

К ВОПРОСУ О ПЛАНАРНОСТИ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

В.Н. Блинов¹, В.Л. Голо²

¹*Московский институт электроники и математики
при НИУ ВШЭ, Москва, Россия*

Механико-математический факультет

²*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

voislav.golo@gmail.com

Поступила 05.08.2014

Краткий обзор последних работ по конформации пептидной связи в белковых молекулах. Приводятся аргументы, что может иметь место нарушение планарности связи, которая обычно предполагается выполненной.

УДК 517.15

1 Предварительные замечания

Как известно, белковую молекулу можно себе наглядно представить как цепь четвёркок атомов $OSNH$, так называемых пептидных групп, к которой посредством промежуточных атомов углерода, C_α , подвешены аминокислотные остатки, см. по-

дробности в [1], Гл. 1, стр. 45. Известная теория Pauling'a и Corey, [2], [3], строения вторичных структур белковых молекул существенно опирается на предположение, что четвёрка атомов самой пептидной группы и два атома соседних C_α углеродов лежат в одной плоскости (планарность пептидной группы). По этому поводу в оригинальной работе [2] говорится следующее:

We assume that, because of the resonance of the double bond between the carbon-oxygen and carbon-nitrogen positions, the configuration of each residue < peptide group > is planar. This structural feature has been verified for each of the amides that we have studied. Moreover, the resonance theory is now so well grounded and its experimental substantiation so extensive that there can be no doubt whatever about its application to the amide group.

Однако в дальнейшем речь пойдёт именно о том, что серьёзное *doubt* касательно этого утверждения всё же имеется. Авторитет нобелевского лауреата Pauling'a был очень велик, и, по-видимому, мало кто сомневался в высказанных им предположениях, и планарность пептидной связи долгое время не обсуждалась.

Впервые сомнения в *обязательной* планарности пептидной группы довольно осторожно выразил Ramachandran, см. работу [5]. Интересно, что до настоящего времени в сообществе молекулярных физиков часто считают, что отклонения от планарности пептидной группы не столь существенны. Однако, результаты полученные за последние десятилетия, и в особенности недавнего времени, указывают на то, что это далеко не так.

В большинстве публикаций планарность пептидной связи утверждается на основании некоторых квантово-механических соображений, которые считаются известными, и из которых следует наличие, как авторы выражаются, сопряжения, или наложения двух электронных структур, см. [1], стр. 45, нейтральной и полярной, см. Рис. 1. Делается утверждение, что $C-N$ связь в пептидной группе на 40% является полярной, не уточняя в каком смысле, и что планарность пептидной связи, причем не только группы $OCNH$, но и всех шести атомов, включая C_α -углероды, т.е. планарность пептидной связи есть следствие наличия двойной связи $C=N$ в полярной структуре.

Таким образом, остаётся понять:

1. что означает 40% “наложение” нейтральной и полярной структур;
2. почему наличие двойной связи $C=N$ в полярной структуре приводит к планарности пептидной связи.

Отправной точкой этих исследований можно считать работу Heitler'a и London'a, [6], о молекуле водорода, потребовавшей применения концепций только что созданный в то время квантовой механики. В частности стало понятно, что необходимо

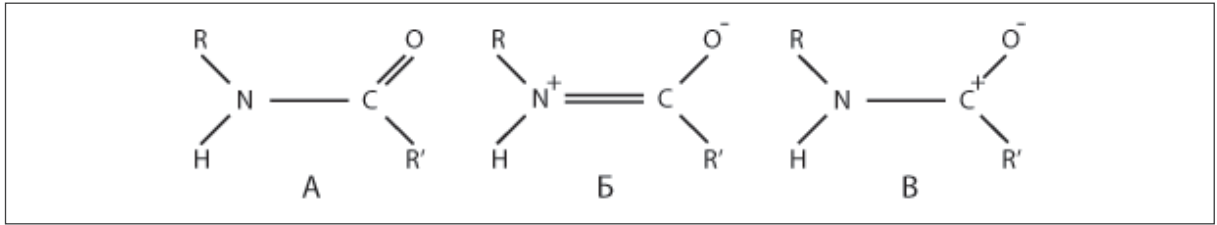


Рис. 1: Возможные состояния пептидных групп. Имеет место суперпозиция квантовых состояний. Обычно рассматривается суперпозиция состояний А и Б. В работе [4] предложено рассматривать суперпозицию трех состояний А, Б, В. На языке квантовой механики это означает, что пробная функция, состояние системы, ищется в виде $\Psi = \lambda_A |A\rangle + \lambda_B |B\rangle + \lambda_C |C\rangle$.

учитывать наличие квантовой динамической переменной спина. Молекула водорода является квантовым аналогом классической задачи движения двух частиц, взаимодействующих согласно кулоновскому потенциалу в поле двух неподвижных притягивающих центров - протонов. Согласно приближению Born'a - Openheimer'a можно считать притягивающие центры, протоны, неподвижными и находящимися в точках $\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2$. Операторы векторов координат электронов обозначим $\mathbf{r}_i$, $i = 1, 2, 3$. Всюду в дальнейшем будем нумеровать частицы латинскими буквами, а координаты соответствующих векторов - греческими; так что будем писать $\mathbf{r}_i^\alpha$ или просто r_i^α .

Волновая функция Ψ системы двух электронов молекулы кососимметрична при перестановке номеров частиц, согласно принципу Pauli; следовательно, предполагая, что спиновая и орбитальная части Σ, Φ волновой функции всей системы расцеплены, получаем, что Σ, Φ должны быть соответственно попарно симметричны - кососимметричны или кососимметричны - симметричны, т.е. имеет место или

$$\Sigma(\chi_1^\alpha, \chi_2^\beta) = -\Sigma(\chi_2^\alpha, \chi_1^\beta); \quad \Phi(r_1^\xi, r_2^\eta) = \Phi(r_2^\xi, r_1^\eta) \quad (1)$$

или

$$\Sigma(\chi_1^\alpha, \chi_2^\beta) = \Sigma(\chi_2^\alpha, \chi_1^\beta); \quad \Phi(r_1^\xi, r_2^\eta) = -\Phi(r_2^\xi, r_1^\eta) \quad (2)$$

Уравнения 1 - 2 описывают пространство состояний системы.

Оператор Гамильтона $\hat{H}$ как обычно есть сумма кинетической T

$$T = \frac{1}{2m} p_1^2 + \frac{1}{2m} p_2^2$$

и потенциальной энергии системы V . Последняя имеет вид

$$V = e^2 \left(\frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2|} + \frac{1}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_1|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_2|} \right)$$

Первое слагаемое в правой части - константа, поскольку положение ядер фиксировано; второе соответствует кулоновскому отталкиванию электронов; оставшиеся четыре - кулоновскому притяжению электронов и ядер. В основе дальнейших вычислений лежит предположение, что не возбужденное состояние молекулы водорода можно представить как суперпозицию следующих двух картин, описываемых волновыми функциями ϕ_1 и ϕ_2 :

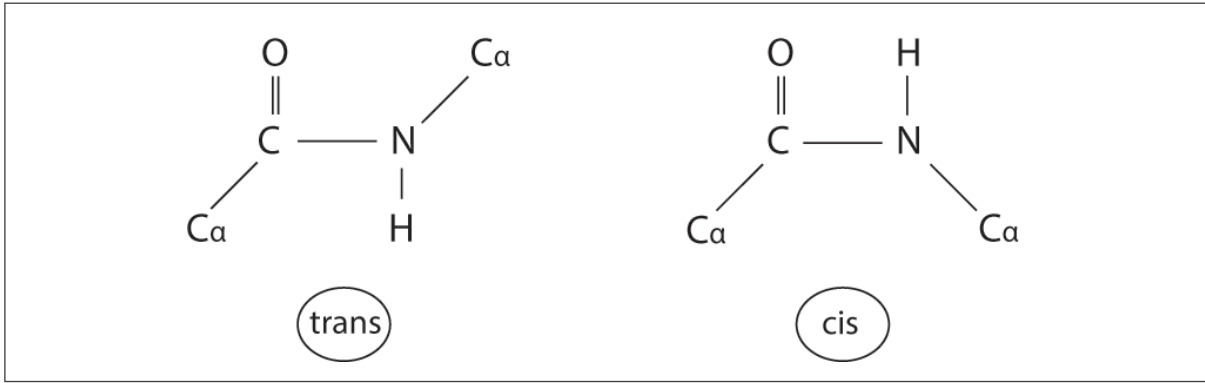


Рис. 2: cis- trans- формы пептидных групп.

- первый электрон относится к первому протону, а второй ко второму, причём оба не зависят друг от друга, так что орбитальная часть волновой функции системы имеет вид

$$\phi_1 = \phi(\mathbf{r}_1) \cdot \phi(\mathbf{r}_2)$$

где $\phi(\mathbf{r})$ - волновая функция основного состояния атома водорода;

- первый электрон относится ко второму протону, а второй ко первому, причём оба не зависят друг от друга, так что орбитальная часть волновой функции системы имеет вид

$$\phi_2 = \phi(\mathbf{r}_2) \cdot \phi(\mathbf{r}_1)$$

где $\phi(\mathbf{r})$ - волновая функция основного состояния атома водорода

$$\phi(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{\pi a_0^3}} e^{-r/a_0}, \quad \text{где } a_0 = \frac{\hbar^2}{me^2} \quad \text{боровский радиус}$$

Наглядно это можно представить, что электроны не являются жестко приписанными к ядрам, и что как бы имеет место обмен электронов ядрами.

Воспользуемся вариационным принципом и будем искать приближённое решение уравнения Шрёдингера как функцию Θ , задающую минимум выражению

$$\tilde{E} = \frac{\langle \Theta | \hat{H} | \Theta \rangle}{\langle \Theta | \Theta \rangle} \quad (3)$$

представляющему приближённое значение энергии, в виде линейной комбинации функций ϕ_1 , ϕ_2 стр. 3, не накладывая пока условий симметрии,

$$\Theta = c_1 \phi_1 + c_2 \phi_2 \quad (4)$$

Здесь c_1, c_2 - варьируемые постоянные, которые находятся из условия минимизации. Заметим, что спиновая часть сокращается в (3). Её роль проявляется только в характере симметрии орбитальной части волновой функции.

Используя выбор нормировки состояния Θ можно рассматривать эту задачу как задачу поиска экстремума функции $\langle \Theta | \hat{H} | \Theta \rangle$ при условии $\langle \Theta | \Theta \rangle = 1$. С этой целью введём функцию Лагранжа

$$\mathcal{L} = \langle \Theta | \hat{H} | \Theta \rangle + \lambda \langle \Theta | \Theta \rangle$$

Условие экстремума задаётся уравнениями

$$\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial c_i} = 0, \quad i = 1, 2$$

Решения будут даваться парой функций

$$\begin{aligned} \psi_{sim} &= \frac{\phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_1)\phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_2) + \phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2)\phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1)}{\sqrt{2(1 + \kappa^2)}} \\ \psi_{anti} &= \frac{\phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_1)\phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_2) - \phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2)\phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1)}{\sqrt{2(1 - \kappa^2)}} \end{aligned} \quad (5)$$

где

$$\kappa = \langle \phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_1) | \phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1) \rangle = \langle \phi(\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2) | \phi(\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_2) \rangle$$

или интеграл перекрытий. Таким образом, κ основной параметр картины; если она равна нулю, то молекулы водорода - нет. Средние значения энергии V будут соответственно

$$V_{sim} = \frac{A + B}{1 + \kappa^2}, \quad V_{anti} = \frac{A - B}{1 - \kappa^2} \quad (6)$$

где

$$\begin{aligned} A &= \langle \phi_1 | \otimes \langle \phi_1 | e^2 \left(\frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2|} + \frac{1}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1|} \right) | \phi_1 \rangle \otimes | \phi_1 \rangle \\ B &= \langle \phi_2 | \otimes \langle \phi_1 | e^2 \left(\frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2|} + \frac{1}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_2|} - \frac{1}{|\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_1|} \right) | \phi_1 \rangle \otimes | \phi_2 \rangle \end{aligned}$$

Рассматривая их как функции расстояния $\varrho = |\mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2|$ между ядрами, $V_{sim}(\varrho)$ и $V_{anti}(\varrho)$. Имеет место

$$V_{anti}(\varrho) > V_{sim}(\varrho)$$

и $V_{anti}(\varrho)$ монотонно убывает. Таким образом устойчивое состояние молекулы описывается энергией $V_{sim}(\varrho)$, соответствующей волновой функции симметричной по орбитальным переменным. Из неё следуют характерные параметры молекулы водорода достаточно хорошо согласующиеся с экспериментом, см. [7], [8]. Условия симметрии 1, 2 позволяют немедленно заключить, что спиновая часть функции должна быть кососимметричной, т.е. имеет место

$$\Sigma(\chi_1^\alpha, \chi_2^\beta) = \chi_1^\alpha \chi_2^\beta - \chi_2^\alpha \chi_1^\beta$$

что соответствует спину 0, или синглетному состоянию. Принято образно выражаться, что спины обоих электронов анти-параллельны. Таким образом метод Heiler'a - London'a позволяет описать валентную связь обеспечивающую молекулу водорода.

Работа Heitler'a и London'a, [6], свела исследование структуры молекулы с точки зрения теоретического анализа к двум этапам: **(1)** нахождение пробной волновой функции Ψ , достаточно ясно описывающую физическую структуру системы и содержащую некоторое число произвольных констант $\mathcal{C}$, и **(2)** решение вариационной задачи в отношении констант c_1, c_2 - нахождение минимума основного состояния, соответствующего пробной функции Ψ . При исследовании конкретных задач успех

предприятия зависит от удачного выбора пробной функции. Обратим ещё раз внимание на то первостепенное обстоятельство, что до того как начинается вся арифметика, формулируется физическая картина: притягивающие центры могут обмениваться электронами; пробная волновая функция есть суперпозиция двух базисных состояний. Важно, что с самого начала рассматривается коллективизированное состояние электронов. Осуществить указанную программу для молекул посложнее молекулы водорода - трудное предприятие. В свое время оно было едва ли выполнимо из-за недостаточности вычислительной техники. Во многом по этой причине был предложен так называемый метод молекулярных орбит, (МО), см. [9]. В основе его лежит предположение, что пробную волновую функцию можно строить рассматривая движение отдельного электрона как бы независимым. при этом предполагается, что его движение рассматривается в поле, созданным всеми остальными электронами, "само-согласованном поле". Осуществить такую программу на самом деле далеко не всегда возможно. Даже в случае одного достаточно сложного атома она сталкивается со значительными трудностями.

Чтобы проследить технику и идеи метода МО рассмотрим простой пример двух-атомной молекулы. Под молекулярной орбитой будем понимать, следуя [2], волновую функцию координат одного электрона, $\psi(\mathbf{r})$, которая *подбирается по обстановке*. Волновая функция всей системы n электронов молекул ищется в виде произведения одноэлектронных функций

$$\Psi = \psi(\mathbf{r}_1) \cdot \psi(\mathbf{r}_2) \cdot \dots \cdot \psi(\mathbf{r}_n)$$

Часто молекулярную орбиту одного электрона удобно представлять как линейную комбинацию атомных орбит, т.е. волновых функций электронов в поле одного атома. Обозначим волновые функции условно говоря первого электрона в поле ядер A и B через $\psi_A(\mathbf{r}_1)$ и $\psi_B(\mathbf{r}_1)$; для второго электрона соответственно $\psi_A(\mathbf{r}_2)$ и $\psi_B(\mathbf{r}_2)$. *Молекулярные орбиты первого и второго электронов выберем в виде линейных комбинаций атомных орбит*

$$\begin{aligned}\phi_1(\mathbf{r}_1) &= a \cdot \psi_A(\mathbf{r}_1) + b \cdot \psi_B(\mathbf{r}_1) \\ \phi_2(\mathbf{r}_2) &= a \cdot \psi_A(\mathbf{r}_2) + b \cdot \psi_B(\mathbf{r}_2)\end{aligned}$$

Пробную волновую функцию системы ищем в виде

$$\Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \phi_1(\mathbf{r}_1) \cdot \phi_2(\mathbf{r}_2)$$

Из нормировки волновых функций ϕ_A , ϕ_B , Ψ вытекает, что имеет место

$$a^2 + b^2 + 2abT; \quad T = \langle \psi_A | \psi_B \rangle \quad (7)$$

Всюду предполагается, что волновые функции действительны. Интеграл T описывает перекрытие волновых функций, связанных с ядрами A и B . Если перекрытие мало, то T можно пренебречь. В этом отношении ситуация здесь такая же, как в методе Heitler'a и London'a.

Удобно воспользоваться обозначениями Dirac'a: состояние электрона в поле ядра A обозначим через $|A\rangle$, соответственно для ядра B через $|B\rangle$, с условием нормировки $\langle A|A\rangle = \langle B|B\rangle = 1$ и $\langle A|B\rangle = T$. Орбита, соответственно первого и

второго электронов

$$\begin{aligned}|1\rangle &= a \cdot |A, 1\rangle + b \cdot |B, 1\rangle \\ |2\rangle &= a \cdot |A, 2\rangle + b \cdot |B, 2\rangle\end{aligned}$$

Пробное состояние будет иметь вид

$$|\Psi\rangle = |1\rangle \otimes |2\rangle$$

с условием нормировки

$$\langle \Psi | \Psi \rangle = (\langle 1 | \otimes \langle 2 |) (|1\rangle \otimes |2\rangle) = \langle 1 | 1 \rangle \langle 2 | 2 \rangle = 1$$

откуда следует условие (7).

Сравним подход Heitler'a - London'a с методом **МО** на примере молекулы водорода, для чего рассмотрим их пробные волновые функции (состояния). И там, и там в основу кладётся решение задачи Кеплера – движение заряда в поле притягивающего кулоновского центра, – для А и В, которые находятся в точках $\mathbf{R}_1$ и $\mathbf{R}_2$, соответственно. Рассматриваются основные состояния $|A, i\rangle$, $|B, i\rangle$ $i = 1, 2$, где i – номер соответствующего электрона. В случае Heitler'a - London'a пробное состояние имеет вид

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{2}} (|A, 1\rangle \otimes |B, 2\rangle + |A, 2\rangle \otimes |B, 1\rangle)$$

что соответствует учёту только энергии обменного взаимодействия. В случае **МО**, если расписать подробно пробное состояние Ψ , получим

$$\begin{aligned}|\Psi\rangle &= a^2 |A, 1\rangle \otimes |A, 2\rangle + b^2 |B, 1\rangle \otimes |B, 2\rangle \\ &+ ab (|A, 1\rangle \otimes |B, 2\rangle + |A, 2\rangle \otimes |B, 1\rangle)\end{aligned}$$

Слагаемое во второй строке по-прежнему описывает обменную энергию, но слагаемые в первой строке имеют совсем другой смысл. Для того, чтобы это понять, обратим внимание на наличие в энергии вклада энергии электростатического взаимодействия пары электронов

$$\frac{e^2}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|}.$$

Какую она играет роль, оценить трудно, и это составляет предмет одной из претензий к **МО**. Метод **МО** описывает ионизацию молекулы, в то время как метод Heitler'a - London'a эффекты ионизации игнорирует.

Таким образом, и метод молекулярных орбиталей, и метод Heitler'a - London'a, или как его ещё называют метод валентности, являются приближёнными вариационными методами. При их практическом применении встаёт вопрос о величине погрешности, ответ на который не всегда просто дать. По этой причине полученные с помощью них результаты не стоит считать истиной в последней инстанции.

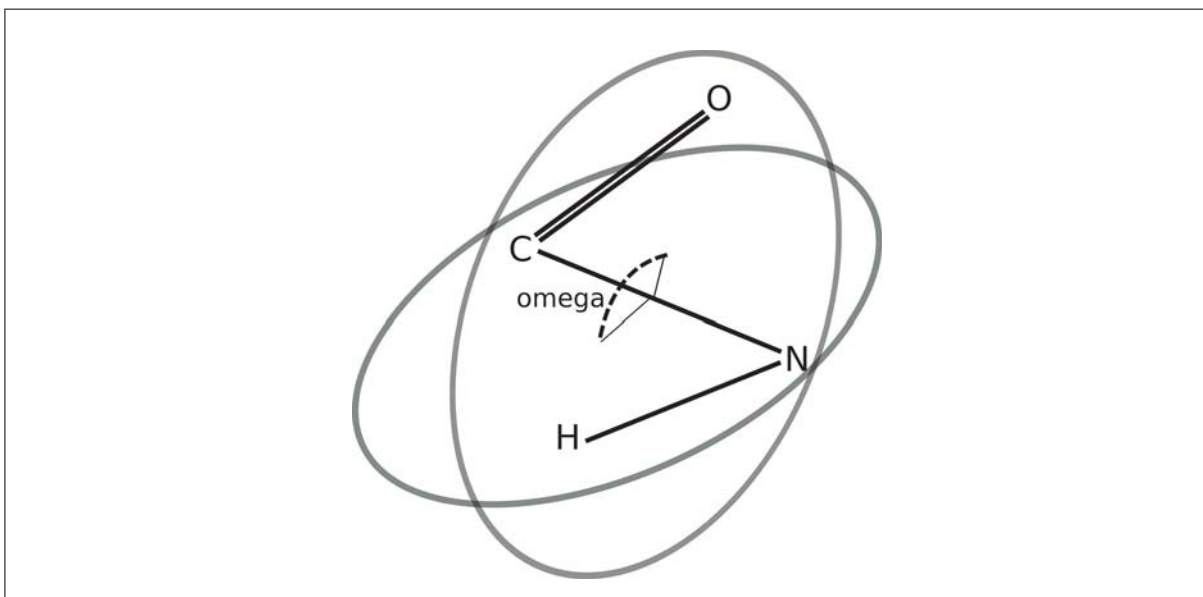


Рис. 3: Угол непланарности, торсионный угловой параметр, ω , - двугранный угол, образованный плоскостями CNO и CNH .

2 Надёжность утверждения о планарности пептидной группы

Согласно распространённым представлениям ¹ четыре атома, входящие в пептидную группу, O, C, N и H , и примыкающие к ним два атома углерода C_α , лежат в одной плоскости. Первоначальные доводы Pauling'a, [2], основывались на том, что имеет место “резонанс” двух возможных форм пептидной группы, см. стр. 2, стр. 2 :

$|\Psi_1\rangle$, с наличием двойной связи между углеродом и кислородом;

$|\Psi_2\rangle$, с двойной связью между углеродом и азотом.

Термин “резонанс” мотивировался Pauling'ом по аналогии с одной из работ Гейзенберга. Его вряд ли можно считать удачным; в действительности ни о каком резонансе речь не идёт. На самом деле рассматривается суперпозиция состояний

$$|\Phi\rangle = |\Psi_1\rangle + |\Psi_2\rangle,$$

которой соответствует меньшая энергия, чем соответствующие значения для $|\Psi_1\rangle$ и $|\Psi_2\rangle$ (что, конечно надо бы проверить, но по-настоящему не проверяют).

Обычно в литературе утверждается, что планарность пептидной связи есть следствие квантовой механики, т.е. что в конформации $|\Psi_1\rangle$ имеет место двойная связь $C=O$, а для $|\Psi_2\rangle$ двойная связь $C=N$. Таким образом из атома углерода выходят две оси, вращение вокруг которых запрещено (*в действительности всего лишь затруднено*), никаких оценок при этом не приводится. Тот факт, что в плоскость, натянутую на них, попадают два C_α -углерода и один водород из обычной стереометрии никак не следует, во всяком случае без дополнительных предположений. В качестве дополнительного довода ещё иногда приводятся аналогии с похожими молекулами, но такого рода аргументация не вполне убедительна.

¹“By now it is generally accepted”

Таким образом, можно считать, что планарность пептидной группы - явление часто встречающееся, но не обязательное, и было бы интересно выяснить, при каких обстоятельствах оно действительно имеет место и чему способствует. Ответа на эти вопросы пока нет.

По-видимому, первым, кто обратил внимание на неблагоприятное положение дел с пептидной связью, был G.N.Ramachandran, в основополагающих работах [12], [13], [14]. Он показал, что имеются циклические (замкнутые) белковые молекулы, структура которых не может быть реализована, если пептидные связи всегда планарны. Другими словами, необходимо допустить существование непланарных пептидных связей. Для описания последних вводился *торсионный угловой параметр* ω . Оценки показывают, что минимумы свободной энергии соответствуют значению $\omega \approx 10^\circ$. Следует отметить, что в случае незамкнутых (открытых молекул белков значения ω малы, менее 5° , в то время как у циклических молекул они достигают 15° , что по-видимому продиктовано тем, что полипептидная цепь замкнута в кольцо. В основе этих представлений лежит замечание, что отклонение от планарности примерно на 20° приводит к проигрышу по энергии порядка $2 - 3 \text{ kcal/mol}$, в то время как выигрыш за счет образования ковалентной связи при замыкании кольца значительно больше.

Таким образом можно заключить, что *непланарность пептидных связей продиктована топологией молекулярной цепи*. Можно предположить, что дальнейшее усложнение топологической структуры цепи может привести к ещё большим отклонениям от планарности, т.е. значениям ω . Возникающие здесь комбинаторно-геометрические задачи мало изучены. Для исследования этих явлений следует, по-видимому, привлечь соображения *дискретной дифференциальной геометрии* работ [15], [16], в которых был разработан очень эффективный алгоритм исследования рентгеновских и ЯМР баз данных.

В настоящее время уже не вызывает сомнения, что имеются конформации, в которых *пептидные связи некомпланарны*, и для которых значения энергии ниже, чем в случае планарных связей. Остановимся на следующих четырёх работах последних лет, которые следует отметить при рассмотрении подобных вопросов.

А.К. Dasgupta et al, [17], начинают с воспоминания о том, что согласно теории Pauling'a - Corey пептидная группа должна находиться в *trans*-форме, и угол кручения ω должен равняться 180° . Однако в ряде случаев угол ω отличается от этого значения более чем на 10° . Общая тенденция, что ω меньше чем 180° . Кроме того, часто встречаются *cis*-группы, в связи с чем можно говорить о наличии *cis - trans* изомерии. Авторы отмечают, что на момент написания работы никаких объяснений по этому поводу не приводилось. С целью выяснения этих обстоятельств авторы анализировали базы данных кристаллических структур, полученных рентгеновским рассеянием (236 структур при разрешении $1.2 \text{ \AA}$; 82 структуры при разрешении $1 \text{ \AA}$), а затем сравнивали их с данными нейтронного рассеяния. Полученным в результате такого анализа результатам придавалась убедительная, по мнению авторов, форма с помощью статистических формулировок. Утверждается, что результаты не зависят от аминокислотного состава белковой молекулы, её размеров и *конформации*, вто-

ричной структуры. Это утверждение звучит странно с учётом данных других работ, в которых утверждается обратное. Впрочем весомых доводов там тоже нет. В то же время авторы утверждают, спустя одну страницу, что значения $\omega < 179^\circ$ чаще встречаются для β структур, и даже приводят некоторое, довольно невразумительное, объяснение этого явления. Упоминается, что непланарность пептидных групп белковых молекул напоминает, по мнению авторов, непланарность amino-групп в молекулах ДНК. Тут стоит вспомнить, что в течении многих лет считалось, что пары оснований в двойной спирали молекулы ДНК планарны, т.е. лежат в одной плоскости. Но в 70-х годах уже было понято, что планарности тут нет, и был введён так называемый угол пропеллера, который описывает непланарность. Последний бывает распределён по последовательности пар оснований хаотическим образом, что существенно может влиять на упругую динамику молекул ДНК. Естественно задать вопрос, не имеет ли место аналогичное явление для белков (поскольку ω у белков напоминает угол пропеллера)? Если да, то пострадает целый ряд теорий, основанный на концепции однородности макромолекулы. В аннотации сказано, что непланарность пептидных связей может приводить к существенным медико-биологическим последствиям, но к каким именно на данный момент непонятно. Между тем, сами авторы утверждают о наличии связи непланарности с возможностью образования β -структур, что может иметь самые радикальные последствия для биологии.

В работе J.I. Mujika et al, [18] всё крутится вокруг попытки оправдать полинговскую резонансную модель, или хотя бы уточнить её. До некоторой степени авторам удаётся это сделать. Отмечается, что ранние теории (по-видимому, имеется в виду Pauling и Corey) декларировали, *несколько интуитивно (!)*, что имеет место резонанс между структурами, соответствующими (I) однократной связи, the nitrogen lone pair (nN), и (II) двойной связи с помощью π -орбитали (πCO), которая связана с sp^2 -гибридизацией атома азота. Таким образом, в терминах стандартной теории имеет место резонанс структур I и II, в результате которого $C - N$ связь становится частично двойной, и, как утверждается, отсюда следует её планарность и стабильность. Едва ли такие доводы можно признать вполне убедительными. Тут авторы замечают, что в действительности имеет место делокализация и электронная структура системы есть гибрид этих двух резонансных структур.

Авторы отмечают, что имели место попытки подправить положение дел, используя теорию ЛКАО, но они идейно противоречат подходу авторов, основанному на “теории” делокализации электронов. Авторы приходят к выводу, что имеет место

a contradictory picture with respect to the resonance model and experimental estimates of electron density.

Положение дел ещё более усугубляется, если принять во внимание данные ЯМР по химическим сдвигам. Авторы предлагают воспользоваться формализмом двухчастичной матрицы плотности, полагая, что таким образом они получают описание известной теории Lewis’a в физических терминах ². так или иначе, приходится прибегать к численным характеристикам, и с этой целью используется угол двугранного угла, описывающий отклонение от планарности, в терминологии авторов, τ . Элек-

² в оригинале трудно переводимая игра weasle words: *the Lewis model of electronic structure finds physical expression.*

тронная структура описывается одноэлектронными и двухэлектронными матрицами плотности, ρ и Γ . Отмечается наличие рассогласования с другими теориями, но утверждается, что в основном всё “ОК”, *happy end*. Впечатление от всего этого таково, что явление отсутствия планарности действительно имеет место, но все потуги просчитать его в рамках существующих методик далеки от завершенности.

В работе R. Improta et al, [19], проводится сравнение результатов квантово-механических расчетов и статистического исследования баз данных структур протеинов. При проведении расчетов рассматривались системы в водной и газовой среде. Было установлено, что *небольшие отклонения от планарности есть, скорее, правило, чем исключение*. Эти выводы согласуются с данными, полученными из статистического анализа баз данных. Показано, что дальние межмолекулярные взаимодействия, хотя и оказывают воздействие на планарность, но статистически усредняются. Таким образом, структура пептидных связей *определяется локальными факторами*, которые являются определяющими. Говорится, что условие планарности играет первостепенное значение для понимания структуры молекулы протеина. Оно описывается, как обычно, углом поворота ω вокруг оси $C - N$. Условие планарности приписывается наличию двойной связи $C = N$, при этом $\omega = 0^\circ$ для *cis* конфигурации и $\omega = 180^\circ$ для *trans*. Справедливо отмечается, что

This simple but powerful picture is the one commonly reported in all biochemistry textbooks, and it is part of the scientific background of most of the researchers in this field.

Но сразу же замечают, что эта *powerful picture* далеко не всегда верна. Наблюдаются *distortions*, и их причина и природа до сих пор не выяснена. Выводы содержатся в утверждении авторов:

According to our analysis it is therefore uncorrect to a priori assume that the maximum strength of the ?amide resonance interaction? is found for perfectly planar peptide geometries.

В работе D.S. Berkholza et al, [20], проводился *компьютерный анализ рентгеновских баз данных* на предмет выявления непланарных пептидных связей. Показано, что в пептидных группах могут быть отклонения от планарности более чем на 25° , и что истинное значение непланарности недооценивается. Подчёркивается хаотическая природа явления непланарности пептидных групп в молекуле. Вместе с тем, не делается каких-либо окончательных выводов по поводу природы непланарности.

3 Пептидная связь как двухуровневая система

Steven W. Ricka и R. E. Cachau предложили воспользоваться представлением пептидной группы как суперпозиции двух систем, см. стр. 2, или, как принято выражаться, резонансом указанных двух структур, *A* и *B*. На самом деле, если пользоваться понятиями квантовой механики, речь идёт о суперпозиции двух квантовых состояний.

Тем не менее, авторы не даже упоминают про волновую функцию, а лишь пишут, где им потребуется, линейные комбинации с коэффициентами C_{iA} , C_{iB} , где $i = 1, 2$ - номера пептидных групп, A , B - указывают на состояния пептидной группы. Накладывается условие

$$C_{iA}^2 + C_{iB}^2 = 1$$

и, где для этого имеется необходимость, берутся соответствующие средние. Например, для силовых констант полагается

$$V = C_{iA}^2 V_A + C_{iB}^2 V_B$$

где V_A, V_B - их значения в состояниях A и B . Энергия всей системы - белковой молекулы, - выписывается согласно принятым в соответствующих кругах правилам.

Работа интересна также тем, что предлагается учесть роль дипольных взаимодействий как фактор, влияющий на конформацию пептидных групп и образование вторичных структур, α -спиралей и β -листов. Действительно, стоит иметь в виду, что пептидные группы могут иметь дипольные моменты величины до $4D$. Отмечается также, что нестационарность конформации пептидов может оказать влияние на эффект folding'a протеинов. Делаются многочисленные упоминания, как правило, в положительном смысле, о согласовании с экспериментом, но из текста работы трудно сделать какие-либо выводы об их правомерности. Исходя из этого можно заключить, что работа содержит новые интересные идеи, но не понятно, до какой стадии развития они доведены.

4 Дипольные моменты и структура белков

Вопросы, относящиеся к электронам в макромолекулах, всегда самые трудные. Пептидные связи несут на себе заряды, соответствующие дипольному моменту $3.5 D$. В указанной выше работе [21] была сделана интересная попытка провести исследование в этом направлении. Следует отметить, что переход от зарядов к диполям является загрублением, поскольку при этом игнорируются мультипольные члены выше второго порядка. С другой стороны, аккуратный учёт распределения заряда в пептидной связи (в частности, электронной плотности с учётом квантовых эффектов) крайне сложен. В этом отношении, дипольное приближение является хорошим компромиссом между точностью и практичностью, и может служить для объяснения качественных эффектов, возникающих в полипептидной цепи.

Устойчивость базовых элементов вторичной структуры белков во многом объясняется наличием в них сети водородных связей, рис. 4 и 5.

С другой стороны, если рассмотреть, например, процесс сворачивания (folding) полипептидной цепи, то можно говорить о важной роли электростатических сил, поскольку они являются дальнедействующими и определяют динамику белка в отсутствии водородных связей. Водородные связи являются короткодействующими и имеют определенное направление, поэтому для их появления в структуре (например, альфа-спирали или бета-листе), конфигурация полипептидной цепи должна сперва

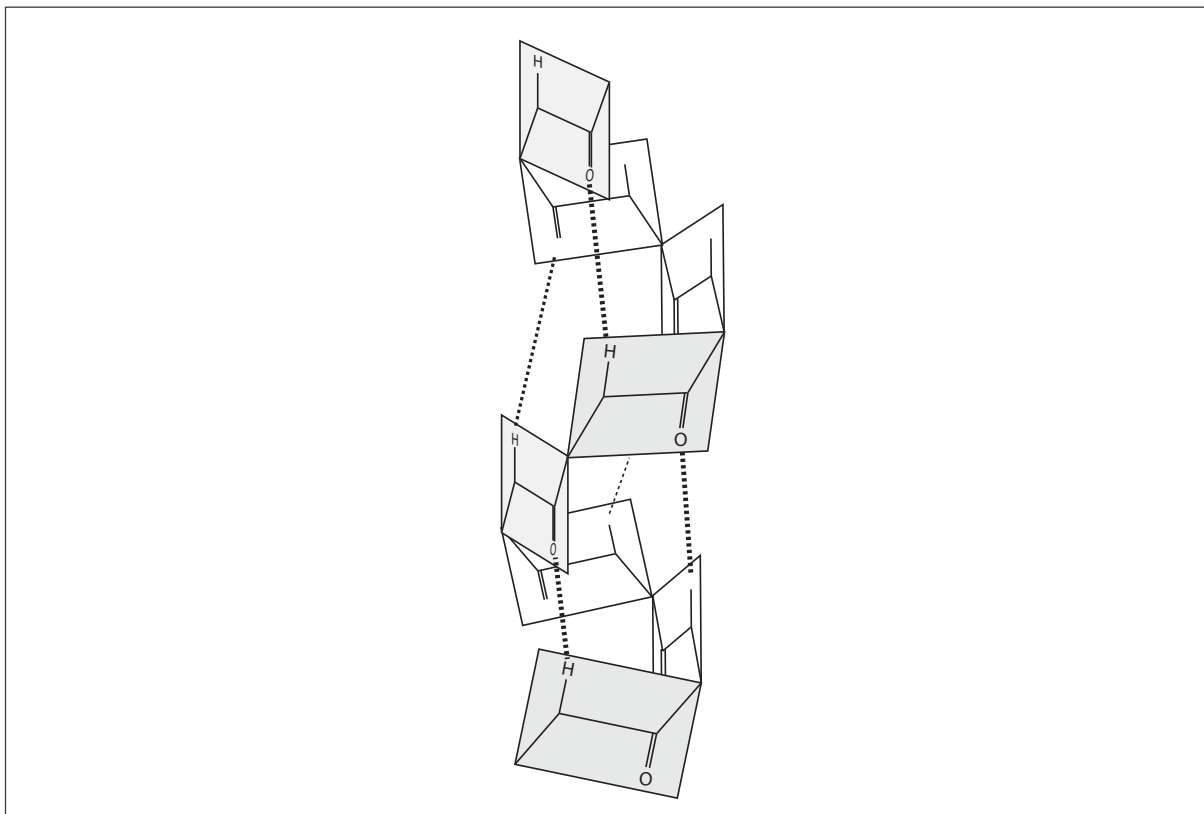


Рис. 4: Расположение пептидных групп в одном элементе вторичной структуры белков – α –спирали. Пунктиром показаны водородные связи.

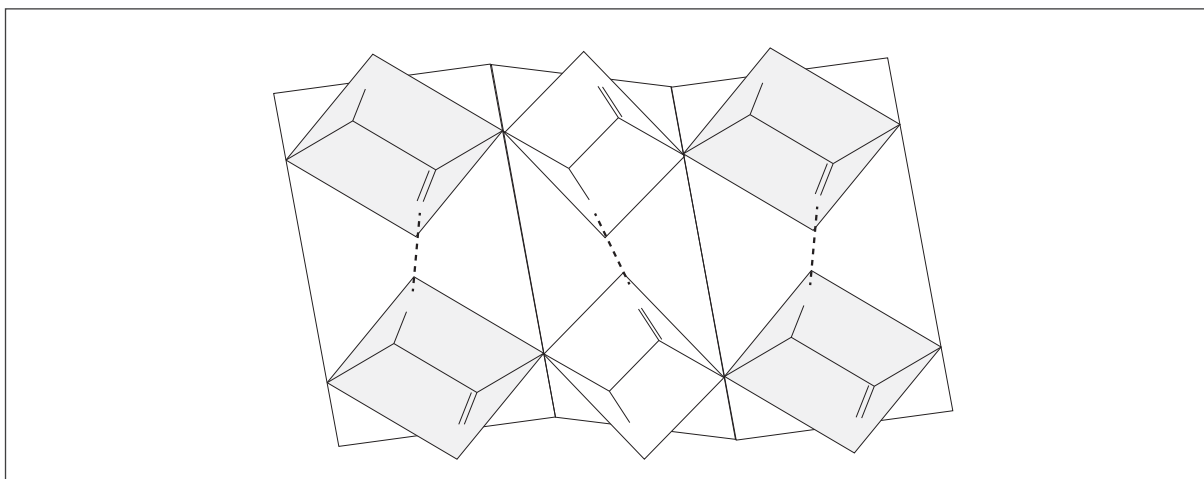


Рис. 5: Расположение пептидных групп в одном элементе вторичной структуры белков – β –листе (симметричном). Пунктиром показаны водородные связи.

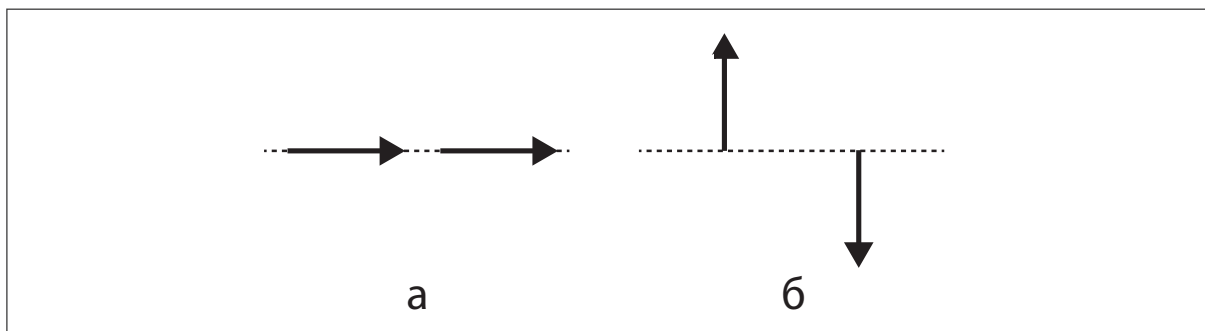


Рис. 6: Конфигурации диполей, при которых достигается минимум энергии: (а) при фиксированном расстоянии; (б) при условии $\mathbf{d}_i \cdot \mathbf{r} = 0$, $i = 1, 2$.

приблизиться к этой структуре. Мы предполагаем, что такое приближение происходит за счёт электростатических сил, а именно, диполь-дипольных взаимодействий пептидных связей.

Для того, чтобы обосновать нашу точку зрения, укажем ряд особенностей дипольных взаимодействий. Если рассмотреть два точечных диполя $\mathbf{d}_1$ и $\mathbf{d}_2$ на расстоянии $\mathbf{r}$, то энергия их взаимодействия имеет вид

$$U_{dd} = \frac{\mathbf{d}_1 \cdot \mathbf{d}_2}{|\mathbf{r}|^3} - 3 \frac{[\mathbf{d}_1 \cdot \mathbf{r}][\mathbf{d}_2 \cdot \mathbf{r}]}{|\mathbf{r}|^5}.$$

Минимуму энергии при заданном $R = |\mathbf{r}|$ соответствует конфигурация дипольных моментов, при которой они сонаправлены и лежат на прямой, соединяющей точки их приложения, рис. 6а. При увеличении числа диполей минимальному значению энергии будут соответствовать линейные структуры (цепочки) из диполей, если запретить точкам приложения диполей приближаться на расстояния, меньшие некоторого R_{min} .

Таким образом, когда два свободно вращающихся дипольных момента сближаются, они стремятся согласовать свои направления “друг за другом”, образуя цепочечную конфигурацию. Более подробно такие системы изучаются, например, в [22].

Другим интересным для нас случаем является такое расположение дипольных моментов, при котором выполняется условие $\mathbf{d}_i \cdot \mathbf{r} = 0$, $i = 1, 2$, то есть, когда диполи жёстко прикреплены к некоторому линейному каркасу, их направление ему перпендикулярно, и разрешено только вращение вокруг каркаса. Такая ситуация (с некоторой погрешностью) реализуется в случае линейной полипептидной цепи. В этом случае минимальному значению энергии соответствует антипараллельная структура, рис. 6б.

Как будет показано ниже, расположение дипольных моментов пептидных связей во вторичных структурах белков согласуются с приведёнными конфигурациями, при которых достигается минимум энергии диполь-дипольных взаимодействий, рис. 8 и 9.

В последнее время появились идеи, основанные на недавних экспериментальных исследованиях, согласно которым в структуре белковых молекул имеют место мотивы сегнетоэлектриков. Тут стоит обратить внимание прежде всего на работу [23], в которой моделируется воздействие внешнего электрического поля на вторичные

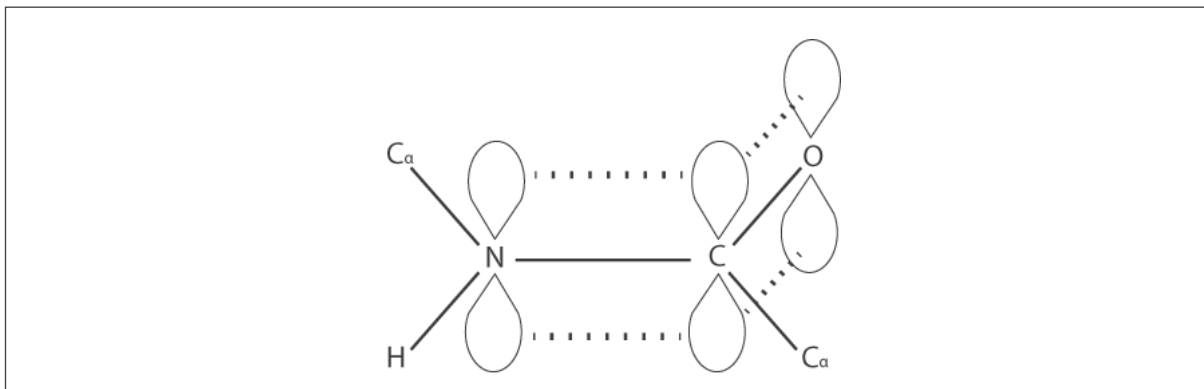


Рис. 7: Распределение зарядов в пептидной группе согласно работе [4]. Все шесть атомов в одной плоскости, π -орбитали к ней перпендикулярны. Пунктиром показаны электронные облака, образованные пересечением орбиталей углерода и азота. Суперпозиция состояний соответствует формам Рис.1.

структуры белковых молекул. Основным соображением является учет воздействия внешнего поля на диполи пептидных связей. Ожидаемый эффект проистекает из-за упорядочивания диполей вдоль поля и их взаимодействием между собой. По сути, происходит вычисление статистической суммы с помощью одного из вариантов метода Монте-Карло.

Существенным вкладом является вид энергии-гамильтониана, предложенный в работе [24] для описания подобных систем. Он основан на крупнозернистом подходе к строению молекулы: остатки аминокислот рассматриваются как твердые непересекающиеся сферы, прикрепленные к пептидным группам, которые рассматриваются с точностью до их атомной структуры. Сами пептидные группы предполагаются плоскими, т.е. характерный угол $\omega = 0$, в *trans*-форме, их положение в пространстве описывается углами Ramachandra, а взаимодействие учитывается с помощью разновидности потенциала Леннарда-Джонса. Наиболее существенную роль для конформации молекулы играют водородные связи и дипольные моменты пептидных групп. В рамках указанной модели переходы между вторичными структурами белковой молекулы выглядят как фазовые переходы сегнетоэлектрика.

В этом отношении работа очень интересна, т.к. содержит новые идеи и представления. Вместе с тем следует отметить, что игнорируются :

1. возможность непланарности пептидных связей
2. возможность более сложной динамики остова пептидных связей
3. влияние внешней среды (трактруется слишком упрощённо)

В работе приводится интересная аналогия полученных результатов с явлениями, которые имеют место для магнетиков. Парамагнитному состоянию соответствует неупорядоченная конформация протеина, для которой диполи ориентированы случайным образом при условии отсутствия внешнего поля. Ферромагнитному соответствует α -спираль. Антиферромагнитному состоянию соответствует β -слой, в котором близкие диполи ориентированы антипараллельно.

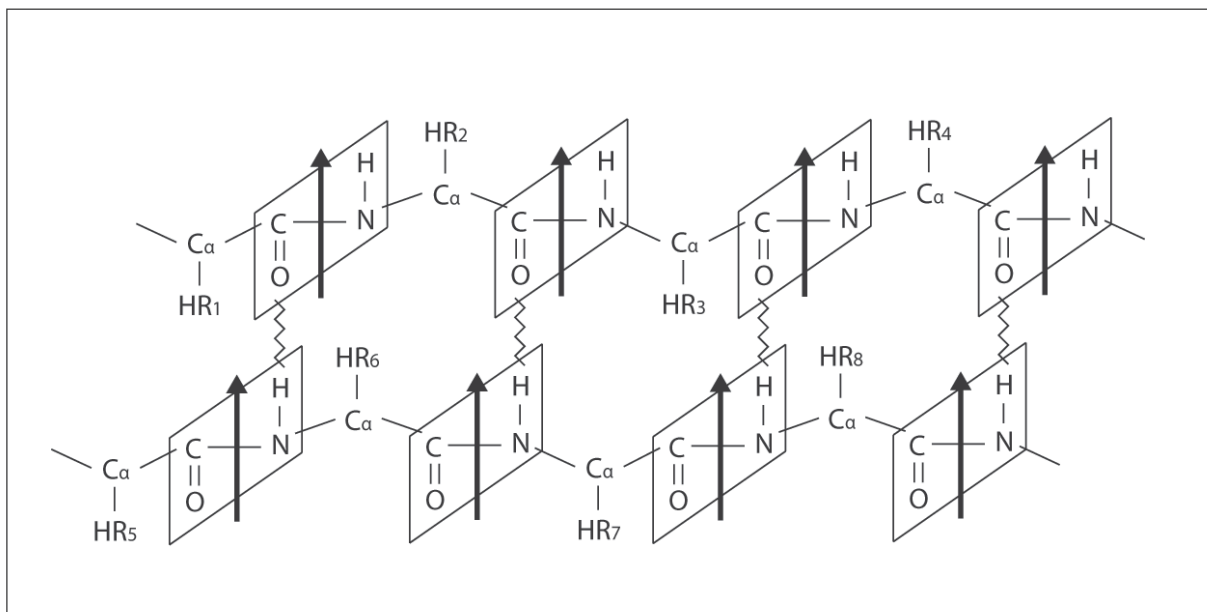


Рис. 8: Конфигурация дипольных моментов пептидных групп в структуре α -спирали полипептидной цепи. Жирные стрелы дипольные моменты пептидных групп, **D**.

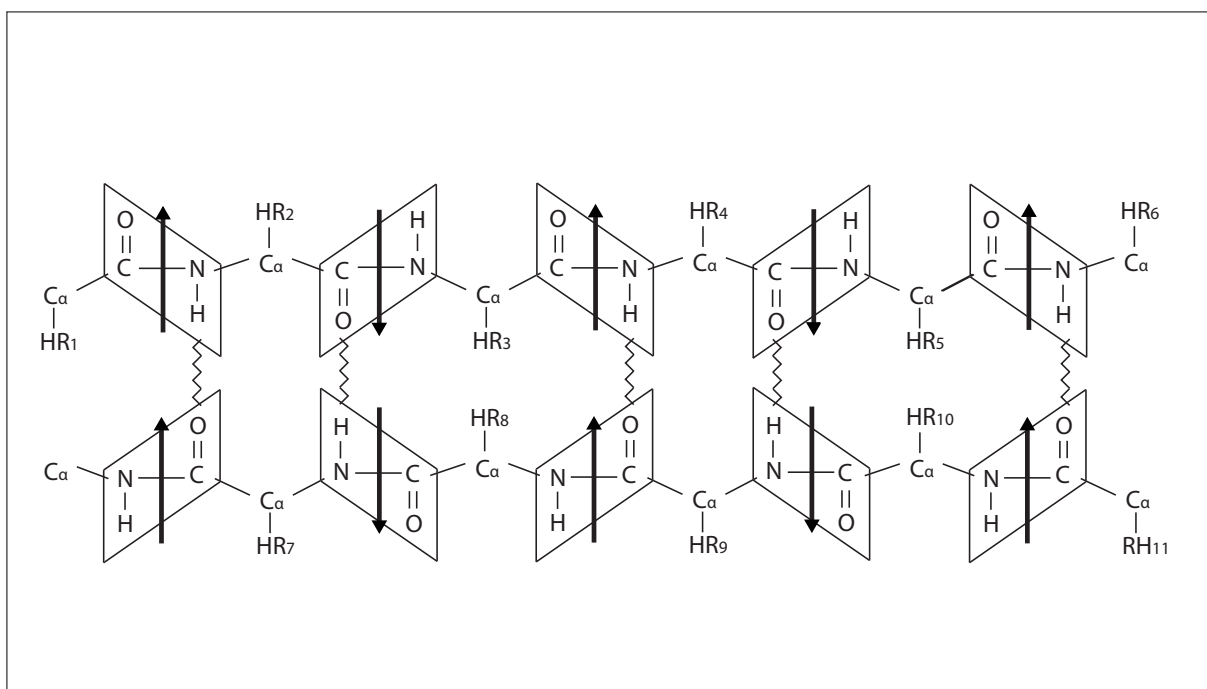


Рис. 9: Конфигурация дипольных моментов пептидных групп в структуре β -листа полипептидной цепи. Жирные стрелы дипольные моменты пептидных групп, **D**.

Здесь следует ещё раз отметить, что структура пептидных групп ещё очень далека от ясного понимания. В этом отношении очень интересна работа [4], в которой приводятся весомые аргументы, что обычные доводы в пользу планарности пептидной группы далеко не убедительны. Автор указывает, что, с одной стороны, пептидную группу принято представлять как “смесь двух резонансных форм”, в одной из которых атом азота имеет положительный заряд, из чего заключают, что полный заряд атома азота положителен, а, с другой стороны, в расчетах по молекулярному моделированию используют отрицательный заряд азота. В качестве оправдания приводят то соображение, что заряды самих резонансных форм следует считать формальными.

Имеются существенные трудности в анализе этих вопросов, которые представляют вызов для теоретиков. Как указывается в [4], имеют место рассогласования:

“Different authors use different methods, some based on quantum mechanics and some on semi-empirical calculations; they can give rise to substantially different sets of figures”.

Автор также отмечает, что, с одной стороны, согласно базе данных Brookhaven Protein Data Bank в пептидных группах преобладает планарность, но причины для того могут быть “неадекватные”:

This could be due to a lack of resolution combined with the restraint toward planarity in the refinement programs used by protein crystallographers. The restraint does not enforce total planarity, but it does impose a bias favoring it.

а, с другой стороны, согласно Cambridge Crystallographic Database малые молекулы полипептидов

which are at higher resolution and not subject to the same restraints in the refinement process as the protein structures, exhibit significantly nonplanar peptide bonds.

Во всяком случае, доводы, основанные исключительно на соображениях “резонанса”, не достаточны.

5 Гидратация

Вполне вероятно, что благодаря дипольным моментам пептидных групп явление некомпланарности пептидной связи оказывается в том же круге проблем, что и явление гидратации. Последний представляет благодатное поле для деятельности теоретиков ввиду наличия большого числа проблем, разрешение которых проверить трудно, если вообще возможно.

В связи с этим особый интерес представляют работы, в которых исследование проводится на основе физических величин, допускающих непосредственное измерение.

Так в работе [25] проводится численное моделирование процесса гидратации белковой молекулы и эффективной диэлектрической проницаемости, которая описывает средний дипольный момент, индуцированный внешним полем в молекуле протеина. Получается, что эта величина может существенно меняться (на порядки величин) для различных молекул. Высказывается предположение, что это явление вызвано эффектами экранировки дипольных моментов протеина гидратной оболочкой (*hydration shell*). По-видимому, имеет место частотная зависимость. К сожалению, эксперимента, который бы напрямую подтверждал выводы автора, не имеется.

Более интересна предшествующая работа [26]; в ней показано, что гидратная оболочка белковой молекулы поляризуется до состояния сегнетоэлектрика, характеризующегося большими значениями среднего дипольного момента и его среднего квадратичного отклонения, т.е. ширина линии электростатических флуктуаций неожиданно возрастает. Предлагается гипотеза о наличии некоторой электростатической согласованности рассматриваемой макромолекулы и её гидратной оболочки вплоть до $15 - 20 \text{ \AA}$ вглубь объемлющей жидкости, из-за чего эффективный дипольный момент значительно превосходит дипольный момент самой молекулы. Таким образом, выводы совпадают с полученными в работе [25]. Возникает вопрос, что авторы имеют в виду, когда они пишут “*elastic*” water shell. Кроме того, они утверждают, что каким-то образом учли наличие водородных связей и даже их динамику в окружающем слое воды толщиной $15 - 20 \text{ \AA}$. В этом отношении следует отметить, что аккуратный учёт подобных явлений требует значительных усилий. Например, согласно последним экспериментальным данным, на указанных масштабах проявляется зернистая структура воды, в связи с чем необходимо, вообще говоря, учитывать, что в воде имеются образования, напоминающие “льдинки”. В отношении последних, в свою очередь, имеется ряд вопросов:

1. Как они влияют на гидратацию?
2. Что может дать малоугловое рентгеновское рассеяние для этой проблемы?
3. Если льдинки имеются в объёме, то можно ли их увидеть вблизи молекул ?
4. Какая фаза имеет место для адсорбированной воды?

6 Заключение и замечания

Поразительно, что эффект больших дипольных моментов у пептидных групп стал рассматриваться сравнительно недавно и как-то робко. В то время как можно предположить, что именно он является причиной возникновения вторичных структур белков, α -спиралей и β -листов. Чтобы убедиться в этом достаточно на обычных картинках, выдаваемых за “доказательства” их наличия, подрисовать дипольные моменты пептидных групп и вспомнить, что они много больше дипольных моментов водородных связей, с которыми принято связывать существование вторичных структур. Дипольные силы являются дальнедействующими, а потому могут объяснить,

например, образование вторичных структур при фолдинге. Кроме того, становится понятнее, откуда берётся эффект $\alpha \longleftrightarrow \beta$ переходов, который видят при численном моделировании пептидов.

Описание непланарности пептидной связи ещё ждёт своего адекватного теоретического описания. Здесь надо последовательно работать с аппаратом квантовой механики. Несомненно, что оно окажется связанным с трёхмерными конформационными эффектами структур спиралей и листов.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

Список литературы

- [1] *Бреслер С.Е.* Молекулярная биология // Наука, Москва (1973).
- [2] *Pauling L.* The nature of the chemical bond. // Cornell University Press, London: Oxford University Press (1960).
- [3] *Pauling L., Corey R.B., and Branson H.R.* The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. // Proc.Nat.Sci. Acad. USA **37**, 205 (1951).
- [4] *Milner-Wite E. James* The partial charge of the nitrogen atom in peptide bonds //, Protein Science, **6**, 2477-2482, (1997).
- [5] *Ramachandran G.N.* Need for Nonplanar Peptide Units in Polypeptide Chains. // Biopolymers **6**, 1494 (1968).
- [6] *Heitler H. and London F.* Wechselwirkung neutraler Atome und homöopolare Bindung nach der Quantenmechanik // Z. Phys., **44**, 455 (1927).
- [7] *Ферми Э.* Молекулы и кристаллы // Иностранная литература, Москва (1947).
- [8] *Коулсон Ч.* Валентность // Мир, Москва (1965).
- [9] *Пенни В., Ван-Флек И., Шерман А.* Квантовая теория валентности // ГОНТИ, Москва (1938).
- [10] *Gavroglu K. Fritz* London: A scientific biography // Cambridge Univ. Press (1995).
- [11] *Дьюар М.* Теория молекулярных орбиталей в органической химии // Мир, Москва (1972).
- [12] *Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., and Sasisekharan V.* Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations // J. Mol. Biol. **7**, 95 (1963).
- [13] *Ramachandran G.N., Lakshminarayanan A.V., and Kolaskar A.S.* Theory of non-planar peptide unit // Biochimica et Biophysica Acta, **303**, 8 (1973).
- [14] *Subramanian Easwara G.N. Ramachandran* (obituary) // Nature Structural Biology **8**, 489 2001.

- [15] Мищенко А.С., Иванов А.О., Тужлилин А.А. Геометрия ломаных и полипептидов // Наноструктуры. Матем.физика и моделирование, **10**, 39 (2014).
- [16] Мищенко А.С., Иванов А.О., Тужлилин А.А. Геометрия аминокислот и полипептидов // Наноструктуры. Матем.физика и моделирование, **10**, 49 (2014).
- [17] Dasgupta A.N., Majumdar R., and Bhatthacharyya D. Characterization of non-planar peptide-grpups in protein crystal structures // Indian J. Biochem. Biophys. **41**, 233 - 240 (2004).
- [18] Mujika Jon I. , Matrain Jon M. , Eriksson Leif A. , and Lopez Xabier Resonance Structures of the Amide Bond: The Advantages of Planarity // Chem. Eur. J., **12**, 7215 ? 7224, (2006)
- [19] Roberto Improta , Luigi Vitagliano , and Luigi Esposito Peptide Bond Distortions from Planarity: New Insights from Quantum Mechanical Calculations and Peptide/Protein Crystal Structures // PLoS ONE | www.plosone.org, **6**, Issue 9, e24533 (September 2011).
- [20] Berkholtz D.S. , Driggersa C.M.,Shapovalovc M.V. , Dunbrack R.L. , Jr., and Karplusa P.A. Nonplanar peptide bonds in proteins are common and conserved but not biased toward active sites // Proc.Nat.Sci. Acad. USA **109**, 499 (2012).
- [21] Ricka Steven W. and Cachau R. E. The nonplanarity of the peptide group: Molecular dynamics simulations with a polarizable two-state model for the peptide bond // J.Chem. Phys. **112** , 5230 (2000).
- [22] Блинов В.Н., Буравцев В.Н. , Макарова Т.И. , Полетаев А.И. Самоорганизация системы дипольных частиц в модели Кеезома // Вестник МГУ Серия 3. Физика. Астрономия. ? 2013. ? Т. 4 ? С. 34-39.
- [23] Ojeda-May Pedro and Garcia Martin E. Electric Field-Driven Disruption of a Native b-Sheet Protein Conformation and Generation of a Helix-Structure // Biophysical Journal, **99**, 595?599 (2010).
- [24] Chen Nan-Yow , Su Zheng-Yao, Mou Chung-Yu Effective potentials for Folding Proteins // Phys.Rev.Lett., **96**, 078103 (2006).
- [25] Matyushov Dmitry V. Dipolar response of hydrated proteins // arXiv:1108.2713v1 [physics.bio-ph] 12 Aug 2011.
- [26] LeBard David N. and Matyushov Dmitry V. Ferroelectric Hydration Shells around Proteins: Electrostatics of the Protein-Water // J. Phys. Chem. **B 114**, 9246?9258 (2010).700

ON THE PLANAR STRUCTURE OF THE PEPTIDE BOND

V.N. Blinov¹, V.L. Golo²

¹*Moscow Institute of Electronics and Mathematics,
The Higher School of Economics, Moscow*

²*Department of Mechanics and Mathematics
the Lomonosov Moscow State University, Moscow*

voislav.golo@gmail.com

Received 05.08.2014

This is a short review of a few recent papers on the peptide bond in protein molecules. The break down of the planar structure of the peptide bond is discussed.

