

# **Análisis teórico de polipéptidos relacionados con la hélice PII de poliglicina y poliprolina**

Herrera, F. E. 1; Sferco, S. J.<sup>1,2</sup>

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 diversos sistemas de polipéptidos representativos de la poliglicina y el colágeno (ambos relacionados entre sí por la estructura de la hélice PII). Los sistemas fueron analizados cuánticamente en vacío y a través de dinámica molecular clásica en medio acuoso. En vacío, la similitud de homopolipéptidos de glicina con la estructura PII, crece al aumentar el número de residuos y es inestable en medio acuoso. En cambio, los resultados de polipéptidos que guardan relación con el colágeno, permiten inferir que la estructura PII es estable tanto en vacío como en medio acuoso.

**Palabras claves:** colágeno – poliglicina – estructura PII.

**SUMMARY:** Theoretical analysis of polypeptides related with polyglycine and polyproline PII helix. Herrera, E.F.; Sferco, S.J.. Several systems of representative polypeptides of polyglycine and collagen were analyzed (both systems are related by the PII helix structure). The systems were analyzed in vacuum using quantum mechanics and through the classical molecular dynamics in aqueous solution. In vacuum, the similitude of glycine homopolypeptides with the PII structure increases when the number of residues grows and it is unstable in aqueous solution. On the other hand, the results from polypeptides that are related with collagen structure allow us to infer that the PII structure is stable in vacuum as well as in aqueous solution.

**Key words:** collagen – polyglycine – PII structure.

---

## **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 Tesina de Licenciatura en Biotecnología aprobada por F. E. Herrera en la U.N.L. en agosto de 2003.

\*Correspondencia a:

E-mail: herrera367@hotmail.com

Recibido: 08-06-04

Aceptado: 09-09-04

## Introducción

La poliglicina posee, cuando precipita de una solución, una estructura de hélice con giro hacia la izquierda o a la derecha, y es lo que se conoce como hélice de poliglicina II (hélice PII). Tiene tres residuos por vuelta y un paso de 9,4 Å. Se puede encontrar tanto en hélice con giro a la izquierda como con giro a la derecha debido a que la glicina es el único aminoácido no quiral. Un residuo de glicina en la estructura PII de poliglicina tiene un ángulo  $\phi$  de  $-79^\circ$  y un ángulo  $\psi$  de  $150^\circ$ , encontrándose todos los residuos en la conformación trans del ángulo  $\omega$  característico del enlace peptídico. (1)

La poliglicina es un homopolipéptido que posee una conformación que se toma como modelo de hélice en proteínas particulares. La poliprolina es otro homopolipéptido que curiosamente posee una conformación idéntica a la de la poliglicina; la hélice de poliprolina se conoce como hélice de poliprolina II (o hélice PII de poliprolina), que es siempre con giro a la izquierda.

El colágeno aparece en todos los animales multicelulares y es la proteína más abundante en los vertebrados. Es una proteína extracelular que se organiza en fibras insolubles muy fuertes. Es el componente mayor del tejido conectivo: huesos, dientes, cartílagos, tendones. (2)

Una molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, cada una con una secuencia similar que consiste en una repetición de un triplete de aminoácidos, de secuencia Gly-X-Y. En donde X es generalmente una prolina e Y es generalmente una hidroxiprolina.

Debido a que el colágeno posee una remarcable alta proporción de prolina y glicina en su secuencia de aminoácidos, es de esperarse que posea una estructura relativamente similar a las de las hélices PII de poliglicina y poliprolina (1).

Estudios de rayos X y de modelado molecular indican que las tres cadenas polipeptídicas del colágeno, que individualmente se parecen a la hélice de poliglicina II, están paralelas y giran una alrededor de la otra, dando lugar a una estructura de triple hélice con un leve giro a la derecha. Cada hebra individual tiene un giro de 3,3 residuos por vuelta y un paso de 10 Å (en contraste con la hélice de poliglicina II que tiene 3 residuos por vuelta y un

paso de 9,4 Å). La triple hélice del colágeno tiene 10 unidades Gly-X-Y por vuelta y un paso de 86,1 Å.

Se conocen pocos trabajos teóricos en los que se estudien cuánticamente sistemas como la poliglicina o el colágeno. La poliglicina se ha estudiado como sistema modelo de péptidos y proteínas, mediante el estudio en vacío de dipéptidos análogos de glicina y residuos de glicina con condiciones periódicas de contorno, de forma tal de simular una cadena infinita de poliglicina (3). Estos autores analizaron cuatro estructuras secundarias predeterminadas (hélices  $\alpha$  y  $3_{10}$ , y estructuras extendidas tipo  $\beta$  y vueltas  $\gamma$ ), pero sin incluir la estructura PII. Encuentran que la estructura de hélice  $\alpha$  es el conformero más estable. Con respecto al colágeno, existen trabajos que estudian sistemas de análogos de dipéptidos relacionados con el colágeno en vacío o en medio acuoso con solvente implícito (4, 5). Existe también un trabajo que estudia a un nivel cuántico un pentapéptido análogo y a un nivel clásico al sistema (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> en vacío o en medio acuoso con solvente implícito (6). En éstos trabajos, los autores focalizan su atención en cómo es afectada la estabilidad del colágeno cuando se consideran las diferentes conformaciones del anillo pirrolidínico de la prolina (C, en conformaciones "arriba" o "abajo"). También estudian cómo se afecta dicha estabilidad ante la presencia de diferentes sustituyentes en el C $\gamma$ . Para ello parten de la estructura PII (caracterizada solamente por los ángulos diedros de la cadena principal), y analizan energéticamente, efectuando optimizaciones de geometría, las diversas combinaciones de las conformaciones de las cadenas laterales de la prolina, así como las sustituciones en el mencionado C $\gamma$ . Sus resultados difieren dependiendo de si consideran los dipéptidos análogos o el pentapéptido. En particular, para los dipéptidos análogos, encuentran que la estructura PII no corresponde a un mínimo de energía. La inclusión de solvente (de forma implícita) no varía sus conclusiones, excepto en favorecer un poco más la estabilidad de la estructura PII. Sin embargo, todos estos autores no analizan la formación de las estructuras de poliglicina y colágeno considerando sucesivamente sus "bloques constitutivos": residuos, dipéptidos, tripéptidos, etc; ni evalúan en qué medida la estructura de estos "bloques constitutivos" difiere de las estructuras PII y del colágeno. Además, el solvente es agregado solo en forma implícita.

En este trabajo estudiamos diversos di, tri y tetrapéptidos, con la intención de ganar en la comprensión de elementos que contribuyen a la estabilidad de las estructuras PII de poliglicina y de la estructura del colágeno. Para ello se estudia a la poliglicina y a una hebra del colágeno tanto en vacío como en presencia de moléculas explícitas de agua. La poliglicina se estudió para tamaños de homopolipéptidos de glicina crecientes (2Gly, 3Gly y 4Gly), partiendo de estructuras cercanas a la estructura PII de la poliglicina y con la finalidad de: (i) analizar la Superficie de Energía Potencial (PES) alrededor de la estructura PII; y (ii) analizar la convergencia a la estructura PII en función del número de residuos del polipéptido. La hebra del colágeno se analizó a través de dipéptidos y tripéptidos: Gly-Pro, Pro-Pro, Gly-Pro-Pro y Gly-Pro-Gly, partiendo de estructuras cercanas al colágeno experimental, y también con la finalidad de: (i) analizar la PES alrededor de la estructura experimental; y (ii) efectuar una comparación entre la estructura de los di y tripéptidos considerados, con dicha estructura experimental.

## Objetivos

Analizar la rugosidad de la superficie de energía potencial cercana al mínimo esperado en la poliglicina (estructura PII) y el colágeno (estructura experimental).

Analizar la estructura de di, tri y tetrapéptidos relacionados con la estructura PII de poliglicina y poliprolina, a fin de comprender las estructuras experimentales relacionadas con los mismos.

## Metodología de cálculo

Estos estudios se realizaron en vacío a un nivel cuántico y en medio acuoso mediante dinámica molecular clásica.

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 los sistemas en medio acuoso se realizaron mediante simulaciones de Di-

námica Molecular clásica utilizando el campo de fuerzas AMBER. (7)

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 utilizan como estructuras iniciales a las estructuras finales obtenidas de la optimización de geometría cuántica en vacío.

2. A cada estructura se la coloca dentro de una caja con moléculas de agua y con condiciones periódicas de contorno. El agua dentro de la caja pertenece al modelo de agua TIP3P (8). El tamaño de la caja y por lo tanto, la cantidad de moléculas de agua consideradas, depende de cada sistema.

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

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 dipéptidos 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 con recocido simulado, cuyos detalles se indican en cada caso.

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.

7. Al último sistema final es al que se le realizan todos los análisis posteriores.

Los resultados se presentan gráficamente y a través del estudio sistemático de los ángulos diedros característicos de los sistemas. Todos los cálculos fueron llevados a cabo utilizando el software HyperChem versión 6.0.

## Desarrollo y resultados

- Poliglicina en vacío

En el esquema de cálculo utilizado para la poliglicina se analizaron los di, tri y tetrapéptidos de

glicina, todos con ángulos diedros iniciales  $\omega$ ,  $\phi$  y  $\psi$  iguales para cada sistema, y cuyos valores son:

$$\omega = 180^\circ; \phi = -60^\circ \text{ y } \psi = 180^\circ$$

debido a que se encuentran en una región cercana a la estructura de la poliglicina en el diagrama de Ramachandran correspondiente. Nótese que nuestra geometría inicial no es la hélice PII, sino una estructura cercana. Lo que se analizará es la posible formación y estabilización en vacío de la hélice de poliglicina, mediante una optimización de geometría y cuánto tiene que ver esta estructura optimizada con la PII. Si bien se sabe que la estructura de hélice PII de poliglicina es la que toma este polipéptido al precipitar de una solución, los resultados en vacío representan una posible primera aproximación para este sistema.

– *Gly-Gly*: Al optimizar la geometría inicial del sistema Gly-Gly ( $\psi = 180^\circ$ ,  $\omega = 180^\circ$ ,  $\phi = -60^\circ$ ), se obtiene que los ángulos diedros característicos  $\psi$ ,  $\omega$  y  $\phi$  toman todos valores muy cercanos a  $180^\circ$  (Tabla 1) perdiendo similitud con el sistema de partida y con la estructura de hélice de poliglicina II. Esto podría deberse a que, únicamente con solo dos residuos, no se puede estabilizar una hélice. La estructura más estable que puede adoptar un sistema con dos residuos es una estructura planar que se denomina todos trans (all trans), debido a que en esta conformación es cuando se obtiene una mayor separación entre todos los átomos, de forma de minimizar las interacciones repulsivas entre ellos; y fue una estructura planar la hallada al final de la optimización.

Tabla 1: Resumen de ángulos diedros obtenidos después de la minimización de geometrías de los di, tri y tetrapéptidos de glicina

	Sistema Inicial	Estructura PII	2 Gly Final	3 Gly Final	4 Gly Final
$\psi_1$	180°	150°	179,26°	-175,44°	-175,54°
$\omega$	180°	180°	-179,91°	172,23°	171,00°
$\phi_{1-2}$	-60°	-79°	-179,26°	-95,26°	-89,84°
$\psi_2$	180°	150°		176,93°	-174,48°
$\omega_2$	180°	180°		174,56°	170,88°
$\phi_{2-3}$	-60°	-79°		-80,60°	-73,09°
$\psi_3$	180°	150°			171,27°
$\omega_3$	180°	180°			176,11°
$\phi_{3-4}$	-60°	-79°			-81,30°

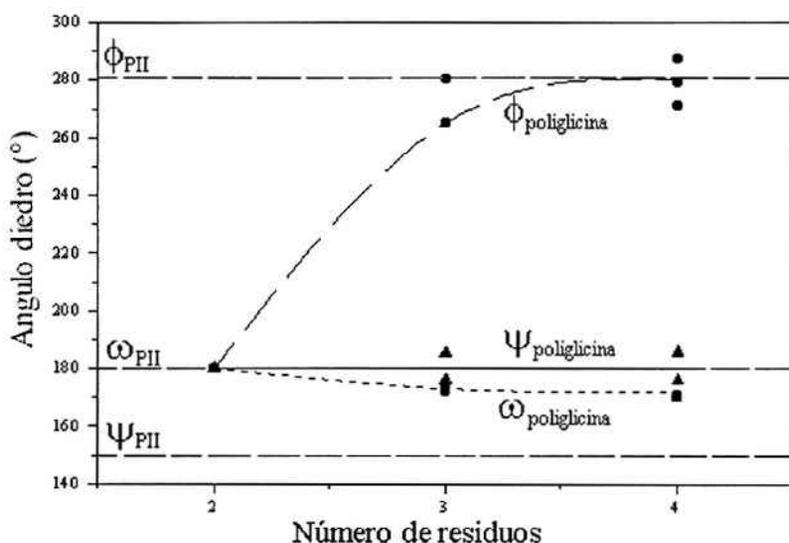
– *Gly-Gly-Gly*: En el caso del tripéptido de glicina, se observó que los ángulos diedros característicos no variaron tanto como en el caso anterior (Tabla 1). En este caso, a diferencia del dipéptido y como el sistema dispone de tres residuos, podemos definir seis ángulos diedros característicos; dos ángulos  $\psi$  y  $\omega$  que se mantuvieron cercanos a  $180^\circ$  como en la estructura de partida y dos ángulos  $\phi$  que variaron en,  $-20,6^\circ$  y  $-35,3^\circ$  respectivamente, también con respecto a la estructura de partida.

La estructura inicial tomada para este caso (al igual que para los demás), tiene la conformación de una hélice con giro hacia la izquierda. La estructura final obtenida después de la optimización de geometría fue también una hélice con giro hacia la izquierda, pero se observa que el giro de la conformación final es levemente menor con respecto al de la conformación inicial, obteniéndose que el sistema se acerca (estructuralmente) al sistema modelo de la hélice PII de poliglicina.

– *Gly-Gly-Gly-Gly*: En el sistema tetrapéptido de glicina se pueden definir tres ángulos  $\omega$ , tres ángulos  $\phi$  y tres ángulos  $\psi$ . Estos ángulos diedros tienen valores iniciales idénticos a los de las conformaciones iniciales del dipéptido y del tripéptido. como se dijo anteriormente, le confieren al sistema una conformación de hélice con giro a la izquierda.

Después de la optimización de geometría, se vuelve a obtener una estructura de hélice con un leve giro a la izquierda (Tabla 1). La conformación final tiene ángulos diedros muy similares a los de la hélice de poliglicina II: comparando con los sistemas anteriores, se puede observar que en este caso los ángulos diedros toman valores mucho más cercanos a los del sistema de poliglicina en su estructura PII.

**Figura 1:** Gráfica de los ángulos  $\omega$ ,  $\phi$  y  $\psi$  vs el número de residuos. Para facilitar la visualización de la evolución, los valores promedio de los ángulos en cada sistema son ajustados con una curva. Se pueden ver también los valores ideales de la estructura PII.



La figura 1, resume los resultados de la poliglicina en vacío. En ella se observan los ángulos  $\omega$ ,  $\phi$  y  $\psi$  vs el número de glicinas en el sistema. Para cada sistema se muestran todos los valores obtenidos de los ángulos diedros característicos y las curvas unen los promedios de cada sistema y de cada ángulo; los ángulos diedros de la estructura PII se incluyen como referencia. De la observación de dicha grafica, podemos afirmar que, la hélice a la que tiende el sistema a medida que se aumenta el número de residuos con las condiciones iniciales impuestas ( $\omega = 180^\circ$ ,  $\phi = -60^\circ$  y  $\psi = 180^\circ$ ) y después de la

optimización de geometría, es una hélice con giro izquierdo con valores de los ángulos diedros similares a los de la hélice de poliglicina II. Los valores de los ángulos de la hélice de poliglicina II son:  $\omega = 180^\circ$ ,  $\phi = -79^\circ$  y  $\psi = 150^\circ$ ; y los valores promedios obtenidos después del cálculo, para el tetrapéptido, son:  $\omega = 172^\circ$ ,  $\phi = -82^\circ$  y  $\psi = 180^\circ$ . Por lo que puede observarse que el ángulo  $\phi$  es prácticamente igual al sistema de la hélice de poliglicina II, el ángulo  $\omega$  también lo es aunque con una variación un poco mayor, pero el ángulo  $\psi$  que inicialmente era de  $180^\circ$ , mantiene en promedio ese valor. Esto podría deber-

se a la existencia de alguna barrera de potencial para que este ángulo pase del valor de  $180^\circ$  al de  $150^\circ$ , barrera no encontrada para los otros ángulos diedros. Como conclusión podemos decir que, para la geometría inicial considerada, aumentando el número de residuos de glicina obtenemos una estructura que converge a una estructura similar a la estructura de la poliglicina PII, siendo ésta una estructura estable aún en vacío.

#### Poliglicina en medio acuoso

En esta parte del trabajo analizamos el efecto del solvente sobre los sistemas de poliglicina, se-

gún el esquema de cálculo detallado en la sección correspondiente a la metodología.

El primer sistema analizado con respecto a la poliglicina fue el dipéptido de glicina en medio acuoso. Este sistema se colocó en una caja con condiciones periódicas de contorno cuyas dimensiones en Å son de  $21 \times 21 \times 25$ , y en la cual se colocaron 359 moléculas de agua más el dipéptido de glicina. La dinámica se realizó por 1400 ps, con 50 ps de calentamiento, 1000 ps a temperatura constante (300 K) y 350 ps de enfriamiento hasta los 0 K.

En este sistema se puede observar (Tabla 2), que los valores de los ángulos diedros característicos de la cadena principal no se acercan mucho a la estructura PII.

**Tabla 2:** Resumen de ángulos diedros obtenidos después de la dinámica molecular de los di, tri y tetrapéptidos de glicina.

	Estructura PII	2 Gly Final	3 Gly Final	4 Gly Final
$\psi_1$	$150^\circ$	$-124,20^\circ$	$59,24^\circ$	$-166,06^\circ$
$\omega_1$	$180^\circ$	$176,83^\circ$	$-166,23^\circ$	$-159,79^\circ$
$\phi_{1-2}$	$-79^\circ$	$-147,09^\circ$	$-141,65^\circ$	$89,75^\circ$
$\psi_2$	$150^\circ$		$-146,96^\circ$	$22,91^\circ$
$\omega_2$	$180^\circ$		$-158,83^\circ$	$176,50^\circ$
$\phi_{2-3}$	$-79^\circ$		$-63,62^\circ$	$-68,01^\circ$
$\psi_3$	$150^\circ$			$64,46^\circ$
$\omega_3$	$180^\circ$			$172,56^\circ$
$\phi_{3-4}$	$-79^\circ$			$-52,47^\circ$

Otro sistema analizado fue el tripéptido de glicina. Este sistema se colocó en una caja de  $21\text{Å} \times 21\text{Å} \times 23\text{Å}$ , junto con 321 moléculas de agua. Se simuló igual que el sistema anterior. El resultado obtenido para este tripéptido (Tabla 2) indica que este sistema, al igual que el anterior, adopta una conformación prácticamente diferente de la estructura PII.

El último sistema analizado fue el tetrapéptido de glicina. Este sistema se colocó en una caja de  $21\text{Å} \times 21\text{Å} \times 28\text{Å}$ , con 385 moléculas de agua. Y se simuló igual que el di y tripéptido. Los resultados se muestran en la Tabla 2, obteniéndose resultados similares a los anteriores. El sistema de tetrapéptido

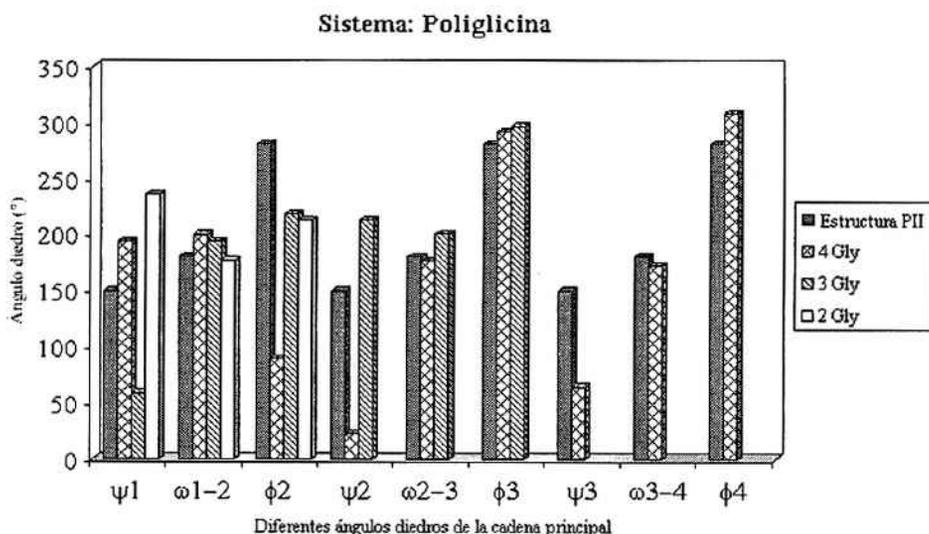
de glicina adopta una conformación diferente de la estructura PII.

La Figura 2 resume los resultados de la poliglicina en medio acuoso. En esta gráfica se puede observar como los únicos ángulos diedros que prácticamente se mantienen similares a los de la estructura PII son los ángulos  $\omega$  (sobre el enlace peptídico) y los ángulos  $\phi_3$  y  $\phi_4$ . Los valores sobre los ángulos  $\omega$  son esperables, debido a que el enlace peptídico tiene un cierto carácter de doble enlace, y por lo tanto, tiene menor variación conformacional que los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$ . Es esperable también que los ángulos no coincidan con los de la estructura PII

ideal debido a que el sistema de poliglicina adopta esa conformación cuando precipita de una solución.

Nuestros resultados indican que la estructura PII de la poliglicina en medio acuoso no es estable, tal como se obtiene experimentalmente.

**Figura 2:** Gráfico de barras de los ángulos diedros  $\omega$ ,  $\phi$  y  $\psi$  característicos de la cadena polipeptídica de todos los sistemas de poliglicinas analizados en medio acuoso. Se debe comparar a cada ángulo con el correspondiente en la estructura PII.



### Colágeno en vacío

Debido a que cada hebra del colágeno tiene una estructura parecida a la hélice de poliglicina II (estudiada anteriormente), se analiza en esta parte del trabajo una secuencia de cálculos cuánticos de pequeños sistemas que tengan alguna similitud con el colágeno, que nos den una primera aproximación del mismo. Los sistemas analizados son: los dipéptidos Gly-Pro y Pro-Pro; y los tripéptidos Gly-Pro-Pro y Gly-Pro-Gly, de forma que cada sistema pueda representar a algún enlace entre residuos de una hebra del colágeno. Todos estos sistemas fueron comparados a su vez con una estructura del colágeno obtenida por difracción de rayos X (extraída de la base de datos PDB (9)).

En esta parte del trabajo, mediante cálculos cuánticos en vacío, se analizará la posible formación y estabilización de una estructura similar a

la del colágeno hallada experimentalmente. Para ello, partiremos de estructuras que se encuentren cercanas a la región del colágeno, en el diagrama de Ramachandran correspondiente

$$\omega \cong 180^\circ; \phi \cong -60^\circ \text{ y } \psi \cong 180^\circ$$

realizándoles optimizaciones cuánticas de geometría, a fin de explorar la "rugosidad" de la PES en la vecindad de la estructura experimental.

La Tabla 3 resume los resultados de los ángulos diedros de los distintos sistemas estudiados, comparándolos entre sí y con el resultado experimental.

*-Colágeno experimental:* Analizando la secuencia Gly-Pro-Pro-Gly de una hebra tomada al azar del colágeno experimental se obtiene que, el ángulo w

es prácticamente plano, con una variación mínima que ronda los  $2^\circ$ , y cuyo promedio es  $178,96^\circ$  (valor promedio ideal:  $\omega = 180^\circ$ ). El ángulo  $\phi$  tiene una variación superior, del orden de los  $18^\circ$ , con un valor promedio de  $-72,34^\circ$  (valor promedio ideal:  $\phi = -51^\circ$ ). Y el ángulo  $\psi$  tiene una variación del orden de los  $20^\circ$ , con un valor promedio de  $162,32^\circ$  (valor promedio ideal:  $\psi = 153^\circ$ ). Los valores medios experimentales para esta porción de la hebra del colágeno, guardan similitud con los de la estructura PII de poliglicina y poliprolina.

- *Gly-Pro*: después de la optimización de geometría de este sistema se obtuvo un sistema similar

al experimental, en el que los valores de los ángulos  $\omega$  y  $\psi$  no mostraron una gran variación y el ángulo  $\phi$  fue el que tuvo una variación mayor (Tabla 3). Comparando este sistema con los sistemas estudiados para la poliglicina, en particular comparándolo con el dipéptido de glicina, se puede observar que en este caso no se produce la planaridad de la molécula entera, y que el ángulo  $\phi$  ya en este sistema toma un valor que se acerca más al correspondiente promedio en el colágeno experimental. El ángulo  $\phi$  toma un valor de  $-98,6^\circ$ , siendo el del colágeno aproximadamente de  $-72,34^\circ$ . El sistema Gly-Gly en cambio, se apartaba notoriamente de la estructura PII de referencia.

**Tabla 3:** Resumen de los valores de los ángulos diedros característicos de los distintos sistemas cuánticamente optimizados y de la estructura obtenida experimentalmente.

	Colágeno PDB	Gly-Pro	Pro-Pro	Gly-Pro-Pro	Gly-Pro-Gly
$\psi$ Gly1	174,77°	-175,85°		171,06°	176,65°
$\omega$ Gly1-Pro2	-179,68°	-170,51°		175,83°	176,48°
$\phi$ Pro2	-78,71°	-98,66°		-71,30°	-79,93°
$\psi$ Pro2	167,03°		173,80°	161,09°	
$\omega$ Pro2-Pro3	178,59°		-175,21°	166,92°	
$\phi$ Pro3	-60,51°		-92,86°	-72,63°	
$\psi$ Pro3	154,15°				169,48°
$\omega$ Pro3-Gly4	177,97°				165,54°
$\phi$ Gly4	-77,80°				-71,23°

- *Pro-Pro*: después de una optimización cuántica de geometría de este sistema (Tabla 3) se puede observar que también hubo pequeñas variaciones en los ángulos diedros característicos como en el caso anterior. En este caso, y a diferencia del anterior, el ángulo  $\psi$  se acercó más al valor promedio del colágeno. La variación del ángulo  $\phi$  es similar al sistema anterior aunque un poco más pronunciada hacia la estructura del colágeno. Y el ángulo  $\omega$  mantuvo más su planaridad. Estos resultados sugieren que este sistema posee una mayor estabilidad

estructural que el sistema Gly-Pro. Esto se pone de manifiesto ya que, por un lado el enlace peptídico mantiene mejor su planaridad, y por otro se observa que este sistema (Pro-Pro) se aproxima a la estructura de la hélice de poliprolina II ( $\psi = 150^\circ$ ,  $\omega = 180^\circ$ ,  $\phi = -79^\circ$ ).

- *Gly-Pro-Pro*: es la secuencia que se repite "n" veces en la estructura del colágeno, y posee además los dos enlaces peptídicos antes estudiados, el enlace entre una glicina y una prolina y el enlace

entre dos prolina. Después de la optimización cuántica de geometría, los resultados para este sistema (Tabla 3) indican una similitud muy grande con la estructura del colágeno. Los valores que toman los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  en la estructura final, entran dentro de los valores obtenidos en la estructura experimental.

- *Gly-Pro-Gly*: Este sistema intenta simular al enlace peptídico entre una glicina y una prolina (estudiado también en los sistemas Gly-Pro y Gly-Pro-Pro) y al enlace peptídico entre una prolina y una glicina. Ambos enlaces están presentes en el colágeno. Los resultados de la optimización cuántica para este sistema indican una estructura muy parecida a la estructura de la hebra de colágeno obtenida experimentalmente (Tabla 3). Esto se pone de manifiesto al observar los datos estructurales; los ángulos diedros característicos están dentro del rango de amplitud observado experimentalmente.

En definitiva, comparando los resultados de los ángulos diedros característicos de los distintos sistemas estudiados, comparándolos entre sí y con el resultado experimental, se puede observar que los dos sistemas de tripéptidos (Gly-Pro-Pro y Gly-Pro-Gly) tienen estructuras similares a la del colágeno. Se puede observar que a medida que se aumenta el número de residuos en el sistema a analizar éste se acerca más a la estructura obtenida experimentalmente. Además, dado que las estructuras iniciales eran parecidas a la estructura del colágeno experimental, concluimos que esta estructura sería estable aún en vacío.

### Colágeno en medio acuoso

Los distintos polipéptidos fueron analizados también en presencia de solvente acuoso, a través de dinámica molecular clásica, siguiendo un esquema de cálculo, idéntico al utilizado para los polipéptidos de poliglicina.

El primer sistema analizado con respecto al sistema del colágeno fue el dipéptido Gly-Pro. Este sistema se colocó en una caja cúbica de 18,70 Å de longitud en cada lado, junto con 215 moléculas de agua. Y se realizó una simulación igual a la de los sistemas de poliglicinas. Los resultados de este dipéptido se muestran en la Tabla 4. En dicha tabla se puede observar que los ángulos diedros de la cadena principal obtenidos para este dipéptido no son muy similares a los del sistema de referencia obtenido experimentalmente.

El segundo sistema analizado fue el dipéptido Pro-Pro. Este sistema se colocó en una caja cúbica de 18,7 Å de longitud por cada lado, junto con 215 moléculas de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se puede observar que, a diferencia del sistema anterior, los ángulos diedros obtenidos se parecen mucho más a los obtenidos experimentalmente para el colágeno.

El tercer sistema analizado es el tripéptido Gly-Pro-Pro. Fue colocado en una caja cúbica de 19,4 Å de longitud por cada lado, junto con 242 moléculas de agua. Los valores de los ángulos diedros obtenidos se muestran en la Tabla 4. En este sistema se obtuvo que la mayor diferencia con respecto a los ángulos hallados experimentalmente se da en el primer ángulo diedro ( $\psi_{Gly1}$ ) mientras que en los otros si bien no exactamente iguales, se puede observar que tienden a valores similares (son valores cercanos en el diagrama de Ramachandran).

El último sistema analizado con relación al sistema del colágeno fue el tripéptido Gly-Pro-Gly, para el cual se utilizó una caja cúbica de 20,5 Å de lado, junto con 284 moléculas de agua. Los resultados obtenidos para este sistema después de la dinámica molecular se muestran en la Tabla 4. Se puede observar que este sistema fue el que resultó con ángulos diedros más parecidos a los del colágeno del PDB.

**Tabla 4:** Resumen de los valores de la amplitud de los ángulos diedros característicos de los distintos sistemas después del esquema de cálculo de la dinámica y de la estructura obtenida experimentalmente.

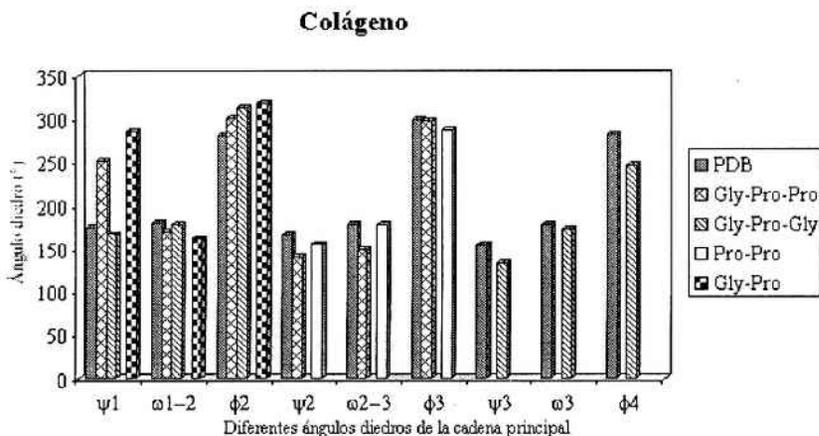
	Colágeno PDB	Gly-Pro	Pro-Pro	Gly-Pro-Pro	Gly-Pro-Gly
$\Psi_{\text{Gly1}}$	174,77°	-73,25°		-107,77°	167,241°
( $\tau$ ) $\phi_{\text{Gly1-Pro2}}$	-179,68°	162,33°		169,87°	177,98°
$\phi_{\text{Pro2}}$	-78,71°	-40,87°		-58,458°	-45,86°
$\Psi_{\text{Pro2}}$	167,03°		155,35°	140,45°	
( $\tau$ ) $\phi_{\text{Pro2-Pro3}}$	178,59°		179,00°	149,15°	
$\phi_{\text{Pro3}}$	-60,51°		-71,72°	-61,56°	
$\Psi_{\text{Pro3}}$	154,15°				133,99°
( $\tau$ ) $\phi_{\text{Pro3-Gly4}}$	177,97°				173,78°
$\phi_{\text{Gly4}}$	-77,80°				-113,09°

La Figura 3 agrupa los resultados obtenidos en la simulación con solvente explícito de polipéptidos relacionados con el colágeno. En dicha gráfica se observa la similitud que tienen los sistemas analizados con respecto al colágeno obtenido experimentalmente, sobre todo en los ángulos del extremo C-terminal. La mayor variación se observa en el ángulo  $\psi_1$  (que corresponde al  $\psi_{\text{Gly1}}$ ) mientras que a medida que avanzamos desde el N-terminal al C-terminal los ángulos se van pareciendo cada vez más a los del colágeno.

En definitiva se puede observar que, a diferencia del sistema de poliglicinas en medio acuoso, para el sistema del colágeno, se pudo obtener una estructura muy similar a la obtenida experimental-

mente. Ya que la estructura experimental es la obtenida a partir de soluciones acuosas cristalizadas, sería esperable que una buena simulación teórica diera resultados aproximados a esta estructura. Exactamente ésta es la tendencia que muestran nuestros resultados luego de la simulación. Sin embargo, debemos recordar que cuando calculamos cuánticamente la estructura del colágeno en vacío ya encontramos una evidencia significativa de la estabilidad de la estructura experimental. Si bien estos cálculos son de dinámica molecular clásica, tenemos nuevamente evidencia de la estabilidad de la estructura experimental. Nuestros resultados nos permiten inferir que las interacciones con el solvente contribuyen adicionalmente a una estabilidad ya básicamente lograda en vacío.

**Figura 3:** Gráfico de barras de los distintos valores de los ángulos diedros  $\omega$ ,  $\phi$  y  $\psi$  característicos de la cadena polipeptídica de todos los sistemas de colágeno analizados en medio acuoso. Cada ángulo debe compararse con el correspondiente en la estructura del PDB.



## Conclusiones

Se analizaron cuánticamente distintos sistemas de homopolipéptidos de glicina (di, tri y tetrapéptidos), con estructuras de partida cercanas a la hélice PII de poliglicina, y a los que se les efectuaron optimizaciones de geometría. En el dipéptido se halló una estructura totalmente planar. Para el tripéptido la estructura que adopta es aproximada a la de la hélice PII de poliglicina. Mientras que el tetrapéptido adopta una estructura mucho más similar a la hélice PII de poliglicina, que los dos sistemas anteriores. Se encontró por lo tanto que, a medida que se aumenta el número de residuos, el sistema se acerca en su geometría a la estructura de la hélice PII de poliglicina.

Teniendo en cuenta la geometría inicial, luego de la optimización cuántica, se encontró clara evidencia de una barrera de potencial para el ángulo diedro y, mientras que los otros ángulos diedros, en cambio, convergen a los valores de la estructura PII.

En el análisis de los polipéptidos mediante dinámica molecular clásica se obtuvo que la estructura PII de poliglicina no es estable en soluciones acuosas, tal como lo indican los resultados experimenta-

les, dado que la estructura PII es la que toma la poliglicina al precipitar de una solución.

Para analizar el sistema del colágeno, se estudiaron cuatro sistemas diferentes: Gly-Pro, Pro-Pro, Gly-Pro-Pro y Gly-Pro-Gly. El sistema Gly-Pro se analizó para representar al enlace entre la glicina y la prolina en la estructura del colágeno, obteniéndose luego de la optimización de geometría un sistema en donde las distancias de enlace y los ángulos diedros característicos de la cadena principal poseían valores similares a los de la estructura del colágeno obtenida por difracción de rayos X. El sistema Pro-Pro, se estudió para simular al enlace entre dos prolinas en la estructura del colágeno, obteniéndose, igual que para el sistema Gly-Pro, que sus ángulos diedros y distancias de enlaces eran parecidas a las del colágeno. En el análisis de los dos tripéptidos, el tripéptido Gly-Pro-Pro representa la unidad que se repite en el colágeno, y el tripéptido Gly-Pro-Gly, simula a los enlaces Gly-Pro y Pro-Gly del colágeno. Para ambos tripéptidos, la estructura obtenida después de la optimización de geometría fue prácticamente idéntica a la del colágeno.

Extrapolando estos resultados podemos inferir que, por lo menos para estos sistemas analizados (poliglicina y colágeno), a medida que se aumenta la

cantidad de residuos, se obtendrán resultados que se aproximen mejor a las estructuras PII y del colágeno experimental, respectivamente, aún realizando cálculos en vacío (y por supuesto al nivel de teoría HF 3-21G y con la estructura inicial considerada).

Nuestros resultados nos indican que la PES del colágeno, no evidenciaría una gran "rugosidad" cercana al mínimo de esta estructura. Partiendo de una zona del mapa de Ramachandran cercana al mínimo, no encontramos barreras de potencial entre las geometrías de partida y la estructura experimental del colágeno.

En el análisis del colágeno en medio acuoso, se obtuvo evidencia de la tendencia que tienen los sistemas estudiados de estabilizarse en medio acuoso con una estructura similar a la del colágeno experimental.

Nótese que obtenemos evidencia de la estabilización de la estructura del colágeno, aún en vacío. Esto podría indicar que las interacciones intra-hebra serían las determinantes en la estabilización de la estructura del colágeno, y que las interacciones entre hebras y entre éstas y el solvente, solamente producirían una estabilización adicional a la estructura.

## Agradecimientos

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

## Bibliografía

1. Voet, D. y Voet, J. G. 1995. "Biochemistry, Second Edition". John Wiley
2. Branden, C y Tooze, J. 1999. "Introduction to Protein Structure". Garland Publishing, Inc.
3. Improta, R.; Barone, V.; Kudin, K. N. y Scuseria, G. 2001. "Structure and Conformational Behavior of Biopolymers by Density Functional Calculations Employing Periodic Boundary Conditions. I. The Case of Polyglycine, Polyalanine, and Poly- $\alpha$ -aminoisobutyric Acid in Vacuo". *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3311-3322.
4. Improta, R.; Benzi, C.; 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**, 12568-12577.
5. 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.
6. Improta, R.; Mele, F.; Crescenzi, O.; Benzi, C.; Barone, V. 2002. "Understanding the Role of Stereoelectronic Effects in Determining Collagen Stability. 2. A Quantum Mechanical/Molecular Mecanical study of (Proline-Proline-Glycine) Polypeptides". *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7857-7865.
7. 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.
8. 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.
9. PDB: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).