



УДК 547.962:541.63

АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ АПАМИНА

I. ФРАГМЕНТ Cys¹—Pro⁶*Попов Е. М., Мельников П. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Рассмотрены конформационные возможности N-концевого фрагмента апамина Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶. Анализ выполнен в несколько стадий путем предварительного расчета перекрывающихся ди-, три- и тетрапептидных участков гексапептида Cys¹—Pro⁶. Исследование дипептидов основывалось на низкоэнергетических конформационных состояниях монопептидов. Конформационный анализ фрагмента Cys¹—Pro⁶ выявил перспективные структуры для исследования фрагмента апамина большей длины.

Настоящее сообщение является первым в серии наших публикаций, посвященных априорному исследованию пространственного строения и конформационных возможностей апамина — природного олигопептида, оказывающего сильное токсическое действие на центральную нервную систему [1]. Он построен из 18 остатков, в том числе четырех цистеинов, образующих два дисульфидных мостика Cys¹—Cys¹¹ и Cys³—Cys¹⁵ (рис. 1) [2]. Интерес к пространственному строению апамина вызван не только важными биологическими свойствами этого соединения, изучение которых требует знания структуры и конформационных возможностей молекулы, но и рядом причин более общего порядка. Можно полагать, что формирование трехмерной структуры такого сложного олигопептида включает некоторые элементы, характерные для укладки белковой цепи. Поэтому его детальный конформационный анализ может оказаться полезным для проверки ряда положений теории пространственной организации белковых молекул, предложенной одним из авторов [3, 4], и разработки эффективного метода расчета трехмерных структур олиго- и полипептидов.

Ранее [3—7] были изучены конформационные состояния многих ди- и трипептидных фрагментов и предложен метод априорного расчета стабильных конформаций олигопептидных молекул. На его основе выполнен конформационный анализ нескольких пента- и нонабрадикининпотенцирующих пептидов [8—11].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что природные олигопептиды не являются флуктуирующими образованиями, а представляют собой компактные структуры, стабильность которых обусловлена согласованностью ближних и средних взаимодействий. Ближние взаимодействия определяют конформационные возможности отдельных аминокислотных остатков, т. е. наборы низкоэнергетических конформаций в их свободном состоянии. Средние взаимодействия только из этих наборов выбирают конформации остатков, сочетание которых у данной последова-

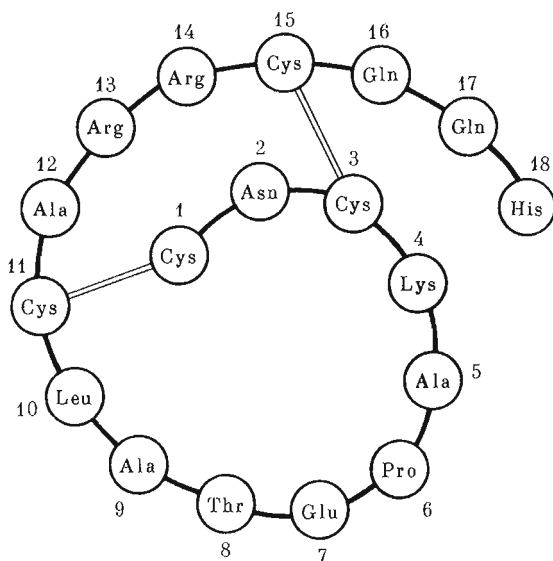


Рис. 1. Аминокислотная последовательность апамина

тельности приводит к наиболее эффективным взаимодействиям между соседними по цепи остатками. У исследованных олигопептидов [8—11] выбор конформационного состояния каждого остатка за счет средних взаимодействий осуществляется практически однозначным образом.

Наличие у сравнительно небольших пептидов стабильных конформаций указывает на возможность образования на некоторых участках белковой последовательности под влиянием средних взаимодействий конформационно жестких структур — нуклеаций. Поскольку компактная глобула не может состоять только из нуклеаций, то следует допустить, что в белковой последовательности имеются также конформационно более лабильные участки. В этом случае взаимодействия между остатками внутри фрагмента выделяют набор приблизительно равновероятных конформационных состояний.

Таким образом, можно предположить, что учет средних взаимодействий в белковой цепи приведет к выявлению нуклеаций и конформационно лабильных участков. Свертывание цепи в глобулярную форму происходит под действием дальних взаимодействий. Их функция по отношению к нуклеациям заключается в дополнительной стабилизации и корректировке конформационных состояний некоторых боковых цепей, а по отношению к лабильным фрагментам — к выбору из наборов равновероятных по средним взаимодействиям состояний единственных конформаций, обеспечивающих сближенность комплементарных друг другу нуклеаций.

Доказательство справедливости предположения об образовании нуклеаций и о согласованности всех внутримолекулярных взаимодействий в глобуле имеет принципиальное значение для решения структурной проблемы белка, так как в этом случае становится возможным представить эту проблему в виде последовательно решаемых менее громоздких проблем ближних, средних и дальних взаимодействий.

Молекула апамина представляется весьма удобным объектом для проверки высказанного выше предположения о согласованности всех взаимодействий в белке. Ее аминокислотная последовательность достаточно сложна, чтобы включать и конформационно жесткие, и лабильные участки. В формировании структуры апамина принимают участие не только средние, но и дальние взаимодействия. Расчет дает возможность количественно оценить вклады этих взаимодействий и выяснить соотношение

между ними, а также проследить на простейшем по сравнению с белком, но в принципе аналогичном примере укладку цепи в нативную структуру.

Молекула апамина позволяет также рассмотреть весьма актуальный для белков вопрос о роли дисульфидных мостиков в пространственной организации пептидов, о побудительных мотивах и механизме их образования. Конформационный анализ бициклического апамина выполнен нами для линейной последовательности без учета двух S—S-связей. В согласии с термодинамической гипотезой Апфинсена [12] мы полагаем, что механизм свертывания этого сложного олигопептида является не статистическим, а строго детерминированным, причем стерически возможными или предпочтительными становятся только взаимодействия между вполне определенными парами остатков Cys. Расчет апамина строился таким образом, что его результаты должны были или опровергнуть, или доказать справедливость представления о том, что не образование дисульфидных мостиков определяет конформацию молекулы, а, напротив, детерминированные состояния различных участков цепи и взаимодействия между ними диктуют избирательную сближенность цистеиновых пар. При априорном многостадийном конформационном анализе октадекапептида случайная сближенность четырех цистеинов практически исключена. Поэтому автоматический приход на завершающей стадии расчета к самым низкоэнергетическим конформациям линейной последовательности молекулы с близкими контактами между соответствующими остатками Cys будет одновременно свидетельствовать о наличии согласованности всех видов межостаточных взаимодействий в глобальной структуре (одно из основных положений конформационной теории белков [3, 4]), о справедливости термодинамической гипотезы образования дисульфидных связей [12], об адекватности использованных в расчете потенциальных функций реальным атом-атомным взаимодействиям и, наконец, о правильном решении конкретной структурной задачи.

Метод расчета. Исследование пространственного строения апамина включает многоступенчатый и довольно трудоемкий расчет фрагментов постепенно увеличивающейся длины. Каждый раз анализируется большое число конформаций, отбираются наиболее предпочтительные, которые служат исходными на следующем этапе. Большое значение при этом приобретает классификация конформаций, охватывающая все возможные варианты и обоснованная с физической точки зрения. Рассмотрим удовлетворяющую этим требованиям классификацию пептидных структур, которой мы будем придерживаться при изложении всего материала, касающегося пространственной организации молекулы апамина. Вначале уточним определения для некоторых структурных понятий, которым будем также строго следовать в дальнейшем.

Конформационное состояние одного аминокислотного остатка полностью определяется (при постоянных длинах связей и валентных углах) значениями двугранных углов Φ , Ψ основной цепи и углов χ^1 , χ^2 , ... боковой цепи. Совокупность состояний остатков в данной последовательности однозначно фиксирует конформацию фрагмента. Под понятиями «конформационное состояние» и «конформация» мы будем всегда подразумевать строгие количественные характеристики геометрии остатка или фрагмента, которые позволяют вычислить значения энергии их ближних и средних взаимодействий.

Углы Φ , Ψ основной цепи в конформациях остатков находятся на стерической карте в низкоэнергетических областях

$$R(\Phi = \Psi = -180 - 0^\circ), B(\Phi = -180 - 0^\circ; \Psi = 0 - 180^\circ), \\ L(\Phi = \Psi = 0 - 180^\circ) \text{ и } P(\Phi = 0 - 180^\circ; \Psi = -180 - 0^\circ).$$

Введем понятие формы остатка, которое характеризует область (R , B , L или P) значений углов Φ , Ψ его основной цепи. Понятия формы остатка и формы фрагмента представляют собой полуколичественные характе-

ристики геометрии основной цепи. Поскольку у всех остатков значения углов Φ , Ψ могут находиться в областях R , B , L , P , форма основной цепи прямо не связана с природой остатков и их порядком. Смысл введения этих понятий заключается в том, что они отражают общий характер взаимодействий атомов основной цепи остатка или пептидного скелета фрагмента, а также определяют возможности боковых цепей в отношении взаимодействий друг с другом и с основной цепью, которые конкретизируются лишь при наложении на формы рассматриваемой аминокислотной последовательности.

Формы основной цепи фрагмента могут быть разделены на отдельные классы, которые мы будем называть шейпами. Формы одного шейпа имеют аналогичный ход пептидной цепи и подобное взаимное расположение основных и боковых цепей. Следовательно, они обладают близкой потенциальной в отношении средних взаимодействий. Различия связаны с энергией ближних взаимодействий и конформационной свободой (области R и B имеют меньшую энергию на конформационной карте монопептида и большую площадь, чем L и тем более P). Шейп является качественным понятием, которое никак не связано с конкретной аминокислотной последовательностью, а определяется лишь числом остатков.

Описанная классификация пептидных структур построена по принципу «дерева». Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы — по шейпам. У дипептида возможны два шейпа — свернутый (f) и развернутый (e), у трипептида — четыре (ff , fe , ef и ee), у фрагмента из n остатков в общем случае число шейпов равно 2^{n-1} . Количество форм в каждом шейпе определяется числом комбинаций R -, B -, L - и P -форм остатков. У остатков аланинового типа (16 природных остатков, в которых отсутствует разветвление боковой цепи при атоме C^β), а также у валина и изолейцина возможна реализация R -, B - и L -форм. У пролина возможны только R и B , а у глицина — все четыре формы R , B , L и P . Число конформаций каждой формы зависит от природы остатков. Все возможные формы основной цепи и шейпы пептидного скелета предполагаются равноценными. Предпочтительность некоторых из них выявляется только в процессе их опробования на конкретной аминокислотной последовательности. В связи с такой структурной градацией возможна энергетическая дифференциация пространственного строения пептида по шейпу, форме и конформации.

Для обозначения структуры амина и его фрагментов конформационные состояния каждого остатка определяются идентификатором $X_{i,j,\dots}^N$, где X характеризует состояние основной цепи остатка (R , B , L), N — номер остатка в последовательности (рис. 1), а $i, j, \dots = 1, 1, \dots; 1, 2, \dots; 1, 3, \dots; 2, 1, \dots$ и т. д. отвечают положениям боковой цепи (χ^1, χ^2, \dots); индекс 1 соответствует значениям углов χ в области $0-120^\circ$, 2 — области от 120 до -120° и 3 — области $-120-0^\circ$. Система идентификаторов будет использоваться нами для описания конформаций во всех промежуточных выкладках и лишь на завершающей стадии расчета всей молекулы будут приведены численные значения двугранных углов Φ , Ψ , χ и координаты атомов.

Отсчет углов вращения соответствует номенклатуре IUPAC — IUB [13].

Потенциальные функции и параметризация. Расчет основан на представлении о молекуле как механической системе, пространственное строение которой определяется взаимодействием валентно не связанных атомов и заторможенным вращением вокруг ординарных связей. Конформационная потенциальная энергия ($E_{\text{обш}}$) представляется в виде суммы энергии невалентных и электростатических взаимодействий, водородной связи и торсионной энергии.

Невалентные взаимодействия оценивались по потенциалу Леннарда — Джонса с системой параметров Скотта и Шераги [14]. Электростатическая

энергия рассчитывалась по закону Кулона в монополюльном приближении с величинами зарядов на атомах, предложенными в работе [15]. Исключения составляют боковые цепи полярных остатков Arg и Lys, для которых величины зарядов были взяты из работ [16, 17]. Расчет проведен применительно к условиям водного окружения. В связи с этим диэлектрическая проницаемость (ϵ) принята равной 10 [18]. Оценка энергии водородной связи произведена по потенциалу Леннарда — Джонса с параметрами A_{OH} и B_{OH} , вычисленными по предложенным в работе [15] эмпирическим формулам:

$$A_{OH} = \frac{56,1}{\epsilon} + 2r_{OH}^6 \left(E_{HB} - \frac{5,5}{\epsilon} \right),$$

$$B_{OH} = \frac{2423}{\epsilon} + 2r_{OH}^{12} \left(E_{HB} - \frac{5,5}{\epsilon} \right).$$

Величина $\epsilon=10$; значение параметра $E_{HB}=1,5$ подобрано таким образом, чтобы рассчитанная по потенциалу Леннарда — Джонса энергия водородной связи при оптимальном расстоянии $r_{OH}=1,8 \text{ \AA}$ соответствовала экспериментальным данным ($-1,3$ ккал/моль), полученным для водных растворов [19, 20]. Торсионные потенциалы и величины барьеров взяты такими же, как в работе [21].

Длины связей в основной цепи приняты равными параметрам Полинга — Кори [22]; валентные углы пептидной группы соответствовали усредненным значениям, предложенным в [23]. Геометрические параметры боковых цепей приведены в работе [21]. Пролиновое кольцо предполагалось плоским; его геометрия приведена в [24].

Поиск минимумов потенциальной энергии конформаций коротких фрагментов осуществлялся по первым производным при варьировании всех двугранных углов ϕ , ψ , χ . В расчете конформаций длинных фрагментов использована процедура, включающая два этапа. Вначале минимизация проводилась по первым производным с использованием симплекс-метода при варьировании двугранных углов сближенных остатков. Найденные таким способом конформации служили исходными приближениями для минимизации на втором этапе, где изменялись углы ϕ , ψ , χ всех остатков.

В настоящем сообщении изложены результаты расчета N-концевого гексапептидного фрагмента апамина Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶. Модель фрагмента и принятые обозначения приведены на рис. 2; b_1 - b_7 — элементы основной цепи, s_1 - s_6 — боковые цепи. В процессе минимизации наряду с общей энергией конформации ($E_{общ}$) определялись ее составляющие, характеризующие взаимодействия основных цепей ($E_{b_m-b_n}$), боковых цепей ($E_{s_m-s_n}$) и взаимодействия между основными и боковыми цепями ($E_{b_m-s_n}$). Энергетические составляющие группировались таким образом, чтобы отразить специфику конформации в отношении взаимодействий на его моно-, ди-, три- и т. д. участках. Монопептидная энергия представлялась в виде суммы энергии взаимодействия атомов боковой цепи (E_{s_m}), прилегающих к ней пептидных групп (E_{b_m} , $E_{b_{m+1}}$) и энергии взаимодействия между ними ($E_{b_m-b_{m+1}}$, $E_{b_m-s_m}$, $E_{b_{m+1}-s_m}$). Энергетические составляющие учитывают невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи, но не включают торсионного вклада. В низкоэнергетических конформациях энергия торсионных взаимодействий практически всегда незначительна и слабо влияет на дифференциацию.

Конформационный анализ гексапептидного фрагмента Cys¹-Pro⁶ не может быть выполнен путем непосредственного использования предпочтительных конформаций соответствующих метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Это потребовало бы рассмотрения порядка 10^6 вариантов структур. Поэтому изучение конформационных возможностей проведено путем постепенного генерирования аминокислотных остатков. Сначала рассчиты-

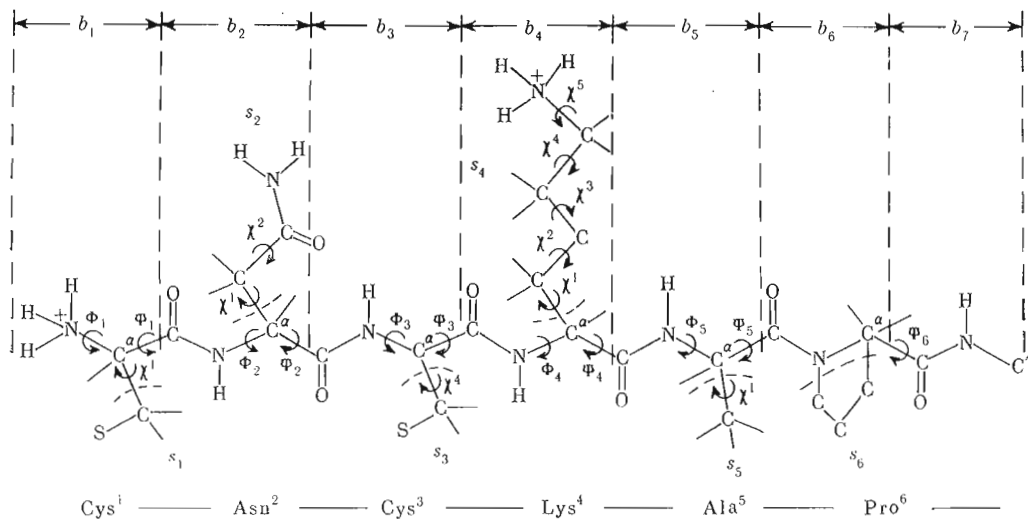


Рис. 2. Модель расчета конформаций фрагмента апамина Cys¹ – Pro⁶

вались конформации перекрывающихся дипептидных участков, затем три- и тетрапептидных участков и, наконец, гексапептида. В расчете каждого фрагмента учитывались результаты предшествующего анализа. Схема расчета Cys¹–Pro⁶ представлена на рис. 3.

Дипептидные фрагменты. Конформации дипептидов имеют развернутые и свернутые формы основной цепи. По этому признаку они могут быть разделены на два шейпа: *e* и *f* (рис. 4). Если в дипептид не входит остаток Gly, то шейп *e* составляют формы *B-B*, *B-R*, *L-R*, *L-B* и *R-L*, а шейп *f* – *R-R*, *R-B* и *B-L*. У конформаций типа *e* не могут осуществляться эффективные взаимодействия между элементами *b*₁ и *b*₃. Боковые цепи *s*₁ и *s*₂ находятся по разные стороны как от оси основной цепи, так и от средней плоскости и также практически не могут взаимодействовать между собой. В то же время в зависимости от природы остатков и конформационных состояний *s*₁ и *s*₂ они имеют возможность образовывать стабилизирующие контакты с элементами основной цепи *b*₁, *b*₂, *b*₃.

В конформациях свернутого шейпа *f* ситуация иная. Здесь сближены оказываются элементы *b*₁ и *b*₂ основной цепи и боковые цепи *s*₁ и *s*₂, взаимодействия между которыми могут вносить значительный вклад в стабилизацию конформаций этого типа. Стерические условия для взаимодействия боковых цепей с основной цепью в этом случае менее благоприятны, чем при развернутом характере пептидного скелета.

Расчет дипептидных фрагментов сложной молекулы позволяет оценить в отдельности влияние на конформационное состояние остатка его ближайшего предшествующего или последующего соседа. Он преследует цель ограничить число вариантов для дальнейшего рассмотрения путем нахождения закономерностей между низкоэнергетическими конформациями различных форм и шейпов, а также путем исключения конформаций с большой энергией.

Нулевые приближения дипептида Cys¹–Asn² формировались из *B*-, *R*- и *L*-форм основной цепи и трех положений по углу χ^1 (~60, 180, –60°) боковой цепи остатка Cys¹ и конформационных состояний метиламида N-ацетил-*L*-аспарагина, энергия которых находится в интервале 0–2 ккал/моль [25]. Исходные варианты у -Asn²- имели также *B*-, *R*- и *L*-формы при значениях углов χ^1 около 60, 180, –60° и χ^2 90, –90°. В указанный интервал у -Asn²- не попадают только конформации типа *L* с значениями $\chi^1, \chi^2 \sim 60, 90^\circ$ и $\sim 180, -90^\circ$ [25].

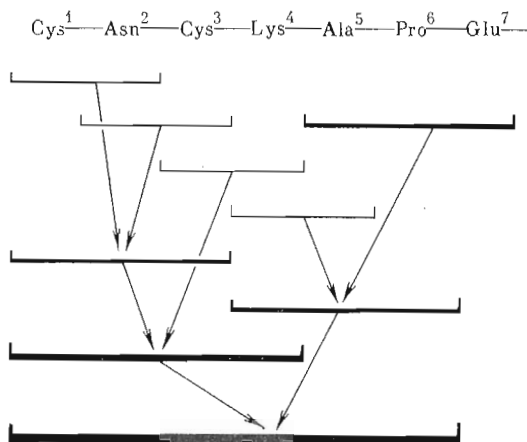


Рис. 3. Схема расчета конформаций фрагмента апамина Cys¹-Pro⁶ с учетом влияния остатка Gly⁷

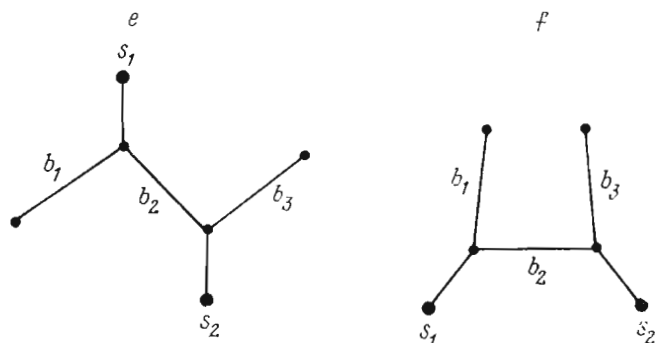


Рис. 4. Шейпы основной цепи дипептидного фрагмента

Все конформации фрагмента Cys¹-Asn² распадаются на восемь форм основной цепи, которые в свою очередь делятся на развернутый и свернутый шейпы. Распределение конформаций по величинам относительной энергии, найденным после минимизации при варьировании двугранных углов Φ , ψ и χ (рис. 2), приведено в табл. 1. В узкий энергетический интервал 0–2 ккал/моль попадают конформации всех форм дипептидов обоих шейпов. Следовательно, ни одна из форм не обладает значительной предпочтительностью. Однако распределение конформаций все-таки нельзя считать равномерным. Энергию менее 2 ккал/моль имеют все конформации с формами R^1-R^2 и R^1-B^2 , две трети — с B^1-B^2 и B^1-R^2 и менее половины конформаций с L -формой остатка Cys¹ или Asn². Это результат главным образом влияния монопептидной (в пределах одного остатка) энергии, которая при L -форме выше на 1,0–1,5 ккал/моль, чем при B и R . Конформации с B^1 - и R^1 -формами -Cys¹ практически изоэнергетичны по углу χ^1 , а с L^1 -формой предпочтительнее варианты с $\chi^1 \sim -60^\circ$. При всех формах основной цепи энергия мало чувствительна к ориентации боковой цепи -Asn². Несколько более предпочтительны положения боковой цепи остатка с $\chi^1, \chi^2 60, -90^\circ; 180, -90^\circ; -60, -90^\circ$. Таким образом, дифференциация конформаций у Cys¹-Asn² весьма незначительна.

Аналогичная картина наблюдается у следующего дипептида Asn²-Cys³ (табл. 2). При $B^2-B^3, B^2-R^3, R^2-R^3$ и R^2-B^3 -формах основной цепи практически тождественны все положения боковой цепи -Cys³. Кон-

Таблица 1

Энергетическое распределение конформаций фрагмента Cys¹-Asn²

Шейк	Форма	Интервал E _{общ.} , ккал/моль				
		5-4	4-3	3-2	2-1	1-0
e	B-B	--	--	5	10	3
	B-R	--	--	3	11	4
	L-B	--	2	8	6	2
	L-R	--	2	8	7	1
	R-L	--	3	4	2	3
f	R-R	--	--	--	15	3
	R-B	--	--	--	12	6
	B-L	3	--	7	2	--

Таблица 2

Энергетическое распределение конформаций фрагмента Asn²-Cys³

Шейк	Форма	Интервал E _{общ.} , ккал/моль				
		5-4	4-3	3-2	2-1	1-0
e	B-B	--	--	11	5	2
	B-R	--	--	5	9	4
	L-B	6	6	6	--	--
	L-R	5	9	4	--	--
	R-L	3	4	8	3	--
f	R-R	--	--	8	8	2
	R-B	--	--	9	7	2
	B-L	4	5	8	1	--

формационная энергия этого фермента также мало зависит от ориентации боковой цепи -Asn².

Для расчета трипептидного участка Cys¹-Asn²-Cys³ отобраны конформации всех форм фрагментов Cys¹-Asn² и Asn²-Cys³, энергия которых находится в интервале 0-2 ккал/моль. Ввиду слабого взаимодействия боковых цепей во всех конформациях обоих дипептидов для дальнейшего анализа выбраны значения углов $\chi^1 \sim 180^\circ$ при B- и R- и $\chi^1 \sim -60^\circ$ при L-формах -Cys¹- и -Cys³-; для боковой цепи -Asn²- отобраны конформации с $\chi^1, \chi^2 \sim 60, -90^\circ; 180, -90^\circ; -60, -90^\circ$.

В табл. 1 и 2 обращает на себя внимание очень близкое распределение по энергии конформаций с формами B-B и B-R, L-B и L-R, R-R и R-B. В каждой паре они различаются между собой значением только одного угла ϕ , который координирует положение C-концевой пептидной группы второго остатка. Близкое энергетическое распределение конформаций показывает, что переход этого остатка из области B в R, т. е. изменение угла ϕ приблизительно на 180° , мало сказывается на величине относительной энергии. Это справедливо и для других фрагментов. Поэтому целесообразно для C-концевого остатка учитывать не три формы основной цепи, а две - B(R) и L, различающиеся значениями угла ϕ . По этой же причине для N-концевого остатка можно рассматривать только формы B(L) и R.

Сократить число рассчитываемых вариантов можно и за счет углов боковой цепи. У всех природных аминокислотных остатков (естественно, за исключением остатков Gly и Pro) приблизительно равновероятна реализация конформеров с ориентациями боковой цепи с $\chi^1 \sim 60, 180$ и -60° . При угле $\chi^1 \sim -60^\circ$ боковая цепь направлена к N-концу, а при $\chi^1 \sim 180^\circ$ - к C-концу пептидной цепи; в случае $\chi^1 \sim 60^\circ$ она занимает промежуточное положение. Поэтому в расчетах можно у N-концевого остатка исключить из рассмотрения состояния с $\chi^1 \sim -60^\circ$, а у C-концевого - с $\chi^1 \sim 180^\circ$, так как при этих значениях углов боковые цепи направлены от фрагмента и с ним эффективно не взаимодействуют. В расчете перекрывающихся фрагментов эти остатки окажутся в середине цепи и у них будут учтены все три возможных положения как боковых, так и основных цепей.

Исходные варианты для анализа следующих дипептидных фрагментов Cys³-Lys⁴ и Lys⁵-Ala⁵ составлены из отмеченных выше 9 конформационных состояний -Cys³-, 56 состояний остатка Lys⁴, отвечающих конформациям метиламида N-ацетил-L-лизина с энергией 0-2 ккал/моль [17] и B-, L-состояний -Ala⁵-. Поскольку остаток Ala⁵ в последовательности аспаргина предшествует -Pro⁶-, то для него область R запрещена по стерическим причинам независимо от конформационного состояния пролина [26-28].

Таблица 3

**Энергетическое распределение конформаций
фрагмента Cys³—Lys⁴**

Шейп	Форма	Интервал $E_{\text{общ}}$, ккал/моль					
		>5	5—4	4—3	3—2	2—1	1—0
<i>e</i>	<i>B-B</i>	2	1	6	15	12	15
	<i>B-R</i>	—	—	—	3	3	6
	<i>L-B</i>	11	12	15	13	—	—
	<i>L-R</i>	—	3	1	8	—	—
	<i>R-L</i>	6	—	6	2	7	—
<i>f</i>	<i>R-R</i>	—	—	—	4	8	—
	<i>R-B</i>	3	1	18	12	15	2
	<i>B-L</i>	6	3	9	3	—	—

Таблица 4

**Энергетическое распределение конформаций
фрагмента Lys⁴—Ala⁵**

Шейп	Форма	Интервал $E_{\text{общ}}$, ккал/моль					
		>5	5—4	4—3	3—2	2—1	1—0
<i>e</i>	<i>B-B</i>	1	—	1	2	8	6
	<i>L-B</i>	3	—	5	—	—	—
	<i>R-L</i>	1	3	—	—	—	—
<i>f</i>	<i>R-B</i>	—	—	—	3	5	—
	<i>B-L</i>	2	9	7	—	—	—

Разброс энергии среди 231 рассчитанной конформации у Cys³—Lys⁴ и 56 у Lys⁴—Ala⁵ составил соответственно 0—10 и 0—7 ккал/моль. Однако в подавляющем большинстве случаев конформационная энергия обоих дипептидов, как видно из табл. 3 и 4, не превышает 5 ккал/моль. Наибольшее число самых низкоэнергетических конформаций имеет развернутые формы шейпа *e*. Значительный вклад в их стабилизацию (~3,5 ккал/моль) вносит взаимодействие боксвой цепи -Lys⁴ (s_4) с элементами основной цепи b_3 (у Cys³—Lys⁴) и b_5 (у Lys⁴—Ala⁵).

Другие взаимодействия приблизительно одинаковы и незначительны по величине; все конформеры по углу χ^1 у -Cys³-изоэнергетичны. Для анализа фрагментов большей длины выбраны 16 низкоэнергетичных конформаций всех форм основной цепи участка Cys³—Lys⁴ при значении угла $\chi^1 \sim 180^\circ$ у боковой цепи первого остатка и $\chi^1 \sim 60$ и -60° второго. Из конформаций участка Lys⁴—Ala⁵ отобраны 13 самых предпочтительных вариантов всех форм при $\chi^1 \sim 60$ и 180° . Выбор такого представительного набора конформаций связан главным образом с остатком Lys⁴, обладающим громоздкой боковой цепью, возможность к взаимодействию которой у рассмотренных дипептидов реализована лишь в очень небольшой степени.

Трипептидные фрагменты. Анализ трипептидных фрагментов позволяет исследовать конформационные состояния центрального остатка при одновременном воздействии на него ближайших соседей с обеих сторон цепи, а также рассмотреть взаимодействия остатков в первом и третьем положениях и оценить путем сопоставления с соответствующими конформациями свободных дипептидов их эффект на моно- и дипептидные контакты.

Все конформации трипептида распределяются по четырем шейпам (рис. 5), представляющим собой комбинации *e*- и *f*-шейпов перекрывающихся дипептидов (*ee*, *ef*, *fe* и *ff*).

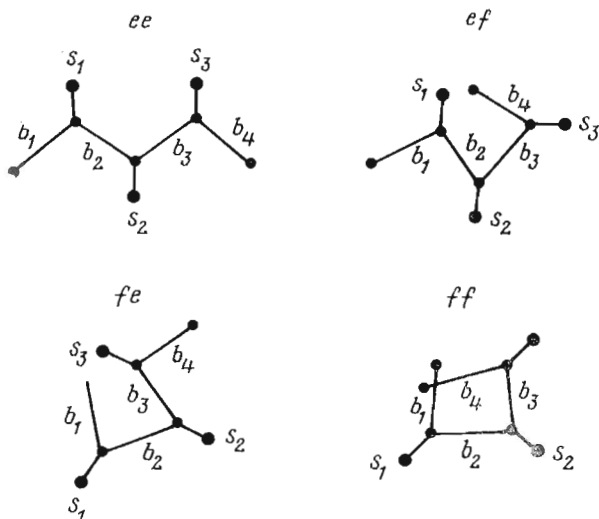


Рис. 5. Шейпы основной цепи трипептидного фрагмента

Нулевые приближения трипептида $\text{Cys}^1 - \text{Asn}^2 - \text{Cys}^3$ составлены из 22 конформаций фрагмента $\text{Cys}^1 - \text{Asn}^2$ и 22 конформаций $\text{Asn}^2 - \text{Cys}^3$, являющихся самыми низкоэнергетическими представителями всех форм основной цепи дипептидов. Минимизация энергии выполнена при варьировании 10 переменных углов Φ , ψ , χ (рис. 2).

Результаты расчета относительно энергии представлены в табл. 5. Величины $E_{\text{общ}}$ попадают в интервал 0–6 ккал/моль, причем около 95% конформаций имеют энергию менее 5, а 50% — менее 3 ккал/моль. Таким образом, фрагмент $\text{Cys}^1 - \text{Asn}^2 - \text{Cys}^3$ в свободном состоянии очень лабилен, что связано с малыми размерами боковых цепей. Несколько более предпочтительны конформации со свернутыми формами основной цепи шейки *ff*, стабилизация которых осуществляется за счет взаимодействий элементов b_1 с b_3 и b_4 и b_2 с b_4 . Исключить из дальнейшего рассмотрения можно лишь конформации форм *L-R-L* (*ee*) и *L-B-L* (*ef*), имеющих энергию более 4,5 ккал/моль. Из конформаций других форм отобраны 27 наиболее низкоэнергетических вариантов. В табл. 5 они отмечены звездочками.

Конформации фрагмента $\text{Lys}^4 - \text{Ala}^5 - \text{Pro}^6$ из-за специфики пролина могут иметь формы основной цепи только двух шейпов *ee* и *fe*. Исходные для минимизации варианты составлены из предпочтительных конформаций участка $\text{Lys}^4 - \text{Ala}^5$, в которых боковая цепь лизина обращена в сторону фрагмента ($\chi^1 \sim 60$ и 180°), и *R*-состояния $-\text{Pro}^6$, изоэнергетичного в данном случае *B*. Расчет фрагмента позволяет оценить взаимодействия $-\text{Lys}^4$ с двумя последующими остатками.

Относительная энергия рассчитанных конформаций приведена в табл. 6. Энергетическая дифференциация и здесь весьма невелика; разброс энергии составляет всего 0–5 ккал/моль. Как и следовало ожидать, более стабильны конформации с полностью развернутой цепью *B-B-R(B)*. Она предоставляет наилучшие условия для взаимодействия боковой цепи $-\text{Lys}^4$ в состоянии $\chi^1, \chi^2, \chi^3, \chi^4 \sim 180^\circ$ с пептидным скелетом и боковой цепью остатка Pro^6 . Однако в данной последовательности вследствие жесткости боковой цепи $-\text{Pro}^6$ это взаимодействие неэффективно.

Конформации, используемые в расчете гексапептида $\text{Cys}^1 - \text{Pro}^6$, отмечены в табл. 6 звездочками. При их отборе учитывались также данные анализа тетрапептида $\text{Cys}^1 - \text{Lys}^4$ (см. ниже).

Расчет фрагмента $\text{Ala}^5 - \text{Pro}^6 - \text{Glu}^7$ предпринят с целью выяснения предпочтительных состояний аланина и пролина, которые в предшествующем трипептиде остались неидентифицированными. Исходные конформации

Относительная энергия конформаций фрагмента Cys¹-Asn²-Cys³

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	
<i>ee</i>	$B_2^1-B_{13}^2-B_2^3$	1,8 *	<i>ff</i>	$R_3-R_{13}-R_3$	0 *	<i>ef</i>	$B_2-R_{13}-B_2$	1,3 *	
	$B_2-B_{23}-B_2$	1,7 *		$R_3-R_{23}-R_3$	1,2		$B_2-R_{23}-B_2$	2,1 *	
	$B_2-B_{33}-B_2$	1,6 *		$R_3-R_{33}-R_3$	2,0		$B_2-R_{33}-B_2$	2,3	
	$B_2-B_{13}-R_2$	1,9 *		$R_3-R_{13}-B_3$	0,2 *		$B_2-R_{13}-R_2$	1,8 *	
	$B_2-B_{23}-R_2$	1,2 *		$R_3-R_{23}-B_3$	1,5		$B_2-R_{23}-R_2$	2,4	
	$B_2-B_{33}-R_2$	2,5		$R_3-R_{33}-B_3$	1,2		$B_2-R_{33}-R_2$	2,3	
	$L_2-R_{13}-B_2$	2,8 *		$R_2-B_{13}-L_2$	3,5		$B_2-B_{13}-L_2$	4,1	
	$L_2-B_{23}-B_2$	3,7		$R_2-B_{23}-L_2$	3,3 *		$B_2-B_{23}-L_2$	3,7 *	
	$L_2-B_{33}-B_2$	3,9		$R_2-B_{33}-L_2$	3,4		$B_2-B_{33}-L_2$	3,6	
	$L_2-B_{13}-R_2$	3,1 *		<i>je</i>	$R_2^1-B_{13}^2-B_2^3$		1,1 *	$L_2-R_{13}-B_2$	3,4 *
	$L_2-B_{23}-R_2$	3,0 *			$R_2-B_{23}-B_2$		1,5 *	$L_2-R_{23}-B_2$	4,3
	$L_2-B_{33}-R_2$	3,7			$R_2-B_{33}-B_2$		2,3	$L_2-R_{33}-B_2$	3,9
	$B_2-R_{13}-L_2$	3,4 *			$R_2-B_{13}-R_2$		1,3 *	$L_2-R_{13}-R_2$	3,4
	$B_2-R_{23}-L_2$	4,9			$R_2-B_{23}-R_2$		0,9 *	$L_2-R_{23}-R_2$	4,6 *
	$B_2-R_{33}-L_2$	4,6			$R_2-B_{33}-R_2$		2,0	$L_2-R_{33}-R_2$	4,1
	$L_3-R_{13}-L_3$	4,9			$R_2-R_{13}-L_2$		3,0 *	$L_3-B_{13}-L_3$	4,9
	$L_3-R_{23}-L_3$	6,0			$R_2-R_{23}-L_2$		4,2	$L_3-B_{23}-L_3$	5,2
$L_3-R_{33}-L_3$	5,4	$R_2-R_{33}-L_2$	4,3		$L_3-B_{33}-L_3$	4,8			
$R_2-L_{23}-B_2$	2,4	$B_2-L_{23}-B_2$	4,1						
$R_2-L_{33}-B_2$	2,2 *	$B_2-L_{33}-B_2$	3,9 *						
$R_2-L_{23}-R_2$	2,8	$B_2-L_{23}-R_2$	3,9						
$R_2-L_{33}-R_2$	2,7 *	$B_2-L_{33}-R_2$	4,0 *						

Примечание. Звездочкой отмечены конформации, включенные в последующий расчет.

Таблица 6

Относительная энергия конформаций фрагмента Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/ /моль	
<i>ee</i>	$B_{1211}^4-B^5-R^6$	0,8 *	<i>ee</i>	$R_{2222}-L-R$	0,7 *	<i>je</i>	$R_{2223}-B-R$	1,5	
	$B_{1223}-B-R$	0,9 *		$R_{2223}-L-R$	0,8		$B_{1211}-L-R$	2,9 *	
	$B_{2122}-B-R$	1,3		$L_{2121}-B-R$	4,8		$B_{1223}-L-R$	3,3 *	
	$B_{2211}-B-R$	1,3		$L_{2211}-B-R$	3,4		$B_{2122}-L-R$	3,6	
	$B_{2222}-B-R$	0,1 *		$L_{2223}-B-R$	3,5		$B_{2211}-L-R$	2,8	
	$B_{2223}-B-R$	0		<i>je</i>	$R_{2121}^4-B^5-R^6$		1,9	$B_{2222}-L-R$	2,8 *
	$R_{2121}-L-R$	0,6			$R_{2122}-B-R$		1,8	$B_{2223}-L-R$	2,7
	$R_{2122}-L-R$	1,4			$R_{2222}-B-R$		1,7 *		

* См. примечание к табл. 5.

-Ala⁵-Pro⁶-Glu⁷- сформированы из *B*- и *L*-состояний остатка Ala⁵, *B*- и *R*-состояния остатка Pro⁶ и конформаций метиламида *N*-ацетил-*L*-глутаминовой кислоты, энергия которых не превышает 2 ккал/моль [29]. Конформации трипептидного фрагмента могут иметь 12 форм основной цепи, принадлежащих двум шейпам *ee* и *ef*.

Величины относительной энергии, полученные после минимизации при варьировании восьми переменных углов Φ , ψ , χ , даны в табл. 7. Ре-

Относительная энергия конформаций фрагмента Ala⁵-Pro⁶-Glu⁷

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$ ккал/моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$ ккал/моль	Шейп	Конфор- мация	$E_{\text{общ}}$ ккал/моль
<i>ee</i>	$B^5-B^6-B_{121}^7$	5,4	<i>ef</i>	$L-B-B_{331}$	5,6	<i>ef</i>	$B-R-R_{331}$	1,9
	$B-B-B_{131}$	5,1		$L-B-R_{421}$	7,0		$B-R-R_{321}$	1,2 *
	$B-B-B_{211}$	3,7 *		$L-B-R_{211}$	6,8		$B-B-L_{311}$	4,8
	$B-B-B_{221}$	4,5		$L-B-R_{221}$	6,1		$B-B-L_{331}$	4,5
	$B-B-B_{231}$	5,1		$L-B-R_{311}$	6,0		$B-B-L_{311}$	3,6 *
	$B-B-B_{311}$	4,5		$L-B-R_{321}$	5,7		$L-R-B_{121}$	5,1
	$B-B-B_{321}$	4,2		$L-B-R_{331}$	5,8		$L-R-B_{131}$	3,3 *
	$B-B-B_{331}$	3,9		$L-R-L_{311}$	4,7		$L-R-B_{211}$	4,0
	$B-B-R_{121}$	5,5 *		$L-R-L_{331}$	5,0		$L-R-B_{221}$	4,5
	$B-B-R_{211}$	5,2		$B^5-R^6-B_{121}^7$	3,2		$L-R-B_{231}$	5,5
	$B-B-R_{221}$	4,5 *		$B-R-B_{131}$	1,5 *		$L-R-B_{311}$	2,9 *
	$B-B-R_{311}$	4,0		$B-R-B_{211}$	2,1 *		$L-R-B_{321}$	4,0
	$B-B-R_{321}$	3,9 *		$B-R-B_{221}$	2,7		$L-R-B_{331}$	4,0
	$B-B-R_{331}$	4,1		$B-R-B_{231}$	3,7		$L-R-R_{121}$	4,2
	$B-R-L_{311}$	5,1		$B-R-B_{311}$	1,1 *		$L-R-R_{211}$	5,4
	$B-R-L_{331}$	3,6 *		$B-R-B_{321}$	2,2		$L-R-R_{221}$	4,6
	$L-B-B_{121}$	7,3		$B-R-B_{331}$	2,1		$L-R-R_{311}$	1,9 *
	$L-B-B_{131}$	7,2		$B-R-B_{311}$	0,2 *		$L-R-R_{321}$	3,5
	$L-B-B_{211}$	5,2		$B-R-R_{121}$	2,0 *		$L-R-R_{331}$	3,9
	$L-B-B_{221}$	6,1		$B-R-R_{211}$	3,2		$L-B-L_{311}$	6,2
$L-B-B_{231}$	6,7	$B-R-R_{221}$	2,4 *	$L-B-L_{331}$	5,9			
$L-B-B_{311}$	6,5	$B-R-R_{311}$	0 *					
$L-B-B_{321}$	6,0	$B-R-R_{321}$	1,5					

* См. примечание к табл. 5.

зультаты убедительно показывают, что конформации с полусвернутым ходом пептидной цепи (*ef*) значительно предпочтительнее конформаций полностью развернутого шейпа *ee*. Все варианты типа *ee* имеют энергию, превышающую 3 ккал/моль. Невыгодность развернутых форм основной цепи очевидна, поскольку при последовательности Ala⁵-Pro⁶-Glu⁷ не может быть реализована предоставляемая шейпом *ee* возможность образования стабилизирующих контактов, за исключением b_6-s_7 .

В конформациях шейпа *ef* основная цепь имеет загиб (рис. 5), сближающий элемент b_7 с b_6 и b_5 , взаимодействие между которыми понижает энергию приблизительно на 1,5 ккал/моль. Кроме того, боковая цепь -Glu⁷ при $\chi^1 \sim -60^\circ$ повернута в сторону N-конца фрагмента и эффективно взаимодействует с основной и боковой цепями -Pro⁶ ($\sim -2,5$ ккал/моль). Мобильная группа -Ala⁵ приближена к элементу основной цепи b_8 и образует стабилизирующий контакт $\sim -1,0$ ккал/моль. Таким образом, в конформациях типа *ef* в отличие от *ee* во взаимодействия включены все боковые цепи и элементы основной цепи.

Представленные в табл. 7 данные получены при начальном значении угла ψ_6 у -Pro⁶ около 150° . Нами воспроизведен весь расчет и при другом крайнем для пролина значении этого угла, равном 90° . В обоих случаях результаты практически не отличаются.

Для некоторых конформаций форм $B-R-B$, $B-R-R$ и $B-B-L$ выполнен также расчет при угле ψ_7 остатка Glu⁷ около 0° . Такое значение ψ_7 обеспечивает образование внутри загиба основной цепи водородной связи типа 4→1 между N-H группой остатка Thr⁸ и C=O остатка Ala⁵. Конформа-

ции с водородной связью отмечены в табл. 7 скобкой над обозначением формы двух центральных остатков в загибе $-\text{Pro}^6 - \text{Glu}^7-$. Сопоставление величин $E_{\text{общ}}$ у соответствующих конформаций показывает, что образование водородной связи $4 \rightarrow 1$ понижает энергию приблизительно на 1,0 ккал/моль.

Из расчета фрагмента $\text{Ala}^5\text{-Pro}^6\text{-Glu}^7$ следует представляющий интерес для анализа гексапептидного участка $\text{Cys}^1\text{-Pro}^6$ вывод о том, что самым предпочтительным сочетанием конформационных состояний $\text{Ala}^5\text{-Pro}^6$ является $B^5\text{-R}^6$; за ним можно поставить $L^5\text{-R}^6$. Однако форма основной цепи $L^5\text{-R}^6$ существенно уступает $B^5\text{-R}^6$ как по энергии самых выгодных в этом ряду конформаций, так и по энтропии, т. е. вероятности образования низкоэнергетических конформаций фрагмента. Формы $B^5\text{-R}^6$ и $L^5\text{-R}^6$ оставлены нами для дальнейшего анализа.

Фрагмент $\text{Cys}^1\text{-Asn}^2\text{-Cys}^3\text{-Lys}^4$. При оценке перспективности ди- и трипептидных конформаций в расчете более сложных фрагментов следует иметь в виду, что на таких коротких участках они не являются в полной мере сопоставимыми между собой по средним взаимодействиям и, следовательно, не могут быть однозначно охарактеризованы величинами относительной энергии. Например, при развернутых формах трипептида, $B\text{-B}\text{-B}$, $B\text{-B}\text{-R}$, $L\text{-B}\text{-B}$ и др., актуальны взаимодействия между боковыми цепями остатков в положениях 1 и 3, но при этом боковая цепь центрального остатка трипептида не может образовывать контакты с другими боковыми цепями. Поэтому для выявления возможности реализации у данной последовательности развернутых форм более интересен анализ тетрапептидного фрагмента, в котором все боковые цепи имеют условия для взаимодействий (1,3 и 2,4). Такой фрагмент больше подходит и для оценки перспективности полностью свернутых форм ($R\text{-R}\text{-R}\text{-R}$, $R\text{-R}\text{-B}\text{-L}$ и др.), так как они в этом случае дают более объективное представление о возможностях данной последовательности в отношении взаимодействий между остатками. При рассмотрении коротких участков мы, как правило, включали в последующий расчет конформации, представляющие все формы и шейки основной цепи, независимо от их энергии относительно глобальной структуры. На первом этапе анализа величины относительной энергии имеют физический смысл в пределах одной формы основной цепи, в рамках которой и следует производить отбор конформаций. В большинстве случаев минимальным фрагментом, позволяющим дискредитировать некоторые формы и шейки, является тетрапептид.

Рассмотрим результаты конформационного анализа фрагментов апамина такой длины — $\text{Cys}^1\text{-Asn}^2\text{-Cys}^3\text{-Lys}^4$. Обсужденный выше трипептидный фрагмент $\text{Lys}^4\text{-Ala}^5\text{-Pro}^6$ позволил оценить взаимодействия Lys^4 с последующими остатками. Тетрапептид $\text{Cys}^1\text{-Lys}^4$ предоставляет возможность решить вопрос о взаимодействиях $-\text{Lys}^4-$ с предшествующим участком. Исходными для этого фрагмента послужили конформации всех форм трипептида $\text{Cys}^1\text{-Cys}^2$, отмеченные в табл. 5, и дипептида $\text{Cys}^3\text{-Lys}^4$ (табл. 3). Их комбинации составили 125 вариантов для минимизации энергии. Они распределены по восьми возможным для тетрапептида шейкам следующим образом: $eee - 37$, $eej - 23$, $efe - 16$, $jee - 16$, $eff - 10$, $fej - 9$, $fje - 9$ и $fff - 5$. Каждый шейп представлен несколькими формами основной цепи. Напомним, что составляющие тетрапептид фрагменты $\text{Cys}^1\text{-Cys}^3$ и $\text{Cys}^3\text{-Lys}^4$ в изолированном состоянии имеют очень большую конформационную свободу (табл. 3 и 5).

Минимизация энергии тетрапептида $\text{Cys}^1\text{-Lys}^4$ показала, что при стыковке наилучших структурных вариантов этих весьма лабильных фрагментов обнаруживается заметная энергетическая дифференциация конформаций. В интервал 0—3 ккал/моль из 125 конформаций попадает лишь 14, а в интервал 0—5 ккал/моль — 29. В табл. 8 представлены конформации $\text{Cys}^1\text{-Lys}^4$, энергия которых не превышает 6,0 ккал/моль; общий разброс величин $E_{\text{общ}}$ составил 0—12 ккал/моль.

Относительная энергия конформаций фрагмента Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$ ккал/моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$ ккал/моль		
eee	$B_2^1-B_{13}^2-B_2^3-B_{1211}^4$	4,2 *	eef	$B_2^1-B_{13}^2-R_2^3-B_{3222}^4$	5,3		
	$B_2-B_{13}-B_2-B_{1223}$	3,5 *		$B_2-B_{13}-R_2-B_{3322}$	5,3		
	$B_2-B_{13}-B_2-B_{3222}$	3,8 *		$B_2-B_{13}-R_2-R_{3322}$	6,0		
	$B_2-B_{13}-B_2-B_{3322}$	4,9		$B_2-B_{23}-R_2-B_{3222}$	5,3		
	$B_2-B_{13}-B_2-R_{3222}$	3,7 *		$B_2-B_{23}-R_2-B_{3322}$	5,6		
	$B_2-B_{13}-B_2-R_{3322}$	3,2		$B_2-B_{23}-R_2-R_{3322}$	5,6		
	$B_2-B_{23}-B_2-B_{3222}$	5,3		fee	$R_2-B_{13}-B_2-B_{1211}$	5,4	
	$B_2-B_{23}-B_2-R_{3222}$	6,0			$R_2-B_{13}-B_2-B_{1223}$	3,9 *	
	$B_2-B_{33}-B_2-B_{3222}$	5,9			$R_2-B_{13}-B_2-B_{3222}$	4,0 *	
	$B_2-B_{33}-B_2-R_{3222}$	5,5			$R_2-B_{13}-B_2-R_{3322}$	5,5 *	
	$B_2-B_{33}-B_2-R_{3322}$	5,7			$R_2-R_{13}-L_2-B_{3222}$	3,6 *	
	$L_2-B_{13}-R_2-B_{1211}$	5,0 *			$B_2-L_{33}-B_2-B_{1211}$	6,0	
	$L_2-B_{13}-B_2-R_{3222}$	5,1		fef	$R_2-B_{23}-R_2-L_{3233}$	5,5	
	$B_2-R_{13}-L_2-B_{3222}$	5,2 *			$R_2-B_{13}-R_2-B_{3222}$	0,2	
	$B_2-R_{13}-L_2-R_{3222}$	5,1 *			$R_2-B_{13}-R_2-B_{3322}$	0,2 *	
	$B_2-R_{13}-L_2-B_{3322}$	5,7			$R_2-B_{13}-R_2-R_{3322}$	0,8 *	
	$R_2-L_{33}-B_2-B_{1211}$	4,6 *			$R_2-B_{23}-R_2-B_{2222}$	1,5 *	
	$R_2-L_{33}-B_2-B_{1223}$	5,2			ffe	$R_3-R_{13}-B_3-B_{1211}$	2,0 *
	$R_2-L_{33}-B_2-R_{3222}$	5,6				$R_3-R_{13}-B_3-B_{1223}$	3,0 *
$B_2-R_{13}-B_2-B_{1223}$	5,2 *	$R_3-R_{13}-B_3-B_{3222}$	1,3 *				
$B_2-R_{13}-B_2-B_{3222}$	5,4	$R_3-R_{13}-B_3-R_{3322}$	0,5				
$B_2-R_{13}-B_2-B_{3322}$	4,9 *	fff	$R_3-R_{13}-B_3-R_{3222}$		2,1		
$B_2-R_{13}-B_2-R_{3222}$	4,4 *		$R_3-R_{13}-B_3-R_{3322}$	0,3 *			
$B_2-R_{13}-B_2-R_{3322}$	5,9		$R_3-R_{13}-B_3-B_{2222}$	1,0 *			
$L_2-R_{13}-B_2-B_{1211}$	4,5 *		$R_3-R_{13}-R_3-L_{3233}$	1,5 *			
$L_2-R_{13}-B_2-B_{1223}$	5,5 *		$R_3-R_{13}-R_3-B_{3222}$	1,2 *			
$L_2-R_{13}-B_2-B_{3222}$	5,9		$R_3-R_{13}-R_3-B_{3322}$	1,5 *			
$B_2-R_{13}-R_2-L_{3233}$	4,4 *		$R_3-R_{13}-R_3-B_{3222}$	0			
$L_2-R_{23}-R_2-L_{3233}$	5,2		$R_3-R_{13}-R_3-R_{3322}$	0,6 *			
				$R_3-R_{13}-R_3-R_{2222}$	0,5 *		
efe	$B_2-R_{13}-B_2-B_{1223}$		5,2 *				
	$B_2-R_{13}-B_2-B_{3222}$	5,4					
	$B_2-R_{13}-B_2-B_{3322}$	4,9 *					
	$B_2-R_{13}-B_2-R_{3222}$	4,4 *					
	$B_2-R_{13}-B_2-R_{3322}$	5,9					
	$L_2-R_{13}-B_2-B_{1211}$	4,5 *					
	$L_2-R_{13}-B_2-B_{1223}$	5,5 *					
	$L_2-R_{13}-B_2-B_{3222}$	5,9					
	$B_2-R_{13}-R_2-L_{3233}$	4,4 *					
	$L_2-R_{23}-R_2-L_{3233}$	5,2					

* См. примечание к табл. 5.

В табл. 8 не пошла ни одна конформация шейпа *eff*. Наибольшее число низкоэнергетических структур имеют шейпы *fef*, *ffe* и *fff* (рис. 6). Их предпочтительность обусловлена дисперсионными взаимодействиями всех элементов основной цепи друг с другом и взаимодействиями расположенных по разные стороны фрагмента боковых цепей остатков Lys⁴ (при $\chi^1 \sim -60^\circ$) и Asn² (при $\chi^1 \sim 60^\circ$) со свернутым пептидным скелетом. Для последовательности Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴ конформации шейпов *fef*, *ffe* и *fff* оказываются наиболее компактными. Однако эффект взаимодействия остатка Lys⁴ с основной цепью этих конформаций ослаблен вследствие дестабилизирующего контакта между положительно заряженными группами $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ его боковой цепи и N-концевого остатка Cys¹.

Нами рассмотрены также три конформации шейпов *fef*, *ffe* и *fff*, в которых боковая цепь -Lys⁴- ориентирована от фрагмента ($\chi^1, \chi^2, \chi^3, \chi^4 \sim 180^\circ$). Расчет показал (табл. 8), что при этом не наблюдается значительного повышения энергии, поскольку ослабление стабилизирующих контактов боковой цепи лицина компенсируется уменьшением электростатического отталкивания между $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ -группами. Таким образом, можно заключить, что

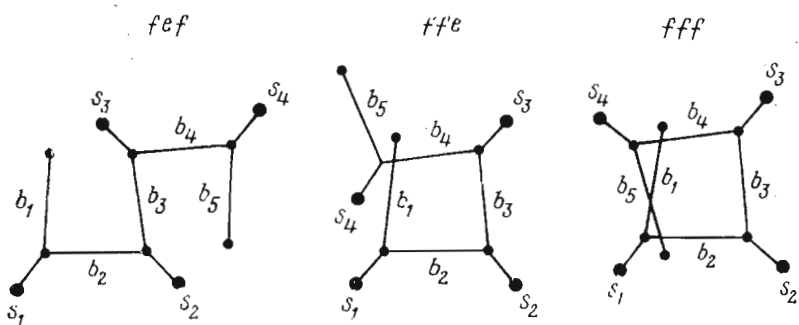


Рис. 6. Шейны основной цепи фрагмента апамина Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴

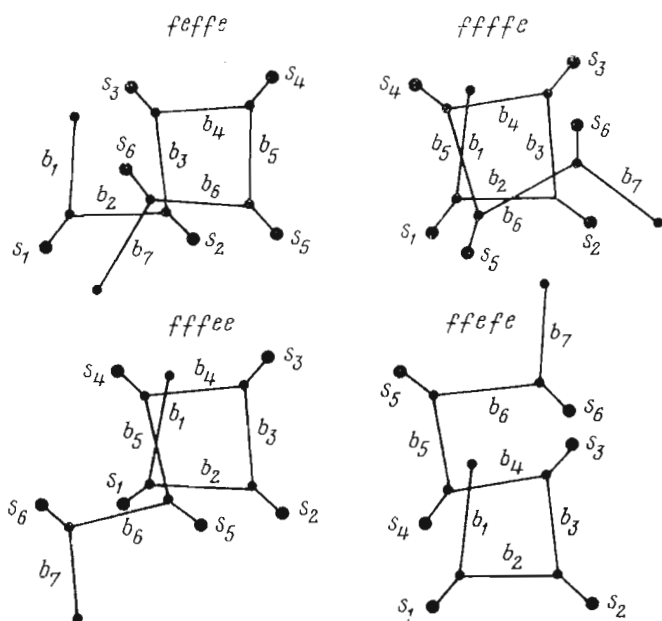


Рис. 7. Шейны основной цепи фрагмента апамина Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶

боковая цепь -Lys⁴- слабо взаимодействует с предшествующими тремя остатками.

Для последующего анализа нами отобраны низкоэнергетические представители всех форм и шейпов, за исключением *eef* и *eff*, высокая энергия которых уже не может быть значительно понижена при удлинении цепи.

Фрагмент Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶. В расчете гексапептидного участка апамина приняты во внимание отмеченные в табл. 8 и 6 конформационные состояния фрагментов Cys¹-Lys⁴ и Lys⁴-Pro⁶, которые являются низкоэнергетическими представителями практически всех форм и шейпов этих фрагментов. Поэтому их комбинации позволяют рассмотреть широкий спектр конформационных возможностей гексапептида.

Из общих соображений можно полагать, что особая роль в формировании структуры Cys¹-Pro⁶ должна принадлежать боковой цепи остатка Lys⁴, занимающего центральное положение. Правда, анализ перекрывающихся по этому остатку фрагментов Cys¹-Lys⁴ и Lys⁴-Pro⁶ не обнаружил у него большой склонности к образованию эффективных стабилизирующих контактов как с предшествующими, так и с последующими остатками. Ситуация, однако, может измениться при объединении этих участков.

Относительная энергия конформаций фрагмента Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/моль	Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/моль	
ееее	$B_2^1-B_{13}^2-B_2^3-B_{1211}^4-B^5-R^6$	3,1 *	ејеје	$B_2^1-R_{13}^2-B_2^3-R_{2222}^4-B^5-R^6$	5,1	
	$B_2-B_{13}-B_2-B_{1223}-B-R$	4,0		$B_2-R_{13}-B_2-R_{3222}-B-R$	3,9 *	
	$B_2-B_{13}-B_2-R_{2222}-B-R$	3,6		$R_2-B_{13}-B_2-R_{2222}-B-R$	4,8	
	$B_2-B_{13}-B_2-B_{3222}-B-R$	4,5		$R_2-B_{13}-B_2-R_{3222}-B-R$	6,7	
	$L_2-B_{13}-B_2-B_{1211}-B-R$	6,0		$R_2-B_{13}-R_2-B_{2222}-B-R$	2,3 *	
	$B_2-R_{13}-L_2-B_{3222}-B-R$	4,3		$R_2-B_{13}-R_2-B_{3222}-B-R$	3,4	
	$R_2-L_{33}-B_2-B_{1211}-B-R$	7,7		$R_3-R_{13}-B_3-B_{1211}-B-R$	4,9	
	$R_2-L_{33}-B_2-B_{2222}-B-R$	7,1		$R_3-R_{13}-B_3-B_{1223}-B-R$	4,2	
	еееје	$B_2-B_{13}-B_2-R_{2222}-B-R$		6,5	$R_3-R_{13}-B_3-B_{2222}-B-R$	4,0 *
		$B_2-B_{13}-B_2-R_{3222}-B-R$		2,5 *	$R_3-R_{13}-B_3-B_{3222}-B-R$	5,3
$B_2-R_{13}-L_2-R_{3222}-B-R$		4,2	$R_3-R_{13}-R_3-L_{3233}-B-R$	8,0		
$R_2-L_{33}-B_2-R_{2222}-B-R$		8,1	$R_3-R_{13}-B_3-R_{2222}-B-R$	6,7		
ејеее		$B_2-R_{13}-B_2-B_{1223}-B-R$	6,0	$R_3-R_{13}-B_3-R_{3222}-B-R$	2,8 *	
	$B_2-R_{13}-B_2-B_{2222}-B-R$	4,3	$R_2-B_{13}-R_2-R_{2222}-B-R$	0 *		
	$B_2-R_{13}-B_2-B_{3222}-B-R$	6,8	$R_2-B_{13}-R_2-R_{3222}-B-R$	0,6		
	$L_2-R_{13}-B_2-B_{1211}-B-R$	6,4	$R_3-R_{13}-R_3-B_{2222}-B-R$	2,0 *		
	$B_2-R_{13}-R_2-L_{3233}-B-R$	6,2	$R_3-R_{13}-R_3-B_{3222}-B-R$	5,7		
јееее	$R_2-B_{13}-B_2-B_{1223}-B-R$	3,5 *	$R_3-R_{13}-R_3-B_{3222}-B-R$	6,0		
	$R_2-B_{13}-B_2-B_{2222}-B-R$	4,4	$R_3-R_{15}-R_3-R_{2222}-B-R$	0,6 *		
	$R_2-B_{13}-B_2-B_{3222}-B-R$	4,8	$R_3-R_{13}-R_3-R_{3222}-B-R$	3,9		
	$R_2-R_{13}-L_2-B_{3222}-B-R$	6,5				

* Звездочкой отмечены конформации, включенные в последний расчет апамина.

Исходными для гексапептида оказались 90 структурных вариантов. Они имели 39 различных форм основной цепи и принадлежали к 12 шейпам. Минимизация энергии по 21 переменному углу Φ , ψ , χ (рис. 2) показала, что все конформации с *L*-состоянием остатка Ala⁵ менее предпочтительны, чем соответствующие конформации того же шейпа с *B*-состоянием остатка.

Как видно из табл. 9, в которой представлены низкоэнергетические варианты различных форм 12 шейпов, наименьшую энергию имеют конформации гексапептида со свернутыми формами у фрагмента Cys¹-Lys⁴ шейпов *fej*, *ffe* и *fff*, которые были наиболее предпочтительными и у свободного тетрапептида. Конформационная энергия участка апамина Cys¹-Pro⁶ в грубом приближении представляет собой аддитивную сумму величин энергии составляющих его фрагментов Cys¹-Lys⁴ и Lys⁴-Pro⁶.

Рассмотрим наиболее предпочтительные конформации гексапептида. На рис. 7 показан ход пептидной цепи этих конформаций, по которому можно судить о сближенности тех или иных структурных элементов. В табл. 10 даны суммарные значения их энергетических составляющих, характеризующие взаимодействия основных и боковых цепей в пределах одного остатка (энергия монопептидных взаимодействий) и между остатками, находящимися в положениях 1-2, 2-3, ..., 5-6 (ди-), 1-3, 2-4, ..., ..., 4-6 (три-) и т. д.

Данные табл. 10 показывают, что во всех случаях, кроме одного, имеется дестабилизация конформаций на тетрапептидном участке Cys¹-Lys⁴, вызванная электростатическим отталкиванием концевых групп NH_3^+ элементов b_1 и s_4 . В глобальной конформации *feffe* положительная энергия этого взаимодействия минимальна (2,0 ккал/моль) из-за удаленности b_1 и s_4 (рис. 7); кроме того, оно здесь скомпенсировано стабилизирующим

Энергетические составляющие предпочтительных конформаций фрагмента
Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶

Шейп	Конформация	$E_{\text{общ}}$, ккал/моль	Энергия взаимодействия, ккал/моль				
			моно-	ди-	три-	тетра-	пента-
<i>jeffe</i>	$R_2^1-B_{13}^2-R_3^3-R_{2222}^4-B^5-R^6$	0	-7,6	-6,8	-0,9	-0,5	-2,6
<i>jejee</i>	$R_2-B_{13}-R_2-B_{2222}-B-R$	2,3	-8,2	-8,1	-1,2	+1,1	-0,5
<i>jjeje</i>	$R_3-R_{13}-B_3-R_{3322}-B-R$	2,8	-6,9	-7,0	-3,4	+2,7	-1,6
<i>jjeee</i>	$R_3-R_{13}-B_3-B_{2222}-B-R$	4,0	-7,6	-7,6	-2,3	+3,5	-0,7
<i>ffffe</i>	$R_3-R_{13}-R_3-R_{2222}-B-R$	0,6	-7,9	-7,4	-3,0	+1,3	-2,0
<i>fffje</i>	$R_3-R_{13}-R_3-B_{2222}-B-R$	2,0	-7,8	-8,8	-2,0	+2,9	-0,8
<i>eeeee</i>	$B_2-B_{13}-B_2-B_{2222}-B-R$	3,6	-9,7	-7,7	+0,1	+2,2	0

взаимодействием сближенных друг с другом боковой цепи Asn² и элемента b_6 (-2,3 ккал/моль). Существенные вклады в стабилизацию этой конформации вносят пентапептидные взаимодействия между s_2 и s_6 (-1,3 ккал/моль) и b_1 и b_6 (-1,0 ккал/моль). Такой же эффект они оказывают в конформации типа *fffje*. Однако последняя уступает глобальной конформации в отношении дестабилизирующего контакта между b_1 и s_4 (3,4 ккал/моль) и энергии торсионных взаимодействий, которая не входит в энергетические составляющие. Форма R основной цепи -Lys⁴ более предпочтительна, чем B . При переходе от R^i к B^i сохраняется электростатическое отталкивание b_1-s_4 , но значительно ослабевают стабилизирующие пентапептидные взаимодействия между остатками Cys¹, Ala⁵ и Asn², Pro⁶, а также тетрапептидные между -Asn², -Ala⁵ и -Cys³, -Pro⁶; некоторое улучшение контактов на более коротких участках полностью не компенсирует рост конформационной энергии.

Для сравнения в табл. 10 включены данные о конформации с полностью развернутой формой основной цепи шейпа *eeeee*. То обстоятельство, что ее энергия определяется только моно- и дипептидными взаимодействиями (а также положительным вкладом b_1-s_4) и лишь на 3,6 ккал/моль превышает энергию глобальной конформации, указывает на сравнительно малую эффективность взаимодействий между остатками в гексапептиде.

В связи с тем что наиболее низкоэнергетические конформации содержат свернутые участки основной цепи, нами была детально исследована возможность образования водородных связей типа 4-1. Такие связи могут возникать между группами C=O и NH первого и четвертого остатков при $R-R$ -, $R-B$ - и $B-L$ -формах основной цепи у промежуточных звеньев (в нашем случае только при $R-R$ - и $R-B$ -формах). Исходные варианты были составлены на основе дипептидных конформаций, которые включали водородные связи 4-1. Автоматически минимизация энергии не приводит к их образованию, поскольку им отвечают на потенциальной поверхности особые минимумы, отделенные барьерами от минимумов соответствующих оптимальных конформаций без водородных связей [30].

В табл. 11 для наиболее предпочтительных конформаций каждой формы приведены величины энергии (относительно структуры с $E_{\text{общ}}=0$; табл. 9, 10) и ее составляющие. Во всех случаях, за одним исключением, водородные связи типа 4-1 повышают, и иногда весьма существенно, конформационную энергию. Уменьшение расстояния между образующими водородную связь группами приводит к ослаблению выгодных контактов на тетра- и пентапептидных участках (ср. табл. 10 и 11). Лишь в глобальной конформации образование водородной связи между C=O остатка Asn² и NH остатка Ala⁵ сопровождается резким понижением энергии. Это связано с реализацией состояния, соответствующего глобальному минимуму, и,

Энергетические составляющие конформаций с водородными связями фрагмента Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶

Шейп	Конформация	$E_{\text{о-ш}}$, ккал/моль	Энергия взаимодействия, ккал/моль					
			моно-	ди-	три-	тетра-	пента-	гекса-
<i>ffe</i>	$R_2^1-B_{23}^2-R_3^3-R_{222}^4-B-R$	-4,2*	-6,5	-8,5	-2,7	-1,8	-3,1	-1,8
<i>ffeee</i>	$R_3-R_{23}-B_3-B_{222}-B-R$	5,5	-7,4	-6,4	-1,5	+2,1	-0,3	+0,5
<i>fffee</i>	$R_3-R_{13}-R_3-B_{1211}-B-R$	6,0	-4,7	-9,1	-1,5	+1,9	-0,8	+0,8
<i>llife</i>	$R_3-R_{15}-R_3-R_{3322}-B-R$	4,8	-7,3	-8,2	-2,6	+2,7	-1,0	+0,7

* Звездочкой отмечена конформация с водородной связью, включенная в последний расчет амина.

как следствие, с проявлением в расчетной модели целого ряда дополнительных взаимодействий между различными участками гексапептида, стабилизирующий эффект которых (-3,1 ккал/моль) значительно превышает энергию самой водородной связи (-1,1 ккал/моль). Возникновение дополнительных многоточечных контактов свидетельствует о наличии в структуре с $E_{\text{общ}}$, равной нулю, комплементарности конформационных состояний соответствующих остатков, т. е. об их предрасположенности к взаимодействиям друг с другом и согласованности с водородной связью между элементами b_3 и b_5 . На это указывает также то обстоятельство, что появление на всех участках модели гексапептида дополнительных стабилизирующих взаимодействий, приводящих к более компактной конформации фрагмента, не ведет к заметному ослаблению монопептидных взаимодействий. Понижение энергии на дипептидных участках приблизительно на 2,0 ккал/моль вызвано образованием как указанной водородной связи 4-1, так и водородной связи между группой C=O боковой цепи остатка Asn² (при $\chi^1, \chi^2 \sim 180, -90^\circ$) и NH элемента b_4 . На трипептидных участках возникают отсутствовавшие ранее дисперсионные взаимодействия между боковыми цепями -Asn²- и -Lys⁴-, а также между элементом основной цепи b_4 и боковой цепью -Pro⁶- (-1,8 ккал/моль). Энергия тетрапептидных взаимодействий понижается на 1,0 ккал/моль за счет ослабления электростатического отталкивания между b_1 и s_4 , что вызвано увеличением расстояния между группами NH₃⁺. Наконец, на пента- и гексапептидных участках вследствие большей близости N- и C-концов фрагмента образуются водородные связи между группами NH элемента b_1 и C=O элементов b_6 и b_7 , общая энергия которых составляет около -2,5 ккал/моль.

Конформацию $R_2^1-B_{23}^2-R_3^3-R_{222}^4-B^5-R^6$ характеризуют следующие энергетические параметры (для сравнения в скобках приведены такие же параметры структуры с $E_{\text{общ}}=0$): суммарная энергия взаимодействий между звеньями основной цепи на ди-, три- и т. д. пептидных участках $E_{b_m-b_n}$ составляет -10,1 (-3,2 ккал/моль), энергия взаимодействий типа $E_{b_m-s_n} = -6,1$ (-4,9 ккал/моль) и $E_{s_m-s_n} = -1,7$ (-1,9 ккал/моль). Таким образом, наибольшая стабильность этой конформации обусловлена прежде всего эффективностью взаимодействий внутри пептидного скелета и затем взаимодействиями его элементов с боковыми цепями. Незначительность у рассматриваемой последовательности взаимодействий типа s_m-s_n неудивительна, так как из шести ее остатков три (Cys¹, Cys³ и Ala⁵) имеют очень малые боковые цепи, а у четвертого (Pro⁶) она жестко связана с основной цепью. Приведенные параметры показывают, что в структуре

$R_2^1-B_3^2-R_3^3-R_{222}^4-B^5-R^6$ основная цепь представляет собой компактно уложенный и стабилизированный межпептидными взаимодействиями каркас, а боковые цепи обладают довольно большой конформационной свободой. Для $-Lys^4$ -наиболее предпочтительно положение боковой цепи при $\chi^1, \chi^2 \sim 180^\circ$; что же касается углов χ^3, χ^4 , то все сочетания их возможных значений ($60, 180, -60^\circ$) практически равновероятны. Близки по энергии конформационные состояния боковой цепи остатка Asn^2 при $\chi^1, \chi^2 \sim 60, -90^\circ$ и $180, -90^\circ$. Изоэнергетичны по углу χ три конформера обоих цистеинов, боковые цепи которых экспонированы наружу. Следовательно, форма основной цепи $R^1-B^2-R^3-R^4-B^5-R^6$ представлена не единственной конформацией, а набором самых предпочтительных для фрагмента Cys^1-Pro^6 конформаций, различающихся ориентациями боковых цепей.

Итак, рассмотрение конформационных возможностей участка апамина $Cys^1-Asn^2-Cys^3-Lys^4-Ala^5-Pro^6$ привело к заключению, что самой выгодной для него в отношении как энтальпии, так и свободной энергии является одна форма основной цепи с водородной связью 4—1 шейца *feffe*. Хотя преимущество конформаций с такой формой очевидно, тем не менее, имея в виду поставленные выше цели данного исследования, для последующего анализа мы отобрали также варианты, представляющие многие другие формы и шейки, величины энергии которых попадают в интервал 0—8 ккал/моль. В табл. 9 они отмечены звездочками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E. (1972) *Science*, **177**, 314—322.
2. Shpolini R., Bradbury A. F., Callewaert G. L., Vernon C. A. (1967) *Chem. Commun.*, **14**, 679—680.
3. Попов Е. М. (1975) *Молекулярн. биология*, **9**, 578—593.
4. Попов Е. М. (1978) Материалы международной конференции по квантовой химии, биологии и фармакологии, Киев.
5. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Ахмедов Н. А. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1268—1290.
6. Ахмедов Н. А., Мельников П. Н., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 746—761.
7. Мельников П. Н., Ахмедов Н. А., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 28—42.
8. Архипова С. Ф., Севастьянова Н. Н., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 335—347.
9. Севастьянова Н. Н., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 473—484.
10. Севастьянова Н. Н., Попов Е. М. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 997—1016.
11. Севастьянова Н. Н., Попов Е. М. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 11—23.
12. Anfinsen C. V. (1973) *Science*, **181**, 223—230.
13. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **229**, 1—17.
14. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) *J. Chem. Phys.*, **45**, 2091—2101.
15. Poland D., Scheraga H. A. (1967) *Biochemistry*, **6**, 3791—3800.
16. Жоров Б. С., Попов Е. М., Говырин В. А. (1975) *Молекулярн. биология*, **9**, 710—715.
17. Жоров Б. С., Попов Е. М., Говырин В. А. (1975) *Молекулярн. биология*, **9**, 415—425.
18. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) *Ж. структурн. химии*, **11**, 121—126.
19. Schellmann I. A. (1955) *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, ser. chim.*, **29**, 223—228.
20. Klotz T. M., Fransen I. S. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 3461—3464.
21. Scheraga H. A. (1968) *Adv. Phys. Org. Chem.*, **6**, 103—184.
22. Pauling L. (1960) *The Nature of the Chemical Bond*. 3rd ed., Cornell Univ. Press, N. Y.
23. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 622—630.
24. Ponnuswamy P. K., McGuire R. F., Scheraga H. A. (1973) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **5**, 73—80.
25. Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Popov E. M. (1973) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **5**, 381—397.
26. Schimmel P. R., Flory P. J. (1968) *J. Mol. Biol.*, **34**, 105—120.
27. Damiani A., Santis P. E., Pizzi A. (1970) *Nature*, **226**, 542—543.
28. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1971) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 312—319.

29. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Будковская В. Н., Попов Е. М. (1974) Молекулярн. биология, 8, 902-912.
30. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) Молекулярн. биология, 4, 509-516.

Поступила в редакцию
27.XI.1978

**A PRIORI CALCULATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF APAMIN.
I. FRAGMENT Cys¹-Pro⁶**

ПОПОВ Е. М., МЕЛ'НИКОВ Р. Н.

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

The conformational possibilities of the apamin N-terminal fragment Cys¹-Asn²-Cys³-Lys⁴-Ala⁵-Pro⁶ (Cys¹-Pro⁶) were described. A multistage analysis involved preliminary calculations for the overlapping di-, tri-, and tetrapeptide portions of the Cys¹-Pro⁶ hexapeptide. Low-energy mono-peptide conformations were used for computing the dipeptide structures. Analysis of the Cys¹-Pro⁶ fragment produced several stable structures which are promising for studies of longer apamin fragments.
