



УДК 547.962 : 541.63

АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ АПАМИНА

III. * СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ

*Попов Е. М., Мельников П. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Выполнен теоретический конформационный анализ молекулы апамина — природного нейротоксина, аминокислотная последовательность которого состоит из 18 остатков. Расчет пространственного строения апамина включал несколько последовательных этапов. На первом этапе рассмотрены конформационные возможности участка Cys¹—Cys¹¹, чему предшествовало решение конформационных задач для ди-, три-, тетра- и т. д. пептидных фрагментов. Полученные здесь результаты и данные исследования свободного участка Cys¹¹—Cys¹⁵ послужили на завершающей стадии второго этапа основой конформационного анализа фрагмента апамина Cys¹—Cys¹⁵. Третий этап состоял из расчета С-концевого пептида Cys¹⁵—His¹⁸ сначала в его свободном состоянии, а затем во взаимодействии с участком Cys¹—Cys¹⁵ в конформациях, полученных на втором этапе. Результаты расчета апамина подтвердили предположения, касающиеся согласованности всех видов взаимодействий между остатками в наиболее стабильной конформации природного олигопептида и справедливости термодинамической гипотезы образования дисульфидных связей. Выяснены конформационные аспекты детерминированного механизма свертывания пептидной цепи, обеспечивающего сближенность соответствующих остатков Cys. Показано, что у апамина возможна реализация ряда структур, различающихся конформационными состояниями фрагмента Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂. Пространственное строение бицикла Cys¹—Cys¹⁵ совпадает с глобальной конформацией свободного пентадекапептида, а строение Cys¹⁵—His¹²-NH₂—с некоторыми из наиболее низкоэнергетических конформаций свободного тетрапептида.

Апамин является природным олигопептидом, оказывающим сильное токсическое действие на центральную нервную систему. Его последовательность состоит из 18 аминокислотных остатков, в том числе четырех цистеинов, образующих два дисульфидных мостика: Cys¹—Cys¹¹ и Cys³—Cys¹⁵.

Теоретический конформационный анализ апамина, включающий расчет большого числа фрагментов постепенно увеличивающейся длины, разбит нами на четыре следующих друг за другом этапа (I—IV), в каждом из которых используются результаты предшествующего этапа. Общая схема расчета и последовательность шагов приведены на рис. 1. Ранее нами были изложены результаты анализа гексапептидного Cys¹—Pro⁶ [2] и декапептидного Cys¹—Leu¹⁰ [1] участков цепи апамина. В настоящем сообщении представлены результаты расчета стабильных конформаций всей молекулы. Вначале рассмотрены конформационные возможности линейного и циклического андекапептидного фрагмента Cys¹—Cys¹¹ (I, рис. 1). Полученные здесь результаты и данные исследования пентапептидного участка Cys¹¹—Cys¹⁵ послужили основой конформа-

* Сообщение II см. [1].

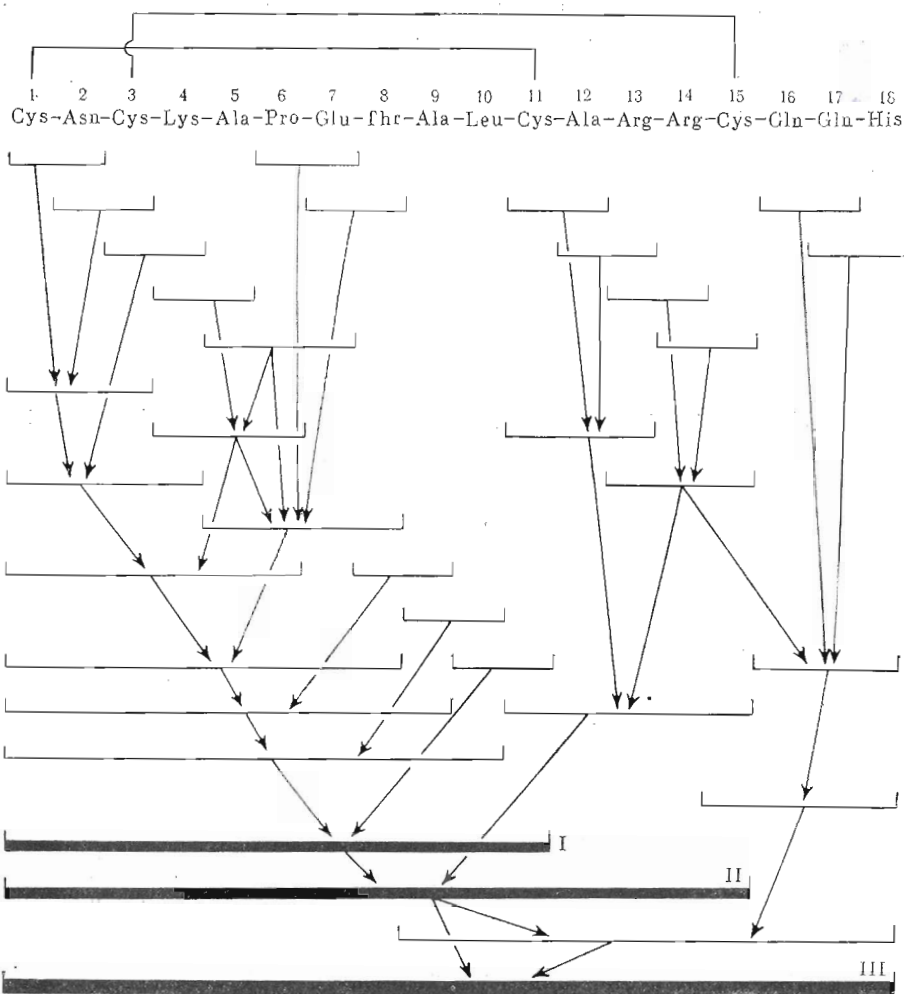


Рис. 1. Схема теоретического конформационного анализа молекулы апамина

конформационного анализа сначала линейного, а затем циклического пентадекапептидного фрагмента $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{15}$ (II). Третий этап, завершающий теоретическое изучение пространственного строения апамина, состоял из расчета С-концевого тетрапептида $\text{Cys}^{15}\text{—His}^{18}$ в свободном состоянии и во взаимодействии с участком $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{15}$. Следующее сообщение будет посвящено рассмотрению конформационных возможностей боковых цепей остатков в потенциальном поле наиболее стабильной структуры апамина (IV этап).

Анализ декапептидного фрагмента апамина $\text{Cys}^1\text{—Leu}^{10}$ выделил в качестве самых предпочтительных по энергии структуры трех родственных шейпов *feffefefe*, *feffefeef* и *feffefeee* (табл. 7 в [1]). Пространственное строение гекса-, окта- и нонапептидных участков в выделенных конформациях отвечает глобальным структурам соответствующих свободных пептидов $\text{Cys}^1\text{—Pro}^6$ (табл. 11 в [2]), $\text{Cys}^1\text{—Thr}^8$ и $\text{Cys}^1\text{—Ala}^9$ (табл. 4 и 6, в [1]). Лучшие представители указанных шейпов имеют одинаковое конформационное состояние октапептидного участка $\text{Cys}^1\text{—Thr}^8$ и различаются лишь формой основной цепи С-концевого дипептида $\text{Ala}^9\text{—Leu}^{10}$. Энергия межостаточных взаимодействий во фрагменте $\text{Cys}^1\text{—Leu}^{10}$ (табл. 7 и 8 в [1]) свидетельствует о том, что октапептидный участок $\text{Cys}^1\text{—Thr}^8$ представляет собой сложившуюся конформационно жесткую нуклеацию, которая практически не связана с последующими остатками

Ala⁹ и Leu¹⁰, отличающимися большой лабильностью. Промежуточное положение занимает Thr⁸, однако и его состояние в большей степени определяется взаимодействиями с предшествующими остатками (−6,0 ккал/моль), чем с Ala⁹ и Leu¹⁰ (−1,8 ккал/моль; табл. 8 в [1]). Сопоставление энергии соответствующих межостаточных взаимодействий в глобальных конформациях N-концевых дека-, нона-, окта- и гексапептидных участков апамина и среднего тетрапептидного участка Ala⁶–Thr⁸ (табл. 8 в [1]) показало, что включение того или иного пептида в этом состоянии в более длинный фрагмент не приводит, несмотря на возникновение многочисленных и эффективных новых взаимодействий, к ослаблению самых предпочтительных его внутренних стабилизирующих контактов. Следовательно, у наиболее низкоэнергетических конформаций декапептида Cys¹–Leu¹⁰ имеет место почти совершенная согласованность межостаточных взаимодействий на всех участках цепи.

Исходные приближения для расчета андекапептидного фрагмента Cys¹–Cys¹¹ составлены из конформаций Cys¹–Leu¹⁰ с энергией $E=0$ (feffefefe), 0,9 и 4,3 (jefefefe), 3,0 (ffffeffef), 4,4 (ffffeffee) и 8,6 ккал/моль (eeefeffee). Для присоединяемого остатка Cys¹¹ была выбрана В-форма основной цепи, которая в данном случае эквивалентна R. Результаты конформационного анализа дипептидов Leu¹⁰–Cys¹¹ и Cys¹¹–Ala¹² свидетельствуют о том, что L-форма Cys¹¹ менее предпочтительна, чем В или R. Тем не менее эта форма была также включена в конформацию типа jefefefe, в которой С-концевой трипептидный участок отвечает состоянию R⁹–R¹⁰–L¹¹.

Линейный фрагмент Cys¹–Cys¹¹. Результаты минимизации энергии семи отобранных конформационных вариантов андекапептида при варьировании всех его двугранных углов ϕ , ψ и χ представлены в табл. 1; на рис. 2 изображены шейки основной цепи. Сопоставление данных табл. 1 с табл. 5 и 7 в [1], где приведены аналогичные сведения о декапептиде, показывает, что присоединение Cys¹¹ не вносит существенных изменений в распределение конформаций по энергии. Остаток Cys¹¹ не образует дальних контактов, и все его взаимодействия ограничены ближайшими по цепи остатками Ala⁹, Leu¹⁰ и в некоторых случаях Thr⁸.

Энергия глобальной конформации шейпа jefefefe с R⁹–B₃₂¹⁰–B₃¹¹-состоянием С-концевого участка Ala⁹–Leu¹⁰–Cys¹¹ очень близка к аддитивной сумме энергии соответствующего состояния декапептида и энергии близких взаимодействий Cys¹¹; дополнительная стабилизация за счет взаимодействий Cys¹¹ с тремя предшествующими остатками составляет всего −0,8 ккал/моль. В этой конформации андекапептида геометрические и энергетические параметры декапептидного участка полностью совпадают с параметрами свободного фрагмента Cys¹–Leu¹⁰. Глобальная структура четко делится на два весьма различных по своим конформационным свойствам участка: Cys¹–Thr⁸ и Ala⁹–Cys¹¹. Первый образует в значительной степени автономную от остальной части фрагмента конформационно жесткую пуклеацию, которая стабилизирована эффективными взаимодействиями между составляющими ее остатками. Наиболее существенные вклады в устойчивость этого структурного образования вносят взаимодействия остатков Asp² (−10,1 ккал/моль), Glu⁷ (−9,7 ккал/моль) и Thr⁸ (−6,4 ккал/моль); энергия всех взаимодействий остатка Lys⁴ в пределах фрагмента Cys¹–Thr⁸, учитывая большие возможности его боковой цепи, сравнительно невелика (−5,4 ккал/моль). Остатки второго участка Ala⁹–Leu¹⁰–Cys¹¹ не только слабо связаны с нуклеацией (−2,4 ккал/моль, из которых −2,2 ккал/моль — с Thr⁸), но и между собой (−1,6 ккал/моль). Поэтому они обладают большой конформационной свободой.

Другие две конформации этого шейпа с B⁹–L₃₂¹⁰–B₃¹¹- и R⁹–R₃₂¹⁰–L₃¹¹-состояниями участка Ala⁹–Leu¹⁰–Cys¹¹ имеют относительную энергию соответственно 2 и 3,6 ккал/моль. Несколько большие величины $E_{\text{общ}}$ обусловлены в первом случае L-формой Leu¹⁰ и ослаблением контактов с нуклеаци-

Относительная энергия и ее составляющие конформаций линейного и циклического фрагмента
Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶-Glu⁷-Thr⁸-Ala⁹-Leu¹⁰-Cys¹¹

Шейп	Конформация	E _{общ} ккал/моль	Энергия взаимодействия, ккал/моль										
			моно-	ди-	три-	тетра-	пента-	гекса-	гепта-	окта-	нона-	дека-	андека-
Линейный андекапептид													
jefjefefee	$R_2^1-B_{23}^2-R_3^4-R_{2222}^5-B^6-R^7-B_{311}^8-R^9-B_{32}^{10}-B_{33}^{11}$	0*	-19,6	-15,7	-5,0	-4,2	-3,2	-2,2	-5,0	-1,4	-0,1	-0,2	+0,1
	$R_3-B_{23}-R_3-R_{2222}-B-R-B_{311}-B_{31}-B-L_{32}-B_3$	2,0*	-18,7	-15,2	-4,1	-5,2	-2,8	-2,5	-5,0	-1,1	+0,1	+0,1	-0,1
	$R_2-B_{23}-R_3-R_{2222}-B-R-B_{311}-B_{31}-R-R_{32}-L_3$	3,6*	-15,6	-15,4	-5,1	-5,2	-3,3	-2,4	-2,4	-6,1	-1,2	0	+0,1
jefjefefee	$R_3-B_{23}-R_3-R_{2222}-B-R-B_{311}-B_{31}-L-B_{32}-B_2$	2,0	-17,0	-16,1	-4,3	-4,4	-3,2	-2,4	-4,9	-1,6	-0,7	-0,9	0
	$R_3-R_{13}-R_3-R_{2222}-B-R-R_{311}-B_{11}-R-B_{32}-B_2$	0,5	-21,2	-15,3	-6,9	-5,5	-1,6	+0,7	-2,7	-2,4	-1,1	-0,1	0
fffjefefee	$R_3-R_{13}-R_3-R_{2222}-B-R-R_{311}-B_{11}-B-B_{32}-B_3$	3,3*	-22,3	-14,6	-5,3	-3,8	-1,6	+0,9	-3,0	-2,1	-1,0	-1,0	+0,2
	$B_3-B_{13}-B_2-R_{2222}-B-R-R_{311}-B_{22}-B-B_{32}-B_2$	7,4*	-23,7	-15,2	-6,3	+1,2	-1,7	-1,3	-4,5	+0,1	-0,1	0	0
Циклический андекапептид													
jefjefefee	$R_{22}^1-B_{23}^2-R_3^3-R_{2222}^4-B^5-R^6-R_{311}^7-B^8-R^9-B_{32}^{10}-B_{33}^{11}$	0*	-18,2	-15,6	-4,3	-4,6	-3,3	-1,9	-5,2	-1,6	-0,3	-0,4	0
	$R_{22}-B_{23}-R_2-R_{2222}-B-R-B_{311}-B_{31}-B-L_{32}-B_{31}$	5,5*	-17,0	-15,5	-4,2	-4,7	-3,0	-2,5	-5,1	-1,9	0	-0,2	0
fffjefefee	$R_{22}-B_{23}-R_2-R_{2222}-B-R-B_{311}-B_{31}-R-R_{32}-L_{33}$	7,3	-15,1	-16,2	-3,1	-5,0	-3,5	-2,3	-5,1	-0,2	0	-0,4	0
	$R_{12}-R_{13}-R_3-R_{2222}-B-R-R_{311}-B_{11}-B-B_{32}-B_{32}$	11,0	-18,0	-14,1	-5,4	-3,7	-1,7	+0,8	-3,0	-2,0	+0,1	-0,5	+0,4
eeefjefefee	$B_{33}-B_{13}-B_2-R_{2222}-B-R-R_{311}-B_{22}-B-B_{32}-B_{21}$	17,3	-18,1	-14,4	-5,8	+1,4	-1,5	-1,1	-1,5	+0,1	-0,1	-0,5	+1,0

Примечание. В энергетические составляющие энергии торсионных взаимодействий не входит. Звездочками отмечены конформации, использованные для последующего анализа.

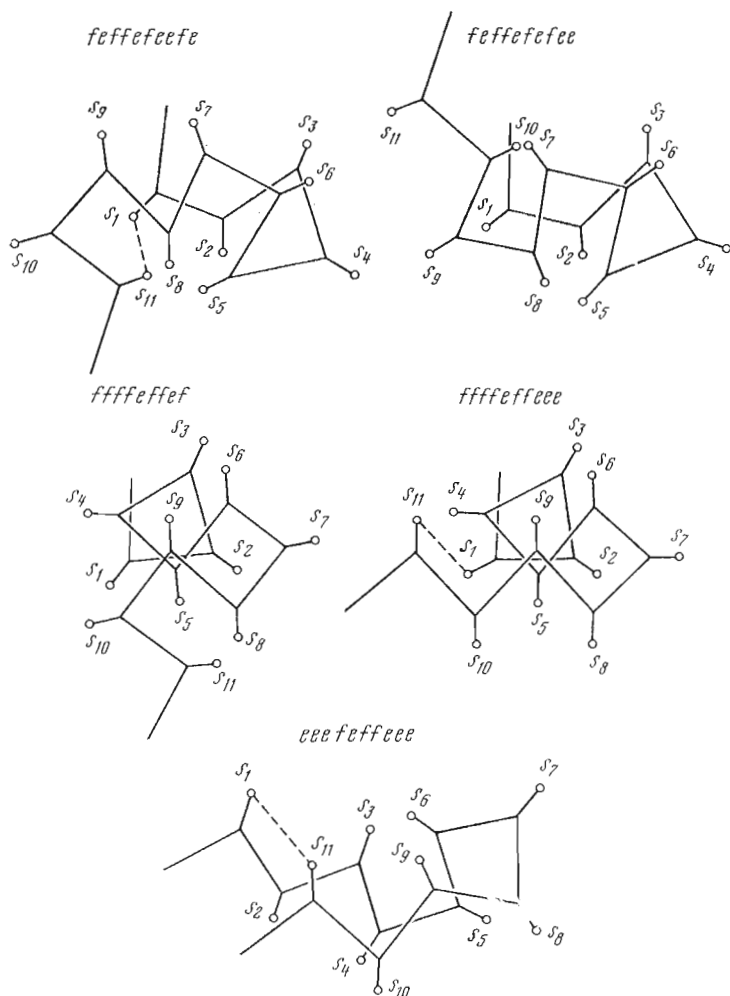


Рис. 2. Шейпы основной цепи фрагмента апамина Cys¹—Cys¹¹; буквами s_i помечены боковые цепи остатков

ей до $-1,5$ ккал/моль, а во втором — повышением энергии монопептидных взаимодействий у Cys¹¹ на $2,2$ ккал/моль и у Thr⁸, Ala⁹, Leu¹⁰ в сумме на $2,3$ ккал/моль.

Близкую величину относительной энергии имеет конформация Cys¹—Cys¹¹ шейпа *feffefefefe* ($E_{\text{общ}}=2,0$ ккал/моль), в которой состояние декапептидного участка отвечает глобальной структуре Cys¹—Leu¹⁰ (табл. 1 и 7 в [1]). Потеря этой конформацией лидирующего положения объясняется изменением под влиянием Cys¹¹ ориентации боковой цепи Leu¹⁰, что приводит к ослаблению на $2,4$ ккал/моль ее взаимодействий с прилегающими пептидными группами и близко расположенной боковой цепью Thr⁸ (рис. 2).

В конформации шейпа *ffffefefefe* ($E_{\text{общ}}=0,5$ ккал/моль) энергия декапептидного участка составляет $3,0$ ккал/моль (табл. 7 в [1]). Заметное понижение относительной энергии конформации этого типа у андекапептидного фрагмента связано с дополнительными взаимодействиями Cys¹¹ с Thr⁸—Leu¹⁰, суммарный эффект которых составляет $-3,3$ ккал/моль. В глобальной структуре *feffefefefe*, имеющей на этом участке такую же форму основной цепи ($B^8-R^9-B^{10}-B^{11}$), но иное положение боковой цепи Thr⁸, энергия этих взаимодействий, как уже отмечалось, равна $-0,8$ ккал/моль.

Величины относительной энергии еще двух рассчитанных конформаций андекапептида шейпов *ffffeffeee* ($E_{\text{общ}}=3,3$ ккал/моль) и *eeeffeffee* (7,4 ккал/моль) почти целиком определяются энергией их декапептидных участков (табл. 7 в [1]); взаимодействие Cys^{11} с предыдущими остатками не превышает здесь $-0,5$ ккал/моль.

Циклический фрагмент $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$. Рассмотрев возможное пространственное строение линейного андекапептидного фрагмента апамина, мы дошли к наиболее интересному этапу исследования, а именно к оценке стерической предрасположенности рассчитанных предпочтительных конформаций к образованию дисульфидной связи. В молекуле апамина, содержащей остатки цистеина в 1, 3, 11 и 15-м положениях, возможны в принципе три системы дисульфидных связей: 1:3, 11:15, 1:11, 3:15 и 1:15, 3:11. В процессе многоступенчатого подхода к выяснению конформационных состояний фрагмента $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ нами не было сделано ни одного предположения о реализации той или иной системы. Образование дисульфидных связей 1:3 и 11:15 исключается, поскольку замыкание боковых цепей Cys^1 и Cys^3 встречает серьезные стерические затруднения [3]. Полученные данные указывают на малую вероятность и системы 1:15 и 3:11. Во всех найденных нами структурах андекапептидного фрагмента остатки Cys^3 и Cys^{11} расположены далеко друг от друга, и их принудительное сближение вызывает резкое повышение энергии.

Результаты априорного расчета однозначно свидетельствуют в пользу только одной системы дисульфидных связей 1:11, 3:15. Остатки Cys^1 и Cys^{11} оказываются сближенными в четырех из шести предпочтительных конформаций — в трех вариантах шейпа *feffeffefe* ($E_{\text{общ}}=0; 2,0$ и $3,6$ ккал/моль) и одного варианта шейпа *ffffeffeee* ($E_{\text{общ}}=3,3$ ккал/моль, рис. 2). Как видно из табл. 1, в этих конформациях линейного андекапептида $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ имеется хотя и очень слабое, но в данном случае весьма показательное взаимодействие между 1-м и 11-м остатками (андекапептидное взаимодействие), которое прямо указывает на малое расстояние между остатками Cys^1 и Cys^{11} (3–4 Å). Несколько большее, но вполне приемлемое для образования S–S-мостика расстояние между этими остатками наблюдается также в конформации шейпа *eeeffeffee* ($E_{\text{общ}}=7,4$ ккал/моль). Эти конформации линейного фрагмента оставлены нами для анализа циклических структур андекапептида; в табл. 1 они отмечены звездочками.

Что же касается не вошедших в этот набор двух конформаций, *feffeffefe* ($E_{\text{общ}}=2,0$ ккал/моль) и *ffffeffefe* ($E_{\text{общ}}=0,5$ ккал/моль), то в них цистеины расположены очень далеко друг от друга (рис. 2) и сблизить их путем изменений двугранных углов, не выходя за пределы форм основных цепей этих структур, не представляется возможным.

Для образования замкнутой системы в рассчитанных конформациях андекапептида была выбрана процедура, предложенная в работе [4]. Согласно этой процедуре, взаимодействие между боковыми цепями остатков Cys , образующими дисульфидную связь, описывается потенциалом Гука

$$E_{\text{S-S}} = B \sum_{i=1}^3 (r_i - r_{i,0})^2,$$

где $B=100$ ккал/моль·Å² — коэффициент упругости стягивающей пружины между атомами S; $r_i=r_1, r_2, r_3, r_4$ — переменные расстояния между парами атомов $\text{S}_i\text{S}_{11}, \text{C}_1^\beta\text{S}_{11}, \text{S}_i\text{C}_{11}^\beta$ и $\text{C}_1^3\text{C}_{11}^\beta$; $r_{i,0}=r_{1,0}, r_{2,0}, r_{3,0}, r_{4,0}$ — экспериментальные равновесные расстояния (рис. 3) при значениях угла вращения вокруг связи S–S $\chi^{\text{S-S}}=\pm 90^\circ$, отвечающих двум минимумам торсионного потенциала $E_{\chi^{\text{S-S}}}=A(r_4-r_{4,0})^2$, где $A=10$ ккал/моль·Å². При этой величине параметра

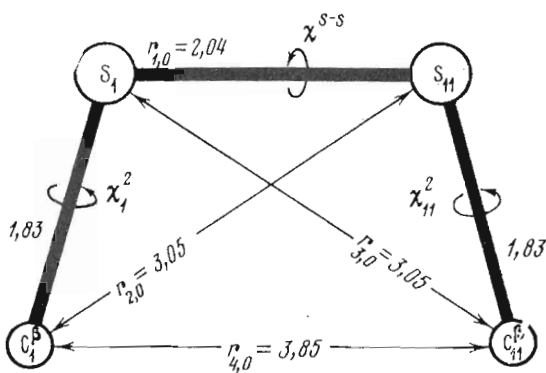


Рис. 3. Геометрия дисульфидного мостика $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ в *gou*-конфигурации ($\chi^{s-s} = \pm 90^\circ$)

А барьер вращения при значениях угла $\chi^{s-s} = 0$ и 180° равен ~ 7 ккал/моль, что соответствует опытному значению [5]. При достижении в процессе минимизации экспериментальных величин длины связи S_1-S_{11} , 2,04 Å и валентных углов $\tau(\text{C}_1^\beta\text{S}_1\text{S}_{11})$ и $\tau(\text{S}_{11}\text{S}_1\text{C}_{11}^\beta)$, равных 104° [6, 7], и двугранного угла $\chi^{s-s} = \pm 90^\circ$ потенциалы E_{s-s} и $E_{\chi^{s-s}}$ обращаются в нуль.

Полученные после использования процедуры зацикливания [4] и минимизации по двугранным углам ϕ , ψ , χ и углу χ^{s-s} величины относительной энергии и геометрические параметры дисульфидного мостика у пяти циклических конформаций андекапептида $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ приведены в табл. 1 и 2. Образование дисульфидной связи сопровождается дополнительной энергетической дифференциацией конформаций. Зацикливание глобальной структуры фрагмента приводит к самой предпочтительной конформации циклического андекапептида. Абсолютная энергия невалентных и электростатических взаимодействий у этой конформации ($-52,7$ ккал/моль) практически совпадает с энергией соответствующей линейной конформации ($-53,8$ ккал/моль). Геометрические параметры дисульфидной связи также весьма близки к экспериментальным значениям (табл. 2, рис. 3). Связи $\text{C}_1^\beta-\text{S}_1$ и $\text{C}_{11}^\beta-\text{S}_{11}$ находятся в *gou*-положении, и угол вращения вокруг S_1-S_{11} -связи близок к 90° , что отвечает минимальному вкладу торсионной составляющей $E_{\chi^{s-s}}$. У следующих двух циклических структур шейпа *feffefee* энергия выше на 5,5 и 7,3 ккал/моль (табл. 1). Дополнительное по сравнению с линейными вариантами повышение энергии в обоих случаях обусловлено в основном торсионной составляющей $E_{\chi^{s-s}}$. Обе конформации имеют менее предпочтительное трансoidное расположение связей $\text{C}_1^\beta-\text{S}_1$ и $\text{C}_{11}^\beta-\text{S}_{11}$ ($\chi^{s-s} \sim 180^\circ$).

При зацикливании конформаций шейпов *ffffefeee* ($E_{\text{общ}} = -3,3$ ккал/моль) и *eeefeffeee* (7,4 ккал/моль) относительная энергия возрастает весьма значительно (табл. 1). Они нереальны и исключены из дальнейшего рассмотрения.

Из представленных выше результатов к наиболее важным, по нашему мнению, следует отнести следующие. Во-первых, самая низкоэнергетическая конформация линейного фрагмента апамина $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ переходит в циклическую конформацию $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$, которая среди структур с дисульфидной связью также обладает минимальной энергией. Во-вторых, глобальная и следующая за ней низкоэнергетическая конформация циклического андекапептида имеют одинаковый шейп пептидного скелета и близкие формы основной цепи. Они различаются лишь формой дипептидного участка $\text{Ala}^9-\text{Leu}^{10}$, который у первой конформации имеет вид R^9-B^{10} , а у второй $-B^9-L^{10}$. Следовательно, циклические конформации шейпа *feffefee* не только намного предпочтительнее конформаций других шейпов по энергии, но обладают большей энтропией.

Геометрические параметры дисульфидного мостика в конформациях
фрагмента $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/моль	Расстояние между атомами, Å			
			$S_1\text{—}S_{11}$	$C_1^{\beta}\dots S_{11}$	$S_1\text{—}C_{11}^{\beta}$	$C_1^{\beta}\dots C_{11}^{\beta}$
<i>feffeefe</i>	$R_{22}^1\text{—}B_{23}^2\text{—}R_3^3\text{—}R_{2222}^4\text{—}B^5\text{—}R^6\text{—}B_{311}^7\text{—}B_{31}^8\text{—}R^9\text{—}B_{32}^{10}\text{—}B_{12}^{11}$	0	1,94	3,08	3,09	4,18
	$R_{22}\text{—}B_{23}\text{—}R_2\text{—}R_{2222}\text{—}B\text{—}R\text{—}B_{311}\text{—}B_{31}\text{—}B\text{—}L_{32}\text{—}B_{31}$	5,5	2,08	3,02	3,09	4,59
<i>ffffeffeee</i> <i>eeeffeffeee</i>	$R_{22}\text{—}B_{23}\text{—}R_2\text{—}R_{2222}\text{—}B\text{—}R\text{—}B_{311}\text{—}B_{31}\text{—}R\text{—}R_{32}\text{—}L_{33}$	7,3	2,07	3,04	3,01	4,45
	$R_{12}\text{—}R_{13}\text{—}R_3\text{—}R_{2222}\text{—}B\text{—}R\text{—}R_{311}\text{—}B_{11}\text{—}B\text{—}B_{32}\text{—}B_{32}$	11,0	2,07	2,97	2,93	4,45
	$B_{33}\text{—}B_{13}\text{—}B_2\text{—}R_{3222}\text{—}B\text{—}R\text{—}R_{311}\text{—}B_{22}\text{—}B\text{—}B_{32}\text{—}B_{21}$	17,3	2,08	3,03	3,12	4,42

Сравним теперь энергию межостаточных взаимодействий и геометрию остатков в линейной и циклической глобальных конформациях фрагмента $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$, которые приведены в табл. 3 и 4. Как видно из табл. 3, образование дисульфидного мостика не нарушает стабилизирующих контактов линейной конформации. Зацикливание привело лишь к незначительному ослаблению монопептидных взаимодействий у остатков Cys^1 и Thr^8 и взаимодействия Thr^8 с Leu^{10} . Во всех остальных случаях энергия межостаточных взаимодействий с точностью 0,1 ккал/моль осталась неизменной. Заметные отклонения двугранных углов ϕ , ψ , χ от их значений в линейной глобальной конформации андекапептида $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$, которые произошли в процессе минимизации энергии при наложении стягивающего потенциала между атомами серы, коснулись в основном фрагмента $\text{Ala}^9\text{—Cys}^{11}$. Таким образом, дополнительное сближение остатков Cys^1 и Cys^{11} при образовании замкнутой системы осуществляется за счет конформационно лабильного участка и практически не затрагивает конформационных состояний остатков, входящих в вуклеацию $\text{Cys}^1\text{—Thr}^8$. Все изменения двугранных углов находятся в пределах соответствующих низкоэнергетических областей и поэтому не вызвали, как видно из табл. 3, сколько-нибудь существенного нарушения благоприятных контактов. Аналогичная ситуация наблюдается и у других конформаций шейпа *feffeefe* ($E_{\text{общ}}=5,5$ и 7,3 ккал/моль).

В случае конформаций шейпов *ffffeffeee* ($E_{\text{общ}}=11,0$ ккал/моль) и *eeeffeffeee* ($E_{\text{общ}}=17,3$ ккал/моль) образование цикла сопровождается значительным искажением геометрии линейной структуры и повышением энергии соответственно на ~7 и 10 ккал/моль.

Следовательно, только глобальная и родственные ей структуры шейпа *feffeefe* линейного фрагмента апамина $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$ оказались предрасположены к созданию дисульфидного мостика между Cys^1 и Cys^{11} . Формиро-

вание глобальной структуры $R_{22}^1\text{—}B_{23}^2\text{—}R_3^3\text{—}R_{2222}^4\text{—}B^5\text{—}R^6\text{—}B_{311}^7\text{—}B_{31}^8\text{—}R^9\text{—}B_{32}^{10}\text{—}B_{12}^{11}$

началось с гексапептидного фрагмента $\text{Cys}^1\text{—Pro}^6$, конформационное со-

стояние которого $R_2^1\text{—}B_{23}^2\text{—}R_2^3\text{—}R_{2222}^4\text{—}B^5\text{—}R^6$ уже имело минимальную энергию (табл. 11 в [2]). При последовательном переходе от гекса- к окта-, нона- и декапептиду соответствующие части глобальной структуры андекапептида неизменно оказывались самыми предпочтительными по энергии, а шейпы — наиболее представительными по числу низкоэнергетических вариантов (табл. 4—7 в [1]). Достройка глобальной структуры, как позд-

Таблица 3

Энергия монопептидных и межостаточных взаимодействий конформаций
фрагмента Cys¹-Cys¹¹ с $E_{\text{общ}}=0$ (табл. 1)

Остаток	Cys ¹	Asn ²	Cys ³	Lys ⁴	Ala ⁵	Pro ⁶	Glu ⁷	Thr ⁸	Ala ⁹	Leu ¹⁰	Cys ¹¹
Cys ¹	-0,6 +0,4	-1,0 -1,0	+0,1 +0,1	+1,2 +1,2	-2,3 -2,5	-1,6 -1,4	-3,7 -3,7	-1,5 -1,7	-0,1 -0,2	-0,1 -0,2	+0,1 0
Asn ²		-2,0 -2,4 -2,0	-2,4 -1,9 -2,4	-1,9 -1,9 -1,9	-2,2 -2,2 -2,2	-1,1 -1,1 -1,1	-0,3 -0,3 -0,3	-1,2 -1,4 -1,2	0 0 0	0 -0,1 0	-0,1 -0,2 -0,2
Cys ³			-0,5 -0,5	-1,8 -1,8	-0,1 -0,1	-1,5 -1,4	+0,3 +0,3	-0,2 -0,2	0 0	0 0	0 0
Lys ⁴				-2,5 -2,5	-1,4 -1,4	-0,4 -0,4	-1,0 -1,0	-0,1 0	0 0	-0,1 -0,1	+0,1 +0,1
Ala ⁵					-0,6 -0,6	-1,6 -1,6	-0,1 -0,1	-0,4 -0,4	0 0	0 0	0 0
Pro ⁶						-0,7 -0,7	-3,6 -3,6	-1,7 -1,6	0 0	+0,1 +0,1	0 0
Glu ⁷							-5,0 -5,0	-1,3 -1,3	-0,1 -0,1	+0,1 +0,1	-0,1 -0,1
Thr ⁸								-2,8 -2,3	-1,0 -0,8	-0,8 -0,2	-0,4 -0,4
Ala ⁹									-1,7 -1,8	-1,2 -1,2	0 -0,1
Leu ¹⁰										-2,2 -2,2	-0,4 -0,5
Cys ¹¹											-1,0 -1,0

Примечание. Верхняя строчка относится к линейному, а нижняя — к циклическому фрагменту.

Таблица 4

Двугранные углы вращения (град) конформаций линейного
(верхняя строчка) и циклического (нижняя строчка) фрагмента
Cys¹-Cys¹¹ с $E_{\text{общ}}=0$ (табл. 1)

Остаток	Основная цепь		Боковая цепь				
	φ	ψ	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	χ^5
Cys ¹	-61,0 -61,0	-60,0 -46,9	180,0 174,4	- 171,4	- 120,0	- -	- -
Asn ²	-100,0 -100,0	140,0 140,0	-170,0 -170,0	-42,0 -42,0	- -	- -	- -
Cys ³	-57,0 -57,0	-45,0 -45,0	180,0 180,0	- -	- -	- -	- -
Lys ⁴	-66,0 -66,0	-36,0 -36,0	-179,0 -179,0	178,0 178,0	180,0 180,0	180,0 180,0	180,0 180,0
Ala ⁵	-138,8 -138,0	91,0 91,0	60,0 60,0	- -	- -	- -	- -
Pro ⁶	-60,0 -60,0	-37,4 -36,0	0 0	0 0	0 0	- -	- -
Glu ⁷	-83,0 -81,0	61,3 62,0	-67,0 -67,0	66,0 66,0	44,0 44,0	- -	- -
Thr ⁸	-125,9 -128,9	125,5 100,0	-64,0 -61,0	67,0 63,0	- -	- -	- -
Ala ⁹	-94,6 -66,0	-49,9 -59,5	60,0 60,0	- -	- -	- -	- -
Leu ¹⁰	-115,0 -81,7	139,9 149,1	-60,0 -60,0	147,6 146,0	- -	- -	- -
Cys ¹¹	-120,1 -155,5	140,0 140,0	-60,0 +40,6	- 178,2	- 120,0	- -	- -

нее и ее зафиксирование, всегда происходила без значительных изменений геометрических и энергетических параметров отвечающих ей конформационных состояний (табл. 8 в [1]), ранее сложившихся у более коротких участков. Таким образом, результаты априорного конформационного анализа, полученные для фрагмента Cys¹⁴-Cys¹⁵ апамина, убедительно свидетельствуют о строго детерминированном механизме укладки пептидной цепи природного олигопептида в нативную конформацию со сближенными остатками цистеинов, образующими дисульфидный мостик, а также о согласованности всех видов межостаточных взаимодействий.

Пентапептидный фрагмент Cys¹⁴-Cys¹⁵. Конформационный анализ фрагмента выполнен на основе результатов расчета двух перекрывающихся трипептидов Cys¹⁴-Ala¹²-Arg¹³ и Arg¹³-Arg¹⁴-Cys¹⁵, полученных в свою очередь из анализа четырех дипептидных участков (рис. 1). Расчет дипептидов указал на возможность реализации очень большого числа конформационных состояний практически всех форм основной цепи, которые и были приняты во внимание при составлении исходных приближений трипептидов. Конформационная энергия Cys¹⁴-Ala¹² и Arg¹⁴-Cys¹⁵ мало чувствительна к значениям угла χ^1 у Cys¹⁴ и Cys¹⁵. Поэтому в расчете трипептидов и пентапептида угол χ^1 у первого остатка варьировался вблизи -60° , а у второго остатка — вблизи 180° . Для боковой цепи Arg¹³ во фрагменте Cys¹⁴-Arg¹³ выбраны углы $\chi^1 \sim 60$ и -60° , а во фрагменте Arg¹³-Cys¹⁵ — $\chi^1 \sim 60$ и 180° , при которых она может взаимодействовать соответственно с предыдущими и последующими остатками. Расположенный около С-конца пентапептида остаток Arg¹³ не может быть реально оценен в пределах данного фрагмента в отношении его взаимодействий с соседними по цепи остатками. Это будет сделано нами позднее, при рассмотрении всей структуры молекулы апамина. В расчете Arg¹³-Cys¹⁵ и Cys¹⁴-Cys¹⁵ было принято одно положение боковой цепи Arg¹⁴ ($\chi^1 - \chi^4 \sim -60, -60, 180, 180^\circ$), при котором она в наибольшей степени ориентирована в сторону предшествующих остатков цепи.

Для трипептида Cys¹⁴-Arg¹³ были сформированы 60 начальных приближений, имеющих 15 различных форм основной цепи, принадлежащих к четырем шейпам (*ee, ef, fe* и *ff*). К наиболее низкоэнергетическим относятся конформации с формами $R^{11}-B^{12}-B^{13}$, $B^{11}-L^{12}-B^{13}$ (*fe*) и $R^{11}-R^{12}-R^{13}$ (*ff*). При отборе вариантов для дальнейшего анализа как в этом случае, так и в случае второго трипептида Arg¹³-Cys¹⁵ необходимо учитывать, что соседние с Arg¹³ остатки далеко не в полной мере могут удовлетворить его возможности к взаимодействиям. Поэтому для анализа пентапептида выбраны низкоэнергетические варианты всех форм основной цепи, за исключением $L^{11}-B^{12}-L^{13}$ (*ef*) и $L^{11}-L^{12}-B^{12}$ (*fe*).

Распределение 56 конформаций второго трипептидного фрагмента Arg¹³-Cys¹⁵ в шкале энергии показало, что и здесь приблизительно равновероятна реализация конформаций подавляющего большинства форм основной цепи четырех шейпов. Высокую энергию, которая не может быть скомпенсирована взаимодействиями Arg¹³ и Arg¹⁴ с остатками других участков молекулы, имеют все конформации с формами $L^{13}-R^{14}-L^{15}$ (*ee*) и $L^{13}-B^{14}-L^{15}$ (*ef*). Они исключены из анализа пентапептида.

Комбинация возможных состояний двух трипептидов составили 162 конформационных варианта фрагмента Cys¹⁴-Cys¹⁵ со 105 формами основной цепи 16 шейпов — максимального для пентапептида количества. Минимизация энергии выполнена при варьировании всех двугранных углов φ , ψ и χ , кроме угла φ_{11} остатка Cys¹⁴, который был зафиксирован при значениях, отвечающих циклическим конформациям Cys¹⁴-Cys¹⁴. В табл. 5 даны величины относительной энергии у наиболее предпочтительных конформаций каждого шейпа. Самыми выгодными для свободного пентапептида Cys¹⁴-Cys¹⁵ являются полностью свернутые структуры шейпа *ffff*. За этой группой следуют две конформации шейпа *efef* ($E_{\text{общ}}=1,1$ и $3,4$ ккал/моль) и пять конформаций шейпа *efee* ($E_{\text{общ}}=1,5; 2,1; 3,2; 4,0$

Относительная энергия предпочтительных конформаций фрагмента Cys¹¹-Ala¹²-Arg¹³-Arg¹⁴-Cys¹⁵

Шейп	Конформации	Е _{общ.} , ккал/моль	Шейп	Конформации	Е _{общ.} , ккал/моль	Шейп	Конформации	Е _{общ.} , ккал/моль
eeee	B ₃ ¹¹ -B ₃ ¹² -B ₃ ¹³ -B ₃ ¹⁴ -B ₃ ¹⁵	4,4	eeff	B ₃ ¹¹ -B ₃ ¹² -R ₃ ¹³ -R ₃ ¹⁴ -R ₃ ¹⁵	4,8	efff	B ₃ ¹¹ -R ₃ ¹² -R ₃ ¹³ -R ₃ ¹⁴ -R ₃ ¹⁵	4,8
	L ₃ -R-L ₃ ²²²³ -B ₃ ³²²² -B ₂	4,4		L ₃ -B-R ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -R ₂	5,6		L ₃ -R-R ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -R ₂	7,6
	B ₃ -R-L ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	4,7		B ₃ -B-R ₃ ¹²² -R ₃ ³²²² -R ₂	5,7		L ₃ -R-R ₃ ¹²² -R ₃ ³²²² -R ₂	9,2
	B ₃ -B-B ₃ ¹²² -R ₃ ³²²² -B ₂	5,2		B ₃ -R-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	1,4 *		B ₃ -L-R ₃ ³²²² -R ₃ ³²²² -R ₂	5,3
	B ₃ -B-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	4,4		B ₃ -R-B ₃ ²²²³ -B ₃ ³²²² -L ₂	3,4 *		R ₃ -B-R ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -R ₂	5,4
	L ₃ -B-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	5,3		L ₃ -R-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	4,6		B ₃ -L-R ₃ ³²²³ -R ₃ ³²²² -R ₂	5,8
	B ₃ -B-B ₃ ¹²² -R ₃ ³²²² -R ₂	6,6		B ₂ -L-R ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	3,1		R ₃ -B-R ₃ ³²²² -R ₃ ³²²² -R ₂	6,0
	B ₃ -B-R ₃ ¹²² -B ₃ ³²²² -B ₂	5,0		R ₂ -B-R ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	4,6		R ₃ -R-B ₃ ²²²¹ -R ₃ ³²²² -R ₂	5,2
	L ₃ -R-R ₃ ¹²² -B ₃ ³²²² -B ₂	5,7		R ₂ -B-B ₃ ³²²² -L ₃ ³²²² -B ₂	5,4		R ₃ -R-B ₂ ²²²³ -B ₃ ³²²² -L ₂	5,3
	R ₃ -L-R ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	6,4		R ₃ -B-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	4,3		R ₃ -B-L ₃ ²²²¹ -R ₃ ³²²² -R ₂	5,6
eefe	B ₃ -R-B ₂ ²²²³ -B ₃ ³²²² -B ₂	1,5 *	feef	B ₂ -L-B ₃ ³²²² -R ₃ ³²²² -R ₂	4,6	fffe	R ₃ -R-B ₃ ²²²¹ -B ₃ ³²²² -L ₂	7,0
	B ₃ -R-R ₃ ¹²² -B ₃ ³²²² -B ₂	2,1 *		B ₃ -L-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -B ₂	4,9		R ₃ -R-B ₃ ²²²¹ -L ₃ ³²²² -B ₂	3,7
	B ₃ -B-L ₃ ²²²¹ -B ₃ ³²²² -B ₂	3,2 *		R ₃ -R-B ₂ ²²²³ -B ₃ ³²²² -B ₂	3,1		R ₃ -R-R ₃ ²²²¹ -B ₃ ³²²² -L ₂	3,8
	B ₃ -R-R ₂ ¹²²³ -L ₃ ³²²² -B ₂	4,0 *		R ₃ -R-B ₃ ²²²¹ -B ₃ ³²²² -B ₂	4,5		R ₃ -R-R ₃ ²²²¹ -R ₃ ³²²² -L ₂	6,2
	B ₃ -R-B ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -L ₂	4,2 *		R ₃ -R-B ₃ ²²²¹ -R ₃ ³²²² -L ₂	7,4		R ₃ -R-R ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -L ₂	7,6
	R ₂ -B-B ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	3,3		L ₃ -R-R ₃ ¹²² -B ₃ ³²²² -B ₂	5,6		R ₃ -R-R ₂ ²²²³ -R ₃ ³²²² -R ₂	0 *
	B ₃ -L-B ₃ ³²²² -B ₃ ³²²² -B ₂	3,7		B ₃ -R-R ₃ ¹²² -R ₃ ³²²² -L ₂	5,9		R ₃ -R-R ₃ ²²²¹ -R ₃ ³²²² -R ₂	1,2 *
	R ₃ -B-B ₂ ²²²³ -B ₃ ³²²² -B ₂	4,5		B ₃ -R-R ₃ ¹²² -B ₃ ³²²² -B ₂	6,6		R ₃ -R-R ₃ ²²²¹ -B ₃ ³²²² -L ₂	1,5 *

Примечание. Звездочками отмечены конформации, использованные для последующего анализа.

и 4,2 ккал/моль; табл. 5). Менее 4,0 ккал/моль имеют также единичные конформации *feee*, *feje*, *ffee* и *ffje*. Выбранные для расчета пентадекапептида $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{15}$ варианты отмечены в табл. 5 звездочками.

Пентадекапептидный фрагмент $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{15}$. Перед анализом этого фрагмента были рассмотрены конформации тридекапептида $\text{Cys}^1\text{—Arg}^{13}$, составленные из двух структур андекапептида $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$ шейпа *feffejeefe* (табл. 1) и конформационных состояний участка $\text{Cys}^{11}\text{—Arg}^{13}$ с формами основной цепи $R^{11}\text{—}R^{12}\text{—}R^{13}$, $B^{11}\text{—}R^{12}\text{—}B^{13}$ и $B^{11}\text{—}B^{12}\text{—}L^{13}$, отвечающих отобранным вариантам пентапептида (табл. 5). Это было сделано по двум причинам. Во-первых, для согласования ориентации боковой цепи Arg^{13} со структурами цикла $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$ и, во-вторых, для получения геометрического критерия образования дисульфидной связи между Cys^3 и Cys^{15} , необходимого для отбора конформаций пентапептида. Анализ тридекапептида прежде всего показал, что структуры, в которых участок $\text{Cys}^{11}\text{—Ala}^{12}\text{—Arg}^{13}$ имеет свернутую форму шейпа *ff*, не могут быть реализованы в последовательности $\text{Ala}^9\text{—Leu}^{10}\text{—Cys}^{11}\text{—Ala}^{12}\text{—Arg}^{13}$ по стерическим причинам. При наличии дисульфидной связи $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{14}$ между боковыми цепями Leu^{10} и Arg^{13} возникают неустраняемые невалентные отталкивания. Ситуация еще более усугубляется при присоединении Arg^{14} , причем его конформационное состояние не имеет значения. Поэтому все конформации $\text{Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$ шейпов типа *ffax* ($x=f$ или e), выгодные для свободного пентапептида (табл. 5), неприемлемы для фрагмента той же последовательности в цепи апамина. Помимо этого конформации с преобладанием свернутой формы основной цепи не обеспечивают необходимую сближенность остатков Cys^3 и Cys^{15} . Более того, анализ показал, что из всех рассмотренных структурных вариантов 16 шейпов фрагмента $\text{Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$ этому условию могут удовлетворить только конформации шейпов *efee* и *efef*, часть которых относится к самым выгодным структурам свободного пентапептида (табл. 5).

Исходные приближения пентадекапептида были составлены из двух циклических конформаций участка $\text{Cys}^1\text{—Cys}^{11}$ (табл. 1) и отмеченных в табл. 5 низкоэнергетических конформаций шейпов *efee* и *efef* участка $\text{Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$. Расчет свободного пентапептида $\text{Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$ показал, что наиболее предпочтительными и приблизительно эквивалентными у боковых цепей Arg^{13} и Arg^{14} являются углы $\chi^1 \sim 180^\circ$ и -60° . В расчете всех структурных вариантов пентадекапептида нами приняты углы $\chi^1 \sim 180^\circ$ и $\chi^2\text{—}\chi^4 \sim 180^\circ$ для остатка Arg^{13} и $\chi^1 \sim -60^\circ$ и $\chi^2\text{—}\chi^4 \sim 180^\circ$ для Arg^{14} . В этих состояниях боковые цепи остатков имеют полностью развернутый характер и представляют наилучшие условия для компактной упаковки основной цепи и оборудования дисульфидной связи на участке $\text{Cys}^3\text{—Cys}^{15}$. Окончательно вопрос об ориентации боковых цепей Arg^{13} и Arg^{14} будет рассмотрен ниже, а также в следующем сообщении при анализе конформационных возможностей боковых цепей в глобальной структуре апамина.

Минимизация энергии составленных таким образом структурных вариантов пентадекапептида и образование дисульфидной связи между Cys^3 и Cys^{15} выполнялись одновременно по способу, предложенному в работе [4] и описанному нами выше. Величины относительной энергии рассчитанных бидекапептидных конформаций фрагмента $\text{Cys}^1\text{—Cys}^3\text{—Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$ даны в табл. 6, а геометрические параметры второго дисульфидного мостика апамина — в табл. 7.

Семь из 12 рассчитанных конформаций с двумя дисульфидными связями обладают очень высокой энергией. Также маловероятны варианты с $E_{\text{общ}} = 7,7; 10,9; 11,4$ и $16,0$ ккал/моль. Задикливание этих конформаций приводит, во-первых, к значительной деформации соответствующих оптимальных структур свободного пентапептида $\text{Cys}^{11}\text{—Cys}^{15}$, что ведет к напряжению фрагмента, и, во-вторых, к возникновению между боковыми цепями остатков Arg^{13} , Arg^{14} и андекапептидным циклом неблагоприятных контактов, которые нельзя устранить, не вызвав новых осложнений.

Относительная энергия конформаций бициклического пентадекапептидного фрагмента Cys¹-Cys³-Cys¹¹-Cys¹⁵

Шейп	Конформация	E _{общ} , ккал/моль
feffe ee ee ee ee	R ¹ ₂₂ -B ² ₂₃ -B ³ ₃₁ -R ⁴ ₂₂₂₂ -B ⁵ ₃₁ -R ⁶ ₇ -B ⁸ ₃₁ -R ⁹ ₁₀ -B ¹¹ ₁₂ -R ¹³ ₁₂ -R ¹⁴ ₃₂₂₂ -B ¹⁵ ₂₂	0*
	»	(.)
	»	11,4
	»	(.)
	»	16,0
feffe ee ee ee e	»	7,7
	»	(.)
	»	10,9
	»	(.)
feffe ee ee ee ee	»	(.)
	»	(.)
	»	(.)
	»	(.)

Примечание. Звездочкой отмечена конформация, использованная для последующего анализа; (.) — конформации имеют высокую энергию.

Геометрические параметры дисульфидного мостика Cys³-Cys¹⁵ в конформациях фрагмента амина Cys¹-Cys³-Cys¹¹-Cys¹⁵ Таблица 7

Шейп	Конформация	E _{общ} , ккал/моль	Расстояние между атомами, Å		
			S ₃ -S ₁₅	S ₃ ...S ₁₆	S ₃ ...C ^β ₁₅
feffe ee ee ee ee	-R ⁹ ₁₀ -B ¹¹ ₁₂ -R ¹³ ₁₂ -B ¹⁴ ₃₂₂₂ -B ¹⁵ ₂₂	0	2,03	3,04	3,10
	-B ¹⁵ ₂₂ -L ³² ₃₁ -R ²² ₂₂ -B ^{3222-R²²}	10,9	2,20	2,86	3,07
	-R ²² ₂₂ -B ³¹ ₃₁ -R ²² ₂₂ -L ^{3222-R²²}	11,4	2,10	2,95	3,10
feffe ee ee ee e	-R ²² ₂₂ -B ¹² ₁₂ -R ²² ₂₂ -B ^{3222-L^{3222-R²²}}	7,7	1,95	3,17	3,12

Примечание. Во всех структурах участок Cys¹-Thr⁵ имеет конформационное состояние R¹₂₂-B²₂₃-R³₃₁-R⁴₂₂₂₂-B⁵₃₁-R⁶₇-B⁸₃₁.

Таблица 8

Энергия монопептидных и межстаточных взаимодействий (ккал/моль)

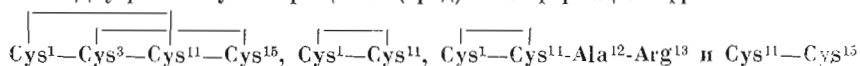
в конформациях фрагментов Cys¹-Cys³-Cys¹¹-Cys¹⁵, Cys¹-Cys¹¹,
Cys¹-Cys¹¹-Ala¹²-Arg¹³ и Cys¹¹-Cys¹⁵

Остаток	Cys ¹	Asn ²	Cys ³	Lys ⁴	Ala ⁵	Pro ⁶	Glu ⁷	Thr ⁸	Ala ⁹	Leu ¹⁰	Cys ¹¹	Ala ¹²	Arg ¹³	Arg ¹⁴	Cys ¹⁵
Cys ¹	0,4	-1,0	0,1	1,2	-2,5	-1,4	-3,7	-1,7	-0,2	-0,2	0	0	1,3	2,9	0,3
	0,4	-1,0	0,1	1,2	-2,5	-1,4	-3,7	-1,7	-0,2	-0,2	0	0	-	-	-
	0,4	-1,0	0,1	1,2	-2,5	-1,4	-3,7	-1,7	-0,2	-0,2	0	0	1,3	-	-
Asn ²		-2,0	-2,4	-1,9	-2,2	-1,1	-0,3	-1,4	0	-0,1	-0,2	0	-0,3	-2,8	-0,9
		-2,0	-2,4	-1,9	-2,2	-1,1	-0,3	-1,4	0	-0,1	-0,2	-	-	-	-
		-2,0	-2,4	-1,9	-2,2	-1,1	-0,3	-1,4	0	-0,1	-0,2	0	-0,4	-	-
Cys ³			-0,5	-1,8	-0,1	-1,4	0,3	-0,2	0	0	0	0	-0,1	-0,3	-1,0
			-0,5	-1,8	-0,1	-1,4	0,3	-0,2	0	0	0	-	-	-	-
			-0,5	-1,8	-0,1	-1,4	0,3	-0,2	0	0	0	0	-0,1	-	-
Lys ⁴				-2,5	-1,4	-0,4	-1,0	0	0	-0,1	0,1	0	0,6	0,8	-0,3
				-2,5	-1,4	-0,4	-1,0	0	0	-0,1	0,1	-	-	-	-
				-2,5	-1,4	-0,4	-1,0	0	0	-0,1	0,1	0	0,6	-	-
Ala ⁵					-0,6	-1,6	0	-0,9	0	0	0	0	0,1	0	0
					-0,6	-1,6	0	-0,9	0	0	0	-	-	-	-
					-0,6	-1,6	0	-0,9	0	0	0	0	0,1	-	-
Pro ⁶						-0,7	-3,6	-1,6	0	0,1	0	0	0	-0,3	-0,1
						-0,7	-3,6	-1,6	0	0,1	0	-	-	-	-
						-0,7	-3,6	-1,6	0	0,1	0	0	0	-	-
Glu ⁷							-5,0	-1,3	-0,1	0,1	-0,1	0	-1,0	-2,1	-0,1
							-5,0	-1,3	-0,1	0,1	-0,1	-	-	-	-
							-5,0	-1,3	-0,1	0,1	-0,1	0	-1,1	-	-
Thr ⁸								-2,3	-0,8	-0,2	-0,7	0	0	0,1	0
								-2,3	-0,8	-0,2	-0,7	-	-	-	-
								-2,3	-0,8	-0,2	-0,7	0	0	-	-
Ala ⁹									-1,8	-1,2	-0,1	0	-0,1	-0,3	0
									-1,8	-1,2	-0,1	-	-	-	-
									-1,8	-1,2	-0,1	0	-0,1	-	-
Leu ¹⁰										-2,2	-0,5	0	-0,1	-0,3	0
										-2,2	-0,5	0	0	-	-
										-2,2	-0,5	0	-0,1	-	-
Cys ¹¹											-1,0	-0,6	-0,3	-0,1	0
											-1,0	-	-	-	-
											-1,0	-0,6	-0,3	-	-
Ala ¹²												-1,4	-0,7	-0,5	-1,3
												-1,0	-1,0	-0,2	0
												-1,0	-1,0	-	-
Arg ¹³													-1,1	-1,3	-0,5
													-1,1	-1,3	-0,5
													-1,1	-1,3	-0,5
Arg ¹⁴														-3,1	0,3
														-3,1	0,3
														-3,1	0,3
Arg ¹⁴														-3,3	0,1
														-3,3	0,1
														-3,3	0,1
Cys ¹⁵															-2,2
															-2,2
															-2,2
															-2,6
															-2,6
															-2,6

-1,7

Примечание. Величины энергии, соответствующие отдельным фрагментам, приведены в порядке их перечисления в заголовке таблицы.

Двугранные углы вращения (град) в конформациях фрагментов



Остаток	Основная цепь		Боковая цепь				
	φ	ψ	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	χ^5
Cys ¹	60,0	-46,9	174,4	171,4	120,0		
	60,0	-46,9	174,4				
	60,0	-46,9	174,4				
Asn ²	-100,0	140,0	-170,0	-42,0			
	-100,0	140,0	-170,0	-42,0			
	-100,0	140,0	-170,0	-42,0			
Cys ³	-57,0	-45,0	-74,4	92,0	-96,0		
	-57,0	-45,0	180,0				
	-57,0	-45,0	-66,7				
Lys ⁴	-66,0	-36,0	-179,0	178,0	180,0	180,0	180,0
	-66,0	-36,0	-179,0	178,0	180,0	180,0	180,0
	-66,0	-36,0	-179,0	178,0	180,0	180,0	180,0
Ala ⁵	-138,0	91,0	60,0				
	-138,0	91,0	60,0				
	-138,0	91,0	60,0				
Pro ⁶	-60,0	-36,0	0	0	0		
	-60,0	-36,0	0	0	0		
	-60,0	-36,0	0	0	0		
Glu ⁷	-81,0	62,0	-67,0	66,0	44,0		
	-81,0	62,0	-67,0	66,0	44,0		
	-81,0	62,0	-67,0	66,0	44,0		
Thr ⁸	-128,9	100,0	-61,0	63,0			
	-128,9	100,0	-61,0	63,0			
	-128,9	100,0	-61,0	63,0			
Ala ⁹	-66,0	-59,5	60,0				
	-66,0	-59,5	60,0				
	-66,0	-59,5	60,0				
Leu ¹⁰	-81,7	119,1	-60,0	146,0			
	-81,7	119,1	-60,0	146,0			
	-81,7	119,1	-60,0	146,0			
Cys ¹¹	-155,5	152,7	40,6	178,2	120,0		
	-155,5	140,0	40,6				
	-155,5	148,6	40,6				
	-148,5	154,2	-63,6				
Ala ¹²	-65,1	-44,1	60,0				
	-	-	-				
	-66,0	-42,6	60,0				
Arg ¹³	-61,3	-39,1	60,0				
	-159,9	143,3	170,0	180,0	180,0	180,0	0
	-	-	-	-	-	-	-
Arg ¹⁴	-158,3	143,8	180,0	180,0	180,0	180,0	0
	-152,3	135,3	178,5	180,0	180,0	75,3	0
	-68,8	146,3	-60,0	180,0	180,0	180,0	0
Cys ¹⁵	-	-	-	-	-	-	-
	-86,5	145,3	-56,0	-62,7	180,0	180,0	0
	-58,3	-55,0	-145,3	-140,0	-96,0		
	-	-	-	-	-		
	-59,5	-53,3	179,6	-			

Примечание. Значения двугранных углов фрагментов приведены в порядке их переисчисления в заголовке таблицы.

Таким образом, результаты теоретического конформационного анализа приводят к заключению, что для бициклического участка апамина $\text{Cys}^1-\text{Cys}^3-\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ наиболее вероятна одна структура шейпа *feffeefeefeefe* ($E_{\text{общ}}=0$; табл. 6). В табл. 2 и 7 представлены геометрические параметры дисульфидных мостиков $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ и $\text{Cys}^3-\text{Cys}^{15}$ у четырех конформаций пентадекапептида с величиной $E_{\text{общ}}$ от 0 до 11,4 ккал/моль. У структуры с $E_{\text{общ}}=0$ параметры обоих мостиков практически совпадают с экспериментальными значениями $r_{\text{S-S}}=2,04$, $r_{\text{C...S}}=3,05$, $r_{\text{C...C}}=3,85$ Å [5-7]. Связи C^β-S в обоих случаях находятся относительно S-S в *gosh*-положении (двугранные углы $\chi^{\text{S-S}}$ близки к 90°), что отвечает минимуму торсионного потенциала. В других конформациях совпадение менее удовлетворительное. Поэтому они должны уступать глобальной конформации по энергии валентных взаимодействий, которые в нашем расчете не учитываются. Установление в этих структурах равновесных длин связей и валентных углов в дисульфидных мостиках будет сопровождаться дополнительным повышением конформационной энергии. Итак, для последующего анализа пространственного строения апамина нами составлена глобальная конформация шейпа *feffeefeefeefe*. Исключенные из дальнейшего рассмотрения конформации имеют высокую энергию, обусловленную главным образом напряжением, возникающим при зацикливании. Оно присуще циклической системе и поэтому не может быть устранено или скомпенсировано удлинением цепи апамина.

Сопоставим теперь энергию межостаточных взаимодействий и значения двугранных углов основных и боковых цепей у бициклического пентадекапептидного участка апамина $\text{Cys}^1-\text{Cys}^3-\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ с андекапептидом $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$, тридекапептидом $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}-\text{Ala}^{12}-\text{Arg}^{13}$ и пентапептидом $\text{Cys}^{14}-\text{Cys}^{15}$. Такое сопоставление позволит получить количественное представление об изменении энергетических и геометрических параметров, которое происходит при образовании второй дисульфидной связи. В табл. 8 приведены значения энергии межостаточных взаимодействий в глобальной конформации пентадекапептида $\text{Cys}^1-\text{Cys}^3-\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ и в соответствующих ей конформационных состояниях у отмеченных выше более коротких фрагментов апамина, а в табл. 9 — значения двугранных углов основных и боковых цепей в этих же конформациях фрагментов. Сравнение энергетических и геометрических параметров позволяет сделать следующие заключения.

1. Образование второй дисульфидной связи $\text{Cys}^3-\text{Cys}^{15}$ апамина не нарушает стабилизирующих контактов и конформационных состояний остатков в первой циклической системе $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$. В свободном цикле $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ и включенном в пентадекапептид $\text{Cys}^1-\text{Cys}^3-\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ энергия межостаточных взаимодействий и двугранные углы имеют те же значения, несмотря на то что остатки второго цикла, и прежде всего Arg^{13} и Arg^{14} , осуществляют с остатками первого как стабилизирующие взаимодействия (с $\text{Glu}^7 \sim -2,6$ ккал/моль), так и дестабилизирующие (с Cys^1 и $\text{Lys}^4 +5,3$ ккал/моль). Отсутствие при этом заметных изменений в энергии и геометрии $\text{Cys}^1-\text{Cys}^{11}$ объясняется электростатической природой этих взаимодействий, обладающих малым градиентом.

2. Сближенность остатков Cys^3 и Cys^{15} происходит автоматически за счет невалентных взаимодействий при конформационном состоянии пентапептида $\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$, которое является одним из самых предпочтительных по энергии и энтропии для свободного фрагмента (табл. 5). На конформационную лабильность, приводящую к зацикливанию структуры $B_3^{11}-R^{12}-B_{2222}^{13}-B_{3222}^{14}-B_2^{15}$ соответствующего фрагмента, указывает очень малое различие в энергии его внутренних межостаточных взаимодействий (табл. 8) при заметном отклонении некоторых двугранных углов этой конформации в бициклической системе от их значений в свободном фрагменте (табл. 9). Все изменения геометрии пентапептида $\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ при

его встройке в цикл присходят в пределах одних и тех же низкоэнергетических областей потенциальной поверхности.

3. Быстрое, спонтанное и безошибочное образование двух дисульфидных связей в апамине осуществляется в принципе по одному и тому же механизму, который, очевидно, является общим и для белков. В основе механизма лежат конформационные аспекты. Следующий из расчета строго детерминированный механизм создания дисульфидного мостика обусловлен предрасположенностью соответствующих участков олиго- или полипептидной молекулы к такому формообразованию, которое неизбежно приводит к сближению определенных остатков Cys и к необходимой для окислительной реакции взаимной ориентации их боковых цепей. Валентному связыванию цистенов предшествует образование на одном конце фрагмента конформационно жесткой нуклеации, а на другом, сравнительно коротком, — лабильного участка. При сложившейся нуклеации и в самой предпочтительной конформации лабильного участка атомы S вступают во взаимодействие. У апамина нуклеацию в первом цикле составляет последовательность Cys¹—Thr⁸, а подвижную часть — Ala⁹—Cys¹¹. Во втором цикле структурно жестким участком является циклический андекапептид Cys¹—Cys¹¹, а лабильным — тетрапептид Ala¹²—Cys¹⁵ (табл. 8). Два резко различающихся по своим конформационным свойствам участка выполняют в создании дисульфидного мостика различные функции, в одинаковой мере необходимые для превращения этого процесса в быстрый, спонтанный и безошибочный. Благодаря нуклеации процесс становится не статистическим, а детерминированным. Конформационно лабильный участок легко локализует и делает низкоэнергетичными все изменения геометрии пептидной цепи, которые неизбежны при сближении атомов S на валентное расстояние.

Третий этап исследования пространственного строения апамина заключался в анализе конформационных возможностей фрагмента Cys¹⁵—Gln¹⁶—Gln¹⁷—His¹⁸—NH₂, уточнении ориентации боковых цепей остатков Arg¹³ и Arg¹⁴ и расчете структуры всей молекулы.

Тетрапептидный фрагмент Cys¹⁵—His¹⁸—NH₂. Конформационному анализу этого фрагмента предшествовал расчет перекрывающихся дипептидов Gln¹⁶—Gln¹⁷, Gln¹⁷—His¹⁸—NH₂ и трипептида Gln¹⁶—Gln¹⁷—His¹⁸—NH₂ (рис. 1). Минимизация энергии начальных приближений трипептида, составленных из низкоэнергетических состояний дипептидов, при варьировании всех двугранных углов привела к заметной дифференциации конформаций. Из 137 оптимальных состояний Gln¹⁶—His¹⁸—NH₂ в интервал 0—5 ккал/моль попала 31 конформация с формами основной цепи *B-B-B* и *B-R-L (ee)*, *B-R-B (ef)*, *R-B-B (fe)*, *R-R-B* и *R-R-R (ff)*. Они, а также *B-* и *R-*формы остатка Cys¹⁵ составили исходные приближения для минимизации энергии тетрапептида Cys¹⁵—His¹⁸—NH₂. Угол φ₁₅ остатка Cys¹⁵ фиксировался при значении, полученном в расчете бицикла Cys¹—Cys³—Cys¹¹—Cys¹⁵ (табл. 9). Результаты минимизации 62 конформаций свидетельствуют о значительной лабильности тетрапептидного фрагмента. Для следующего анализа нами оставлены варианты с энергией до 6 ккал/моль, которые представляют все формы основной цепи. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий у наиболее предпочтительных конформаций фрагмента Cys¹⁵—Gln¹⁶—Gln¹⁷—His¹⁸—NH₂ приведена в табл. 10. У глобальной конформации *R₂¹⁵-B₂₁₃¹⁶-R₃₁₁¹⁷-B₃₃¹⁸ (fef)* наиболее интенсивный вклад в стабилизацию вносят взаимодействия боковых цепей Gln¹⁶ и Gln¹⁷ с пептидным остовом и боковой цепью His¹⁸ (−8,7 ккал/моль). В следующей за ней в шкале энергии свернутой конформации *R₂¹⁵-R₂₁₁¹⁶-R₂₁₁¹⁷-B₃₁¹⁸ (fff; E_{овш} = 0,4 ккал/моль) эти взаимодействия составляют −5,3 ккал/моль; основной стабилизирующий эффект оказывают скелетные взаимодействия, энергетический вклад которых равен −6,7 ккал/моль, в то время как у глобальной конформации — лишь −1,5 ккал/моль. Стабильность конформаций *R₂¹⁵-B₂₁₃¹⁶-B₃₁₁¹⁷-B₃₃¹⁸* и *R₂¹⁵-B₂₁₃¹⁶-R₃₁₁¹⁷-L₃₃¹⁸* с энергией 1,0 и*

Энергия внутри- и межстаточных взаимодействий в предпочтительных конформациях фрагмента Cys¹⁵-Gln¹⁶-Gln¹⁷-His¹⁸-NH₂

Шейп	Конформация	E _{общ.} , ккал/моль	Энергия внутри- и межстаточных взаимодействий, ккал/моль									
			Cys ¹⁶	Gln ¹⁶	Gln ¹⁷	His ¹⁸	Cys ¹⁵ -Gln ¹⁶	Gln ¹⁶ -Gln ¹⁷	Gln ¹⁷ -His ¹⁸	Cys ¹⁵ -Gln ¹⁷	Gln ¹⁶ -His ¹⁸	Cys ¹⁵ -His ¹⁸
<i>eee</i>	B ₂ ¹⁵ -B ₂₁₃ ¹⁶ -B ₃₁₁ ¹⁷ -B ₃₃ ¹⁸	2,5	0,9	-4,1	-4,0	-4,1	-0,7	-3,5	-1,8	-0,6	-2,0	0
<i>eej</i>	B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	1,4	0,8	-4,1	-4,0	-4,2	-0,7	-4,8	-1,9	-0,5	-1,8	0
<i>eje</i>	B ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	3,6	0,9	-4,1	-4,3	-4,2	-0,7	-1,1	-3,2	-0,3	-1,2	-0,9
<i>fee</i>	R ₂ -B ₂₁₃ -B ₃₁₁ -B ₃₃	1,0	0,9	-4,1	-4,0	-4,0	-0,8	-3,5	-1,8	-0,8	-1,9	0
	R ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	1,7	0,9	-4,1	-3,7	-1,0	-1,1	-4,8	-2,8	-1,3	-3,5	0
<i>eff</i>	B ₂ -R ₂₂₁ -R ₃₁₁ -R ₂₁	4,9	1,0	-2,0	-2,3	-3,6	-0,8	-4,7	-1,4	-0,8	-2,8	-1,7
<i>fej</i>	R ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	0	0,9	-4,1	-4,0	-4,1	-1,1	-5,0	-1,9	-1,4	-1,8	0
<i>ffe</i>	R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃	3,8	0,9	-2,6	-4,2	-2,1	-1,4	-0,9	-4,6	-1,5	-1,7	-1,7
<i>fff</i>	R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₁	0,4	1,0	-4,0	-4,4	-4,4	-1,9	-1,5	-2,4	-2,7	-1,4	-1,2

1,7 ккал/моль обусловлена в основном взаимодействиями боковых цепей Gln¹⁶ и Gln¹⁷ со всеми элементами основной цепи и с боковой цепью His¹⁸.

Апамин Cys¹-His¹⁸-NH₂. Непосредственное использование результатов анализа фрагментов Cys¹-Cys¹⁵ и Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ для расчета конформаций всей молекулы апамина сопряжено с рассмотрением достаточно большого числа вариантов. Поэтому предварительно нами были оценены конформационные возможности С-концевого декапептидного участка Ala⁹-His¹⁸-NH₂. В исходных для минимизации приближениях структура Ala⁹-Cys¹⁵ отвечала состоянию этого участка в глобальной конформации Cys¹-Cys¹⁵ (табл. 9), а структура Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ — 35 конформациям с энергией от 0 до 6,0 ккал/моль. Расчет декапептида привел к заметной энергетической дифференциации его конформаций (табл. 11), которая в основном отражает стерическое соответствие между низкоэнергетическими состояниями свободного тетрапептида Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ и принятой структурой Ala⁹-Cys¹⁵. В самой предпочтительной конформации Ala⁹-His¹⁸-NH₂ (E_{общ.}=0; табл. 11) С-концевой тетрапептид находится в состоянии, которое является глобальным для свободного фрагмента (табл. 10). Низкоэнергетичен также ряд вариантов с конформациями Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ шейпа *fee*. Менее комплементарными оказались все свернутые структуры концевого фрагмента (*fff*). Конформации декапептида Ala⁹-His¹⁸-NH₂, использованные в расчете структуры всей молекулы апамина, отмечены в табл. 11 звездочками. Они представляют все шейпы и, за редким исключением, все формы основной цепи фрагмента Ala⁹-His¹⁸-NH₂.

Величины энергии рассчитанных конформаций апамина, полученные после минимизации по двугранным углам основной и боковых цепей всей молекулы, представлены в табл. 12. Расчет показал, что положение боковой цепи Arg¹⁴ с $\chi^1, \chi^2 \sim -60^\circ$ и $\chi^3, \chi^4 \sim 180^\circ$ (3322), наиболее выгодное для декапептида Ala⁹-His¹⁸-NH₂, неприемлемо для апамина из-за наталкивания гуанидиновой группы на дисульфидный мостик Cys¹-Cys¹¹. Новые предпочтительные ориентации боковой цепи Arg¹⁴ имеют следующие значения двугранных углов: $\chi^1 \sim -60^\circ, \chi^2 \sim 60^\circ, \chi^3, \chi^4 \sim 180^\circ$ (3122), $\chi^1 \sim -60^\circ, \chi^2 - \chi^4 \sim 180^\circ$ (3222) и $\chi^1, \chi^3 \sim -60^\circ, \chi^2, \chi^4 \sim 180^\circ$ (3232).

Анализ апамина приводит к заключению, что его структура состоит из двух существенно различающихся по конформационным свойствам участков Cys¹-Cys¹⁵ и Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂. Первый из них имеет весьма жест-

Относительная энергия конформаций фрагмента Ala⁹-Leu¹⁰-Cys¹¹-Ala¹²-Arg¹³-Arg¹⁴-Cys¹⁵-Gln¹⁶-Gln¹⁷-His¹⁸-NH₂

Шейп	Конформация	Е общ. ккал/моль	Шейп	Конформация	Е общ. ккал/моль
feefeeeee	-B ₁₃ ¹⁴ -B ₁₄ ¹⁵ -B _{15-B₁₆¹⁷-B₁₈¹⁸ -B₂₂₃₃-B₃₃₂₂-B₂-B₂₁₃-R₃₁₁-B₃₃}	3,5 *	feefee ef	-B ₁₃ ¹⁴ -B ₁₄ ¹⁵ -B _{15-B₁₆¹⁷-B₁₈¹⁸ -B₂₂₃₃-B₃₃₂₂-R₂-B₂₁₃-R₃₁₁-B₃₃}	0 *
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	5,4	feefee ffe	-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃	4,0
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	6,7		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃	4,7 *
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	3,2 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	10,0
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	8,5		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	2,9 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	7,4 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	9,6		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	9,6		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -B ₂₁₃ -B ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -B ₃₃	4,9 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃	(.)
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	3,6 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -L ₃₃	11,0
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	0,9 *	feefee fff	-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₁ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₁	4,9 *
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	4,5		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃	5,0
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -L ₃₃	8,0		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃	7,4
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁	13,9		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -B ₃₃	7,6
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁	6,8 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₂₁ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₂₁	6,4
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₂₁	13,7		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₂₁ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₂₁	6,4
feefeeeee	-B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₃₁ -B ₂₂₃₃ -B ₃₃₂₂ -B ₂ -B ₂₁₃ -R ₃₁₁ -R ₃₁	7,7 *		-B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₃₁ -B ₃₂₁₂ -B ₃₃₂₂ -R ₂ -R ₂₁₁ -R ₂₁₁ -R ₃₁	5,2

Примечание. Во всех структурах фрагмента Ala⁹-His¹⁸-NH₂ участок Ala⁹-Ala¹² имеет конформационное состояние R⁹-B₃₂¹²-B₁₂¹¹-R⁹.

Относительная энергия конформаций апамина

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/моль
<i>feffeefeefeefe</i>	$-B_{2223}^{13} - B_{3222}^{13} - R_{22}^{15} - B_{213}^{16} - R_{311}^{17} - L_{33}^{18}$	0
	$-B_{2223} - B_{3232} - R_{22} - B_{213} - R_{311} - L_{33}$	0,1
	$-B_{2322} - B_{3122} - R_{22} - B_{213} - B_{311} - B_{33}$	4,4
<i>fejfeefeefeef</i>	$-B_{2223} - B_{3122} - R_{22} - B_{213} - R_{311} - B_{33}$	0,3
<i>fejfeefeefeef</i>	$-B_{2322} - B_{3122} - B_{22} - \overline{R_{221} - R_{311}} - R_{21}$	2,2
<i>feffeefeefeefe</i>	$-B_{2322} - B_{3122} - B_{22} - R_{221} - R_{311} - R_{31}$	5,9
<i>fejfeefeefeefe</i>	$-B_{2223} - B_{3122} - B_{22} - B_{213} - R_{311} - B_{33}$	3,1
<i>fejfeefeefeefe</i>	$-B_{2223} - B_{3122} - B_{22} - B_{213} - B_{311} - B_{33}$	3,5
<i>fejfeefeefeefe</i>	$-B_{2322} - B_{3122} - B_{22} - R_{211} - B_{213} - B_{33}$	3,7
<i>fejfeefeefeefe</i>	$-B_{3212} - B_{3122} - R_{22} - R_{211} - R_{211} - L_{33}$	5,2
	$-B_{3222} - B_{3122} - R_{22} - R_{211} - R_{221} - B_{31}$	2,4

Примечание. Во всех структурах апамина участок Cys¹-Ala¹² имеет конформационное

состояние $R_{22}^1 - B_{23}^2 - \overline{B_{31}^3 - R_{2222}^4} - B_{31}^5 - R_{311}^6 - B_{311}^7 - B_{31}^8 - R_{31}^9 - B_{32}^{10} - B_{12}^{11} - R_{12}^{12}$.

кую форму основной цепи, стабилизированную значительными межкосточными взаимодействиями и дополнительно скрепленную двумя дисульфидными связями. Наибольшей свободой на этом участке обладают боковые цепи Arg¹³ и Arg¹⁴, причем во всех случаях самыми выгодными значениями угла χ^1 являются соответственно ~ 180 и -60° (детальное количественное рассмотрение конформационных возможностей всех боковых цепей Cys¹-Cys¹⁵ будет нами сделано в следующем сообщении). Что касается фрагмента Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂, то он конформационно лабилен как в отношении основной, так и боковых цепей (табл. 12). В интервале 0—5 ккал/моль попадают девять конформаций апамина, различающихся состоянием фрагмента Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂, из которых семь имеют различные формы и шейпы пептидной цепи. Самыми выгодными и практически равновероятными являются следующие четыре конформационных состояния С-концевого тетрапептида: $R_2^{15} - B_{213}^{16} - R_{311}^{17} - L_{33}^{18}$ (*fee*; $E_{\text{общ}} = 0$ и 0,1 ккал/моль), $R_2^{15} - B_{213}^{16} - R_{311}^{17} - B_{33}^{18}$ (*fej*; $E_{\text{общ}} = 0,3$ ккал/моль) и $B_2^{15} - R_{21}^{16} - R_{311}^{17} - R_{21}^{18}$ (*eff*; $E_{\text{общ}} = 2,2$ ккал/моль). Эти же состояния участка апамина Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ были одними из наиболее предпочтительных у свободного тетрапептида и у фрагмента Ala⁹-His¹⁸-NH₂ (табл. 10, 11).

Энергетические составляющие взаимодействий остатков фрагмента Arg¹³-His¹⁸-NH₂ с остатками остальной части апамина в отмеченных четырех конформациях приведены в табл. 13. Аналогичные данные о фрагменте Cys¹-Ala¹² содержатся в табл. 8. Первые две конформации молекулы с относительной энергией 0 и 0,1 ккал/моль различаются между собой лишь ориентацией боковой цепи Arg¹⁴. При состоянии B_{3222}^{14} этого остатка ($E_{\text{общ}} = 0$) более эффективны его взаимодействия с С-концевым участком Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ ($-4,7$ ккал/моль), чем с N-концевым Cys¹-Ala¹² ($-2,4$ ккал/моль). При состоянии B_{3232}^{14} ($E_{\text{общ}} = 0,1$ ккал/моль) ситуация меняется. Вклады от взаимодействий с последующим и предшествующим участками теперь соответственно равны $-0,6$ и $-5,6$ ккал/моль. В остальных обе структуры практически эквивалентны. Для них характерно прежде всего наличие слабых контактов между фрагментами Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ и Cys¹-Ala¹² (около $-2,0$ ккал/моль); энергия внутри- и межкосточных взаимодействий в тетрапептиде составляет $-21,4$ ккал/моль, а энергия его взаимодействий с Arg¹³ равна $-5,2$ ккал/моль. Оба положения боковой

Энергия внутри- и межстагоновых взаимодействий (ккал/моль) фрагмента Arg¹³-His¹⁸-NH₂ в наиболее предпочтительных конформациях амина

Оста- ток	Cys ¹	Asn ²	Cys ³	Lys ⁴	Ala ⁵	Pro ⁶	Glu ⁷	Thr ⁸	Ala ⁹	Leu ¹⁰	Cys ¹¹	Ala ¹²	Arg ¹³	Arg ¹⁴	Cys ¹⁵	Gln ¹⁶	Gln ¹⁷	His ¹⁸
Arg ¹³	1,3	-0,3	-0,1	0,8	0,1	0	-1,1	0	-0,1	-0,1	-0,3	-1,0	-1,5	0,2	-1,7	-0,2	-3,5	0,2
	1,2	-0,3	-0,1	0,8	0,1	0	-1,1	0	-0,1	-0,1	-0,3	-1,0	-1,5	-0,4	-1,7	-0,2	-3,5	0,2
	1,3	-0,3	-0,1	0,8	0,1	0	-1,1	0	-0,1	-0,1	-0,3	-0,9	-1,5	-0,4	-1,7	-0,3	-3,4	0,1
	1,3	-0,3	0,1	0,7	0,1	0	-1,1	0	-0,1	-0,1	-0,3	-0,9	-1,1	-1,1	-0,8	-0,3	0	0,4
Arg ¹⁴	2,9	-2,7	-0,3	0,7	0	-0,3	-2,1	0,1	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	0,2	-1,9	-0,7	-1,8	-2,2	0
	2,8	-2,7	-0,3	0,8	0	-0,2	-2,1	0	-0,6	-1,5	-0,7	-1,1	-0,4	-1,6	-0,6	0	0	0
	2,8	-2,7	-0,3	0,8	0	-0,3	-2,1	0,1	-0,6	-1,5	-0,7	-1,1	-0,4	-1,7	-0,6	-0,9	-0,4	0
	2,8	-2,7	-0,3	0,8	0	-0,3	-2,0	0,1	-0,6	-1,5	-0,7	-1,1	-1,1	-1,5	-0,9	0	0	-1,8
Cys ¹⁵	0,3	-0,9	-1,0	-0,3	0	-0,1	-0,1	0	0	0	0	0	-1,7	-0,7	0,6	-1,0	-1,5	0
	0,3	-1,0	-1,0	-0,3	0	-0,1	-0,1	0	0	0	0	0	-1,7	-0,6	0,6	-1,0	-1,5	0
	0,3	-1,0	-1,0	-0,3	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	-1,7	-0,6	0,6	-1,0	-1,4	0
	0,3	-1,0	-1,0	-0,3	0	-0,1	-0,1	0	0	0	0	0	-0,8	-0,9	1,0	-0,9	-0,5	-2,1
Gln ¹⁶	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	-1,8	-1,0	-4,1	-4,3	-3,5
	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,2	0	-1,0	-4,1	-4,3	-3,5
	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,3	-0,9	-1,0	-4,1	-5,1	-1,7
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,3	0	-0,9	-2,4	-5,8	-2,9
Gln ¹⁷	0,2	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	-3,5	-2,2	-1,5	-4,3	-3,4	-2,8
	0,2	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	-3,5	0	-1,5	-4,3	-3,4	-2,8
	0,2	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	-3,1	-0,4	-1,4	-3,7	-2,0	-2,8
	-0,1	0	0,4	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	-0,5	-5,8	-2,1	-1,4
His ¹⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	-3,5	-2,8	-1,4
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	-3,5	-2,8	-1,4
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,0	0	-1,7	-2,0	-3,9
	-2,3	-2,4	-0,1	0	0	-0,1	0,2	-0,1	0	0	0	0	0,4	-1,8	-2,1	-2,9	-1,4	-3,8

Примечание. Первое значение в каждой клетке относится к конформации амина с $E_{0,111} = 0$, второе — 0,1, третье — 0,3 и четвертое — 2,2 ккал/моль (табл. 12).

Двугранные углы вращения (град) в наиболее предпочтительных конформациях апамина

Остаток	Основная цепь		Боковая цепь				
	φ	ψ	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	χ^5
Cys ¹	60,0	-46,9	174,4	171,4	120,0		
Asn ²	-100,0	140,0	-170,0	-42,0			
Cys ³	-57,0	-45,0	-74,4	92,0	-96,0		
Lys ⁴	-66,0	-36,0	-179,0	178,0	180,0	180,0	180,0
Ala ⁵	-138,0	91,0	60,0				
Pro ⁶	-60	-36	0	0	0		
Glu ⁷	-81,0	62,0	-67,0	66,0	44,0		
Thr ⁸	-128,9	100,0	-61,0	63,0			
Ala ⁹	-66,0	-59,5	60,0				
Leu ¹⁰	-81,7	119,1	-60,0	146,0			
Cys ¹¹	-155,5	152,7	40,6	178,2	120,0		
Ala ¹²	-65,1	-44,1	60,0				
Arg ¹³	-159,9	143,3	165,1 166,3 148,1 148,5	179,9 176,6 177,7 -91,0	160,0 160,2 179,7 180,0	-77,1 -80,0 -74,0 180,0	0 0 0 0
Arg ¹⁴	-68,8	146,3	-61,1 -60,3 -82,7 -83,5	-176,0 -177,0 59,7 59,7	-177,3 -60,0 -177,3 -177,3	172,8 175,8 172,8 172,8	0 0 0 0
Cys ¹⁵	-58,3	-50,0 -57,7 -53,8 155,5	-145,3	-140,0	-96,0		
Gln ¹⁶	-116,6 -108,8 -107,0 -61,0	141,2 140,5 141,0 -40,8	178,5 179,9 179,0 179,7	56,5 57,0 57,0 180,0	-99,0 -99,0 -102,0 61,0		
Gln ¹⁷	-93,2 -94,9 -97,0 -74,4	-32,4 -33,4 -43,5 -23,2	-72,3 -70,6 -71,0 -73,3	62,0 63,0 63,0 58,0	79,0 79,0 76,0 51,0		
His ¹⁸ -NH ₂	66,5 66,4 -138,0 -79,2	58,5 59,0 139,0 -52,0	-46,7 -47,6 -56,6 -179,3	-87,3 -84,0 -90,0 91,0			

Примечание. В клетке с четырьмя значениями углов первое соответствует конформации апамина с $E_{\text{общ}}=0$, второе $-1,0$, третье $-0,3$ и четвертое $-2,2$ ккал/моль (табл. 12).

цепи Arg¹⁴ энергетически весьма близки и в отношении взаимодействия с Arg¹³ (0,2 и $-0,4$ ккал/моль).

Конформация апамина с $E_{\text{общ}}=0,3$ ккал/моль отличается от рассмотренных выше формой основной цепи последнего остатка и положением боковой цепи Arg¹⁴ (табл. 12), что, однако, заметным образом не сказывается ни на величине общей энергии, ни на ее отдельных составляющих. В этой конформации вклады от взаимодействий Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ с Cys¹-Ala¹², Arg¹³ и Arg¹⁴ соответственно равны $-2,1$; $-5,0$ и $-1,9$ ккал/моль, а от взаимодействий Cys¹-Ala¹² с Arg¹³ и Arg¹⁴, а также Arg¹³ с Arg¹⁴ равны $-0,8$; $-5,6$ и $-0,4$ ккал/моль; внутренняя конформационная энергия фрагмента Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ составляет $-22,3$ ккал/моль. Все приведенные

для конформации с $E_{\text{общ.}} = 0,3$ ккал/моль энергетические составляющие практически такие же, как в случае $E_{\text{общ.}} = 0$.

В четвертой конформации ($E_{\text{общ.}} = 2,2$ ккал/моль) состояния всех остатков Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂ существенно отличаются от состояний в трех других выгодных структурах апамина. В результате сближенности N- и C-концов молекулы энергия взаимодействий Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂ с Cys¹—Ala¹² составляет здесь $-6,8$ ккал/моль, причем наибольший вклад в эту величину вносят взаимодействия His¹⁸-NH₂ с Cys¹ ($-2,3$ ккал/моль). Сближенность противоположных частей апамина сопровождается значительным ослаблением стабилизирующих контактов между Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂ и остатками Arg¹³ и Arg¹⁴ соответственно до $-0,7$ и $-2,7$ ккал/моль. Как и у

свободного тетрапептида в состоянии $B_5^{12}-R_{221}^{18}-R_{311}^{17}-R_{21}^{18}$, энергия внутренних взаимодействий фрагмента в этой конформации апамина на $1-2$ ккал/моль больше, чем у рассмотренных выше (ср. табл. 10 и 13).

Таким образом, результаты теоретического конформационного анализа указывают на возможность реализации у молекулы апамина ряда структур. Они различаются между собой конформационными состояниями C-концевого фрагмента Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂, которые отвечают некоторым из наиболее низкоэнергетических конформаций свободного тетрапептида (ср. табл. 12 и 10). Во всех случаях структура бициклической части апамина Cys¹—Cys³—Cys¹¹—Cys¹⁵ совпадает (за исключением боковой цепи Arg¹⁴) с глобальной конформацией свободного пентадекапептида (ср. табл. 12 и 6). Образование в единой структуре молекулы целого ряда контактов между фрагментами Cys¹—Cys³—Cys¹¹—Cys¹⁵ и Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂, энергия которых у четырех рассмотренных конформаций равна соответственно $-12,0$; $-8,0$; $-9,0$; $-11,0$ ккал/моль, не сопровождается их дестабилизацией. Величины суммарной энергии внутри- и межостаточных взаимодействий у конформаций свободного фрагмента Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂ и у соответствующих состояний в предпочтительных конформациях всей молекулы практически совпадают (ср. табл. 13 и 10). Это свидетельствует о том, что в найденных структурах апамина имеет место согласованность между всеми видами взаимодействий.

Рассчитанные значения 80 двугранных углов φ , ψ и χ , описывающих геометрию четырех самых выгодных конформаций апамина, представлены в табл. 14.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мельников П. Н., Попов Е. М. (1979) Биоорг. химия, **5**, 1011—1024.
2. Попов Е. М., Мельников П. Н. (1979) Биоорг. химия, **5**, 828—847.
3. Спасов В., Попов Е. М. (1978) Материалы международной конференции по квантовой химии, биологии и фармакологии, Киев.
4. Momany F. A., McGuize R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. (1975) J. Phys. Chem., **79**, 2364—2381.
5. Lowe J. P. (1968) Progr. Phys. Org. Chem., **6**, 1—10.
6. Sutter D., Dreizler H., Rudolph H. D. (1965) Z. Naturforsch., **A20**, 1676—1684.
7. Jones D. D., Bernal I., Frey M. N., Koetzle T. F. (1974) Acta crystallogr., **B30**, 1220—1229.

Поступила в редакцию
22.I.1979

После доработки
30.III.1979

A PRIORI CALCULATION OF THE APAMIN THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE.
III. THE STRUCTURE OF THE MOLECULE

POPOV E. M., MEL'NIKOV P. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Theoretical conformational analysis of apamin, a naturally occurring neurotoxin built of 18 amino acid residues, was effected. It involved the assessment of conformational possibilities for fragments of gradually increasing length and demonstrated a plausibility of a series of stable apamin structures differing in the conformational state of the Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ fragment. The spatial structure of the bicyclic pentadecapeptide Cys¹-Cys¹⁵ corresponds to the global form of the free fragment, while the Cys¹⁵-His¹⁸-NH₂ may take the set of the lowest energy conformations of the free tetrapeptide. The results demonstrate the consistency of all intra- and interresidue interactions in the most stable oligopeptide structure and give support to the thermodynamic hypothesis of the formation of disulphide links.
