

# ESTRUCTURA MOLECULAR DEL DIPÈPTID L-Arg-L-Ser. AcH

N. VERDAGUER, I. FITA AND J. A. SUBIRANA

Departament d'Enginyeria Química. ETSEIB.  
Universitat Politècnica de Catalunya

## INTRODUCCIÓ

L'anàlisi per difracció de raigs X a alta resolució de cristalls d'aminoàcids i pèptids curts, dona una informació detallada molt útil en estudis conformacionals de proteïnes.

S'ha descrit en diferents treball que el grup guanidini de les cadenes laterals d'arginina té un paper important en la interacció i la funció de les proteïnes. A les proteïnes aquest grup interactua preferentment amb els grups carboxilat d'aspartats i glutamats i pot interactuar fortament amb els grups fosfat carregats i amb les bases de l'ADN.<sup>1,2</sup>

Aquest treball forma part d'un projecte que comprèn la determinació d'estructures de diferents pèptids amb residus bàsics<sup>3-9</sup> d'interès en estudis d'interacció ADN-nucleoproteïnes.

## EXPERIMENTAL

L'acetat de L-arginil-L-serina va cristal·litzar per difusió de vapor d'etanol a partir d'una solució del pèptid en 20% d'àcid acètic/aigua 1:3 i 80% etanol. Els cristalls obtinguts eren plaques rectangulars de dimensions 1x 0,4x 0,05 mm. Les dades de difracció es van recollir mitjançant un difractòmetre automàtic Enraf-Nonius CAD4 utilitzant radiació CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Els paràmetres de la cel·la unitaria es van determinar a partir de 25 reflexions independents ( $8 < \theta < 12$ ) i es mostren a la taula 1. Les intensitats es van mesurar a temperatura ambient utilitzant la tècnica  $\omega$ -scan. Durant la recollida de dades es van fer controls d'intensitat a partir de tres reflexions mesurats cada dues hores. Finalment es van aplicar a les dades les correccions de Lorentz, polarització i decaïment, per obtenir les

**Taula 1. Dades cristal·logràfiques.**

Fórmula molecular	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> / CH <sub>3</sub> COO / H <sub>2</sub> O
Pes molecular	251.4 Daltons
Grup espacial	P2 <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a	4.764 (3) Å
b	10.159 (7) Å
c	32.404 (13) Å
Z	4
Densitat calculada	1.25 g.cm <sup>-3</sup>
Nombre de reflexions observades	825 I > 5 σ (I)
R	0.091

amplituds dels factors d'estructura. A la taula 1 hi ha les principals dades cristal·logràfiques.

La determinació de l'estructura es va fer per mètodes directes utilitzant el programa MITHRIL,<sup>10</sup> seguidament es va refinar per mínims quadrats de matriu sencera amb el programa SHELX-76.<sup>11</sup> El mapa de diferències de Fourier (2Fo-Fc) va revelar l'existència d'un desordre en el cristall que afectava la cadena lateral d'arginina, i es posava de manifest per la presència de pics addicionals molt propers als àtoms d'aquesta cadena. Es van assignar dues posicions i es van afinar amb ocupacions parcials. La major part d'àtoms d'hidrogen no eren visibles en el mapa de diferències de Fourier i es van posicionar utilitzant consideracions geomètriques. Finalment es van realitzar afinaments anisotròpics dels àtoms diferents d'hidrogen i isotròpics dels hidrogens, que van convergir en un factor d'acord R = 0,091 per a 825 reflexos, I > 5 σ (I). Les alçades màxima i mínima dels pics romanents en el darrer mapa de diferències de Fourier van ser: 0,26 i -0,36 eÅ<sup>-3</sup>.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les coordenades atòmiques i els paràmetres tèrmics es poden veure a la taula 2. A la figura 1 hi ha la molècula de dipèptid amb la numeració dels àtoms. Les distàncies i els angles d'enllaç es presenten a la taula 3, i els principals angles conformacionals, a la taula 4.

### *Conformació de la cadena peptídica*

La geometria d'un dipèptid és definida per cinc angles de torsió<sup>12</sup>  $\psi_1$ ,  $\omega_2$ ,  $\phi_2$ ,  $\psi_2'$ ,  $\psi_2''$ . Quatre d'ells tenen valors quasi fixos  $\omega_2 = 180^\circ$  a causa de

Taula 2. Coordenades atòmiques fraccionaries amb les desviacions estàndard estimades entre parèntesis i paràmetres isotròpics equivalents (Å) BEQ.

Àtom	X / a	Y / b	Z / c	BEQ
N1	-0.3298 (26)	1.0410 (15)	0.3536 ( 4)	7.22
CA1	-0.2521 (27)	0.8955 (16)	0.3457 ( 5)	6.36
CB1	-0.3931 (89)	0.8264 (38)	0.3851 (15)	3.29
CB'1	-0.3384 (75)	0.7955 (35)	0.3782 (13)	1.25
CG1	-0.3732 (57)	0.6740 (33)	0.3770 (11)	6.74
CG'1	-0.2142 (89)	0.6620 (37)	0.3651 (15)	6.80
CD1	-0.0520 (90)	0.6399 (34)	0.3813 (25)	1.25
CD'1	-0.1922 (70)	0.5677 (32)	0.4037 (12)	4.82
NE1	-0.0036 (80)	0.5075 (42)	0.3793 (12)	8.20
NE'1	-0.0263 (92)	0.4617 (43)	0.3879 (14)	1.25
CE1	-0.0229 (90)	0.4250 (44)	0.4098 (17)	9.23
CE'1	0.0703 (92)	0.3703 (49)	0.4138 (10)	6.88
NZ1	-0.0989 (64)	0.4617 (28)	0.4487 ( 9)	5.44
NZ'1	0.0424 (79)	0.3900 (39)	0.4565 ( 9)	6.07
NZ2	0.0476 (98)	0.2925 (36)	0.4053 (14)	9.88
NZ'2	0.2535 (62)	0.2765 (29)	0.4022 (10)	7.92
C1	-0.3903 (27)	0.8570 (17)	0.3041 ( 5)	5.15
O1	-0.6383 (19)	0.8700 (12)	0.3006 ( 3)	7.89
N2	-0.2208 (21)	0.8092 (14)	0.2746 ( 4)	5.80
CA2	-0.3250 (26)	0.7783 (15)	0.2344 ( 5)	6.48
CB2	-0.3989 (36)	0.8969 (17)	0.2093 ( 5)	5.33
OG2	-0.1545 (28)	0.9737 (11)	0.2010 ( 3)	8.42
C2	-0.1197 (29)	0.6881 (15)	0.2125 ( 5)	4.15
O21	-0.1630 (21)	0.6711 (11)	0.1736 ( 4)	4.81
O22	0.0696 (20)	0.6303 (11)	0.3214 ( 3)	5.37
OW1	0.5000 ( 0)	0.0000 ( 0)	0.0000 ( 0)	9.77
OW2	0.6110 (37)	0.0752 (15)	0.4379 ( 4)	9.05
C1Ac	0.9279 (35)	0.3141 (19)	0.0118 ( 6)	1.25
C2Ac	0.9637 (81)	0.4284 (30)	-0.0177 (13)	13.98
O1Ac	1.1248 (42)	0.2351 (21)	0.0161 ( 6)	10.02
O2Ac	0.6964 (42)	0.2810 (29)	0.0231 (11)	14.73

les característiques de l'enllaç peptídic,  $\psi_1 = 180^\circ$  (bé que amb un ampli marge de variació, atribuïble a les forces d'empaquetament), finalment  $\psi'_2$  i  $\psi''_2$  que determinen l'orientació del grup carboxilat terminal es troben sempre amb un oxigen cis respecte al nitrogen peptídic  $\psi'_2 = 0^\circ$  i l'altre oxigen en trans  $\psi''_2 = 180^\circ$ . Aquests dos últims angles presenten, igual que en el cas anterior, un marge de variació força gran. Per tant, la conformació d'un dipèptid és determinada exclusivament per l'angle  $\phi_2$ . Aquest angle pot prendre valors entre  $-160^\circ$  i  $-60^\circ$  per a tots els dipèptids excepte quan

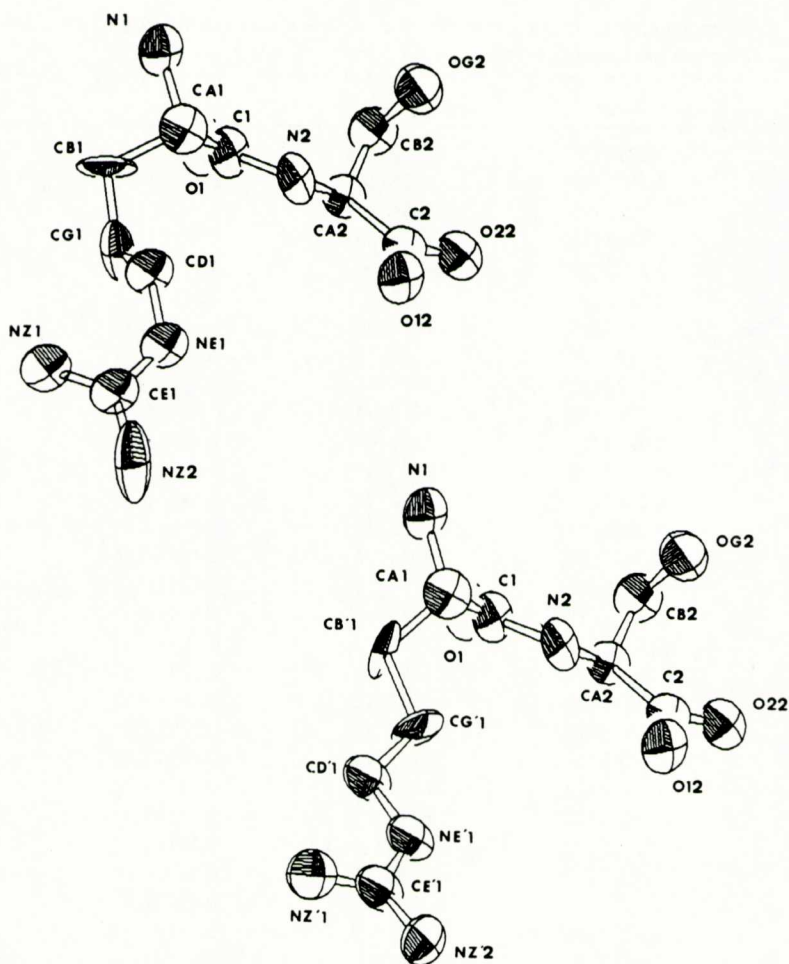


Figura 1. Conformació del dipèptid i numeració dels àtoms. Les dues conformacions de la cadena lateral de l'arginina es troben en el mateix cristall.

la glicina és el segon residu. Generalitzant podem considerar que un dipèptid té la cadena estesa quan  $\phi_2$  és entre  $120-180^\circ$  i plegada quan  $\phi_2$  és entre  $60-120^\circ$ .

El dipèptid Arg-Ser, amb un valor per  $\phi_2$  de  $-159,8^\circ$ , presenta per tant una cadena principal estirada. El valor de la resta d'angles dièdres de la cadena peptídica es troben dintre dels valors estàndard descrits per Suresh i Vijayan.<sup>12</sup> Vegeu la taula 4.

**Taula 3.** Distàncies d'enllaç (Å) i angles d'enllaç (°). Les desviacions estàndard s'indiquen entre parèntesis.

Cadena peptídica			
N1 – CA1	1.541 (18)	N1 – CA1 – C1	106.3 (1.2)
CA1 – C1	1.548 (19)	N1 – CA1 – CB1	100.8 (1.8)
CA1 – CB1	1.601 (37)	CB1 – CA1 – C1	113.7 (2.6)
CA1 – CB'1	1.516 (31)	N1 – CA1 – CB'1	117.4 (2.0)
C1 – O1	1.193 (15)	CA1 – C1 – O1	118.4 (1.4)
C1 – N2	1.341 (17)	CA1 – C1 – N2	116.8 (1.8)
N2 – CA2	1.429 (15)	O1 – C1 – N2	124.8 (1.6)
CA2 – CB2	1.493 (19)	C1 – N2 – CA2	121.1 (1.1)
CA2 – C2	1.516 (19)	N2 – CA2 – CB2	113.7 (1.3)
C2 – O12	1.285 (16)	C2 – CA2 – CB2	112.5 (1.3)
C2 – O22	1.240 (16)	CA2 – C2 – O12	115.8 (1.3)
		CA2 – C2 – O22	121.7 (1.4)
		O21 – C2 – O22	122.6 (1.5)
Cadena lateral arginina (A)			
CB1 – CG1	1.568 (37)	CA1 – CB1 – CG1	105.8 (2.7)
CG1 – CD1	1.579 (38)	CB1 – CG1 – CD1	105.1 (2.0)
CD1 – NE1	1.362 (37)	CG1 – CD1 – NE1	112.1 (3.7)
NE1 – CE1	1.336 (38)	CD1 – NE1 – CE1	115.6 (4.2)
CE1 – NZ1	1.374 (40)	NE1 – CE1 – NZ1	119.9 (3.3)
CE1 – NZ2	1.347 (39)	NE1 – CE1 – NZ2	122.8 (4.0)
		NZ1 – CE1 – NZ2	117.2 (3.6)
Cadena lateral arginina (B)			
CB'1 – CG'1	1.536 (38)	CA'1 – CB'1 – CG'1	107.0 (2.7)
CG'1 – CD'1	1.575 (37)	CB'1 – CG'1 – CD'1	109.9 (3.0)
CD'1 – NE'1	1.429 (38)	CG'1 – CD'1 – NE'1	102.0 (2.8)
NE'1 – CE'1	1.330 (36)	CD'1 – NE'1 – CE'1	119.4 (2.7)
CE'1 – NZ'1	1.401 (35)	NE'1 – CE'1 – NZ'1	119.1 (3.2)
CE'1 – NZ'2	1.345 (35)	NE'1 – CE'1 – NZ'2	122.8 (3.2)
		NZ'1 – CE'1 – NZ'2	115.9 (3.0)
Cadena lateral serina			
CB2 – OG2	1.428 (19)	CA2 – CB2 – OG2	108.5 (1.3)

### Conformació de la cadena lateral d'arginina

La conformació de la cadena lateral dels aminoàcids és determinada pels angles  $\chi$ . Estudis energètics fets per Benedetti i col·laboradors<sup>13</sup> pre-diuen que les conformacions més favorables per a la cadena lateral d'arginina són les esteses  $g^-$  o  $t$  ( $\chi^1$ ),  $t$  ( $\chi^2$ ),  $t$  ( $\chi^3$ ),  $t$  ( $\chi^4$ ). Vegem doncs què suc-

Taula 4. Angles conformacionals del dipèptid (°).

Cadena peptídica			
N1 - CA1 - C1 - N2	$\psi_1$	123.7	
CA1 - C1 - N2 - CA2	$\omega_2$	-176.5	
C1 - N2 - CA2 - C2	$\phi_2$	-159.8	
N2 - CA2 - C2 - O12	$\psi_2^1$	14.0	
N2 - CA2 - C2 - O22	$\psi_2^2$	167.2	
Cadena lateral arginina			
		A	B
N1 - CA1 - CB1 - CG1	$\chi^1$	-176.4	-174.5
CA1 - CB1 - CG1 - CD1	$\chi^2$	68.3	155.2
CB1 - CG1 - CD1 - CE1	$\chi^3$	175.8	-169.5
CG1 - CD1 - CE1 - NE1	$\chi^4$	-91.3	172.5

ceix en el nostre cas: ( $\chi^1$ ) a l'arginina pot adoptar tres valors  $g^-$ ,  $g^+$  i  $t$ , tots els quals s'han trobat en diferents estructures resoltes.<sup>3,4,14</sup> La variació en aquest angle, a diferència dels altres de la cadena lateral, no afecta la distància entre el grup guanidini i la cadena principal. Així pot variar l'orientació del grup guanidini mantenint-se allunyat dels grups peptídics; de fet aquest grup i la seva interacció amb altres molècules ha de determinar la conformació de la cadena lateral, que és bastant flexible. ( $\chi^2$ ) i ( $\chi^3$ ) de la cadena B presenten valors molt propers a 180, cosa que determina la màxima extensió de la cadena, i això implica una interacció C-C mínima i, per tant, energèticament més favorable. ( $\chi^2$ ) a la cadena A té un valor de 68,3°, és a dir, el CG és en posició  $g^+$  respecte al CA. Finalment ( $\chi^4$ ), que determina la posició del grup guanidini, és trans en el cas de la cadena B i  $g^-$  en el cas de la cadena A. La conformació de la cadena A seria en general energèticament menys favorable que la cadena B;<sup>13</sup> no obstant això, com veurem més endavant, queda més afavorida pel tipus d'empaquetament en el cristall.

### Empaquetament

La taula 5 descriu tots els enllaços d'hidrogen que forma aquest pèptid, i la figura 2 mostra les interaccions de la cadena lateral d'arginina amb la resta de molècules al cristall. A la cadena principal, cal destacar la presència de ponts d'hidrogen cap-cua, formats entre els grups amino terminal de l'arginina i el carboxilat terminal, i l'absència de ponts d'hidrogen entre grups peptídics. A la cadena lateral d'arginina, les interaccions dels

Taula 5. Distàncies d'enllaç (Å) i angles (°) dels ponts d'hidrogen.

D-H ..... A		D-A	H..... A	/ H \ D A
N1	-H ..... O22 (a)	3.149	2.111 (16)	120.9 (1.9)
N1	-H' ..... OW2 (b)	2.765	1.687 (17)	174.6 (0.8)
N1	-H'' ..... O21 (c)	2.837	1.849 (18)	138.4 (1.1)
NZ1	-H .... O1Ac (d)	2.997 <sup>a</sup>		
NZ1	-H' ..... OW1 (a)	2.543 <sup>a</sup>		
NZ'1	-H .... O1Ac (e)	2.539 <sup>a</sup>		
NZ'1	-H' ..... O2Ac (e)	3.032 <sup>a</sup>		
NZ2	-H ..... O21 (f)	2.887 <sup>a</sup>		
NZ2	-H' ..... OW2 (g)	3.210 <sup>a</sup>		
NZ'2	-H ..... O21 (f)	2.708 <sup>a</sup>		
NZ'2	-H ..... OW2 (g)	2.889 <sup>a</sup>		
NE1	-H ..... OG2 (a)	2.726 <sup>a</sup>		
OW1	-H ..... NZ'1 (a)	2.944 <sup>a</sup>		
OW1	-H .... O2Ac (g)	3.105 <sup>a</sup>		

Codi de simetria: (a)  $-x, y - 0.5, -z + 0.5$ ; (b)  $x + 1, y + 1, z$ ; (c)  $-x + 1, y - 0.5, -z + 0.5$ ; (d)  $-x + 1, y - 0.5, -z + 0.5$ ; (e)  $-x + 1, -y + 0.5, -z - 0.5$ ; (f)  $-x, y + 0.5, -z + 0.5$ ; (g)  $x + 1, y, z$ .

a: Aquests àtoms d'hidrogen no eren visibles en el mapa de diferències de Fourier i llurs posicions no han pogut ser calculades per restriccions geomètriques.

dos conformers són les mateixes amb l'excepció d'un pont d'hidrogen amb un oxigen de l'anió acetat. Pel que fa a la interacció d'aquesta cadena amb les altres molècules del pèptid, hi ha interaccions mitjançant dos ponts d'hidrogen, el NE i un dels amino terminals del guanidini interaccionen amb el carboxilat terminal i l'hidroxil de la serina d'una altre molècula simètricament relacionada i traslladada una cel·la al llarg de l'eix *a*. En aquesta interacció sembla més afavorida la conformació plegada que en principi seria menys favorable. La figura 2, mostra que els ponts d'hidrogen estan més ben orientats i són més simètrics en el cas de la conformació plegada. Potser sigui aquesta l'explicació de trobar dos conformers a la xarxa cristal·lina: l'un és més favorable energèticament i l'altre és més afavorit pel tipus d'empaquetament.

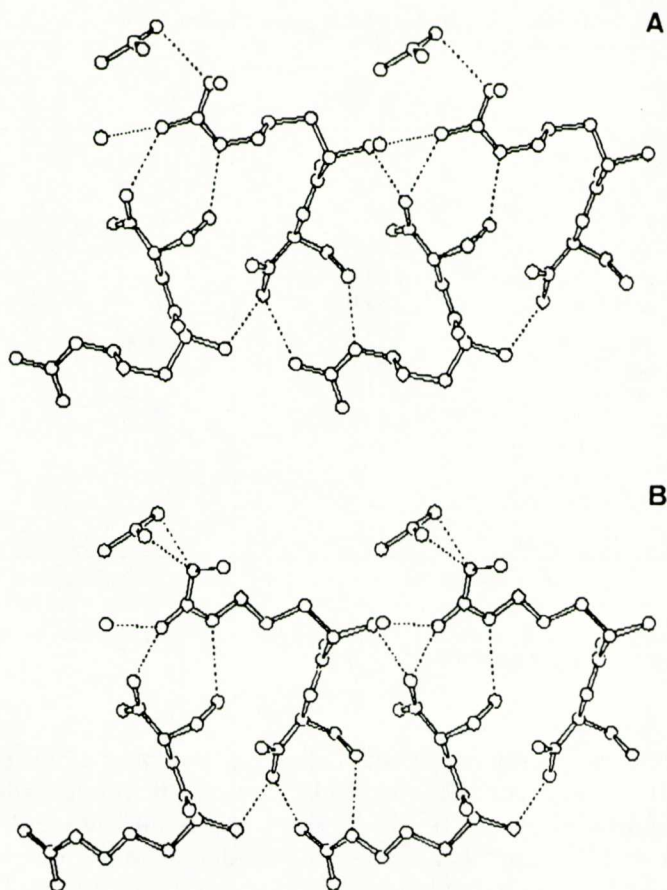


Figura 2. Interaccions de la cadena lateral d'arginina amb la resta de molècules al cristall.

#### ABSTRACT

The crystal structure of L-Arginyl-L-Serine acetate has been determined by x-ray diffraction. The peptide is in zwitterion form with the carboxylic group deprotonated, and with positive charges both in the amino terminal and guanidinium groups of arginine. Crystals are orthorhombic, space group  $P22_12_1$  with one peptide molecule, one acetate molecule and two water molecules in the asymmetric unit. The main chain is in extended conformation  $\phi_2 = -159.8^\circ$ . The arginine side chain appears to be an average of two different conformations with 50% occupation. While one conformation is fully extended, the torsional angles for the second are  $t^+ t^-$ , a conformation that had not been previously reported.



## BIBLIOGRAFIA

1. SEEMAN, N. C., ROSEMBERG, J. M. i RICH, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **73**, 804.
2. HELENE, C. (1977) *FEBS Lett.* **74**, 10.
3. COLL, M., SOLANS, X., FONT-ALTABA, M. i SUBIRANA, J. A. (1985) *Int. J. Pept. Protein Res.* **23**, 242.
4. COLL, M., SUBIRANA, J. A., SOLANS, X., FONT-ALTABA, M. i MAYER, R. (1987) *Int. J. Pept. Protein Res.* **29**, 708.
5. URPI, L., COLL, M., SUBIRANA, J. A., SOLANS, X. i FONT-ALTABA, M. (1988) *Acta Cryst.* **C44**, 281.
6. URPI, L., COLL, M. i SUBIRANA, J. A. (1988) *Int. J. Biol. Macromol.* **10**, 55.
7. VERDAGUER, N., URPI, L., FITA, I. i SUBIRANA, J. A. (1988) *Biopolymers* **27**, 1887.
8. BOQUÉ, L., VERDAGUER, N., URPI, L., FITA, I. i SUBIRANA, J. A. (1988) *Int. J. Pept. Protein Res.* **33**, 157.
9. VERDAGUER, N., FITA, I. i SUBIRANA, J. A. (1990) *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 315.
10. GILMORE, C. G. (1983) "MITHRIL a computer program for the automatic solutions of crystal structures from x-ray data". University of Glasgow, Scotland.
11. SHELDRIK, G. M. (1976) "SHELX76 program for crystal structure determination". University of Cambridge, England.
12. SURESH, C. G i VIJAYAN, M. (1985) *Int. J. Pept. Protein Res.* **26**, 311.
13. BENEDETTI, E., MORELLI, G., NEMETHY, G. i SHERAGA, H. A. (1983) *Int. J. Pept. Protein Res.* **22**, 1.
14. BHAT, T. N. i VIJAYAN, M. (1977) *Acta Cryst.* **B23**, 1754.