

energy. This result is more in agreement with the previously mentioned NMR data than the results from the calculations with  $\epsilon = 1$ . Future calculations on saccharides will decide whether  $\epsilon = 3$  should be used in the case of intramolecular energies, or that the apparent disagreement between experimental and theoretical results is due to the packing effects described above.

#### References

- ALLINGER, N. L. & CHUNG, D. Y. (1976). *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 6798–6803.  
 ALLINGER, N. L., TRIBBLE, M. T., MILLER, M. A. & WERTZ, D. H. (1971). *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1637–1648.  
 ALLINGER, N. L. & YUH, Y. H. (1980). *Quantum Chemistry Program Exchange*, No. 423. Chemistry Department, Indiana Univ., Bloomington, IN.  
 BROWN, G. M. & LEVY, H. A. (1979). *Acta Cryst.* **B35**, 656–659.

- ELIEL, E. L., ALLINGER, N. L., ANGYAL, S. J. & MORRISON, G. A. (1965). In *Conformational Analysis*, Ch. 6. New York: Wiley Interscience.  
 HOUGH, E., NEIDLE, S., ROGERS, D. & TROUGHTON, P. G. H. (1973). *Acta Cryst.* **B29**, 365–367.  
 JEFFREY, G. A. (1982). In *Molecular Structure and Biological Activity*, edited by J. F. GRIFFIN & W. L. DUAX. New York: Elsevier Biomedical.  
 JEFFREY, G. A. & TAYLOR, R. (1980). *J. Comput. Chem.* **1**, 99–109.  
 KILDEBY, K., MELBERG, S. & RASMUSSEN, K. (1977). *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **31**, 1–13.  
 KROON-BATENBURG, L. M. J. & KANTERS, J. A. (1983). *J. Mol. Struct.* Submitted.  
 MARCHESSAULT, R. H. & PÉREZ, S. (1979). *Biopolymers*, **18**, 2369–2374.  
 MATSUOKA, O., CLEMENTI, E. & YOSHIMINE, M. (1976). *J. Chem. Phys.* **64**, 1351–1361.  
 STREEFKERK, D. G., DE BIE, M. J. A. & Vliegenthart, J. F. G. (1973). *Tetrahedron*, **29**, 833–844.

*Acta Cryst.* (1983). **B39**, 754–760

## Etude Conformationnelle par Diffraction des Rayons X et Calcul Théorique du Fragment 23–26 de l'ACTH: Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> · 0,7C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS

PAR M. COTRAIT, S. GEOFFRE, M. HOSPITAL ET G. PRÉCIGOUX

Laboratoire de Cristallographie associé au CNRS, LA 144, 351 avenue de la Libération, 33405 Talence CEDEX, France

(Reçu le 24 janvier 1983, accepté le 18 juillet 1983)

#### Abstract

A conformational study of Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH, the 23–26 ACTH fragment, is presented, in the solid state using X-ray analysis (Cu K $\alpha$ ) and in the isolated state by empirical calculations. Monoclinic,  $P2_1$ ,  $a = 9.574(3)$ ,  $b = 9.831(3)$ ,  $c = 15.707(4)$  Å,  $\beta = 103.06(1)^\circ$ ,  $V = 1440$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ . In the crystal, the tetrapeptide has an approximately stretched conformation and is involved in numerous intermolecular hydrogen bonds; this conformation is rather close to those of its zwitterionic form. Theoretical calculations show that the most stable conformation (by 11–25 kJ mol<sup>-1</sup>) is the (Pro<sub>2</sub>-Tyr<sub>3</sub>)  $\beta$  turn III. It is followed by numerous partially or fully stretched structures as well as the (Pro<sub>2</sub>-Tyr<sub>3</sub>)  $\beta$  turns II and I. It appears that such a short peptide may adopt various conformations in a limited range of energy, some of which may be stabilized by surrounding molecules.

L'hormone adrénocorticotrope (ACTH) est un peptide linéaire, constitué de 39 acides aminés, produit par l'hypophyse antérieure. Son action biologique prin-

cipale est la stimulation et la régulation de la sécrétion des corticostéroïdes (Sayers, Beall & Seelig, 1974). De nombreuses études ont montré que l'ACTH et certains de ses fragments sont aussi impliqués dans le processus comportemental chez l'animal (de Wied, 1974).

Les études physicochimiques les plus récentes: par dichroïsme circulaire, RMN et prédictions conformationnelles (Toma, Greff, Fermandjian, Löw & Kisfaludy, 1976; Toma, Fermandjian, Löw & Kisfaludy, 1978; Mutter, Mutter & Bayer, 1979) sont plus ou moins en faveur d'une structure non ordonnée pour l'ACTH 16–22 ou 17–24 mais sont en désaccord en ce qui concerne la partie C-terminale. Par exemple, Jibson & Li (1979) concluent à la formation d'un ' $\beta$  turn' pour le fragment 23–26 suivi d'une hélice  $\alpha$  pour la séquence 27–35 tandis que Mutter *et al.* (1979) inclinent pour une structure non ordonnée suivie par une structure en feuillet  $\beta_p$ .

Pour apporter un éclairage nouveau à ce problème, nous avons synthétisé, cristallisé, établi la structure cristalline du fragment 23–26 et calculé les conformations les plus probables du térapeptide.

## Partie expérimentale

## Synthèses et purifications

Le peptide L-Tyr-L-Pro-L-Asn-L-Gly et son analogue partiellement protégé acétyl-L-Tyr-L-Pro-L-Asn-L-Gly-OH ont été synthétisés en phase solide. La synthèse a été effectuée sur un appareil automatique mis au point au laboratoire.

Les acides aminés protégés (*N*-Boc) sont d'origine Bachem. La fixation du premier acide aminé sur la résine a été réalisée après réaction du sel de césium de la Boc-glycine avec une résine chlorométhylée de polystyrène-1%-divinylbenzène (Gisin, 1973; Wang, Gisin, Winter & Makofske, 1977).

Le principe de fixation de chaque acide aminé comprend la déprotection par l'acide trifluoroacétique à 30%, la neutralisation avec 10% de diisopropyl-éthylamine dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et le couplage en utilisant le dicyclohexylcarbodiimide (Sheehan & Hess, 1955) ou un ester actif dans le cas du résidu asparaginy (Bodanozky, 1955). Les peptides ont été coupés de la résine par l'acide fluorhydrique en présence d'anisole puis précipités par l'éther, filtrés et extraits par l'acide acétique dilué. Les produits bruts ont d'abord été purifiés par perméation de gel (Biogel P2 sur colonne  $95 \times 2,4$  cm) utilisant l'acide acétique 0,1 *M* comme éluant. La dernière étape a été la chromatographie liquide haute pression en phase inverse (colonne Waters  $\text{C}_{18}$ -Bondapack) avec comme phase mobile un mélange méthanol-eau. Les profils d'éluion en HPLC des pics majeurs obtenus par filtration sur Biogel P2 sont représentés sur la Fig. 1.

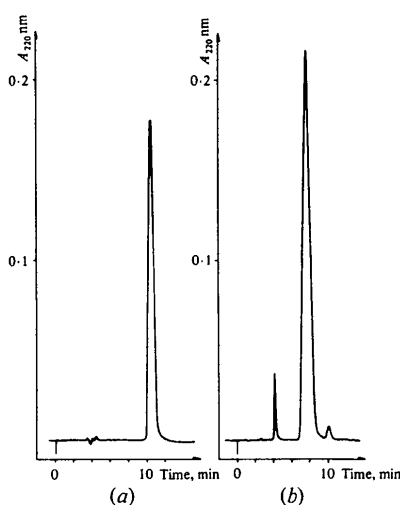


Fig. 1. Profils d'éluion en chromatographie liquide haute pression des composés A et B. (a) Composé A: Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH. Solvant: MeOH 20%,  $\text{H}_2\text{O}$  80%;  $\text{AcONH}_4$ :  $\chi = 8 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ , débit: 3  $\text{ml min}^{-1}$ . (b) Composé B: Tyr-Pro-Asn-Gly. Solvant: MeOH 10%,  $\text{H}_2\text{O}$  90%;  $\text{AcONH}_4$ :  $\chi = 8 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ , débit: 4  $\text{ml min}^{-1}$ .

## Données cristallines et détermination de la structure

Des cristaux d'Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH ont été obtenus par lente évaporation d'une solution dans un mélange de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'eau. Le cristal utilisé pour les mesures a des dimensions voisines de  $0,1 \times 0,4 \times 0,6$  mm. Les intensités des réflexions ont été mesurées sur un diffractomètre automatique Nonius CAD-4 en utilisant la radiation  $\text{Cu K}\alpha$  monochromatisée par une lame de graphite. Les paramètres de la maille ont été affinés à partir de 18 réflexions avec  $8^\circ < \theta < 28^\circ$ .

Les intensités des deux réflexions test, mesurées toutes les 50 réflexions, n'ont pas variées de manière significative ( $\Delta I/I < 0,02$ ) tout au long des mesures effectuées sur le domaine  $60^\circ > \theta > 2^\circ$ . Aucune correction d'absorption n'a été effectuée. Parmi les 2280 réflexions mesurées, 1795 ont été considérées comme observées [ $I > 3\sigma(I)$ ]. La structure a été résolue par méthodes directes en utilisant le programme MULTAN 78 (Main, Hull, Lessinger, Germain, Declercq & Woolfson, 1978). Les positions atomiques ont été affinées par moindres carrés sur  $(F_o - F_c)^2$ , et en utilisant l'approximation des blocs diagonaux et un facteur de température  $B_i$  isotrope indépendant pour chaque atome C, N, O. Les atomes d'hydrogène ont été introduits en position théorique lorsque cela était possible ou repérés sur les sections différence de Fourier. L'inclusion de DMSO a été affinée avec un facteur d'occupation égal à 0,7 seulement; l'atome de soufre occupe deux positions statistiquement équivalentes.

Cette valeur est *a priori* suprenante mais une valeur égale à l'unité correspond à des valeurs négatives importantes sur les sections 'différence' de Fourier. Un facteur d'occupation non stœchiométrique a déjà été observé, notamment dans le cas du térapeptide Tyr-Gly-Gly-Phe (Prangé & Pascard, 1979).

L'affinement avec les facteurs de température anisotropes pour les atomes C, N et O, et isotropes pour les atomes d'hydrogène a conduit à un indice résiduel égal à 0,078. Les facteurs de diffusion atomique utilisés sont ceux de *International Tables for X-ray Crystallography* (1974) pour les atomes C, N et O, et ceux de Stewart, Davidson & Simpson (1965) pour les atomes d'hydrogène. Le schéma de pondération utilisé est  $\sqrt{w} = 1$  si  $|F_o| < p$  et  $\sqrt{w} = p/F_o$  si  $|F_o| > p$  avec  $p = [F_o^2(\text{max.})/10]^{1/2}$ . Les coordonnées atomiques finales sont indiquées sur le Tableau I et une projection de la structure suivant l'axe *x* est montrée sur la Fig. 2.\*

\* Les listes des facteurs de structure, des paramètres thermiques anisotropes et des coordonnées des atomes d'hydrogène ont été déposées au dépôt d'archives de la British Library Lending Division (Supplementary Publication No. SUP 38725: 17 pp.). On peut en obtenir des copies en s'adressant à: The Executive Secretary, International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, Angleterre.

Tableau 1. Paramètres atomiques cristallins définitifs ( $\times 10^3$ ), et paramètres thermiques équivalents  $B_{eq}$

	$B_{eq} = \frac{4}{3} \sum_i \sum_j \beta_{ij} a_i \cdot a_j$			$B_{eq} (\text{Å}^2)$
	x	y	z	
<b>Acétyl</b>				
C(1)	241 (2)	736 (2)	771 (1)	5,3 (6)
C(2)	173 (2)	774 (1)	678 (1)	3,4 (4)
O(3)	42 (1)	777 (1)	650 (1)	3,8 (3)
<b>Tyrosyl</b>				
N	265 (1)	811 (1)	628 (1)	2,9 (3)
C <sup>α</sup>	213 (1)	848 (1)	538 (1)	2,7 (4)
C'	160 (1)	721 (1)	481 (1)	2,9 (4)
O	214 (1)	607 (1)	503 (1)	3,8 (3)
C <sup>β</sup>	335 (1)	915 (2)	503 (1)	3,2 (4)
C <sup>γ</sup>	359 (1)	1062 (1)	530 (1)	3,0 (4)
C <sup>δ1</sup>	463 (1)	1100 (2)	605 (1)	3,0 (4)
C <sup>δ2</sup>	271 (2)	1160 (2)	487 (1)	3,4 (4)
C <sup>ε1</sup>	479 (1)	1235 (2)	632 (1)	3,4 (4)
C <sup>ε2</sup>	286 (1)	1297 (1)	511 (1)	3,0 (4)
C <sup>ε</sup>	388 (1)	1331 (1)	586 (1)	3,0 (4)
O <sup>η</sup>	404 (1)	1467 (1)	615 (1)	3,6 (3)
<b>Prolyl</b>				
N	64 (1)	740 (1)	407 (1)	2,7 (3)
C <sup>α</sup>	15 (1)	623 (1)	352 (1)	2,8 (4)
C'	112 (1)	591 (2)	289 (1)	2,8 (4)
O	170 (1)	684 (1)	255 (1)	3,2 (3)
C <sup>β</sup>	-133 (2)	669 (2)	300 (1)	4,1 (5)
C <sup>γ</sup>	-123 (2)	822 (2)	294 (1)	3,8 (5)
C <sup>δ</sup>	-15 (2)	864 (2)	375 (1)	3,9 (5)
<b>Asparaginyll</b>				
N	125 (1)	464 (1)	270 (1)	2,9 (3)
C <sup>α</sup>	179 (1)	421 (2)	194 (1)	3,2 (4)
C'	64 (2)	457 (2)	111 (1)	3,2 (4)
O	-60 (1)	436 (1)	105 (1)	4,7 (4)
C <sup>β</sup>	204 (1)	271 (2)	193 (1)	3,3 (4)
C <sup>γ</sup>	342 (2)	226 (2)	259 (1)	3,9 (4)
N <sup>δ2</sup>	349 (1)	91 (1)	269 (1)	5,3 (5)
O <sup>δ1</sup>	432 (1)	303 (1)	292 (1)	4,7 (3)
<b>Glycine</b>				
N	116 (1)	503 (1)	44 (1)	3,6 (4)
C <sup>α</sup>	23 (2)	524 (2)	-40 (1)	3,8 (5)
C'	-11 (2)	392 (2)	-87 (1)	4,1 (5)
O'	56 (1)	289 (1)	-70 (1)	5,7 (4)
O''	-115 (1)	405 (1)	-160 (1)	4,5 (3)
<b>Diméthylsulfoxyde</b>				
O,7C(1)	376 (3)	144 (3)	-9 (2)	9,2 (6)
O,7C(2)	566 (3)	295 (4)	-70 (2)	10,1 (7)
O,7O	602 (2)	39 (2)	-23 (1)	7,3 (6)
O,35S'	533 (2)	174 (2)	-10 (1)	6,0 (6)
O,35S''	477 (2)	134 (2)	-92 (1)	7,5 (6)

### Analyse conformationnelle théorique

L'analyse conformationnelle théorique du térapeptide Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH a été réalisée en utilisant des méthodes empiriques. Une approche séquentielle (Anderson & Scheraga, 1978; Cotrait & Ptak, 1981), combinant les conformations de faible énergie des restes ou des peptides constitutifs du térapeptide étudié, a été utilisée. Une telle méthode semble être plus appropriée qu'une méthode statistique (Premilat & Maigret, 1980) pour analyser les contributions de chacun des restes. En outre, les repliements types tels que les  $\beta$  turns ont été considérés séparément.

Toutes les séquences intermédiaires ont été étudiées sous la forme de peptides protégés: la présence des groupements terminaux protecteurs acétyl (Ac) et méthylamide (MA) élimine les effets de charge et permet de simuler des fragments peptidiques inclus dans des séquences plus longues.

Tous les angles de torsion ont été considérés comme variables sauf  $\phi(\text{Pro})$  dont la valeur dépend de la géométrie du cycle pyrrolidine. Dans le cas présent, nous avons utilisé la configuration *B* (Balasubramanian, Lakshminarayanan, Sabesan, Tegoni, Venkatesan & Ramachandran, 1971) dite encore 'down', pour les conformations non repliées et une configuration différente pour les  $\beta$  turns (Karle, 1978, 1979) en accord avec les structures cristallines. Les angles  $\omega_1$  ont été fixées à  $180^\circ$ , valeurs très proches des valeurs expérimentales dans le premier cas et variables pour les structures où interviennent des liaisons hydrogène ( $\beta$  turns, hélices...).

Les conformations et énergies correspondantes ont été calculées grâce au programme *ECEPP* (*Quantum Chemistry Program Exchange*, 1976) pour une constante diélectrique  $\epsilon$  égale à 2. Les minimisations de l'énergie par optimisation des angles de torsion ont été effectuées par la méthode du 'Simplex' (Nelder & Mead, 1965). Les valeurs de ces angles sont données conformément aux conventions IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970).

Les fragments de taille croissante suivants, ont été étudiés: Ac-Tyr-Pro-MA, Ac-Tyr-Pro-Asn-MA et finalement Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH.

*Ac-Tyr-Pro-MA*. Les conformations de ce dipeptide ont été générées en combinant les conformations les plus stables\* des restes Tyr et Pro (Lewis, Momany & Scheraga, 1973). De sévères restrictions stériques s'appliquent à tout reste *X* précédant un reste Pro [ $|\psi(X)| < 70^\circ$ ] ce qui réduit notablement le nombre de combinaisons. Après minimisation de l'énergie, seules 10 conformations stables\* sont retenues.

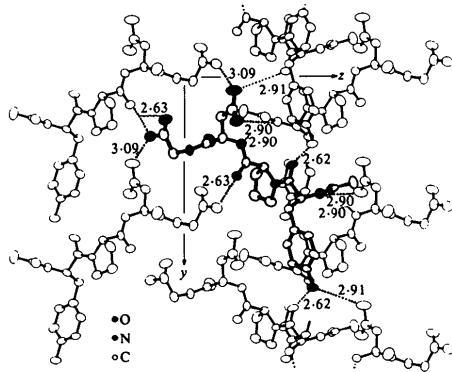


Fig. 2. Projection de la structure suivant l'axe x montrant les interactions hydrogènes. (Distances en Å.)

\* La limite de  $13 \text{ kJ mol}^{-1}$  a été utilisée et justifiée par différents auteurs (Simon, Nemethy & Scheraga, 1978) relativement à la forme la plus stable (minimum global). Elle a été présentement étendue à  $15 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

*Ac-Tyr-Pro-Asn-MA*. Les conformations de départ ont été obtenues en combinant les 10 formes précédemment trouvées avec les plus stables d'Ac-Asn-MA. Après minimisation, 52 des 90 combinaisons correspondantes sont stables; certaines d'entr'elles ont des angles conformationnels très proches, notamment ceux de la chaîne principale: on se ramène ainsi à 21 types de conformations, dites non dégénérées.

*Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH*. Les conformations initiales ont été générées en combinant les 21 formes non dégénérées du tripeptide précédent avec les sept formes les plus stables pour Ac-Gly-MA. L'énergie des 147 structures ainsi obtenues a été minimisée; environ un tiers (51 conformations) sont stables et plus des deux tiers ont une énergie inférieure à 25 kJ mol<sup>-1</sup>. En plus de ces structures, les conformations particulières telles que les  $\beta$  turns, les hélices  $\alpha$ ..., etc., ont été examinées et leur énergie minimisée.

### Résultats

Les longueurs de liaison et angles de valence de la structure cristalline sont reportées sur la Fig. 3; ces valeurs ne diffèrent pas de manière significative de celles généralement observées pour les peptides en milieu cristallin. Elles sont en particulier très comparables à celles observées pour le zwitterion Tyr-Pro-Asn-Gly (Précigoux, Geoffre, Hospital & Leroy, 1982).

Il existe de nombreuses liaisons hydrogène (Tableau 2) et ici aussi l'oxygène O<sup>n</sup> de la tyrosine et celui de la proline participent aux liaisons hydrogènes les plus fortes (2,62 et 2,63 Å respectivement). Le long de l'axe Oy (Fig. 4) les restes Gly et Asn forment des cavités où viennent s'insérer de façon non stœchiométrique des molécules de DMSO. Il est certain que ces nombreuses liaisons hydrogène intermoléculaires stabilisent notablement la conformation cristalline et l'empêchent peut-être d'adopter une conformation repliée. Il existe

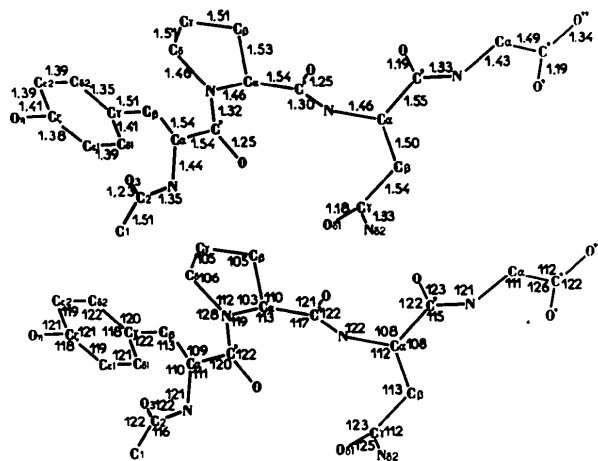


Fig. 3. Longueurs de liaison ( $\bar{\sigma} = 0,01$  Å) et angles de valence ( $\bar{\sigma} = 0,1^\circ$ ).

Tableau 2. *Liaisons hydrogène (Å) entre une molécule et ses voisines ( $\sigma = 0,01$  Å) dans le cristal*

O(3)-N(Asn)(-x, $\frac{1}{2}$ + y, -z)	2,90
O <sup>n</sup> (Tyr)-O(Tyr)(x, 1 + y, z)	2,62
O <sup>n</sup> (Tyr)-N <sup><math>\delta^2</math></sup> (Asn)(1 - x, $\frac{1}{2}$ + y, 1 - z)	2,91
N(Tyr)-O <sup><math>\delta^1</math></sup> (Asn)(1 - x, $\frac{1}{2}$ + y, 1 - z)	2,90
O(Tyr)-O <sup>n</sup> (Tyr)(x, -1 + y, z)	2,62
O(Pro)-O <sup>n</sup> (Gly)(-x, $\frac{1}{2}$ + y, -z)	2,63
N(Asn)-O(3)(-x, - $\frac{1}{2}$ + y, -z)	2,90
N <sup><math>\delta^2</math></sup> (Asn)-O <sup>n</sup> (Tyr)(1 - x, - $\frac{1}{2}$ + y, 1 - z)	2,91
N <sup><math>\delta^2</math></sup> (Asn)-O <sup>n</sup> (Gly)(-x, $\frac{1}{2}$ + y, -z)	3,09
O <sup><math>\delta^1</math></sup> (Asn)-N(Tyr)(1 - x, - $\frac{1}{2}$ + y, 1 - z)	2,90
N(Gly)-O(DMSO)(1 - x, $\frac{1}{2}$ + y, -z)	2,82
O <sup>n</sup> (Gly)-N <sup><math>\delta^2</math></sup> (Asn)(-x, $\frac{1}{2}$ + y, -z)	3,09
O <sup>n</sup> (Gly)-O(Pro)(-x, - $\frac{1}{2}$ + y, -z)	2,63

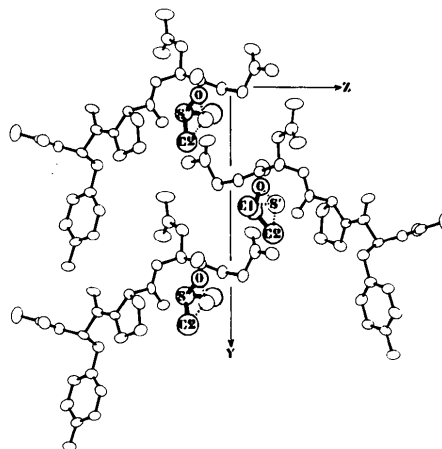


Fig. 4. Projection suivant la direction x. Les molécules de DMSO viennent se loger dans des cavités situées autour de l'axe y.

Tableau 3. *Angles de torsion ( $^\circ$ ) de la molécule dans le cristal ( $\bar{\sigma} = 1^\circ$ )*

Les valeurs entre parenthèses correspondent à la forme zwitterion.

	Chaîne principale	Chaînes latérales
Tyrosyl	$\varphi = -73$	N-C <sup><math>\alpha</math></sup> -C <sup><math>\beta</math></sup> -C <sup><math>\gamma</math></sup> = -79 (-64)
	$\psi = 155$ (166)	C <sup><math>\alpha</math></sup> -C <sup><math>\beta</math></sup> -C <sup><math>\gamma</math></sup> -C <sup><math>\delta^1</math></sup> = -80 (-87)
	$\omega = 179$ (176)	
Prolyl	$\varphi = -86$ (-53)	N-C <sup><math>\alpha</math></sup> -C <sup><math>\beta</math></sup> -C <sup><math>\gamma</math></sup> = 29 (-26)
	$\psi = 147$ (142)	C <sup><math>\alpha</math></sup> -C <sup><math>\beta</math></sup> -C <sup><math>\gamma</math></sup> -C <sup><math>\delta</math></sup> = -29 (33)
	$\omega = 163$ (182)	C <sup><math>\beta</math></sup> -C <sup><math>\gamma</math></sup> -C <sup><math>\delta</math></sup> -N = 18 (-26)
Asparaginyl	$\varphi = -70$ (-96)	C <sup><math>\gamma</math></sup> -C <sup><math>\delta</math></sup> -N-C <sup><math>\alpha</math></sup> = 1 (9)
	$\psi = 141$ (160)	C <sup><math>\delta</math></sup> -N-C <sup><math>\alpha</math></sup> -C <sup><math>\beta</math></sup> = -19 (11)
	$\omega = 172$ (175)	
Glycine	$\varphi = -78$ (180)	
	N-C <sup><math>\alpha</math></sup> -C'-O <sup>n</sup> = 170 (188)	

notamment une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène du DMSO et la glycine. Rien ne prouve cependant que l'absence de DMSO favoriserait une telle conformation.

Les interactions hydrophobes sont essentiellement situées aux niveaux des résidus tyrosyl et prolyl (Fig. 2). Les contacts les plus étroits sont  $C^{\delta}(\text{Tyr})-C^{\beta}(\text{Tyr}) = 3,36$ ,  $C^{\delta}(\text{Tyr})-C^{\gamma}(\text{Pro}) = 3,49$ ,  $C^{\epsilon 1}(\text{Tyr})-C^{\beta}(\text{Tyr}) = 3,53$  et  $C^{\epsilon 2}(\text{Tyr})-C^{\delta}(\text{Pro}) = 3,53$  Å.

Les angles de torsion de la molécule cristalline sont reportés dans le Tableau 3 en accord avec la nomenclature IUPAC-IUB (1970). Les valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  conservent tout au long de la chaîne des valeurs respectivement voisines de  $-80$  et  $150^{\circ}$ . La conformation générale du térapeptide peut donc être décrite comme proche de la forme pseudo étendue  $\beta''$  (Fig. 5).\* En ce qui concerne les chaînes latérales, la tyrosine adopte une conformation classique avec  $\chi_1 \simeq -60^{\circ}$  et le cycle phénol perpendiculaire au plan  $C^{\alpha}-C^{\beta}-C^{\gamma}$  (Cotrait & Bideau, 1974; Janin, Wodak, Levitt & Maigret, 1978). Selon la notation de Balasubramanian *et al.* (1971), la proline adopte la configuration *B*. Dans la forme zwitterionique, la proline adopte, par contre, la configuration *A*. La chaîne latérale de l'asparagine avec  $\chi_2 = 168^{\circ}$  est dans une conformation très différente de celle observée pour la forme zwitterionique, où il vaut  $-80^{\circ}$ ; dans le milieu cristallin, cet angle est généralement proche de  $\pm 90^{\circ}$  (Karth & de Vries, 1961; Ramanadham, Sikka & Chidambaram, 1972).

Le calcul conformationnel montre que la forme la plus stable (minimum global avec  $\Delta E = 0,0$  kJ mol $^{-1}$ ), relativement à la molécule isolée, est un  $\beta$  turn de type III où Pro et Asn occupent les sommets du turn, encore

\* Les dénominations utilisées pour les conformations types de la chaîne principale ( $\varphi, \psi$ ) sont les suivants:  $\beta$  ( $-150, 150$ ),  $\beta'$  ( $-150, 70$ ),  $\beta''$  ( $-70, 150$ ),  $\alpha_R$  ou  $\alpha$  ( $-70, -60$ ),  $\alpha_L$  ou  $L$  ( $70, 60$ );  $\gamma$  pour la forme  $C_7^g$  ( $-80, 80$ ),  $\tilde{\gamma}$  pour la forme  $C_7^s$  ( $80, -80$ ); *P* ( $180, 180$ ) forme plane du reste Gly.

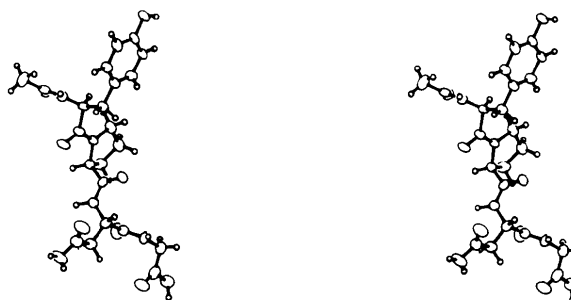


Fig. 5. Vue stéréoscopique du térapeptide Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH. Les ellipsoïdes d'agitation thermique sont tracés avec une probabilité de 50%.

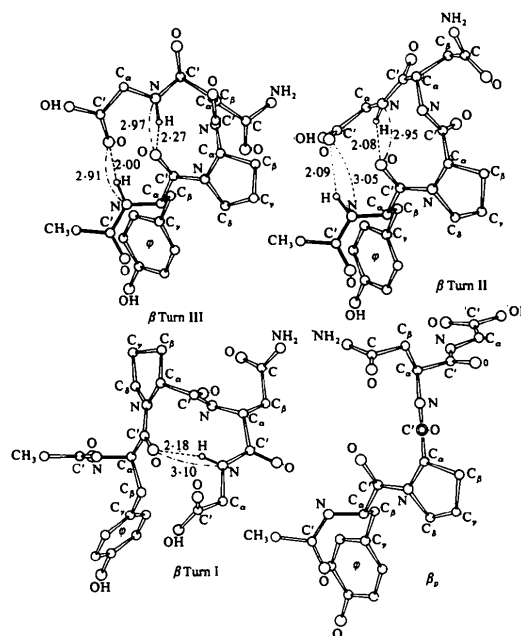


Fig. 6. Quelques conformations calculées parmi les plus stables. (Distances en Å.)

Tableau 4. Angles de torsion ( $^{\circ}$ ) des conformations calculées les plus stables

Type de conformation	Tyr				Pro $\psi$	Asn				Gly		$\Delta E$ (kJ mol $^{-1}$ )
	$\varphi$	$\psi$	$\chi_1$	$\chi_2$		$\varphi$	$\psi$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\varphi$	$\psi$	
$\beta$ turn III	-140	163	-58	106	-36	-65	-39	-60	98	169	172	0,0
$\beta$ turn II	-143	165	-59	110	107	58	43	-52	99	-169	183	11
$\beta \alpha \beta \gamma$	-153	155	52	86	-44	-152	137	188	-95	88	-81	11
$\beta \beta' \gamma L$	-153	156	71	96	113	-66	116	-63	96	74	45	12
$\beta$ turn I	-143	83	-62	104	-42	-110	-34	-57	101	-163	-130	13
$\beta \beta \beta \gamma$	-156	154	55	89	136	-162	158	65	96	-81	84	14
$\beta \alpha \alpha \gamma$	-144	156	-63	108	-45	-71	-43	-59	99	-99	73	16
$\beta \beta' \beta'' \tilde{\gamma}$	-154	156	-70	95	112	-67	126	-62	95	88	-70	17
$\beta \alpha \gamma \tilde{\gamma}$	-150	155	-71	102	-38	-79	94	-60	90	83	-83	18
$\beta \alpha \alpha \alpha$	-150	156	-68	105	-28	-67	-38	-61	95	-73	-52	20
$\beta'' \beta \beta'' P$	-93	161	-59	111	156	-75	135	-63	-79	-178	-168	23
$\beta \gamma \gamma L$	-155	156	66	96	91	-70	106	184	83	69	37	24
$\beta \beta \beta P$	-155	154	55	90	137	-163	161	64	96	-178	180	24
$\beta \beta \beta \beta'$	-157	154	55	89	136	-162	164	65	97	-158	69	25

appelé  $\beta$  turn ( $\text{Pro}_2\text{-Tyr}_3$ ). Il est stabilisé par deux liaisons entre groupes NH et C=O des restes Tyr et Gly. Les  $\beta$  turns de type II et I sont également stables avec des énergies relatives respectivement égales à 11 et 13 kJ mol<sup>-1</sup>, mais ne mettent en jeu qu'une seule liaison hydrogène. Il s'agit là de conformations particulières (Fig. 6).

Si l'on considère maintenant les conformations générales, la stabilité du térapeptide dépend essentiellement du tripeptide Tyr-Pro-Asn et relativement peu du reste Gly. La conformation la plus stable est du type  $\beta\alpha\beta\gamma^*$  (c'est-à-dire étendue de type  $\beta$  pour Tyr et Asn, hélicoïdale  $\alpha$  pour Pro et sous la forme d'un  $\gamma$  turn inverse  $\bar{\gamma}$  pour Gly) et a une énergie de 11 kJ mol<sup>-1</sup> au-dessus du minimum global. D'autres conformations dont une hélicoïdale  $\beta\alpha\alpha$  et plusieurs étendues sont relativement stables. Les angles conformationnels et les énergies de quelques conformations caractéristiques sont rassemblés dans le Tableau 4. L'une d'elles, pratiquement étendue, de type  $\beta''\beta\beta''P$ , est assez proche de la conformation cristalline et a une énergie de 23 soit 11 kJ mol<sup>-1</sup> au dessus de la forme non repliée la plus stable,  $\beta\alpha\beta\bar{\gamma}$ .

### Discussion

Les calculs conformationnels et la diffraction des rayons X sont les principales méthodes permettant d'accéder à la ou aux conformations précises de molécules relativement complexes.

Si les conformations de type  $\beta$  turn apparaissent ici comme les formes les plus stables pour la molécule isolée, cela n'a en soi rien de très surprenant car ces conformations sont stabilisées par une ou deux liaisons hydrogène intramoléculaires. Rappelons d'ailleurs que des  $\beta$  turns ont été observés à l'état solide pour un nombre important d'oligopeptides possédant un reste Pro: c'est le cas notamment pour un certain nombre de substrats de la collagénase comme *N*-benzyloxy-carbonyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-OH (Bando, Tanaka, Ashida & Kakudo, 1978), le térapeptide terminal de l'oxytocine Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (Rudko & Low, 1975).

L'examen d'un nombre très important de  $\beta$  turns dans les protéines montre que le reste Pro a une probabilité de présence très élevée au niveau du 2° reste (Chou & Fasman, 1977). Certains restes ont une chance non négligeable d'être situés en troisième position et c'est notamment le cas du reste Asn. La nature des 1<sup>er</sup> et 4° restes reliés par une liaison interpeptidique n'est pas indifférente par suite d'une gêne stérique possible entre les chaînes latérales de ces restes. Cette gêne est diminuée présentement puisque le 4° reste est Gly. Dans le cas présent, les calculs ont mis

en évidence une quinzaine de conformations relativement stables pour le peptide Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH. Ce peptide peut donc être considéré comme flexible à l'état isolé.

En milieu cristallin, les liaisons hydrogène intramoléculaires sont en général moins privilégiées, du fait de l'existence d'un grand nombre de liaisons intermoléculaires possibles.

hormis le cas où deux molécules indépendantes existent dans un cristal, on observe par radiocristallographie, une conformation unique correspondant à un environnement bien précis. Pour une molécule aussi flexible qu'un peptide linéaire, on pourrait s'attendre à ce qu'un changement d'environnement (arrangement cristallin différent, donc réseau de liaisons hydrogène différent) apporte des modifications de conformation. Les cristaux de Ac-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH et Tyr-Pro-Asn-Gly sont différents: l'un est monoclinique, l'autre est orthorhombique; les environnements moléculaires ne sont donc pas comparables. L'analyse radiocristallographique montre cependant deux formes très voisines pour les chaînes peptidiques. Les seules variations conformationnelles se situent au niveau de la proline qui adopte des configurations *A* ou *B*, de la glycine et de la chaîne latérale de l'asparagine. Il est remarquable de noter que malgré le grand nombre de liaisons hydrogène différentes intervenant dans la cohésion cristalline, les modifications structurales soient aussi faibles. Cette conformation observée, correspond à l'une des formes non repliées les plus stables trouvées par le calcul théorique. La différence d'énergie (23 kJ mol<sup>-1</sup>) la séparant de la forme la plus stable, le  $\beta$  turn III, correspond à la présence d'une liaison hydrogène forte et pourrait être notablement inférieure à l'énergie de solvatation du térapeptide.

### Références

- ANDERSON, J. S. & SCHERAGA, H. A. (1978). *Macromolecules*, **11**, 812-819.
- BALASUBRAMANIAN, R., LAKSHMINARAYANAN, A. V., SABESAN, M. N., TEGONI, G., VENKATESAN, K. & RAMACHANDRAN, G. N. (1971). *Int. J. Protein Res.* **3**, 25-33.
- BANDO, S., TANAKA, N., ASHIDA, T. & KAKUDO, M. (1978). *Acta Cryst.* **B34**, 3447-3452.
- BODANOSKY, M. (1955). *Nature (London)*, **175**, 685.
- CHOU, P. Y. & FASMAN, G. D. (1977). *J. Mol. Biol.* **115**, 135-175.
- COTRAIT, M. & BIDEAU, J. P. (1974). *Acta Cryst.* **B30**, 1024-1028.
- COTRAIT, M. & PTAK, M. (1981). *J. Comput. Chem.* **2**(4), 460-469.
- GISIN, B. F. (1973). *Helv. Chim. Acta*, **56**(5), 1476-1482.
- International Tables for X-ray Crystallography* (1974). Vol. IV. Birmingham: Kynoch Press.
- IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE (1970). *Biochemistry*, **9**, 3471-3478.
- JANIN, J., WODAK, S., LEVITT, M. & MAIGRET, B. (1978). *J. Mol. Biol.* **125**, 357-386.
- JIBSON, M. D. & LI, C. H. (1979). *Int. J. Pept. Protein Res.* **14**, 113-121.
- KARLE, I. L. (1978). *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 1286-1288.
- KARLE, I. L. (1979). *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 181-184.
- KARTHA, G. & DE VRIES, A. (1961). *Nature (London)*, **172**, 862-868.

\* Voir la note précédente.

- LEWIS, N., MOMANY, F. A. & SCHERAGA, H. A. (1973). *Isr. J. Chem.* **11**, 121–152.
- MAIN, P., HULL, S. E., LESSINGER, L., GERMAIN, G., DECLERCQ, J.-P. & WOOLFSON, M. M. (1978). *MULTAN 78. A System of Computer Programs for the Automatic Solution of Crystal Structures from X-ray Diffraction Data*. Univ. de York, Angleterre, et Louvain-la-Neuve, Belgique.
- MUTTER, H., MUTTER, M. & BAYER, E. (1979). *Z. Naturforsch. Teil B*, **34**, 874–885.
- NELDER, J. A. & MEAD, R. (1965). *Comput. J.* **7**, 308–313.
- PRANGÉ, T. & PASCARD, C. (1979). *Acta Cryst.* **B35**, 1812–1819.
- PRÉCIGOUX, G., GEOFFRE, S., HOSPITAL, M. & LEROY, F. (1982). *Acta Cryst.* **B38**, 2172–2176.
- PREMILAT, S. & MAIGRET, B. (1980). *J. Phys. Chem.* **84**, 293–300.
- Quantum Chemistry Program Exchange* (1976). *ECEPP (Empirical Conformational Energy Program for Peptides)*. N° 286. Indiana Univ., Bloomington, Indiana.
- RAMANADHAM, S. K., SIKKA, S. K. & CHIDAMBARAM, R. (1972). *Acta Cryst.* **B28**, 3000–3005.
- RUDKO, A. D. & LOW, B. W. (1975). *Acta Cryst.* **B31**, 713–725.
- SAYERS, G., BEALL, R. J. & SEELIG, S. (1974). *Biochemistry of Hormones*. Tome 8. *Biochemistry Series*, édité par H. V. RICKENBERG, pp. 25–60. London: Butterworths.
- SHEEHAN, J. C. & HESS, G. P. (1955). *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067–1072.
- SIMON, I., NEMETHY, G. & SCHERAGA, H. A. (1978). *Macromolecules*, **11**, 797–804.
- STEWART, R. F., DAVIDSON, E. R. & SIMPSON, W. T. (1965). *J. Chem. Phys.* **42**, 3175–3187.
- TOMA, F., FERMANDJIAN, S., LÖW, M. & KISFALUDY, L. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, pp. 112–122.
- TOMA, F., GREFF, D., FERMANDJIAN, S., LÖW, M. & KISFALUDY, L. (1976). Dans *Peptides*, édité par A. LOFFLET. Univ. de Bruxelles.
- WANG, S. S., GISIN, B. F., WINTER, D. P. & MAKOFKSKE, R. (1977). *J. Org. Chem.* **42**(8), 1286–1290.
- WIED, D. DE (1974). *The Neurosciences*, édité par O. F. SCHMITT & F. C. WORDEN, pp. 653–666. Cambridge (Etats-Unis): MIT Press.

*Acta Cryst.* (1983). **B39**, 760–768

## The Electron Density of $\alpha$ -Oxalic Acid Dihydrate at 100 K by X-ray Diffraction: a Contribution to the IUCr Commission on Charge, Spin and Momentum Densities Project on the Accurate Determination of Electron Densities\*

BY J. DAM, S. HARKEMA AND D. FEIL

*Chemical Physics Laboratory, Twente University of Technology, PO Box 217, 7500 AE Enschede, The Netherlands*

(Received 7 January 1983; accepted 28 July 1983)

### Abstract

The results of the determination of the electron density of  $\alpha$ -oxalic acid dihydrate at 100 K by means of X-ray diffraction are reported as part of the project on the accurate determination of electron densities which was initiated by the International Union of Crystallography. An extensive data set, consisting of all reflexions in the whole reciprocal sphere up to  $\sin \theta/\lambda = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$ , was measured. Most of the structural parameters and experimental deformation densities compare well with the findings of an earlier published study [Stevens & Coppens (1980). *Acta Cryst.* **B36**, 1864–1876]; thermal parameters, however, differ significantly. Application of a correction for thermal diffuse scattering increased the vibrational parameters by 12%. The polarization of the water O lone-pair density, found by

Stevens & Coppens (1980), is firmly confirmed by this study.

### 1. Introduction

A quantitative interpretation of electron densities, as obtained from X-ray diffraction experiments, is generally of limited value due to the fact that it is hardly feasible to perform a diffraction experiment under a variety of conditions in order to assess the errors in the observed electron densities, which may be the result of the particular choices made for the experimental setup, treatment of the data, refinement techniques *etc.* In order to facilitate such an error assessment, the IUCr initiated a project in which researchers were invited to perform experiments and/or calculations aiming at an accurate determination of the electron density distribution of a single substance:  $\alpha$ -oxalic acid dihydrate. Some studies on this subject have already appeared in the literature (Johansen, 1979; Stevens & Coppens, 1980; Stevens, 1980) and this determination of the

\* Supported in part by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO).