

# Konformacyjne właściwości modyfikowanych reszt aminokwasowych

Roksana WAŁĘSA, Aneta BUCZEK, Małgorzata A. BRODA\* - Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, 68, 4, 329–334

## Wstęp

Poszukiwanie związków biologicznie aktywnych jest celem prac licznych zespołów badawczych. Dużą popularność i nadzieje aplikacyjne w medycynie, farmacji, przemyśle i rolnictwie zyskują związki peptydowe. Peptydy, jako leki wykazują jednak wiele wad, między innymi niską biodostępność po podaniu doustnym, którą przypisuje się inaktywacji tych związków w przewodzie pokarmowym. Podejmowanych jest wiele działań, których celem jest zwiększenie stabilności tych związków [1]. Jednym z nich jest modyfikacja peptydu poprzez wprowadzenie niekodowanych aminokwasów (np.  $\alpha,\beta$ -dehydroaminokwasów) w łańcuch główny peptydu.  $\alpha,\beta$ -Dehydroaminokwasy różnią się od naturalnych  $\alpha$ -aminokwasów tym, że zawierają podwójne wiązanie pomiędzy węglem  $C^\alpha$  oraz  $C^\beta$ , co ogranicza możliwość zmian konformacyjnych łańcucha bocznego i blokuje  $\beta$ -podstawki w pozycji Z lub E [2].

Peptydy mogą być również modyfikowane poprzez zastąpienie atomu wodoru przy amidowym atomie azotu grupą metylową, co określa się jako *N*-metylowanie. *N*-metylowane peptydy wykazują unikatowe cechy konformacyjne. W związkach tego typu zauważono zwiększoną tendencję do przyjmowania konfiguracji *cis* ugrupowania amidowego w porównaniu do standardowych peptydów. Ważną konsekwencją wprowadzenia grupy metylowej do ugrupowania peptydowego jest wzrost odporności peptydu na degradację proteolityczną. Ponadto obecność dodatkowych grup metylowych w łańcuchu zwiększa hydrofobowość peptydu, a przez to ułatwia przenikanie przez błony biologiczne [3 ÷ 5].

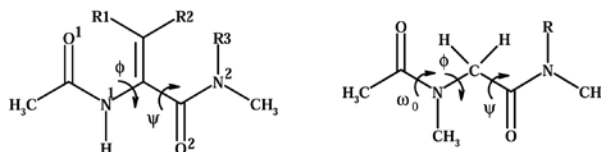
Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie właściwości konformacyjnych modyfikowanych reszt aminokwasowych na przykładzie małych modelowych diamidów badanych metodami teoretycznymi.

## Część eksperymentalna

Konformacja łańcucha peptydowego może się zmieniać dzięki obrotom wokół wiązań  $N-C^\alpha$  i  $C^\alpha-C'$  każdej reszty aminokwasowej. Obroty te definiowane są odpowiednio przez kąty  $\phi$  ( $C'-N-C^\alpha-C'$ ) i  $\psi$  ( $N-C^\alpha-C'-N$ ), które przyjmują wartości w granicach od  $-180^\circ$  do  $+180^\circ$ . Aby określić różnice w preferencjach konformacyjnych izomerów *E* i *Z*, reszty dehydrofenyloalaniny oraz *cis/trans* (*cis*:  $\omega_0=0^\circ$ , *trans*:  $\omega_0=180^\circ$ ) reszty *N*-metyloglicyny w sąsiedztwie drugo lub trzeciorzędowego układu amidowego, zostały obliczone mapy konformacyjne przedstawiające zależność energii potencjalnej cząsteczki od wartości kątów torsyjnych  $\phi,\psi$  dla następujących związków: Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NHMe (1), Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NHMe (2), Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (3), Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (4), Ac-(Me)Gly-NHMe (5) oraz Ac-(Me)Gly-NMe<sub>2</sub> (6) (Rys. 1). Obliczenia były prowadzone metodą B3LYP/6-31G\* w próżni i w otoczeniu polarnego rozpuszczalnika (woda). Minima konformacyjne zostały w pełni zoptymalizowane metodą B3LYP/6-31+G\*\*. Wpływ wody modelowany był metodą PCM [6, 7]. Obliczenia zostały wykonane przy użyciu programu Gaussian 09 [8]. Na podstawie uzyskanych wartości energii narysowano mapy konformacyjne  $E=f(\phi,\psi)$  korzystając z programu Surfer 8 [9].

Autor do korespondencji:

Dr hab. Małgorzata BRODA, e-mail: broda@uni.opole.pl



R1=R3=H R2=Ph Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NHMe (1) R=H Ac-(Me)Gly-NHMe (5)  
R2=R3=H R1=Ph Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NHMe (2) R=Me Ac-(Me)Gly-NMe<sub>2</sub> (6)  
R1=H R2=Ph R3=Me Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (3)  
R1=Ph R2=H R3=Me Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (4)

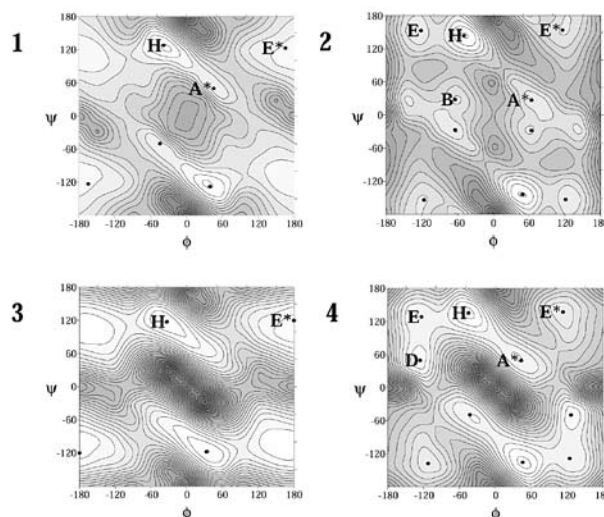
Rys. 1. Struktury badanych związków z zaznaczonymi kątami torsyjnymi

## Omówienie wyników

Mapy konformacyjne badanych związków w wodzie zostały przedstawione na Rysunkach 2 oraz 3. W Tablicach 1 i 2 zostały zebrane energie względne konformerów i wartości kątów torsyjnych  $\phi,\psi$  dla badanych związków w próżni i w wodzie.

Na mapie konformacyjnej Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NHMe (1) w wodzie występują trzy minima energetyczne  $E^*$ , H,  $A^*$  (Rys. 2, Tab. 1). Obliczenia DFT wskazują, że polarne środowisko wpływa na zmniejszenie ilości konformerów tego związku, jednak zarówno w próżni jak i w otoczeniu wody, minimum globalnym jest struktura rozciągnięta *E* stabilizowana przez wiązanie wodorowe  $N^1-H\cdots O^2$  typu C5. Wykazaną teoretycznie tendencję do przyjmowania przez (1) konformacji rozciągniętej potwierdzają wyniki krystalograficzne: kąty torsyjne  $\phi,\psi$  Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NHMe w kryształach są równe odpowiednio  $\pm 163,46(16)^\circ$  oraz  $\pm 116,19(17)^\circ$  [10], natomiast w dłuższych peptydach reszta (*E*)- $\Delta$ Phe przyjmuje konformację H lub A [11, 12].

Zmiana położenia pierścienia fenylowego w łańcuchu bocznym reszty  $\Delta$ Phe z pozycji *E* do *Z* ma ogromny wpływ na jej właściwości konformacyjne. W otoczeniu wody najniższej energetycznej struktury Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NHMe (2) to konformer  $A^*$  ( $\phi,\psi = 67^\circ, 19^\circ$ ), o kątach typowych dla struktur helikalnych i niespotykany dla standardowych reszt aminokwasowych konformer H ( $\phi,\psi = 47^\circ, 142^\circ$ ). Wartości kątów torsyjnych tego związku w kryształach wynoszą  $\phi = \pm 157^\circ, \psi = \mp 149^\circ$  i leżą w obszarze konformacji H [13].



Rys. 2. Mapy konformacyjne  $E=f(\phi,\psi)$  Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NHMe (1), Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NHMe (2), Ac-(*E*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (3), Ac-(*Z*)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (4) obliczone metodą B3LYP/6-31G\* w wodzie. Zaznaczone położenia minimów otrzymane metodą B3LYP/6-31+G\*\*

Tablica I

Energia względna oraz wartości wybranych kątów torsyjnych związków 1 ÷ 4 otrzymane metodą B3LYP/6-31+G\*\*

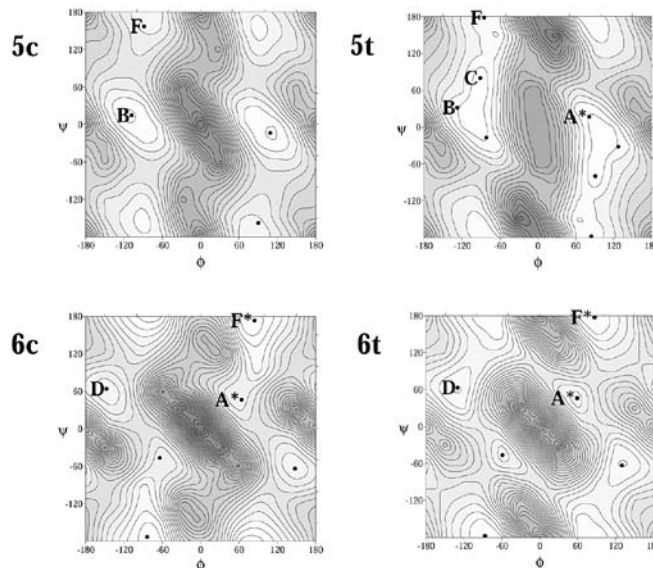
Konformer	$\phi$ [°]	$\psi$ [°]	$\Delta E$ , kcal/mol
<b>Ac-(E)<math>\Delta</math>Phe-NHMe (1)</b>			
próżnia			
E	-178,6	162,3	0,00
C	-74,6	68,8	4,23
H	-43,2	123,1	4,37
D	-154,0	38,7	6,66
A*	55,7	36,3	7,26
woda			
E*	177,6	147,0	0,00
H	-40,6	127,5	0,88
A*	49,3	45,3	1,64
<b>Ac-(Z)<math>\Delta</math>Phe-NHMe (2)</b>			
próżnia			
B	-55,8	24,4	0,00
H	-43,8	138,8	1,27
E	-129,1	159,8	1,32
E*	132,6	170,3	1,54
woda			
A*	67,4	18,9	0,00
H	-46,7	142,4	0,16
B	-61,8	25,8	1,28
E	-128,2	156,0	1,55
E*	125,3	160,2	1,71
<b>Ac-(E)<math>\Delta</math>Phe-NMe<sub>2</sub> (3)</b>			
próżnia			
E	-174,2	129,8	0,00
H	-37,6	116,4	1,69
woda			
H	-33,7	117,4	0,00
E*	179,8	120,0	0,44
<b>Ac-(Z)<math>\Delta</math>Phe-NMe<sub>2</sub> (4)</b>			
próżnia			
H	-38,6	127,7	0,00
E	-127,7	146,4	1,13
D	-124,1	45,3	4,20
E*	124,5	155,5	3,37
G*	125,9	50,4	6,85
woda			
H	-41,7	133,1	0,00
A*	37,3	52,8	0,95
E	-129,9	142,5	1,94
E*	112,8	141,1	2,88
D	-126,7	46,3	3,14

Trzeciorzędowy, C-końcowy układ amidowy wyraźnie ogranicza swobodę konformacyjną reszty (E)- $\Delta$ Phe i zmniejsza jej tendencję do przyjmowania konformacji rozciągniętej. Ac-(E)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (3) w otoczeniu wody może przyjmować tylko jedną z dwóch konformacji o podobnych energiach (Tab. I): H ( $\phi$ ,  $\psi$  = -34°, 117°) lub E\* ( $\phi$ ,  $\psi$  = 180°, 120°). Istnienie w roztworze chloroformu mieszaniny dwóch konformerów – jednego stabilizowanego wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym a drugiego otwartego – po-

twierdzają widma IR [14]. W kryształach wartości kątów torsyjnych  $\phi$ ,  $\psi$  Ac-(E)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O wynoszą odpowiednio -/+36,23(14)° i +/-124,08(10)°, co zgodnie z wynikami teoretycznymi odpowiada konformacji otwartej H [10].

Na mapie konformacyjnej izomeru Z Ac- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (4) występuje pięć minimów oraz ich odbicia lustrzane. Minimum globalnym w próżni i w wodzie jest konformer H ( $\phi$ ,  $\psi$  = -40°, 130°) stabilizowany przede wszystkim przez oddziaływanie dipolowe dwóch grup karbonylowych [10]. Charakterystyczne dla związków (2) i (4) jest pojawienie się w środowiskach polarnych konformacji A\*, która dla Ac-(Z)- $\Delta$ Phe-NHMe w wodzie jest minimum globalnym, natomiast dla Ac-(Z)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> jest drugim pod względem energii minimum. Dla Ac-(Z)- $\Delta$ Phe-NMe<sub>2</sub> (4) zostały zarejestrowane widma IR w czterochlorku węgla oraz w chloroformie [14]. Na obu widmach w zakresie drgań rozciągających grup -NH widoczne jest jedno wąskie symetryczne pasmo przy częstościach odpowiednio 3424 cm<sup>-1</sup> w CCl<sub>4</sub> oraz 3416 cm<sup>-1</sup> w CHCl<sub>3</sub>. Świadczy to o obecności w roztworze jednego konformeru, w którym występuje wiązanie wodorowe grupy -NH. Korzystając z wyników obliczeń teoretycznych, pasmo to zostało przypisane konformerowi otwartemu H, stabilizowanemu poprzez oddziaływanie grupy -N<sup>1</sup>H z elektronami  $\pi$  pierścienia fenylowego łańcucha bocznego [14].

Również w przypadku peptoidu Ac-(Me)Gly-NHMe (5) zauważony został bardzo istotny wpływ polarnego otoczenia na właściwości konformacyjne. W próżni zlokalizowane zostały 3 minima (Tab. 2), z których najniższym energetycznym jest konformer *trans*-C ( $\phi$ ,  $\psi$  = -88°, 77°) stabilizowany przez stosunkowo silne wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe N<sup>2</sup>-H...O<sup>1</sup>. Natomiast w otoczeniu wody związek (5) wykazuje 6 minimów (Rys. 3), wśród których najniższe energie mają konformery *trans*-F ( $\phi$ ,  $\psi$  = -84°, 178°) i *cis*-F ( $\phi$ ,  $\psi$  = -89°, 152°) stabilizowane głównie poprzez oddziaływanie dipolowe grup karbonylowych [15].



Rys. 3. Mapy konformacyjne  $E=f(\phi, \psi)$  Ac-(Me)Gly-NHMe (5c/5t), Ac-(Me)Gly-NMe<sub>2</sub> (6c/6t) obliczone metodą B3LYP/6-31+G\* w wodzie. Zaznaczone położenia minimów otrzymane metodą B3LYP/6-31+G\*\*

Dla peptoidu Ac-(Me)Gly-NMe<sub>2</sub> (6) zlokalizowano 6 minimów, zarówno w fazie gazowej jak i w otoczeniu wody (Tab. 2, Rys. 3). W otoczeniu rozpuszczalnika najbardziej korzystną konformacją jest *trans*-F\* ( $\phi$ ,  $\psi$  = 87°, 177°) stabilizowana przez silne oddziaływanie dipolowe. W środowisku wody różnica energii pomiędzy konformerami F z konfiguracją *cis* i *trans* ugrupowania amidowego ulega zmniejszeniu do 0,62 kcal/mol. Podobnie jak w przypadku peptoidu z drugorzędowym ugrupowaniem amidowym drugim w szeregu energetycznym minimum jest *cis*-F\* ( $\phi$ ,  $\psi$  = 84°, 173°) [15].

Tablica 2

## Energia względna oraz wartości wybranych kątów torsyjnych związków 5 i 6 otrzymane metodą B3LYP/6-31+G\*\*

Konformer	$\phi$ [°]	$\psi$ [°]	$\Delta E$ , kcal/mol
<b>Ac-(Me)Gly-NHMe (5)</b>			
próżnia			
trans-C	-87,5	76,6	0,00
cis-B	-103,0	8,3	2,40
cis-F	-89,6	-148,9	4,56
woda			
trans-F	-84,4	178,0	0,00
cis-F	-88,5	151,7	0,07
trans-B	-127,4	31,9	0,51
cis-B	-108,8	14,6	0,87
trans-A*	81,4	17,0	1,17
trans-C	-91,0	79,7	1,68
<b>Ac-(Me)Gly-NMe<sub>2</sub> (6)</b>			
próżnia			
trans-D	-115,0	68,1	0,00
trans-F	-90,2	-176,5	0,25
cis-F	-84,3	-173,3	2,01
cis-D	-148,0	63,0	3,66
cis-A	-62,2	-49,4	4,71
trans-A	-56,0	-44,1	6,33
woda			
trans-F*	86,8	177,2	0,00
cis-F*	84,2	173,2	0,62
trans-D	-130,0	63,2	1,37
trans-A*	59,2	46,2	3,34
cis-D	-147,5	64,2	3,74
cis-A*	64,0	46,5	4,49

## Podsumowanie i wnioski

Wyniki przeprowadzonych obliczeń wskazują na zdolność izomerów E i Z reszty  $\Delta$ Phe do przyjmowania konformacji H, która nie jest dostępna dla standardowych aminokwasów. W przypadku reszty (Z)- $\Delta$ Phe (związki 2 i 4) polarne środowisko silnie stabilizuje konformację A o kątach  $\phi, \psi$  charakterystycznych dla struktur helikalnych.

Stwierdzono również w przypadku peptoidów (5 i 6) tendencję do przyjmowania konfiguracji cis N-końcowego wiązania amidowego. Wprawdzie w próżni najniższą energię ma konformer dla obu zbadanych związków jest izomer trans, a następny pod względem energii izomer cis ma energię o ok. 2 kcal/mol wyższą, ale w otoczeniu wody energie konformerów F z cis i trans konfiguracją N-końcowego amidu (czyli cis-F i trans-F) stają się porównywalne.

Ponadto, dla wszystkich badanych związków stwierdzono, że w próżni minima globalne stanowiły konformery stabilizowane przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Natomiast w otoczeniu wody silnie stabilizowane były konformery otwarte stabilizowane głównie przez oddziaływania dipolowe.

## Podziękowania

Roksana Wałęsa jest stypendystką projektu systemowego Samorządu Województwa Opolskiego pn. Stypendia doktoranckie – inwestycja w kadre naukowe województwa opolskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007–2013, na rok akademicki 2013/2014.

Obliczenia zostały wykonane w Akademickim Centrum Komputerowym CYFRONET AGH i we Wrocławskim Centrum Sieciowo-Superkomputerowym.

## Literatura

- Adessi C., Soto C.: *Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability*. *Curr. Med. Chem.* 2002, **9**, 9, 963–978.
- Gupta M., Chauhan V.S.: *De novo design of  $\alpha, \beta$ -didehydrophenylalanine containing peptides: From models to applications*. *Biopolymers* 2011, **95**, 3, 161–173.
- Chatterjee J., Gilon C.H., Hoffman A., Kessler H.: *N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry*. *Acc. Chem. Res.* 2008, **41**, 10, 1331–1342.
- Chatterjee J., Laufer B., Kessler H.: *Synthesis of N-methylated cyclic peptides*. *Nature Protocols* 2012, **7**, 3, 432–444.
- Chatterjee J., Rechenmacher F., Kessler H.: *N-Methylation of Peptides and Proteins: An Important Element for Modulating Biological Functions*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, **52**, 1, 254–269.
- Miertus S., Tomasi J.: *Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes*. *Chem. Phys.* 1982, **65**, 2, 239–245.
- Tomasi J., Mennucci B., Cammi R.: *Quantum mechanical continuum solvation models*. *Chem. Rev.* 2005, **105**, 8, 2999–3093.
- Frisch MJ, et al. (2009) Gaussian 09 Revision B.01, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA.
- Surfer 8, Golden Software, Inc., 2002.
- Buczek A., Siódłak D., Bujak M., Broda M. A.: *The effects of side-chain orientation on the backbone conformation of dehydrophenylalanine residue. Theoretical and X-ray study*. *J. Phys. Chem. B* 2011, **115**, 15, 4295–4306.
- Latajka R., Makowski M., Jewgiński M., Pawelczak M., Koroniak H., Kafarski P.: *Peptide p-nitrophenylamides containing (E)-dehydrophenylalanine - Synthesis, structural studies and evaluation of their activity towards cathepsin C*. *New J. Chem.* 2006, **30**, 7, 1009–1018.
- Makowski M., Lisowski M., Mikołajczyk I., Lis T.: *N-[tert-Butoxycarbonyl-glycyl-(E)- $\alpha, \beta$ -dehydrophenylalanyl-glycyl-(E)- $\alpha, \beta$ -dehydrophenylalanyl]-glycine*. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep.* 2007, **63**, 1, o19–o21.
- Souhassou M., Lecomte C., Ghermani N.-E., Rohmer M.M., Wiest R., Benard M., Blessing R.H.: *Electron distributions in peptides and related molecules. 2. An experimental and theoretical study of (Z)-N-acetyl- $\alpha, \beta$ -dehydrophenylalanine methylamide*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 7, 2371–2382.
- Buczek A.M., Ptak T., Kupka T., Broda M.A.: *Experimental and theoretical NMR and IR studies of the side-chain orientation effects on the backbone conformation of dehydrophenylalanine residue*. *Magn. Reson. Chem.* 2011, **49**, 6, 343–349
- Wałęsa R., Broda M.A.: *Solvent effects on the conformational preferences of model peptoids. MP2 study*. *J. Pept. Sci.* 2014, **20**, 203–211.

\* Dr hab. Małgorzata BRODA, prof. UO jest absolwentką Wydziału Mat.-Fiz.-Chem., kierunku Chemia Uniwersytetu Wrocławskiego (1982). Doktorat (1990) i habilitacja (2006) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Od 2011 r. pracuje na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Wydziale Chemii UO. Zainteresowania naukowe: metody spektroskopowe i modelowanie molekularne jako metody badania właściwości stereoelektronowych peptydów. Jest współautorką ponad 50 publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.  
e-mail: broda@uni.opole.pl

Mgr Aneta BUCZEK jest absolwentką Wydziału Mat.-Fiz.-Chem kierunku Chemia Podstawowa i Stosowana Uniwersytetu Opolskiego (2008). Obecnie jest słuchaczką międzyrodzinkowych studiów doktoranckich pomiędzy Uniwersytetem Opolskim a Politechniką Wrocławską. Celem jej badań jest określenie właściwości konformacyjnych modelowych pochodnych reszty  $\alpha, \beta$ -dehydrofenyloalaniny. Jest współautorką 12 publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Mgr Roksana Wałęsa jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego, obecnie doktorantką III roku Środowiskowego Studium Doktoranckiego Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego na kierunku Chemia. Zainteresowania naukowe: metody spektroskopowe i modelowanie molekularne N-metylowanych peptydów. Jest współautorką 2 publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, 1 monografii oraz 10 komunikatów konferencyjnych.