

Análisis de dipéptidos conteniendo prolina en vacío y en solución acuosa

Herrera, F. E.¹; Sferco, S. 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), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Se analizaron distintos dipéptidos X-Y y X-Pro en las conformaciones cis y trans, en vacío (cuánticamente) y en medio acuoso (clásicamente) mediante moléculas explícitas de agua. Los análisis estructurales y energéticos del cálculo cuántico permiten entender por qué se encuentra a los dipéptidos X-Pro con mayor frecuencia en la conformación cis que a los X-Y. Las repulsiones entre nubes electrónicas de átomos vecinos que no forman enlaces, son las interacciones responsables de las diferencias energéticas observadas en ambas conformaciones. La inclusión del solvente incrementa la estabilidad pero no favorece ninguna conformación en particular.

Palabras claves: prolina – dipéptidos – cálculos cuánticos ab-initio.

SUMMARY: Analysis of dipeptides containing proline in vacuum and aqueous solution. Herrera, F.; Sferco, S.J.. Different dipeptides X-Y and X-Pro in the cis and trans conformation were analyzed, in vacuum (quantum mechanics) and in aqueous solution (classical mechanics) with explicit water molecules. The structural and energetic analysis of quantum calculus allow us to understand why the X-Pro dipeptides are found more frequently than X-Y dipeptides in cis conformation. The repulsion among electronic clouds of neighboring, nonbonded atoms are responsible for the energetic differences found in both conformations. The inclusion of solvent accounts for an additional stability but none conformation is specially favored.

Key words: proline – dipeptides – ab-initio quantum calculations.

Nota

Este trabajo ha sido parcialmente presentado en las siguientes reuniones científicas: (1) Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica "SAB 2002", Buenos Aires, diciembre 2002; (2) "International Workshop on proteomics, protein structure, function and interaction", Trieste, Italia, mayo 2003. Además, los resultados de este trabajo son parte de la Tesis de Licenciatura en Biotecnología aprobada por F. E. Herrera en la U.N.L. en agosto de 2003.

Correspondencia

e-mail: herrera367@hotmail.com

Recibido: 08-06-04

Aceptado: 09-09-04

Introducción

La prolina es un aminoácido especial en el sentido que es el único aminoácido cuyo grupo R se cierra sobre el N, formando un anillo pirrolidínico. Esta característica estructural limita la libertad conformacional del ángulo diedro ϕ (rotación alrededor del enlace N-C $_{\alpha}$) y tiene ciertamente influencia en las conformaciones que adoptan polipéptidos conteniendo prolina.

En un estudio de 154 estructuras de proteínas obtenidas por difracción de Rx (1), analizando 32539 ángulos ω (característicos de los enlaces peptídicos), se encuentra que sólo 116 (0.36 %) de ellos fueron hallados en la conformación cis. Algunos enlaces específicos, sin embargo, frecuentemente sí se encuentran en cis. La mayoría de ellos corresponden a enlaces peptídicos X-Pro (donde X indica cualquier aminoácido). De todos los enlaces peptídicos Tyr-Pro el 25% de ellos se encuentran en cis; de todos los enlaces peptídicos Ser-Pro, el 11% se encuentra en cis; y el 6,5% de todos los enlaces peptídicos X-Pro se encuentran en cis.

Estos resultados muestran que la prolina en los enlaces peptídicos X-Pro es un aminoácido diferente del resto, ya que es el único que aparece en la conformación cis con mucha más frecuencia que el resto, y de aquí es nuestro interés en los enlaces peptídicos de los dipéptidos X-Pro (enlaces tipo proli). Dado que el ángulo diedro ϕ en un dipéptido representa rotaciones alrededor de un enlace localizado en el segundo aminoácido, los dipéptidos Pro-X no tienen la limitación conformacional impuesta por la prolina y por ello no son objeto de nuestro estudio.

En este trabajo analizamos a través de cálculos cuánticos en vacío y de simulaciones de dinámica molecular clásica con solvente acuoso explícito, la estabilidad relativa de las conformaciones cis y trans de dipéptidos X-Pro y X-Y.

Se encuentran pocos artículos de la literatura que traten en forma cuántica enlaces peptídicos en los que forme parte la prolina. Dos de ellos (2,3) tratan solamente sobre sistemas análogos a dipéptidos de prolina (una prolina aislada utilizando como terminadores los grupos acetil y N-metil amida en sus extremos N y C-terminal respectivamente: Ace-Pro-Nme). El restante utiliza como análogo de dipéptido a la molécula N-formil-prolinamida, que es una molécula de prolina con el grupo -COH en su

extremo N-terminal y con el grupo -NH₂ en su extremo C-terminal (4). Estos trabajos pretenden entender otro tipo de comportamiento de estos dipéptidos, como el efecto que ejerce la rugosidad del anillo de pirrolidina en la estabilización del colágeno o la aparición o no de otras conformaciones (diferentes de las cis y trans) con estos enlaces.

Objetivos

Determinar la posible causa del comportamiento particular que presenta el enlace peptídico en los dipéptidos X-Pro, mediante análisis energéticos, electrónicos y estructurales de distintos dipéptidos en vacío y en presencia de solvente acuoso.

Metodología de cálculo

Los cálculos cuánticos de la estructura electrónica para cada geometría fija de los núcleos en vacío, 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 estudios de dipéptidos en medio acuoso se realizaron mediante simulaciones de Dinámica Molecular clásica utilizando el campo de fuerzas AMBER (5). Los resultados cuánticos se presentan a través de un análisis electrónico, gráficamente a través del estudio sistemático de las densidades de carga en 3 dimensiones, así como análisis energéticos y estructurales. Los resultados clásicos incluyendo solvente son presentados a través de análisis energéticos. Todos estos cálculos fueron llevados a cabo utilizándose el software HyperChem versión 6.0.

Desarrollo y resultados

Dipéptidos X-Y y X-Pro en vacío

En esta parte del trabajo, se analizan distintos dipéptidos en las conformaciones cis y trans sin ningún tipo de terminadores. El objetivo es comprender las características, desde un punto de vista cuántico, de las conformaciones cis y trans que involucran a dipéptidos X-Y y X-Pro. Para ello se analizaron las características estructurales, electrónicas y energéticas de los mismos. Debido al tamaño de los resi-

duos y al método de cálculo utilizado, se eligieron a los siguientes dipéptidos como representativos de los sistemas X-Y: Glicina-Glicina (Gly-Gly), Glicina - Alanina (Gly-Ala), y Serina - Alanina (Ser-Ala). Para el estudio de los dipéptidos X-Pro: Glicina - Prolina (Gly-Pro), Serina - Prolina (Ser-Pro), y Alanina - Prolina (Ala-Pro).

Estos sistemas fueron estudiados en las conformaciones cis ($\omega = 0^\circ$) y trans ($\omega = 180^\circ$), con ángulos diedros iniciales $\phi = -60^\circ$ (característico del anillo pirrolidinico de la prolina) y $\psi = 180^\circ$ (valor cercano al correspondiente a una hélice de poliprolina II). Todos los sistemas fueron sometidos a optimizaciones de geometría, de forma tal de minimizar la energía total del sistema. Se quiere analizar cómo el sistema se acomoda estructuralmente al optimizarse su geometría, y por ello comparamos todos los sistemas finales con sus estructuras iniciales, además de evaluar la diferencia energética entre ambas conformaciones cis y trans.

Análisis energético

En la Tabla 1 se pueden observar las energías obtenidas, después de una optimización de geometría. Se muestra también la diferencia de energía entre las conformaciones cis y trans para cada dipéptido, siendo $\Delta E = E_{\text{cis}} - E_{\text{trans}}$, por lo que un ΔE negativo significa que la conformación cis es la de menor energía. En dicha tabla se puede observar claramente que para todos los sistemas X-Y, siempre el sistema de menor energía (y por lo tanto el más estable) es el que tiene la conformación del enlace peptídico en trans. En los sistemas X-Pro vemos que para el sistema Ser-Pro la conformación trans es la de menor energía, mientras que para los otros dos sistemas lo es la conformación cis.

Como conclusión podemos decir que todos los sistemas estudiados tienen mínimos locales cercanos a las conformaciones cis y trans, encontrándose que algunas conformaciones cis de dipéptidos X-Pro son las más estables.

Tabla 1: Energías totales de todos los sistemas optimizados estudiados, y la diferencia energética entre las conformaciones cis y trans.

	Sistema	Energía total Cis (Kcal/mol)	Energía total Trans (Kcal/mol)	ΔE ($E_{\text{cis}} - E_{\text{trans}}$) (Kcal/mol)
X-Y	Gly-Gly	-305534,25	-305539,33	5,08
	Gly-Ala	-329896,47	-329902,96	6,49
	Ser-Ala	-400957,09	-400976,69	19,6
X-Pro	Gly-Pro	-377882,96	-377882,23	-0,73
	Ser-Pro	-448947,89	-448958,62	10,73
	Ala-Pro	-402253,11	-402251,91	-1,20

Análisis estructural

En esta sección focalizamos la atención en un cierto número de variables estructurales, a fin de caracterizar posibles diferencias entre las conformaciones cis y trans, así como entre las geometrías iniciales y aquellas obtenidas de una optimización de las mismas.

rando la distancia en cis con respecto a la del mismo sistema pero en trans, se observa que en casi todos los casos, el enlace peptídico de mayor longitud se encontró en la conformación cis. En el sistema Gly-Pro ocurrió a la inversa. Cabe aclarar que en este último ocurren las mayores distancias de enlace pero también la menor variación porcentual 0,2%.

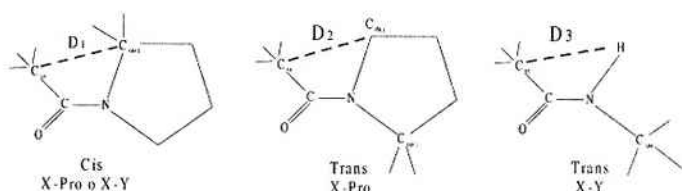
Distancias de enlace C'-N

En el análisis de las distancias del enlace peptídico de los distintos sistemas (Tabla 2), compa-

Tabla 2: Distancias de enlace, del enlace peptídico y variación de dicha distancia en las conformaciones cis y trans, en los distintos sistemas analizados. La variación está calculada respecto al promedio de las distancias cis y trans.

Sistema	Cis	Trans	Diferencia (Å)	Variación porcentual	
	Distancia C'-N (Å)	Distancia C'-N (Å)	D _{cis} - D _{trans}		
X-Y	Gly-Gly inicial	1,335	1,335	0	0 %
	Gly-Gly final	1,365	1,351	0,014	1,0 %
	Gly-Ala inicial	1,335	1,335	0	0 %
	Gly-Ala final	1,358	1,350	0,008	0,6 %
	Ser-Ala inicial	1,335	1,335	0	0 %
	Ser-Ala final	1,377	1,339	0,038	2,8 %
X-Pro	Gly-Pro inicial	1	1	0	0 %
	Gly-Pro final	1,369	1,372	-0,003	0,2 %
	Ser-Pro inicial	1,33	1	0,33	28,3 %
	Ser-Pro final	1,368	1,333	0,035	2,6 %
	Ala-Pro inicial	1,33	1,33	0	0 %
	Ala-Pro final	1,351	1,335	0,016	1,2 %

Figura 1: Esquemas representativos de los sistemas X-Pro y X-Y, en donde se pueden observar cuales son las distancias que se tienen en cuenta en el análisis estructural.



Se puede observar que la energía de los sistemas es mayor cuando la distancia del enlace peptídico es también mayor. Para el sistema Gly-Pro, cuya energía es similar en las dos conformaciones, se puede observar que la distancia del enlace peptídico también es similar.

Distancia entre carbonos cercanos

En la Figura 1 se definen las distancias entre los átomos de carbonos (o carbono-hidrógeno, que son analizados en los sistemas X-Pro y X-Y en las conformaciones cis y trans.

Tabla 3: Distancias para un sistema X-Y o X-Pro. D1: entre los átomos C -C para ambos sistemas en la conformación cis. D2: entre los átomos C -C en sistemas trans X-Pro. D3: entre los átomos C -H para los sistemas en trans X-Y. Véase también Figura 1.

Sistema	Cis D1 (Å)	Trans D2 (Å)	Trans D3 (Å)
X-Y	Gly-Gly inicial	2,786	2,55
	Gly-Gly final	2,927	2,59
	Gly-Ala inicial	2,785	2,55
	Gly-Ala final	2,947	2,58
	Ser-Ala inicial	2,786	2,55
	Ser-Ala final	3,137	2,49
	X-Pro	Gly-Pro inicial	2,497
Gly-Pro final		2,933	2,920
Ser-Pro inicial		2,532	2,536
Ser-Pro final		3,100	3,131
Ala-Pro inicial		2,446	2,749
Ala-Pro final		3,037	2,965

Para un sistema general X-Y o X-Pro, definimos:

D1: distancia entre el C_α del Xaa y el C_α del Yaa o Pro (aa cualquiera, incluyendo a la prolina).

D2: distancia entre el C_α del Xaa y el C_δ de la Prolina únicamente.

D3: distancia entre el C_α del Xaa y el H del N del Yaa (todos excepto la prolina).

Al analizar estas distancias en los sistemas estudiados (Tabla 3), se observa que para los sistemas X-Pro ambas distancias (D1 y D2) son similares y cercanas a 3Å, en los sistemas ya optimizados. En los sistemas X-Y, se observa que la distancia en cis no varía demasiado con respecto a los sistemas X-Pro. La distancia en trans (D3) es menor que la distancia en trans (D2) de los sistemas X-Pro, a pesar de que las distancias iniciales en ambos sistemas eran similares.

Como conclusión podemos decir que existe una correlación entre la energía total del sistema y las distancias en cis (D1) y trans (D2 y D3). Para los sistemas X-Y, las distancias D1 (cis) son siempre mayores a las D3 (trans), igual a lo que se obtiene con respecto a las energías totales. En los sistemas

X-Pro, ocurre algo similar: la energía es mayor (*menor*) en los casos en que D1 (cis) es mayor (*menor*) que D2 (trans).

- Análisis de la densidad de carga electrónica

En función de comprender los resultados energéticos y estructurales anteriores, en esta sección analizamos la densidad electrónica de todos los dipéptidos y mostramos únicamente las graficas de un dipéptido X-Y y un dipéptido X-Pro (ambos en cis y trans), debido a que estos resultados son representativos de los resultados obtenidos para los demás dipéptidos.

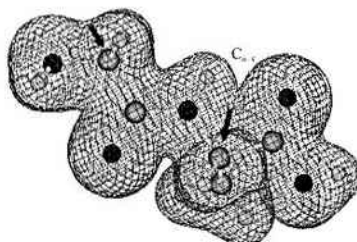
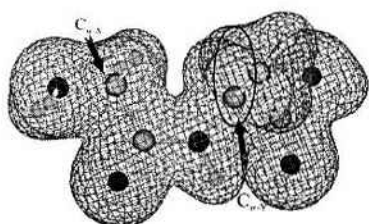
Las Figuras 2 y 3 muestran las densidades de carga para un sistema X-Y y para un sistema X-Pro, ambos en las dos conformaciones de menor energía cercanas a las conformaciones cis y trans, respectivamente. En estas figuras se observa a la densidad de carga como una isosuperficie de densidad constante.

Las interacciones que determinan la estabilización de un sistema son las interacciones: núcleo-núcleo, electrón-electrón y núcleo-electrón. Las dos primeras son interacciones repulsivas, y la última

es atractiva. El efecto que ejercen estas interacciones en conjunto es lo que determina la estructura tridimensional y la forma de la densidad de carga

alrededor de la molécula. Denominaremos efectos estéricos aquellos efectos que hacen subir la energía del sistema debido a interacciones repulsivas del tipo núcleo-núcleo y electrón-electrón.

Figura 2: Gráficos en 3D de las densidades de carga del sistema Gly-Ala en cis (izquierda) y en trans (derecha). Las flechas indican los C_{α} .

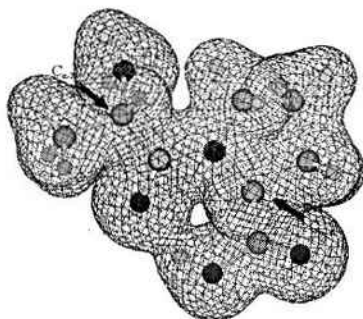
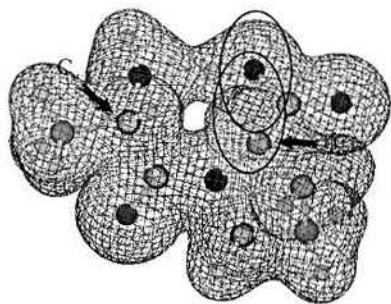


Al observar la Figura 2, para un dipéptido X-Y, se puede ver que en la conformación cis el sistema posee una gran cantidad de densidad de carga electrónica en una zona en donde no hay enlace químico: la zona entre los dos carbonos α . En cambio en la conformación trans la carga está más espacialmente distribuida. Esto explica claramente por qué la energía de las conformaciones cis en los dipéptidos X-Y es mayor que las energías de las conformaciones trans: la repulsión entre nubes electrónicas en una zona carente de enlace químico, incrementa la energía total.

Para un sistema X-Pro se puede observar (Figura 3) que, en ambas conformaciones, se encuen-

tra una cantidad de carga electrónica similar en una zona en donde no hay enlace químico. En la conformación cis, ocurre entre los dos carbonos α , pero en la conformación trans ocurre entre el carbono α del aminoácido X y el carbono δ de la prolina (Figura 1). Esto explica también claramente por qué los sistemas X-Pro tienen energías similares en las conformaciones cis y trans. Las repulsiones entre nubes electrónicas y entre núcleos son similares en ambas conformaciones, produciendo mínimos locales energéticamente comparables. El caso de Ser-Pro resulta especial, ya que las estructuras de menor energía resultan ser las más alejadas de las conformaciones cis y trans ideales.

Figura 3: Gráficos en 3D de las densidades de carga del sistema Ala-Pro en cis (izquierda) y en trans (derecha). Las flechas indican los C_{α} .



Estos resultados permiten entender que, en los sistemas X-Y, la mayor longitud del enlace peptídico obtenida para la conformación *cis*, se debe a la mayor repulsión por parte de los carbonos α de ambos aminoácidos, mientras que en la conformación *trans* tal repulsión está notablemente disminuida.

Las distancias entre átomos de carbonos cercanos (vistas anteriormente), expresan nuevamente la importancia de las repulsiones entre nubes electrónicas. La repulsión asociada a los átomos de C_α y C_β (en *trans* para sistemas X-Pro) es más importante que la repulsión asociada a los átomos de C_α y H (en *trans* para sistemas X-Y).

En definitiva, este análisis de densidad de carga nos permite comprender que el llamado efecto estérico es el más importante a tener en cuenta para que un sistema pueda adoptar una conformación *cis* o una *trans*. O sea que es este efecto el predominante para que los sistemas X-Y se encuentren con más frecuencia en la conformación *trans* y que los sistemas X-Pro se puedan encontrar tanto en *cis* como en *trans*.

Díptidos X-Y y X-Pro en presencia de solvente acuoso

En esta parte del trabajo se desea analizar el efecto del solvente sobre la estabilidad *cis* – *trans* de los díptidos, a través de la consideración explícita de moléculas de agua. Debido a la complejidad del sistema resultante, en lugar de cálculos cuánticos, realizamos simulaciones de dinámica molecular clásica utilizando el campo de fuerzas AMBER.

Partiendo de las estructuras de mínima energía obtenidas en vacío con el cálculo cuántico, realizamos simulaciones de dinámica molecular utilizando el siguiente esquema:

1. Se utiliza como partida las estructuras finales obtenidas de la optimización de geometría cuántica en vacío.

2. A esta estructura se la coloca dentro de una caja con 215 moléculas de agua y con condiciones periódicas de contorno. El agua dentro de la caja pertenece al modelo de agua TIP3P (6). El tamaño de la caja es de 18,7 Å de longitud por cada lado.

3. Al sistema completo se le realiza una optimización de geometría clásica utilizando el campo de fuerzas AMBER, de forma tal de disminuir el

gradiente RMS, para comenzar la dinámica molecular en óptimas condiciones.

4. Se seleccionan luego la molécula de soluto junto a las moléculas de agua que se encuentren alrededor del sistema, de forma tal de que la selección total ronde las 100 moléculas. Es decir, se divide al solvente en dos subsistemas. Las aguas de la capa cercana a los díptidos participaran de la simulación de dinámica molecular en presencia de la capa más externa de aguas que se mantendrá fija durante la simulación.

5. Al sistema resultante se le realiza una simulación por dinámica molecular: se le asigna un tiempo de calentamiento de 200 ps desde 0 K hasta 300 K (temperatura fisiológica), se mantiene a esta última temperatura por un tiempo de 800 ps y se le asigna otro tiempo de enfriamiento de 400 ps hasta 0 K nuevamente.

6. Luego de la dinámica se realiza otra optimización de geometría pero ahora del sistema completo, para llevar al sistema al mínimo local más cercano de la superficie de energía potencial, dado que al final de la dinámica el sistema no siempre se encuentra en un mínimo.

7. Al último sistema final es al que se le realizan todos los análisis que se detallan a continuación.

El objetivo que tienen todos estos cálculos es poder visualizar cómo cambian estructuralmente los sistemas al colocarlos dentro de un solvente acuoso y cómo se estabilizan con el mismo.

La estabilización del sistema se estudió mediante un análisis energético, en el cual primero se determina la energía del sistema final completo (E_{total}), luego se determina la energía del díptido aislado manteniendo la geometría que poseía dentro del sistema acuoso (E_{sist}) y por último se determina la energía asociada a todas las aguas juntas separadas del díptido (E_{aguas}). Así definimos

$$\Delta H_b = (E_{sist} + E_{aguas}) - E_{total}$$

Donde ΔH_b es la energía ganada por la interacción con el solvente (interacciones coulombianas y de van der Waals) y donde un valor positivo indica una estabilización adicional por interacciones con el solvente.

En el análisis energético de todos los sistemas estudiados (Tablas 4 y 5) siempre ocurre una mayor estabilización del sistema con el solvente después de la simulación ($\Delta H_{b\text{-final}} > \Delta H_{b\text{-inicial}}$).

Dipéptidos X-Y

En el análisis energético del sistema Gly-Ala (Tabla 4), se puede observar que se produce una mayor estabilización por la interacción con el solvente en el sistema trans ($\Delta H_{b\text{-final TRANS}} > \Delta H_{b\text{-final CIS}}$), pudiéndose deber en parte a la mayor formación de enlaces de hidrógeno que ocurren en trans con respecto a los que ocurren en cis. La energía del sistema trans aislado es menor que la del sistema cis aislado ($E_{\text{sist-final TRANS}} < E_{\text{sist-final CIS}}$), como es de

esperarse para este tipo de dipéptidos X-Y. Nótese sin embargo, que la energía total del sistema completo es menor en el sistema que posee al dipéptido en cis ($E_{\text{total-final CIS}} < E_{\text{total-final TRANS}}$).

Para el dipéptido Ser-Ala, (Tabla 4) se observa, que a diferencia del sistema anterior, la mayor estabilización se da en la conformación cis ($\Delta H_{b\text{-final CIS}} > \Delta H_{b\text{-final TRANS}}$). La energía del conformero en trans es menor que la del conformero en cis ($E_{\text{sist-final TRANS}} < E_{\text{sist-final CIS}}$) nuevamente como corresponde a sistemas X-Y. Por último, nótese que la energía total final es menor en la conformación trans ($E_{\text{total-final TRANS}} < E_{\text{total-final CIS}}$), situación inversa que la del sistema Gly-Ala.

Tabla 4: Energías de los sistemas Gly-Ala (izquierda) y Ser-Ala (derecha) en sus estados iniciales y finales, y en sus conformaciones cis y trans.

Glicina-Alanina		Serina-Alana	
Cis (Kcal/mol)	Trans (Kcal/mol)	Cis (Kcal/mol)	Trans (Kcal/mol)
$E_{\text{total-inicial}}$	2668,82	$E_{\text{total-inicial}}$	2617,52
$E_{\text{sist-inicial}}$	50,86	$E_{\text{sist-inicial}}$	53,81
$E_{\text{agua-inicial}}$	2710,73	$E_{\text{agua-inicial}}$	2673,59
$\Delta H_{b\text{-inicial}}$	92,77	$\Delta H_{b\text{-inicial}}$	109,88
$E_{\text{total-final}}$	-3413,18	$E_{\text{total-final}}$	-3403,5
$E_{\text{sist-final}}$	53,44	$E_{\text{sist-final}}$	47,73
$E_{\text{agua-final}}$	-3316,21	$E_{\text{agua-final}}$	-3293,08
$\Delta H_{b\text{-final}}$	150,41	$\Delta H_{b\text{-final}}$	158,15
$E_{\text{total-inicial}}$		$E_{\text{total-inicial}}$	2589,31
$E_{\text{sist-inicial}}$		$E_{\text{sist-inicial}}$	116,43
$E_{\text{agua-inicial}}$		$E_{\text{agua-inicial}}$	2601,2
$\Delta H_{b\text{-inicial}}$		$\Delta H_{b\text{-inicial}}$	128,32
$E_{\text{total-final}}$		$E_{\text{total-final}}$	-3388,45
$E_{\text{sist-final}}$		$E_{\text{sist-final}}$	103,25
$E_{\text{agua-final}}$		$E_{\text{agua-final}}$	-3304,54
$\Delta H_{b\text{-final}}$		$\Delta H_{b\text{-final}}$	187,16
$E_{\text{total-inicial}}$		$E_{\text{total-inicial}}$	2619,11
$E_{\text{sist-inicial}}$		$E_{\text{sist-inicial}}$	90,68
$E_{\text{agua-inicial}}$		$E_{\text{agua-inicial}}$	2628,86
$\Delta H_{b\text{-inicial}}$		$\Delta H_{b\text{-inicial}}$	100,43
$E_{\text{total-final}}$		$E_{\text{total-final}}$	-3416,83
$E_{\text{sist-final}}$		$E_{\text{sist-final}}$	86,03
$E_{\text{agua-final}}$		$E_{\text{agua-final}}$	-3342,1
$\Delta H_{b\text{-final}}$		$\Delta H_{b\text{-final}}$	160,76

Dipéptidos X-Pro

En el dipéptido Gly-Pro, analizando las energías de los distintos componentes (Tabla 5) se puede observar que, en este caso se produce una mayor estabilización del sistema por interacción con el solvente en la conformación trans ($\Delta H_{b\text{-final TRANS}} > \Delta H_{b\text{-final CIS}}$). Nótese que la energía del sistema cis aislado es menor que la del sistema trans aislado ($E_{\text{sist-final CIS}} < E_{\text{sist-final TRANS}}$), como también se obtuvo en el cálculo cuántico. Y también nótese que la energía total final del sistema es menor en la conformación cis ($E_{\text{total-final CIS}} < E_{\text{total-final TRANS}}$).

Para el dipéptido Ser-Pro (Tabla 5), la mayor estabilización con el solvente se da en el sistema en cis ($\Delta H_{b\text{-final CIS}} > \Delta H_{b\text{-final TRANS}}$), a diferencia del caso Gly-Pro. Pero en este caso la energía del sistema aislado también es menor en la conformación cis ($E_{\text{sist-final CIS}} < E_{\text{sist-final TRANS}}$), a diferencia del resultado cuántico obtenido anteriormente. Debido a la escasa diferencia de energías entre las conformaciones cis y trans, la dinámica clásica a 300 K y la presencia del solvente permiten obtener resultados diferentes a los cuánticos. Pero debe tenerse en cuen-

ta que no está ocurriendo una transición de trans a cis (o a la inversa), sino que se trata de dos sistemas diferentes, uno siempre en trans y el otro siempre en

cis, cuyas energías finales comparamos. La energía final total del sistema es levemente menor en la conformación trans ($E_{\text{sist-final TRANS}} < E_{\text{sist-final CIS}}$), nuevamente diferente al caso anterior.

Tabla 5: Energías de los sistemas Gly-Pro (arriba izquierda), Ser-Pro (arriba derecha) y Ala-Pro (abajo) en sus estados iniciales y finales, y en sus conformaciones cis y trans.

Glicina-Prolina				Serina-Prolina			
Cis (Kcal/mol)		Trans (Kcal/mol)		Cis (Kcal/mol)		Trans (Kcal/mol)	
E	2557,71	E	2571,4	E	2823,69	E	2879,61
E _{total-inicial}	112,28	E _{total-inicial}	104,7	E _{total-inicial}	141,95	E _{total-inicial}	152,72
E _{sist-inicial}	2543,61	E _{sist-inicial}	2577,32	E _{sist-inicial}	2798,29	E _{sist-inicial}	2839,96
E _{agua-inicial}	78,18	E _{agua-inicial}	110,62	E _{agua-inicial}	116,55	E _{agua-inicial}	113,07
E _{b-inicial}	-3424,40	E _{b-inicial}	-3383,99	E _{b-inicial}	-3363,99	E _{b-inicial}	-3364,46
E _{total-final}	110,54	E _{total-final}	118,12	E _{total-final}	131,89	E _{total-final}	163,93
E _{sist-final}	-3334,43	E _{sist-final}	-3255,5	E _{sist-final}	-3257,78	E _{sist-final}	-3293,67
E _{agua-final}	200,51	E _{agua-final}	246,61	E _{agua-final}	238,1	E _{agua-final}	234,72
E _{b-final}		E _{b-final}		E _{b-final}		E _{b-final}	
Alanina-Prolina							
Cis (Kcal/mol)		Trans (Kcal/mol)		Cis (Kcal/mol)		Trans (Kcal/mol)	
E	2851,8	E	2707,16	E	2707,16	E	2707,16
E _{total-inicial}	147,5	E _{total-inicial}	151,22	E _{total-inicial}	151,22	E _{total-inicial}	151,22
E _{sist-inicial}	2782,96	E _{sist-inicial}	2646,75	E _{sist-inicial}	2646,75	E _{sist-inicial}	2646,75
E _{agua-inicial}	78,66	E _{agua-inicial}	90,81	E _{agua-inicial}	90,81	E _{agua-inicial}	90,81
E _{b-inicial}	-3388,39	E _{b-inicial}	-3309,8	E _{b-inicial}	-3309,8	E _{b-inicial}	-3309,8
E _{total-final}	147,96	E _{total-final}	144,44	E _{total-final}	144,44	E _{total-final}	144,44
E _{sist-final}	-3332,39	E _{sist-final}	-3252,86	E _{sist-final}	-3252,86	E _{sist-final}	-3252,86
E _{agua-final}	203,96	E _{agua-final}	201,38	E _{agua-final}	201,38	E _{agua-final}	201,38
E _{b-final}		E _{b-final}		E _{b-final}		E _{b-final}	

En el sistema Ala-Pro (Tabla 5), el sistema en la conformación cis posee una ganancia de energía levemente mayor por interacción con el solvente que el sistema en trans ($\Delta H_{\text{b-final CIS}} > \Delta H_{\text{b-final TRANS}}$), al igual que el caso Ser-Pro, y a la inversa del caso Gly-Pro. Con respecto a la energía del sistema aislado, en este caso, la energía del sistema en la conformación trans es menor que la de la conformación

cis ($E_{\text{sist-final TRANS}} < E_{\text{sist-final CIS}}$), nuevamente inverso al resultado cuántico y mereciendo la misma explicación que el caso Ser-Pro. Pero con respecto a la energía final total del sistema, ahora sucede lo mismo que para el caso Gly-Pro, la energía total final es menor en el sistema en cis ($E_{\text{sist-final CIS}} < E_{\text{sist-final TRANS}}$).

Figura 4: Gráficos de barras de todos los sistemas analizados en sus condiciones finales y en las conformaciones cis y trans. Se muestra la energía que posee el dipéptido aislado de las aguas pero manteniendo rígida su geometría.

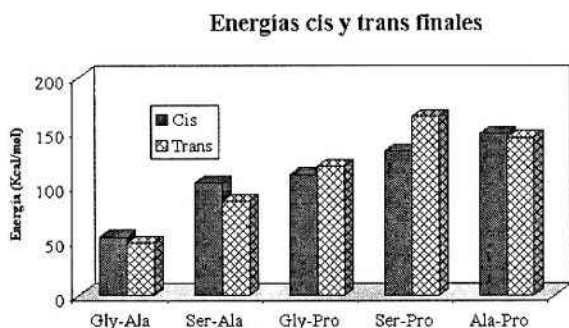
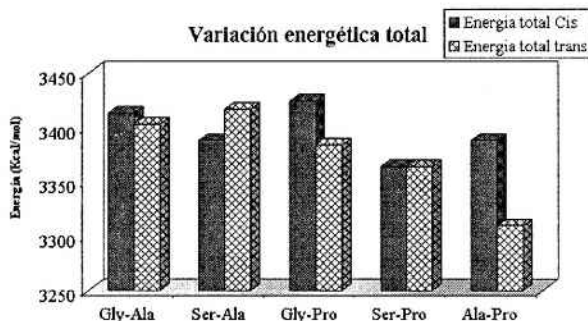


Figura 5: Gráfico de barras de las energías totales (dipéptido más moléculas de agua) de todos los sistemas analizados. Se grafica el módulo de la energía, por lo que las barras de mayor longitud son las que indican la menor energía.



Las figuras 4 y 5 resumen estos resultados. En la figura 4, se muestra un gráfico de barras de las energías de los dipéptidos aislados de las aguas en las condiciones finales, pero manteniendo rígidas sus geometrías, en las conformaciones cis y trans ($E_{\text{sisl-final}}$). En dicho gráfico se puede observar que para los sistemas X-Y analizados, siempre la energía del dipéptido en la conformación cis es mayor a la de la conformación trans. Mientras que para los dipéptidos X-Pro, se observa que en algunos casos (dipéptidos Ser-Pro y Gly-Pro) la energía de la conformación trans es mayor que la de la conformación cis. En el caso del dipéptido Ala-Pro, se obtuvo que las energías de las dos conformaciones son prácti-

camente iguales, siendo levemente mayor la de la conformación cis. Estos resultados confirman nuevamente que los dipéptidos X-Pro tienen mayor probabilidad de encontrarse en la conformación cis que los dipéptidos X-Y.

En la Figura 5 se muestra un gráfico de barras de las energías totales ($E_{\text{total-final}}$), para cada sistema en las dos conformaciones analizadas. En dicho gráfico se puede observar que la energía total del sistema no depende de la conformación del dipéptido. Por ejemplo, para el sistema Gly-Ala, la menor energía total se obtiene para el sistema en la conformación cis (Figura 5), a pesar de que la energía del dipéptido es menor en trans (Figura 4) y de que la ganancia

energética por interacción con el solvente sea mayor en trans. La disminución de la energía total es debida básicamente al acomodamiento de las aguas y formación de enlaces de hidrógeno. Realizando el mismo análisis para los otros sistemas, nos permite concluir que no hay una correlación entre la conformación y la energía total. Por lo tanto, nuestros resultados indican que, la presencia del solvente no favorece la estabilidad de una conformación particular con respecto a la otra.

Conclusiones

Los cálculos cuánticos implementados para dipéptidos X-Pro y X-Y permiten comprender la naturaleza de las interacciones que determinan por qué los dipéptidos X-Pro presentan sus enlaces peptídicos en conformación cis o trans, mientras los dipéptidos X-Y sólo lo presentan en la conformación trans.

Los análisis energéticos revelan que la energía total de los sistemas X-Pro es comparable en las conformaciones cis y trans, mientras que es manifiestamente menor en la conformación trans, para los dipéptidos X-Y. También se obtiene que a menor distancia del enlace peptídico menor será la energía del sistema.

Los análisis de las densidades de carga electrónica, y de distancias típicas entre carbonos, permiten comprender que son las repulsiones electrónicas y nucleares las responsables de las diferencias observadas. En los sistemas X-Y, se caracterizan por las repulsiones entre nubes electrónicas (no formando enlace) de los sitios de C_{α} en la conformación cis, estando éstas notablemente disminuidas en la conformación trans. Por el contrario, en los sistemas X-Pro, se tiene nuevamente la repulsión de nubes electrónicas ligadas a los sitios de C_{α} en la conformación cis, pero existe una repulsión comparable en trans, entre las nubes electrónicas ligadas a los C_{α} y C_{β} del anillo de prolina.

Estos resultados cuánticos no hacen más que confirmar la descripción clásica a través de repulsiones estéricas entre los átomos de carbono antes mencionados.

Se analizaron también sistemas de dipéptidos X-Pro y X-Y en medio acuoso a través de simulaciones de dinámica molecular clásica, a una tempera-

tura de 300 K, y donde el solvente fue explícitamente considerado.

Las estructuras finales obtenidas de la dinámica molecular fueron a su vez, optimizadas en geometría a fin de tener estructuras en mínimos locales de energía.

Los resultados obtenidos indican que las energías asociadas a los dipéptidos aislados para los sistemas X-Y, son menores en trans respecto de cis, mientras que para los sistemas X-Pro, se obtienen algunas estructuras mínimas en cis, pero también algunas otras en trans. En este aspecto, estos resultados concuerdan con los resultados cuánticos obtenidos en vacío.

Además, se obtiene que la estabilización en el medio acuoso es independiente de la conformación del sistema (cis o trans) y de que sea X-Y o X-Pro.

En definitiva, los resultados de los dipéptidos nos permiten inferir que el medio acuoso no parece favorecer a una conformación particular (sea cis o trans) frente a la otra.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos del proyecto CAI+D 19-131/02 de la UNL.

Referencias

1. Stewart, D. E.; Sarkar, A. y Wampler, J. E., 1990. The occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biology*, **214**, 253-260.
2. Benzi, C.; Improta, R.; Scalmani, G.; Barone, V. 2001. Quantum Mechanical Study of the Conformational Behavior of Proline and 4R-Hydroxyproline Dipeptide analogues in Vacuum and in Aqueous Solution. *J. Comp. Chem.*, **23**, 341-350.
3. Improta, R.; Benzi, C.; Barone, V., 2002. 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**, 12568-12577.
4. Baldoni, H. A.; Rodríguez, A. M.; Zamora, M. A.; Zamorabide, G. N.; Enriz, R.D.; Farkas, O.; Császár, P.; Torday, L. L.; Sosa, C. P.; Jákli, I.; Perzel, A.; Papp, J. G.; Hollosi, M. y Csizmadia, I. G., 1999. Peptide models XXIV: An ab initio study on N-formyl-L-prolinamide with trans peptide bond. The existence or non-existence of α_c and ϵ_c conformations. *J. Mol. Structure*, **465**, 79-91.

5. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W. y Kollman, P. A., 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5479-5197.
6. Jorgensen, W. L.; Chandreskhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.*, **79**, 926-935.