estudió además la estabilidad de estos sistemas, la formación de enlaces de hidrógeno y la posible estabilidad del zwitterión en presencia de dos moléculas de agua.

Palabras claves: prolina - zwitterión - cálculos cuánticos ab-initio.

SUMMARY: Interaction analysis of proline with solvent molecules using ab-initio quantum calculations. Herrera, Fernando E. ¹; Pujato, Mario A. ¹; Sferco, Silvano J. ^{1,2}. The interaction of proline with water molecules for different systems, was analyzed using ab-initio quantum calculations. The systems formed by neutral proline with two water molecules, proline zwitterion in the presence of two water molecules, and neutral proline plus hydronium and hydroxide ions, were considered. The stability of these systems, the hydrogen bond formation and the zwitterion stability in presence of water were analyzed.

Key words: proline - zwitterion - ab-initio quantum calculations.

Introducción

Ha sido elegida la prolina para su estudio, debido a que posee propiedades muy particulares. Se trata de un aminoácido no esencial, constituido por 17 átomos, y es el único que posee una amina secundaria, debido a que el grupo R (constituido por 3 átomos de carbono) se cierra sobre el nitrógeno, formando un anillo pirrolidínico; es por esto que la prolina tiene menos grados de libertad conformacionales en comparación con los demás aminoácidos, otorgándole cierta particularidad, pudiendo tomar sólo algunos valores de los ángulos ψ y ϕ , característicos de los enlaces peptídicos. El otro ángulo característico ω , puede tomar dos valores aproximados de 0° y

180° , dando las configuraciones cis o trans respectivamente, prefiriéndose por la mayoría de los aminoácidos la configuración trans, pero el enlace peptídico X-pro se puede hallar en su forma cis con cierta frecuencia (X-pro 6,5%, tyr-pro 25%, ser-pro 11%).

La prolina, formando parte de una estructura proteica, usualmente se encuentra en turns, en cualquiera de sus dos configuraciones, y generalmente rompe las hélices α , a no ser que se encuentre en la primer vuelta.

Su punto isoeléctrico se encuentra a pH 6,3; esto significa que a este pH y en medio acuoso, se encuentra en su estructura zwitteriónica, a valores inferiores se encuentra protonada y a valores superiores se encuentra desprotonada.

Cabe destacar que es un aminoácido poco estudiado desde el punto de vista cuántico. Sólo recientemente se han publicado dos trabajos sobre análogos de dipéptidos conteniendo hidroxiprolina y fluoroprolina, con la finalidad de estudiar la estabilidad del colágeno (1-2). En estos trabajos, el solvente es simulado mediante un modelo continuo polarizable, no calculándose los efectos de moléculas de agua en forma explícita. En otras publicaciones se estudió cuánticamente la posible estabilización del zwitterión de glicina (3) en presencia de moléculas explícitas de agua; y el zwitterión de β -alanina (4) modelando el solvente acuoso como un medio continuo y polarizable.

En nuestro trabajo hemos estudiado cuánticamente la estructura electrónica y la geometría de menor energía total de la prolina en vacío y en presencia de moléculas explícitas de agua. Se estudiaron además, los procesos de protonación y desprotonación de la prolina. En este trabajo presentamos nuestros resultados correspondientes a sistemas prolina-agua, analizando la energética y la formación de enlaces de hidrógeno con el solvente. Todos estos resultados han sido presentados recientemente en el XIV International Biophysics Congress (5).

Objetivos

Determinar las propiedades electrónicas de la prolina en presencia de moléculas de solvente acuoso.

so. Analizar las geometrías de mínima energía total para distintos sistemas prolina-solvente con la posible formación de enlaces de hidrógeno. Estudiar la estabilidad del zwitterión de prolina con un mínimo de moléculas de agua.

Metodología de cálculo

Los cálculos de la estructura electrónica para cada geometría fija de los núcleos, fueron realizados mediante el método ab-initio Unrestricted Hartree-Fock (UHF), utilizando una base gaussiana 3-21G. Las geometrías fueron optimizadas utilizando un criterio de minimización de energía total, implementado a través del método de gradientes conjugados. Los resultados se presentan gráficamente a través del estudio sistemático de las densidades de carga y los potenciales generados por las mismas, mostrados en planos representativos en cada caso. Todos estos cálculos así como los gráficos fueron llevados a cabo utilizándose el software HyperChem versión 6.0.

Desarrollo y Resultados

La geometría de la prolina utilizada en todo este trabajo corresponde a la obtenida a partir de una optimización de geometría de la prolina aislada (figura 1).

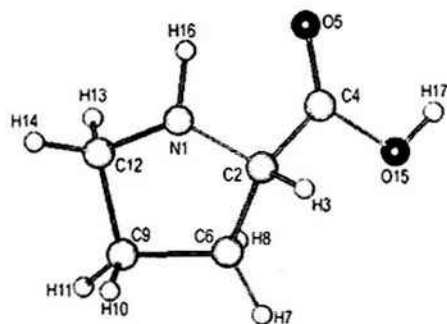


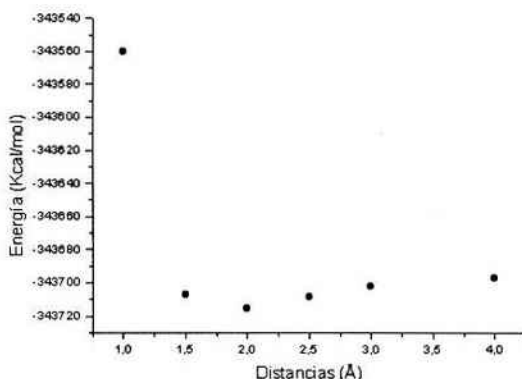
Figura 1: Estructura optimizada para la prolina en vacío.

Sistema: Prolina + 2 aguas

Se obtuvo el perfil energético (figura 2) del acercamiento de dos moléculas de agua (denominadas A1 y A2); A1 se acerca por uno de sus H al N de la prolina en un sentido arbitrario (se eligió la dirección de protonación); A2 se acerca por su O al protón 17 de la prolina en la misma dirección de la desprotonación. Esta gráfica muestra un mínimo, lo que indica que

existe una distancia para la cual el sistema se estabiliza formando enlaces de hidrógeno. Esta geometría de mínima energía fue optimizada, permitiendo la libre relajación de todos los átomos obteniéndose una nueva geometría correspondiente a un nuevo mínimo de energía del sistema compuesto, donde la distancia de separación de cada agua a la prolina es distinta, así como su orientación a la misma.

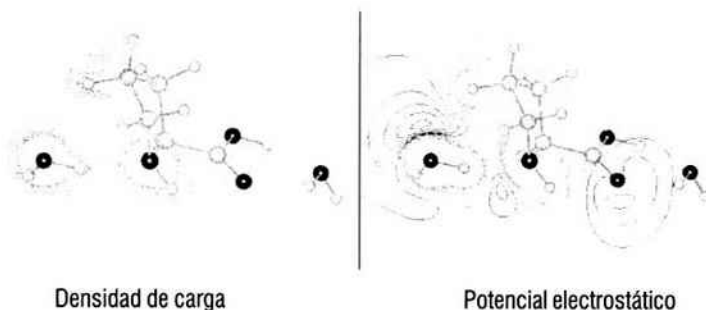
Figura 2: Energía vs. distancia del acercamiento de dos moléculas de agua a la prolina (la distancia de acercamiento es la misma para ambas moléculas de agua); manteniéndose rígidas las posiciones de los átomos de todas las moléculas. Se observa un mínimo de energía para una distancia de 2Å.



Como resultado hubo alejamiento y rotación de las aguas con formación de enlaces de hidrógeno que se pueden apreciar en las gráficas de densidades de carga y potenciales electrostáticos en 2D (figura 3).

Puede verse, en general para un enlace puente de hidrógeno, en un gráfico de densidad de carga, que existe muy poca densidad de electrones (aproximadamente $0,04 e/a_0^3$). Véase discusión más abajo.

Figura 3: Densidad de carga y potencial electrostático en 2D de la optimización de geometría del sistema prolina más dos aguas, en el plano formado por el oxígeno y un hidrógeno del agua A1 y N1. En la densidad de carga, la línea más externa tiene un valor de $0,04 e/a_0^3$ con un interlineado de $0,04 e/a_0^3$. En el potencial electrostático, la línea más externa tiene un valor de $-0,15 e/a_0$ con un interlineado de $0,03 e/a_0$.

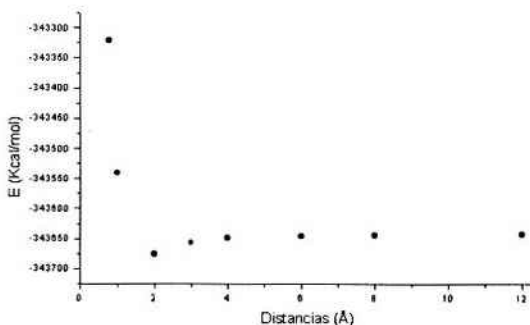


Sistema: Zwitterión + 2 aguas

Se estudió este sistema para diferentes distancias, acercando las moléculas de agua, en las direcciones de protonación y desprotonación halladas en nuestros cálculos previos (5). Una molécula

de agua se acerca por uno de sus hidrógenos a un oxígeno de la prolina, y la otra se acerca por su oxígeno al hidrógeno adicional del nitrógeno en el zwitterión. El perfil energético (figura 4) vuelve a mostrar un mínimo, lo que indica que existe una distancia para la cual el sistema se estabiliza.

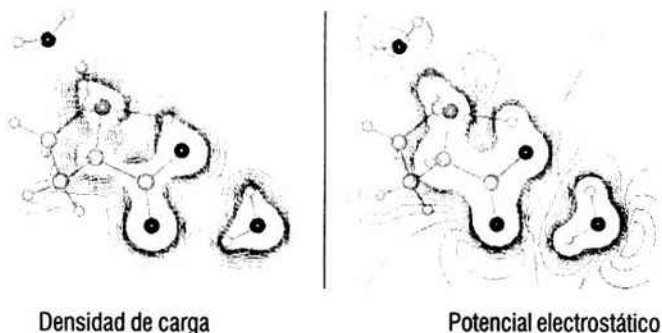
Figura 4: Energía vs. distancia del acercamiento de dos moléculas de agua al zwitterión (la distancia de acercamiento es la misma para ambas moléculas de agua); manteniéndose rígidas las posiciones de los átomos de todas las moléculas. Se observa un mínimo de energía para una distancia de 2Å.



Al igual que para el sistema prolina más dos aguas, se optimizó la geometría del sistema de energía mínima, esperando obtener la estabilización del zwitterión. Los resultados muestran que éste se desestabilizó a través de un acomodamiento interno de átomos (figura 5), obteniéndose una prolina neutra cuya estructura se denominó Z1o. Los movimientos atómicos ocurridos durante la optimización

son los siguientes: el protón 17 rompió su enlace con el nitrógeno y se unió químicamente al oxígeno más cercano (O5), previo a esto tuvo que haber ocurrido una pequeña variación del ángulo de torsión formado por los átomos 1-2-4-5, y una modificación en la estructura del anillo. Las aguas también se alejaron formando enlaces de hidrógeno con la nueva estructura Z1o.

Figura 5: Densidad de carga y potencial electrostático en 2D de la optimización de geometría del sistema zwitterión más dos aguas, en el plano formado por el oxígeno y un protón del agua A2 (enfrentado a O5) y O5. Idénticos valores para las curvas de nivel de la figura 3.



Sistema: Prolina + H_3O^+ + OH^-

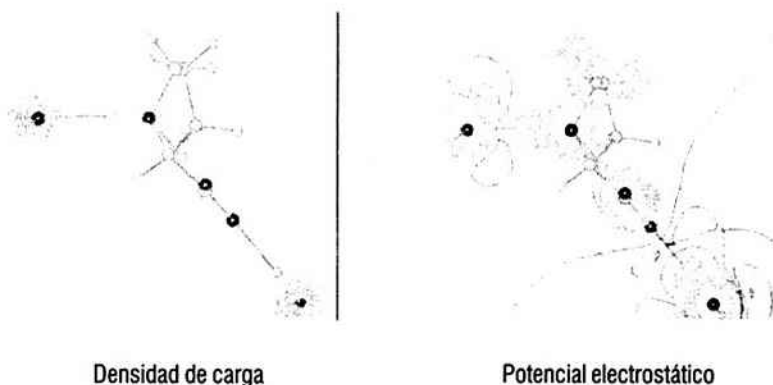
Se partió de una geometría donde se coloca a cada ion en la dirección y a la distancia de la prolina correspondiente a la geometría de energía mínima de la protonación (H_3O^+) y desprotonación (OH^-), estudiadas separadamente (5).

Se optimizó la geometría de este sistema, y los resultados muestran que hubo un movimiento de átomos, quedando la prolina neutra unida por puentes de hidrógeno a dos moléculas de agua (figura 6).

Para llegar a este resultado, la prolina debió protonarse en el nitrógeno con un protón del hidronio (quedando éste como agua) y desprotonarse en el grupo carboxilo (formándose agua con el grupo hidroxilo), a la vez que debió moverse internamente el H16 (rompiendo su enlace con el N) hacia el O5 (formando un nuevo enlace).

El proceso puede interpretarse como que la prolina pasó por un intermediario zwitteriónico, que inmediatamente se desestabilizó para formar la prolina neutra con una estructura similar a la Z1o.

Figura 6: Densidad de carga y potencial electrostático en 2D de la optimización de geometría del sistema prolina más hidronio e hidroxilo, en el plano formado por el oxígeno y un protón provenientes del hidronio y N1. En la densidad de carga, la línea más externa tiene un valor de $0,2 e/a_0^3$ con un interlineado de $0,05 e/a_0^3$. En el potencial electrostático, la línea más externa tiene un valor de $-0,15 e/a_0$ con un interlineado de $0,03 e/a_0$.



Todos estos estudios concluyen que la prolina forma enlaces de hidrógeno con moléculas de agua y que, al menos para las geometrías estudiadas, no es posible estabilizar al zwitterión de la prolina en presencia de dos aguas, como sí fue encontrado en el caso de la glicina (3). El zwitterión de prolina reacomoda su geometría dando una prolina neutra.

Calculando energías de enlace y enlaces de hidrógeno

Todos los sistemas estudiados anteriormente mostraron mínimos de energía total, formando complejos con moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno.

La energía de enlace, por lo tanto, está compuesta por una disminución de la energía total debido a la formación de enlaces de hidrógeno y por un

aumento de la energía total debido a un reordenamiento de las geometrías de los compuestos del sistema, la energía ganada por la formación de enlaces de hidrógeno es mayor que la pérdida por el reordenamiento individual de las moléculas, por esto la energía total resultante es menor que la del sistema inicial; es decir, el sistema se ha vuelto más estable.

a- Energías de enlace total

Se calcularon las energías totales de los tres sistemas anteriores ya optimizados (S1, S2 y S3), luego se aislaron las moléculas constituyentes de los sistemas manteniendo rígidamente sus geometrías, calculándose por separado sus energías respectivas y posteriormente se optimizaron por separado estos componentes. Así, las energías de enla-

ce, y su descomposición en energías debidas a la formación de enlaces de hidrógeno y energías de reacomodamiento estructural, pueden ser calculadas utilizando:

$$\Delta E_{t_{S_i}} = \Delta E_{h_{S_i}} - \Delta E_{r_{t_{S_i}}} = E[\text{Pop}_{S_i}] + 2 \cdot E[\text{Aop}] - E_{S_i \text{ total}}$$

$$\Delta E_{h_{S_i}} = E[\text{P}_{S_i}] + E[\text{A1}_{S_i}] + E[\text{A2}_{S_i}] - E_{S_i \text{ total}}$$

$$\Delta E_{r_{t_{S_i}}} = E[\text{P}_{S_i}] - E[\text{Pop}_{S_i}] + (E[\text{A1}_{S_i}] + E[\text{A2}_{S_i}] - 2 \cdot E[\text{Aop}])$$

donde:

$\Delta E_{t_{S_i}}$: energía de enlace del sistema i

$\Delta E_{h_{S_i}}$: energía debida a la formación de enlaces de hidrógeno en el sistema i

$\Delta E_{r_{t_{S_i}}}$: energía debida al reacomodamiento molecular en el sistema i

$E_{S_i \text{ total}}$: energía total del sistema i

$E[\text{P}_{S_i}]$: energía de la prolina en sistema i

$E[\text{A1}_{S_i}]$: energía del agua 1 en el sistema i

$E[\text{A2}_{S_i}]$: energía del agua 2 en el sistema i

$E[\text{Pop}_{S_i}]$: energía de la prolina optimizada del sistema i

$E[\text{Aop}]$: energía de la molécula de agua optimizada (-47430,879 Kcal/mol)

La tabla 1 resume todos los resultados para los tres sistemas estudiados.

Tabla 1: Comparación energética entre los sistemas estudiados en este trabajo.

Sistema 1 (S1): Prolina + 2 Aguas		Sistema 2 (S2): Zwitterión + 2 Aguas		Sistema 3 (S3): Prolina + H ₃ O ⁺ + OH ⁻	
	E (Kcal/mol)		E (Kcal/mol)		E (Kcal/mol)
P _{S1}	-248833,584	P _{S2}	-248834,389	P _{S3}	-248834,119
A1 _{S1}	-47430,770	A1 _{S2}	-47430,729	A1 _{S3}	-47430,867
A2 _{S1}	-47430,643	A2 _{S2}	-47430,870	A2 _{S3}	-47430,881
E _{S1 total}	-343729,344	E _{S2 total}	-343717,774	E _{S3 total}	-343715,945
E[pop _{S1}]	-248835,016	E[pop _{S2}]	-248834,850	E[pop _{S3}]	-248834,850
$\Delta E_{h_{S1}} =$	34,347 Kcal/mol	$\Delta E_{h_{S2}} =$	21,786 Kcal/mol	$\Delta E_{h_{S3}} =$	20,078 Kcal/mol
$\Delta E_{r_{t_{S1}}} =$	1,777 Kcal/mol	$\Delta E_{r_{t_{S2}}} =$	0,620 Kcal/mol	$\Delta E_{r_{t_{S3}}} =$	0,741 Kcal/mol
$\Delta E_{t_{S1}} =$	32,570 Kcal/mol	$\Delta E_{t_{S2}} =$	21,166 Kcal/mol	$\Delta E_{t_{S3}} =$	19,337 Kcal/mol

b- Enlaces de hidrógeno

Como se dijo anteriormente las ganancias energéticas calculadas, se deben a la existencia de enlaces de hidrógeno formados entre las moléculas de agua y la prolina. Los valores normales de ganancia energética debida a la presencia de un enlace de hidrógeno en moléculas biológicas, se pueden clasificar en tres: débil (> 4 Kcal/mol, con ángulos entre 90 y 150°, y distancias entre 2,2 y 3,2 Å), moderado

(4 - 15 Kcal/mol, con ángulos entre 130 y 180°, y distancias entre 1,5 y 2,2 Å) y fuerte (14 - 40 Kcal/mol, con ángulos entre 175 y 180°, y distancias entre 1,2 y 1,5 Å) (6).

Se midieron las distancias y los ángulos entre los átomos que pueden formar enlaces de hidrógeno en los tres sistemas para determinar la existencia y el tipo de enlaces de hidrógeno presentes en los mismos.

En el sistema 1 la distancia entre un hidrógeno del agua 1 y el nitrógeno de la prolina es de 1,88 Å (con un ángulo de 161,13°); entre uno de los hidrógenos del agua 2 y el O5 es de 1,98 Å (con un ángulo de 131,13°); y entre el oxígeno del agua 2 y el H17 de la prolina es de 1,63 Å (con un ángulo de 153,34°); sugiriendo la existencia de tres enlaces de hidrógeno, cuya energía individual aportada promedio es de 11,45 Kcal/mol.

En el sistema 2 la distancia entre el O del agua 1 y el H16 de la prolina es de 1,90 Å (con un ángulo de 177,01°); entre uno de los hidrógenos del agua 2 y el O5 es de 2,19 Å (con un ángulo de 134,10°); y entre el otro H del agua 2 y el O15 de la prolina es de 2,13 Å (con un ángulo de 140,15°); sugiriendo nuevamente la existencia de tres enlaces de hidrógeno, con una energía aportada promedio por cada uno de 7,26 Kcal/mol.

En el sistema 3 la distancia entre el O del agua 1 y el H16 de la prolina es de 1,90 Å (con un ángulo de 134,77°); y entre uno de los hidrógenos del agua 2 y el O15 es de 1,91 Å (con un ángulo de 164,61°); sugiriendo la existencia de dos enlaces de hidrógeno, cuya energía aportada promedio por cada uno es de 10,04 Kcal/mol.

En todos los sistemas las energías promedio aportadas por los enlaces de hidrógeno entran en la clasificación, según su intensidad, de energías de enlaces de hidrógeno moderados.

Estos resultados muestran que la contribución más importante a la energía de enlace total proviene de los enlaces de hidrógeno y no de la energía de reordenamiento estructural del sistema.

Conclusiones

Todos los cálculos de estructura electrónica, potenciales electrostáticos y densidades de carga, se realizaron mediante el método ab-initio Unrestricted Hartree-Fock (UHF), utilizando una base gaussiana 3-21G.

La prolina neutra en presencia de dos aguas, acercándose cada una por las direcciones de protonación y desprotonación, conduce a un complejo de prolina neutra más dos aguas formando enlaces de hidrógeno.

La prolina neutra en presencia de iones H_3O^+ y OH^- acercándose por las direcciones de protonación y desprotonación respectivamente, se estabiliza en

una prolina neutra formando un complejo con dos aguas unidas por enlaces de hidrógeno. Este resultado se obtiene a través de movimientos inter e intramoleculares: el ion H_3O^+ cede un protón al N de la prolina. Asimismo, ésta se desprotona formando un zwitterión que, inmediatamente se desestabiliza en prolina neutra, a través de la transferencia del protón adicional del N a un oxígeno, formando un grupo OH.

El zwitterión de prolina en presencia de dos aguas acercándose por las direcciones de protonación y desprotonación, se estabiliza formando un complejo de prolina neutra más dos aguas unidas por enlaces H. Ocurre aquí una transferencia intramolecular de protones indicando que, al menos para las geometrías estudiadas, no es posible estabilizar al zwitterión solamente en presencia de dos moléculas de agua.

Bibliografía

- 1- Benzi, K.; Improta, R.; Scalmani, G.; Barone, V., 2002. Quantum Mechanical Study of the Conformational Behavior of Proline and 4R-Hydroxyproline Dipeptide Analogues in Vacuum and in Aqueous Solution. *J. Comput. Chem.*, **23**, 3: 341-350.
- 2- Improta, R.; Benzi, K.; Barone, V., 2001. Understanding the Role of Stereoelectronic Effects in Determining Collagen Stability. 1. A Quantum Mechanical Study of Proline, Hydroxyproline, and Fluoroproline Dipeptide Analogues in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 50: 12568-12577.
- 3- Jensen, J. H.; Gordon M. S., 1995. On the Number of Water Molecules Necessary To Stabilize the Glycine Zwitterion. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 31: 8159-8170.
- 4- Nielsen, P. A.; Norrby, P. O.; Liljefors, T.; Rega, N.; Barone, V., 2000. Quantum Mechanical Conformational Analysis of β -Alanine Zwitterion in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 13: 3151-3155.
- 5- Herrera, F. E.; Pujato, M. A.; Sferco S. J.; 2002. Proline: Zwitterionic and Neutral Structures in Presence of Water. Poster presentado en el "XIV International Biophysics Congress", IUPAB, del 27 de abril al 1 de mayo, Buenos Aires, Argentina.
- 6- Jeffrey G. A., 1997. "An Introduction to Hydrogen Bonding" Oxford University Press (New York).