Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

УДК 577.352.2; 577.352.3
№ госрегистрации
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
д-р геол.-минерал.наук, профессор
_____ Д.К.Нургалиев
«___»_____ _____ г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы

по теме:

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ АВ-ПЕПТИДОВ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН В УСЛОВИЯХ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ. КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ЯМР

Шифр заявки «2010-1.1-142-043-024»

(промежуточный, этап № 1)

Наименование этапа: «Одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа и активного фрагмента $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22)»

Руководитель проекта: _____ (д.х.н., профессор, А.В.Аганов)

подпись, дата

Казань 2010

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель, д.х.н., профессор	подпись, дата	Аганов А.В. (раздел(ы) 1, 2, 3, 4)
Исполнители		
В.н.с., д.х.н., профессор	подпись, дата	Клочков В.В. (раздел(ы) 1, 2, 3, 4)
Г.н.с., д.ф-м.н., профессор	подпись, дата	Скирда В.Д. (раздел(ы) 1, 4)
С.н.с., д.ф.-м.н.	подпись, дата	Филиппов А.В. (раздел(ы) 2, 3)
Инженер, к.ф.-м.н.	подпись, дата	Клочков А.В. (раздел(ы) 1, 3)
Инженер, к.ф.-м.н.	подпись, дата	Юльметов А.Р. (раздел(ы) 1, 4)
Инженер, к.ф.-м.н.	подпись, дата	Хайрутдинов Б.И. (раздел(ы) 1, 2)
Н.с., к.ф.-м.н.	подпись, дата	Васильев Г.И. (раздел(ы) 1, 2)
М.н.с., к.ф.-м.н	подпись, дата	Рудакова М.А.. (раздел(ы) 2, 3)
Аспирант	подпись, дата	Сулейманова А.В.. (раздел(ы) 2,3)
Аспирант	подпись, дата	Мунавиров Б.В. (раздел(ы) 2, 3)
Аспирант	подпись, дата	Ефимов С.В. (раздел(ы) 1, 2)
Аспирант	подпись, дата	Усачев К.С. (раздел(ы) 1,4)
Студент	подпись, дата	Блохин Д.С. (раздел(ы) 1,2)

Студент _____ Николаева Т.Н.

подпись, дата (раздел(ы) 1,4)

Нормоконтролер _____ Рыбасова В.И.

подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчёт - 39 страниц, 28 рисунков, 10 таблиц, библиография - 28 источников

ОЛИГОПЕПТИДЫ, Aβ - ПЕПТИДЫ, ЯМР, СПЕКТРОСКОПИЯ, ДВУМЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ, COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY МОДИФИКАЦИИ, CP/MAS ЯМР ^{13}C СПЕКТРОСКОПИЯ

На данном этапе целью выполнения Проекта было проведение исследований “Одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа и активного фрагмента $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22)” и получение следующих результатов: регистрация одномерных (^1H и ^{13}C) спектров ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа, его фрагмента $A\beta_{(10-35)}$ и активного фрагмента $A\beta_{(16-22)}$ пептида $A\beta_{(1-40)}$ в растворах и CP/MAS ЯМР ^{13}C спектров исследуемых пептидов в твердой фазе; запись двумерных спектров ЯМР (COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY модификации) исследуемых пептидов в растворах.

В качестве объектов исследования использованы пептиды: синтетический $A\beta_{(1-40)}$ пептид нативного типа (H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH), его фрагмент $A\beta_{(10-35)}$ (H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH) и активный фрагмент $A\beta_{(16-22)}$ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2) пептида $A\beta_{(1-40)}$.

В результате исследований подобраны соответствующие экспериментальные условия, включающие в себя выбор удобных для эксперимента растворителей и подбор соответствующих временных характеристик проведения двумерных экспериментов; проведена регистрация одномерных (^1H и ^{13}C) и двумерных спектров ЯМР (COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY модификации) исследуемых пептидов.

Областью применения полученных результатов может быть фундаментальная наука (биофизика, биохимия, физиология клетки), фармакология, медицина. Продолжение исследований в рамках Проекта даст возможность установить трехмерную структуру данного ряда пептидов в растворах и в модельных биомембранах, выяснить роль таких мембран при образовании промежуточных структур агрегации, механизм изменения свойств мембраны (проницаемости) при взаимодействии с пептидами.

Содержание

Введение 7

1. Регистрация одномерных (^{1}H и ^{13}C) спектров ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа, его вариаций при изменении одной из аминокислот в первичной структуре, активного фрагмента $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22) и его вариации в растворе. 16

2. Запись двумерных спектров ЯМР (COSY, HSQC модификации) исследуемых пептидов в растворе. 19

3. Регистрация двумерных спектров ЯМР (TOCSY, HSQC-TOCSY) исследуемых пептидов в растворе. 28

4. Запись одномерных CP/MAS ЯМР ^{13}C спектров исследуемых пептидов в твердой фазе. 33

Заключение 36

Список использованных источников 37

Обозначения и сокращения

ЯМР	ядерный магнитный резонанс
COSY	*Correlation spectroscopy* – двумерная корреляционная спектроскопия
TOCSY	*Total correlation spectroscopy* – полная корреляционная двумерная спектроскопия
HSQC	*Heteronuclear single-quantum correlation* – двумерная гетероядерная корреляционная спектроскопия
HMBC	*Heteronuclear multiple-quantum correlation* - двумерная много-квантовая гетероядерная корреляционная спектроскопия
HMQC	*Heteronuclear multiple-bond correlation* - двумерная полная много-квантовая гетероядерная корреляционная спектроскопия
CP/MAS NMR ^{13}C	*Cross polarisation magic angle spinning NMR ^{13}C* – ЯМР метод кросс-поляризации и вращение под магическим углом на ядрах ^{13}C
NOESY	*Nuclear Overhauser effect spectroscopy* –спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера
ХС	химический сдвиг
ТМС	тетраметилсилан, его сигналы в спектрах ЯМР ^{1}H и ^{13}C приняты за 0 м.д.
м.д.	миллионная доля – единица измерения химических сдвигов в спектрах ЯМР ^{1}H и ^{13}C
ТФЭ	трифторэтанол

Введение

Агрегация амилоидных пептидов сопровождает развитие таких нейродегенеративных заболеваний как: болезни Альцгеймера, Хантингтона, и другие [1]. Результат агрегации наблюдается в форме амилоидных фибрилл, в которых молекулы протеина в конформации β-складки уложены поперек направления оси фибриллы, а также нефибриллярных агрегатов. Цитотоксичность проявляют не сами фибриллы, а некоторые олигомерные продукты [2]. В настоящее время исследованы процессы фибриллярной агрегации в протеинах, связанных с развитием болезни Альцгеймера [3, 4]. Начальные стадии агрегации пептидов исследованы мало, в частности Аβ-пептиды и лизоцим в растворе были исследованы методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля [5-8]. Открытым остается вопрос образуются ли олигомерные агрегаты при агрегации амилоидного Аβ-пептида. Единственная работа, в которой сообщалось о непосредственном наблюдении таких агрегатов была опубликована в 2005 году [5]. Несмотря на важность данного вопроса ни опровержения, ни подтверждения существования олигомерных агрегатов в данной системе за последние 4 года не сообщалось.

Хорошо известно, что биологическая активность протеинов или белков связана с их пространственным строением, что, несомненно, делает актуальным данное исследование. Изучение конформаций олигопептидов, содержащих в цепи два и более аминокислотных остатков, также важно, поскольку их можно рассматривать в качестве структурных блоков протеинов и знание их строения может быть использовано для предсказания конфигурации цепей полипептидов в биомембране [9,10]. Строение относительно небольших органических молекул в растворах, как правило, определяется по данным одномерной ЯМР спектроскопии, двумерных методик (NOESY, корреляционных методик COSY, HSQC) [11,12], динамического ЯМР [13-15]. Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (2D NOESY) позволяет также определять расстояния между магнитными ядрами до 5 Å, и тем самым устанавливать пространственную структуру растворённых соединений [11,12].

Одной из составляющих данного Проекта является установление пространственной структуры, а именно определение конформаций и геометрических параметров (координат атомов) ряда пептидов: синтетический $A\beta_{(1-40)}$ пептид нативного типа (Рисунок 1), его вариации при изменении одной из аминокислот в первичной структуре $A\beta_{(10-35)}$ и активный фрагмент $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22) в растворе и твердой фазе. В качестве методов исследования нами использованы ЯМР ^{1}H, ^{13}C спектроскопия, двумерная спектроскопия ЯМР (COSY, HSQC и NOESY модификации), ^{13}C CP/MAS ЯМР и HR-MAS спектроскопия и теоретическое моделирование молекулярных структур с использованием программного обеспечения MOPAC 7.0 (PM 3).

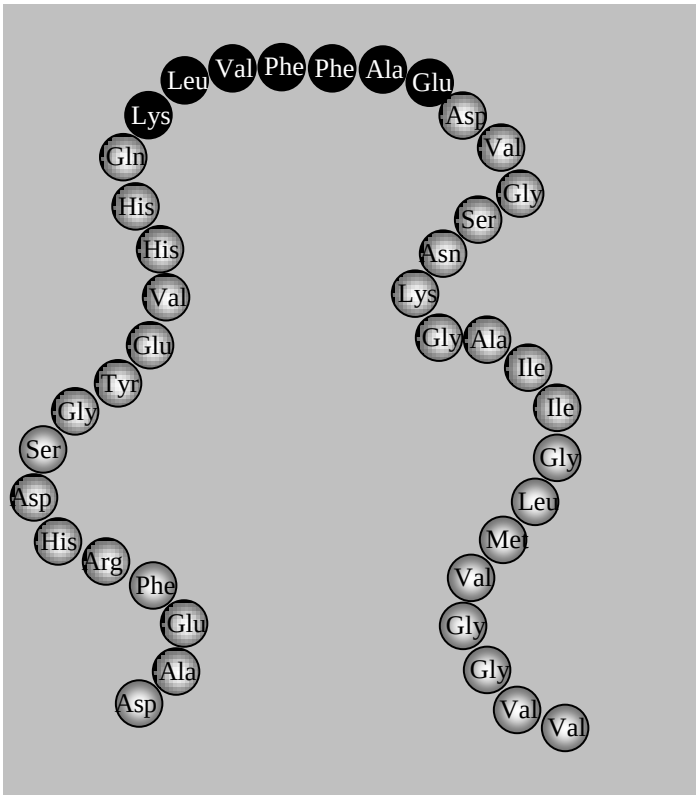

Рисунок 1 - Схематическое изображение бета-амилоида $A\beta_{1-40}$ (H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH). Черным цветом выделен участок $A\beta_{16-22}$, который, как предполагается, отвечает за агрегацию между амилоидами

На первом этапе выполнения Проекта “Пространственное строение Ab-пептидов и фундаментальные свойства липидных мембран в условиях их взаимодействия. Комплексное исследование методами ЯМР” планировалось проведение исследований по теме: “Одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа и активного фрагмента $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22)” и получение следующих результатов:

- Регистрация одномерных (^{1}H и ^{13}C) спектров ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа, его фрагмента $A\beta_{(10-35)}$ и активного фрагмента $A\beta_{(16-22)}$ пептида $A\beta_{(1-40)}$ в растворах и CP/MAS ЯМР ^{13}C спектров исследуемых пептидов в твердой фазе.
- Запись двумерных спектров ЯМР (COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY модификации) исследуемых пептидов в растворах.

Объекты исследования

Методом ЯМР спектроскопии исследованы, следующие пептиды: синтетический $A\beta_{(1-40)}$ пептид нативного типа (H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH), его фрагмент $A\beta_{(10-35)}$ (H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-

Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH) и активный фрагмент $A\beta_{(16-22)}$ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2) пептида $A\beta_{(1-40)}$ в растворах и в твердой фазе.

Подготовка образцов и условия проведения ЯМР исследований пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$

Пептиды $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ были синтезированы по стандартному методу твердофазного синтеза FMOC [16-18] с помощью автоматического синтезатора пептидов ABI 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) на кафедре прикладной химии Технического Университета Лулео (Швеция) [18]. Отделение пептидов от подложки и защитных групп производилось в кислой среде на основе трифторуксусой кислоты. Очистка пептидов производилась методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии на приборе Series 200 Perkin Elmer HPLC System (Waltham, MA, USA) в градиенте вода - ацетонитрил. Качество конечного продукта характеризовали методом MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization) масс-спектрометрии в университете Карлсруэ (Karlsruhe Institute of Technology, Germany).

Регистрация ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+HCL+D_2O), фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) и трифторэтанола (CF_3CD_2OD) проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации поля по линии резонанса дейтерия (^2H). При записи протонных спектров в изотропном растворителе (D_2O) использовались 90^0 импульсы и поднасыщение сигнала воды, либо 30^0 импульсы без поднасыщения растворителя. Задержки между импульсами составляли 2 сек., число накоплений – от 4 до 100, ширина спектра – 11 м.д., число точек – 26832. При записи спектров ЯМР ^{13}C использовались 30^0 импульсы и развязка от протонов (WALTZ–16). Межимпульсные задержки равнялись 2 сек., число накоплений – 19485, ширина спектра – 236,6 м. д., число точек – 65536. При обработке спектра применялась цифровая экспоненциальная фильтрация с константой 3 Гц. Одномерные спектры регистрировались при стабилизированной температуре 20^0 С или 25^0 С. Точность определения химических сдвигов ЯМР ^1H и ^{13}C была не хуже 0.01 м.д.

Спектры ЯМР ^{13}C CP/MAS (125.69 МГц) пептидов в твердом состоянии (порошок) снимали при комнатной температуре на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker» с использованием датчика фирмы "Doty Scietific". Регистрация спектров

проводилась при различных скоростях вращения. Число накоплений – от 200. В качестве внешнего стандарта использовался ЯМР сигнал адамантана.

Концентрации пептидов в растворах была не менее 10 % по массе. Концентрация боратного буфера: $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ составляла 5.82% по массе и 0.1 М соляной кислоты в воде (отношение H_2O к D_2O - 10/1); фосфатного буфера: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 28,16% по массе, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 26.71% по массе, H_2O – 44.13% по массе, D_2O –1% по массе [19-24].

Двумерные эксперименты ЯМР (^1H-^1H, ^1H-^{13}C) по записи соответствующих двумерных спектров пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+HCL+D_2O), фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) и трифторэтанола (CF_3CD_2OD) также были проведены на ЯМР спектрометре AVANCE-500 фирмы «Bruker». Параметры экспериментов приведены ниже в таблице 1.

Таблица 1 - Некоторые параметры импульсных последовательностей, использованных в работе.

Название эксперимента	Импульсная последовательность	TD	S	Задержка d_1 (сек)	Время эксперимента
^1H	zgcppr	32K	00	1	14 мин
^1H TOCSY	selmlgp	32K	500	1.5	2 ч 41 мин
^1H-^1H COSY	cosycwgppsqf	2K	00	1	2 ч 55 мин
^1H-^1H TOCSY	mlevgpph19	4k	0	1.5	2 ч 58 мин
^1H-^{13}C HSQC	hsqcetgpprsisp2.2	4K	4	2	2 ч 31 мин

В двумерном ЯМР эксперименте сигнал является функцией двух переменных: времени t_1 и t_2. Если произвести Фурье преобразование по двум этим величинам, то получится спектр, который является функцией двух частот. В общем виде эксперимент по двумерному ЯМР можно представить следующим образом (рисунок 2):

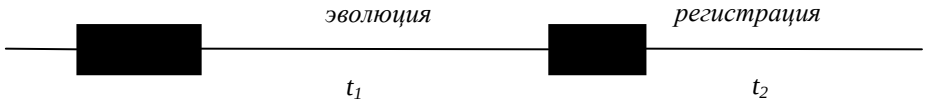

Рисунок 2 - Импульсная последовательность 2D ЯМР эксперимента.

В первом периоде, который называется *подготовительным*, на образец воздействуют одним радиочастотным импульсом. После выключения импульса суммарная намагниченность эволюционирует. Затем следует период, который называется *временем смешивания или временем эволюции*, который содержит один или несколько радиочастотных импульсов. После времени смешивания регистрируется сигнал, который является функцией времени t_2. Эта последовательность событий называется импульсной последовательностью, свойства которой зависят от подготовительного периода и времени смешивания.

Таким образом, *двумерный ЯМР спектр* представляет собой подобие топографической карты, на которой интенсивность пиков представлена контурными линиями (рисунок 3.).

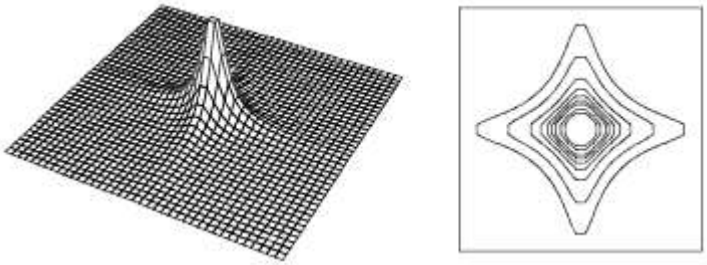

Рисунок 3 - Вид двумерного ЯМР сигнала в спектре.

Положение каждого пика определяется двумя координатами (частотами ν_1 и ν_2).

Эксперимент COSY (*Correlation spectroscopy*).

Импульсная последовательность двумерного эксперимента ЯМР COSY приведена на рисунке 4. (здесь и далее см. также [11-12,25]):

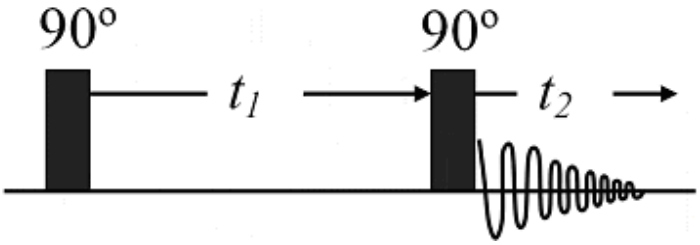

Рисунок 4 - Импульсная последовательность двумерного эксперимента ЯМР COSY.

Этот гомоядерный эксперимент используется для анализа протонных спектров. Из спектра в эксперименте ЯМР COSY можно определить химические сдвиги цепочки спинов, связанных скалярным спин-спиновым взаимодействием. На рисунке 5. приведено схематическое изображение спектра COSY. В спектре присутствуют два вида пиков: *кросс-пики* (светло-серого цвета) и *диагональные пики* (темно-серого цвета). Кросс-пики имеют разные частоты по ω_1 и ω_2.

Наличие пика с частотами $\omega_1=\Omega_A$, $\omega_2=\Omega_B$ указывает на взаимодействие спина с химически сдвигом Ω_A и спина с химическим сдвигом Ω_B. Таким образом, пики из спектра на рисунке 5. указывают на наличие спин-спинового взаимодействия между спинами: *A-B, B-D* и *C-E*. Диагональные пики имеют одни и те же частоты по ω_1 и ω_2.

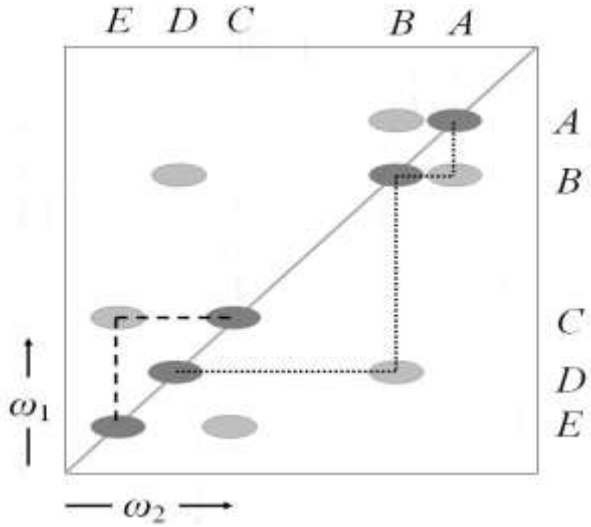

Рисунок 5 - Схематическое изображение спектра в эксперименте ЯМР COSY.

Из спектра COSY можно получить информацию о цепочке спинов связанных спин-спиновым взаимодействием.

Эксперимент TOCSY (*Total correlation spectroscopy*)

Данный эксперимент как и в эксперименте COSY позволяет регистрировать наличие спин-спинового взаимодействия, однако в TOCSY (рисунок 6.) наблюдаются кросс-пики между спинами, которые связаны неразрывной цепочкой взаимодействий. Т.е. если спин *A* связан со спином *B* и спин *B* связан со спином *C*, то в спектре TOCSY будет кросс-пик между спинами *A* и *C*, даже если между ними нет прямого взаимодействия.

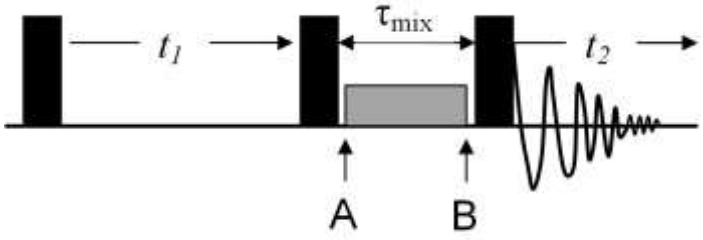

Рисунок 6 - Импульсная последовательность ЯМР эксперимента TOCSY.

На рисунке 7. приведено схематическое изображение спектра TOCSY. Данный гипотетический спектр приведен для той же спиновой системы, что и в эксперименте COSY на

рисунке 5. Соответствующие кросс-пики также указывают на наличие спин-спинового взаимодействия между спинами: *A-B, B-D* и *C-E,* но в спектре TOCSY дополнительно проявляются кросс-пики между спинами *A* и *D,* означающие связь этих спинов через спин *B.*

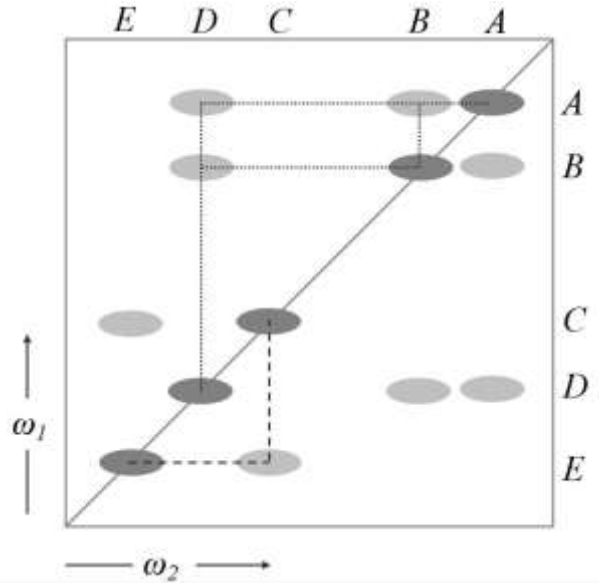

Рисунок 7 - Схематическое изображение спектра эксперимента TOCSY.

Эксперименты HMQC (*Heteronuclear multiple-quantum correlation*) *и HMBC* (*Heteronuclear multiple-bond correlation*)

Для наблюдения корреляций между разными ядрами удобны двумерные эксперименты, в которых по одной оси отложены химические сдвиги ядер одного типа (например, протонов), а по другой оси химические сдвиги ядер другого типа (например, ^{13}C), которые связаны взаимодействиями с первыми.

Регистрация сигнала в ЯМР эксперименте может производиться как по низкочувствительным ядрам (например, ^{13}C, ^{15}N) так и по сильночувствительным ядрам (протонам). Однако, предпочтительнее наблюдать сигнал протонов, так как его природное содержание 100% и гиромагнитное отношение γ намного выше чем у других ядер.

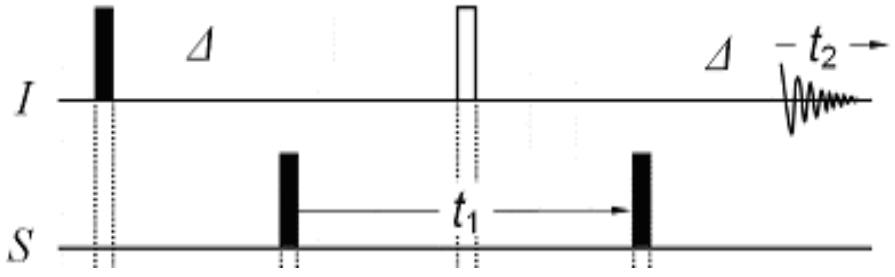

Рисунок 8 - Импульсная последовательность HMQC: темные прямоугольники соответствуют 90^0 импульсам, светлые 180^0. Задержка $\Delta=1/(2J_{12})$.

Рассмотрим эксперимент по гетероядерной мульти-квантовой корреляции HMQC (*Heteronuclear multiple-quantum correlation*). Импульсная последовательность приведена на рисунке 8.

В результате воздействия этой импульсной последовательности, получаем двумерный ЯМР спектр, где по оси частот ν_2 будет наблюдаться дублет с положительной фазой, соответствующий сигналам ядер 1 (*I*), и по частоте ν_1 - пик, соответствующий сигналам ядер 2 (*S*). Схематический вид спектра приведен на рисунке 9:

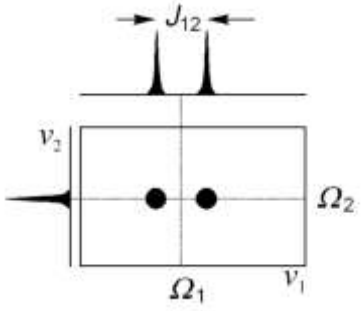

Рисунок 9 - Схематический HMQC спектр для двух связанных спинов

Данный эксперимент позволяет выявить сигналы по высокочувствительным ядрам *I* (^{1}H), которые связаны спин-спиновым взаимодействием с низко чувствительными ядрами *S* (^{13}C, ^{15}N).

Для ядер ^{13}C и протонов взаимодействие через одну связь, наиболее интенсивное, по сравнению с взаимодействиями через большее количество связей. Выбор задержки $\Delta=1/(2J)$ не дает ни каких других корреляций, кроме как корреляций через одну связь. Для наблюдения корреляции через большее количество связей, необходимо увеличить время задержки с тем, чтобы компоненты этих сигналов стали противофазными. Такой эксперимент получил название HMBC (*Heteronuclear multiple-bond correlation*).

Эксперимент HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation*)

Использование градиентов магнитного поля является еще одним инструментом для выделения взаимодействия ядерных спинов. Градиентами можно селективно расфокусировать не интересующие нас спины и оставить для наблюдения сигналов ЯМР лишь необходимые. Рассмотрим импульсную последовательность HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation*) (рисунок 10.). Эта импульсная последовательность приводит к тем же результатам в спектре, что и последовательность HMQC. Несмотря на то, что импульсная последовательность HSQC более громоздкая, чем HMQC, она имеет ряд преимуществ для регистрации спектров высокомолекулярных соединений (например, протеинов).

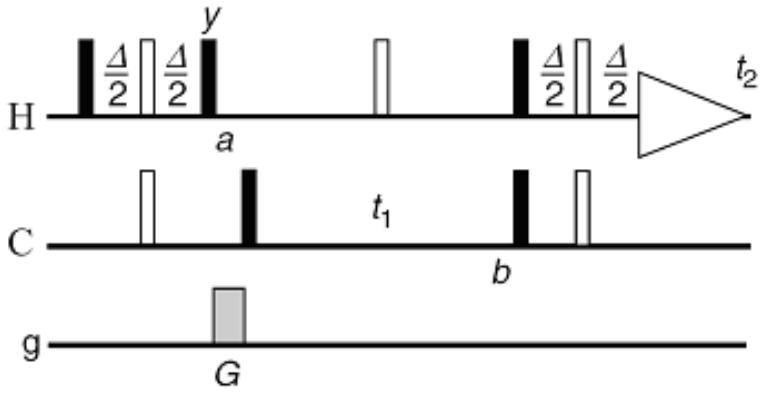

Рисунок 10 - Импульсная последовательность HSQC: темные прямоугольники соответствуют 90^0 импульсам, светлые 180^0. Задержка $\Delta=1/(2J_{12})$. Все импульсы приложены вдоль оси x, за исключением третьего 90^0 импульса по ^1H, который приложен вдоль оси y.

В результате в спектре будет наблюдаться дублет с положительной фазой по оси ν_2 соответствующий сигналу протонов, и эти пики будут иметь сигналы по оси частот ν_1 соответствующие сигналам ядер *S*. Схематически вид спектра будет иметь такой же вид, что и спектр HMQC (рисунок 9.).

1. Регистрация одномерных (^{1}H и ^{13}C) спектров ЯМР пептидов: синтетического $A\beta_{(1-40)}$ пептида нативного типа, его вариаций при изменении одной из аминокислот в первичной структуре, активного фрагмента $A\beta_{(1-40)}$ пептида (16-22) и его вариации в растворе.

Структурная формула гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 приведена на рисунке 1.1.

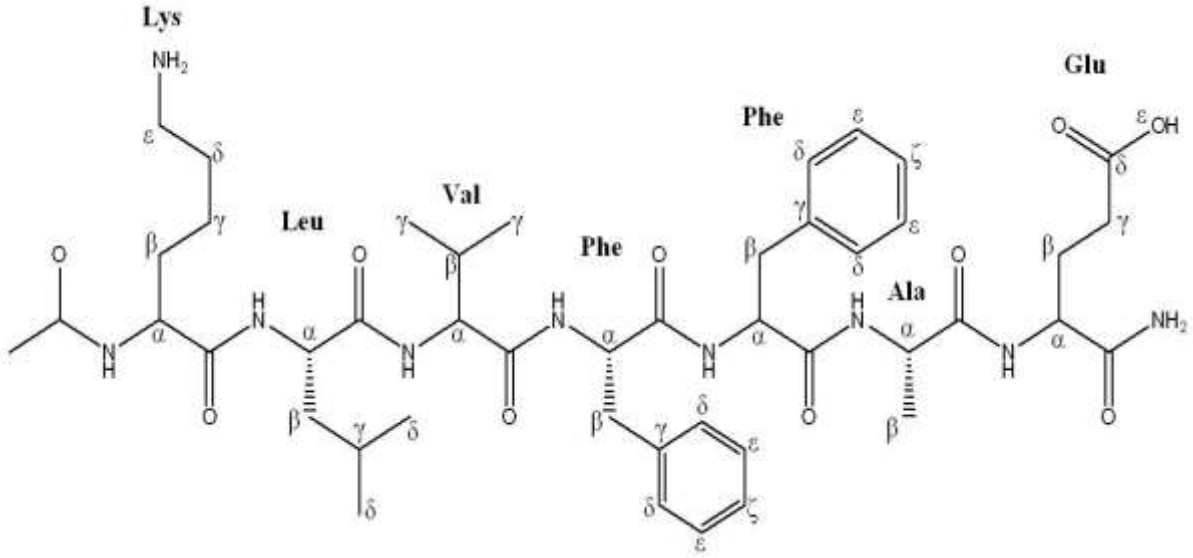

Рисунок 1.1 - Структурная формула гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2).

Регистрация ЯМР ^{1}H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ в различных растворителях проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 1.2 представлен одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$). Представленное на рисунке 1.2 отнесение сигналов в ЯМР ^{1}H спектре гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 было сделано с использованием двумерных гетеро-корреляционных экспериментов ЯМР.

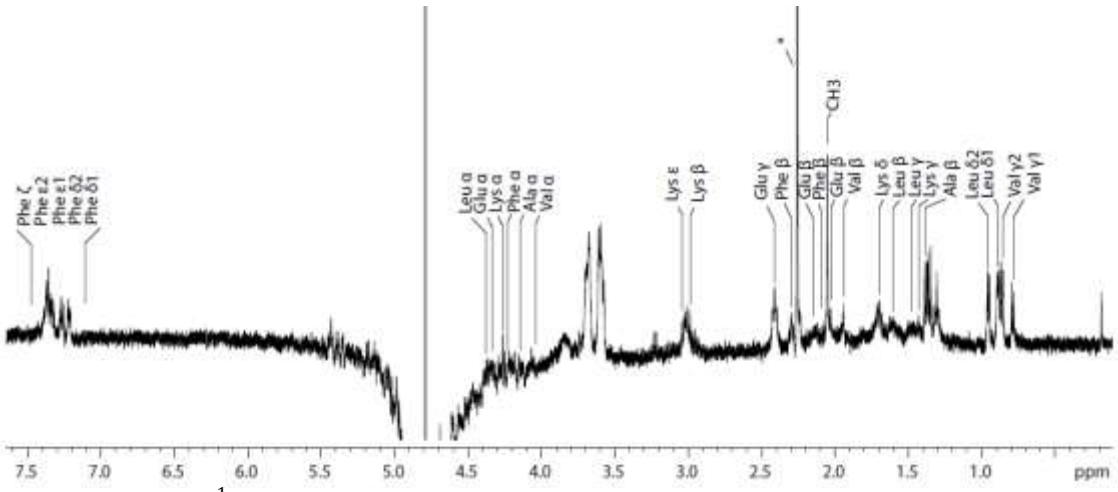

Рисунок 1.2 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 К.

Регистрация ЯМР ^{1}H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров пептида $A\beta_{(10-35)}$ [H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH] в различных растворителях проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 1.3 представлен одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O). Представленное на рисунке 1.3 отнесение сигналов в ЯМР ^{1}H спектре пептида $A\beta_{(10-35)}$, также как и в предыдущей части, было сделано с использованием двумерных гетеро-корреляционных экспериментов ЯМР.

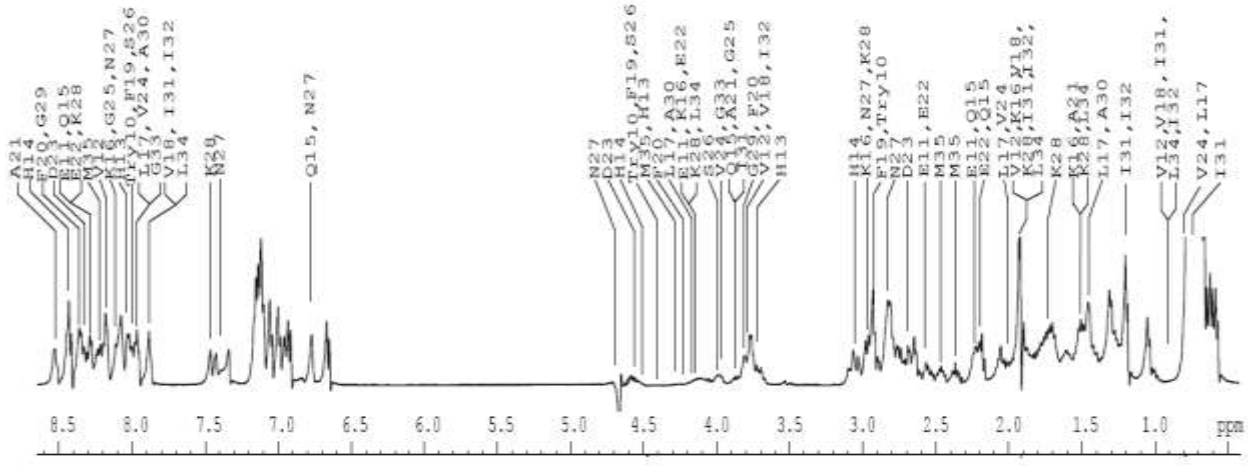

Рисунок 1.3 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 К.

Наиболее удобным растворителем для пептида $A\beta_{(10-35)}$ оказался фосфатный буфер ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4 и температуре T = 293 К.

Регистрация ЯМР ^{1}H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в различных растворителях проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 1.4 представлен одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР пептида $A\beta_{(1-40)}$ [H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH] в растворе трифторэтанола (CF_3CD_2OD).

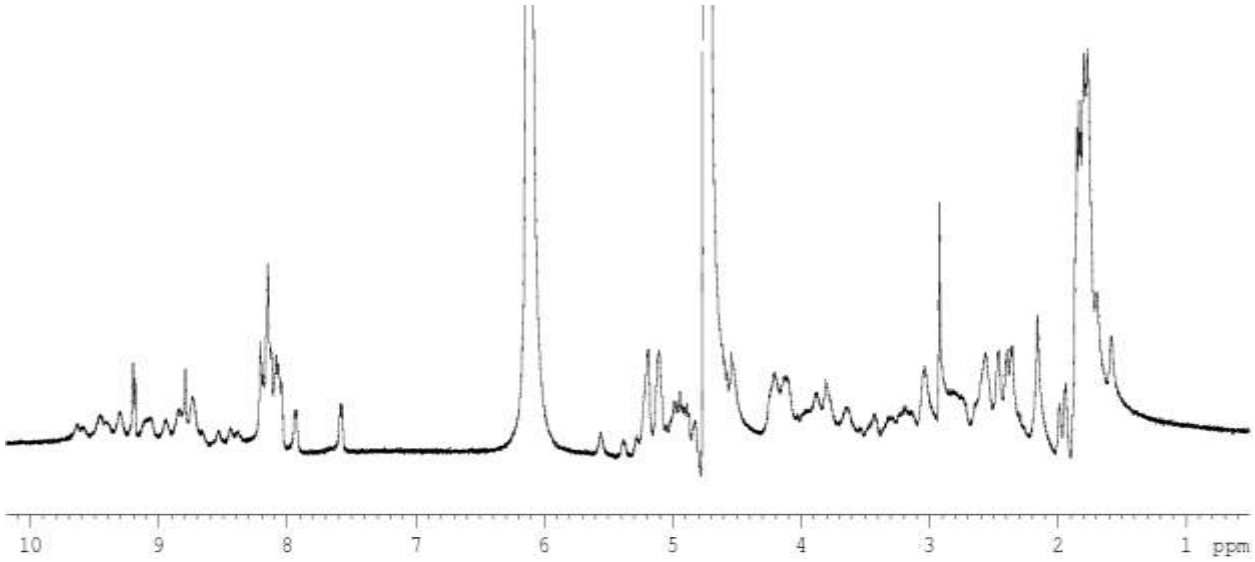

Рисунок 1.4 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) спектр ЯМР пептида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе трифторэтанола (CF_3CD_2OD). T = 293 K.

Данный пептид хорошо растворяется, кроме трифторэтанола (CF_3CD_2OD), и в фосфатном буфере ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4 и температуре T = 293 K.

2. Запись двумерных спектров ЯМР (COSY, HSQC модификации) исследуемых пептидов в растворе.

На рисунках 2.1 и 2.2 приведены двумерный ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY спектр и двумерный ЯМР ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2.

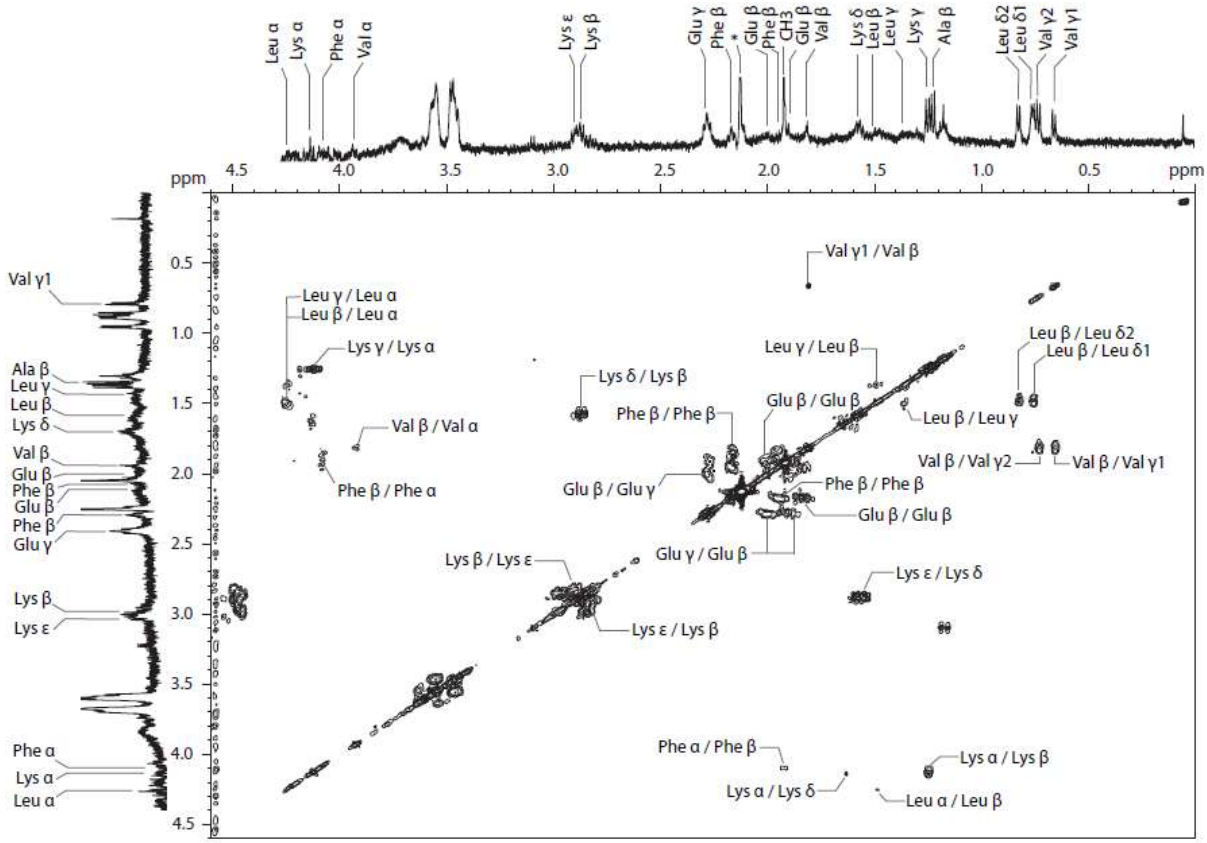

Рисунок 2.1 - Двумерный ^{1}H-^{1}H COSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 K.

Анализируя расположение кросс-пиков в двумерных ^{1}H-^{1}H TOCSY и ^{1}H-^{1}H COSY спектрах и используя литературные данные о химических сдвигах протонов в аминокислотах [26-28], были отнесены сигналы протонов NH, CH, CH_2 и CH_3 групп аминокислот исследуемого гептапептида $A\beta_{(16-22)}$. Также были проведены одномерные ^{1}H TOCSY эксперименты (рисунки 2.3-2.6), в которых с помощью селективного возбуждающего импульса на определенных частотах были выявлены спиновые системы аминокислотных остатков Ala, Leu, Glu и CH_3(NAc).

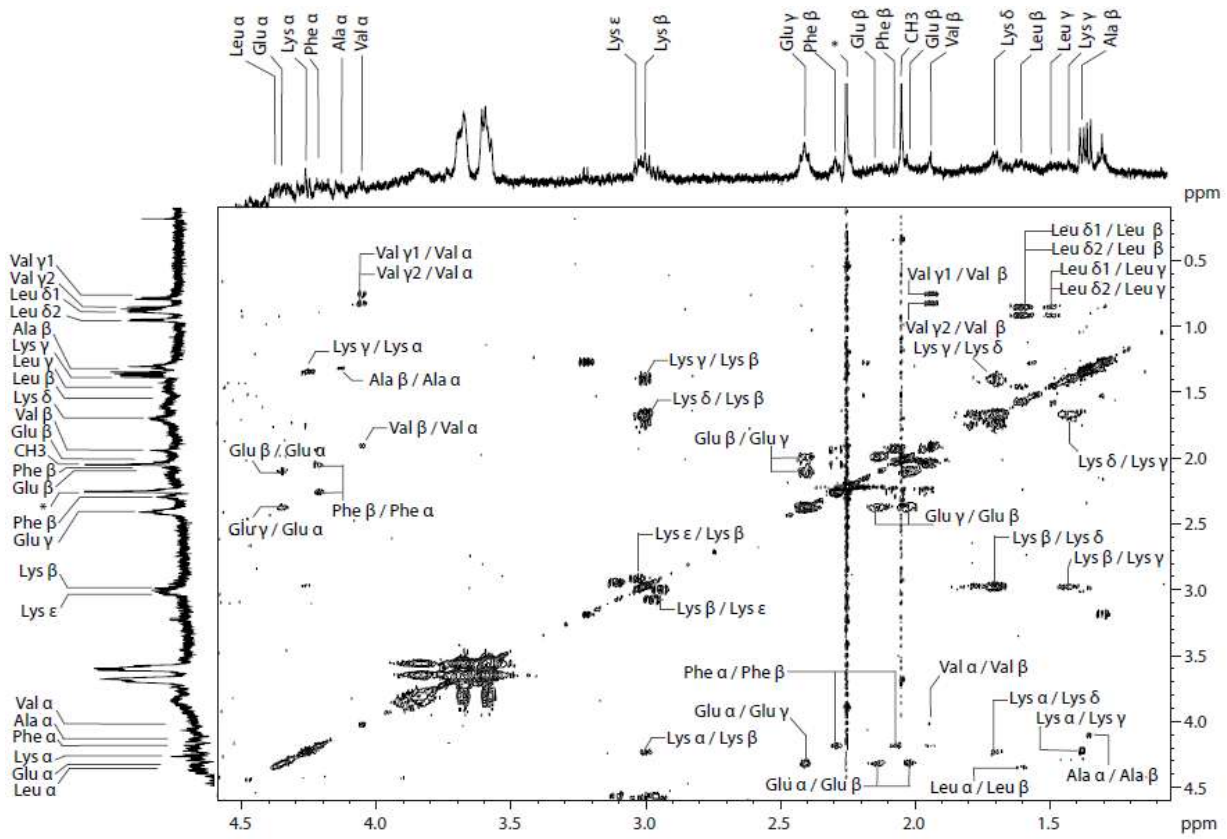

Рисунок 2.2 - Двумерный ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 K.

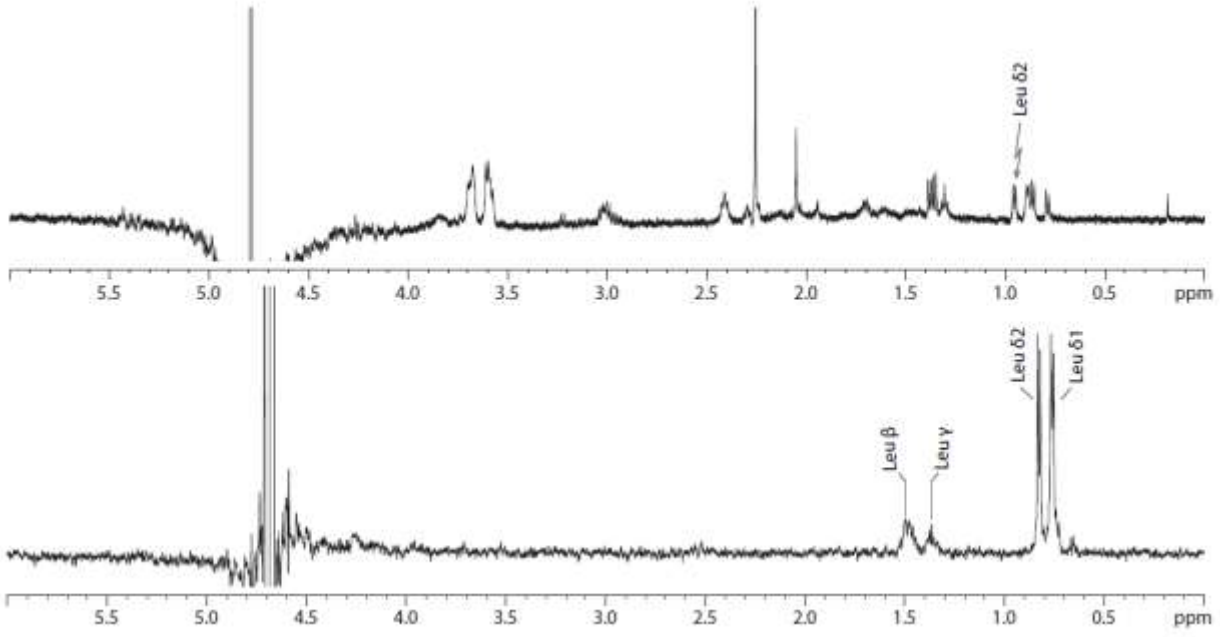

Рисунок 2.3 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) TOCSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 K. Селективное возбуждение производилось по сигналу с ХС 0.93 м.д., соответствующему сигналу протонов δ-группы лейцина (Leu δ_2).

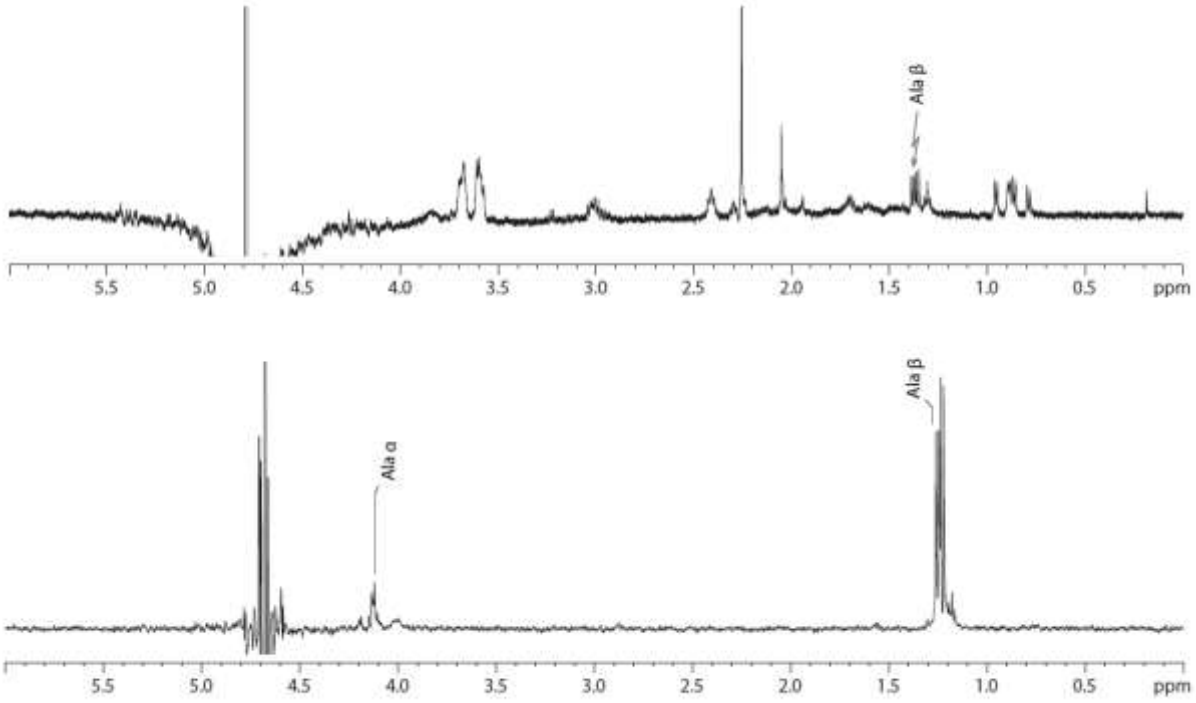

Рисунок 2.4 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) TOCSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 K. Селективное возбуждение производилось по сигналу с ХС 1.34 м.д., соответствующему сигналу протонов β-группы аланина (Ala β).

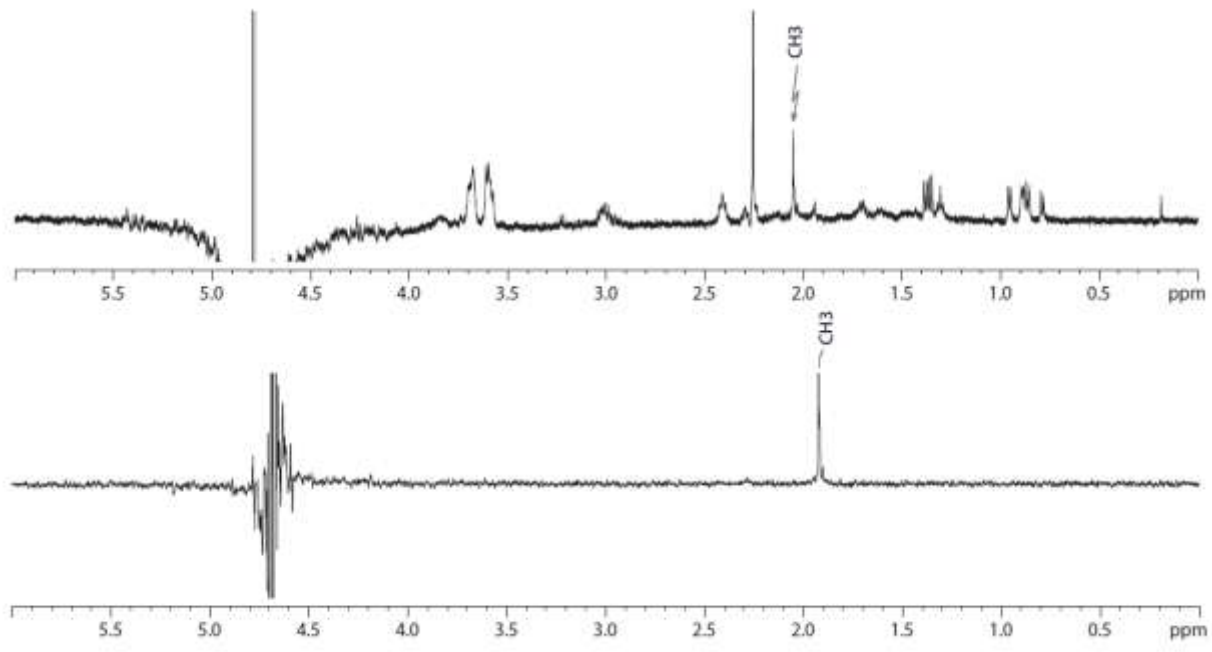

Рисунок 2.5 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) TOCSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) при pH = 8.4. T= 293 K. Селективное возбуждение производилось по сигналу с ХС 2.05 м.д., соответствующему сигналу протонов CH_3-группы NAc-фрагмента (NAc).

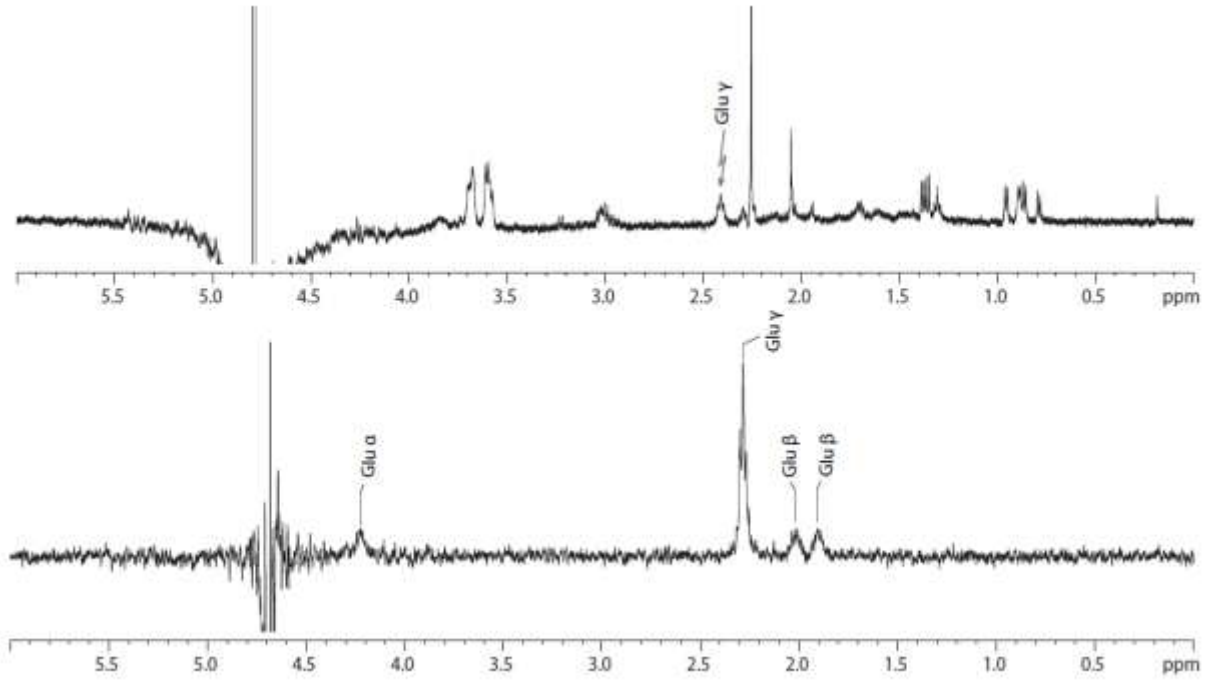

Рисунок 2.6 - Одномерный ^{1}H (500 МГц) TOCSY спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+D_2O) при pH = 8.4. T= 293 K. Селективное возбуждение производилось по сигналу с ХС 2.41 м.д., соответствующему сигналу протонов γ-группы глутамина (Glu γ).

Полученные значения ЯМР ^{1}H химических сдвигов исследуемого гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - ЯМР ^{1}H химические сдвиги (м.д., относительно ТМС) гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+D_2O) при pH = 8.4. T= 293 K.

Аминокислотный остаток	Химические сдвиги функциональных групп				
	NH	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
NAc		2.05			
Lys		4.26	3.00	1.38	1.7 (δ), 2.95 (ε)
Leu		4.36	1.60	1.49	0.86 (δ_1), 0.93 (δ_2)
Val		4.06	1.94	0.78, 0.84	
Phe		4.20	2.07, 2.28		
Phe		4.20	2.07, 2.28		
Ala		4.13	1.34		
Glu		4.35	2.38, 2.11	2.41	

На рисунке 2.7 приведен двумерный ЯМР ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр пептида H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH.

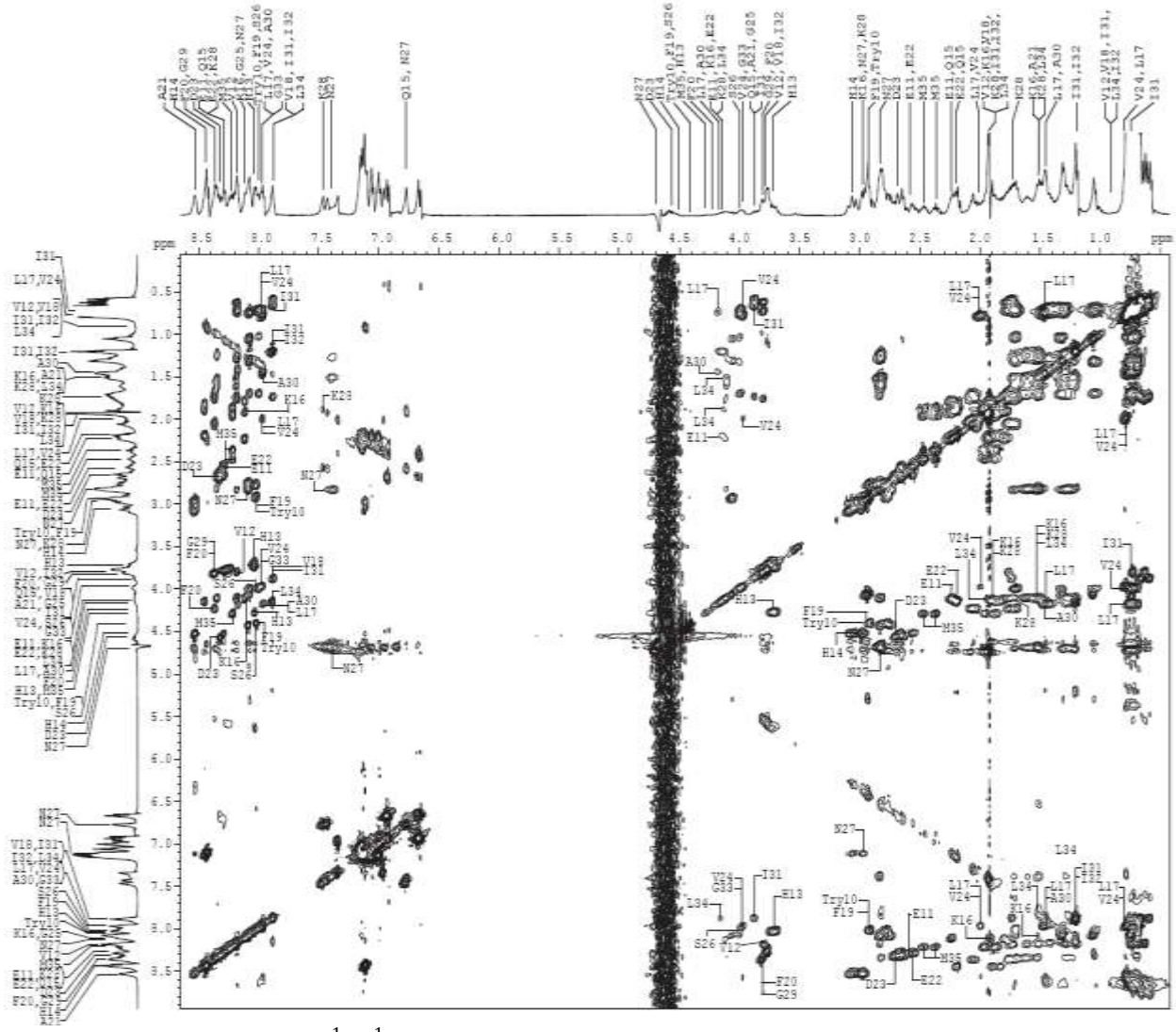

Рисунок 2.7 - Двумерный ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр ЯМР пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Анализируя расположение кросс-пиков в двумерном ^{1}H-^{1}H TOCSY спектре и используя литературные данные о химических сдвигах протонов в аминокислотных фрагментах [26-28] были отнесены сигналы протонов NH, CH, CH_2 и CH_3 групп аминокислот исследуемого пептида.

Полученные величины химических сдвигов ЯМР ^{1}H исследуемого пептида $A\beta_{(10-35)}$ приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 - ЯМР ^{1}H химические сдвиги (м.д., относительно ТМС) пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Аминокислотный остаток	Химические сдвиги функциональных групп				
	NH	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
Try10	8,03	4,41	2,93		
Glu11	8,28	4,15	2,20	2,58	
Val12	8,18	3,81	1,92	0,90	
His13	8,04	4,29	3,72		
His14	8,44	4,51	3,06		8,44
Gln15	8,28	3,89	2,18	2,24	6,78
Lys16	8,12	4,15	1,92	1,52	2,98, 1,52
Leu17	7,97	4,18	2,00	1,47	0,79
Val18	7,88	3,81	1,92	0,90	
Phe19	8,00	4,41	2,93		
Phe20	8,37	4,24	3,82		
Ala21	8,53	3,89	1,52		
Glu22	8,28	4,15	2,18	2,58	
Asp23	8,33	4,55	2,69		
Val24	7,97	3,97	2,00	0,79	
Gly25	8,12	3,89			
Ser26	8,00	4,41	4,00		
Asn27	8,12	4,70	2,98, 2,84	7,47, 6,78	
Lys28	8,28	4,15	1,92	1,52	7,47, 2,98, 1,72
Gly29	8,37	3,82			
Ala30	7,97	4,18	1,47		
Ile31	7,88	3,89	1,92	1,20, 0,90	0,73
Ile32	7,88	3,81	1,92	1,20, 0,90	
Gly33	7,97	3,97			
Leu34	7,88	4,15	1,92	1,52	0,90
Met35	8,22	4,29	2,37	2,47	

На рисунке 2.8 приведен двумерный ЯМР ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$.

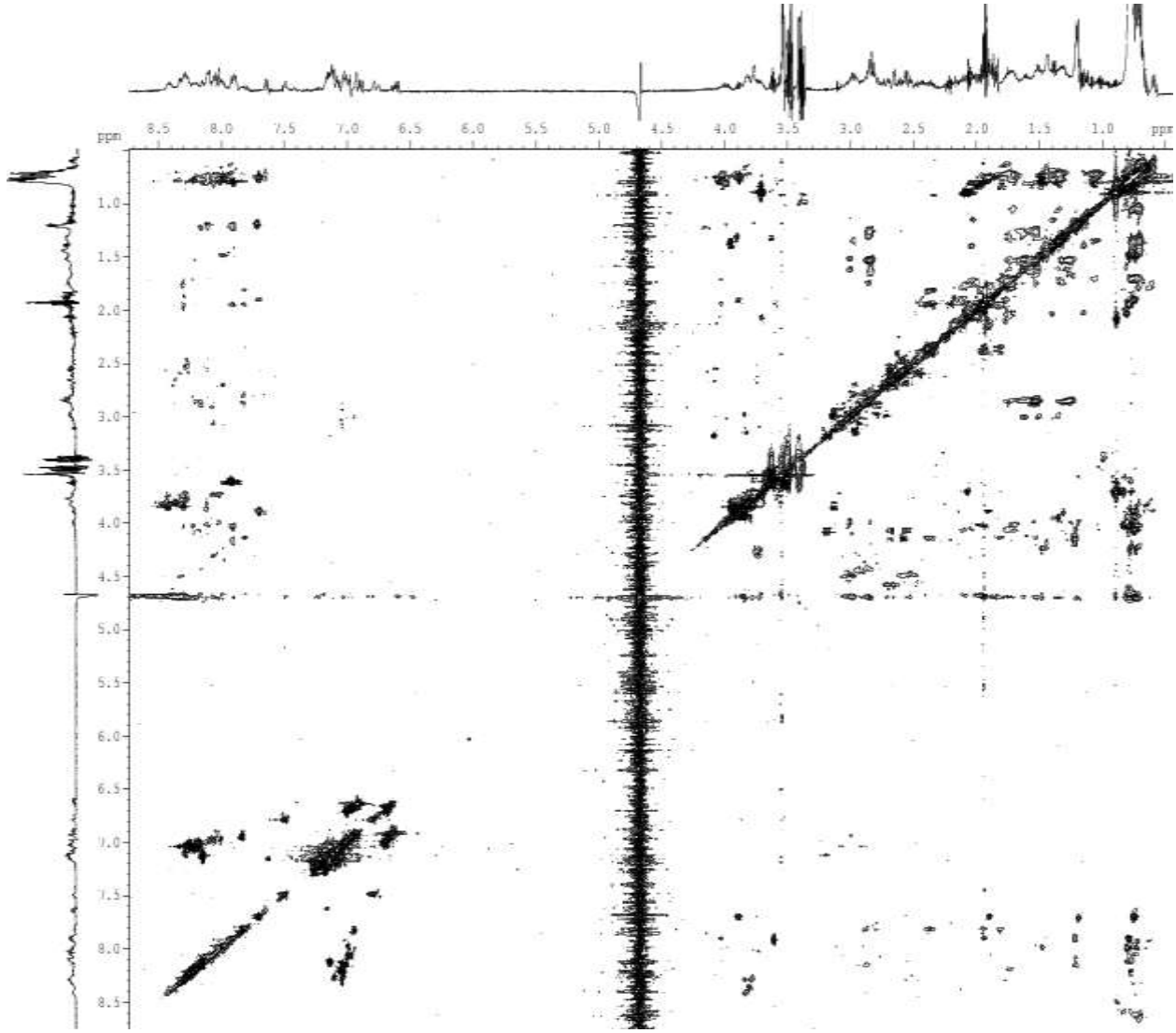

Рисунок 2.8 - Двумерный ^{1}H-^{1}H TOCSY спектр ЯМР бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Анализируя взаимное расположение кросс-пиков в двумерном ^{1}H-^{1}H TOCSY спектре и используя литературные данные о химических сдвигах [26-28] были отнесены сигналы протонов NH, CH, CH_2 и CH_3 групп аминокислот исследуемого пептида.

Определенные таким образом ЯМР ^{1}H химические сдвиги исследуемого пептида приведены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 - ЯМР ^{1}H химические сдвиги (м.д., относительно ТМС) пептида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Аминокислотный остаток	Химические сдвиги функциональных групп				
	NH	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
Asp1		4.29	3.00, 2.99		
Ala2	8.70	4.33	1.36		
Glu3	8.20	4.22	2.00, 1.96	2.37, 2.34	
Phe4	7.96	4.55	3.11, 3.09		7.29 (3/5), 7.20 (2/6)
Arg5	7.97	4.16	1.70	1.78, 1.53	7.26 (δNH), 3.15 (δ)
His6	8.35	4.63	3.29, 3.17		8.56 (2), 7.26 (4)
Asp7	8.39	4.72	2.90		
Ser8	8.37	4.37	3.94, 3.89		
Gly9	8.45	3.93, 3.91			
Try10	8.02	4.30	3.09		7.06 (2/6), 6.74 (3/5)
Glu11	8.24	4.10	2.20	2.52	
Val12	8.14	3.79	2.06	1.01, 0.88	
His13	8.06	4.36	3.25		8.56 (2), 7.25 (4)
His14	8.44	4.27	3.26, 3.04		8.43 (2), 7.19 (4)
Gln15	8.30	3.96	2.17, 2.098	2.35	6.80, 6.59 (δNH_2)
Lys16	8.04	4.09	1.90, 1.88	1.44	2.92 (ε), 1.66 (δ)
Leu17	7.66	4.20	1.70	1.64	0.86 (δ)
Val18	7.77	3.63	1.99	0.81	
Phe19	8.00	4.36	3.18		7.27 (3/5), 7.14 (2/6)
Phe20	8.33	4.26	3.26		7.24 (2/6), 7.19 (3/5)
Ala21	8.58	3.97	1.50		
Glu22	8.29	4.14	2.16, 2.08	2.62, 2.46	
Asp23	8.18	4.55	2.77, 2.74		
Val24	8.05	3.80	1.91	0.80, 0.72	
Gly25	8.12	3.87			
Ser26	7.91	4.42	3.98, 3.92		
Asn27	8.07	4.78	2.94, 2.81		7.47, 6.18 (γNH_2)

Продолжение таблицы 2.3.

Lys28	8.24	4.12	1.87	1.52, 1.44	7.59(ε), 2.98(ε), 1.69(δ)
Gly29	8.34	3.88, 3.85			
Ala30	7.78	4.21	1.47		
Ile31	7.67	3.91	1.98	1.25, 0.95	0.87 (δ)
Ile32	7.86	3.84	1.91	1.23, 0.91	
Gly33	7.97	3.82, 3.78			
Leu34	7.82	4.20	1.93	1.56	0.85 (δ)
Met35	8.14	4.32	2.27, 2.13	2.71, 2.51	
Val36	8.42	3.99	2.20	1.02, 0.95	
Gly37	8.02	4.05, 3.90			
Gly38	7.92	3.98			
Val39	7.87	4.09	2.10	0.96, 0.93	
Val40	7.57	4.29	2.12	0.92	

3. Регистрация двумерных спектров ЯМР (TOCSY, HSQC-TOCSY) исследуемых пептидов в растворе.

Химические сдвиги ЯМР ^{13}C гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера были получены на основе анализа двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC спектра ЯМР (рисунок 3.1) и приведены в таблице 3.1.

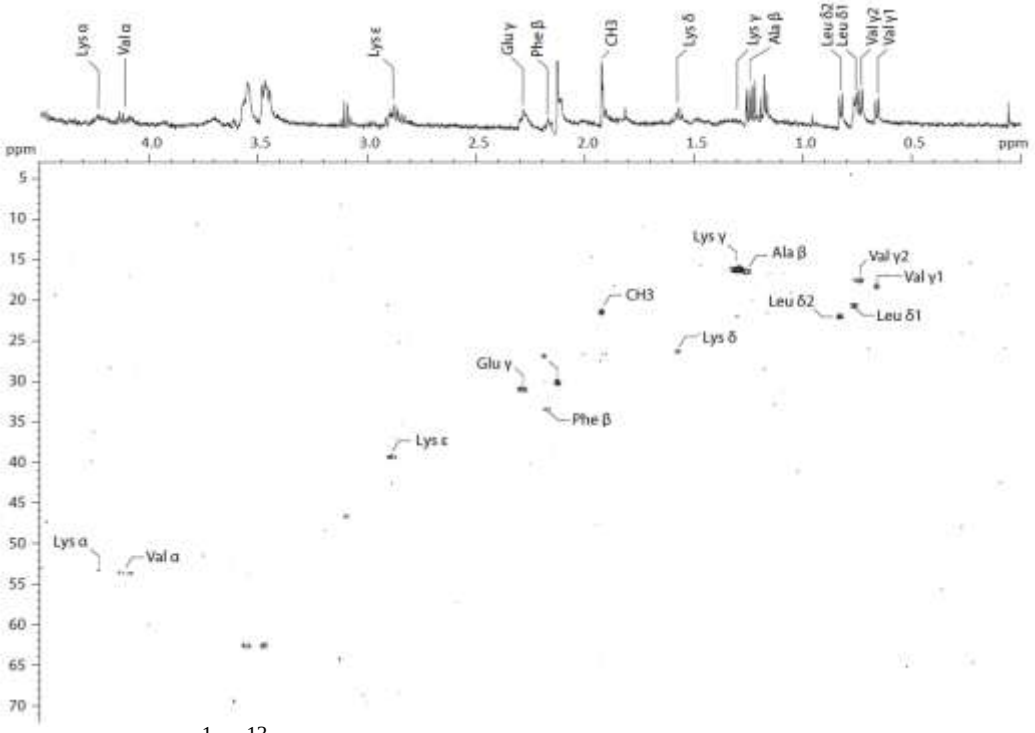

Рисунок 3.1 - Двумерный ^{1}H-^{13}C HSQC спектр ЯМР гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 в растворе боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+D_2O) при pH = 8.4. T=293 K.

Таблица 3.1 - ЯМР ^{13}C химические сдвиги гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2 (м.д., относительно ТМС).

Аминокислот-ный остаток	Химические сдвиги функциональных групп			
	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
NAc	21.5			
Lys	53.2		16.2	26.4 (δ), 39.4 (ε)
Leu				20.7 (δ_1), 22.0 (δ_2)
Val	53.6		18.3 (γ_1), 17.6 (γ_2)	
Phe		33.4		
Phe		33.4		
Ala		16.5		
Glu			31.0	

Данные о химических сдвигах ядер ^{13}C пептида H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH были получены на основе анализа двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC спектра ЯМР (рисунок 3.2) в растворе фосфатного буфера.

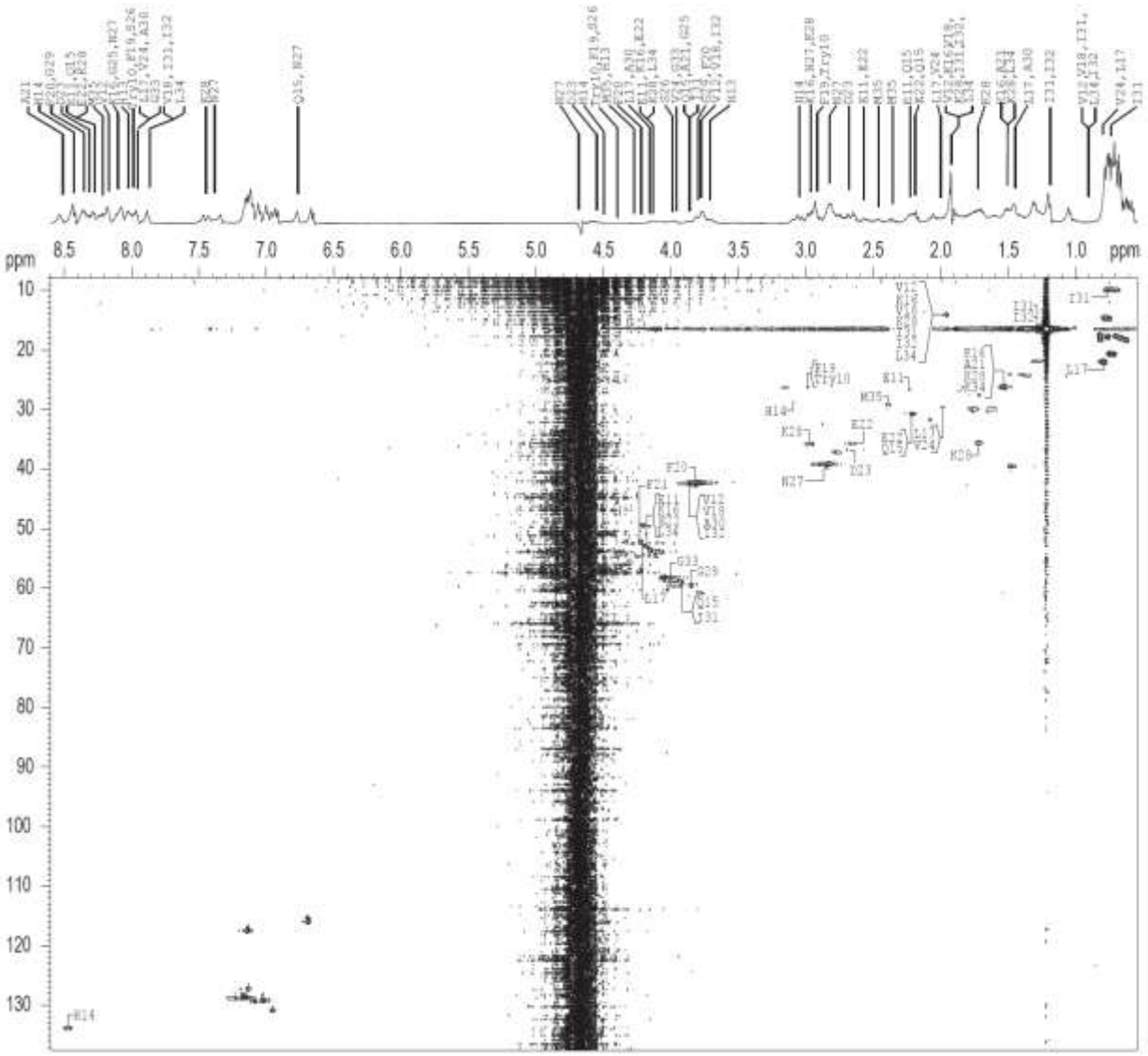

Рисунок 3.2 - Двумерный ^{1}H-^{13}C HSQC спектр ЯМР пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Полученные значения химических сдвигов ЯМР ^{13}C исследуемого пептида $A\beta_{(10-35)}$ приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 - Химические сдвиги ЯМР ^{13}C (м.д., относительно ТМС) пептида $A\beta_{(10-35)}$ в растворе фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) при pH = 7.4. T= 293 K.

Аминокислотный остаток	Химические сдвиги функциональных групп			
	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
Try10		26.2		
Glu11	53.5	26.9	35.6	
Val12	42.3	14.1		
His13				
His14		30.4		
Gln15	58.8	30.5		
Lys16	53.5	14.1	26.1	26.1(δ)
Leu17	52.9	29.6	39.5	21.8 (δ)
Val18	42.3	14.1		
Phe19		26.2		
Phe20	51.1	42.9		
Ala21		26.1		
Glu22	53.5	30.6	35.6	
Asp23		36.7		
Val24		29.6		
Gly25				
Ser26				
Asn27		39.1		
Lys28		14.1	26.1	35.8(ε), 35.5 (δ)
Gly29		59.3		
Ala30	42.3			
Ile31	58.8	14.1	16.5	9.8 (δ)
Ile32	42.3	14.1	16.5	
Gly33	58.1			
Leu34	53.5	14.1	26.1	
Met35		29.2	29.2	

Данные о величинах химических сдвигов ЯМР некоторых ядер ^{13}C бета-амлоида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе фосфатного буфера, необходимые для дальнейшего использования при определении пространственного строения были получены на основе анализа двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC спектра ЯМР (рисунок 3.3).

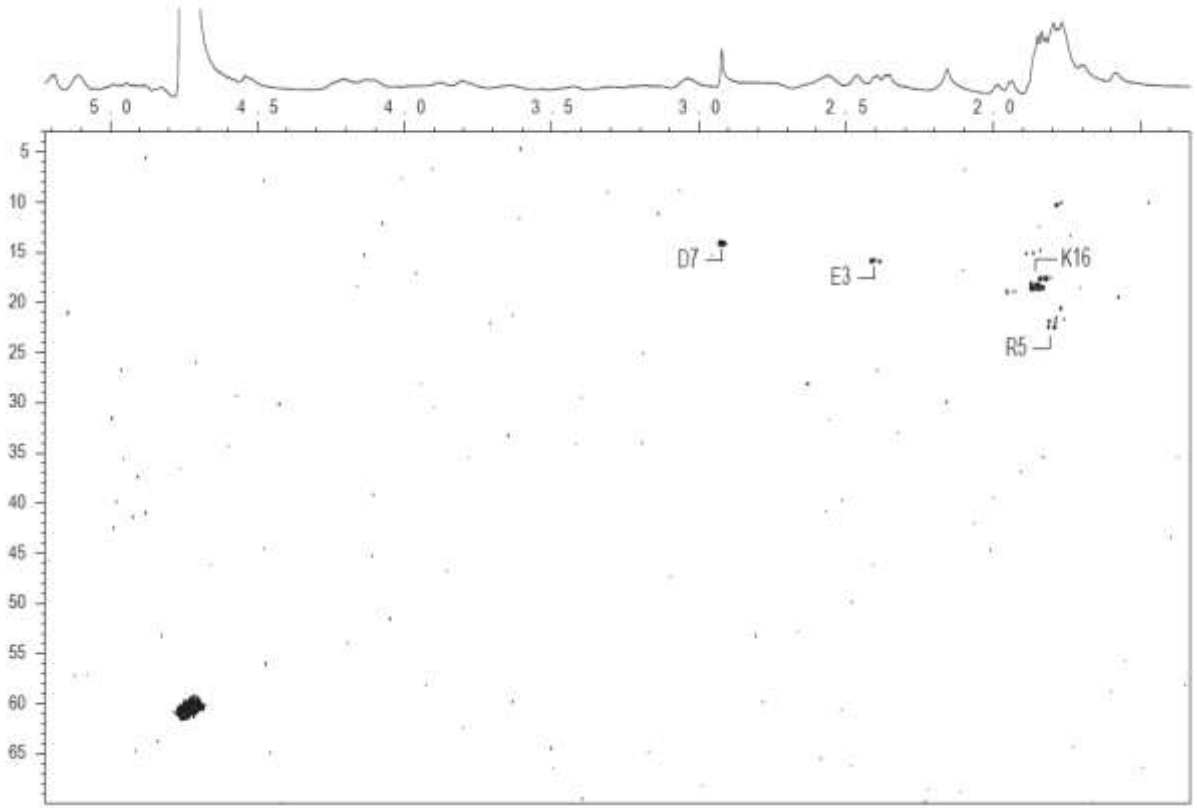

Рисунок 3.3 - Двумерный ^{1}H-^{13}C HSQC спектр ЯМР бета-амилоида $A\beta_{1-40}$ в растворе трифторэтанола (CF_3CD_2OD). T= 293 K.

ЯМР ^{13}C химические сдвиги (м.д.) бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе трифторэтанола (CF_3CD_2OD) приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 - ЯМР ^{13}C химические сдвиги (м.д., относительно ТМС) бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в растворе трифторэтанола (CF_3CD_2OD). T= 293 K.

Аминокислотный остаток	Химические сдвиги функциональных групп			
	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	прочие
Glu3			15.8	
Arg5			22.1	
Asp7		14.1		
Lys16		18.5		
Val39	53.9			
Val40	46.7			

4. Запись одномерных CP/MAS ЯМР ^{13}C спектров исследуемых пептидов в твердой фазе.

Регистрация ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектров гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ в твердой фазе также проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 4.1 представлен одномерный ^{13}C CP/MAS ЯМР спектр пептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2.

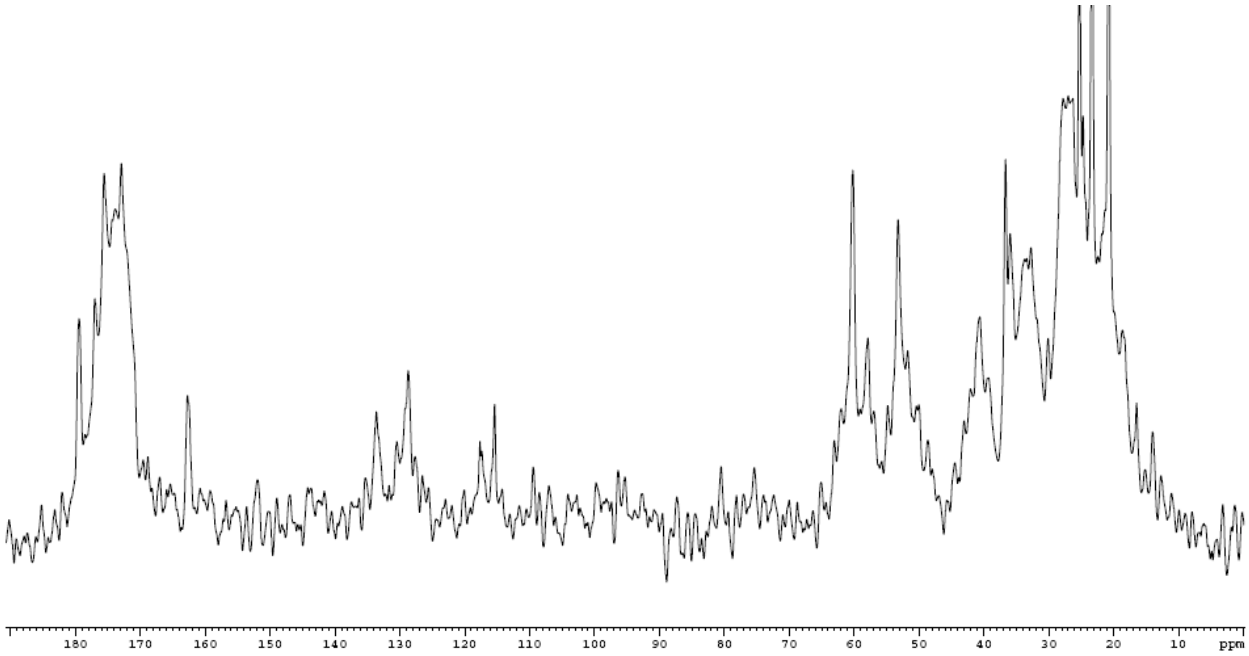

Рисунок 4.1 - Одномерный ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектр порошка гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ в твердой фазе, скорость вращения образца – 5.5 кГц. T= 293 K.

В таблице 4.1 приведены химические сдвиги ЯМР ^{13}C (125.69 МГц), определенные из ЯМР ^{13}C CP/MAS спектра порошка гептапептида $A\beta_{(16-22)}$.

Таблица 4.1 - ЯМР ^{13}C химические сдвиги гептапептида $A\beta_{(16-22)}$ в твердой фазе. T= 293 K. Значения химических сдвигов приведены в м.д.

20.71	39.27	57.90	162.62
23.27	40.79	60.19	172.87
25.14	42.11	115.32	173.98
26.94	50.00	117.39	175.57
33.24	51.74	128.68	177.03
35.95	53.12	130.41	179.38
36.57	54.65	133.60	

Регистрация ЯМР ^{13}C (125.69 МГц) CP/MAS спектров пептида $A\beta_{(10-35)}$ в твердой фазе также проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 4.2 представлен одномерный ^{13}C CP/MAS ЯМР спектр пептида H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH.

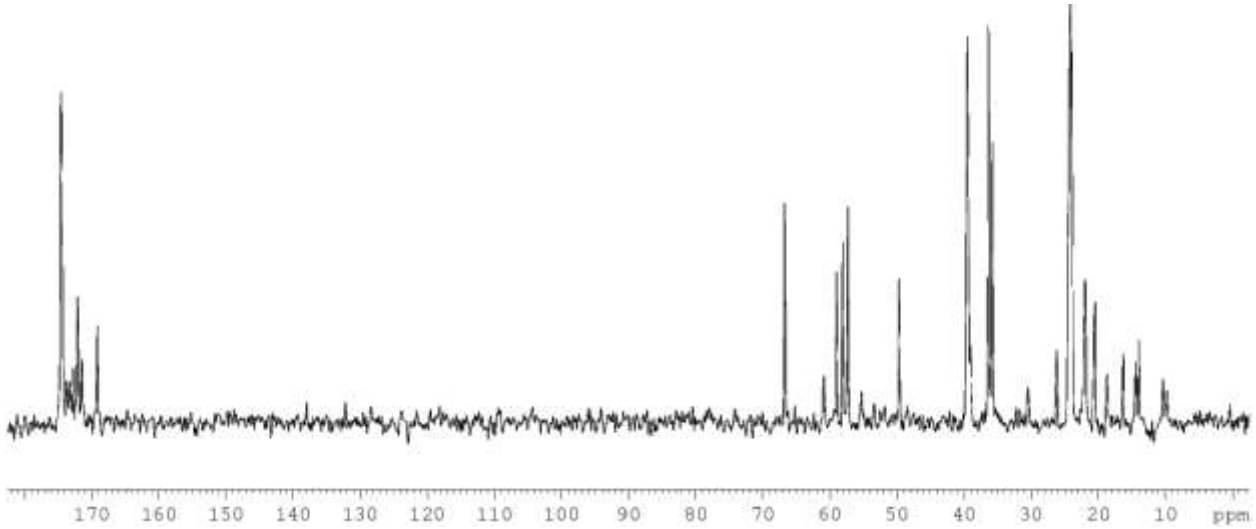

Рисунок 4.2 - ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектр порошка пептида $A\beta_{(10-35)}$ в твердой фазе, скорость вращения образца – 6.5 кГц. T= 293 К.

В таблице 4.2 приведены ЯМР CP/MAS ^{13}C (125.69 МГц) химические сдвиги, определенные из ЯМР спектра бета-амилоида $A\beta_{(10-35)}$ в твердой фазе.

Таблица 4.2 - ЯМР CP/MAS ^{13}C химические сдвиги бета-амилоида $A\beta_{(10-35)}$. T= 293 К. Значения химических сдвигов приведены в м.д.

9.7	22.0	39.5	169.2
10.3	23.9	49.7	171.4
14.0	24.2	57.3	172.1
14.4	26.2	58.1	172.8
16.3	30.5	59.0	173.2
18.7	35.8	60.8	173.7
20.5	36.3	66.7	174.5

Регистрация ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектров бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 II^{TM} фирмы «Bruker». На рисунке 4.3 представлен одномерный ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектр пептида H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH.

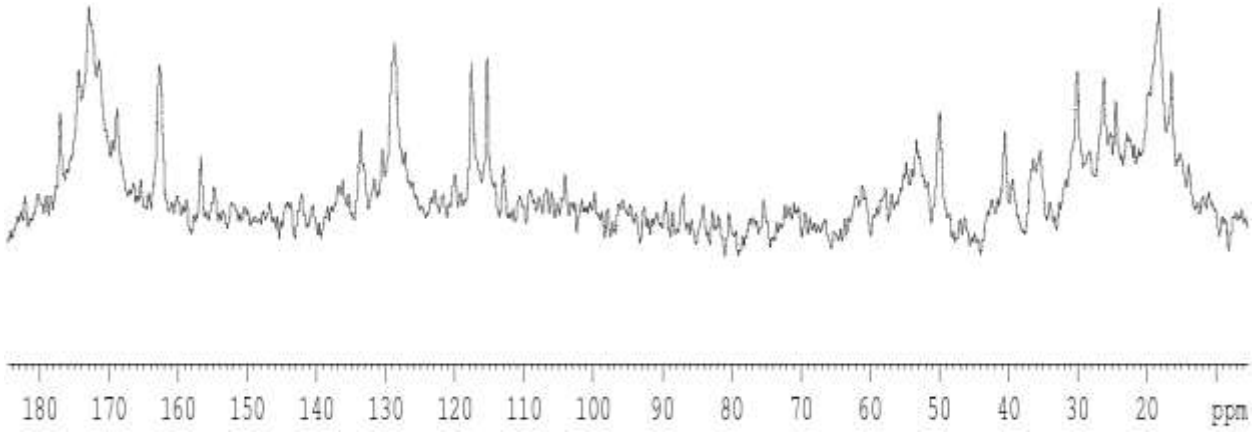

Рисунок 4.3 - Одномерный ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) спектр порошка пептида $A\beta_{(1-40)}$, скорость вращения образца 6.0 кГц. T= 293 K.

В таблице 4.3 приведены ^{13}C CP/MAS ЯМР (125.69 МГц) химические сдвиги, определенные из ЯМР спектра бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в твердой фазе.

Таблица 4.3 - ЯМР ^{13}C химические сдвиги бета-амилоида $A\beta_{(1-40)}$ в твердой фазе Значения химических сдвигов приведены в м.д., относительно ТМС.

16.5	39.4	112.9	156.7
18.3	40.5	115.3	162.7
22.6	50.1	117.6	168.8
24.5	53.2	128.8	171.5
26.3	55.0	133.5	172.8
30.0	58.0	136.7	174.4
36.0	61.3	154.9	177.1

Заключение

Объектами исследований на данном этапе Проекта были: синтетический $A\beta_{(1-40)}$ пептид нативного типа (H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH), его фрагмент $A\beta_{(10-35)}$ (H-Try-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH) и активный фрагмент $A\beta_{(16-22)}$ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH_2) пептида $A\beta_{(1-40)}$.

В результате исследований:

- записаны одномерные ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектры пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+HCL+D_2O), фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) и трифторэтанола (CF_3CD_2OD);

- проведена регистрация спектров ЯМР ^{13}C CP/MAS (125.69 МГц) пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в твердом состоянии (порошок);

- проведены двумерные эксперименты ЯМР (^1H-^1H, ^1H-^{13}C) (COSY, HSQC, TOCSY, HSQC-TOCSY модификации) по записи соответствующих двумерных спектров пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$+HCL+D_2O), фосфатного буфера ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ +D_2O) и трифторэтанола (CF_3CD_2OD);

- полностью отнесены сигналы ЯМР ^1H протонов NH, CH, CH_2 и CH_3 групп аминокислот исследуемых пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах;

- по данным двумерных ^1H-^{13}C HSQC спектров ЯМР определены ЯМР ^{13}C химические сдвиги ядер углерода пептидов $A\beta_{(16-22)}$, $A\beta_{(10-35)}$ и $A\beta_{(1-40)}$ в растворах.

Полученная ЯМР спектральная информация позволит на следующих этапах исследования определить трехмерные структуры исследуемых пептидов в растворах и в модельных биомембранах, выяснить роль мембраны при образовании промежуточных структур агрегации, механизм изменения свойств мембраны (проницаемости) при взаимодействии с пептидами, что является последующими задачами Проекта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ross, C. A. Protein aggregation and neurodegenerative diseases [Text] / C. A. Ross, M.A Poirier // Neurodegeneration. - 2004. – V. 6. - P. S10-S17.

2. Rochet, J.-C. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations [Text] / J.-C. Rochet, P. T. Lansbury // Current Opinion in Structural Biology. - 2000. –V. 10(1) - P. 60 -68.

3. Gorbenko, G. P. The role of lipid–protein interactions in amyloid-type protein fibril formation [Text] /. G. P. Gorbenko, P. K. J. Kinnunen // Chemistry and Physics of Lipids. - 2006. – V. 141.- P. 72–82.

4. Antzutkin, O. N. Amyloidosis of Alzheimer's A beta peptides: solid-state nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy and atomic force microscopy studies [Text] / O. N.Antzutkin // Magnetic Resonance in Chemistry. - 2004. – V. 42. - P. 231-246.

5. Narayanan S. Characterization of chemical exchange between soluble and aggregated states of beta -amyloid by solution-state NMR upon variation of salt conditions [Text] / S. Narayanan, B. Reif // Biochemistry.- 2005. – V. 44 .- P. 1444 -1452.

6. Jarvet, J. Reversible random coil to b-sheet transition and the early stage of aggregation of the Ab(12-28) fragment from the Alzheimer peptide [Text] / J. Jarvet, P. Damberg, K. Bodell, L. E. G. Eriksson, A. Gräslund // Journal of the American Chemical Society.- 2000.- V. -122 .- P. 4261 - 4268.

7. Filippov, A. V. Diffusion and aggregation of Alzheimers's Abeta(1-40) peptide in aqueous trifluoroethanol solutions as studied by pulsed field gradient nmr [Text] / A. V. Filippov, A. V. Sulejmanova, O. Antzutkin, G. Gröbner // Applied Magnetic Resonance.- 2005. - V. 29. - P. 439-449.

8. Filippov, A.V. Effect of freezing on amyloid peptide aggregation and self-diffusion in an aqueous solution [Text] / A. V. Filippov, A.V. Suleimanova, G. Grobner, N. Antsutkin // Colloid Journal. - 2008. – V. 70.- P. 501–506.

9. Bradley, E. K. NMR structural characterization of oligo-N-substituted glycine lead compounds from a combinatorial library [Text] / E. K. Bradley, J. M. Kerr, L. S. Richter, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, R. N. Zuckermann, D. C. Spellmeyer, J. M. Blaney // Molecular Diversity. - 1997. - V. 3. - P. 1-15.

10. Anishetty, S. Tripeptide analysis of protein structures [Text] / S. Anishetty, G. Pennathur, R. Anishetty // BMC Structural Biology - 2002. - V. 2. - P. 1472-1507.

11. Ernst, R. R. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions [Text] / R. R. Ernst, B. Bodenhausen, A. Wokaun. - Oxford: Oxford University Press, -1987.- 610 p.

12. Van der Ven, Multidimensional NMR in liquids: basic principles and experimental methods [Text] / Van der Ven, J. M. Frank, - N-Y: Wiley-VCH, 1995. - 399 p.

13. Jackman, L. M. Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy [Text] / L. M. Jackman, F. A.Cotton, - N-Y: Academic Press, 1975. - 660 p.

14. Sandstrom J. Dynamic NMR Spectroscopy [Text] / J. Sandstrom // London: Academic Press, 1982. - 226 p.

15. Oki, M. Application of dynamic NMR spectroscopy to organic chemistry [Text] / N-Y: Wiley-VCH, - 1985. - 423 p.

16. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide [Text] / R.B. Merrifield // J. Am. Chem. Soc. - 1963. - Vol.85. – P.2149.

17. Jones, J. Amino Acid and Peptide Synthesis [Text] / J. Jones - New York: Oxford University Press. - 2002. - P.92.

18. Filippov, A. Synthesis and aggregation studies on amyloid oligomers of Alzheimer's Abeta peptides [Text] / Licentiate of Technology Thesis. Department of Chemical Technology and Geosciences. Division of Chemical Engineering. Lulea University of Technology. 2010. 26 p. ISSN: 1402-1757 ISBN 978-91-7439-069-8. Lulea University of Technology 2010.

19. Li, T. Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: Comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice—Initial results [Text] / T. Li, K. Tachibana, M. Kuroki // Radiology. - 2003. - V. – 229. – P. 423–428.

20. Wolf, M. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactideco-glycolide) nanospheres [Text] / M. Wolf, M. Wirth, F. Pittner, F. Gabor // International Journal of Pharmaceutics. - 2003. – V. 256. – P. 141–152.

21. Mason, T. J. Practical sonochemistry: Uses and applications of ultrasound [Text] / T. J. Mason, , D. Peters. – Chichester, UK.: Horwood Publishing, 2002. – 543 p.

22. Soto, C. The alpha-helical to beta-sheet transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation [Text] / C. Soto, E. Castano, B. Frangione, N. Inestrosa // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – V. 271. – P. 3963–3967.

23. Lomas D. A. Serpinopathies and the conformational dementias [Text] / D. A. Lomas, R. W. Carrell // Nature Reviews Genetics. – 2002. - V. 3 (10). – P. 759.

24. Stefani M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution [Text] / M .Stefani, C. M. Dobson // Journal of Molecular Medicine. - 2003. – V. 81. – P. 678-699.

25. Berger, S. 200 and More NMR Experiments [Text] / S. Berger, S. Braun. – Weinheim: Wiley-VCH, - 2004. - 810 p.

26. Friebolin, H. Basic one- and two dimensional NMR spectroscopy [Text] / H. Friebolin // Weinheim; Basel; New York: Wiley-VCH. - 1991. - p. 344

27. Breitmaier, E. ^{13}C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry [Text] / E. Breitmaier, W. Woelter // Weinheim, N.-Y.: Verlag Chemie. - 1978. - p. 322

28. Wuthrich, K. NMR of proteins and nucleic acids [Text] / K. Wuthrich // N-Y: Wiley-VCH. - 1986. - p. 1-292, 396