



УДК 547.962:541.63

АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ АПАМИНА

IV. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ МОЛЕКУЛЫ

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

Исследована потенциальная поверхность апамина и найдены все возможные положения боковых цепей остатков Asn², Lys⁴, Glu⁷, Thr⁸, Leu¹⁰, Arg¹³ и Arg¹⁴, входящих в бициклический фрагмент молекулы Cys¹—Cys¹⁵. Конформационные состояния боковых цепей, рассчитанные путем минимизации, попадают в самые низкоэнергетические и широкие области сечений потенциальной поверхности апамина, совпадающих с областями низкой энергии свободных остатков. Показано, что характер потенциальной поверхности соответствует процедуре минимизации, использованной при определении структуры апамина.

В предыдущих сообщениях [1—3] были изложены результаты теоретического конформационного анализа апамина — природного олигопептида, оказывающего сильное токсическое действие на центральную нервную систему. Его аминокислотная последовательность состоит из 18 остатков, в том числе четырех цистеинов, образующих два дисульфидных мостика Cys¹ — Cys¹¹ и Cys² — Cys¹⁵.

Изучение пространственного строения молекулы состояло из нескольких последовательных этапов, каждый из которых включал в себя рассмотрение конформационных возможностей большого числа фрагментов постепенно увеличивающейся длины. В результате было показано, что в отношении конформационных свойств основной цепи найденная трехмерная структура молекулы апамина может быть четко разделена на две части — жесткую, которую образует бициклический пентадекапептидный участок Cys¹ — Cys³ — Cys¹¹ — Cys¹⁵, и лабильную, представленную С-концевым тетрапептидным фрагментом Cys¹⁵ — His¹⁸-NH₂. Одинаковое у всех предпочтительных конформаций апамина пространственное строение первого участка совпадает с глобальной структурой свободного пентадекапептида Cys¹ — Cys¹⁵, а возможные конформационные состояния второго отвечают нескольким наиболее низкоэнергетическим структурам свободного тетрапептида Cys¹⁵ — His¹⁸-NH₂, различающимся как формой основной цепи, так и ориентациями боковых цепей.

Полученные результаты расчета характеризуют пространственную организацию апамина значительно полнее, чем это в принципе могло бы быть сделано на основе экспериментальных данных, включающих также данные рентгеноструктурного анализа. Однако и их недостаточно для последующего изучения молекулярного механизма действия этого нейротоксина. Реализация его функции осуществляется посредством строго детерминированных и взаимообусловленных конформационных изменений, вызываемых цевалентными и химическими взаимодействиями с рецептором.

Поэтому для понимания биологического акта необходимо знать не только геометрию нативной структуры, но и ее потенциальную возможность, т. е. заложенную в исходной структуре предрасположенность к целенаправленным конформационным изменениям, проявляемым в процессе взаимодействия. Недостающая информация о динамических свойствах найденной конформации молекулы может быть получена при исследовании ее многомерной энергетической поверхности. Структурным перестройкам на всех стадиях взаимодействия подвергаются, как правило, боковые цепи аминокислотных остатков. Особенно это справедливо в данном случае по отношению к участку апамина $Cys^1 - Cys^3 - Cys^{11} - Cys^{15}$, основная цепь которого помимо стабилизирующих невалентных взаимодействий дополнительно скреплена двумя дисульфидными связями. Поэтому для дальнейшего изучения механизма действия нейротоксина наибольший интерес могут представить сечения энергетической поверхности молекулы, полученные при фиксированной форме пептидного скелета. В настоящем сообщении нами рассмотрены конформационные карты боковых цепей тех остатков апамина, которые составляют бициклический пентадекапептидный участок, имеющий во всех реальных структурах молекулы одну и ту же форму основной цепи.

Цель данного исследования заключалась, однако, не только в получении дополнительных сведений о конформационных свойствах апамина. Представленные в сообщении конкретные данные о потенциальной поверхности вместе с полученными ранее [1—3] результатами расчета геометрических и энергетических характеристик стабильных конформаций молекулы и ее отдельных фрагментов позволили рассмотреть ряд вопросов, имеющих несомненно более общий характер. Они касаются некоторых принципиальных сторон метода теоретического конформационного анализа и его соответствия специфике пространственной организации природных пептидов и белков. В конечном счете речь идет о выяснении самой возможности используемого теоретического подхода предсказывать структуру сложных пептидов на основе аминокислотной последовательности. Некоторые общие вопросы уже затрагивались нами в предшествующих сообщениях [1—3]. Здесь мы остановимся на тех, в решении которых существенное значение имеют данные о потенциальном поле молекулы.

Принято считать, что теоретический конформационный анализ пептидов и особенно белков неминуемо сопряжен с расчетом огромного числа структурных вариантов и в силу этого не является перспективным. Однако в настоящее время показано [4, 5], что наличие в нативных структурах природных пептидов согласованности между внутри- и межостаточными взаимодействиями, а также способность сравнительно коротких участков аминокислотной последовательности образовывать низкоэнергетические, конформационно жесткие нуклеации чрезвычайно резко снижают количество необходимых для рассмотрения конформационных состояний. Это обстоятельство и использование достаточно быстродействующих и сервисных программ для ЭВМ делают задачу вполне решаемой. Апамин — один из примеров, подтверждающих это. Метод, однако, не исследован в другом отношении, а именно: в какой мере используемая расчетная процедура соответствует особенностям потенциального поля пептидных молекул? От решения этого вопроса во многом зависит достоверность получаемых результатов.

В основе поиска стабильных структур олиго- и полипептидов лежат наборы предпочтительных конформационных состояний свободных монопептидов. Геометрические параметры каждого состояния отвечают, как правило, неглубокому потенциальному минимуму, расположенному в одной из широких низкоэнергетических областей потенциальной поверхности соответствующего монопептида. В конформациях олиго- и полипептидов двугранные углы Φ , Ψ и χ остатков, хотя и отличаются от своих базовых значений, тем не менее не выходят за пределы областей низкой

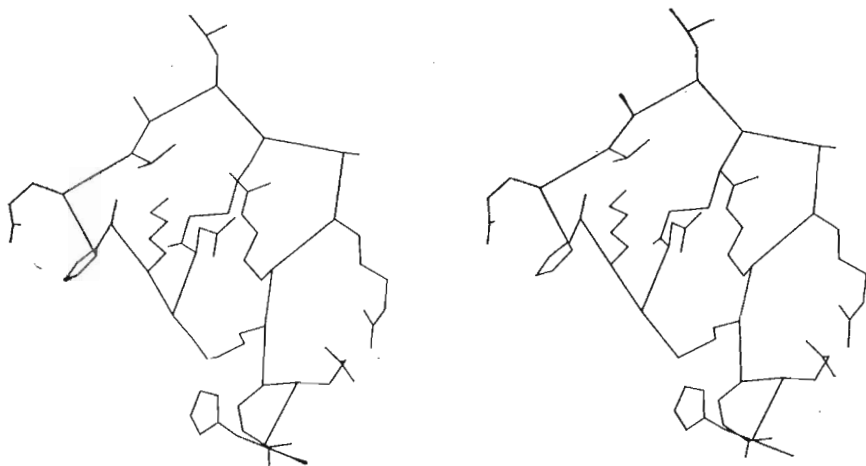


Рис. 1. Стерические проекции основной цепи апамина

энергии. Они соответствуют другому локальному минимуму низкоэнергетической монопептидной области, в той или иной степени деформированной межостаточными взаимодействиями. Минимизация энергии из-за отсутствия эффективных методов анализа многомерных поверхностей сложных объектов приводит к спуску в ближайший от исходного минимум, причем остается неизвестным, является ли он самым предпочтительным и существуют ли в этой области другие минимумы. Таким образом, получаемые результаты зависят от соответствия процедуры минимизации конкретному профилю потенциальной поверхности. Очевидно, неопределенность в решении конформационной задачи будет больше в случае сильно рельефной поверхности, т. е. при наличии в данной низкоэнергетической области многих потенциальных ям, разделенных высокими барьерами. Детальное знание конформационных свойств апамина может представить общий интерес для оценки реальной ситуации, поскольку потенциальное поле этой молекулы, безусловно, отражает некоторые характерные особенности пространственной организации сложных природных пептидов.

Начнем рассмотрение с краткой характеристики конформационных состояний элементов основной цепи у наиболее предпочтительных структур апамина. Во всех низкоэнергетических вариантах пространственного строения молекулы фрагмент $\text{Cys}^1 - \text{Cys}^3 - \text{Cys}^{11} - \text{Cys}^{15}$ имеет одну форму основной цепи $R^1 - B^2 - \overline{R^3 - R^4} - B^5 - R^6 - B^7 - B^8 - R^9 - B^{10} - B^{11} - R^{12} - B^{13} - B^{14} - R^{15} (B^{15})$, а фрагмент $\text{Cys}^{15} - \text{His}^{18} - \text{NH}_2$ — ряд форм, среди которых наиболее выгодными являются $R^{15} - B^{16} - R^{17} - L^{18}$ ($E_{\text{общ}} = 0$ и $0,1$ ккал/моль; табл. 12 в [3]),

$R^{15} - B^{16} - R^{17} - B^{18}$ ($E_{\text{общ}} = 0,3$ ккал/моль) и $B^{15} - \overline{R^{16} - R^{17}} - R^{18}$ ($E_{\text{общ}} = 2,2$ ккал/моль). Стерические проекции пептидного скелета в глобальной конформации апамина ($E_{\text{общ}} = 0$) даны на рис. 1. По характеру влияния на конформационную свободу монопептидного участка $\text{CONH}-\text{CHR}-\text{CONH}$ все остатки апамина (за исключением $-\text{Pro}^6-$) относятся к одному стереохимическому типу [6]. Они имеют конформационные карты $\Phi-\Psi$, совпадающие с картой аланинового монопептида ($R = \text{CH}_3$), представленной на рис. 2. На карту нанесены конформационные точки (Φ, Ψ) остатков апамина в состояниях, отвечающих четырем наиболее выгодным структурам молекулы ($E_{\text{общ}} = 0; 0,1; 0,3; 2,2$ ккал/моль). Все точки попадают на карту свободного аланинового монопептида в низкоэнергетические области B, R, L и не выходят за пределы контура 1 ккал/моль. Такое распределение показывает, что в отношении основной цепи конформационные состояния остатков, составляющих пептидную цепь апамина, энталпийно практически не отличаются от состояний свободных монопептидов.

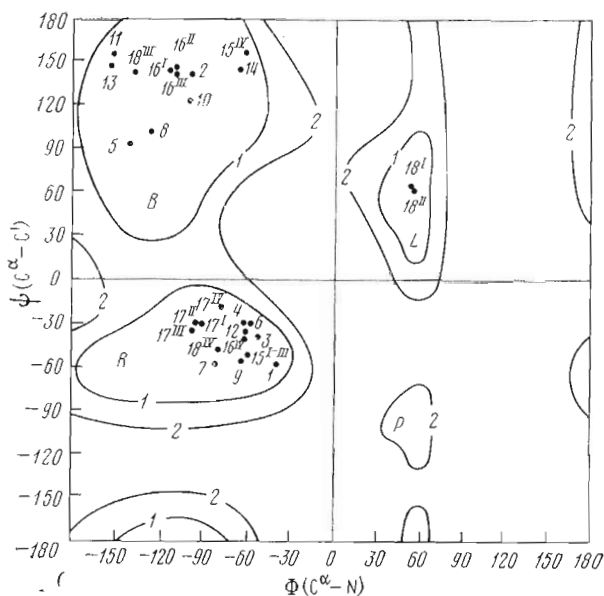
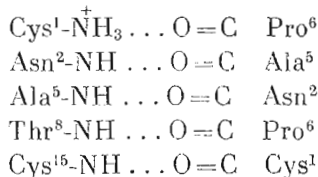


Рис. 2. Распределение на карте Φ - Ψ метиламида N-ацетил-L-аланина конформационных точек низкоэнергетических конформаций апамина

Между тем элементы пептидного скелета в рассчитанных структурах молекулы весьма эффективно взаимодействуют между собой и с боковыми цепями. Так, на конформационно жестком пентадекапептидном участке Cys¹—Cys¹⁵ они образуют пять внутрицепочечных водородных связей:



Общая энергия невалентных взаимодействий только между элементами основной цепи Cys¹—Cys¹⁵ составляет -15 ккал/моль, а между ними и боковыми цепями этого же фрагмента $-21,0$ ккал/моль. Кроме того, на этом участке плотно упакованная пептидная цепь образует бициклическую структуру, дополнительно стабилизированную двумя дисульфидными мостиками. Таким образом, можно сделать заключение о том, что, во-первых, в конформации пентадекапептидного фрагмента апамина имеет место согласованность всех взаимодействий и, во-вторых, элементы основной цепи, находясь в самых предпочтительных для изолированных монопептидов состояниях, обладают в молекуле весьма ограниченной конформационной свободой. Жесткость пептидного скелета участка Cys¹—Cys¹⁵ позволяет исследовать потенциальные поверхности боковых цепей входящих в него остатков при фиксированных значениях двугранных углов Φ , Ψ . Для оценки влияния на потенциальные поверхности взаимодействий боковых цепей между собой и с основной цепью были получены при одних и тех же углах Φ , Ψ конформационные карты X^i — X^{i+1} как для свободных, так и для включенных в молекулу остатков. Карты отражают конформационные возможности боковых цепей, определяемые в первом случае только ближними взаимодействиями, а во втором — суммарным эффектом ближних и межостаточных взаимодействий. Предварительно конформационные карты строились с шагом в 30° , а затем уточнялись в областях низкой энергии с шагом в 10 и 5° .

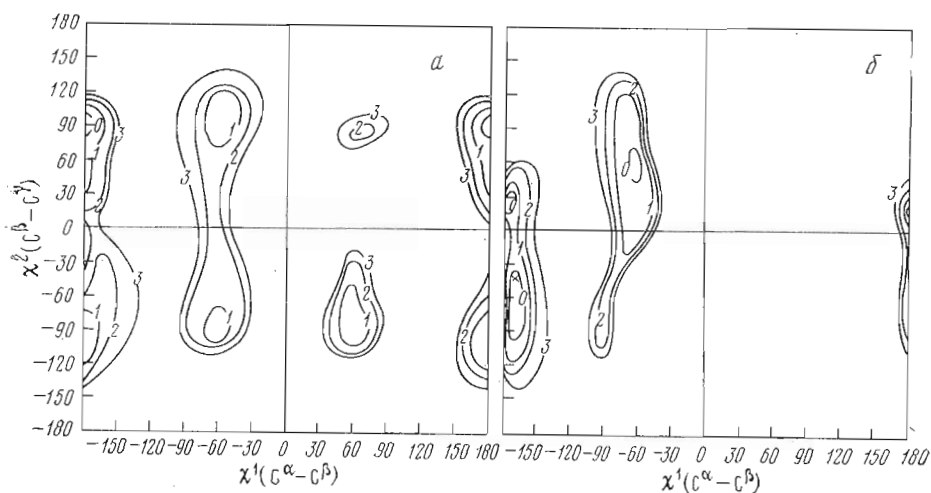


Рис. 3. Конформационные карты X^1 - X^2 боковой цепи $-\text{Asn}^2-$ в свободном состоянии остатка (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов $\Phi -100^\circ$, $\Psi 140^\circ$. Здесь и на рис. 4-8 крестиком отмечено положение боковой цепи в глобальной конформации

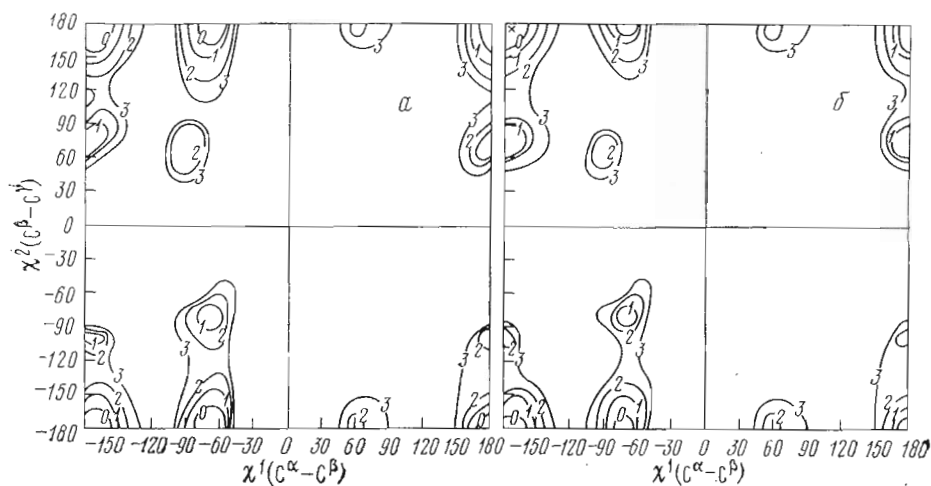


Рис. 4. Конформационные карты X^1 - X^2 боковой цепи $-\text{Lys}^4-$ в свободном состоянии остатка (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов $X^3=X^4=180^\circ$ и $\Phi -66^\circ$, $\Psi -36^\circ$

Сечения потенциальной поверхности X^1 - X^2 аспарагина, находящегося в последовательности апамина на втором месте, представлены на рис. 3. Они получены при значениях углов $\Phi -100^\circ$ и $\Psi 140^\circ$, соответствующих геометрии основной цепи в структуре пентадекапептида $\text{Cys}^1-\text{Cys}^3-\text{Cys}^{11}-\text{Cys}^{15}$ (табл. 14 в [3]). Для боковой цепи свободного остатка Asn^2 ($\text{C}^\alpha - \text{CONH} - \text{C}^\epsilon\text{HR} - \text{CONH} - \text{C}^\epsilon$; $\text{R} = \text{CH}_2-\text{CONH}_2$; рис. 3а) разрешенными по углу X^1 являются все положения, отвечающие минимумам торсионного потенциала $U(X^1)$, т. е. ~ 60 , 180 и -60° . Наиболее вероятны значения угла X^1 около 180 и -60° , при которых угол X^2 может изменяться в очень широких пределах. Ориентации боковой цепи при $X^1 \sim 60^\circ$ и $X^2 \sim \sim 90$ и -90° менее предпочтительны как энталпийно, так и энтропийно по ближним взаимодействиям.

При включении остатка Asn^2 в пептидную цепь апамина, т. е. при учете его взаимодействий с другими остатками, конформационная карта X^1 - X^2 заметно изменяется (рис. 3б). Интервал значений X^1 от ~ 0 до $\sim 180^\circ$ ста-

новится полностью запрещенным при всех значениях X^2 из-за наталкивания атомов боковой цепи $-Asn^2-$ на основную и боковую цепи $-Ala^5-$. Повышение энергии и резкое сужение области при $X^1 \sim -60^\circ$ и $X^2 < 0^\circ$ вызваны неблагоприятными контактами с боковой цепью $-Thr^8-$. Предпочтительной оказывается область низкой энергии вдоль вертикали $X^1 -170^\circ$, в которой угол X^2 может изменяться от ~ 40 до $\sim -120^\circ$. Самая низкая энергия на потенциальной поверхности соответствует значениям $X^1 -170^\circ$ и $X^2 -42^\circ$, найденным при минимизации (табл. 14 в [3]). Некоторое понижение относительной энергии в этой области по сравнению со свободным остатком (рис. 3а, б) вызвано образованием водородной связи между группами $C=O$ боковой цепи $-Asn^2-$ и NH основной цепи $-Lys^4-$. Практически равновероятными для Asn^2 являются положения его боковой цепи при X^1 от -50 до -80° и X^2 от -20 до 120° .

Приведенное на рис. 3б сечение потенциальной поверхности X^1-X^2 остатка Asn^2 получено при ориентации боковой цепи остатка Lys^4 $X^1-X^4 \sim 180^\circ$ (2222) *. Такие же сечения для $-Asn^2-$ были нами построены и при значениях у Lys^4 $X^1 \sim 60$ и -60° (1222 и 3222). В случае $X^1 \sim -60^\circ$ (3222) карта X^1-X^2 остатка Asn^2 аналогична рассмотренной выше. На ней имеются те же области низкой энергии, однако они несколько уже и на 1–2 ккал/моль выше. При значении у боковой цепи $-Lys^4-$ угла $X^1 \sim 60^\circ$ (1222) на карте $-Asn^2-$ обнаруживается лишь один узкий минимум при $X^1 \sim -60^\circ$ и $X^2 \sim 0^\circ$, энергия которого больше на 2,5 ккал/моль, чем у отмеченного на рис. 3б глобального минимума. Таким образом, боковая цепь $-Asn^2-$ в апаине обладает значительной, особенно в отношении вращения вокруг связи $C^{\beta}-C^{\gamma}(X^2)$, конформационной свободой. Рассчитанное ранее положение цепи находится на потенциальной поверхности X^1-X^2 (рис. 3б) в самой низкоэнергетической и наиболее широкой области, совпадающей с одной из областей низкой энергии на потенциальной поверхности свободного остатка Asn^2 (рис. 3а).

Конформационные карты X^1-X^2 боковой цепи остатка Lys^4 вне и в поле апаина (рис. 4а, б) весьма близки. Они получены при $X^3=X^4=180^\circ$ и $\Phi -66^\circ$, $\Psi -36^\circ$. Различия заключаются лишь в незначительном уменьшении площадей низкой энергии, вызванном электростатическим отталкиванием боковых цепей остатков Lys^4 , Arg^{13} , Arg^{14} и NH_3^+ -группы остатка Cys^1 . Ситуация заметным образом не меняется при других значениях углов X^3 , X^4 . Совпадение карт на рис. 4а и 4б свидетельствует о слабом взаимодействии боковой цепи $-Lys^4-$ с другими остатками, что согласуется с результатами расчета энергетических составляющих (табл. 3 и 13 в [3]). Суммарная энергия взаимодействий $-Lys^4-$ со всеми остатками апаина не превышает $-1,7$ ккал/моль, причем максимальный вклад ($-1,4$ ккал/моль) вносит взаимодействие $-Lys^4-$ с $-Ala^5-$. Самые предпочтительные положения боковой цепи лизина при X^1 180 и -60° , которые, как отмечалось выше, аналогичны и в отношении конформационной свободы остатка Asn^2 . Рассчитанные значения углов $X^1 -179^\circ$, $X^2 178^\circ$, $X^3=X^4=180^\circ$ боковой цепи $-Lys^4-$ попадают в наиболее выгодную по энтальпии и энтропии область потенциальной поверхности.

Для боковой цепи свободной глутаминовой кислоты с фиксированными углами $\Phi -81^\circ$, $\Psi 62^\circ$ были построены три конформационные карты X^2-X^3 при значениях угла $X^1 \sim 60$, 180 и -60° . Приведенная на рис. 5а карта остатка Glu^7 с $X^1 \sim -60^\circ$ указывает на значительную в этом случае конформационную свободу боковой цепи по X^2 и особенно по X^3 . Разрешены и практически равновероятны все положения, отвечающие минимумам торсионных потенциалов $U(X^2)$ и $U(X^3)$. На сечении потенциальной поверхности X^2-X^3 остатка Glu^7 , построенном с учетом взаимодействия боковой цепи с другими остатками апаина (рис. 5б), выделяется низко-

* Цифрами обозначены области возможных значений двугранных углов боковой цепи [1].

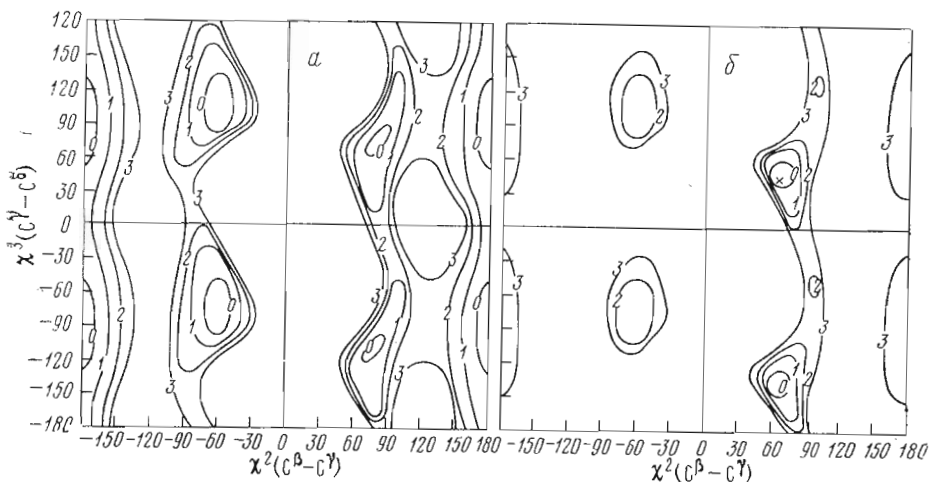


Рис. 5. Конформационные карты X^2 - X^3 боковой цепи -Glu^7 в свободном состоянии (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов X^1 -67° , Φ -81° и Ψ 62°

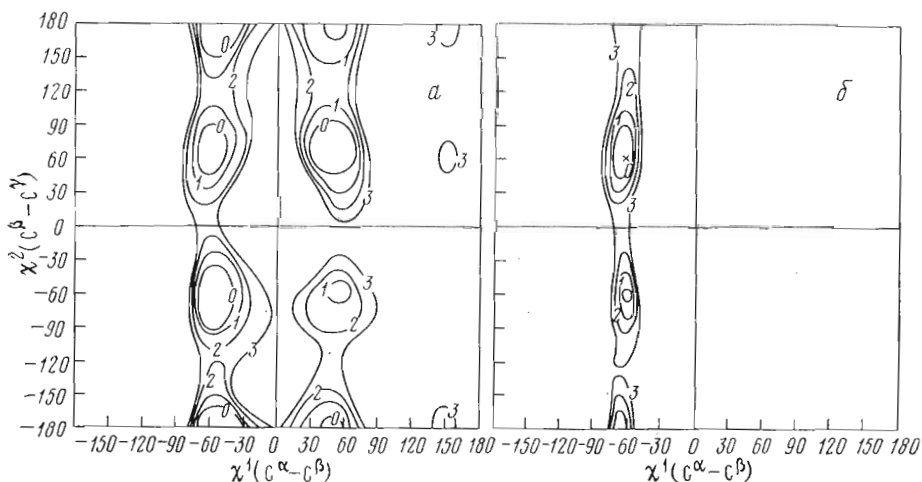


Рис. 6. Конформационные карты X^1 - X^2 боковой цепи -Thr^8 в свободном состоянии (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов Φ $-128,9^\circ$, Ψ 100°

энергетическая область с минимумом при $X^2 \sim 70^\circ$ и $X^3 \sim 50^\circ$ (-130°). Ее предпочтительность обусловлена не наличием в других областях неблагоприятных контактов, а реализацией стабилизирующих взаимодействий гидрофобной части боковой цепи -Glu^7 с пирролидиновым циклом остатка Pro^6 ($-3,6$ ккал/моль) и полярной части COO^- с группой NH_3^+ остатка Cys^1 ($-3,7$ ккал/моль). Значения углов X^1 -67° , X^2 66° и X^3 44° боковой цепи -Glu^7 , полученные после минимизации (табл. 14 в [3]), точно соответствуют этой области. Две другие ориентации боковой цепи глутаминовой кислоты ($X^1 \sim 60$ и 180°) значительно менее выгодны как для свободного остатка, так и для остатка, включенного в пептидную цепь молекулы апамина. При $X^1 \sim 60^\circ$ на обеих картах отсутствуют области низкой энергии ($X^2 \sim 60, 180, -60^\circ$), реализующиеся в случае $X^1 \sim -60^\circ$. Увеличение энергии связано с сильным электростатическим отталкиванием между основной (C=O) и боковой (COO^-) цепями остатка Glu^7 . Минимум наблюдается лишь в одном месте при $X^2 \sim -120^\circ$, $X^3 \sim 90^\circ$, однако и здесь он на ~ 5 ккал/моль выше, чем при $X^1 \sim -60^\circ$. Потенциальные поверхности -Glu^7 , построенные для $X^1 \sim 180^\circ$, отличаются от поверхностей с $X^1 \sim 60^\circ$ тем, что

имеют столь же незначительное понижение энергии не при $X^2 \sim -120^\circ$, а при $X^2 150^\circ$.

Самые предпочтительные положения свободной боковой цепи -Thr^8 при $\Phi -129^\circ$, $\Psi 100^\circ$ отвечают значениям $X^1 \sim 60$ и -60° , при которых возможно варьирование угла X^2 в очень широком интервале (рис. 6а). Потенциальная поверхность X^1 - X^2 остатка Thr^8 резко деформируется при учете взаимодействия боковой цепи остатка с остальной частью молекулы (рис. 6б). Из-за наталкивания гидроксильной группы -Thr^8 на боковую цепь -Cys^1 и основные цепи -Asn^2 и -Ala^5 недоступной становится область вдоль значения $X^1 \sim 60^\circ$. Исчезновение минимумов при $X^1 \sim 150^\circ$ связано с неблагоприятными контактами метильной группы -Thr^8 и основных цепей -Asn^2 и -Ala^5 . Остаются лишь две области низкой энергии при $X^1 \sim -60^\circ$, $X^2 \sim 60$ и -60° , причем и они оказываются более узкими по сравнению с областями на карте свободного остатка. Резкая граница слева ($X^1 < -80^\circ$) связана с наталкиванием группы CH_3 остатка Thr^8 на боковую цепь -Cys^1 , а справа ($X^1 > -50^\circ$) — на основную цепь -Ala^5 . Более предпочтительна по энергии (на 1 ккал/моль) и значительно шире область при $X^2 \sim 60^\circ$, которой соответствует расчетное положение боковой цепи -Thr^8 ($X^1 -61^\circ$, $X^2 63^\circ$) в глобальной структуре апамина.

Конформационные карты X^1 - X^2 свободного остатка Leu^{10} и включенного в цепь апамина (рис. 7а, б) практически совпадают между собой. Это указывает на фактическую изоляцию боковой цепи лейцина в структуре апамина. Действительно, энергия взаимодействия -Leu^{10} с другими остатками при самой выгодной ориентации боковой цепи ($X^1 -60^\circ$, $X^2 146^\circ$) составляет $-2,5$ ккал/моль (табл. 3, 13 в [3]). Однако при $\Phi -81^\circ$, $\Psi 119^\circ$ серьезные ограничения в конформационную свободу боковой цепи лейцина вносят внутримолекулярные взаимодействия.

У остатка Arg^{13} наиболее вероятные положения боковой цепи отвечают углу $X^1 \sim 180^\circ$. При значении $X^1 \sim -60^\circ$ энергия возрастает из-за электростатического отталкивания между сближенными гуанидиновыми группами этого остатка и -Arg^{14} ; состояние боковой цепи с $X^1 \sim 60^\circ$ невозможно по стерическим причинам. В случае $X^1 \sim 180^\circ$ цепь ориентирована преимущественно в сторону С-конца молекулы. Суммарный эффект ее взаимодействий с пентадекапептидным участком Cys^1 - Cys^{15} очень мал ($-1,0$ ккал/моль). Значения углов X^2 - X^4 определяются в основном конформационным состоянием тетрапептида Cys^{15} - His^{18} - NH_2 . Ввиду лабильности этого фрагмента приемлемым для боковой цепи -Arg^{13} оказывается большое число сочетаний углов X^2 - X^4 . По этой причине мы не приводим конформационные карты -Arg^{13} . В самых выгодных структурах апамина боковая цепь остатка имеет углы $X^1 \sim X^3 \sim 180^\circ$ и $X^4 \sim -60^\circ$ (табл. 14 в [3]).

Боковая цепь остатка Arg^{14} в свободном состоянии при $\Phi -68,8^\circ$ и $\Psi 146,3^\circ$ обладает большой лабильностью. Как видно из рис. 8а, потенциальная поверхность X^1 - X^2 ($X^3 = X^4 = 180^\circ$) содержит целый ряд низкоэнергетических областей, которые группируются вдоль вертикалей $X^1 \sim 60$, 180 и -60° . Взаимодействия -Arg^{14} с другими остатками, имеющие в основном дестабилизирующий характер, заметно ограничивают конформационную свободу его боковой цепи (рис. 8б). Из-за неблагоприятных контактов аргинина с дисульфидным мостиком Cys^3 - Cys^{15} и основной цепью -Asn^2 нерациональны положения боковой цепи с $X^1 \sim 180^\circ$ и X^2 от 150 до -170° . При значении угла $X^1 \sim 180^\circ$ низкоэнергетической остается только одна очень узкая область вблизи $X^2 \sim 170^\circ$ (рис. 8б). Наталкивание боковой цепи -Arg^{14} на основную цепь -Arg^{13} делает невозможными все положения с $X^1 \sim 60^\circ$. В этом случае возникают также стерические затруднения вследствие сближенности боковой цепи с С-концевым фрагментом Cys^{15} - His^{18} - NH_2 при наиболее выгодных конформациях последнего. Наименьшие изменения потенциальной поверхности происходят вдоль координаты $X^1 \sim -60^\circ$. Однако и здесь из-за наталкивания гуанидиновой группы на дисульфидный мостик Cys^1 - Cys^{11} неприемлемым оказывается положение боковой

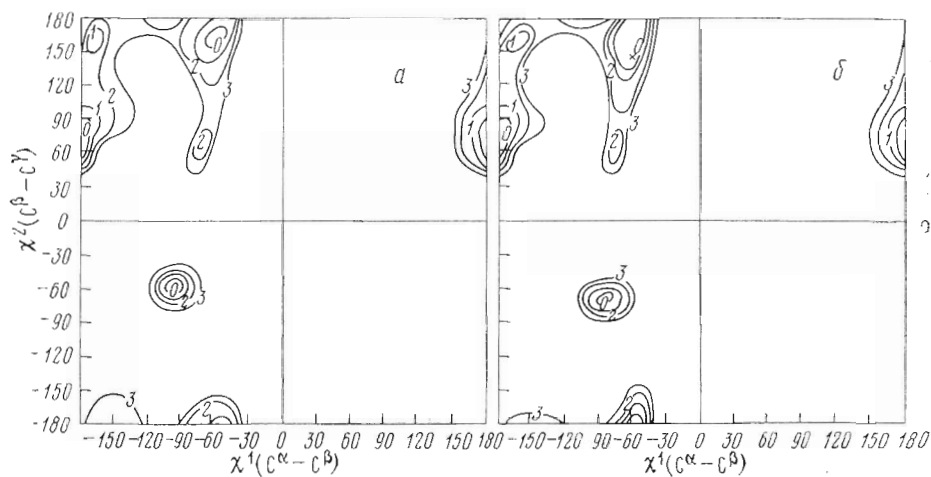


Рис. 7. Конформационные карты X^1 - X^2 боковой цепи -Leu¹⁰ в свободном состоянии остатка (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов $\Phi = -81,7^\circ$, $\Psi = 119,1^\circ$

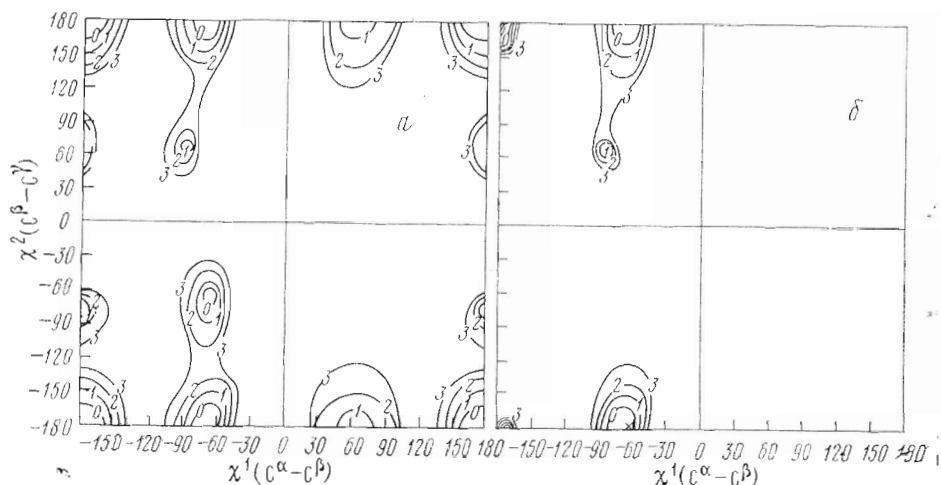


Рис. 8. Конформационные карты X^1 - X^2 боковой цепи -Arg¹⁴ в свободном состоянии остатка (а) и в молекуле апамина (б) при значениях углов $X^3=X^4=180^\circ$ и $\Phi = -68,8^\circ$, $\Psi = 146,3^\circ$

цепи -Arg¹⁴ с $X^1 \sim X^2 \sim -60^\circ$. Самая предпочтительная область потенциальной поверхности при $X^1 \sim -60^\circ$ ограничена значениями угла X^2 от ~ 70 до $\sim -120^\circ$. Она имеет два минимума при $X^2 \sim 180$ и 60° , которым и соответствуют расчетные значения двугранных углов боковой цепи -Arg¹⁴ в наиболее низкоэнергетических структурах апамина (табл. 14 в [3]). Свобода боковой цепи -Arg¹⁴ ограничена главным образом по углам X^1 и X^2 . Что же касается X^3 и X^4 , то большинство комбинаций их оптимальных значений являются разрешенными. Малая чувствительность энергии к значениям углов X^3 и X^4 обусловлена, с одной стороны, незначительностью стабилизирующих взаимодействий гидрофобной части боковой цепи -Arg¹⁴ с другими остатками, а с другой — малым градиентом электростатических взаимодействий, которые осуществляет гуанидиновая группа с N-концом апамина и остатками Lys⁴, Glu⁷ и Arg¹³ (табл. 13 в [3]); к тому же полярные взаимодействия отмеченных остатков в их предпочтительных состояниях носят компенсационный характер.

Рассмотренные сечения потенциальной поверхности апамина и полученные ранее результаты расчета оптимальных структур [1-3] показывают, что конформационные свойства различных частей молекулы не

могут быть охарактеризованы однозначным образом. Прежде всего, основная цепь апамина состоит из двух разных участков — жесткой, компактной части Cys¹—Cys³—Cys¹¹—Cys¹⁵ и лабильной Cys¹⁵—His¹⁸-NH₂. Однако первый участок также неоднороден. При конформационной жесткости его основной цепи отсутствует строгая детерминация боковых цепей. Они могут реализовываться в нескольких взаимообусловленных конформационных состояниях, осуществляя в каждом наборе состояний приблизительно одинаковую стабилизацию одной и той же формы основной цепи бициклического пентадекапептида. Наибольшей конформационной свободой обладают боковые цепи заряженных остатков Lys⁴, Arg¹³ и Arg¹⁴. Они относительно слабо связаны с другими остатками, и их расположение диктуется главным образом электростатическими взаимодействиями как между собой, так и с группами NH₃⁺ и COO⁻ остатков Cys¹ и Glu⁷. В найденной структуре апамина (табл. 14 в [3]) величины энергии электростатического отталкивания (7,1 ккал/моль) и притяжения (-7,9 ккал/моль) практически полностью скомпенсированы. Наименьшую конформационную свободу имеют боковые цепи остатков Thr⁸, Glu⁷ и Asn², хотя и у них есть несколько низкоэнергетических состояний, различающихся по углу X².

Полученные путем минимизации конформационные состояния боковых цепей попадают в самые низкоэнергетические и широкие области сечений потенциальной поверхности, т. е. являются у всех остатков наиболее выгодными по энтальпии и энтропии. Область конформационной карты, в которой находятся параметры рассчитанного состояния боковой цепи данного остатка в апаине, совпадает с одной из областей низкой энергии на карте свободного остатка. Таким образом, в найденной структуре апамина (табл. 14 в [3]) конформационное состояние каждого остатка отвечает одной из самых выгодных конформаций изолированного монопептида, что свидетельствует о согласованности всех внутри- и межостаточных взаимодействий.

Полученные результаты подтверждают эффективность использованной в теоретическом конформационном анализе процедуры минимизации. Это обусловлено сравнительной простотой сечений потенциальной поверхности. Низкоэнергетические области содержат один или два четко выраженных и далеко отстоящих друг от друга потенциальных минимума. Поэтому минимизация энергии приводит к реальным результатам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов Е. М., Мельников П. Н. (1979) *Биоорг. химия*, 5, 828—847.
2. Мельников П. Н., Попов Е. М. (1979) *Биоорг. химия*, 5, 1011—1024.
3. Попов Е. М., Мельников П. Н. (1979) *Биоорг. химия*, 5, 1471—1493.
4. Попов Е. М. (1975) *Молекулярн. биология*, 9, 578—593.
5. Попов Е. М. (1979) *G. J. Quantum. Chem.*, in press.
6. Попов Е. М., Липкинд Г. М. (1971) *Молекулярн. биология*, 5, 624—636.

Поступила в редакцию
28.V.1979

A PRIORI CALCULATION OF THE APAMIN THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE. IV. CONFORMATIONAL POSSIBILITIES OF THE SIDE CHAINS

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

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

The potential surface for apamin was analyzed and all possible positions were found for the side-chains of residues comprising the bicyclic fragment Cys¹-Cys¹⁵, i. e. Asn², Lys⁴, Glu⁷, Thr⁸, Leu¹⁰, Arg¹³ and Arg¹⁴. These side-chain conformational states found by a minimization procedure are related to the wide lowest energy minima for apamin and coincide with the minima on conformational maps for individual amino acids. The pattern of the apamin potential surface is shown to correspond to the utilized minimization procedure.