

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление (специальность): 03.03.02 – Физика

Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ
АМИЛОИДОГЕННОГО ПЕПТИДА PАР (85-120)
МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студентка 4 курса

Группы 06-811

“21” июня 2022 г. М.О. Абрамова (М.О. Абрамова)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

“21” июня 2022 г. А.Р. Юльметов (А.Р. Юльметов)

Научный консультант

к.ф.-м.н., доцент

“21” июня 2022 г. Д. С. Блохин (Д. С. Блохин)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

“21” июня 2022 г. А.В. Аганов (А.В. Аганов)

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 Основы ЯМР спектроскопии	5
1.1 Природа ядерного магнитного резонанса	5
1.2 Квантовомеханическое описание ядерного магнитного резонанса	6
1.3 Чувствительность метода ЯМР	8
1.4 Параметры спектров ЯМР высокого разрешения	10
1.4.1 Химический сдвиг	10
1.4.2 Косвенное (скалярное) спин-спиновое взаимодействие	12
1.4.3 Интегральная интенсивность	12
2 Двумерная ЯМР спектроскопия	14
2.1 Импульсная спектроскопия	14
2.2 Схема двумерного эксперимента	15
2.3 Основные виды двумерных спектров	18
3 Экспериментальная часть	21
3.1 Объект исследования	21
3.2 Спектры ЯМР и их анализ для РАР (85-120) в водном растворе	22
3.3 Определение пространственной структуры	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) ослабляет иммунитет человека. Проникая в организм, ВИЧ поражает клетки иммунной системы. Данный вирус вызывает заболевание ВИЧ инфекции — синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД), который появляется вследствие работы вируса.

Было показано [1,2], что семенная жидкость человека содержит амилоидные фибриллы SEVI (*Semen-derived enhancer of viral infection* — полученный из спермы усилитель вирусной инфекции), которые способны повышать уровень распространения ВИЧ-заболеваний. Фибриллы SEVI формируются из двух пептидных фрагментов простатической кислой фосфатазы (PAP): PAP (248-286) и PAP (85-120). SEVI выступают в качестве «мостика» при взаимодействии вирионов ВИЧ и клеток организма человека. Без участия амилоидных фибрилл вероятность взаимодействия вирионов ВИЧ и клеток организма мала из-за того, что их поверхности имеют отрицательный заряд. Поверхность амилоидных фибрилл имеет положительный заряд, что позволяет им являться посредником при взаимодействии вириона и клеток организма человека.

Целью данной работы было установление пространственного строения пептида PAP (85-120). Информация о структуре пептида лежит в основе понимания механизмов, с помощью которых происходит образование амилоидных фибрилл и взаимодействие амилоидных фибрилл с клетками.

Для установления пространственной структуры PAP (85-120) был выбран метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) — один из мощных и эффективных методов исследования химических соединений с целью получения информации о составе и расположении частей молекулы относительно друг друга. Главной особенностью метода ядерной магнитной

резонансной спектроскопии является то, что благодаря анализу спектральных линий можно получить информацию о строении молекул.

Основными и часто используемыми экспериментами метода являются получение одномерных и двумерных спектров. Одномерные эксперименты — это те, в которых используются спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах углерода-13 (^{13}C) и на ядрах водорода-1 (^1H). В спектрах для веществ со сложной химической структурой бывают проблемы, например, перекрывание сигналов. В данном случае использование двумерных экспериментов позволяет справиться с такими трудностями. Кроме того, двумерные методики ядерной магнитной спектроскопии позволяют выполнить идентификацию сигналов от различных групп ядер и выявить взаимодействие между ними.

Целью данной работы являлось установление пространственной структуры пептида PAP (85-120) методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

При этом необходимо было решить следующие задачи:

- Записать спектры ЯМР водного раствора пептида PAP (85-120): одномерные на ядрах ^1H и ^{13}C , двумерные HSQC, TOCSY, NOESY.
- Провести расшифровку полученных спектров, сделать приписание сигналов, определить химические сдвиги.
- Из анализа спектров NOESY определить ограничения на межъядерные расстояния.
- Установить пространственную структуру пептида PAP(85-120) в водном растворе.

1 Основы ЯМР спектроскопии

1.1 Природа ядерного магнитного резонанса

Все вещества состоят из электронов и ядер. Электроны участвуют в орбитальном (l) и в спиновом (s) движениях. Данные виды движения характеризуются следующими моментами: механическим \vec{P} и магнитным $\vec{\mu}$. Значимую роль в ЯМР играет магнитный момент, который является мерой движения заряженных частиц[3].

При облучении исследуемого вещества радиочастотным полем происходит его поглощение магнитными спинами, при некоторой частоте облучения поглощение максимально и наступает резонанс. Это явление обусловлено ядерным магнетизмом. Ядра в исследуемом веществе начинают выстраиваться в одном направлении (по полю или против поля) при попадании в магнитное поле, подобно магнитам. Самым распространенным химическим элементом, из которого в основном состоит видимая часть материи, является водород (H). Если ядрам ^1H в исследуемом веществе присущи магнитные свойства, то при помещении такого вещества в центр катушки, которая расположена между полюсами магнита, и через которую пропущен переменный ток определенной частоты, при определенном значении напряженности магнитного поля исследуемое вещество будет поглощать энергию. Ток через катушку, которая создает переменное магнитное поле, будет увеличиваться. Таким образом, при воздействии на систему, будем измерять ее отклик и получать спектр[4].

Итак, ЯМР — это явление резонансного поглощения энергии электромагнитного поля системой ядерных магнитных моментов[5].

1.2 Квантовомеханическое описание ядерного магнитного резонанса

Из классической и квантовой механики известно, что взаимосвязь между механическим и магнитным моментами выражается через гиромагнитное соотношение γ , которое зависит от типа ядра:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P}. \quad (1)$$

Еще одно понятие, которое отвечает за магнитные свойства — это спин. Спин есть у каждой частицы и это не классическая величина, а квантовая. Он характеризует внутреннее движение частицы и при этом не зависит от того, какое у частицы внешнее движение. Спин \vec{I} — это угловой момент, который связан с магнитным моментом соотношением:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}. \quad (2)$$

Угловой момент спина квантуется, как и все угловые моменты. Его различные квантовые состояния получаются с помощью спинового квантового числа I . Проекция спина на определенную ось характеризуется с помощью набора значений магнитного квантового числа m_I , которое изменяется от $-I$ до I с шагом в единицу. Ориентация спина в пространстве — дискретная, как и набор m_I .

Рассмотрим ядро с $I = 1/2$ и $m_I = \pm 1/2$. Его можно интерпретировать как магнитный диполь, проекция магнитного момента на ось z (выбранная произвольно) которого принимает положительные или отрицательные значения (рисунок 1).

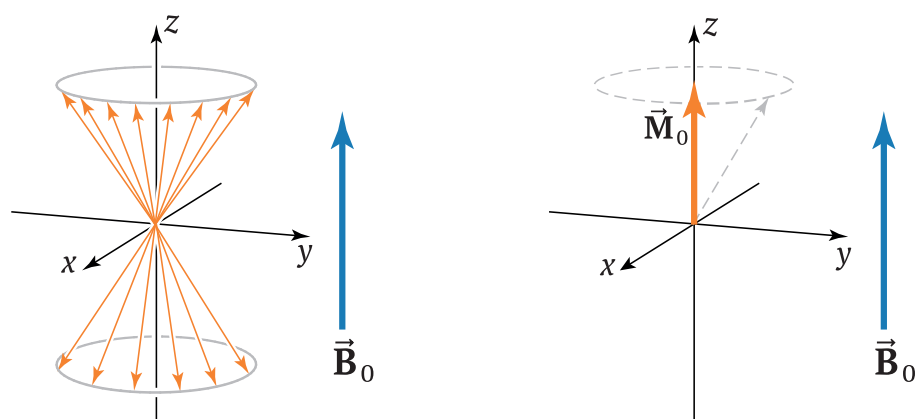


Рисунок 1 — Распределение прецессирующих магнитных моментов ядер при наличии магнитного поля (слева) и направление результирующего вектора намагниченности \vec{M}_0 (справа)[6]

В отсутствие приложенного внешнего магнитного поля все механические и магнитные спиновые моменты электрона ориентированы случайным образом и имеют почти одинаковую энергию. Такие состояния называются вырожденными. Но для того, чтобы получить спектр методом ЯМР, необходимо наличие двух и более различных состояний, которые имеют различные энергии. Это нужно для того, чтобы были переходы между уровнями. Снять вырождение можно приложением внешнего магнитного поля \vec{B}_0 , при наличии которого магнитные моменты электрона ориентируются по полю или против поля. Их энергии изменяются, энергетический уровень расщепляется на два. Поглощенный фотон переводит ядерный спин из своего основного состояния в возбужденное. Энергия уровней будет изменяться в соответствии со следующей формулой:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0. \quad (3)$$

Если направление вектора магнитного момента ядра совпадает с выбранной осью z , то разница энергий в расщепленном состоянии выражается формулой:

$$\Delta E = 2\mu_z B_0 = \hbar\gamma B_{0z}. \quad (4)$$

Рассмотрим систему с двумя энергетическими уровнями: m — это более низкий уровень с меньшей энергией, а n — это более высокий уровень с большей энергией.

Чтобы был переход между m и n должны выполняться правила отбора и правила квантования:

$$\begin{aligned}\hat{I}^+ |I, m\rangle &= \sqrt{I(I+1) - m(m+1)} |I, m+1\rangle, \\ \hat{I}^- |I, m\rangle &= \sqrt{I(I+1) - m(m-1)} |I, m-1\rangle.\end{aligned}\tag{5}$$

Кроме того, необходимо сообщить квант энергии:

$$\Delta E = E_n - E_m = h\nu = \hbar\omega_0.\tag{6}$$

Возбуждение переходов между этими состояниями стимулируется с помощью радиочастотного (РЧ) электромагнитного излучения. При совпадении частоты РЧ поля с ларморовской частотой ω_0 будет наблюдаться максимум поглощения — явление ЯМР. Ларморовская частота — та частота, с которой прецессирует спин во внешнем магнитном поле. Связь ларморовской частоты с прикладываемым полем:

$$\omega_0 = \gamma B_0.\tag{7}$$

1.3 Чувствительность метода ЯМР

ЯМР спектроскопия является методом исследования с очень низкой чувствительностью (амплитудой получаемого резонансного поглощения РЧ поля). Из-за низкой чувствительности время эксперимента увеличивается, так как необходимо проводить серию экспериментов.

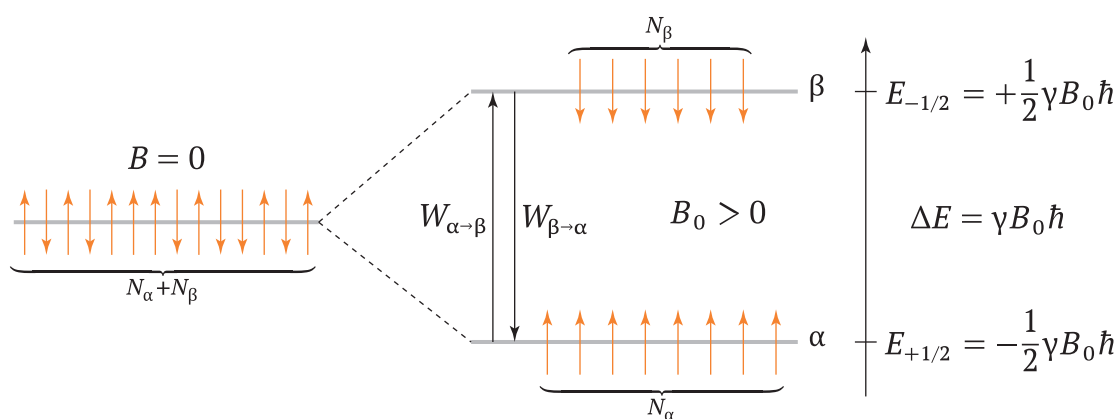


Рисунок 2 — Энергия системы ядер со спином $\frac{1}{2}$. При отсутствии магнитного поля состояния вырождены (слева). Если поместить систему в магнитное поле \mathbf{B}_0 , то возникает два уровня энергии с разной заселенностью (справа)[7]

Чувствительность зависит от того, насколько заселены уровни, и от вероятности перехода между ними. Связь заселенности уровней и вероятностями перехода характеризуется следующим соотношением:

$$N_n W_{n \rightarrow m} = N_m W_{m \rightarrow n} , \quad (8)$$

где N_n , N_m — заселенность уровней n и m соответственно, а $W_{n \rightarrow m}$, $W_{m \rightarrow n}$ — вероятности переходов с уровня n на m и наоборот (рисунок 2).

В методе ЯМР отличие населенностей уровней очень мало (разница между уровнями энергии минимальна, как и частота электромагнитного излучения, которая используется на эксперименте), вследствие чего времена прихода системы в равновесное состояние оказываются очень длинными.

Как говорилось выше, эксперименты метода ЯМР проводятся на ядрах ^{13}C , которого содержится 1% в природе (таблица 1). Данный фактор усложняет проведение эксперимента, так как влияет на его чувствительность. Если чувствительность низкая, то время всего эксперимента увеличивается, так как возникает необходимость повторять импульсную программу, чтобы выполнить накопление сигнала.

Таблица 1 — Характеристические особенности ядер, которые чаще всего используются в спектроскопии ЯМР биомолекул[7]

Ядро	Естественное содержание	Относительная чувствительность	Абсолютная чувствительность
^1H	99,98	100,0	100,0
^{13}C	1,11	1,6	0,018
^{31}P	100,0	6,6	6,6
^{19}F	100,0	83,0	83,0

1.4 Параметры спектров ЯМР высокого разрешения

1.4.1 Химический сдвиг

Одним из самых важных и полезных спектральных и структурных параметров ЯМР является химический сдвиг. Благодаря ему мы можем предсказать расположение групп структуры химического вещества. Но при этом, для одного и того же типа ядер могут наблюдаться разные сигналы. Это происходит из-за того, что «соседи» могут быть другими, то есть химический сдвиг зависит от окружения исследуемого ядра. Из-за наличия данного параметра ЯМР спектра максимум энергии прикладываемого поля будет наблюдаться на интервале частот $\nu_0 \pm \Delta\nu$. То есть химический сдвиг — смещение получаемого сигнала ЯМР в зависимости от «соседей» [8].

Природа химического сдвига основана на возникновении локальных магнитных полей, вследствие которых наблюдается экранирование. Когда мы помещаем исследуемое вещества в постоянное магнитное поле \vec{B}_0 , как говорилось выше в пункте 1.2, возникает дополнительная циркуляция электронного облака, что приводит к возникновению диамагнитного момента,

которое, по закону Ленца, направлено в противоположную сторону от внешнего поля. При этом создается вторичное индуцированное (локальное) магнитное поле $\vec{B}_{\text{лок}}$, которое тоже действует на ядро. Таким образом, действие внешнего магнитного поля понижается на величину

$$B_{\text{лок}} = \sigma B_0, \quad (9)$$

где σ — это константа экранирования.

Если ядра экранированы, то выражение для эффективного магнитного поля, которое действует на ядро:

$$B_{\text{эф}} = B_0 - B_{\text{лок}} = B_0(1 - \sigma). \quad (10)$$

Итак, ядра в различных химических средах испытывают воздействие разных локальных полей и из-за этого сигналы возникают на разных частотах. Это происходит вследствие экранирующих эффектов локальных электронов.

Различия в частотах выражаются с помощью специальной δ -шкалы, единицы измерений которой являются безразмерными и являются миллионными долями (м.д., или *part per million* — ppm). Миллионные доли составляют $1/1000000$ от базового значения величины, в нашем случае от частоты резонанса, которая составляет 700 МГц. С помощью них можно выполнить идентификацию сигналов от различных групп ядер.

На химические сдвиги влияют многие факторы, например: электроотрицательность атомов, находящихся рядом; гибридизация связей, которая связана с геометрией молекул и близостью к химическим структурам, которые содержат много электронов; электрические поля и вторичные магнитные поля, а также внешние факторы (температура, растворители и т.д.)

1.4.2 Косвенное (скалярное) спин-спиновое взаимодействие

Косвенное или не прямое спин-спиновое взаимодействие влияет на расщепление резонансных линий в спектрах ЯМР и является причиной появления мультиплетной структуры [8]. Данное взаимодействие называется косвенным, потому что информация о поворотах спина в ядрах передается с помощью электронов через взаимодействие ядерных и электронных спинов. Также оно называется скалярным, так как ориентация спинов относительно друг друга не влияет на это взаимодействие.

Выражение для энергии непрямого спин-спинового взаимодействия:

$$E = J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2, \quad (11)$$

где J_{12} — это константа косвенного спин-спинового взаимодействия (КССВ), которая определяется разницей частот между расщепленными линиями в спектре.

Знак КССВ может принимать положительное или отрицательное значение. С помощью него можно узнать ориентацию спинов из расщепления линий спектра. Но это не распространяется на спектры первого порядка.

1.4.3 Интегральная интенсивность

Еще одним параметром спектра ЯМР является интегральная интенсивность сигнала, которая пропорциональна количеству ядер, дающий данный сигнал. Ядрами чаще всего являются протоны, но также могут быть и другие, например, ^{13}C . Узнать относительное количество ядер позволяет площадь под линией сигнала спектра. Например, из рисунка 3 видно, что части спектра «4» соответствует 2 протона, а «11» соответствует 3.

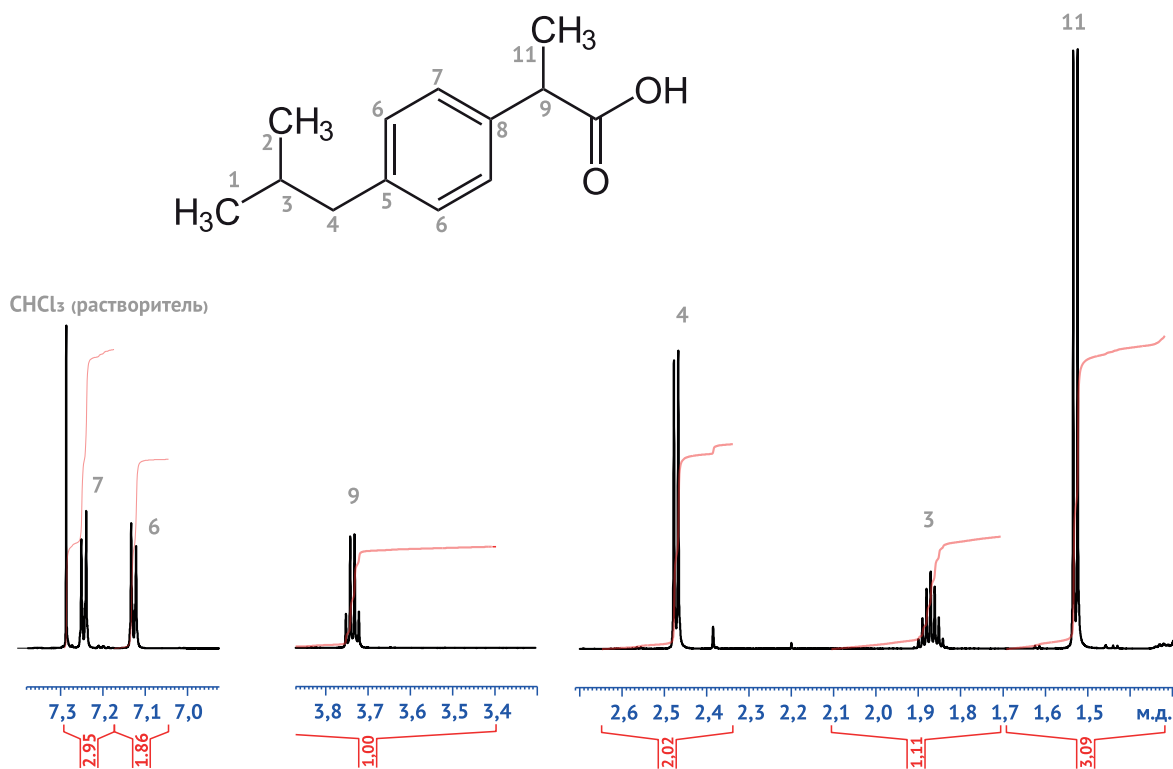


Рисунок 3 — ЯМР ¹Н спектр ибупрофена в хлороформе с указанием интегральных интенсивностей и без карбоксильной группы

2 Двумерная ЯМР спектроскопия

2.1 Импульсная спектроскопия

С помощью импульсных методов можно получить отклик спиновой системы и спектр ЯМР за сравнительно короткое время, сопоставимое с временем релаксации системы. Также импульсная спектроскопия хороша тем, что улучшается отношение полученного сигнала к шуму[6].

Метод заключается в том, что мы воздействуем на исследуемое вещество коротким (порядка микросекунд) РЧ импульсом, вследствие которого вектор намагниченности \vec{M} совершает поворот. Отклонение от изначального направления вектора намагниченности (угол отклонения от оси z) характеризуется следующим выражением:

$$\theta = \omega_1 t_p = \gamma B_1 t_p, \quad (12)$$

где ω_1 — частота радиочастотного поля, которым мы воздействуем, чтобы создать импульс, B_1 — его амплитуда, t_p — время воздействия (длительность импульса).

Рисунок 4 иллюстрирует поворот вектора намагниченности от его начального направления (вдоль оси z) при включении РЧ поля B_1 , с помощью которого подаем импульс на систему в течение времени t_p . Далее регистрируют затухание сигнала в направлении, перпендикулярном приложенному магнитному полю (спад свободной индукции).

После использования импульсного метода, полученный сигнал обрабатывается с помощью преобразования Фурье, который позволяет совершить превращение зависимости от времени к зависимости от частоты, то есть перейти к обычному ЯМР спектру[9].

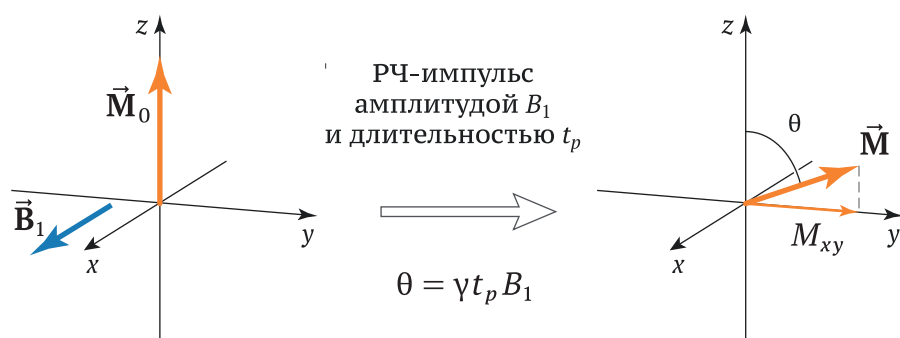


Рисунок 4 — Изменение ориентации вектора намагниченности после действия импульса

2.2 Схема двумерного эксперимента

В двумерных спектрах (2D-спектрах) ЯМР сигнал зависит не от одной частоты, как это было в одномерных спектрах, а от двух. Например, ^1H и ^{13}C .

Чтобы провести 2D-эксперимент сначала систему переводят в неравновесное состояние, то есть проводят подготовку системы. Это совершается с помощью подачи импульса $\pi/2$. В результате вектор намагниченности меняет ориентацию — «падает» на плоскость xy . Далее происходит эволюция системы спинов — прецессия спинов под действием взаимодействий между ними. Во время этого процесса, который происходит в течение времени t_1 , импульсы не подаются. Третьим шагом подаем еще один импульс $\pi/2$, который провоцирует обмен намагниченностями между спинами так, что появляется наблюдаемый сигнал. Этот шаг называется смешивание. Изменяя время t_1 , можно проводить несколько регистраций спектров[9]. Зависимость наблюдаемого при этом сигнала от времени показана на рисунке 5.

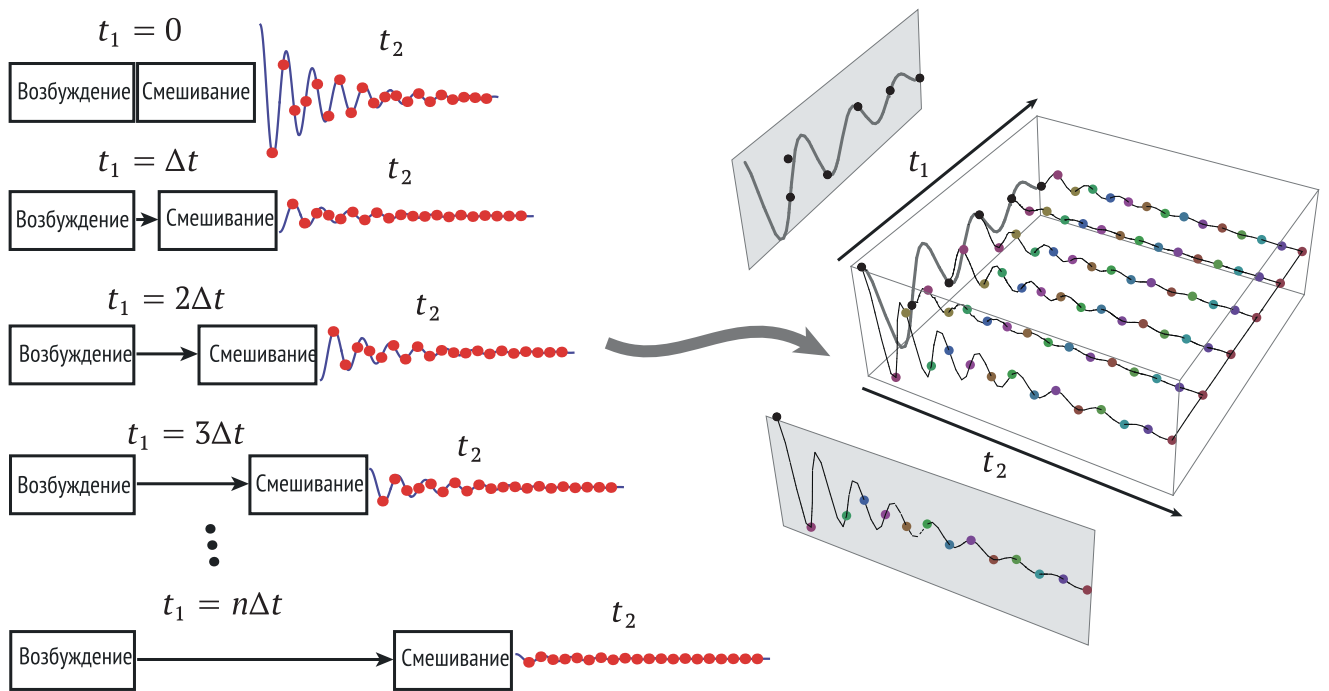


Рисунок 5 — Зависимость детектируемого сигнала от времени эволюции t_1

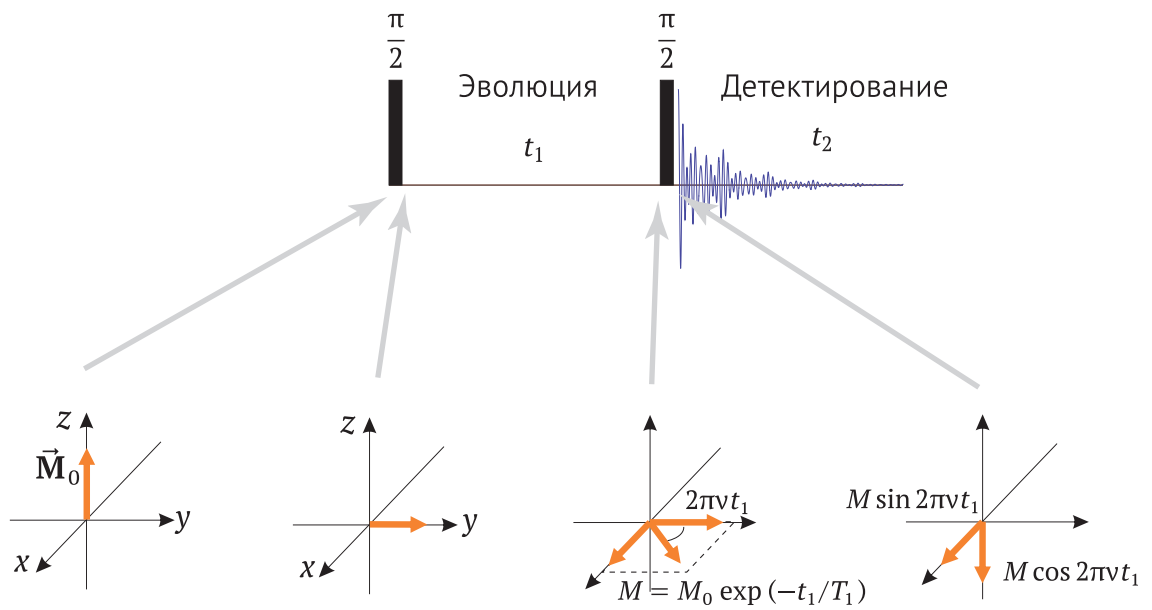


Рисунок 6 — Схема двумерного эксперимента

После всех действий наблюдаем ССИ и детектируем обе проекции намагниченности: и по оси x , и по оси y . Каждую регистрацию ССИ нужно записывать как косинус и синус. Это необходимо для точного определения фазы и для того, чтобы определить правильную форму сигнала поглощения. Схематичное представление всех вышеперечисленных процессов показано на рисунке 6.

В итоге эксперимента получаем двумерный сигнал, по двум осям которого отложено время t_1 и t_2 — время регистрации сигнала. Чтобы получить частотный спектр, используем метод математической обработки — преобразование Фурье. В результате сигнал превращается в контурное представление двумерного спектра, на осях которого отложены частоты ν_1 и ν_2 [10]. Частота ν_1 соответствует прецессии намагниченности за время t_1 , а частота ν_2 — за время t_2 (рисунок 7).

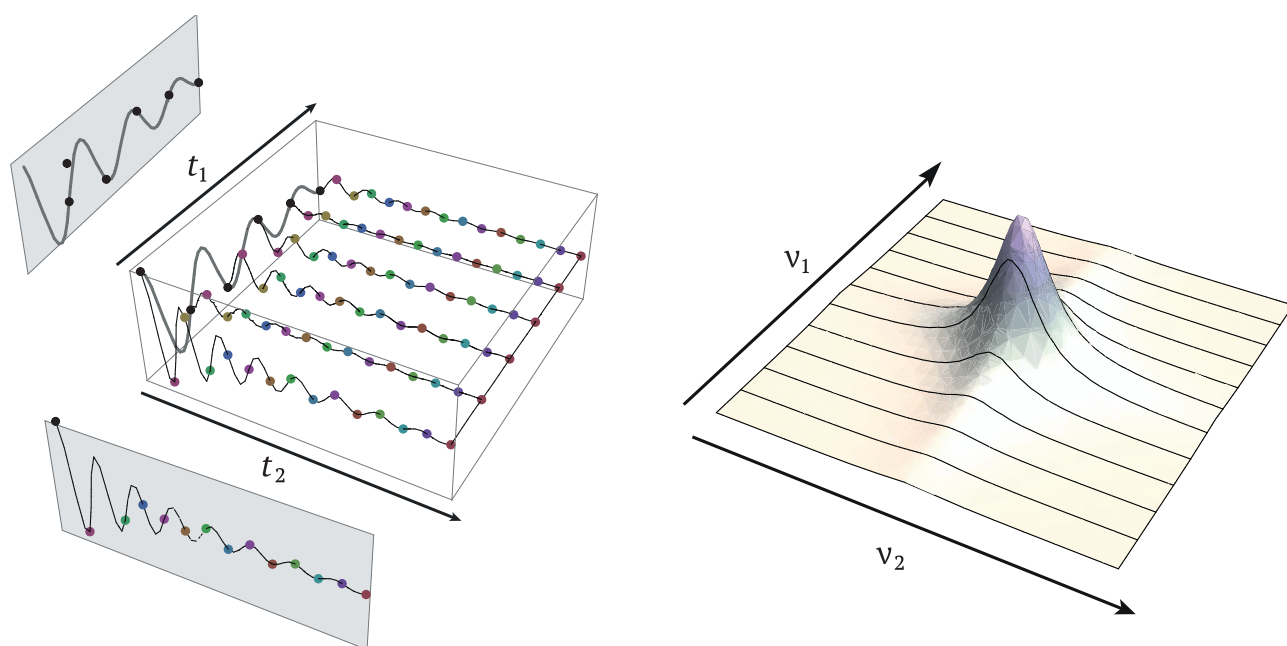


Рисунок 7 — Двумерный сигнал до обработки преобразованием Фурье (слева) и после (справа)

2.3 Основные виды двумерных спектров

HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) — эксперимент, с помощью которого можно идентифицировать взаимодействие двух разных типов ядер, соединенных через КССВ[11]. Данный эксперимент проходит по двум каналам: ^1H и ^{13}C (рисунок 8).

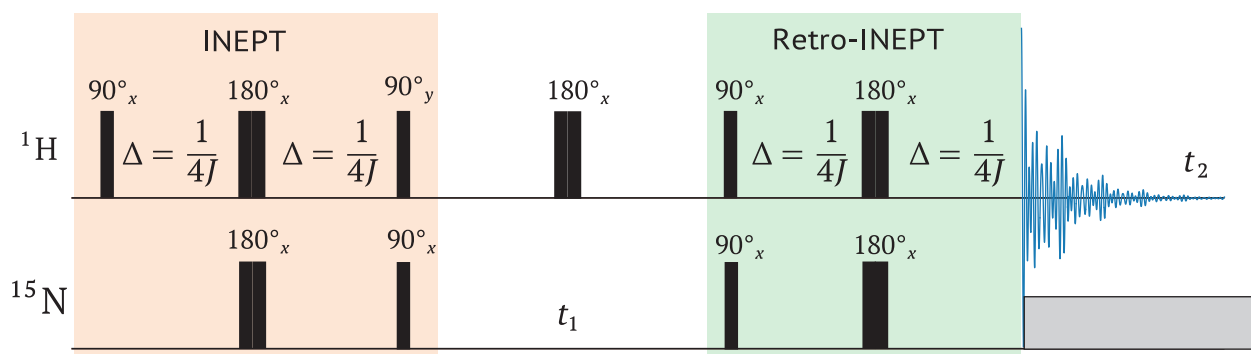


Рисунок 8 — Вид импульсной программы эксперимента[12].

По двум каналам подаются импульсы в 90° и 180° . В закрашенной области INEPT намагниченность переносится с ^1H на ^{13}C , а в Retro-INEPT — наоборот с ^{13}C на ^1H

В спектре HSQC каждая из частотных осей соответствуют своему типу ядер (ν_1 — ядрам ^{13}C , ν_2 — ядрам ^1H), сигнал регистрируется от ядер ^1H , что улучшает чувствительность эксперимента[13]. В спектре наблюдаются кросс-пики, чьи координаты соответствуют резонансным частотам ядер ^1H и ^{13}C , связанным косвенным спин-спиновым взаимодействием. Величина сигналов зависит от величины константы КССВ, поэтому как правило наблюдаются только сигналы от пар ядер, испытывающих КССВ через одну химическую связь.

Эксперимент HSQC может проводиться и на других типах ядер, например на ядрах ^1H и ^{15}N . Поскольку ядро азота ^{15}N при его естественном содержании обладает очень низкой чувствительностью, то эксперимент TOCSY — на практике часто единственный способ определить химические сдвиги ядер азота.

TOCSY (*Total correlation Spectroscopy*) — эксперимент, с помощью которого можно идентифицировать взаимодействие между ядрами в пределах одной спиновой системы, соединенных через КССВ[14] (рисунок 9)).

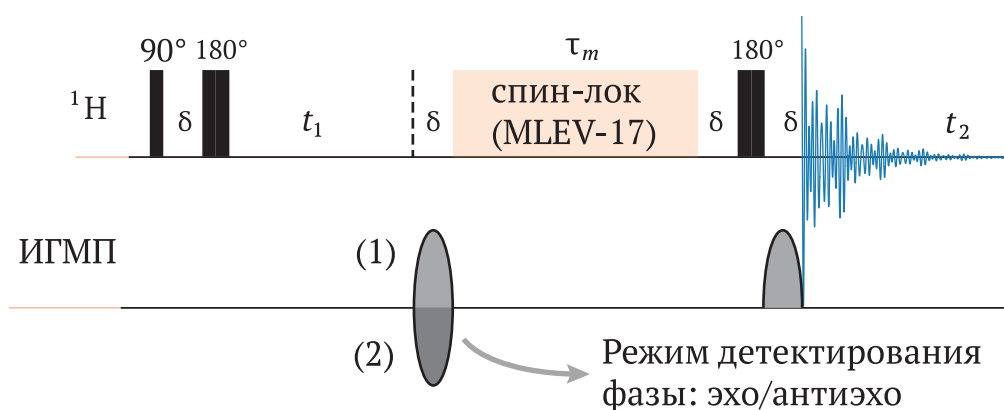


Рисунок 9 — Импульсный вид программы эксперимента TOCSY. Сначала идет подготовка системы, затем эволюция, смешивание и детектирование полученного сигнала. Во время смешивания t_m происходит обмен намагниченностями между спинами вследствие чего наблюдаются кросс-пики на спектре

NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) — эксперимент, с помощью которого можно идентифицировать взаимодействие между ядрами водорода, которые близко расположены по отношению друг к другу в пространстве (рисунок 10)).

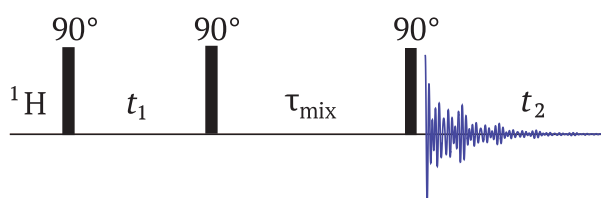


Рисунок 10 — Импульсный вид программы эксперимента NOESY. Основа эксперимента — эффект Оверхаузера. Он протекает за время смешивания t_{mix}

Эффект Оверхаузера основан на переносе намагниченности с одного облучаемого ядра на другое, которое находится рядом в пространстве[9]. Намагниченность спинов меняется со скоростью кросс-релаксации, механизм которой основан на диполь-дипольном взаимодействии спинов, которые обмениваются намагниченностью. Чем сильнее диполь-дипольное взаимодействие между ядрами, тем сильнее по интенсивности будет кросс-пик. Скорость кросс-релаксации определяется:

$$\sigma_{IS} = \gamma^4 \left(\frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - 1 \right) \frac{\tau_c}{r_{IS}^6}, \quad (13)$$

где I и S — спины, которые обмениваются намагниченностями, γ — гиромагнитное отношение, τ_c — время корреляции, r_{IS} — расстояние между ядрами, ω_0 — резонансная частота.

Таким образом, измерив интегральную интенсивность линии в спектре NOESY, можно определить расстояние между соответствующими ядрами. Точная оценка расстояния, однако, затруднена, поскольку требует знания такого параметра, как время корреляции и зависимости интенсивности сигнала от времени смешивания (что необходимо для измерения скорости кросс-релаксации). Поэтому обычно из одиночного спектра NOESY получают только достаточно грубую (с точностью 0,5...1,0 ангстрем) оценку межъядерного расстояния.

Рассмотрим классификацию типов структуры белка. Всего их 4 вида: первичная, вторичная, третичная и четвертичная (рисунок 13).

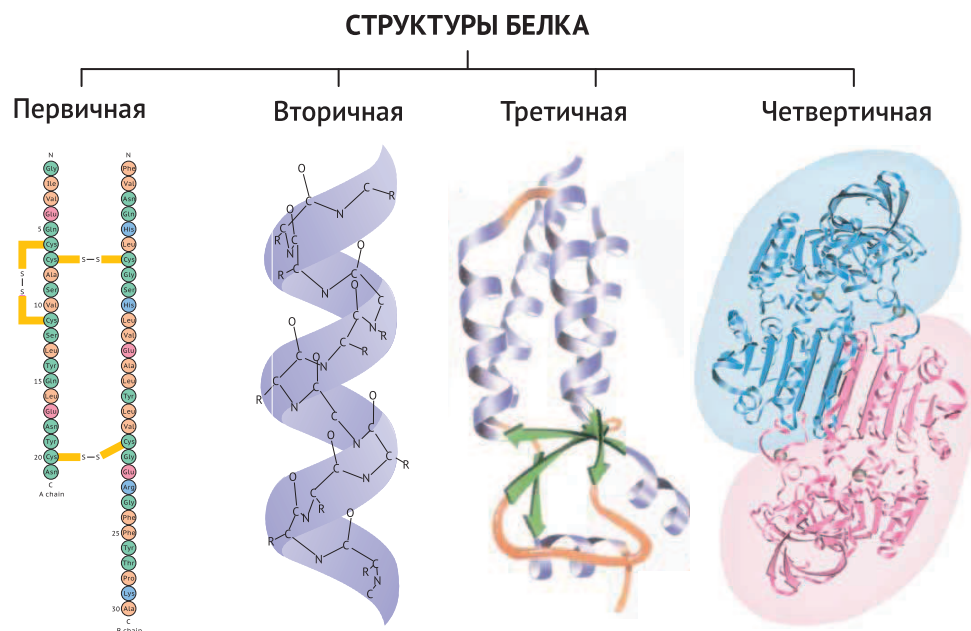


Рисунок 13 — Схематическое изображение различных типов структуры белка

Первичная структура представляет собой цепочку аминокислот, которые соединены пептидной связью. Вторичная структура получается в случае, если молекула образует спиралевидную форму или бета-складки. Третичная форма — глобула или шар, образованная четырьмя типами связей: дисульфидной, гидрофобной, ионной и водородной. Четвертичная является смесью нескольких третичных: шаров, образованных четырьмя типами связей.

3.2 Спектры ЯМР и их анализ для РАР (85-120) в водном растворе

Были записаны одномерный ^1H и двумерные ^1H - ^1H TOCSY и NOESY спектры РАР (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$). Регистрация спектров проводилась на ЯМР-спектрометре 700 МГц (Bruker, AVANCE III 700) при температуре 298 К.

Одним из записанных двумерных спектров был спектр, полученный в результате проведения эксперимента ^1H - ^1H TOCSY. Количество точек при записи спектра составляет 2048 x 512 (параметр TD). Накопление сигнала происходило по результатам 64 накоплений (параметр NS). Релаксационная задержка составляла 1,5 секунд, время смешивания 0,1 секунд, а длительность импульса в 90° составила 11,17 микросекунд. С помощью данного спектра, были идентифицированы сигналы, которые соответствуют ядрам в пределах одной спиновой системы (одного аминокислотного остатка).

За основу при анализе сигналов в спектре TOCSY были взяты значения химических сдвигов для протонов NH-групп, для каждой такой группы были найдены кросс-пики, соответствующие протонам других групп того же самого аминокислотного остатка (рисунок 14).

Рассмотрим в качестве примера идентификацию сигналов ядер ^1H для аминокислоты аргинина **86 Arg**, где номер означает порядковый номер аминокислоты в последовательности PAP (85-120). В состав данной аминокислоты входят следующие группы: HN, H α , H β , H γ , H δ . В таблице 2 представлены литературные данные для значений химических сдвигов ^1H для аргинина.

Таблица 2 — Значение химических сдвигов ^1H ЯМР (δ_H , м.д.) значения химических сдвигов для аргинина. Литературные данные [11,15]

	HN	H α	H β	H γ	H δ	Другие (NH)
Arg	8,24	4,27	1,79	1,58	3,13	7,32 6,74 6,72

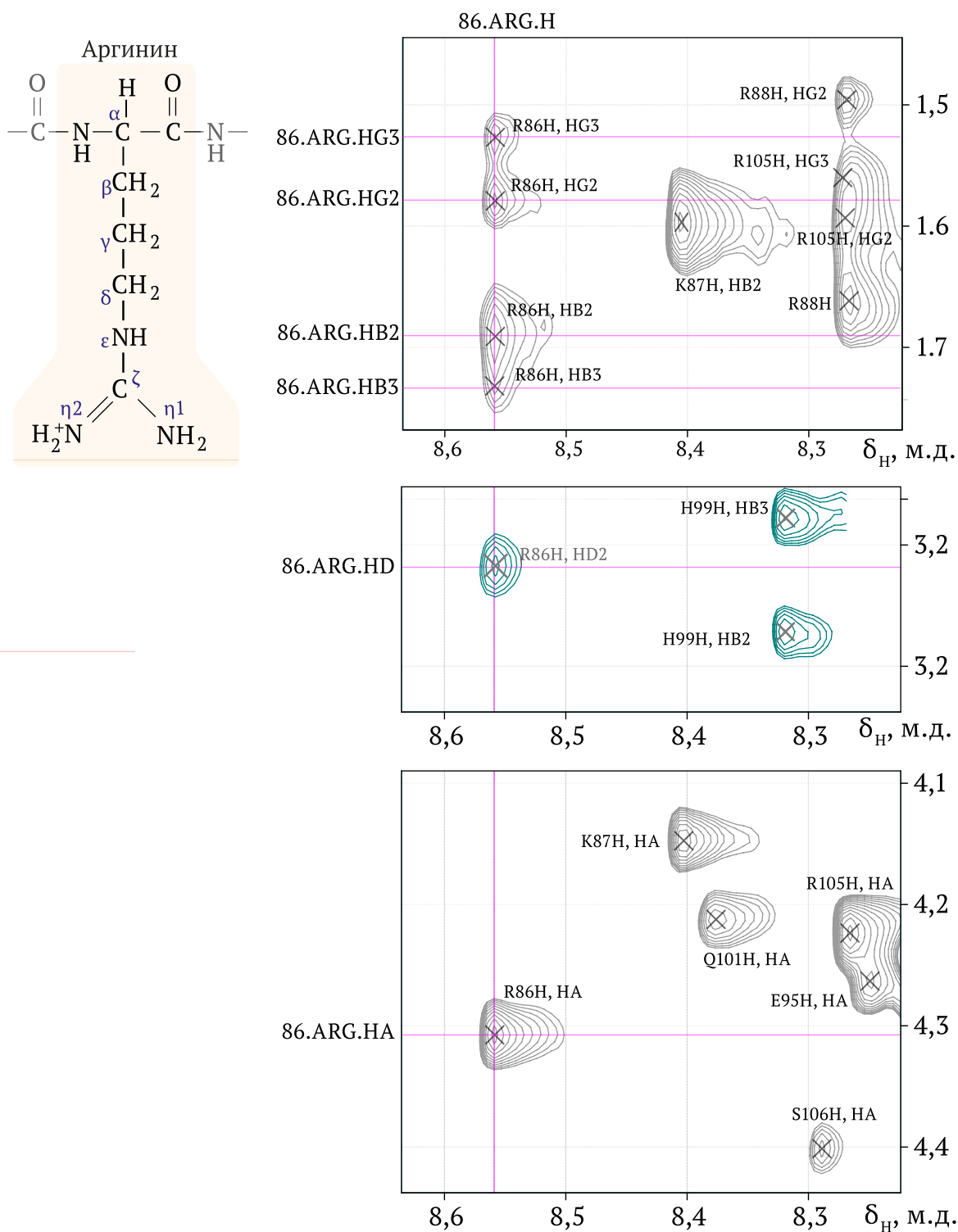


Рисунок 14 — Фрагмент двумерного спектра ^1H - ^1H пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 298 К, на пересечении линий находятся кросс-пики, соответствующие одной из протонных групп аминокислоты аргинина

Рассмотрим фрагмент спектра, который кросс-пики для сигнала со значением химического сдвига 8,57 м.д. в амидной области спектра. Первый кросс-пик, который соответствует протонной группе Н рассматриваемой аминокислоты 86 Arg, соответствует значению химического сдвига 4,31 м.д. (рисунок 14, нижний фрагмент). Из сравнения с литературными данными (таблица 4) можно сделать вывод, что это сигнал от Н α протона.

Следующие кросс-пики (со значениями химических сдвигов 1,67 м.д. и 1,73 м.д.) принадлежат группе Н β , наличие двух сигналов говорит о том, что протоны в этой группе неэквивалентны. Далее следует протоны Н γ , которые также является неэквивалентными. От данной группы наблюдаются 2 кросс-пики со значениями химических сдвигов 1,58 м.д. и 1,53 м.д. (рисунок 14, верхний фрагмент).

Группа Н δ , связанная через спин-спиновое взаимодействие с группой Н γ , имеет сигнал со значением химического сдвига 3,11 м.д. (рисунок 14, средний фрагмент). Также наблюдается сигнал от группы Н ϵ , имеющий значение химического сдвига 7,10 м.д.

Таким образом, для выбранного значения химического сдвига амидной группы (8,57 м.д.), из анализа сигналов в спектре TOCSY мы получили значения химических сдвигов для остальных протонов выбранного аминокислотного остатка. При этом из сравнения химических сдвигов с известными табличными значениями можно определить вид найденного остатка (в приведенном примере — аргинин) и найти соответствие найденных значений химических сдвигов с протонами этой аминокислоты.

Последовательность аминокислот в структуре была установлена с помощью анализа спектра, полученного с помощью двумерного эксперимента ^1H - ^1H NOESY (рисунок 15). Количество точек при записи спектра составляет 2048×512 (параметр TD). Накопление сигнала происходило по результатам 24 накоплений (параметр NS). Релаксационная задержка составляла 1,5 секунд, время смешивания 0,25 секунд, а длительность импульса в 90° составила 11,22 микросекунд.

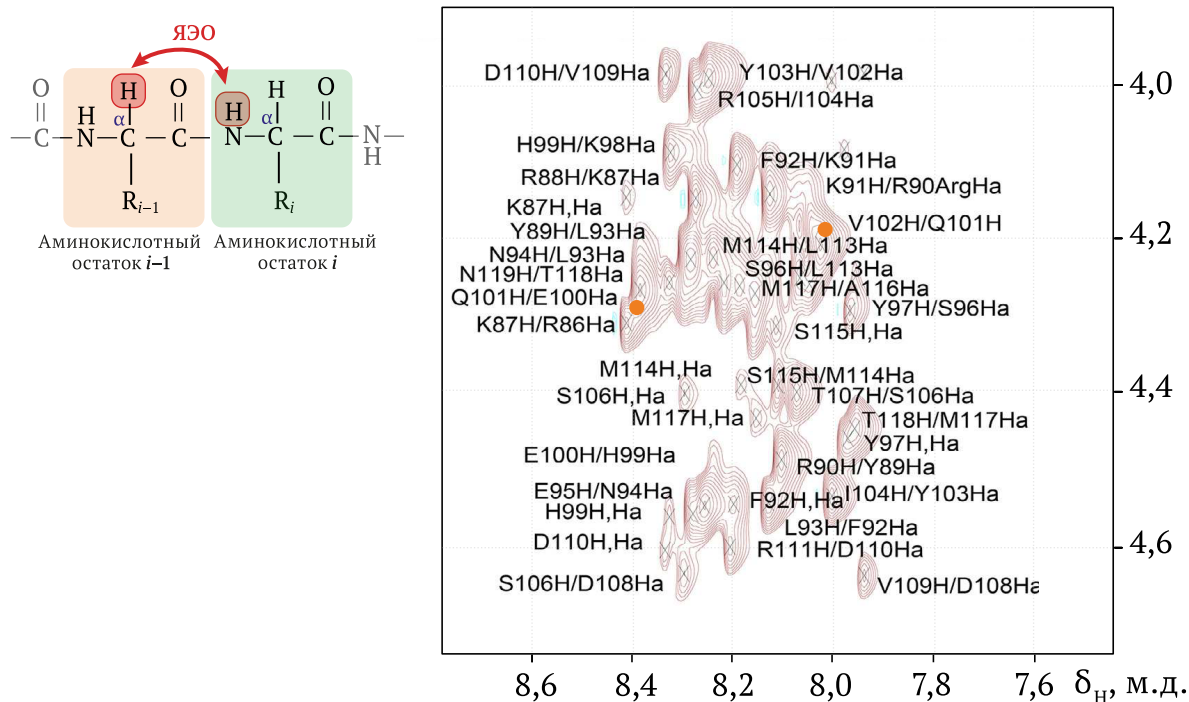


Рисунок 15 — Фрагмент двумерного спектра ^1H - ^1H NOESY пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 298 К, выделены кросс-пики, которые соответствует ЯЭО между протонами NH и H_α соседних аминокислотных остатков: валина 102V

Рассмотрим цепочку 100 Glu – 102 Val. На рисунке 15 видим кросс-пик на пересечении двух прямых, которому соответствуют значения химических сдвигов, равных 8,36 м.д. и 4,26 м.д. Они соответствуют группе NH аминокислоты глутамина 101 Gln (однобуквенное обозначение Q), которая является единственной в цепочке аминокислот образца исследования PAP (85-120),

а также группе $\text{H}\alpha$ глутаминовой аминокислоты 100 Glu(однобуквенное обозначение E). Таким образом можно сделать вывод о том, что аминокислоты глутамин и глутаминовая кислота идут друг за другом. Далее на рисунке 15 видим на пересечении двух прямых кросс-пик, соответствующий значениям химических сдвигов 8,01 м.д. и 4,20 м.д. Данные химические сдвиги соответствуют группе HN валина 102 Val(V) и группе $\text{H}\alpha$ глутамина 101 Gln(Q). Аналогично можно сделать вывод о том, что данные аминокислоты находятся рядом друг с другом в пространстве.

Таким образом, для того, чтобы соотнести химические сдвиги ^1H , использовались двумерные эксперименты ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY. Спектры данных экспериментов (рисунки 15 и 16) были проанализированы и была произведена идентификация химических сдвигов ^1H объекта исследования PAP (85-120). Результаты представлены в таблице 3.

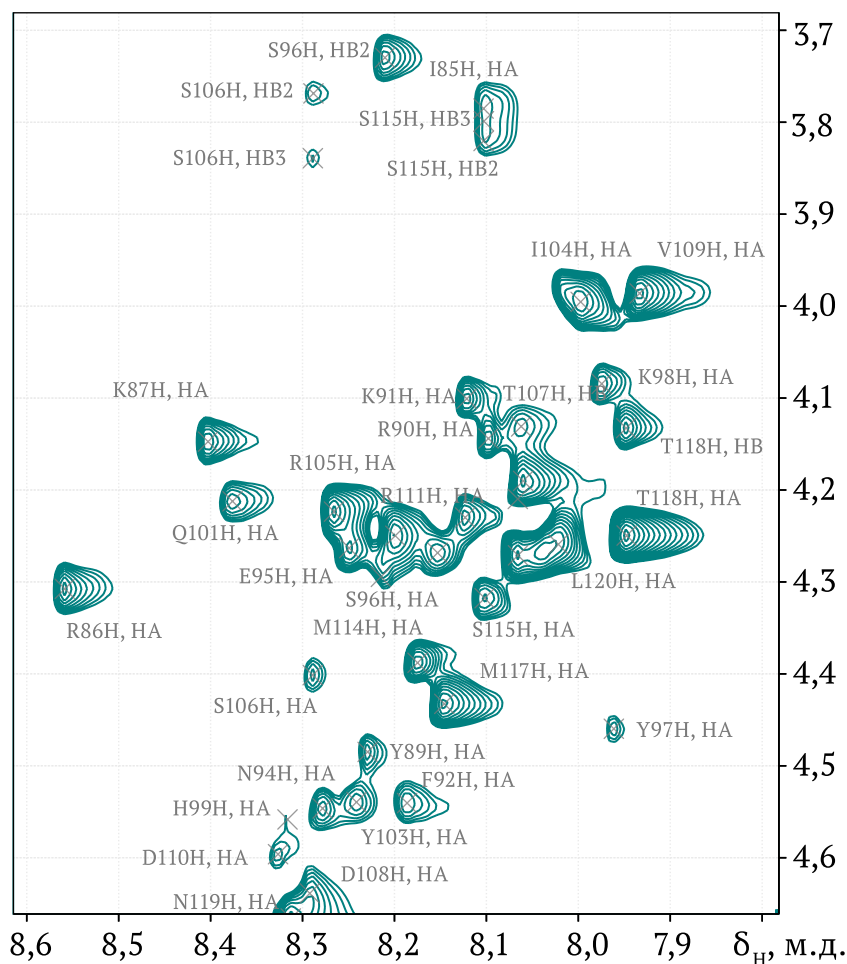


Рисунок 16 — Фрагмент двумерного спектра ^1H - ^1H TOCSY пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 298 К

Таблица 3 — Параметры, использованные при проведении экспериментов HSQC (TD — количество точек при записи спектра, NS — количество накоплений, $D1$ — релаксационная задержка, $P1$ — длительность импульса в 90° для канала ^1H , а $P2$ — длительность импульса в 90° для каналов ^{15}N и ^{13}C)

	TD	NS	$D1$, с	$P1$, мкс	$P2$, мкс	J , Гц
^1H - ^{15}N HSQC	2048x512	128	1,5	11,58	32,70	90
^1H - ^{13}C HSQC	2048x1024	64	1,5	11,52	11,00	145

Таблица 4 — Значение химических сдвигов ^1H (δ_{H} , м.д.) пептида PАР (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}/90\% + 10\%$) при 298 К.

	HN	H α	H β	Другие
85 Ile	–	3,79	1,87	H γ : 1,12 0,90; H δ : 0,84
86 Arg	8,57	4,31	1,68 1,73	H γ : 1,58 1,53; H δ : 3,10; H ϵ : 7,11
87 Lys	8,41	4,16	1,61	H γ : 1,32 1,23; H ϵ : 2,87
88 Arg	8,27	4,31	1,67	H γ : 1,49 1,43; H δ : 3,06; H ϵ : 7,08
89 Tyr	8,24	4,49	2,84, 2,91	–
90 Arg	8,10	4,15	1,61, 1,56	H γ : 1,43 1,38; H δ : 3,05; H ϵ : 7,03
91 Lys	8,13	4,11	1,56	H γ : 1,25 1,17; H ϵ : 2,87; H ζ : 7,43
92 Phe	8,19	4,54	3,03, 2,91	–
93 Leu	8,13	4,23	1,45	H δ : 0,75 0,81
94 Asn	8,29	4,55	2,75, 2,65	–
95 Glu	8,26	4,27	1,97, 1,83	H γ : 2,30
96 Ser	8,22	4,29	3,73	–
97 Tyr	7,97	4,46	2,88, 2,95	–
98 Lys	7,98	4,09	1,63	H γ : 1,18; H δ : 1,54
99 His	8,32	4,56	3,17, 3,09	H δ : 7,19; H ϵ : 8,51
100 Glu	8,27	4,27	1,99, 1,86	H γ : 2,33
101 Gln	8,39	4,21	1,88	H γ : 2,19
102 Val	8,02	3,99	1,89	H γ : 0,78 0,76
103 Tyr	8,24	4,54	2,89, 2,82	–
104 Ile	8,00	4,00	1,68	H γ : 1,05 1,34 0,77; H δ : 0,73
105 Arg	8,27	4,22	1,77	H γ : 1,59 1,56; H δ : 3,12; H ϵ : 7,12
106 Ser	8,29	4,41	3,76, 3,83	–
107 Thr	8,07	4,19	4,13	H γ : 1,12
108 Asp	8,31	4,63	2,79, 2,69	–
109 Val	7,93	3,98	2,01	H γ : 0,84 0,83
110 Asp	8,33	4,61	2,84	–
111 Arg	8,20	4,25	1,72, 1,83	H γ : 1,58 1,54; H δ : 3,12
112 Thr	8,07	4,27	4,21	–
113 Leu	8,04	4,26	1,55	H δ : 0,79 0,84
114 Met	8,18	4,39	1,94, 2,03	H γ : 2,46 2,54; H ϵ : 2,03
115 Ser	8,11	4,32	3,82, 3,78	–
116 Ala	8,16	4,27	1,34	–
117 Met	8,15	4,43	1,95, 2,04	H γ : 2,47 2,56
118 Thr	7,95	4,25	4,13	H γ : 1,12
119 Asn	8,32	4,66	2,66, 2,73	–
120 Leu	8,03	4,25	1,55	H γ : 0,83

Химические сдвиги углерода ^{13}C были определены с помощью анализа спектров ^1H - ^{13}C HSQC с учетом данных о химических сдвигах ядер водорода ^1H , полученных из экспериментов ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY. Параметры, использованные при проведении экспериментов HSQC представлены в таблице 3. Результаты представлены в таблице 5.

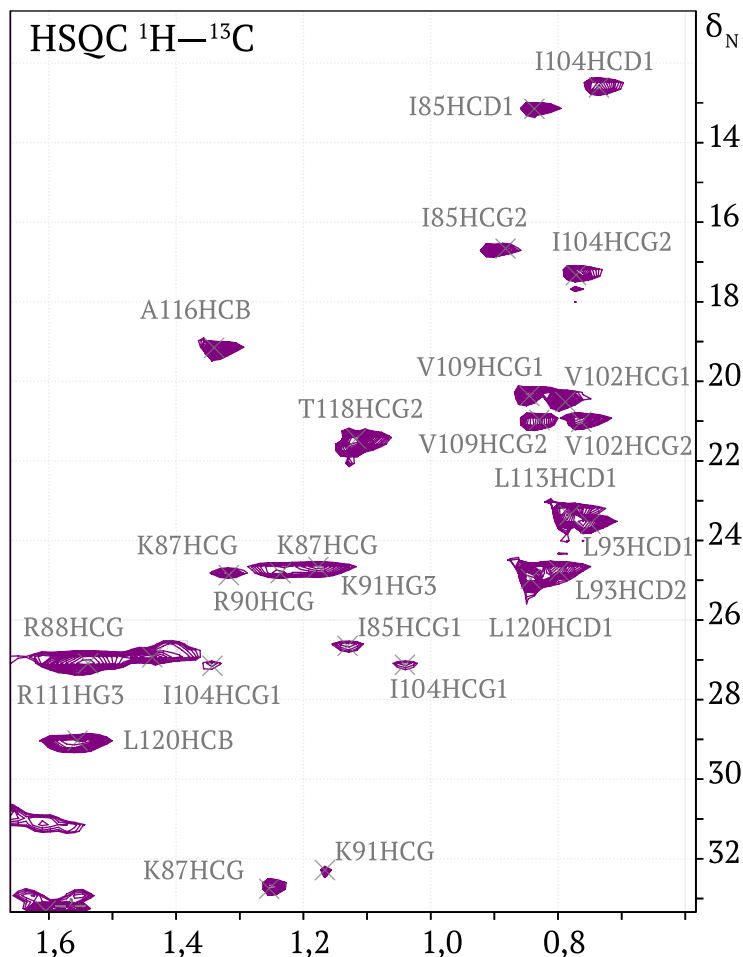


Рисунок 17 — Фрагмент двумерного спектра ^1H - ^{13}C HSQC пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 298 К

Таблица 5 — Значение химических сдвигов ^{13}C (δ_{C} , м.д.) пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}/90\% + 10\%$) при 298 К

	C	C α	C β	Другие
85 Ile	172,07	60,34	39,14	C γ : 26,69
86 Arg	175,66	56,11	33,27	–
87 Lys	175,93	56,37	39,21	C γ : 24,87 ; C δ : 42,11
88 Arg	175,54	55,33	39,67	–
89 Tyr	175,31	57,67	42,53	–
90 Arg	176,23	55,74	38,84	–
91 Lys	175,72	56,34	29,08	–
92 Phe	175,13	57,23	63,63	–
93 Leu	176,51	55,81	38,51	C δ : 23,63 24,76
94 Asn	175,21	53,31	32,91	–
95 Glu	175,95	55,51	28,82	C γ : 33,16
96 Ser	174,25	58,62	29,12	–
97 Tyr	175,66	57,89	29,51	–
98 Lys	175,86	56,44	32,96	–
99 His	174,21	55,27	38,94	C γ : 131,07
100 Glu	175,67	55,95	38,86	C γ : 33,06
101 Gln	175,18	55,92	63,75	C γ : 33,76
102 Val	175,86	62,22	69,63	C γ : 20,47 21,01
103 Tyr	177,04	57,61	32,68	–
104 Ile	175,54	60,67	38,56	C γ : 27,14
105 Arg	175,59	55,93	30,55	–
106 Ser	174,72	58,46	69,63	–
107 Thr	175,41	62,61	32,76	–
108 Asp	175,45	53,53	63,76	–
109 Val	175,45	62,69	19,21	C γ : 20,37 21,04
110 Asp	175,38	53,35	32,78	–
111 Arg	176,61	56,72	69,77	–
112 Thr	174,67	61,89	38,86	–
113 Leu	177,43	54,74	42,28	C δ : 23,35 24,81
114 Met	176,46	55,77	39,14	C γ : 32,04
115 Ser	174,21	58,58	33,27	–
116 Ala	177,71	52,68	33,27	–
117 Met	176,35	55,62	39,67	C γ : 32,07
118 Thr	173,85	53,14	42,53	–
119 Asn	174,51	53,14	318,84	–
120 Leu	176,31	55,04	29,08	C γ : 25,03

С помощью двумерного спектра ^1H - ^{15}N HSQC были получены химические сдвиги ядер ^{15}N . Результаты представлены в таблице 6.

Рассмотрим приписание химического сдвига для аминокислоты треонина, который в аминокислотной последовательности объекта исследования P4P (85-120) стоит под номером 118. На рисунке 18 мы видим пик под номером 118, его пересечение с осью x , которая соответствует значениям химического сдвига от ядер водорода ^1H , приходится на значение 7,95 м.д. Из ранее сделанного анализа и полученных химических сдвигов ядер ^1H мы можем сделать вывод, что данный пик относится к аминокислоте треонин. Тогда мы смотрим пересечение данного пика с осью y , которая соответствует значениям химического сдвига от ядер азота ^{15}N , получаем значение химического сдвига азотной группы аминокислоты треонина, равное 114,356 м.д.

Таким образом были получены 134 значения химических сдвигов ядер углерода ^{13}C , 33 значения химических сдвигов ядер азота ^{15}N и 220 значений химических сдвигов ядер водорода ^1H . Полученные данные о химических сдвигах были депонированы в международную базу данных BioMagResBank (<http://www.bmrb.io>) под регистрационным номером BMRB 51231.

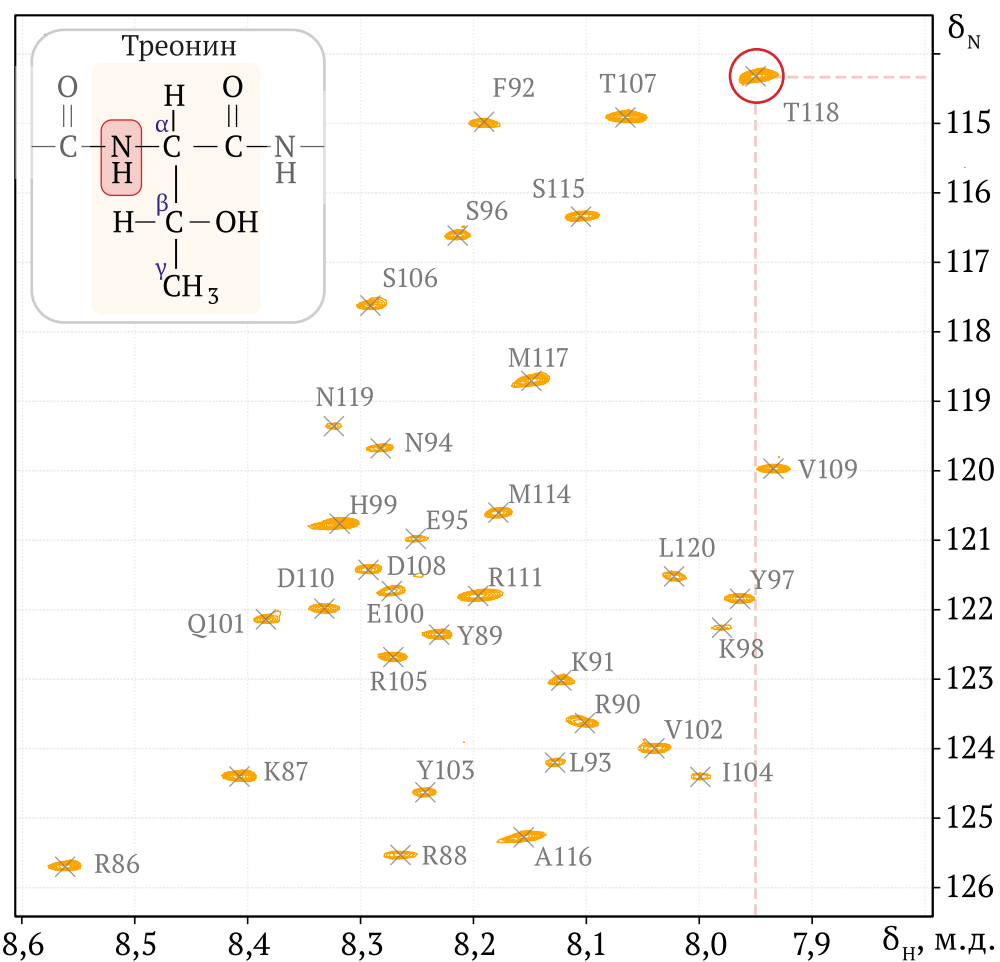


Рисунок 18 — Фрагмент двумерного спектра ^1H - ^{15}N HSQC пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 298 К

Таблица 6 — Значение химических сдвигов ^{15}N (м.д.) пептида PAP (85-120) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}/90\% + 10\%$) при 298 К

NH		NH		NH	
85 Ile	–	97 Tyr	121,88	109 Val	120,01
86 Arg	125,73	98 Lys	122,29	110 Asp	122,02
87 Lys	124,43	99 His	120,81	111 Arg	121,84
88 Arg	125,56	100 Glu	121,77	112 Thr	–
89 Tyr	122,39	101 Gln	122,17	113 Leu	–
90 Arg	123,67	102 Val	124,28	114 Met	120,64
91 Lys	123,05	103 Tyr	124,66	115 Ser	116,38
92 Phe	115,01	104 Ile	124,44	116 Ala	125,31
93 Leu	124,23	105 Arg	122,72	117 Met	118,74
94 Asn	119,71	106 Ser	117,66	118 Thr	114,36
95 Glu	121,01	107 Thr	114,95	119 Asn	119,39
96 Ser	116,65	108 Asp	121,46	120 Leu	119,39

3.3 Определение пространственной структуры

Для расчета пространственной структуры объекта исследования PAP (85-120) были использованы данные об интегральных интенсивностях сигналов, полученные из анализа спектра ^1H - ^{15}N NOESY. Данные об интегральных интенсивностях были использованы для того, чтобы получить пространственные ограничения на межъядерные расстояния. Чтобы получить межъядерные расстояния использовалась программы CCPNMR [16,17] и XPLOR-NIH [18], в которых использовался следующий метод:

На спектре, полученном в ходе анализа эксперимента ^1H - ^1H NOESY были помечены расположения пиков. Данная информация о расположении пиков соотносилась с информацией о значениях химических сдвигов ядер водорода ^1H для каждой из аминокислот. Далее из значения интенсивности каждого пика была получена информация о пространственных ограничениях на межъядерные расстояния. Для определения данных расстояний использовалась метод, описанный в работах [19,20], в котором сигналы разбиваются на четыре класса в зависимости от их интенсивности: 0-20% (очень слабый), 20-50% (слабый), 50-80% (средний) и 80-100% (сильный), и даны соответствующие им диапазоны межъядерных расстояний 1,8–6,0, 1,8–5,0, 1,8–3,3, и 1,8–2,7 ангстрем соответственно. В случае, когда одним из атомов является протон метильной группы (CH_3), то к полученному расстоянию прибавляется 0,5 ангстрема[21].

Далее, в программе XPLOR-NIH производилось автоматическое соотнесение кросс-пиков на основе предварительно полученной таблицы химических сдвигов ^1H (таблица 4). Для процедуры соотнесения использовался алгоритм PASD[22]. В результате было получено 172 ограничения на межъядерные расстояния. Результаты представлены в таблице 7. При этом часть пиков в спектре NOESY накладывается друг на друга, поэтому, во-первых, удалось идентифицировать не все сигналы в спектре, а во-вторых — часть сигналов были идентифицированы так, что им может соответствовать несколько пар ядер (например расстояние №7 в таблице 7). В случае магнитно-эквивалентных протонов (например CH_2 и CH_3) их номер заменен на «*» — это означает, что на этом месте может быть любая цифра — 1...3.

После того, как были получены пространственные ограничения на межъядерные расстояния, данные были внесены в программу XPLOR-NIH, которая позволила получить ансамбль структур.

Таблица 7 — Интервал пространственных ограничений (ангстремы) на межъядерные расстояния для пептида PAP (85-120)

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
1	90HN-89HA	1,8 ... 3,3	18	112HN-111HA	1,8 ... 3,3
2	89HN-89HA	1,8 ... 2,7		98HN-95HA	
3	109HN-110HA	1,8 ... 3,3	19	105HN-105HA	1,8 ... 2,7
4	118HN-116HA	1,8 ... 3,3	20	105HN-105HA	1,8 ... 2,7
5	91HA-92HN	1,8 ... 3,3	21	90HN-90HA	1,8 ... 3,3
6	86HN-85HA	1,8 ... 5,0		91HN-91HA	
7	103HN-89HB2	1,8 ... 3,3		107HN-107HB	
	103HN-97HB*		22	99HN-98HA	1,8 ... 3,3
8	89HN-89HB*	1,8 ... 3,3	23	96HN-95HA	1,8 ... 2,7
9	117HN-117HB*	1,8 ... 3,3	24	107HN-107HB	1,8 ... 2,7
10	114HN-113HB*	1,8 ... 3,3	25	97HN-97HA	1,8 ... 2,7
	107HN-105HG2		26	109HN-106HA	1,8 ... 2,7
11	112HN-111HG*	1,8 ... 3,3	27	103HN-103HA	1,8 ... 2,7
	112HN-113HB*		28	111HN-110HA	1,8 ... 2,7
	98HN-105HG2		29	89HN-89HA	1,8 ... 2,7
12	118HN-120HB*	1,8 ... 3,3	30	93HN-93HA	1,8 ... 2,7
	97HN-105HG2		31	107HN-107HB	1,8 ... 2,7
13	115HN-87HG*	1,8 ... 3,3	32	106HN-106HB*	1,8 ... 5,0
	116HN-87HG*		33	96HN-96HB*	1,8 ... 5,0
14	87HN-86HA	1,8 ... 3,3	34	97HN-98HA.	1,8 ... 5,0
15	101HN-100HA	1,8 ... 3,3	35	104HN-104HA	1,8 ... 5,0
16	116HN-88HA	1,8 ... 2,7		102HN-102HA	
17	108HN-95HA	1,8 ... 5,0	36	119HN-119HA	1,8 ... 3,3
	108HN-105HA		37	115HN-106HA	1,8 ... 5,0
	110HN-111HA			115HN-114HA	
	99HN-95HA				

Продолжение таблицы 7

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
38	107HN-106HB*	1,8 ... 5,0	56	104HN-104HG12	1,8 ... 6,0
	114HN-106HB*		57	89HN-88HG2	1,8 ... 6,0
39	98HN-98HG*	1,8 ... 5,0	58	106HN-88HG2	1,8 ... 6,0
40	95HN-95HG*	1,8 ... 6,0		119HN-90HG*	
41	102HN-100HB*	1,8 ... 3,3		94HN-90HG*	
	104HN-101HB*		59	90HN-93HB*	1,8 ... 3,3
42	101HN-100HB2	1,8 ... 3,3		90HN-93HB*	
43	87HN-86HG*	1,8 ... 6,0	60	115HN-88HB*	1,8 ... 5,0
44	117HN-117HE*	1,8 ... 6,0		90HN-88HB*	
45	114HN-114HB*	1,8 ... 5,5		91HN-86HB*	
	114HN-114HE1			91HN-88HB*	
46	89HN-86HB2	1,8 ... 5,0		116HN-88HB*	
47	103HN-95HB2	1,8 ... 3,3		117HN-88HB*	
	96HN-95HB2			90HN-86HB*	
48	95HN-95HB2	1,8 ... 3,3	61	97HN-98HD*	1,8 ... 5,0
49	115HN-88HB*	1,8 ... 5,0		97HN-105HG*	
	115HN-111HB*		62	108HN-89HB*	1,8 ... 5,0
	116HN-88HB*			99HN-103HB*	
	117HN-88HB*			108HN-103HB*	
51	88HN-86HB*	1,8 ... 3,3		110HN-103HB*	
52	88HN-86HG2	1,8 ... 3,3	63	89HN-94HB*	1,8 ... 5,0
53	89HN-104HD*	1,8 ... 5,5		92HN-94HB*	
	92HN-93HD12*			95HN-94HB*	
	92HN-93HD13			100HN-94HB*	
	92HN-93HD11		64	96HN-108HB2	1,8 ... 5,0
54	109HN-109HG*	1,8 ... 5,5		111HN-108HB2	
	109HN-109HG22			111HN-119HB*	
55	104HN-104HB	1,8 ... 5,0		96HN-94HB*	

Продолжение таблицы 7

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
65	108HN-94HB*	1,8 ... 5,0	78	108HN-95HB*	1,8 ... 5,0
	108HN-119HB*			110HN-95HB*	
	110HN-94HB*			99HN-95HB*	
	110HN-119HB*		79	115HN-114HG*	1,8 ... 6,0
66	103HN-94HB*	1,8 ... 5,0		116HN-114HG*	
	111HN-119HB*			117HN-114HG*	
	88HN-94HB*		80	98HN-101HG*	1,8 ... 6,0
	96HN-94HB*			102HN-101HG*	
67	108HN-119HB*	1,8 ... 6,0	81	94HB2-94HN	1,8 ... 5,0
	110HN-119HB*		82	108HB*-89HN	1,8 ... 5,0
68	95HN-94HB2	1,8 ... 3,3	83	108HB2-105HN	1,8 ... 6,0
69	107HN-89HB*	1,8 ... 6,0		94HB*-89HN	
70	107HN-103HB*	1,8 ... 5,0		94HB*-92HN	
71	114HN-87HE*	1,8 ... 6,0	84	89HB2-103HN	1,8 ... 3,3
72	107HN-89HB2	1,8 ... 5,0	85	103HB2-103HN	1,8 ... 3,3
	1107HN-97HB*		86	110HB*-109HN	1,8 ... 5,0
	90HN-89HB2			110HB*-118HN	
	91HN-89HB2			89HB*-109HN	
73	109HN-107HB	1,8 ... 5,0	87	85HA-86HN	1,8 ... 5,0
	118HN-107HB		88	101HA-101HN	1,8 ... 5,0
	97HN-107HB		89	109HA-110HN	1,8 ... 3,3
74	115HN-115HB*	1,8 ... 6,0	90	105HA-105HN	1,8 ... 3,3
75	87HN-87HA	1,8 ... 5,0	91	102HA-103HN	1,8 ... 2,7
76	93HN-100HB*	1,8 ... 6,0	92	87HA-116HN	1,8 ... 3,3
	93HN-117HE*		93	90HA-90HN	1,8 ... 3,3
76	93HN-100HB*	1,8 ... 6,0	94	107HB-104HN	1,8 ... 3,3
	93HN-117HE*				
77	90HN-95HB2	1,8 ... 6,0			

Продолжение таблицы 7

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
95	94HB*-95HN 94HB*-105HN 94HB*-92HN 108HB*-95HN 108HB*-105HN	1,8 ... 6,0	109	107HG2*-107HB 118HG2*-118HB	1,8 ... 5,5
95	108HB2-105HN 94HB*-89HN 94HB*-92HN	1,8 ... 6,0	110	110HB*-111HG*	1,8 ... 2,7
96	89HB2-103HN	1,8 ... 3,3	111	95HB*-109HG22 100HB*-104HG2*	1,8 ... 3,2
97	103HB2-103HN	1,8 ... 3,3	112	190HG2-93HD*	1,8 ... 3,8
98	110HB*-109HN 110HB*-118HN 89HB*-109HN	1,8 ... 5,0	113	100HB2-102HG2*	1,8 ... 3,2
99	85HA-86HN	1,8 ... 5,0	114	104HB-104HD*	1,8 ... 3,2
100	101HA-101HN	1,8 ... 5,0	115	16HA-87HG*	1,8 ... 5,0
101	109HA-110HN	1,8 ... 3,3	116	118HB-118HG2*	1,8 ... 3,8
102	105HA-105HN	1,8 ... 3,3	117	91HG*-91HN	1,8 ... 5,0
103	102HA-103HN	1,8 ... 2,7	118	90HG*-90HN	1,8 ... 3,3
104	87HA-116HN	1,8 ... 3,3	119	105HG2-107HN 113HB*-115HN	1,8 ... 3,3
105	90HA-90HN	1,8 ... 3,3	120	105HG2-98HN	1,8 ... 3,3
106	107HB-104HN	1,8 ... 3,3	121	114HG2-114HB2 117HG*-117HE*	1,8 ... 5,5
107	111HA-109HN 112HA-109HN 112HB-109HN 118HA-109HN 95HA-109HN	1,8 ... 6,0	122	117HG2-109HB	1,8 ... 5,0
108	107HG2*-107HA	1,8 ... 3,3	123	114HG2-114HB* 114HG2-114HE1	1,8 ... 5,5
			124	86HG*-85HG12	1,8 ... 3,3
			125	104HA-104HN	1,8 ... 5,0
			126	119HB*-119HA	1,8 ... 6,0
			127	119HB*-110HA	1,8 ... 5,0
			128	94HB2-89HA	1,8 ... 5,0

Продолжение таблицы 7

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
129	108HB*-89HA 94HB*-89HA	1,8 ... 5,0	143	107HA-118HG2* 107HB-118HG2*	1,8 ... 5,5
130	92HB*-92HA	1,8 ... 5,0	144	105HE-105HD*	1,8 ... 5,0
131	90HD*-89HA 90HD*-94HA 92HB*-89HA 92HB*-94HA	1,8 ... 5,0	145	86HE-90HD* 86HE-92HB* 99HD2-92HB*	1,8 ... 6,0
132	106HB*-88HA 96HB*-100HA 106HB*-112HA 96HB*-112HA	1,8 ... 3,3	146	105HE-97HB* 105HE-97HB2 86HE-89HB2	1,8 ... 3,3
133	119HB*-119HN	1,8 ... 5,0	147	105HG*-105HN	1,8 ... 5,0
134	104HA-104HG2*	1,8 ... 5,5	148	117HB*-117HN	1,8 ... 5,0
135	104HA-95HB* 104HA-100HB* 109HA-95HB* 109HA-100HB*	1,8 ... 5,0	149	86HB2-89HN 86HB2-92HN	1,8 ... 6,0
136	102HA-102HB	1,8 ... 5,0	150	95HB2-96HN 95HB2-103HN	1,8 ... 3,3
137	117HA-117HB*	1,8 ... 6,0	151	91HB*-92HN 91HB*-95HN 86HG*-89HN 87HB*-89HN	1,8 ... 5,0
138	112HA-111HB2 120HA-111HB2	1,8 ... 5,0	152	88HG2-114HN 88HG2-116HN	1,8 ... 5,5
139	91HA-91HB*	1,8 ... 5,0	153	88HG*-116HN	1,8 ... 3,3
140	87HA-87HB*	1,8 ... 2,7	154	88HG*-88HN 111HG2-111HN	1,8 ... 2,7
141	86HA-86HG2 113HA-113HB*	1,8 ... 5,0	155	88HG2-115HN	1,8 ... 2,7
142	105HD*-120HB* 111HD*-113HB* 109HA-95HB* 111HD*-120HB*	1,8 ... 5,0	156	105HG2-97HN 120HB*-118HN	1,8 ... 2,7

Продолжение таблицы 7

	Пара атомов	Интервал, А		Пара атомов	Интервал, А
157	105HG2-97HN 120HB*-118HN	1,8 ... 2,7	165	104HD*-104HG12	1,8 ... 3,8
158	105HG*-97HN	1,8 ... 3,3	166	111HA-107HB 113HA-107HB 118HA-107HB 120HA-107HB 93HA-107HB 95HA-107HB	1,8 ... 6,0
159	100HB2-102HN	1,8 ... 3,3	167	111HN-109HN 96HN-97HN	1,8 ... 3,3
160	98HB*-97HN 98HD*-97HN	1,8 ... 5,0	168	115HN-118HN 116HN-118HN 117HN-118HN	1,8 ... 5,0
161	90HG*-89HN 90HG*-92HN	1,8 ... 5,0	169	94HN-93HN	1,8 ... 3,3
162	90HG*-89HN 90HG*-92HN	1,8 ... 5,0	170	94HN-93HN	1,8 ... 2,7
163	107HG2*-93HN 107HG2*-112HN 107HG2*-113HN 118HG2*-93HN 118HG2*-112HN 118HG2*-113HN	1,8 ... 5,5	171	111HN-112HN 96HN-93HN	1,8 ... 6,0
164	93HD11-93HB*	1,8 ... 5,5	172	103HN-104HN	1,8 ... 3,3

Алгоритм расчета структуры заключался в следующем: первым этапом выполнялся поиск возможной структуры методом стимулированного отжига (моделирование динамики молекулы с наложением полученных пространственных ограничений при температуре 1000 К, затем охлаждение до 25 К

в течение 10 пс), затем проводилась минимизация энергии для полученной структуры. Эта операция повторялась 500 раз (был получен ансамбль из 500 структур, соответствующих локальным минимумам энергии), далее из этих структур были отобраны 18 различных структур с минимальной энергией.

Ансамбль, состоящей из 18 полученных структур, соответствующих минимуму энергии показан на рисунке 19. Статистические данные для полученного ансамбля приведены в таблице 8.

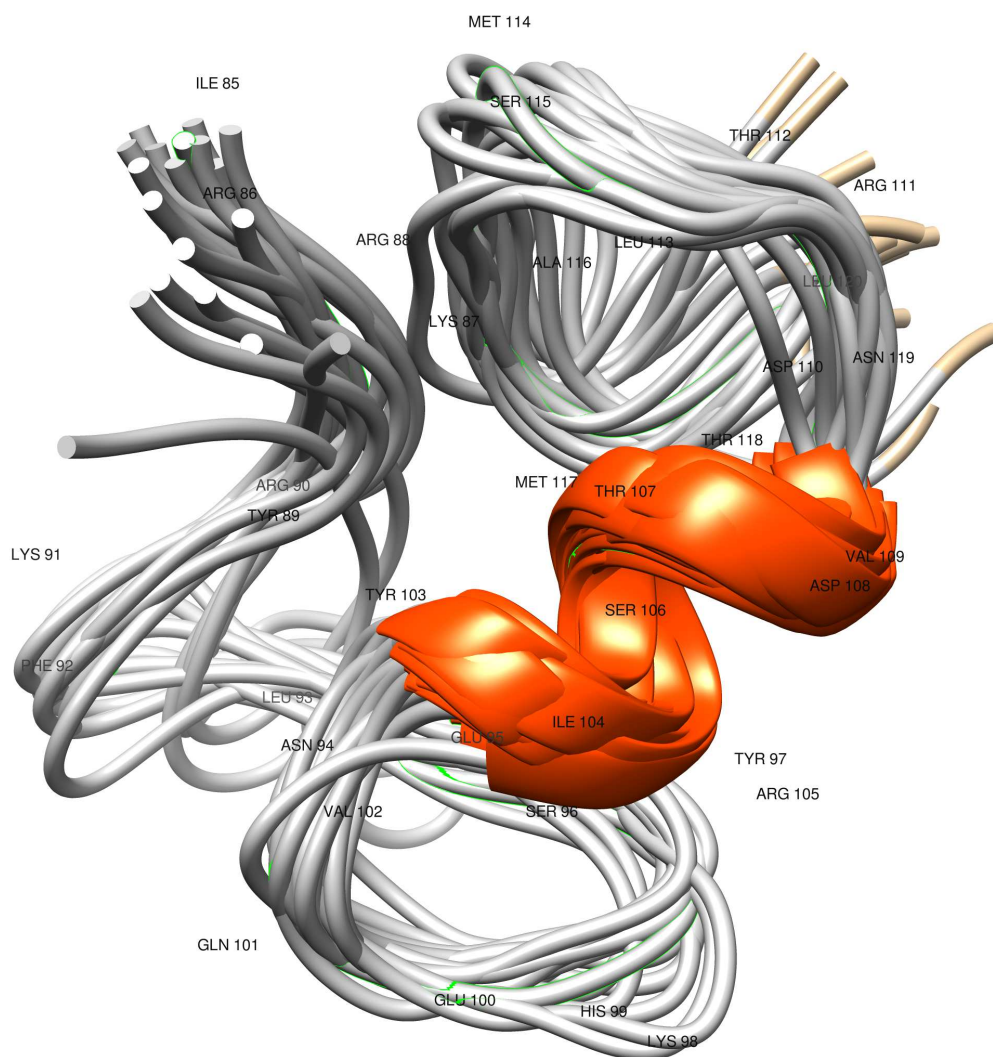


Рисунок 19 — Пространственная структура пептида PAP (85-120) в виде ансамбля из 18 структур минимальной энергией

Таблица 8 — Статистическая информация для структурного ансамбля PAP(85-120)

Межъядерные расстояния	
Всего	172
внутри аминокислотных остатков	64
между пространственно близкими аминокислотными остатками	
близкие ($i-j=1$)	49
средне-удаленные ($i-j=2...4$)	19
дальние ($i-j>4$)	40
Структурная статистика	
кол-во нарушений межъядерных расстояний	0
кол-во нарушений ограничений на двугранные углы	0
СКО для отклонений связей (Å)	0,002
СКО для отклонений углов (град.)	0,274
СКО всех атомов основной цепи, фрагмент (R105-V109) (Å)	0,23
Структурная статистика	
Карта Рамачандрана	
остатки в наиболее благоприятной области (%)	84,8
остатки в дополнительно разрешенной области (%)	100,0
остатки в запрещенной зоне (%)	0

Пептид в своей структуре имеет α -спираль на участке от аминокислоты изолейцина 104 Ile до аминокислоты аспарагина 110 Asp. Полученные структуры далее проверялись на корректность путем анализа двугранных углов (карта Рамачандрана [23]). Из рисунка 20 видно, что каждый из сигналов не выходит за границы разрешенных областей, что означает, что пространственная структура образца исследования рассчитана корректно.

Полученный ансамбль был депонирован в международную базу данных PDB databank (www.wwpdb.org), под регистрационным номером PDB ID: 7ZZV.

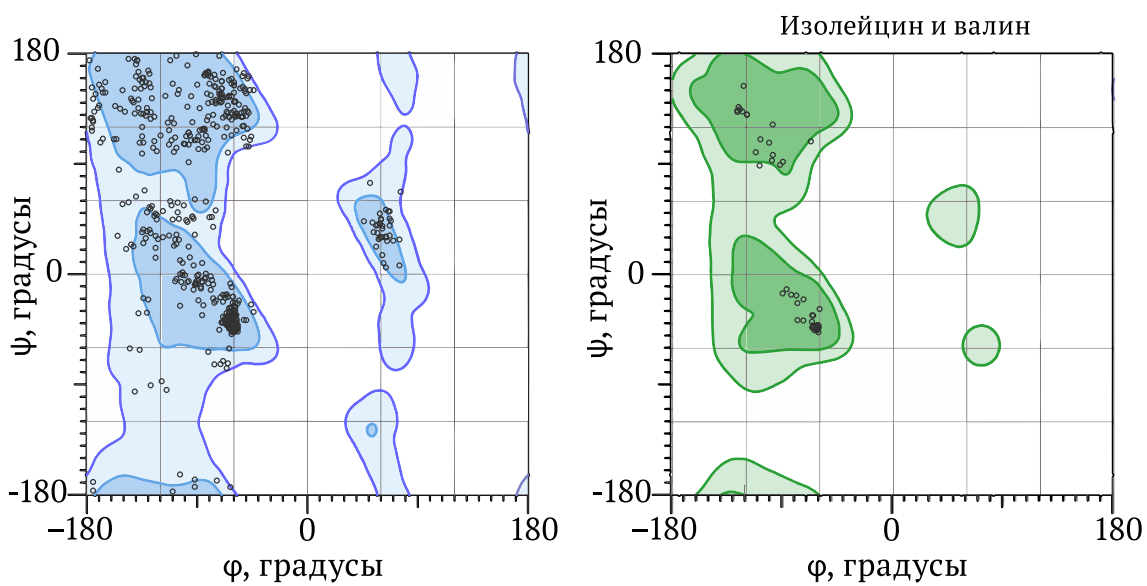


Рисунок 20 — Карта Рамачандрана РАР (85-120) для ансамбля из 18 структур с минимальной энергией

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был использован метод спектроскопии ЯМР с помощью которого были исследован пептидный фрагмент простатической кислой фосфатазы PAP (85-120), получены следующие результаты:

- Были зарегистрированы спектры ЯМР: одномерные на ядрах ^1H , и двумерные: HSQC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, HSQC $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$), TOCSY ($^1\text{H} - ^{13}\text{H}$), NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$).
- Выполнен анализ полученных спектров и сделано приписание сигналов для ядер водорода ^1H , азота ^{15}N и углерода ^{13}C , значения химических сдвигов были депонированы в базу данных BioMagResBank.
- Из анализа интегральных интенсивностей сигналов спектра NOESY были определены 172 пространственных ограничения для расстояний между атомами.
- Была установлена пространственная структура объекта исследования PAP (85-120) и депонирована в международную базу данных PDB databank. Установлено, что пептид в своей структуре содержит α -спираль на участке от остатка 104 (изолейцин) до 110 (аспарагин). Полученный ансамбль из 18 структур обладает хорошей сходимостью.

Полученные результаты опубликованы:

Structure of amyloidogenic PAP(85-120) peptide by high-resolution NMR spectroscopy / A. Kusova, M. Abramova, P. Skvortsova, A. Yulmetov, T. Mukhametzyanov, V. Klochkov, D. Blokhin // *Journal of Molecular Structure*. — V.1253. — 2022. — 132–294 p.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helical Conformation of the SEVI Precursor Peptide PAP_{248–286}, a Dramatic Enhancer of HIV Infectivity, Promotes Lipid Aggregation and Fusion / J. R. Brender, K. Hartman, L. M. Gottler, M. E. Cavitt[et al.]. — *Biophysical Journal*. — 2009. — V. 97. — P. 2474-2483.
2. Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection / J. Münch, E. Rücker, L. Ständker, K. Adermann[et al.]. — *Cell*. — 2007. — V. 131. — P. 1059-1071.
3. *Абрагам, А. Ядерный магнетизм / А. Абрагам. — М.:Изд. ин. лит., 1963. — 552 с.*
4. *Purcell, E. M. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid / E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound. — Physical Review. — 1946. — V. 69. — P. 37-38.*
5. *Bloch, F. Nuclear Induction / F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard. — Physical Review. — 1946. — V. 69. — P. 127.*
6. *Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy / J. Keeler. — 2nd ed. — John Wiley & Sons, 2010. — 526 pp.*
7. *Аганов, А. В. Введение в магнитнорезонансную томографию / А. В. Аганов. — Казань:Изд-во Казан. ун-та, 2014. — 64 с.*
8. *Гюнтер, Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР / Х. Гюнтер. — М.:Мир, 1984. — 478 с.*
9. *Дероум, Э. А. Современные методы ЯМР для химических исследований. / Э. А. Дероум; пер. с англ. Ю. М. Демина. — М.:Мир, 1992. — 403 с.*

10. *Brutscher, B. Speeding up Multidimensional NMR Data Acquisition* / B. Brutscher, D. Marion, L. Frydman; Ed. by I. Bertini, K. S. McGreevy, G. Parigi. — Wiley-Blackwell, 2012. — 444-465 pp.
11. *Rule, G. S. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy* / G. S. Rule, T. K. Hitchens; Ed. by R. Kaptein. — Dordrecht:Springer, 2006. — 550 pp. — V. 4 of *Focus on Structural Biology*.
12. *Parella, T. Improved sensitivity in gradient-based 1D and 2D multiplicity-edited HSQC experiments* / T. Parella, F. F. Sanchez, A. Virgili. — *Journal of Magnetic Resonance*. — 1997. — V. 126. — P. 274-277.
13. *Alshammari, S. Review Chapter in Nuclear Magnetic Resonance (NMR)* / S. Alshammari. — GRIN Verlag, 2019.
14. *Turner, D. L. Basic Two-Dimensional Nmr* / D. L. Turner. — *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. — 1986. — V. 17. — P. 281-358.
15. *Wuthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids* / K. Wuthrich. — *Europhysics News*. — 1986. — V. 17. — P. 11-13.
16. *The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline* / W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh[et al.]. — *Proteins*. — 2005. — V. 59. — P. 687-696.
17. *Structure calculation, refinement and validation using CcpNmr Analysis* / S. P. Skinner, B. T. Goult, R. H. Fogh, W. Boucher[et al.]. — *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*. — 2015. — V. 71. — P. 154-161.

18. *Schwieters, C. D.* The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package / C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore. — *Journal of Magnetic Resonance*. — 2003. — V. 160. — P. 65-73.
19. *Clore, G. M.* Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy / G. M. Clore, A. M. Gronenborn. — *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. — 1989. — V. 24. — P. 479-564.
20. *Clore, G. M.* Two, three and four dimensional NMR methods for obtaining larger and more precise three-dimensional structures of proteins in solution / G. M. Clore, A. M. Gronenborn. — *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*. — 1991. — V. 20. — P. 29-63.
21. *Clore, G. M.* Applications of three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy to protein structure determination / G. M. Clore, A. M. Gronenborn. — *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*. — 1993. — V. 23. — P. 43-92.
22. *Kuszewski, J. J.* Automated error-tolerant macromolecular structure determination from multidimensional nuclear Overhauser enhancement spectra and chemical shift assignments: improved robustness and performance of the PASD algorithm / J. J. Kuszewski, R. A. Thottungal, G. M. Clore, C. D. Schwieters. — *Journal of Biomolecular NMR*. — 2008. — V. 41. — P. 221-239.
23. *Laskowski, R. A.* The ramachandran plot and protein structure validation / R. A. Laskowski, N. Furnham, J. M. Thornton. — *World Scientific*. — 2013. — P. 62-75.