



УДК 547.96.02+547.993

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА АПАМИНА В РАСТВОРЕ.  
АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ЛАЗЕРНОГО КОМБИНАЦИОННОГО  
РАССЕЯНИЯ

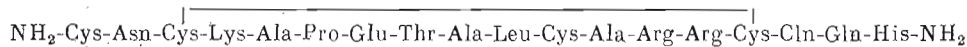
Нурхаметов А. Х\*., Елякова Е. Г., Ефремов Е. С.,  
Миросишников А. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Спектры комбинационного рассеяния апамина, 18-членного пептида из яда пчелы, свидетельствуют о высокой стабильности его конформации в растворе и в твердом состоянии. Показано, что в структуре апамина могут присутствовать участки  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -изгиба и нерегулярной формы. Из анализа колебаний  $\nu(\text{C}-\text{S})$  и  $\nu(\text{S}-\text{S})$  определена конфигурация дисульфидных связей. Показано, что оба дисульфидных моста имеют *gag*-конфигурацию относительно связей  $\text{S}-\text{S}$  и  $\text{C}-\text{S}$ . Связи  $\text{C}^\alpha-\text{N}$  и  $\text{C}^\beta-\text{S}$  принимают *trans*-расположение относительно связи  $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$ .

Недавно было показано, что октадекапептид из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* специфично блокирует передачу нервного возбуждения в гладких мышцах, вызванную либо электростимуляцией, либо действием экзогенного АТФ. Предполагается, что этот нейротоксин действует на хемовозбудимые  $\text{K}^+$ -каналы [1-3]. Уникальное действие апамина, по-видимому, объясняется особенностями структуры, необходимым элементом которой является наличие двух гуанидиногрупп остатков аргинина в бициклической системе молекулы, скрепленной двумя дисульфидными связями. Чрезвычайно высокая конформационная стабильность апамина была показана изучением его спектров кругового дихроизма в растворах различной полярности, при различных значениях рН и в присутствии денатурирующих агентов [4]. Различные варианты пространственной структуры молекулы апамина были предложены на основе анализа спектров ЯМР [5-7], теоретического конформационного анализа [8] и полуэмпирических расчетов по Чоу и Фасману [9, 10].

Целью настоящей работы было исследование Раман-спектров апамина в области амидных колебаний и колебаний дисульфидных связей, позволивших сделать вывод о наличии в структуре нейротоксина регулярных участков и определить конфигурацию дисульфидных связей, образованных остатками цистеина в 1 и 11, 3 и 15-м положениях полипептидной цепи:



\* Постоянный адрес: Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, Купавна, Московской области.

Колебания «амид I» и «амид III» в полипептидах и белках

Тип структуры	Амид I, см <sup>-1</sup>	Амид III, см <sup>-1</sup>
$\alpha$ -Спираль	1645–1655 [16, 42–46] 1632 в <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O [11, 47]	1265–1300 [16, 42–46, 48]
Неупорядоченная форма	1660–1670 [42–46] 1655–1661 в <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O [11, 47, 49]	1240–1253 [16, 42–46, 48]
$\beta$ -Форма	1660–1680 [11, 16, 42–46, 48] 1658–1661 в <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O [11, 35, 36]	1230–1240 [16, 42, 45, 46] 980–986 в <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O [11, 47, 50]

Как известно, колебания «амид I» и «амид III» в КР-спектрах \* полипептидов и белков проявляются в виде характерных полос, положение максимума и интенсивность которых позволяют судить о наличии таких элементов вторичной структуры, как  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -форма или неупорядоченное состояние. Соответствующие наиболее часто используемые корреляции приведены в табл. 1. Конформационно-чувствительными являются также колебания связей C—C(N) в области 800–1200 см<sup>-1</sup> [11].

Анализ спектров КР апамина в растворе при различных pH и в твердом состоянии (рис. 1, 2) прежде всего подтверждает сделанный ранее вывод о высокой конформационной стабильности его структуры [4] и сохранении ее неизменной в растворе и в твердом состоянии.

Полоса «амид I» в апаминах (1657 см<sup>-1</sup>) несколько асимметрична и сохраняет свое положение в H<sub>2</sub>O при всех значениях pH и в твердом состоянии, смещаясь к 1648 см<sup>-1</sup> при дейтерозамещении (рис. 3). Это положение полосы «амид I» соответствует  $\alpha$ -спиральной и (или) неупорядоченной форме в белках (табл. 1).

В области колебаний «амид III» (1230–1300 см<sup>-1</sup>) наблюдается ряд полос, из которых полосы при 1247 и 1275 см<sup>-1</sup> можно отнести к колебаниям «амид III» на основании смещения этих полос при дейтерозамещении в низкочастотную область [12]. Формальное сопоставление этих частот с данными, приведенными в табл. 1, также говорит в пользу структуры типа  $\alpha$ -спирали и неупорядоченной формы.

Однако в последнее время получен ряд новых расчетных и экспериментальных данных, на основании которых высокочастотные полосы «амид III» могут быть отнесены к участкам  $\beta$ -изгибов. Так, в теоретической работе Кримма и Бандекара [13] показано, что для различных типов  $\beta$ -изгибов значения частот «амид I» и «амид III» находятся в интервалах 1650–1685 и 1270–1310 см<sup>-1</sup>, причем высокочастотные колебания «амид I» и низкочастотные «амид III» отвечают  $\beta$ -изгибам с ослабленной водородной связью. В согласии с экспериментом для инсулина были рассчитаны частоты  $\beta$ -изгибов с «нормальной» водородной связью (1652 и 1289 см<sup>-1</sup>) и без водородной связи (1680 и 1300 см<sup>-1</sup>) [13]. Недавно в соединениях, моделирующих  $\beta$ -изгиб, наблюдали расщепление полосы «амид I» на высокочастотный компонент (1680 см<sup>-1</sup> в [14] и 1695 см<sup>-1</sup> в [15]), относящийся к свободным амидным группам, и сдвинутый на 25–30 см<sup>-1</sup> низкочастотный компонент, возникающий от карбонильных групп, участвующих в водородной связи; при этом полоса «амид III» имела частоту  $\sim$ 1300 см<sup>-1</sup> [14]. В окситоцине [16], а также в ряду пептидных гормонов типа окситоцина и вазопрессина [17, 18] наличие полос «амид III» в диапазоне 1260–1276 см<sup>-1</sup> было объяснено присутствием в этих структурах  $\beta$ -изгибов со слабой водородной связью. Можно полагать, что и в случае апамина высокочастотный компонент «амид III» может быть обусловлен участком (участками)  $\beta$ -изгиба. Учи-

\* КР-спектры – спектры комбинационного рассеяния.

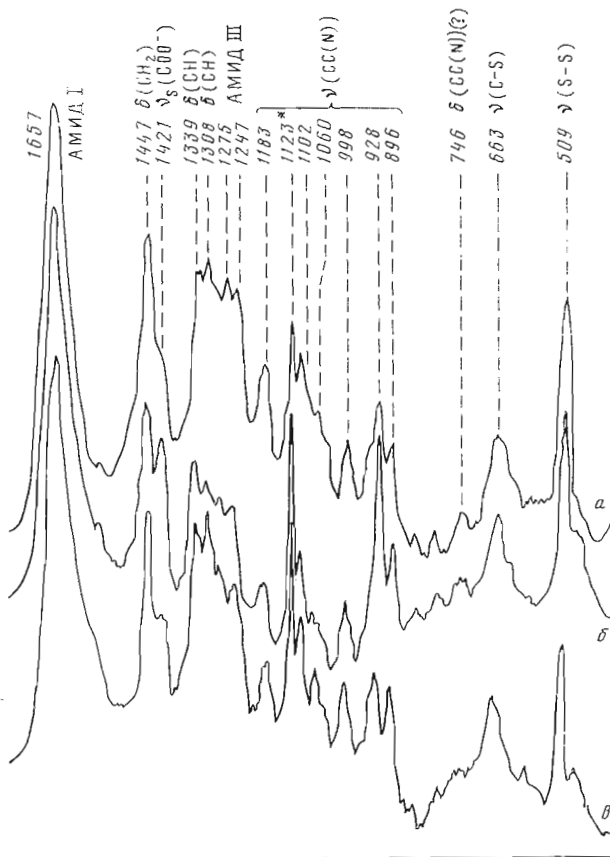


Рис. 1. Спектры КР апамина в  $H_2O$ , с 40 мг/мл, длина волны возбуждения (EL) 514,5 нм, число сканирований (NS) 10, чувствительность (SN)  $2 \cdot 10^{-9}$ , ширина щели (SL) 750 мкм, скорость сканирования (SD)  $40 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ . а — рН 2,6; напряжение на ФЭУ (PM) 1040 В, постоянная времени (TC) 0,3 с, мощность лазерной линии (PO) 250 мВт; б — рН 5,9, PM 1080 В, PO 300 мВт, TC 0,3 с; в — рН 11,2, PM 1080 В, PO 300 мВт, TC 0,5 с. \* — плазменная линия;  $\nu_s$  — частота валентного симметричного колебания,  $\delta$  — частота деформационного колебания

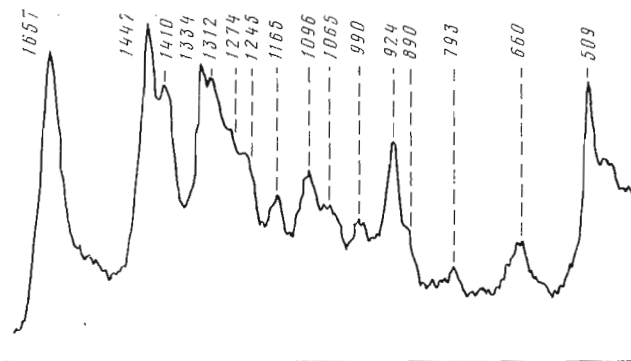


Рис. 2. Спектры КР апамина в твердом состоянии. EL 488,0 нм, SD  $40 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ , NS 10, PM 1100 В, PO 125 мВт, SL 750 мкм, SN  $2 \cdot 10^{-9}$ , TC 0,3 с

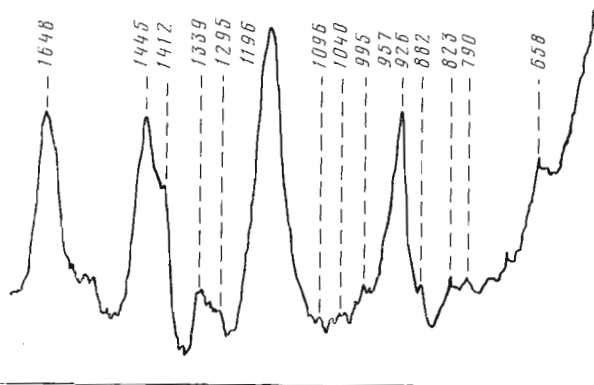


Рис. 3. Спектры КР апамина в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . EL 514,5 нм, с 40 мг/мл, SD 40  $\text{cm}^{-1}$ /мин, NS 10, PM 1120 В, PO 250 мВт, SL 800 мкм, SN  $2 \cdot 10^{-9}$ , TC 0,5 с

тывая, что в полосе «амид I» нет явного вклада в высокочастотной области, а колебание «амид III» имеет сравнительно невысокое значение частоты для  $\beta$ -изгиба, можно утверждать, что предполагаемый  $\beta$ -изгиб (изгибы) обладает водородной связью умеренной силы.

Таким образом, из анализа амидных колебаний не удастся сделать однозначный вывод о структуре молекулы апамина: наряду с нерегулярной формой возможны не только  $\alpha$ -спиральные участки, но и  $\beta$ -изгибы либо их совместное присутствие.

На основании спектров КД также пока затруднительно оценивать вклад  $\beta$ -изгибов в общую структуру пептидов и белков, хотя в последнее время и предлагаются некоторые подходы к таким оценкам [19, 20].

Форма кривой КД апамина (рис. 4) весьма напоминает классическую кривую для правой  $\alpha$ -спирали, однако имеет несколько заниженную эллиптичность полос при 208 и 220 нм. Она похожа также на кривые КД, характерные для  $\beta$ -изгибов так называемого типа «граммицидина» S [21], чрезвычайно редко встречающегося в пептидах и белках и потому представляющегося маловероятным в апаине. Другие типы  $\beta$ -изгибов имеют кривые КД с положительным вкладом в области 200–220 нм [19–21]. Вклад неупорядоченной формы в этой спектральной области невелик. С учетом этих фактов наиболее приемлемой представляется интерпретация спектра КД апамина как суперпозиция вкладов  $\alpha$ -спирального участка и  $\beta$ -изгибов «обычного» типа.

По данным теоретического конформационного анализа [8], в оптимальной конформации апамина  $\alpha$ -спираль отсутствует, а  $\beta$ -изгибы находятся в участках 2–5 и 12–14. В работе Хайдера [9] по методу Чоу и Фасмана были рассчитаны наиболее вероятные участки  $\alpha$ -спирали (остатки 9–18) и  $\beta$ -изгибов (1–4 и 5–8). Иное расположение  $\alpha$ -спирального фрагмента и участков  $\beta$ -изгиба предложено на основании детального анализа спектров ЯМР [7]. В моделях Хайдера [9] и Быстрова [7] предполагается наличие участков  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -изгиба, что качественно согласуется с полученными нами данными по анализу его вторичной структуры.

Интересной особенностью спектров КР апамина при разных pH является изменение интенсивности полосы колебания карбоксильной группы остатка  $\text{Glu}^7$  (рис. 1). Известно, что колебания  $\nu(\text{COOH})$  наблюдаются при  $1710 \text{ cm}^{-1}$ , а  $\nu(\text{COO}^-)$  — при  $1420 \text{ cm}^{-1}$  [11, 12, 22, 23]. Если при переходе от нейтральных pH в кислую область закономерно исчезновение полосы  $\nu(\text{COO}^-)$ , то неожиданным оказывается сильное уменьшение интенсивности этой полосы при щелочном pH. Для проверки характера pH-зависимых изменений в интенсивности этой полосы были исследованы спектры КР модельной системы — водного раствора ацетата аммония

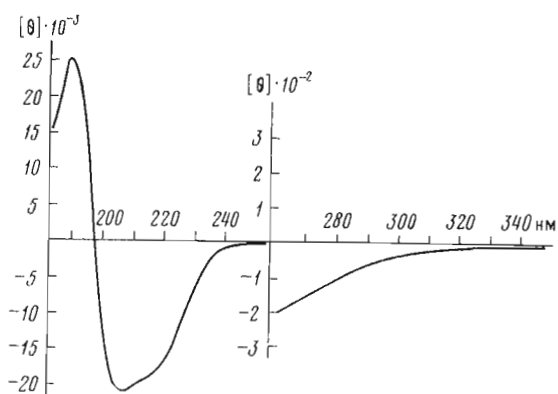


Рис. 4. Спектр КД амина в воде, с  $10^{-4}$  М

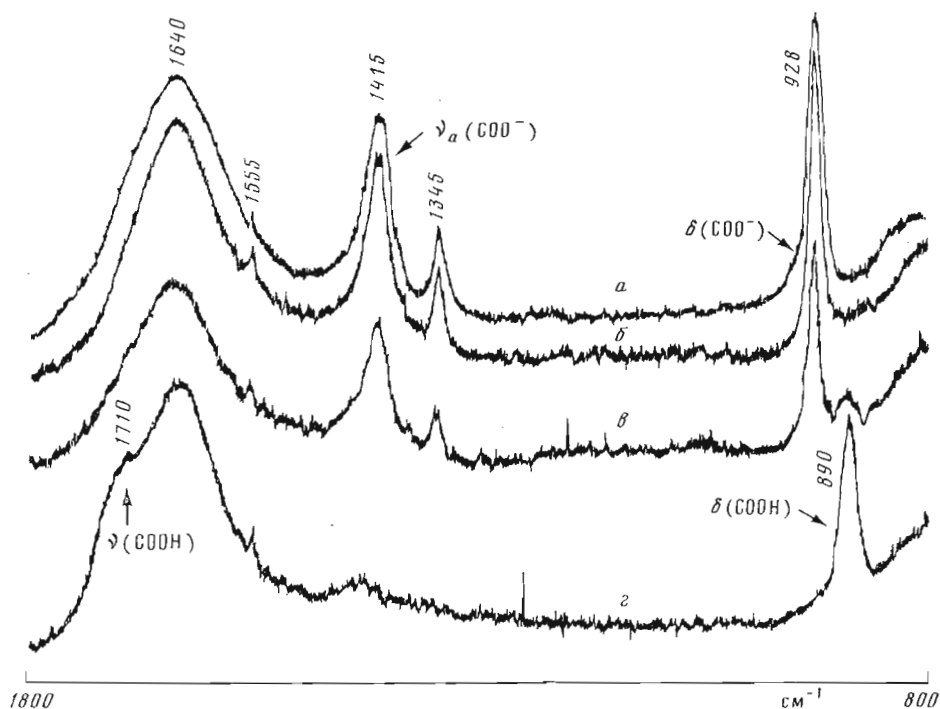


Рис. 5. Спектры КР ацетата аммония в  $H_2O$  (с  $10^{-2}$  М) при pH 4,39 (а), 5,30 (б), 7,38 (в), 12,3 (г).  $\nu_a$  — частота валентного антисимметричного колебания

(рис. 5). Как видно из рис. 5, полосы  $\nu(COOH)$  и  $\nu(COO^-)$  меняются в соответствии с ионным состоянием карбоксильной группы и при щелочном pH интенсивность  $\nu(COO^-)$  примерно такая же, как при нейтральном pH. Отличный от модельной системы характер изменения  $\nu(COO^-)$  в аминах позволяет предположить существование зависящего от pH взаимодействия карбоксильной группы с какой-то другой группой молекулы. Вероятнее всего, это аминокетильная группа  $Lys^1$  (или  $Lys^4$ ), которая должна иметь рК в щелочной области pH. Действительно, по данным ЯМР [5, 6], группа  $COO^-$  остатка  $Glu^7$  сближена с  $\alpha$ -аминогруппой молекулы токсина, имеющей  $pK_0 \sim 6,7$ . По-видимому, ослабление полосы  $1420 \text{ см}^{-1}$  можно объяснить изменением электростатического взаимодействия групп  $COO^-$  и  $NH_3^+$  при депротонировании последней, приводящего к уменьшению поляризуемости связи  $C=O$  карбоксильной группы.

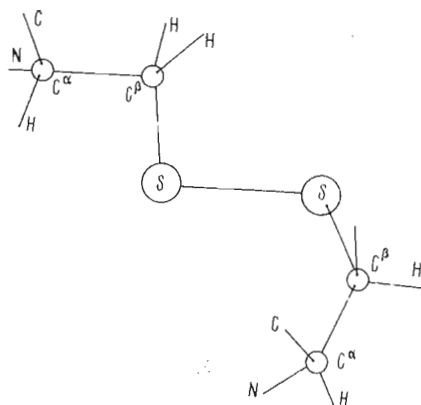


Рис. 6. Транс-гош-гош-конфигурация дисульфидной связи

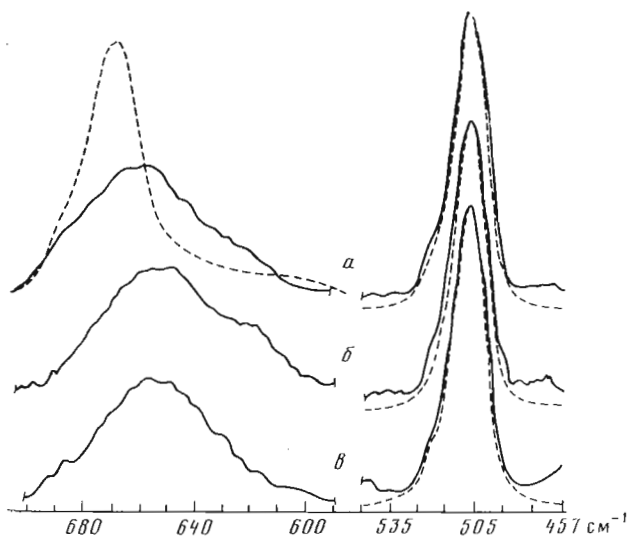


Рис. 7. Спектры КР в области валентных C-S- и S-S-колебаний дисульфидной связи апамина (NS 30) при pH 2,6 (а), 5,9 (б), 11,2 (в). Пунктиром обозначен спектр цистина в 0,2 н. HCl

Важно отметить, что в спектрах ацетата аммония параллельно с изменениями полос валентных колебаний карбоксильной группы наблюдаются отчетливые изменения в интенсивностях полос при  $890$  и  $928$   $\text{см}^{-1}$ . Обычно в спектрах белков или пептидов полосы, появляющиеся в этой области, относят к нехарактеристическим скелетным колебаниям  $\nu\text{C}-\text{C}(\text{N})$ . В частности, появление полосы при  $\sim 930$   $\text{см}^{-1}$  связывают с наличием  $\alpha$ -спиральной структуры [11]. В модельной системе такое отнесение исключено, и на основании синхронных изменений полос  $890$  и  $928$   $\text{см}^{-1}$  с полосами  $\nu(\text{COOH})$  и  $\nu(\text{COO}^-)$  мы относим их к деформационным колебаниям  $\delta(\text{COOH})$  и  $\delta(\text{COO}^-)$  соответственно. Вероятно, и в апаине полоса  $928$   $\text{см}^{-1}$  происходит от  $\delta(\text{COO}^-)$ , и ее pH-зависимые изменения в интенсивности легко объясняются по аналогии с  $\nu(\text{COO}^-)$ , но не разрушением  $\alpha$ -спиральной структуры при крайних pH (сохранение структуры апамина при этих pH было показано по спектрам КД [4]). Менее отчетливы изменения в интенсивности более слабой полосы  $\sim 896$   $\text{см}^{-1}$ .

Область валентных колебаний S-S- и C-S-связей изучена нами более подробно. Анализ спектров КР в этой области позволяет получить весьма ценную и недоступную для других методов информацию о конфигурации

Корреляция между  $\nu(S-S)$  и двугранными углами относительно связей C-S и S-S и эллиптичности полос КД с углами  $\chi(CS-SC)$ 

Данные КР-спектров				Данные КД				
$\nu(S-S)$ , см <sup>-1</sup>	$\chi(CS-SC)$ , град	$\chi(SS-CC)$		$\chi(CS-SC)$ , град	$\lambda_1$ , нм	$[\theta]_1$ , град·см <sup>2</sup> / моль [30-34]	$\lambda_2$ , нм	$[\theta]_2$ , град·см <sup>2</sup> / моль [30-34]
		град [24-27]	конформа- ция [28, 29]					
485	0			0	370	0	280	0
495	30			30	330	3300	262	-5000
509	60			60	280-294	11500	238-244	-6700 ÷ -18800
510±5	90	{ 50-180 50-180 0-50 50-180	{ <i>гош</i> <i>гош</i> <i>гош</i> <i>транс</i>	90	250	0		
525±5	90	{ 0-50 50-180	{ <i>гош</i> <i>транс</i>					
540±5	90	{ 0-50 0-50	{ <i>транс</i> <i>транс</i>					

дисульфидных связей [11, 24]. Конфигурация дисульфидной связи может быть определена на основе корреляционной зависимости между частотой валентного колебания дисульфидной связи S-S и двугранными углами относительно S-S- и C-S-связей, которая была получена на основе детального изучения спектров КР большого числа модельных соединений, а также данных рентгеноструктурного анализа и теоретических расчетов [24-29].

В ряде экспериментальных и теоретических работ установлена также связь между значениями двугранного угла CS-SC и эллиптичностью длинноволновой и коротковолновой полос дисульфидов [30-34]. В табл. 2 приведены эти корреляционные зависимости на основе КР- и КД-спектров. Приводимые в таблице значения двугранных углов отсчитываются от затененной *цис*-конфигурации (на рис. 6 показана *транс-гош-гош*-конфигурация дисульфидного мостика).

На рис. 7 представлены спектры апамина в области  $\nu(S-S)$  и  $\nu(C-S)$  при трех различных pH. Для сравнения пунктирной линией обозначен спектр цистина, снятый в 0,2 н. HCl. В молекуле апамина две S-S-связи, причем одна из них принадлежит N-концевому остатку цистеина. Можно ожидать поэтому влияния состояния ионизации N-концевой аминогруппы на конфигурацию этого дисульфидного мостика. Легко видеть, что при всех значениях pH положение полосы  $\nu(S-S)$  около 509 см<sup>-1</sup> и ее полуширина ( $\Delta\nu_{1/2}=15$  см<sup>-1</sup>) практически совпадают с теми же параметрами модельного соединения. На этом основании можно утверждать, что оба дисульфидных мостика имеют одинаковую конфигурацию относительно S-S-связи, не меняющуюся при изменении заряда N-концевой аминогруппы.

В соответствии с данными табл. 2 наблюдаемой в спектре апамина частоте  $\nu(S-S)$  около 509 см<sup>-1</sup> отвечают углы 60 и 90° (*гош*-конфигурация) относительно связи S-S и *гош*-конфигурация относительно связи C-S (по данным других авторов [24-27] возможен интервал значений 50°-180°). Свободный цистин в 0,2 н. HCl имеет также *гош*-конфигурации относительно связей S-S и C-S [28, 29]. Кроме того, при изучении ряда модельных дисульфидов было показано, что при *транс*-расположении C<sup>α</sup>-H- и C<sup>β</sup>-S-связей относительно связи C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> частоты  $\nu(C-S)$  составляют 640-670 см<sup>-1</sup>, а в *гош*-конфигурации 710-740 см<sup>-1</sup> [28, 29]. В спектре цистина имеется сравнительно узкая полоса  $\nu(C-S)$  около 670 см<sup>-1</sup>, что соответствует *транс*-конфигурации. В апаине  $\nu(C-S)$  равно 660 см<sup>-1</sup> как в растворе, так и в твердом состоянии, что также отвечает *транс*-конфигурации C<sup>α</sup>-H и C<sup>β</sup>-S. Однако, как можно видеть из рис. 6, эта полоса зна-



чительно уширена и несимметрична по форме, что может быть объяснено небольшим вкладом от других *транс*-конфигураций дисульфидных мостиков. Вероятно, изменение относительных вкладов этих конфигураций в зависимости от рН вызвало и небольшой сдвиг по частоте  $\nu(\text{C-S})$  при переходе от рН 2,6 к рН 11,2. Отношение интенсивностей  $\nu(\text{C-S})$  и  $\nu(\text{S-S})$  примерно одинаково в  $\text{H}_2\text{O}$  при всех рН и в твердом состоянии и составляет  $\sim 0,4$ . Хотя было показано, что не существует определенной закономерности, связывающей отношение этих интенсивностей с конфигурацией дисульфидной связи [35–38], тем не менее неизменность отношения может быть индикатором сохранения структуры дисульфидных мостиков [39, 40]. Таким образом, эти дополнительные данные свидетельствуют о сохранении *гош-гош-гош*-конфигурации дисульфидных связей в апаине при разных рН и в твердом состоянии.

Конформации с углами  $60^\circ$  и  $90^\circ$  должны отчетливо различаться и по спектрам КД (табл. 2). При этом хироптические эффекты, возникающие от двух дисульфидных связей в положениях 1–11 и 3–15, можно рассматривать независимо [41]. Конформация с  $\chi(\text{CS-SC})$ , равным  $60^\circ$ , обнаружила бы себя сильным положительным эффектом Коттона в районе 240–330 нм, в то время как для конформации с  $90^\circ$  эллиптичность этих полос должна быть близка к 0, что и реализуется в случае апаина (см. рис. 4).

Таким образом, в структуре апаина могут сосуществовать участки  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -изгиба (изгибов). Его конформационное состояние остается неизменным как в растворе в широком диапазоне рН, так и в твердом состоянии. Обе дисульфидные связи имеют *гош*-конфигурацию относительно S–S-связи ( $\chi(\text{CS-SC}) 90^\circ$ ) и *гош*-конфигурацию относительно C–S-связи (возможен интервал значений  $\chi(\text{CC-SS}) 50^\circ\text{--}180^\circ$ ).  $\text{C}^\alpha\text{-H}$ - и  $\text{C}^\beta\text{-S}$ -связи принимают *транс*-расположение относительно связи  $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$ .

### Экспериментальная часть

Апаин, лиофилизированный из аммоний-ацетатного буфера, был растворен в дистиллированной воде, подкисленной HCl до рН 2,6, и вновь лиофилизирован для исключения из спектров КР полос, связанных с аммоний-ацетатными группами. Концентрация растворов составляла 40 мг/мл. Подкисление и подщелачивание растворов проводили 1 н. HCl и 1 н. NaOH.

Спектры КР были получены на Раман-спектрометре фирмы «Ramanor HG-2S» (Jobin Yvon, Франция) с двойным монохроматором на вогнутых голографических решетках и с охлаждаемым фотоумножителем типа RCA-c31034. Для возбуждения использовались линии 488,0 и 514,5 нм Ar<sup>+</sup>-лазера «Spectra-Physics 164-03». Для ослабления плазменных линий, лежащих вблизи от возбуждающей линии, на пути луча ставили соответствующие интерференционные фильтры. Накопление спектров в аналоговом режиме и их обработку проводили с помощью компьютера «Nicolet-1180». Спектры в  $\text{H}_2\text{O}$  при различных рН получены за вычетом вклада  $\text{H}_2\text{O}$  и капилляра. Съемку спектров растворов и твердых образцов проводили в кварцевых капиллярах с внутренним диаметром 1 мм. Условия, в которых были получены спектры, даны в подписях под рисунками.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за внимание к работе и ценные критические замечания.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Байдан Л. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. (1978) Докл. АН СССР, **241**, 1224–1227.
2. Владимирова И. А., Шуба М. Ф. (1978) Нейрофизиология, **10**, 295–299.
3. Banks V. E. C., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. M., Jenkinson D. H. (1979) Nature, **282**, 415–417.
4. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. (1978) Биоорг. химия, **4**, 1022–1028.
5. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. (1978) J. Magn. Res., **30**, 151–184.



6. Оханов В. В., Афанасьев В. А., Гуревич А. З., Елякова Е. Г., Мирошников А. И., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 840–864.
7. Bystrov V. F. (1980) Abstracts of the 5th international symposium on solute-solvent interactions, p. X, 6, Florence, Italy.
8. Мельников П. Н., Попов Е. М. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 21–30.
9. Hider R. C., Ragnarsson V. (1980) *FEBS Lett.*, **111**, 189–193.
10. Busetta B. (1980) *FEBS Lett.*, **112**, 138–142.
11. Gaber G. B., Spiro S. L. (1976) *Annual Rev. Biochem.*, **46**, 553–573.
12. Кёвиг Д. Л. (1975) *Усп. химии*, **14**, 1475–1516.
13. Vandekar I., Krimm S. (1980) *Biopolymers*, **19**, 1–36.
14. Deslauries R., Leach S., Maxfield F. R., Minasian E., McQuie J. R., Meinwald Y. C., Nemethy G., Pottle M. S., Rae I. D., Scheraga H. A., Stimson E. R., Van Nispen J. W. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2512–2514.
15. Kawai M. C., Fasman G. D. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 3631–3632.
16. Tu A. T., Bjarnason J. B., Hruby V. J. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **533**, 530–536.
17. Hruby V. J., Deb K. K., Fox J., Bjarnason J. B., Tu A. T. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 6060–6067.
18. Tu A. T., Lee J., Deb K. K., Hruby V. J. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3272–3278.
19. Brahm S., Brahm J. (1980) *J. Mol. Biol.*, **138**, 149–178.
20. Chang C. T., Wu C. S., Young J. T. (1978) *Anal. Biochem.*, **91**, 13–31.
21. Bush C. A., Sarkar S. K., Kopple K. D. (1978) *Biochemistry*, **17**, 4951–4954.
22. Turano T., Hartman K., Thomas G. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 1157–1163.
23. Беллами Л. (1963) *Инфракрасные спектры молекул*, с. 231–252, Изд-во иностран. лит., М.
24. Maxfield P. M., Scheraga H. A. (1977) *Biochemistry*, **16**, 4443–4451.
25. Van Wart H. E., Scheraga H. A. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 1812–1823.
26. Van Wart H. E., Scheraga H. A. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 1823–1831.
27. Van Wart H. E., Scheraga H. A., Cardinaux M. C. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 625–631.
28. Sugeta H., Go A., Miyazawa T. (1972) *Chem. Lett. (Japan)*, 83–86.
29. Sugeta H., Go A., Miyazawa T. (1973) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 3407–3411.
30. Neubert L. A., Carmack M. D. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 943–949.
31. Carmack M. D., Neubert L. A. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 7134–7142.
32. Donzel B. J., Kamber B. C., Wütrich K. L., Schwyzer R. N. (1972) *Helv. chim. acta*, **55**, 947–954.
33. Mez H. C. (1974) *Cryst. Struct. Commun.*, **3**, 657–659.
34. Ludescher V. S., Schwyzer R. N. (1971) *Helv. chim. acta*, **54**, 1637–1646.
35. Yu N.-T., Lord R. C. (1970) *J. Mol. Biol.*, **50**, 521–529.
36. Yu N.-T., Jo T. N. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **156**, 472–479.
37. Bastian E. R., Martin B. C. (1973) *J. Phys. Chem.*, **77**, 1131–1139.
38. Van Wart H. E., Lewis E. D., Scheraga H. A., Saeva G. S. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2619–2631.
39. Yu N.-T., Liu M. N., O'Shea R. S. (1972) *J. Mol. Biol.*, **70**, 117–124.
40. Yu N.-T., Liu M. N. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **160**, 616–621.
41. Snatzke G. (1979) *Angew. Chem.*, **18**, 363–377.
42. Tsuboi M. (1976) *Proceedings of the 5th international conference on Raman spectroscopy*, p. 135–143, Freiburg, Abstr.
43. Chen C. H., Lord R. C. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 4750–4759.
44. Frushour L. S., Koenig L. D. (1975) *Advances IR and Raman Spectroscopy*, vol. 1, London.
45. Thomas G. J. (1976) *The Spex Speaker*, **21**, 1–8.
46. Tu A. T. (1977) *The Spex Speaker*, **22**, 1–10.
47. Yu N.-T., Lippert S. L., Peticolas V. N. (1973) *Biopolymers*, **12**, 2161–2176.
48. Yu N.-T., East E. J. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 2196–2202.
49. Frushour L. S., Koenig L. D. (1974) *Biopolymers*, **13**, 1809–1821.
50. Yu N. T., Lin T. S., Tu A. T. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 1782–1785.

Поступила в редакцию  
6.VI.1980

#### SPATIAL STRUCTURE OF APAMIN IN SOLUTION. LASER RAMAN SPECTRA ANALYSIS

NURKHAMETOV A. H., ELYAKOVA E. G., EFREMOV E. S.,  
MIROSHNIKOV A. I.

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

The Raman spectra of apamin, an 18-membered peptide from bee venom, testify to a high stability of its structure both in solution and in solid state. It is shown that the  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -turn and unordered structures are likely to be present in apamin. Analysis of  $\nu(\text{C}-\text{S})$  and  $\nu(\text{S}-\text{S})$  vibrations enabled the determination of the configuration of disulfide bonds. Both disulfide bridges are *gauche* about the S—S and C—S bonds, and  $\text{C}^\alpha-\text{H}$  and  $\text{C}^\beta-\text{S}$  linkages are *trans* in respect to the  $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$  bond.