

## О НЕПЛАНАРНОСТИ O=C-N-H ГРУППЫ В ОДИНОЧНЫХ АМИДАХ И ДИПЕПТИДАХ L-АМИНОКИСЛОТ

Самченко А. А., Кондратьев М. С., Кабанов А. В.,  
Комаров В. М.

(Россия, Пушино)

*В работе на базе неэмпирических MP2 и PM3 полуэмпирических квантово-химических расчетов обсуждается важная роль бистабильности непланарного фрагмента O=C-N-H в организации формы простейших амидов и дипептидов L-аминокислот. Показано влияние природы бокового радикала на характер структурного полиморфизма пептидной группы.*

**Введение.** Механизм фолдинга белка остается одной из наиболее сложных проблем молекулярной биологии и биофизики. Существуют разные варианты теории сворачивания полипептидных цепей. Однако даже для такой важной формы вторичной структуры глобулярного белка, как  $\alpha$ -спираль, несмотря на более чем полувекую историю ее установления, нет ясного физического представления об истоках ее «закрутки».

Вместе с тем все больше и больше заставляют обратить на себя внимание данные, указывающие, что исходный, главный элемент полипептидной цепи — фрагмент **O=C-N-H** — любого природного белка практически всегда оказывается реализующимся не в общепринятой, постулированной планарной форме [1], а в форме со стабильными и весьма значительными торсионными искажениями [2–4]. Поэтому, на наш взгляд, одним из важнейших моментов в установлении механизма сворачивания белков является решение вопроса о степени исходной торсионной лабильности самой пептидной группы. Целью данной работы является теоретическое обоснование идеи о внутренней первопричине появ-

ления неплоского характера O=C-N-H фрагмента в структуре оди-  
ночных амидов и дипептидов L-аминокислот.

**Методы и подходы.** Для решения данной задачи в работе были выполнены сравнительные квантово-химические неэмпирические HF, MP2-расчеты (в разных вариантах наборов базисных функций, вплоть до 6-311++G\*\*) и полуэмпирические PM3-расчеты различных простейших амидов и пептидов. В соответствии с экспериментальными данными анализировались основные структурные и термодинамические особенности газофазных молекул производных формамида (*метилформамида, диметилформамида, ацетамида, метилацетамида, диметилацетамида, вилиламина*) и дипептидов разной природы из 20 L-аминокислот. Рассматривалось влияние химического замещения в становлении неплоской формы пептидного O=C-N-H фрагмента в формамиде. Изучалась зависимость степени непланарности пептидной группы от природы боковых аминокислотных остатков в структуре дипептида.

**Результаты и обсуждение.** Накопленные к настоящему времени литературные данные указывают на существование вполне определенных торсионных «напряжений» плоских пептидных групп в структуре различных видов синтетических и природных полипептидов. Наиболее значимые проявления таких напряжений могут быть сведены к следующему:

а) нелинейность геометрии водородного связывания пептидных групп в структуре белков (рис. 1 а) [5];

б) несоответствие радиусов кривизны идеализированных моделей  $\alpha$ -спиралей с исходно жесткой плоской геометрией пептидных групп и реальных структур  $\alpha$ -спиралей (рис. 1 б) [6];

в) широкий, колоколообразный вид распределения угла «непланарности»  $\omega$  пептидных групп в реальных белковых структурах (рис. 1 в) [2,3].

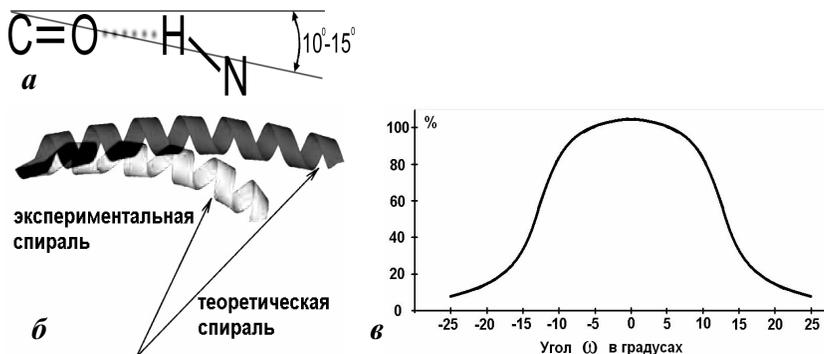
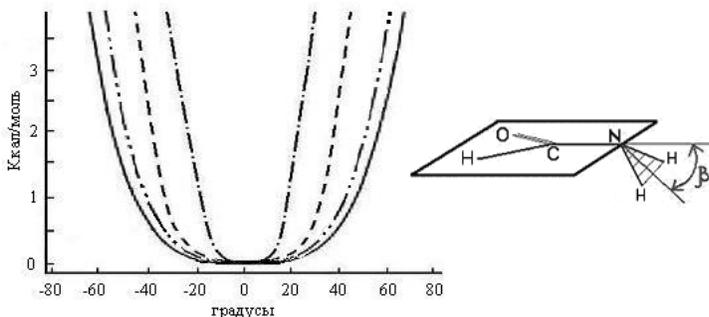


Рис. 1.

На основе только этих факторов можно сделать заключение о наличии достаточно высокой стабильности стремления пептидного фрагмента  $O=C-N-H$  иметь неплоскую геометрию при организации вторичной структуры олигопептидного остова. В свое время Рамачандраном [Biopolymers. 1968, 6, 1494–1496] уже обращалось внимание на необходимость более тщательного анализа вопроса о возможной непланарности строения пептидной группы, по крайней мере, для случая структуры циклических пептидов. Указывалось на важность учёта пирамидализации ( $sp^3$ -гибридизации) валентных связей атома азота пептидной группы для правильного описания структуры данного типа пептидных образований.

Есть и другие, более веские основания считать, что пептидная (а фактически – исходно амидная) группа сама по себе должна обладать скрытой, потенциальной непланарностью своей геометрии, независимо от того, включается ли эта группа в состав пептида или же она является просто одним из представителей молекул класса аминов. Как известно [7,8], в простейших молекулах алифатических, ненасыщенных или ароматических аминов всегда реализуется неплоское строение их  $C-NH_2$  группы. Для изолированных структур наблюдается пирамидализация геометрии валентных связей при атоме азота за счет предпочтительности его  $sp^3$ -гибридного валентного состояния над  $sp^2$ -гибридным со-

стоянием. Хотя энергетика такой предпочтительности непланарной геометрии над планарной не так велика, порядка  $\sim 1$  ккал/моль [9,10], она тем не менее стабильна и достаточно четко фиксируется в соответствующих микроволновых спектроскопических экспериментах [10,11].



**Рис. 2.** График изменения полной энергии формамида в зависимости от угла  $\beta$ , наклона плоскости  $\text{NH}_2$  относительно плоскости молекулы (— — спектроскопические данные [R.D.Brawn et al 1987, J.Mol. Spectrosc.]; — · — ab initio MP2/6-31G\* расчет [K.W.Wiberg, P.R.Rablen, 1995, J.Am.Chem.Soc.]; — — — полумпирический PM3 расчет [наши результаты]; — · · — MP2/6-311G\*\* расчет [наши результаты])

Ранее нами [7,12,13] исходя из результатов простейших квантово-химических расчетов уже оценивалась возможность реализации неплоской геометрии  $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$  фрагмента в структуре молекулы формамида — родоначальника пептидов. До сих пор многие считают (постулируют), что эта изолированная молекула имеет жесткую плоскую структуру вследствие наличия двух стабилизирующих факторов: резонанса ионных и ковалентных структур в системе  $\pi$ -связей. Однако прецизионные микроволновые данные говорят о планарности только в среднем ее геометрии [14]. Это специфика данного амина, и она скорее исключение, чем правило. Поэтому, прежде чем обсуждать основной вопрос о степени торсионной лабильности пептидной группы в структуре пептидов, мы вначале дадим квантово-химическое обоснова-

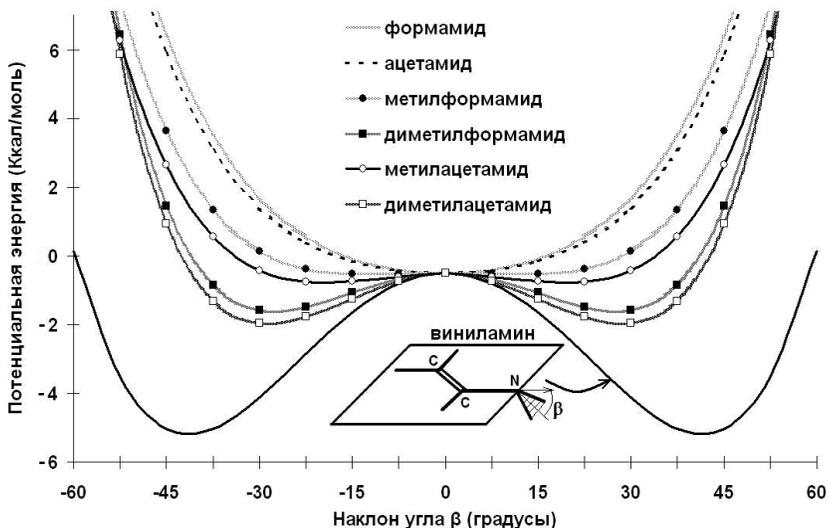
ние формирования устойчивой непланарности амидной группы в ряду замещенных формамида.

На рисунке 2 представлены наши и литературные данные зависимости полной энергии молекулы формамида от угла наклона плоскости  $\text{NH}_2$ -группы относительно плоскости  $\text{O}=\text{C}-\text{N}$  остова.

Как видно из рисунка, молекула формамида, а значит и пептидная группа, в изолированной фазе может рассматриваться только в среднем как «плоская» структура. По причине сильного кулоновского напряжения от взаимодействия 3-х неподеленных пар электронов в этом химическом образовании реализуется уникальная нестабильная ориентация N-H связей. Любой наклон от  $-40^\circ$  до  $+40^\circ$  плоскости NH связей фактически оказывается эквивалентным с организацией плоской структуры молекулы. При этом использование традиционных распространенных *ab initio* MP2/6-31G\* подходов на основе не столь широкого базисного набора атомных функций, хотя и с учетом корреляционных поправок, не совсем адекватно передает возникающую ситуацию. Только более строгие методы воспроизводят достаточно уверенно экспериментально наблюдаемую широкую амплитуду безбарьерной торсионной подвижки данной молекулы. При этом, как ни странно, полуэмпирический PM3-подход дает вполне удовлетворительное описание этого нетривиального эффекта. Что лишнее подчеркивает достаточно высокую надежность PM3-метода в анализе свойств молекул с высокой конформационной лабильностью.

Следовало ожидать, что усложнение химической структуры амида должно приводить, вообще говоря, к изменению исходных условий кулоновского влияния неподеленных пар и, как следствие, к снятию вырождения данной неустойчивости в равновесной структуре. Действительно, как показывает и эксперимент [7,9,11] и теория [7,9–11,15], с появлением в системе валентных связей формамида другого типа химических радикалов энергетика равновесной структуры молекулы за счет ослабления эффектов кулоновского отталкивания неподеленных пар электронов приобре-

тает явный сдвиг в сторону преимущества неплоской ориентации N-H (N-R) связей относительно остова молекулы. Замена в формамиде, например, водородов на метильные группы уже достаточно четко выявляет характерную для всех аминов пирамидальную бистабильность валентных связей в области аминокуппы (рисунок 3).

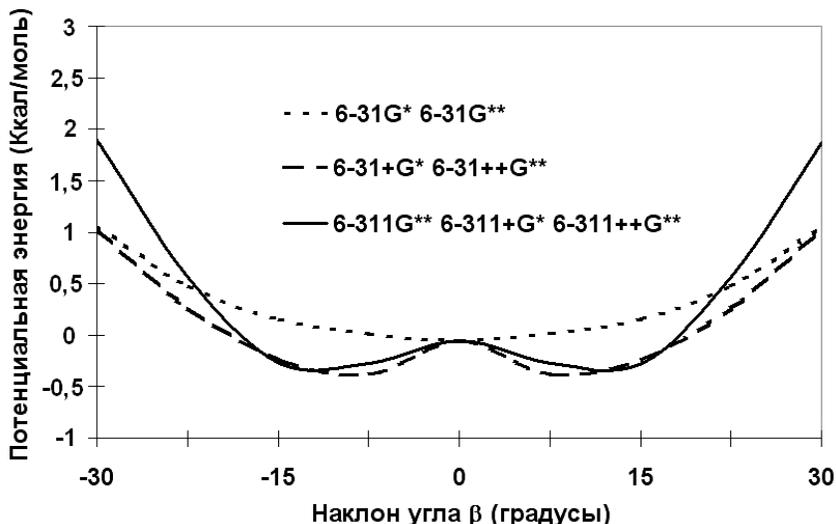


**Рис. 3.** PM3-рассчитанные профили поверхности полной энергии метилзамещенных формамида и молекулы виниламина,  $H_2C=CH-NH_2$ , как функции угла наклона  $\beta$

В случае молекулы N-метилацетамида – этого простейшего аналога пептидной группы в структуре природного полипептида, можно заметить, что с выигрышем энергии в 0,2 ккал/моль выделяются две устойчивые неплоские формы пептидного фрагмента  $O=C-N-H$  с наклоном вверх и вниз связей N-H(R) относительно плоскости остова. Для сравнения укажем на виниламин. Это  $\pi$ -электронный аналога формамида. Здесь отсутствуют две неподеленные пары электронов, нет сильных кулоновских

напряжений в электронной системе молекулы и потому бистабильность структуры в области аминогруппы выражается наиболее ярко.

Но если в РМЗ-приближении это обстоятельство, как мы показали, достаточно четко фиксируется, то в традиционных широко распространенных *ab initio* оценках с использованием стандартного не столь широкого базисного набора атомных функций, хотя и с учетом корреляционных вкладов, этот результат достигается не всегда. На рисунке 4, в качестве примера, приведены результаты выполненных нами MP2 сравнительных оптимизационных конформационных расчетов молекулы N-метилацетамида в разных вариантах наборов исходных базисных функций.



**Рис. 4.** MP2 рассчитанные профили поверхности N-метилацетамида как функции угла наклона  $\beta$  (угла наклона плоскости аминогруппы относительно плоскости O=C-N) в разных вариантах расширения базисных функций

Весьма четко видна зависимость получаемого результата в выигрыше энергетики неплоской структуры амида от вида ис-

пользуемого в расчете набора атомных базисных функций. Только в вариантах более совершенных базисных наборов с включением поляризационных и диффузных функций устойчиво воспроизводится должный эффект  $sp^3$ -гибридизации орбиталей атома азота аминогруппы и соответственно хорошо описывается предпочтительность неплоской геометрии амида над его плоской структурой.

Можно заключить, что в простейших соединениях с пептидной группой непланарность фрагмента  $O=C-N-H$  является его внутренним свойством. Возникающий выход из плоскости атома водорода оказывается не малым (наклон  $N-H$  связи к плоскости молекулы оказывается  $\sim 20^\circ$ ) и обусловлен эффектом  $sp^3$ -гибридизации валентных связей атома  $N$ .

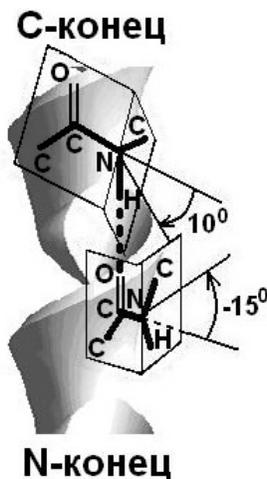
	<b>Ala</b>	<b>Glu</b>	<b>Asp</b>	<b>Gln</b>	<b>Asn</b>	<b>Ser</b>	<b>His</b>	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>
↑	-7.6	-10.2	-12.69	-11.74	-7.8	-6.32	-8.54	-12.41	-10.4
↓	9.81	13.361	13.4	14.861	5.673	4.828	7.806	13.205	8.858
	<b>Thr</b>	<b>Ile</b>	<b>Val</b>	<b>Leu</b>	<b>Met</b>	<b>Phe</b>	<b>Tyr</b>	<b>Cys</b>	<b>Trp</b>
↑	-5.6	-7.64	-8.23	-8.554	-13.33	-11.01	-15.6	-13.63	-10.1
↓	3.185	5.6234	6.3246	9.24	12.09	8.628	14.63	15.61	9.198

**Таблица 1.** РМЗ-рассчитанные углы выхода  $N-H$  связи пептидной группы из плоскости  $O=C-N$  молекулы дипептида (↑ —  $N-H$  над плоскостью, ↓ —  $N-H$  под плоскостью)

Аналогичные результаты с бистабильностью непланарности пептидной группы были получены нами и для случая структуры дипептидов разной природы. На поверхности их потенциальной энергии, рассчитанной с помощью полуэмпирического РМЗ-метода, также были выявлены по 2 устойчивых минимума, отвечающие над- и подплоскостному выходу атома водорода во фрагменте  $O=C-N-H$ . Причем глубины минимумов оказались уже асимметричными и зависящими от природы аминокислотного радикала в составе дипептида, т.е. от электронного строения бли-

жайшего окружения. В таблице 1 представлены некоторые из этих данных по дипептидам всех 20 L-аминокислот.

Видно, что элемент бистабильности равновесной структуры пептидной группы  $O=C-N-H$  в составе дипептида действительно сохраняется. Однако при этом у разных дипептидов достаточно явно проявляется предпочтительность к выходу «вверх» или «вниз» (под плоскость) атома водорода у пептидной группы. Поскольку N-H группа активный участник формирования межпептидного водородного связывания, то такая «непланарность» ориентации N-H связи пептидов может, вообще говоря, значительно влиять на стабильность той (типа  $\alpha$ -) или иной (типа  $\beta$ -) формы вторичной структуры заданной аминокислотной последовательности.



**Рис. 4.** Организация структурного полиморфизма пептидных групп в РМЗ-оптимизированной аланиновой  $\alpha$ -спирали из 7 остатков

В работе, в качестве примера, иллюстрирующего нетривиальный характер бистабильности пептидов в структуре коротких олигопептидов, были рассмотрены некоторые  $\alpha$ -спиральные последовательности, состоящие из 7 и более аминокислот одинако-

вой природы. На рисунке 4. приведена, в частности, РМЗ-рассчитанная структура 7-мерной аланиновой спирали.

На этом рисунке выделены участки с непланарными пептидными группами, на геометрии которых реализовалась наиболее энергетически выгодная конфигурация  $\alpha$ -спирали. Хорошо видно, что выход атома водорода из плоскости пептида в разных местах спирали реализуется по-разному. Это связано с особенностями электронной структуры аланинового пептида. Торсионная бистабильность его  $O=C-N-H$  фрагмента позволяет оптимально формировать устойчивую структуру  $\alpha$ -спирали.

В литературе уже неоднократно обсуждалась возможная предрасположенность тех или иных аминокислот к организации  $\alpha$ - или  $\beta$ -форм полипептидов. Однако первопричина этого явления остается до сих пор неясной. Вполне возможно, что дальнейший детальный анализ структурного полиморфизма пептидных групп в составе разных дипептидов поможет пролить свет на природу такой взаимосвязи.

### **Выводы.**

1. Показано, что, в отличие от общепринятого мнения, пептидная группа  $O=C-N-H$  всегда обладает скрытым, внутренним полиморфизмом неплоской структуры.
2. В коротких пептидах в зависимости от природы боковых остатков реализуется разная степень непланарности  $O=C-N-H$  фрагмента.
3. Структурный полиморфизм пептидной группы может играть важную роль в формировании  $\alpha$ - и  $\beta$ -подобных форм олигопептидов.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. // Proc.N.A.S. — 1951. — V. 37. — P. 205–211.
2. MacArthur, M. W.; Thornton, J.M. Deviations from planarity of the peptide bond in peptides and proteins. // J.Mol.Biol. — 1996. — V. 264. — P. 1180.
3. Carugo, O Incoherent relationship between torsion values and bonds

- lengths in atomic resolution protein crystal structures. // *Acta. Chim. Slov.* — 2003. — V. 50. — P. 505.
4. Sulzbach, H. M.; Schleyer, P.v.R.; Schaefer, III H.F. Influence of the non-planarity of the amide moiety on computed chemical shifts in peptide analogs. Is the amide nitrogen pyramidal? // *J.Am.Chem.Soc.* — 1995. — V.117. — P. 2632–2637.
  5. Alan G. Walton *Polypeptides and protein structure.* — Elsevier New York, 1981. — 393 c.
  6. Zagrovic, B.; Jayachandran, G.; Ian S. Millett, Doniach, S.; Vijay S. Pande, V.S. How Large is an  $\alpha$ -Helix? Studies of the Radii of Gyration of Helical Peptides by Small-angle X-ray Scattering and Molecular Dynamics. // *J.Mol.Biol.* — 2005. — V.353. — P.232–241
  7. Brown, R.D.; Godfrey, P.D.; Kleibömer, B. The inversion-torsion motion in vinylamine. // *J.mol.spectroscopy* 1987. — V. 124. — P. 21
  8. V.M.Komarov, R.V.Polozov, G.G.Konoplev Non-planar structure of nitrous bases and non-coplanarity of Watson-Crick pairs. // *J.theor. Biol.* 1992. — V.155. — P.281–294.
  9. Wong, M. W.; Wiberg, K.B. Structure of acetamide: planar or nonplanar? // *J.Phys.Chem.* — 1992. — V.96. — P.668–671.
  10. Jean, Y.; Demachy, I.; Lledos, A.; Maseras, F. Electronic against steric effects in distorted amides. // *J.Mol.Struct.(THEOCHEM)* 2003. — V.632. — P.131–144.
  11. Mack, H.-G.; Oberhammer, H. Planarity of N, N-dimethylacetamide, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NC(O)CH<sub>3</sub>. // *J.Am.Chem.Soc.* — 1997. — 119. 567.
  12. K.Ohba, T.Usami, Y.Kawashima, E.Hirota Fourier transform microwave spectra and ab initio calculation of N-ethylformamide // *J.Mol.Strc.* 2005. — V.744–747. — P.815–819.
  13. Комаров В.М., Полозов Р.В., Коноплёв Г.Г. Неплоское строение аминзамещённых азотистых оснований. РСМО конформационное исследование. // Препринт АН СССР НЦБИ институт биол. физики. Пущино, 1989.
  14. Комаров В.М. Некопланарное Н-связывание хугстеновских пар оснований. РСМО конформационные оценки. I. Аденин-аденин и аденин-тимин пары. // *Биофизика* отд. оттиск т.39, вып.5, 1994.
  15. Brown, R.D., Godfrey, P.D., Kleibomer, B. The conformation of formamide. *J.Mol.Spectroscopy* 1987, 124, 34–45.
  16. Noemi G.Mirkin, S.Krimm Structure of trans-N-methylacetamide: planar or non-planar symmetry? // *J.Mol.Stuct (Theochem)* 1995. V.334. P.1–6.

**ON THE NON-PLANARITY OF O=C-N-H GROUP IN  
SINGLE AMIDES AND DIPEPTIDES OF L-AMINOACIDS**

**Samchenko A. A., Kondratiev M. S., Kabanov A. V.,  
Komarov V. M.**

(Russia, Pushchino)

*By using ab initio MP2 and semi-empirical PM3 quantum-chemical calculations we discussed the non-planar structure bistability of O=C-N-H fragment in the form organization of simple amides and dipeptides. Influence of chemical substitution on structural polymorphism of the peptide group is shown.*