

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ  
ФИБРИЛЛООБРАЗУЮЩЕГО ПЕПТИДА SEM1(86-107),  
УЧАСТВУЮЩЕГО В УВЕЛИЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОЙ  
АКТИВНОСТИ ВИЧ

Студентка 4 курса группы 06-712

«18» июня 2021 г.

(Санчугова Д.А.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

«18» июня 2021 г.

(Блохин Д.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«18» июня 2021 г.

(Аганов А.В.)

Казань-2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
1. Основы ЯМР-спектроскопии .....	5
1.1 Физические основы ядерного магнитного резонанса .....	5
1.2 Квантовомеханическое описание ядерного магнитного резонанса .....	5
1.3 Химический сдвиг.....	8
1.4 Спин – спиновое взаимодействие .....	9
2. Методы двумерной ЯМР-спектроскопии .....	10
2.1 TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) .....	10
2.2 NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) .....	12
2.3 ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY).....	13
3. Экспериментальная часть.....	14
3.1 Объект исследования.....	14
3.2 Методы исследования .....	14
4. Результаты и обсуждения.....	16
4.1 Определение пространственной структуры пептида SEM1(86-108) в водном растворе .....	16
4.2 Определение пространственной структуры пептида SEM1(86-107) в комплексе с белком-мицеллой DPC в водном растворе .....	23
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	28
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	29
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	32

## ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) – это вирус, поражающий клетки иммунной системы человека. Постепенно иммунная система человека разрушается и развивается синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД). Организм становится восприимчив к различным инфекциям и опухолям, которые в конечном итоге приводят к гибели больного [1]. ВИЧ широко распространен во всем мире, но в лабораторных условиях вирус не активен, и лишь небольшой процент вирионов способен вызвать заражение ВИЧ.

Увеличение инфекционной активности ВИЧ связано с наличием в семенной жидкости амилоидных фибрилл [2]. Исследуемый пептид SEM1(86-107) является продуктом расщепления белка семеногелина<sup>1</sup>, экспрессируемого в семенных пузырьках [3]. После эякуляции семеногелин<sup>1</sup> быстро расщепляется внутренними протеазами на различные короткие пептидные фрагменты, одним из которых является SEM1(86-107). Пептид SEM1(86-107) участвует в образовании амилоидных фибрилл, которые связывают вирион ВИЧ с клеткой-мишенью. Понимание молекулярных механизмов взаимодействия фибрилл с вирионами и клетками основано на структурных характеристиках пептида. Для данного исследования был выбран пептид SEM1(86-107) для определения его пространственной структуры в растворе с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Дополнительно пептид SEM1(86-107) исследовался в комплексе пептид-мицелла додецилфосфохолина (DPC), который использовался в качестве модели поверхности липидной мембраны [4].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – это спектроскопический метод исследования биохимических объектов, использующий явление ядерного магнитного резонанса. Метод ЯМР-

спектроскопии является незаменимым в изучении структуры вещества в растворе, благодаря магнитным свойствам атомов в веществе. С его помощью становится возможным установление состава, строения, динамических характеристик и межмолекулярных взаимодействий в сложных соединениях.

Целью работы является определение пространственной структуры пептида SEM1(86-107), увеличивающего инфекционную активность ВИЧ, в водном растворе и в комплексе пептид-мицелла додецилфосфохолина. Для достижения цели было необходимо выполнение следующих задач:

1. Отнесение химических сдвигов водорода ЯМР-спектров пептида SEM1(86-107) и пептида SEM1(86-107) + DPC в водном растворе.
2. Определение межъядерных расстояний исследуемых образцов.
3. Предсказание вторичной структуры методом ЯМР-спектроскопии.
4. Расчет пространственной структуры пептида SEM1(86-107) и пептида SEM1(86-107) в комплексе с белком-мицеллой додецилфосфохолином.

# 1. Основы ЯМР-спектроскопии

## 1.1 Физические основы ядерного магнитного резонанса

Физические основы спектроскопии ядерного магнитного резонанса определяются свойствами атомных ядер. Когда происходит взаимодействие магнитного момента ядра с внешним магнитным полем  $B_0$ , происходит расщепление энергетических уровней в соответствии с правилами квантования. Это связано с тем, что магнитная энергия ядра может принимать только некоторый дискретный набор значений  $E_i$ , называемый собственными значениями энергии. Этому набору соответствует определенный набор собственных состояний. Для возбуждения электронов необходим высокочастотный генератор, с помощью которого можно вызвать переходы между собственными состояниями. Поглощение энергии можно обнаружить, усилить и записать как спектральную линию, или так называемый резонансный сигнал.

## 1.2 Квантовомеханическое описание ядерного магнитного резонанса

Магнитные свойства атомного ядра являются основой спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Из ядерной физики известно, что некоторые ядра, в том числе и протон, обладают угловым моментом  $\mathbf{L}$ , который в свою очередь обусловлен появлением у ядра магнитного момента  $\boldsymbol{\mu}$ . Обе этих величины связаны соотношением

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{L}, \quad (1)$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение, которое является константой, характеризующей данное вещество [5].

Угловой момент и ядерный момент квантованы:

$$L_z = \hbar m_I, \quad (2)$$

где  $\hbar$  – постоянная Планка,  $m_I$  – магнитное квантовое число, характеризующее стационарные состояния ядра.

Из условия квантования следует, что магнитное квантовое число может принимать дискретный ряд значений:

$$m_I = -I, (-I + 1), \dots, (I - 1), I, \quad (3)$$

где  $I$  – спиновое квантовое число данного ядра. Магнитное квантовое число  $m_I$  может принимать  $(2I + 1)$  значение, следовательно, число возможных энергетических уровней равно  $(2I + 1)$ .

Спиновое квантовое число протона равно  $\frac{1}{2}$ . Следовательно, протон может находиться в двух квантовых состояниях, которые характеризуются магнитными квантовыми числами  $m_I = -\frac{1}{2}$  или  $m_I = +\frac{1}{2}$ . Из этого можно сделать вывод, что максимальная проекция углового момента на ось  $z$  для протона равна:

$$L_z = \pm \hbar I. \quad (4)$$

Тогда величина проекции магнитного момента на ось  $z$  для протона равна

$$\mu_z = \gamma \hbar m_I = \pm \gamma \hbar I = \pm \frac{\gamma \hbar}{2}. \quad (5)$$

Таким образом, протон можно представить, как магнитный диполь,  $z$ -компонента которого  $\mu_z$  может иметь параллельную и антипараллельную ориентацию относительно направления внешнего магнитного поля  $B_0$ .

В квантовой механике вводятся собственные функции  $\alpha$  и  $\beta$  для обозначения энергетических уровней протона, которые соответствуют состояниям  $m_I = +\frac{1}{2}$  или  $m_I = -\frac{1}{2}$ . Для ядер со спином  $\frac{1}{2}$  эти состояния имеют одинаковую энергию, то есть имеется вырождение данных уровней (рисунок 1а). Вырождение можно снять, наложив одномерное магнитное поле  $V_0$ . Это происходит за счет взаимодействия ядерного магнитного момента  $\mu$  с полем. Тогда разность энергий двух спиновых состояний принимает значение

$$\Delta E = 2\mu_z V_0. \quad (6)$$

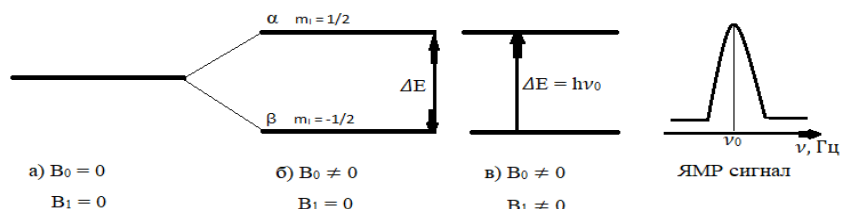
Из-за того, что энергия магнитного диполя в поле  $V_0$  равна  $-\mu_z V_0$ , либо  $+\mu_z V_0$ , происходит расщепление уровней состояний (рисунок 1б). Протон будет занимать состояние с минимальной энергией, которая соответствует собственной функции  $\beta$ . Чтобы вызвать переход в состояние с более высокой энергией, необходимо сообщить протону квант энергии (рисунок 1в):

$$\Delta E = h\nu_0 = 2\mu_z V_0 = \gamma\hbar V_0 \quad (7)$$

или излучение с частотой

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} V_0 \text{ или } \omega_0 = \gamma V_0 \quad (8)$$

Уравнение  $\omega_0 = \gamma V_0$  является условием резонанса. Ларморовская частота  $\nu_0$  изменяется в зависимости от используемого в эксперименте



значения магнитного поля  $V_0$  (рисунок 1).

Рисунок 1 - Расщепление энергетических уровней протона в магнитном поле.

### 1.3 Химический сдвиг

Химическим сдвигом в спектроскопии ядерного магнитного резонанса называется смещение сигнала ЯМР в зависимости от химического состава вещества, вызванного экранированием внешнего магнитного поля электронами атомов.

В связи с этим, из-за различного химического окружения протонов в молекуле, наблюдается несколько разных сигналов для различных протонов. Резонансные сигналы оказываются разделены химическим сдвигом. В первом приближении причиной химического сдвига является связь С-Н. Внешнее магнитное поле  $B_0$  воздействуя на ядро, создает магнитное поле, направление которого противоположно направлению внешнему полю. Из-за эффекта магнитного экранирования локальное магнитное поле  $B_{\text{лок}}$  на ядре меньше, чем внешнее поле  $B_0$  на величину  $\sigma$ , называемую константой экранирования для данного протона:

$$B_{\text{лок}} = B_0(1 - \sigma), \quad (9)$$

Из условия резонанса  $\omega_0 = \gamma \cdot B_0$ , где  $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ , следует, что при изменении внешнего магнитного поля  $B_0$  меняется резонансная частота  $\nu_0$ . Следовательно, положение резонансного сигнала необходимо измерять относительно сигнала эталонного вещества.

Для определения химического сдвига была введена безразмерная величина, определяемая по формуле:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{вещество}} - \nu_{\text{эталон}}}{\nu_0} \quad (10)$$

где  $\nu_0$  – рабочая частота используемого спектрометра;  $\nu_{\text{вещество}}$  – резонансная частота вещества;  $\nu_{\text{эталон}}$  – резонансная частота эталонного вещества.

В качестве единиц в  $\delta$ -шкале используются миллионные доли (м.д.).

#### 1.4 Спин – спиновое взаимодействие

Возникновение спин-спинового взаимодействия связано с тем, что между отдельными протонами вещества возникает магнитное взаимодействие, которое передается через электроны химических связей, косвенно соединяющих эти протоны [6].

Для молекулы  $A X_n$  (A и X не эквивалентные ядра) число линий расщепления для ядра A равно  $(2nI_x + 1)$ , где  $I_x$  – спиновое квантовое число ядра X, а интенсивности линий определяются биномиальными коэффициентами n-ой степени. В мультиплете расщепленные линии расположены на одинаковом расстоянии друг от друга, а величина расщепления характеризуется константой спин-спинового взаимодействия  $J_{AX}$  [7].

## 2. Методы двумерной ЯМР-спектроскопии

Двумерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса – это один из видов ЯМР-спектроскопии, в котором данные распределены по двум осям. Двумерная ЯМР-спектроскопия дает больше информации о структуре молекулы, чем одномерные ЯМР-спектры. Этот метод очень удобен для установления пространственной структуры молекул, которые имеют большие последовательности аминокислотных остатков [7].

Каждый эксперимент состоит из последовательности радиочастотных импульсов с разными периодами задержки между ними. Эксперименты отличаются друг от друга частотой интенсивностью импульсов, а также временем задержки между ними.

Каждый двумерный эксперимент состоит из серии одномерных экспериментов. Поскольку в двумерной ЯМР-спектрометрии производится два измерения, они ассоциированы с двумя осями частот химических сдвигов, каждая из которых связана с одной или двумя временными переменными: длиной времен эволюции и детекции. Для перехода от серии времен к серии частот проводится двумерное преобразование Фурье.

### 2.1 TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

Рассмотрим импульсную последовательность 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY ЯМР-эксперимента (рисунок 2) [8]. Данная последовательность состоит из четырех этапов: подготовка, эволюция, смешивание и детектирование, которые характерны для всех двумерных экспериментов.

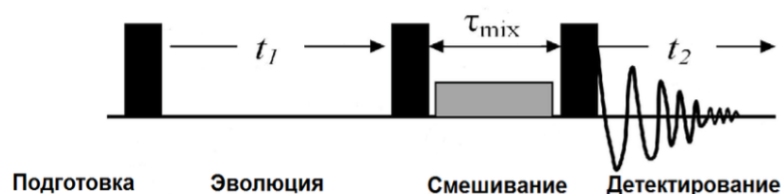


Рисунок 2 - Импульсная последовательность ЯМР-эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY.

После определенного фиксированного периода подготовки на систему происходит воздействие 90 импульсом. В течение заданного времени  $t_1$  возбужденные спины начинают свободно прецессировать. За это время происходит кодирование химического сдвига спина. В период изотопного смешивания ( $\tau_{\text{mix}}$ ) намагниченность с первого ядра переносится на второе. Во время детектирования происходит запись данных, полученных во время эксперимента.

Эксперимент TOCSY позволяет устанавливать корреляции между ядрами одного типа (например  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), и мы можем наблюдать кросс-пики между протонами, которые связаны друг с другом спин-спиновым взаимодействием.

Рассмотрим цепочку из четырех атомов водорода, обозначенных А, В, С, D. Водород А связан с водородом В, который связан с С, который связан с D. В эксперименте TOCSY будут наблюдаться кросс-пики между всеми парами ядер водорода, как показано на рисунке 3.

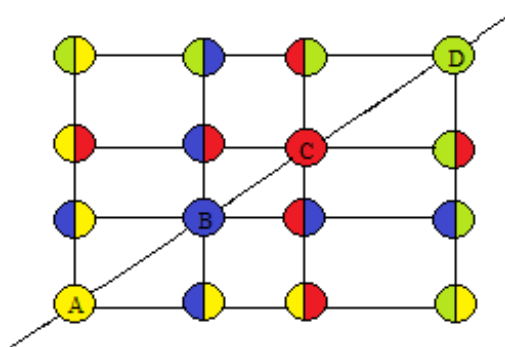


Рисунок 3 - Кросс-пики между связанными ядрами А, В, С, D, наблюдаемые в эксперименте 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY.

## 2.2 NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Одним из межпространственных корреляционных методов ЯМР-спектроскопии является 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Этот метод помогает установить взаимодействия между ядрами водорода, которые пространственно близки друг от друга вне зависимости от расположения связей в молекуле между данными ядрами (рисунок 4). Данный метод основан на ядерном эффекте Оверхаузера, согласно которому близлежащие атомы (на расстоянии до 5 Å друг от друга) подвергаются кросс-релаксации, основанной на механизме спин-решеточной релаксации [9].

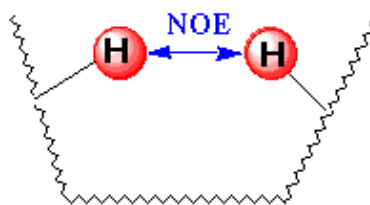


Рисунок 4 - Прямое взаимодействие ядер через пространство в ЯМР-эксперименте 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY.

Базовая импульсная последовательность состоит из трех  $90^\circ$  импульсов (рисунок 5) [10]. Первый импульс создает поперечную спиновую намагниченность. Спины прецессируют в течение времени эволюции  $t_1$ . Второй импульс создает продольную намагниченность, равную поперечной составляющей намагниченности, ортогональной направлению импульса. Во время смешивания  $\tau_m$  происходит перенос намагниченности посредством кросс-релаксации. Третий импульс создает поперечную намагниченность из оставшейся продольной. Детектирование сигналов происходит сразу же после подачи третьего импульса.

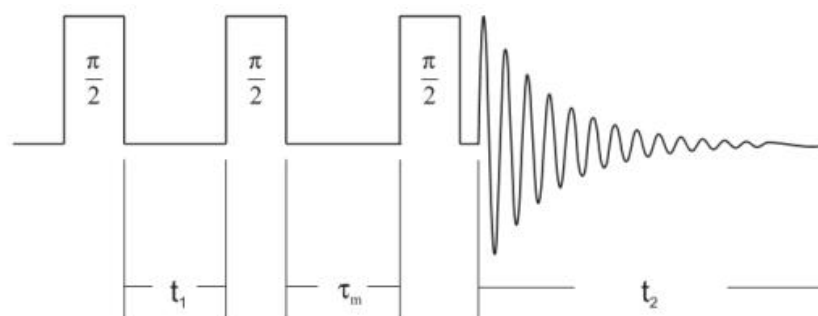


Рисунок 5 - Последовательность 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ЯМР-спектра.

### 2.3 ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy)

Двумерный гомоядерный эксперимент ROESY (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат), импульсная последовательность которого представлена на рисунке б, также как NOESY, позволяет определить межъядерные расстояния между протонами, пространственно близкими друг к другу. Но для молекул с небольшой молекулярной массой (1-3 кДа) спектры ROESY являются более интенсивными, чем спектры NOESY. ROESY характеризуется только положительным значением интенсивности из-за отсутствия фазовой чувствительности и провала на шкале интенсивности сигнала [11].

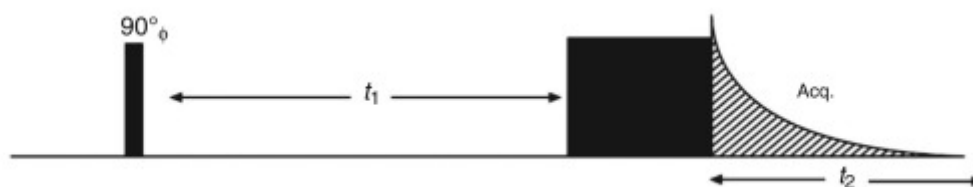


Рисунок 6 - Импульсная последовательность 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY ЯМР-спектра.

### 3. Экспериментальная часть

#### 3.1 Объект исследования

Объектом исследования является пептид SEM1(86-107), состоящий из 22 аминокислотных остатков (рисунок 7), соответствующих 86-107 аминокислотным остаткам белка семеногелина1 человека. Пептид был получен твердофазным синтезом по методике, описанной в статье М. И. Камалова [12].

**Asp Leu Asn Ala Leu His Lys Thr Thr Lys Ser Gln Arg His Leu Gly Gly Ser Gln Gln Leu Leu**

Рисунок 7 - Аминокислотная последовательность пептида SEM1(86-107).

Додецилфосфохолин для получения мицелл был приобретен у SigmaeAldrich (Милуоки, Висконсин).

#### 3.2 Методы исследования

ЯМР-спектры 1D  $^1\text{H}$  и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) были получены на ЯМР-спектрометре 700 МГц (Bruker, AVANCE III 700) при температуре 298 К. Для исследования образца были зарегистрированы двумерные ЯМР-спектры экспериментов 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY.

Пептид SEM1(86-107) без DPC и пептид SEM1(86-107) в пептид-мицелла DPC растворяли в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) непосредственно перед проведение экспериментов.

Для пептида SEM1(86-107) без DPC были получены двумерные ЯМР-спектры экспериментов  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY. Для пептида SEM1(86-107) в комплексе пептид-мицелла DPC были получены двумерные ЯМР-спектры экспериментов  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY

Обработка данных производилась с помощью программы Bruker Topspin 3.6. Дальнейший анализ спектров производился с помощью программ NMRFAM-SPARKY [13] и CCP-NMR [14]. Отнесение химических сдвигов водорода было сделано с использованием ЯМР-спектров экспериментов 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY для пептида SEM1(86-107) без DPC и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY для пептида SEM1(86-107) в комплексе пептид-мицелла DPC. Во время всех ЯМР-экспериментов никаких изменений в 1D  $^1\text{H}$  спектрах исследуемых объектов не наблюдалось. На основе этого можно предположить, что структурных изменений пептида не происходило.

Определение межъядерных расстояний производилось с помощью анализа ЯМР-спектров экспериментов 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY для пептида SEM1(86-107) без DPC и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY для пептида SEM1(86-107) в комплексе с DPC. Для расчета пространственной структуры исследуемых образцов использовалась программа XPLOR-NIH [15]. Как входные данные для этой программы, использовались ранее определенные межъядерные расстояния пептида SEM1(86-107) и пептида SEM1(86-108) + DPC. Визуализация рассчитанных структур производилась в программе UCSF Chimera [16].

## 4. Результаты и обсуждения

### 4.1 Определение пространственной структуры пептида SEM1(86-108) в водном растворе

С помощью ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY было произведено отнесение химических сдвигов водорода с соответствующими аминокислотными остатками. Рассмотрим подробно отнесение сигналов ядер водорода для одного из аминокислотных остатков на примере аминокислоты 100Leu. Отнесение химических сдвигов протонов остальных аминокислотных остатков исследуемого пептида производилось таким же способом, как в описанном примере.

Выбранная аминокислота 100Leu состоит из 5 протонных групп NH,  $\text{H}_\alpha$ ,  $\text{H}_\beta$ ,  $\text{H}_\gamma$ ,  $\text{H}\delta_1$ ,  $\text{H}\delta_2$ . В табличных данных [17, 18], представленных на рисунке 8, показаны средние значения химических сдвигов ядер водорода для аминокислотного остатка лейцина.

<i>Residue</i>	<i>NH</i>	<i>H<math>_\alpha</math></i>	<i>H<math>_\beta</math></i>	<i>Others</i>
Leu	8.22	4.32	1.63, 1.57	1.54 ( $\gamma\text{CH}$ ), 0.77, 0.76 ( $\delta\text{CH}_3$ )

Рисунок 8 – Средние значения химических сдвигов ядер водорода для аминокислоты лейцин.

В амидной области спектра TOCSY присутствовал сигнал со значением химического сдвига 8,38 м.д., для которого наблюдалось 5 кросс-пиков (рисунок 9). Первый кросс-пик был образован с сигналом, значение химического сдвига которого было равно 4,32 м.д. Данный кросс-пик соответствует  $\text{H}_\alpha$  группе аминокислоты лейцин (рисунок 9в). Следующая группа, связанная с  $\text{H}_\alpha$  группой спин-спиновым взаимодействием, -  $\text{H}_\beta$ . Для лейцина  $\text{H}_\beta$  группа является эквивалентной, т.е. будут наблюдаться один

кросс-пик (рисунок 9б). В амидной области наблюдался кросс-пики, химический сдвиг которого равен 1,51 м.д., которые соответствуют  $H_{\beta}$  группе (рисунок 9б). Группа  $H_{\gamma}$  связана спин-спиновым взаимодействием с  $H_{\beta}$  группой. Следовательно, кросс-пик, имеющий значение химического сдвига 1,50 м.д в амидной области, соответствует  $H_{\gamma}$  группе лейцина (рисунок 9б). Группа, связанная с  $H_{\gamma}$  группой спин-спиновым взаимодействием, –  $H_{\delta}$ . Для лейцина  $H_{\delta}$  группа является неэквивалентной, т.е. будут наблюдаться два сигнала от этой группы:  $H_{\delta_1}$ ,  $H_{\delta_2}$ . Кросс-пики, имеющие значения химических сдвигов 0,78 м.д и 0,84 м.д. в амидной области, соответствуют  $H_{\delta_1}$ ,  $H_{\delta_2}$  группам лейцина (рисунок 9а).

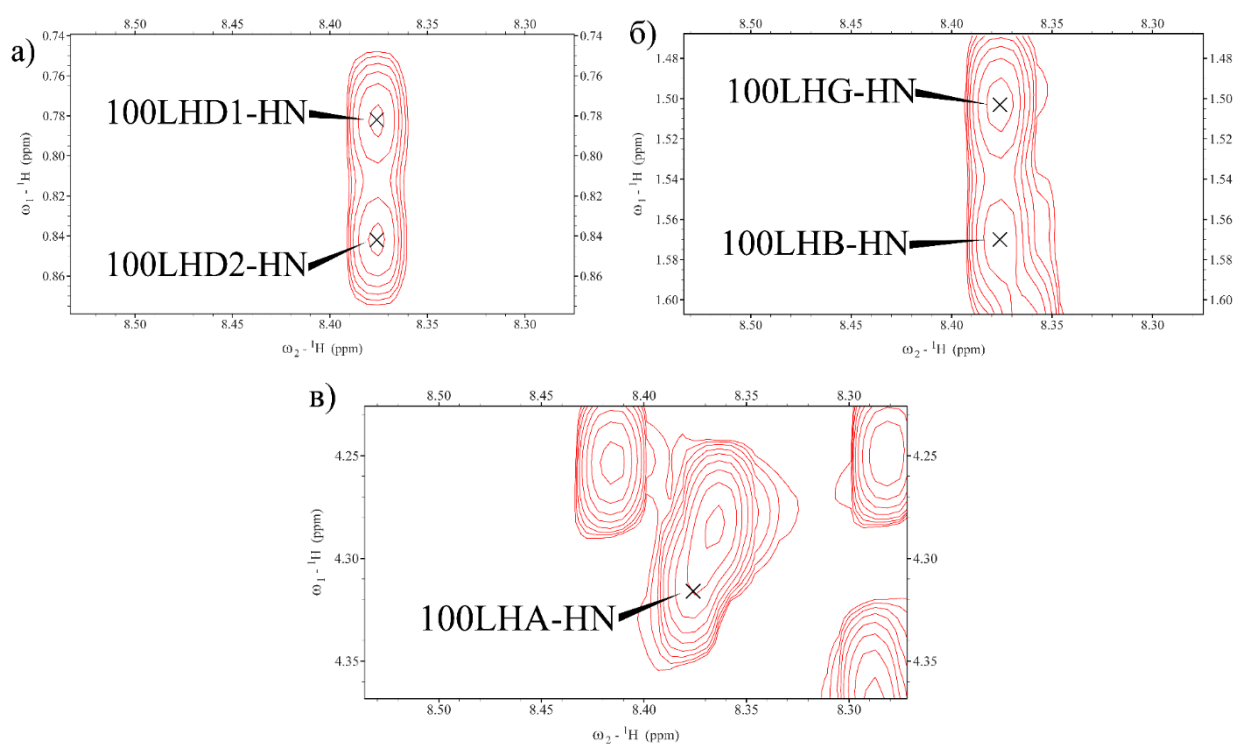


Рисунок 9 - Амидная область ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К. а)  $H_{\delta_1}$ ,  $H_{\delta_2}$  группа лейцина, б)  $H_{\beta}$  и.  $H_{\gamma}$  группы лейцина, в)  $H_{\alpha}$  группа лейцина.

Анализируя кросс-пики ЯМР-спектров 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY, было проведено отнесение химических сдвигов ядер водорода для 22 аминокислотных остатков исследуемого пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К (рисунки 10, 11). Полученные значения химических сдвигов ядер водорода приведены в приложении 1.

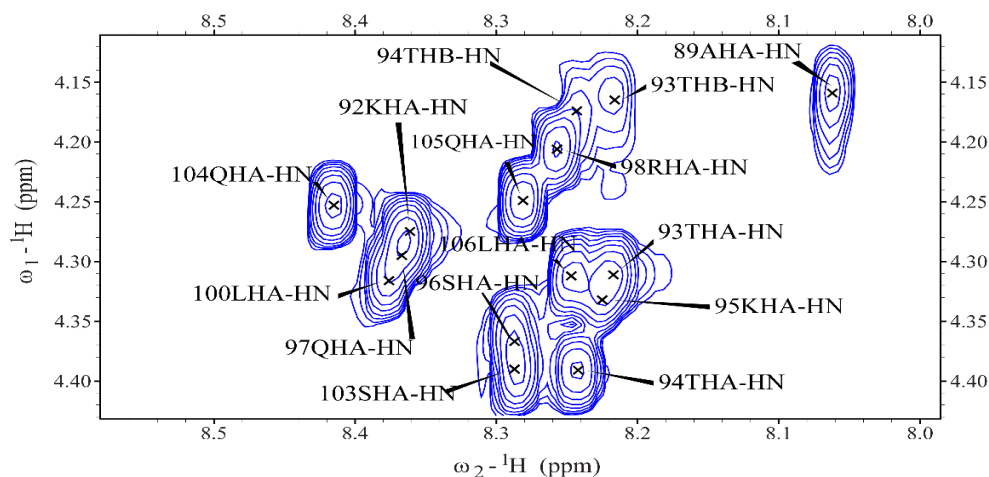


Рисунок 10 - Амидная область ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К.

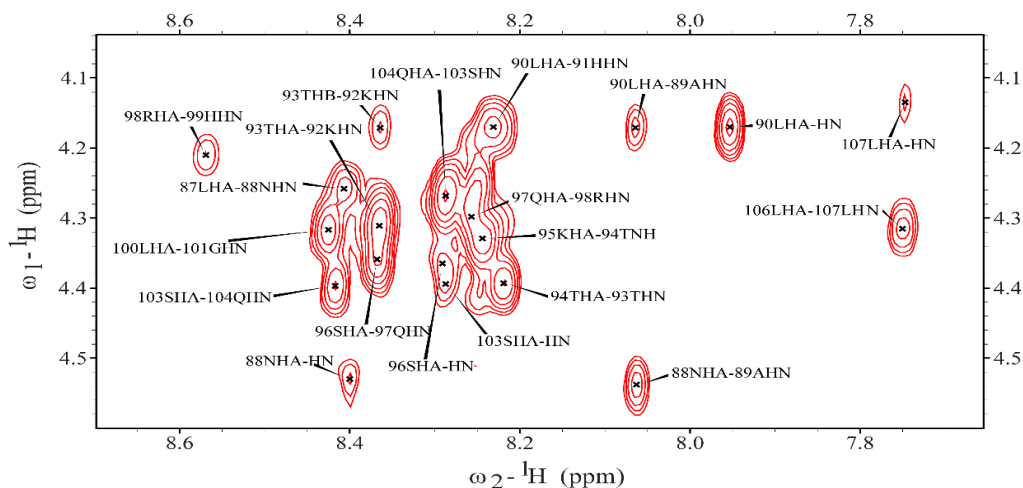


Рисунок 11 - Фрагмент ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К.

Анализ ЯМР-спектров 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (рисунок 12) позволил определить межъядерные расстояния пептида SEM1(86-107) в водном растворе (приложение 2). Всего было определено 134 межъядерных расстояния, из которых 96 расстояний внутри аминокислотных остатков и 38 расстояний между протонами, пространственно близких аминокислотных остатков: 5 расстояний между протонами групп NH соседних аминокислотных остатков, 17 расстояний между протонами HA и NH групп соседних аминокислотных остатков и 16 расстояний между протонами других групп.

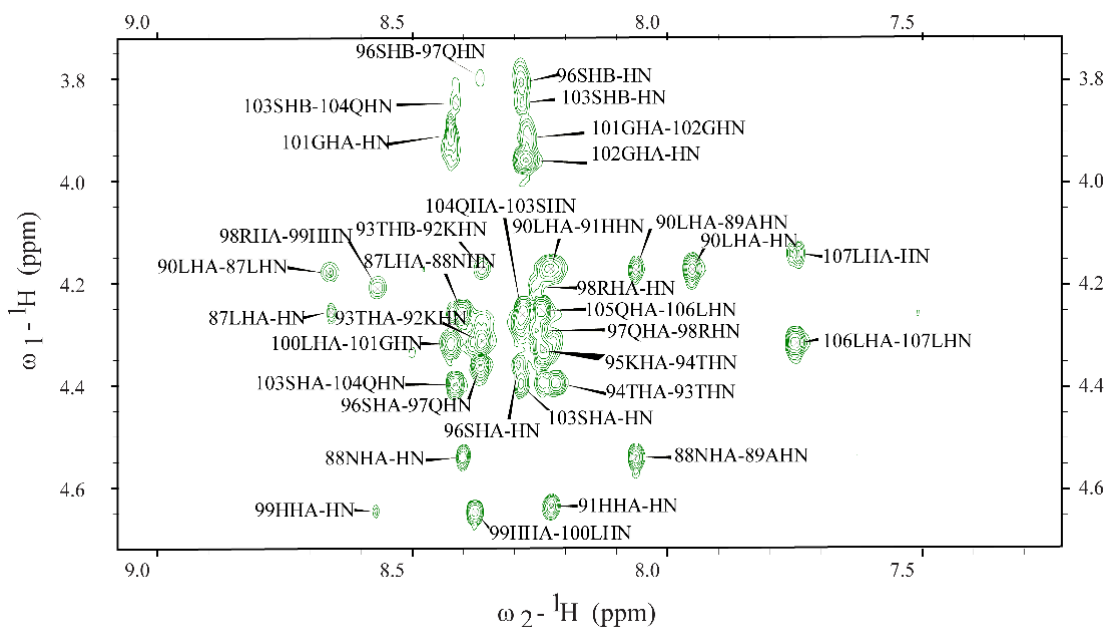


Рисунок 12 - Фрагмент ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К.

Предсказание вторичной структуры было выполнено с использованием параметров ЯМР-спектроскопии: химических сдвигов и межъядерных расстояний [19]. Вторичную структуру визуализировали с помощью программы CCPNMR. Анализ показал, что вторичная структура пептида SEM1(86-107) относится к структуре «случайного клубка» (рисунок 13).

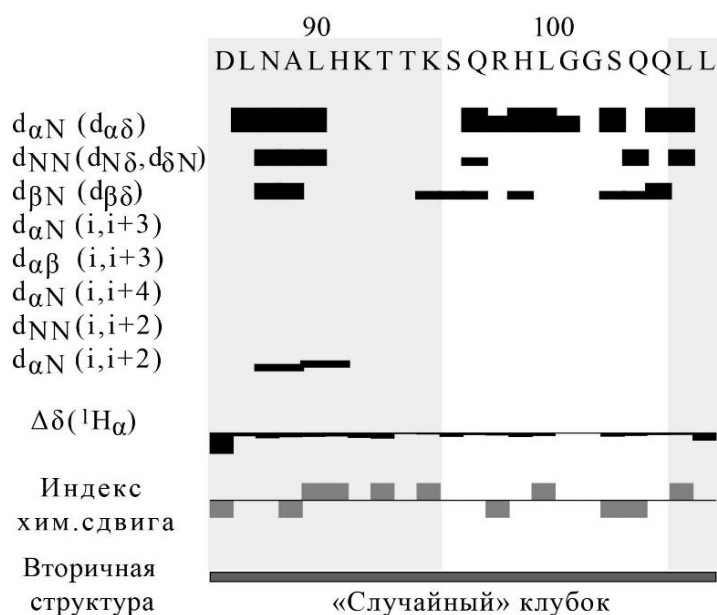


Рисунок 13 - Предсказание вторичной структуры пептида SEM1(86-107).

Для расчета пространственной структуры пептида SEM1(86-107) были использованы средние значения межъядерных расстояний, определенные ранее в экспериментах NOESY и ROESY. Расчет производился в программе XPLOR-NH.

На рисунке 14 показан ансамбль из 9 структур, выровненных по N-концевому фрагменту пептида (СКО основной цепи (bb) для Leu87-Lys92:  $0,26 \pm 0,10 \text{ \AA}$ ). Пептид SEM1(86-107) обладает неупорядоченной вторичной структурой.

Для проверки рассчитанной пространственной структуры пептида была выполнена карта Рамачандрана (рисунок 15) [20]. Поскольку все сигналы не выходят за границы разрешенных областей, можно считать, что структура рассчитана верно.

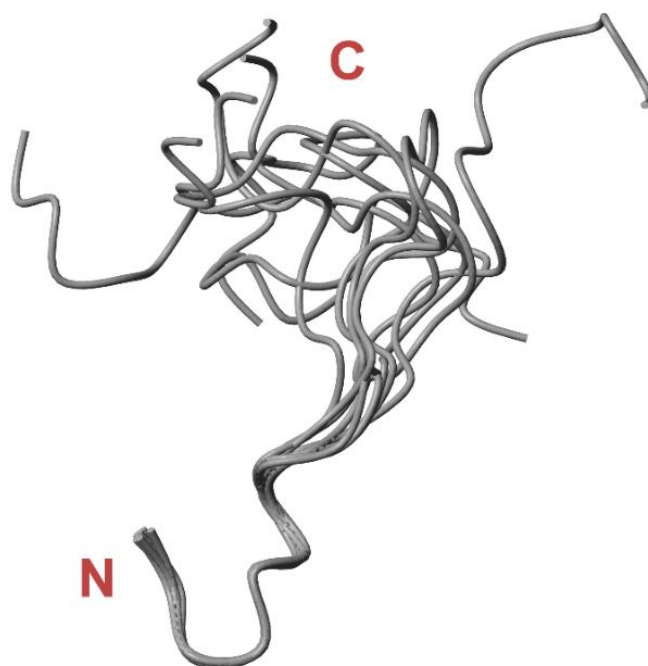


Рисунок 14 - Пространственная структура пептида SEM1(86-107) в водном растворе. Ансамбль из 9 структур.

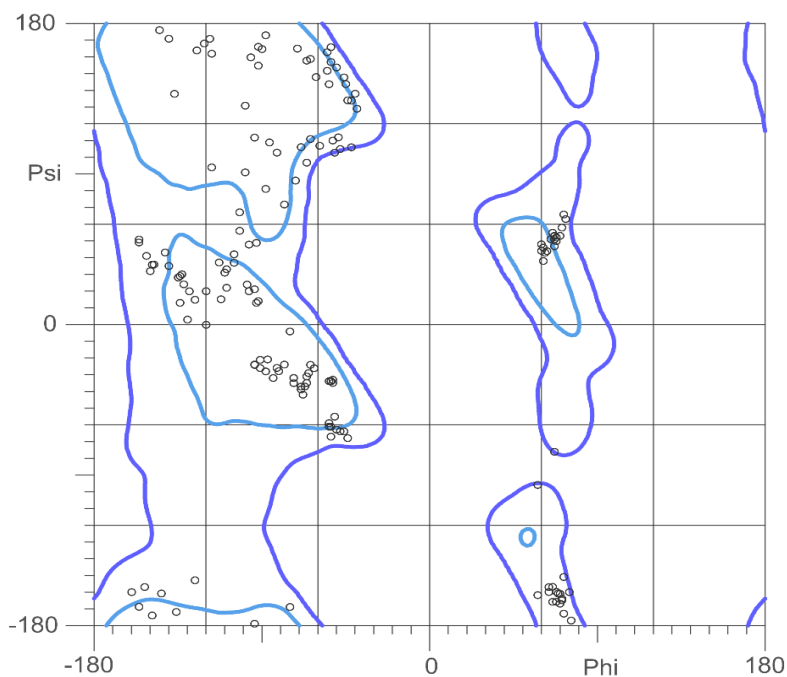


Рисунок 15 - Карта Рамачандрана пептида SEM1(86-107) для ансамбля из 9 структур.

Несмотря на то, что пептид SEM1(86-107) имеет неупорядоченную вторичную структуру, в аминокислотной последовательности данного пептида имеются участки, обладающие высокой сходимостью по ансамблю: Leu87-Lys92 (bb СКО:  $0.26 \pm 0.10 \text{ \AA}$ ), Thr94-Gln97 (bb СКО  $0.20 \pm 0.06 \text{ \AA}$ ) и Gln104-Leu107 (bb СКО  $0.22 \pm 0.10 \text{ \AA}$ ). Остальные фрагменты обладают низкой сходимостью по ансамблю из 9 структур, что может быть связано с их высокой подвижностью.

Из статьи К. Френча [21] известно, что фибриллы, образованные пептидами SEM1(86-107), имеет защищенное растворителем ядро, которое включает остатки Asp86-Lys92, Ser96-Arg-98, Gln104-Leu107. На основании известных и экспериментальных данных можно предположить, что найденные нами участки аминокислотной последовательности Leu87-Lys92, Thr94-Gln97 и Gln104-Leu107 могут участвовать в образовании фибрилл.

#### 4.2 Определение пространственной структуры пептида SEM1(86-107) в комплексе пептид-мицелла DPC в водном растворе

Отнесение химических сдвигов ядер водорода соответствующих аминокислотных остатков пептида SEM1(86-107) в комплексе пептид-мицелла DPC в водном растворе проводилось с помощью ЯМР-спектра эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY. Анализируя кросс-пики, полученные в 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  эксперименте TOCSY, было проведено соотнесение сигналов протонных групп для 22 аминокислотных остатков исследуемого фрагмента фибриногена (рисунок 16). Полученные значения химических сдвигов ядер водорода приведены в приложении 3.

Отнесение химических сдвигов ядер водорода пептида SEM1(86-107) в комплексе пептид-мицелла DPC в водном растворе проводилось аналогичным образом, описанным для пептида SEM1(86-107) без DPC в водном растворе.

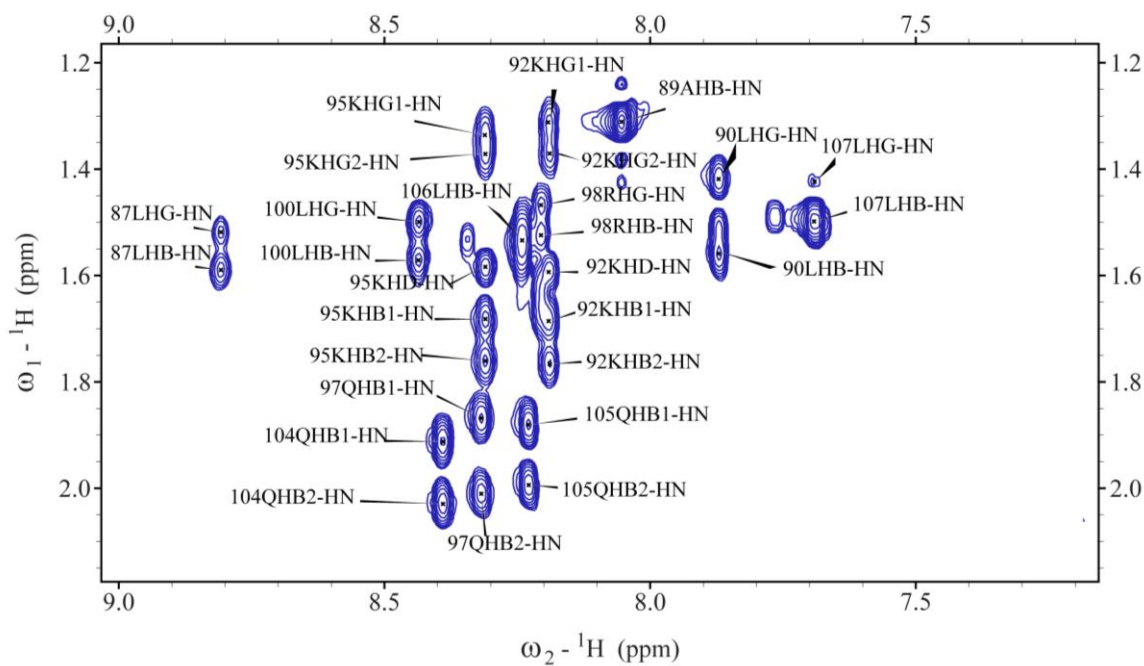


Рисунок 16 - Амидная область ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY пептида SEM1(86-107) + DPC в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К.

Для определения межъядерных расстояний был записан ЯМР-спектр 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  эксперимента ROESY. Наблюдались кросс-пики между сигналами протонов, относящихся к различным аминокислотным фрагментам исследуемого образца (рисунок 17).

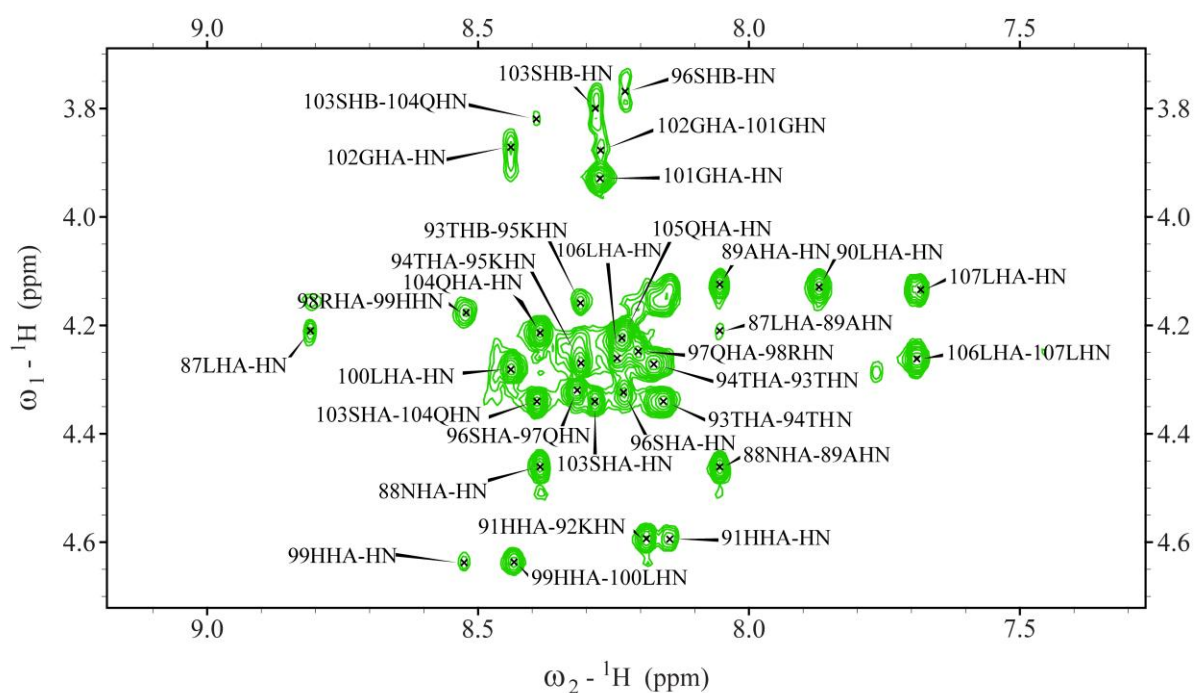


Рисунок 17 - Фрагмент ЯМР-спектра 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY пептида SEM1(86-107) + DPC в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при температуре 298 К.

В ходе эксперимента было определено 120 межъядерных расстояния, среди которых 87 расстояний внутри аминокислотных остатков и 33 расстояние между протонами пространственно близких аминокислотных остатков (10 расстояний между протонами NH групп соседних аминокислотных остатков, 13 расстояний между протонами  $\text{H}_\alpha$  и NH групп соседних аминокислотных остатков, 10 расстояний между протонами других групп).

После анализа и обработки данных кросс-пиков, были получены приближенные межъядерные расстояния (приложение 4). В программе XPLOR-NIH была рассчитана пространственная структура пептида SEM1(86-107) + DPC. Найденные ранее усредненные значения межъядерных расстояний использовались как входные данные для расчета. Полученные

данные использовались в качестве входных данных при расчете пространственной структуры пептида SEM1(86-107) + dDPC в программе XPLOR-NIH. Из 1000 рассчитанных структур были выбраны 9 структур с наименьшими значениями энергий. Полученный ансамбль из 9 структур выровнен по N-концевому фрагменту пептида, обладающему хорошей сходимостью по данному ансамблю (СКО основной цепи (bb) для Leu87-Lys92:  $0,37 \pm 0,13 \text{ \AA}$ ). Структура были визуализирована в программе USFC Chimera и представлена на рисунке 18.

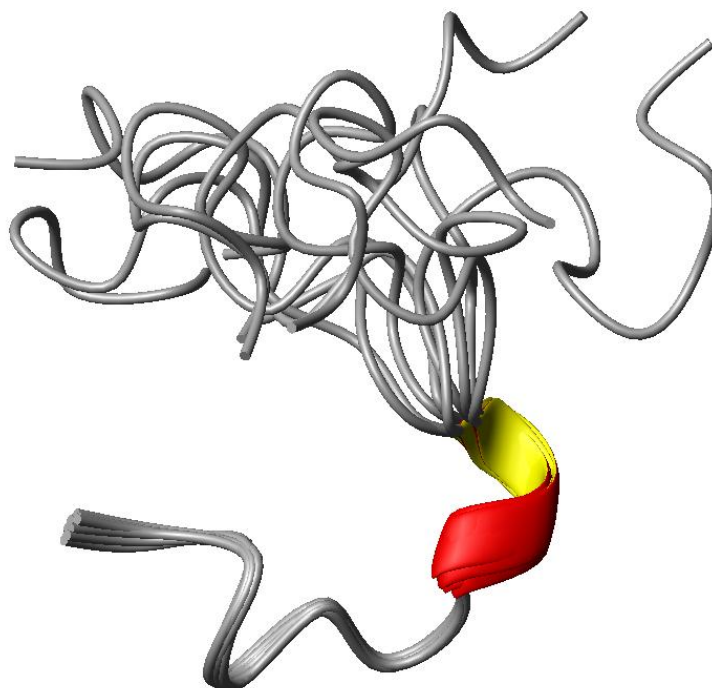


Рисунок 18 - Пространственная структура пептида SEM1(86-107) + DPC в водном растворе. Ансамбль из 9 структур.

Исследования пространственной структуры показало, что пептид SEM1(86-107) + DPC обладает неупорядоченной вторичной структурой, но имеет  $3_{10}$ -спираль (Thr94-Ser96). N-концевой фрагмент пептида (Leu87-Lys92) обладает хорошей сходимостью в ансамбле из 9 структур. Остальные фрагменты обладают плохой сходимостью по ансамблю, что может быть объяснено их высокой подвижностью.

Ранее мы определили пространственную структуру пептида SEM1 (86-107) в водном растворе (рисунок 14). Если сравнить структуры, можно отметить, что N-концевые домены пептидов имеют хорошую сходимость в ансамбле (СКО bb для SEM1(86-107) Leu87-Lys92:  $0,26 \pm 0,10 \text{ \AA}$ ; для SEM1(86-107) + DPC Leu87-Lys92:  $0,18 \pm 0,06 \text{ \AA}$ ), в отличие от C-концевого домена. Оба пептида имеют неупорядоченную структуру, но SEM1(86-107) с мицеллой додецилфосфохолина имеет  $3_{10}$ -спираль (Thr94-Ser96). Мы предполагаем, что присутствие мицелл DPC, как модели поверхности липидной мембраны, приводит к появлению спиральной области. На основании вышеизложенного можно предположить, что при изучении амилоидных пептидов спермы нельзя игнорировать влияние липидных мембран на пространственную структуру пептидов.

## ВЫВОДЫ

В ходе работы были получены следующие результаты:

1. Сделано отнесение химических сдвигов ядер водорода пептида SEM1(86-107) без DPC и пептида SEM1(86-107) в комплексе с белком-мицеллой DPC и определены межъядерные расстояния исследуемых образцов.
2. Впервые была рассчитана пространственная структура пептида SEM1(86-107) и SEM1(86-107) + DPC.
3. Вторичная структура исследуемых образцов представляет собой «случайный клубок», но SEM1(86-107) + DPC имеет 310-спираль (Thr94-Ser96).
4. Сравнивая рассчитанные структуры, можно отметить, что N-концевые домены пептидов имеют хорошую сходимость в ансамбле из 9 структур. Оба пептида обладают неупорядоченной структурой, но SEM1(86-107) с мицеллой додецилфосфохолина имеет 310-спираль (Thr94-Ser96). Мы предполагаем, что присутствие мицелл DPC как модели поверхности липидной мембраны приводит к появлению спиральной области. Можно предположить, что при изучении амилоидных пептидов семенной жидкости нельзя игнорировать влияние липидных мембран на пространственную структуру пептидов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. / D. S. Dimitrov, R. L. Willey, H. Sato [et al.] // *Journal of Virology*. – 1993. – Vol. 67, № 4. – P. 2182-2190.
2. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. / J. Munch, E. Rucker, L. Standker [et al.] // *Cell* – 2007. – Vol. 131, № 6. – P. 1059-1071.
3. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. / N. R. Roan, J. A. Müller, H. Liu [et al.] // *Cell Host and Microbe* – 2011. – Vol. 10. – P. 541-550.
4. Schrank, E. Solution NMR Studies of the Orientation of Membrane-Bound Peptides and Proteins by Paramagnetic Probes. / E. Schrank, G. E. Wagner, K. Zangger // *Molecules* – 2013. – Vol. 18. – P. 7407-7435.
5. Gunter, H. NMR Spectroscopy: An Introduction. / H. Gunter – Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1987.
6. Эмсли, Дж. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. / Дж. Эмсли, Дж. Финей, Л. Сатклиф.; пер. с англ. Б. А. Квасова. – Москва: Мир, 1968.
7. Дероум, Э. А. Современные методы ЯМР для химических исследований. / Э. А. Дероум; пер. с англ. Ю. М. Демина. – Москва: Мир, 1992.
8. Вах, А. Two-Dimensional NMR in Liquids. / A. Vah – Dordrecht: Reidel, 1984.
9. Turner, D. L. Basic Two-Dimensional Nmr / D. L. Turner // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* – 1985 – Vol. 17. – P. 281-358.
10. Keller, J. Understanding NMR Spectroscopy. / J. Keller – England: John Wiley, 2005.

11. Neuhaus, D. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. / D. Neuhaus, M. P. Williamson – New York: Wiley-VCH, 2000.
12. Kamalov, M. I. Synthesis and characterization of polyaspartic acid-histidine conjugate as an analog of antioxidant enzymes. / M. I. Kamalov, G. R. Sadrieva, A. M. Pavlyuk [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology – 2019. – Vol. 55. – P. 474-481.
13. Goddard, T. D. SPARKY 3. / T. D. Goddard, D. G. Kneller // URL: <http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/> .
14. Vranken, W. F. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. / W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens [et al.] // Proteins – 2005. – Vol. 59. – P. 687-696.
15. 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. – Vol. 160, №1. – P. 65-73.
16. Pettersen, E. F. UCSF CHIMERA – a visualization system for exploratory research and analysis. / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, T. E. Ferrin [et al.] // Journal of Computational Chemistry – 2004 – Vol. 25, №13. – P. 1605-1612.
17. Wuthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. / K. Wuthrich – New York: Wiley-VCH, 1986.
18. Rule, G.S. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. / G. S. Rule – Dordrecht: Springer, 2006.
19. Wishart, D. S. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. / D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards // Biochemistry – 1992 – Vol. 31(b). – P. 1647-1651.
20. Laskowski, R. A. The ramachandran plot and protein structure validation. / R. A. Laskowski, N. Furnham, J. M. Thornton // World Scientific – 2013 – P. 62-75.

21. French, K. C. Structural characterization of semen coagulum-derived SEM1(86-107) amyloid fibrils that enhance HIV-1 infection. / K. C. French, N. R. Roan, G. I. Makhatadze // *Biochemistry* – 2014 – Vol. 53. – P. 3267-3277.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Таблица химических сдвигов  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta\text{H}$ , мд) пептида SEM1(86-107) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}/90\% + 10\%$ ) при 298 К.

	HN	HA	HB	Остальные группы
86 Asp	-	4.18	2.75	-
87 Leu	8.66	4.26	1.58	HG 1.55; HD 0.82/0.86
88 Asn	8.40	4.54	2.73	HD2 6.89/7.63
89 Ala	8.06	4.15	1.31	-
90 Leu	7.95	4.17	1.49/1.54	HG 1.41; HD 0.78/0.84
91 His	8.23	4.63	3.10/3.20	-
92 Lys	8.36	4.28	1.70/1.78	HG 1.36; HD 1.61; HE 2.92
93 Thr	8.22	4.31	4.16	HG 1.14
94 Thr	8.24	4.39	4.18	HG 1.15
95 Lys	8.23	4.33	1.69/1.77	HG 1.38; HD 1.62; HE 2.90
96 Ser	8.29	4.36	3.79	-
97 Gln	8.37	4.29	1.89/2.03	HG 2.29
98 Arg	8.26	4.21	1.65/1.70	HG 1.49
99 His	8.57	4.64	3.07/3.16	-
100 Leu	8.38	4.32	1.51	HG 1.51; HD 0.78/0.84
101 Gly	8.42	3.91	-	-
102 Gly	8.28	3.95	-	-
103 Ser	8.29	4.39	3.84	-
104 Gln	8.42	4.26	1.93/2.06	HG 2.29
105Gln	8.28	4.25	1.90/2.00	HG 2.27
106 Leu	8.25	4.31	1.55	HG 1.55; HD 0.78/0.85
107 Leu	7.75	4.14	1.51	HG 1.45; HD 0.79/0.83

Приложение 2. Межъядерные расстояния пептида SEM1(86-107) в водном растворе (H<sub>2</sub>O + D<sub>2</sub>O/90% + 10%) при 298 К.

	Пара атомов	Расстояние, Å		Пара атомов	Расстояние, Å		Пара атомов	Расстояние, Å
1	L87HA – L87HB	2.50	46	T93HG – T93HB	2.50	91	L100HB – L100HN	2.50
2	L87HA – L87HN	2.50	47	T93HG – T93HN	2.50	92	L100HG – L100HN	3.46
3	L87HA – N88HN	3.46	48	T93HN – T94HA	3.74	93	L100HD2 – L100HN	2.50
4	L87HB – L87HD1	2.50	49	T94HA – T94HB	2.50	94	G101HA – G101HN	2.50
5	L87HB – L87HN	2.50	50	T94HA – T94HG	3.01	95	G101HA – G102HN	2.50
6	N88HA – N88HN	2.50	51	T94HA – T94HN	2.50	96	G102HA – G102HN	2.50
7	N88HA – A89HN	3.37	52	T94HG – T94HN	3.30	97	S103HA – S103HB	2.50
8	N88HB – N88HA	2.50	53	K95HA – K95HB1	2.50	98	S103HA – S103HN	2.50
9	N88HB – N88HN	2.50	54	K95HA – K95HB2	2.50	99	S103HA – Q104HN	3.19
10	N88HB – A89HN	2.50	55	K95HA – K95HD	2.50	100	S103HB – S103HN	2.50
11	N88HN – A89HN	2.50	56	K95HA – K95HG	3.41	101	S103HB – Q104HN	2.50
12	A89HB – A89HN	2.50	57	K95HB1 – K95HN	3.64	102	Q104HA – S103HN	4.50
13	A89HB – L90HN	2.50	58	K95HB1 – S96HN	2.50	103	Q104HA – Q104HB2	2.50
14	A89HN – A89HA	2.50	59	S96HA – T94HG	2.50	104	Q104HA – L106HG	2.50
15	A89HN – L90HN	2.50	60	S96HA – S96HB	2.50	105	Q104HB1 – Q104HB2	2.50
16	L90HA – L87HN	2.50	61	S96HA – S96HN	2.50	106	Q104HB1 – Q104HN	3.56
17	L90HA – A89HN	3.88	62	S96HA – Q97HN	2.50	107	Q104HB2 – Q104HN	2.50
18	L90HA – L90HB	2.50	63	S96HB – Q97HN	2.50	108	Q104HG – Q104HN	2.50
19	L90HA – L90HG	2.50	64	Q97HA – Q97HB1	2.50	109	Q104HN – Q104HA	2.50
20	L90HA – L90HN	2.50	65	Q97HA – Q97HB2	2.50	110	Q104HN – Q105HN	2.50
21	L90HA – H91HN	2.50	66	Q97HA – Q97HG	2.50	111	Q105HA – Q105HB1	2.50
22	L90HB – L90HN	3.74	67	Q97HA – R98HN	2.50	112	Q105HA – Q105HB2	2.50
23	L90HB1 – L90HD2	2.50	68	Q97HB1 – Q97HB2	2.50	113	Q105HA – Q105HG	2.50
24	L90HG – L90HD1	2.50	69	Q97HB1 – Q97HN	3.71	114	Q105HA – L106HN	3.13

Продолжение приложения 2.

25	L90HG – L90HD2	2.50	70	Q97HB2 – Q97HN	2.50	115	Q105HB1 – Q105HB2	2.50
26	L90HG – L90HN	2.50	71	Q97HG – Q97HN	2.50	116	Q105HB1 – Q105HG	2.50
27	L90HN – H91HN	2.50	72	Q97HN – Q97HA	2.50	117	Q105HB1 – Q105HN	3.56
28	H91HA – H91HN	2.50	73	R98HA – R98HB1	2.50	118	Q105HB1 – L106HN	2.50
29	H91HB1 – H91HN	2.50	74	R98HA – R98HB2	2.50	119	Q105HB2 – Q105HN	2.50
30	H91HB2 – H91HB1	2.50	75	R98HA – R98HG	2.50	120	Q105HB2 – L106HN	2.50
31	H91HB2 – H91HN	2.50	76	R98HA – R98HD	4.09	121	Q105HG – Q105HN	2.50
32	H91HN – K92HB2	3.21	77	R98HA – R98HN	2.50	122	Q105HG – L106HN	3.50
33	K92HA – K92HB1	2.50	78	R98HA – H99HN	2.50	123	Q105HN – Q105HA	2.50
34	K92HA – K92HB2	2.50	79	R98HB1 – R98HD	2.50	124	L106HA – L106HG	2.50
35	K92HA – K92HD	3.60	80	R98HB1 – R98HN	2.50	125	L106HA – L107HN	2.50
36	K92HB1 – K92HE	3.25	81	R98HB2 – R98HG	2.50	126	L106HG – L106HD2	2.50
37	K92HB1 – K92HN	2.50	82	R98HB2 – R98HD	2.50	127	L106HD1 – L106HG	2.50
38	K92HB2 – K92HD	2.50	83	R98HB2 – R98HN	2.50	128	L106HN – L107HN	2.50
39	K92HB2 – K92HE	2.50	84	R98HG – R98HD	2.50	129	L107HA – L107HB	2.50
40	K92HB2 – K92HN	3.10	85	H99HA – H99HN	2.50	130	L107HA – L107HN	2.50
41	K92HD – K92HE	2.50	86	H99HA – L100HN	2.50	131	L107HB – L107HD1	2.50
42	K92HN – T93HB	2.50	87	H99HB1 – L100HN	2.50	132	L107HB – L107HD2	2.50
43	T93HA – K92HN	3.92	88	H99HB2 – L100HN	2.50	133	L107HB – L107HN	2.50
44	T93HA – T93HG	2.50	89	L100HA – L100HG	3.20	134	L107HN – L106HG	4.36
45	T93HG – K92HN	3.24	90	L100HA – G101HN	2.50			

Приложение 3. Таблица химических сдвигов  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta\text{H}$ , мд) пептида SEM1(86-107) + dDPC в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}/90\% + 10\%$ ) при 298 К.

	HN	HA	HB	Other
86 Asp	-	4.15	2.78	-
87 Leu	8.81	4.21	1.59	HG 1.52 ; HD 0.80/0.85
88 Asn	8.38	4.46	2.72	HD2 6.86/7.65
89 Ala	8.05	4.12	1.31	-
90 Leu	7.87	4.13	1.56	HG 1.42 ; HD 0.76/0.83
91 His	8.15	4.59	3.09/3.20	-
92 Lys	8.19	4.27	1.69/1.77	HG 1.32/1.37 ; HD 1.59 ; HE 2.89
93 Thr	8.18	4.34	4.16	HG 1.12
94 Thr	8.16	4.27	4.16	HG 1.12
95 Lys	8.31	4.23	1.68/1.76	HG 1.34/1.37 ;HD 1.58 ; HE 2.89
96 Ser	8.23	4.33	3.78	-
97 Gln	8.32	4.24	1.87/2.01	HG 2.26
98 Arg	8.21	4.18	1.523	HG 1.47 ; HD 3.08
99 His	8.52	4.63	3.06/3.16	-
100 Leu	8.44	4.28	1.57	HG 1.50 ; HD 0.77/0.83
101 Gly	8.27	3.93	-	-
102 Gly	8.45	3.88	-	-
103 Ser	8.28	4.34	3.81	-
104 Gln	8.39	4.21	1.91/2.03	HG 2.26
105Gln	8.23	4.23	1.88/1.99	HG 2.25
106 Leu	8.24	4.27	1.53	HG 1.57 ; HD 0.77/0.83
107 Leu	7.69	4.13	1.50	HG 1.42; HD 0.77/0.81

Приложение 4. Межъядерные расстояния пептида SEM1(86-107)  
+dDPC в водном растворе (H<sub>2</sub>O + D<sub>2</sub>O/90% + 10%) при 298 К.

	Пара атомов	Расстояние, Å		Пара атомов	Расстояние, Å		Пара атомов	Расстояние, Å
1	L87HA – L87HB#	2.50	41	K92HE# – K92HG1	2.50	81	G101HA# – G101HN	3.50
2	L87HA – L87HD1#	2.50	42	K92HE# – K92HD#	2.50	82	G101HN – L100HN	2.50
3	L87HA – L87HD2#	2.50	43	K92HE# – T93HG#	2.50	83	G102HA# – G101HN	3.50
4	L87HA – L87HN	2.50	44	T93HA – T93HG#	2.50	84	G102HA# – G102HN	2.50
5	L87HA – A89HN	2.50	45	T93HA – T94HN	2.50	85	S103HA – S103HB#	2.50
6	L87HB# – L87HD1#	3.28	46	T93HB – K95HN	2.50	86	S103HA – S103HN	2.50
7	L87HB# – L87HD2#	3.14	47	T94HA – T93HN	3.80	87	S103HA – Q104HN	3.40
8	L87HB# – L87HN	2.50	48	T94HA – T94HG#	2.50	88	S103HB# – S103HN	2.50
9	L87HB# – N88HN	2.50	49	T94HA – K95HN	3.15	89	S103HB# – Q104HN	2.50
10	L87HG – N88HN	3.54	50	T94HN – K95HN	2.50	90	S103HN – Q104HN	2.50
11	N88HA – N88HB#	2.50	51	K95HA – K95HB1	2.50	91	Q104HA – Q104HB1	2.50
12	N88HA – N88HN	2.50	52	K95HA – K95HB2	2.50	92	Q104HA – Q104HN	2.50
13	N88HA – A89HN	3.23	53	K95HA – K95HG1	2.50	93	Q104HB1 – Q104HB2	2.50
14	N88HB# – N88HN	3.28	54	K95HA – K95HG2	2.50	94	Q104HB1 – Q104HN	2.50
15	N88HB# – A89HN	3.00	55	K95HB1 – K95HG2	2.50	95	Q104HB2 – Q104HA	2.50
16	N88HN – A89HN	2.50	56	K95HB1 – K95HN	3.40	96	Q104HB2 – Q104HN	3.40
17	A89HA – A89HB#	2.50	57	K95HG1 – K95HN	2.50	97	Q104HG# – G102HN	2.50
18	A89HA – A89HN	2.50	58	K95HE# – K95HB2	2.50	98	Q104HG# – Q104HN	2.50
19	A89HB# – A89HN	2.50	59	K95HE# – K95HG2	2.50	99	Q104HG# – L106HD1#	2.50
20	A89HB# – L90HN	2.50	60	K95HN – S96HN	2.50	100	Q105HA – Q105HB1	2.50
21	A89HN – L90HN	2.50	61	S96HA – S96HB#	2.50	101	Q105HA – Q105HN	2.50
22	L90HA – L90HD2#	2.50	62	S96HA – S96HN	2.50	102	Q105HB1 – Q105HG#	2.50
23	L90HA – L90HN	2.50	63	S96HA – Q97HN	2.50	103	Q105HB1 – Q105HN	2.50
24	L90HB# – L90HN	2.50	64	S96HB# – S96HN	2.50	104	Q105HB2 – Q105HN	3.46

Продолжение приложения 4.

25	L90HG – L90HD1#	2.50	65	S96HN – Q97HN	2.50	105	Q105HG# – Q105HN	2.50
26	L90HN – H91HN	2.50	66	Q97HA – R98HN	2.50	106	Q105HG# – L107HN	2.50
27	H91HA – H91HB2	2.50	67	Q97HB1 – Q97HB2	2.50	107	Q105HN – Q104HN	4.13
28	H91HA – H91HN	2.50	68	Q97HB1 – Q97HN	2.50	108	L106HA – L106HD1#	2.50
29	H91HA – K92HN	2.50	69	Q97HG# – Q97HN	2.50	109	L106HA – L106HD2#	3.50
30	H91HB1 – H91HN	2.50	70	R98HA – H99HN	2.50	110	L106HA – L106HN	2.50
31	K92HA – K92HB1	2.50	71	R98HB# – R98HD#	2.50	111	L106HA – L107HN	2.50
32	K92HA – K92HB2	2.50	72	R98HD# – R98HG#	2.50	112	L106HB# – L106HN	3.43
33	K92HA – K92HG1	3.40	73	H99HA – H99HB2	2.50	113	L107HA – L107HB#	2.50
34	K92HA – K92HG2	3.40	74	H99HA – H99HN	2.50	114	L107HA – L107HD1#	2.50
35	K92HB1 – K92HN	2.50	75	H99HA – L100HN	2.50	115	L107HA – L107HD2#	2.50
36	K92HB2 – K92HG1	2.50	76	L100HA – L100HG	2.50	116	L107HA – L107HN	2.50
37	K92HB2 – K92HG2	2.50	77	L100HA – L100HN	2.50	117	L107HB# – L107HD1#	3.20
38	K92HB2 – K92HD#	2.50	78	L100HB# – L100HN	2.50	118	L107HB# – L107HD2#	3.13
39	K92HG2 – K92HN	2.50	79	L100HG – L100HD2#	2.50	119	L107HB# – L107HN	2.50
40	K92HE# – K92HB1	3.40	80	L100HG – L100HN	2.50	120	L107HN – L106HN	2.50