

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

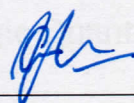
Направление: 03.03.02 – Физика

Профиль: Физика живых систем

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ ПЕПТИДА  
SEM1 (49-67) МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студент 4 курса группы 06-911

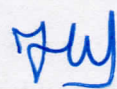
«15» июня 2023 г.

 (Семенова Е.А.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент


«15» июня 2023 г.

 (Юльметов А.Р.)

Научный консультант

к.ф.-м.н., доцент

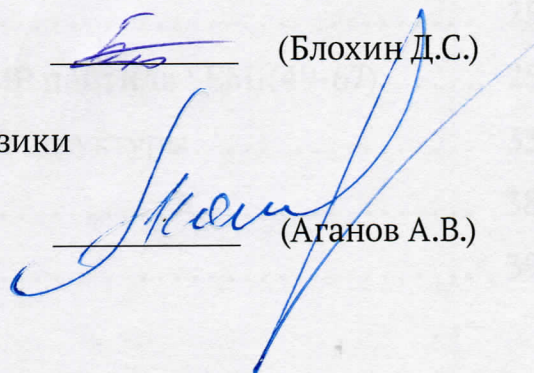
«15» июня 2023 г.

 (Блохин Д.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.ф.-м.н., профессор

«15» июня 2023 г.

 (Аганов А.В.)

Казань–2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1 Обзор литературы .....	5
1.1 Амилоидные фибриллы на основе фрагментов семеногелина	5
1.2 Физические основы ядерного магнитного резонанса .....	8
1.3 Угловой и магнитный моменты количества движения ядер ..	9
1.4 Ядра в статическом магнитном поле .....	9
1.5 Энергия ядер в магнитном поле .....	10
1.6 Химический сдвиг .....	12
1.7 Спин-спиновое взаимодействие .....	13
1.8 Импульсная спектроскопия ядерного магнитного резонанса	13
1.9 Метод двумерной ЯМР-спектроскопии .....	15
1.10 Эксперимент TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) .....	16
1.11 Эксперимент NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)	18
1.12 Эксперимент HSQC (Heteronuclear Sngle Quantum Coherence spectroscopy) .....	20
1.13 Эксперимент HMBC (Heteronuclear Multiply Bond Coherence)	21
2 Экспериментальная часть .....	23
2.1 Объект исследования .....	23
2.2 ЯМР спектры пептида SEM1(49-67) .....	23
3 Результаты и обсуждение .....	25
3.1 Анализ двумерных спектров ЯМР пептида SEM1(49-67) ....	25
3.2 Определение пространственной структуры .....	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	39

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) был выявлен в 1981 году [1] и является одним из тех вирусов, которые полностью уничтожить на данный момент невозможно. По данным исследований, на 2021 год выявлено около 40 миллиона зараженных. Ученые выделяют три основных способа заражения ВИЧ: незащищенный половой акт, во время которого возможны повреждения слизистых и проникновение вируса внутрь здоровой клетки, заражение при контакте с кровью инфицированного, также вирус может передаваться ребенку от ВИЧ-инфицированной матери во время беременности. Выведение ВИЧ из организма производится с помощью лекарственных препаратов, однако при несоблюдении должного лечения у больного повышается вероятность развития синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). На этом этапе организм человека теряет возможность бороться с различными видами инфекций, что приводит к смерти [2].

Одной из частых причин заражения выделяют незащищенный половой акт, поэтому семенная жидкость рассматривается как основной фактор увеличения инфекционной активности ВИЧ [3]. Сперма человека состоит из различных биологических компонентов, одним из которых является семенная жидкость. Семенная жидкость сообщает сперматозоидам подвижность, а также обеспечивает их энергетическими субстратами, сохраняя тем самым способность к оплодотворению. В составе семенной жидкости присутствует белок семеногелин, который выделяется семенными пузырьками и отвечает за фиксацию сперматозоидов в семенном коагуляте.

Механизм заражения ВИЧ-инфекцией на данный момент изучен не до конца. Если рассмотреть вирион ВИЧ и клетку как отрицательно заряженные частицы, то вследствие электростатического взаимодействия они будут от-

талкиваться. Однако определенные фрагменты семенной жидкости образуют фибриллы — нетевидные структуры, которые в свою очередь заряжены положительно. Фибриллы участвуют в транспортировке ВИЧ–инфекции внутрь человеческого организма, т.е выступают в качестве электростатического мостика, с помощью которого вирион ВИЧ проникает внутрь клетки. Ранее было выявлено что семеногелин активно участвует в образовании таких фибрилл[4]. Таким образом, изучение пространственной структуры одного из таких фрагментов семеногелина, который образует фибриллы, поможет в дальнейшем более детально изучить процесс заражения, что является актуальным в медицине на данный момент.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) — аналитический метод, который применяется в таких областях как медицина, биология, химия и физика. Сущность этого явления состоит в том, что система магнитных ядер поглощает энергию только при определенной частоте облучения. Этот метод широко используется для установления пространственной структуры белков и пептидов [5].

*Целью* данной работы являлось установление пространственной структуры фрагмента белка семеногелина — пептида SEM1(49-67) методом спектроскопии ЯМР. Для достижения цели было необходимо выполнение следующих задач:

- Записать спектры ЯМР для водного раствора пептида SEM1 (49-67): одномерного на ядрах  $^1\text{H}$ , и двумерных: TOCSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ), HSQC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ ), HMBC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ), NOESY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ), ROESY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ).
- Из анализа спектров NOESY и ROESY определить ограничения на межъядерные расстояния.
- Установить пространственную структуру пептида SEM1 (49-67) в водном растворе.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Амилоидные фибриллы на основе фрагментов семеногелина

Семенная жидкость влияет на увеличение скорости передачи ВИЧ половым путем [3]. Преобладающими белками в семенных пузырьках являются такие белки как семеногелин I (SEM1) и семеногелин II (SEM2), они составляют около 60% всего эякулята [6–9]. Оба белка выделяются из семенных пузырьков в виде гелеобразной структуры [10], однако концентрация SEM1 превосходит концентрацию SEM2 в 5–10 раз. В биохимические функции семеногелина входит разжижение спермы, понижение бактериальной активности и многие другие функции эякулята [10].

Белки — это органические соединения, основными элементами которых являются  $\alpha$ -аминокислоты и аминокислотные остатки, связанные между собой пептидными связями. Для каждого белка характерна последовательность аминокислотных остатков, которая определяет его пространственную структуру [11].

Peptide	Precursor	Sequence
PAP(248–286)	PAP	GIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMY
PAP(85–120)	PAP	IRKRYRKFLNESYKHEQVYIRSTDVDRTLMSAMTNL
SEM1(86–107)	SEM1	DLNALHKTTKSQRHLGGSQQLL
SEM1(68–107)	SEM1	TYHVDANDHDQSRKSQQYDLNALHKTTKSQRHLGGSQQLL
SEM1(45–107)	SEM1	GQHYSGQKKGKQQTESKGSFSIQYTYHVDANDHDQSRKSQQYDLNALHKTTKSQRHLGGSQQLL
SEM1(49–107)	SEM1	SGQKKGKQQTESKGSFSIQYTYHVDANDHDQSRKSQQYDLNALHKTTKSQRHLGGSQQLL
SEM2(68–107)	SEM2	TYHVDINDHDWTRKSQQYDLNALHKATKSKQHLGGSQQLL
SEM2(45–107)	SEM2	GQHYFGQKDQQHTKSKGSFSIQHTYHVDINDHDWTRKSQQYDLNALHKATKSKQHLGGSQQLL
SEM2(49–107)	SEM2	FGQKDQQHTKSKGSFSIQHTYHVDINDHDWTRKSQQYDLNALHKATKSKQHLGGSQQLL

Рисунок 1 — Пептидные фрагменты белков семенной жидкости, участвующих в образовании амилоидных фибрилл [4]

Определенные фрагменты белков образуют фибриллы — невидимые структуры, которые участвуют в транспортировке ВИЧ-инфекции внутрь человеческого организма (рисунок 1).

В силу того, что вирион ВИЧ и клетка-мишень заряжены отрицательно, между ними будет происходить электростатическое отталкивание. Однако, при образовании положительно заряженных фибрилл указанными выше фрагментами белков, это отталкивание будет заметно уменьшено, и вирион с легкостью сможет проникнуть внутрь клетки. В данном процессе фибрилла выступает в качестве положительно-заряженного мостика, с помощью которого происходит заражение ВИЧ.

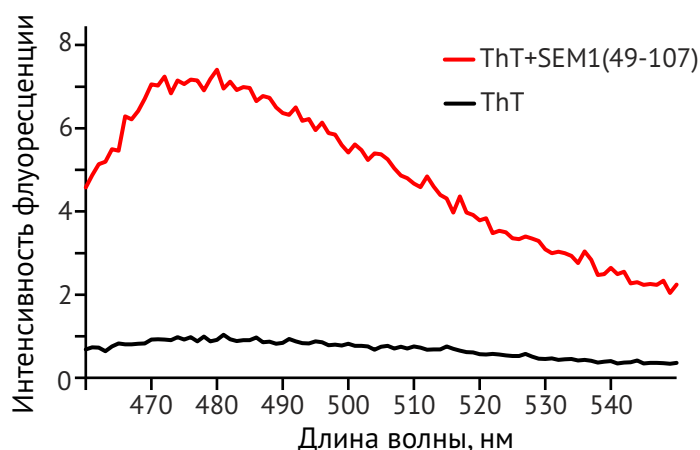


Рисунок 2 — Спектр флуоресценции тιοфлавина для водного раствора пептида SEM1(49-107) [12]

Одним из фрагментов семеногелина-1, который агрегирует и образует фибриллы, является пептид SEM1(49-107). Для точного определения того, что этот фрагмент образует фибриллы, для его водного раствора с добавлением красителя тιοфлавина были получены спектры флуоресценции [12]. Идея эксперимента заключается в том, что при добавлении такого красителя как тιοфлавин он способен специфическим способом связываться с амилоидными фибриллами в растворах, вследствие чего значительно возрастает квантовый выход его флуоресценции, который можно зафиксировать (рисунок 2). На графике черным цветом выделена кривая контроля, с помощью которой можно

убедиться в том, что сам по себе краситель не излучает свет, а красным показана кривая флуоресценции тиофлавина в семеногелине. При измерении флуоресценции было обнаружено образование фибрилл в течение 30 минут после начала эксперимента.

Образование фибрилл в водном растворе SEM1(49-107) также было подтверждено при помощи просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 3).

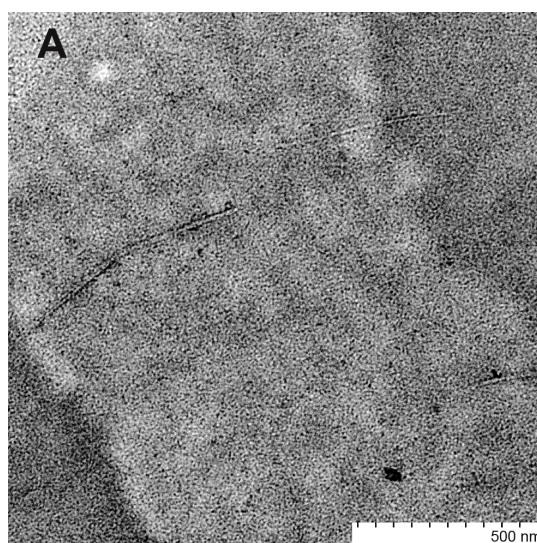


Рисунок 3 — Изображение ПЭМ фибрилл в образце SEM1(49-107) [12]

Таким образом, определение пространственной структуры пептида SEM1(49-107) методом спектроскопии ЯМР затруднено в виду того, что он начинает агрегировать. Поэтому, для определения структуры крупного пептида SEM1(49-107) методом твёрдофазного синтеза был получен более короткий пептид SEM1 (49-67), который и изучался в данной работе. Идея деления пептиды на отдельные фрагменты заключается в поочередном исследовании фрагментов с дальнейшим использованием их геометрических параметров для получения структуры рассматриваемого крупного полипептида[13].

## 1.2 Физические основы ядерного магнитного резонанса

Физические основы метода спектроскопии ЯМР во многом объясняются свойствами атомных ядер. При помещении атомного ядра во внешнее магнитное поле происходит взаимодействие магнитного ядра с полем, что в свою очередь приводит к расщеплению его уровней энергии. Данную теорию экспериментально проверил Феликс Блох, поместив ядро со спином  $I = 1/2$  в магнитное поле  $\vec{B}_0$  и условно принял, что  $\vec{B}_0$  направлено вдоль оси  $Z$ . Также на систему действует внешнее магнитное поле  $\vec{B}_1$ , которое направлено перпендикулярно  $\vec{B}_0$ . Магнитный диполь, находясь под таким воздействием полей, начинает прецессировать, т.е. вращаться вдоль оси  $Z$ . Состоянию, когда вектор магнитного момента коллинеарен вектору индукции магнитного поля  $\vec{B}_0$ , соответствует низкая энергия. При рассмотрении случая, когда два вектора, описанных выше, антипараллельны друг другу, система будет находиться в состоянии с максимальной энергией. В итоге происходит квантование энергетических уровней, и ядро может находиться только в определенных состояниях с дискретным набором значений энергии  $E_i$ . Такой набор также называют собственными значениями энергии.

С помощью использования высокочастотного генератора процесс перехода ядра между своими собственными состояниями становится контролируемым. Поглощение или излучение энергии в данном случае с помощью генератора можно как ослабить, так и усилить для дальнейшей записи спектральной линии или резонансного сигнала.



### 1.3 Угловой и магнитный моменты количества движения ядер

Для введения такого термина, как угловой момент движения  $\vec{P}$ , нужно представить атомное ядро в виде сферы, которое несет в себе положительный заряд и которое способно производить вращение вокруг своей оси:

$$P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar, \quad (1)$$

где  $\hbar = h/2\pi$  — постоянная Дирака,  $I$  — ядерный спин, который принимает целые и полуцелые значения от 0 до 6.

Квазивекторной характеристикой кругового движения зарядов является магнитный момент  $\vec{\mu}$ :

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{P}, \quad (2)$$

который подобно угловому моменту количества движения принимает фиксированные значения, т.е является квантованной физической величиной:

$$\mu = \gamma\sqrt{I(I + 1)}\hbar. \quad (3)$$

Коэффициент пропорциональности  $\gamma$ , связывающий магнитный и механический моменты, называется гиромагнитным отношением.

### 1.4 Ядра в статическом магнитном поле

После помещения ядра в магнитное поле  $\vec{B}_0$ , направленное вдоль оси  $Z$ , оно начинает вращаться вокруг оси  $Z$ , т.е прецессировать. Частота вращения ядра или частота ларморовской прецессии  $\nu_L$  определяется следующим соотношением:

$$v_L = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right)B_0. \quad (4)$$

Также удобнее вместо обычной частоты использовать круговую частоту  $\omega$ , которая измеряется в радианах/секунду

$$\omega = \gamma B_0. \quad (5)$$

Для нахождения  $Z$  компоненты углового момента можно воспользоваться соотношением

$$P_z = m\hbar, \quad (6)$$

где  $m$  — магнитное квантовое число.

### 1.5 Энергия ядер в магнитном поле

При рассмотрении диполя в магнитном поле  $\vec{B}_0$  значение его энергии определяется следующим соотношением

$$E = -\mu_z B_0. \quad (7)$$

Количество энергетических состояний, в которых может находиться ядро, определяется количеством возможных ориентаций спина этого ядра. Для ядра с  $(2I + 1)$  возможными ориентациями спина имеется  $(2I + 1)$  дискретных энергетических состояний (ядерные Зеемановские уровни).

Ядра, спин которых  $I = 1/2$  ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ), обладают двумя энергетическими уровнями, т. к. магнитное число  $m$  для данного случая может принимать два значения (рисунок 4). При  $m = +1/2$   $z$ -компонента магнитного момента направлена вдоль поля  $\vec{B}_0$  и является энергетически выгодной. В том случае, когда  $m = -1/2$   $z$ -компонента ориентирована в противоположном направлении относительно направления поля  $\vec{B}_0$ .

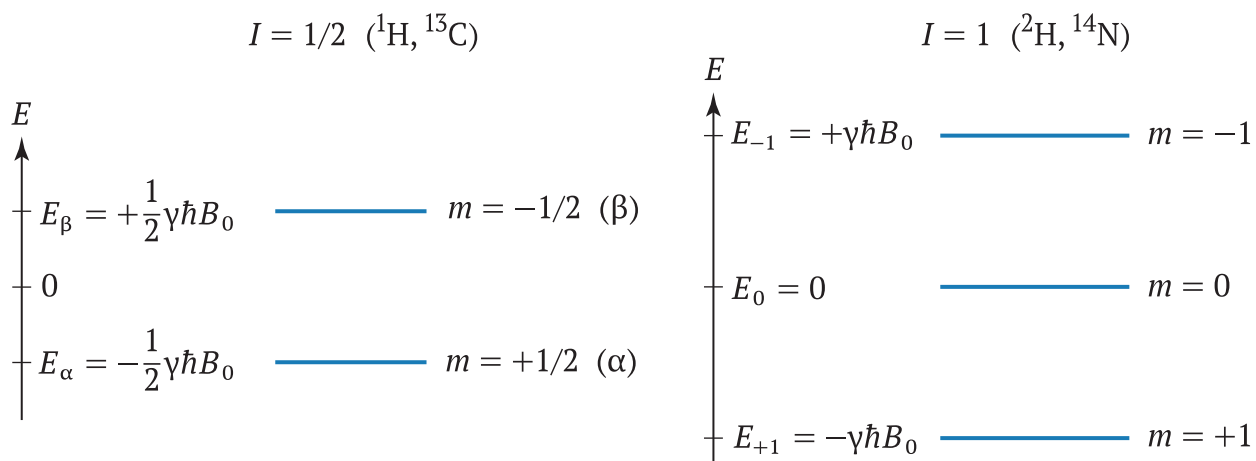


Рисунок 4 — Схема энергетических уровней для ядер со спинами  $I = 1/2$  (слева) и 1 (справа). Для ядер со спином  $I = 1$  ( $^2\text{H}$  и  $^{14}\text{N}$ )  $m$  принимает значения  $+1, 0, -1$ , поэтому наблюдаются три энергетических уровня

Чтобы определить разность между соседними энергетическими уровнями на рисунке 5 можно воспользоваться соотношением:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0. \quad (8)$$

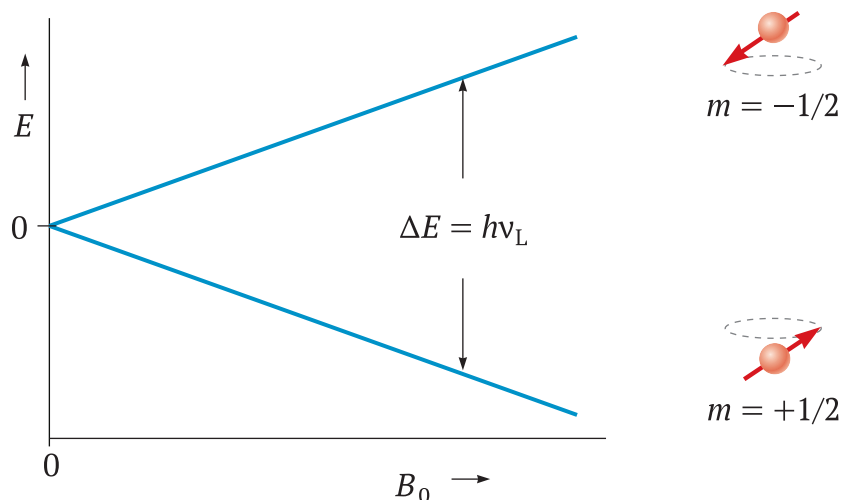


Рисунок 5 — Зависимость разности энергий между двумя соседними энергетическими уровнями от индукции магнитного поля  $B_0$  ( $I = 1/2$ )

## 1.6 Химический сдвиг

Метод спектроскопии ЯМР позволяет различать ядра одного и того же типа внутри одной молекулы. При рассмотрении подобных ядер можно зафиксировать их различные значения резонансных частот. Это происходит, потому что на резонансные частоты однотипных ядер влияет их химическое окружение или, другими словами, распределение электронов в рассматриваемой молекуле.

Физическая величина, характеризующая сдвиг сигнала ЯМР, называется химическим сдвигом. Смещение происходит в результате того, что электроны атомов ослабляют внешнее магнитное поле. В связи с этим, в спектре на ядрах водорода  $^1\text{H}$  для каждого из них мы будем получать различные сигналы. При помещении ядра во внешнее магнитное поле  $\vec{B}_0$  около ядра электронами создается локальное магнитное поле  $B_{\text{лок}}$ , которое направлено в противоположную сторону по сравнению с направлением внешнего поля. Величина, которая показывает на сколько локальное и внешнее поля отличаются друг от друга, называется константой экранирования  $\sigma$  и определяется

$$\vec{B}_{\text{лок}} = (1 - \sigma)\vec{B}_0. \quad (9)$$

Условие резонанса можно записать через соотношение  $\omega_0 = \gamma B_0$ , где  $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ . Из представленных соотношений очевидно, что изменение магнитного поля  $B_0$  приводит к изменению резонансной частоты  $\nu_0$ . Таким образом, для определения положения резонансного сигнала выбирается условное эталонное вещество, относительно которого будет производиться расчет.

Химический сдвиг определяется 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.

## 1.7 Спин-спиновое взаимодействие

Взаимодействие между ядрами может происходить как через пространство, так и через электроны химических связей. Ядра взаимодействуют друг с другом за счет связи между электронами соседних атомов, такой тип взаимодействия называется косвенным спин-спиновым взаимодействием. Ядра, связанные подобным образом, называют спиновой системой[14].

Энергия спин-спинового взаимодействия между двумя ядрами  $A$  и  $X$  пропорциональна скалярному произведению их ядерных магнитных моментов:

$$E = J_{AX} \vec{I}_A \cdot \vec{I}_X, \quad (11)$$

где  $\vec{I}_A$  и  $\vec{I}_X$  — ядерные спиновые векторы обоих ядер,  $J_{AX}$  — скалярная константа спин-спинового взаимодействия.

Энергия спин-спинового взаимодействия и константа спин-спинового взаимодействия не зависят от напряженности внешнего магнитного поля.

## 1.8 Импульсная спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Суть одномерного эксперимента заключается в том, что ядра образца переводятся в возбужденное состояние, и в тот момент, когда ядро переходит с верхнего энергетического уровня на нижний, происходит выделение энергии, которое проявляется в виде пиков в спектре.

Простейший метод наблюдения ЯМР — эксперимент CW типа (от англ. *continuous waves* — непрерывные волны). При этом исследуемый образец помещают в постоянное магнитное поле (обычно между полюсами электромагнита), в датчик — катушку ориентированную перпендикулярно направлению постоянного поля. Когда на эту катушку подается переменный ток от генератора, возникшее радиочастотное поле может вызвать переходы между зеемановскими уровнями ядер образца при совпадении частоты генератора с частотой Лармора.

Для уменьшения времени эксперимента и повышения чувствительности чаще используют импульсный метод. Для его рассмотрения вводят вращающуюся (с направлением оси вдоль поля и со скоростью прецессии ядер) систему координат. В такой системе внешнее поле как бы отсутствует, а радиочастотное поле становится постоянным и находящимся в новой плоскости  $x'y'$ .



Рисунок 6 — Под действием радиочастотного импульса длительностью  $\tau_p$  и амплитудой  $\vec{B}_1$  вектор намагниченности поворачивается на угол  $\theta = \gamma B_1 \tau_p$

В этой системе импульс радиочастотной энергии с длительностью  $\tau_p$  меняет угол суммарной намагниченности на  $\theta = \gamma B_1 \tau_p$  (рисунок 6). Как правило, длительность и амплитуду РЧ-поля подбирают так, чтобы угол поворота был равен или  $90^\circ$  или  $180^\circ$ , при этом в такой схеме сигнал регистрируется в плоскости  $xu$ , то есть поворот на  $90^\circ$  вызывает максимальную амплитуду сигнала, а  $180^\circ$  — нулевую.

## 1.9 Метод двумерной ЯМР-спектроскопии

Одним из видов ЯМР-спектроскопии является двумерная спектроскопия ЯМР, позволяющая получить как можно больше информации о структуре по сравнению с одномерными опытами. Удобство этого метода заключается в возможности определения структуры даже тех молекул, в состав которых входит большое количество атомов, сигналы которых в одномерном спектре могут перекрываться.

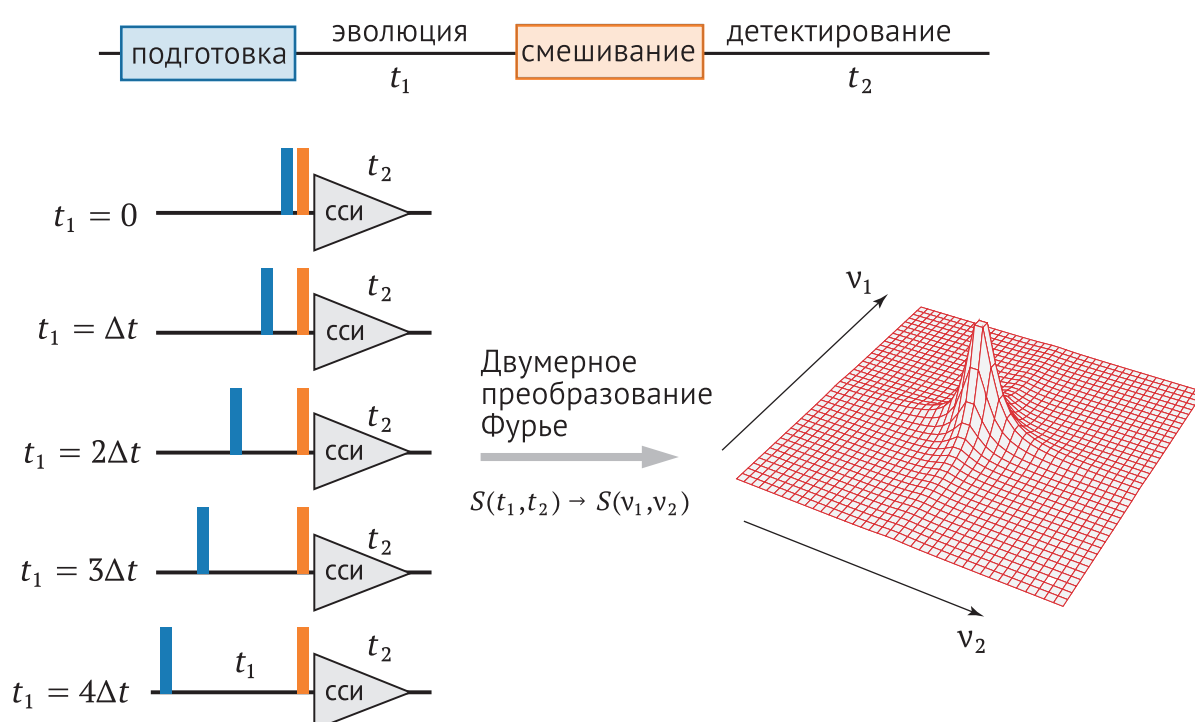


Рисунок 7 — Схема получения двумерных спектров ЯМР[15]

Двумерный эксперимент заключается в поочередной передаче радиочастотных импульсов с разным временем задержки и разной интенсивностью. Технология двумерного эксперимента представляет собой серию одномерных экспериментов, которые в свою очередь состоят из подготовки, эволюции, смешивания и детектирования (рисунок 7). Процесс подготовки от-

вечает за приведение спиновой системы к определенному состоянию. В простейшем случае на систему подается  $90^\circ$  импульс, который изменяет направление намагниченности  $M_z$  на ось  $y$ , где  $z$ -направление внешнего магнитного поля  $\vec{B}_0$ . Далее происходит эволюция спиновой системы. Эволюция — время, в течение которого система переходит в состояние с нужными для эксперимента свойствами. Следующий процесс — смешивание. Во время смешивания происходит перераспределение намагниченности с одного ядра на другое. А процесс детектирования в свою очередь записывает получившийся сигнал. Детектирование в двумерной спектроскопии ЯМР аналогично детектированию в одномерной спектроскопии — записывается сигнал свободной индукции (ССИ) возбужденных спинов.

Сигнал в спектре представлен в частотных координатах, т.е. каждому измерению соответствуют две оси частот химических сдвигов. Для перехода к сериям частот необходимо произвести двумерное преобразование Фурье.

### 1.10 Эксперимент TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

Эксперимент TOCSY — один из двумерных экспериментов ЯМР, который позволяет анализировать спин-спиновое взаимодействие между ядрами водорода  $^1\text{H}$  в молекуле. С помощью данного метода можно обнаружить даже корреляции между протонами, у которых отсутствует непосредственная спиновая связь.

В эксперименте TOCSY используются два импульса радиочастотного излучения, которые вызывают изменение состояния ядер в молекуле[16]. Затем происходит передача магнитного момента от выбранного ядра к другим ядрам.



Последовательность  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY ЯМР-эксперимента представлена на рисунке 8. Эксперимент состоит из следующих этапов: подготовка, эволюция, смешивание и детектирование, которые характерны для всех двумерных экспериментов.

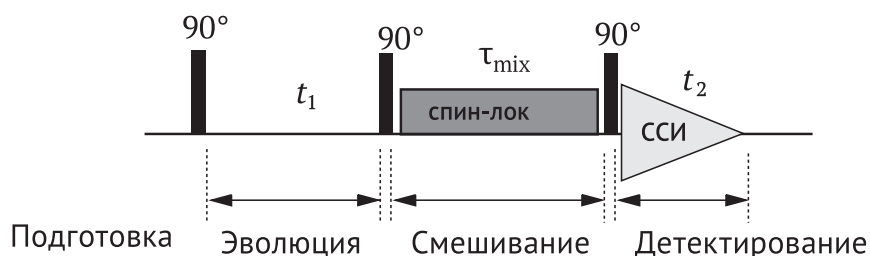


Рисунок 8 — Импульсная последовательность ЯМР-эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY

В начале эксперимента для каждого образца задается определенное время подготовки, после окончания которого на систему воздействуют  $90^\circ$  импульсом. Этот импульс необходим для того, чтобы перевести намагниченность в плоскость  $OXY$ , которая перпендикулярна однородному магнитному полю  $\vec{B}_0$ , направленному вдоль  $Z$ . После воздействия этого импульса система переходит в возбужденное состояние и находится в нём в течение времени  $t_1$ , т.е. время эволюции. Следующий этап — это этап смешивания, он длится в течение времени  $\tau_{\text{mix}}$ . Физическая составляющая этапа смешивания заключается в том, что намагниченность передается с одного ядра на другое. Завершающим шагом в данном эксперименте является детектирование, именно в этот момент происходит анализ всех процессов и их запись.

С помощью эксперимента TOCSY удастся зафиксировать связь между ядрами одного и того же типа (например  $^1\text{H}$ ). На выходе мы получаем кросс-пики между протонами, которые связаны друг с другом спин-спиновым взаимодействием в пределах одной спиновой системы.

## 1.11 Эксперимент NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Одним из методов, который позволяет установить связь между ядрами в пространстве, является эксперимент 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Основная идея заключается в том, что с помощью этого эксперимента можно установить связь между ядрами водорода, которые пространственно близки друг от друга, т.е. в данном случае не берется в рассмотрение расположение связей в молекуле (рисунок 9). Физика метода объясняется ядерным эффектом Оверхаузера, согласно которому близлежащие атомы (на расстоянии до 5 ангстрем друг от друга) подвергаются кросс-релаксации, основанной на механизме диполь-дипольного взаимодействия[17].

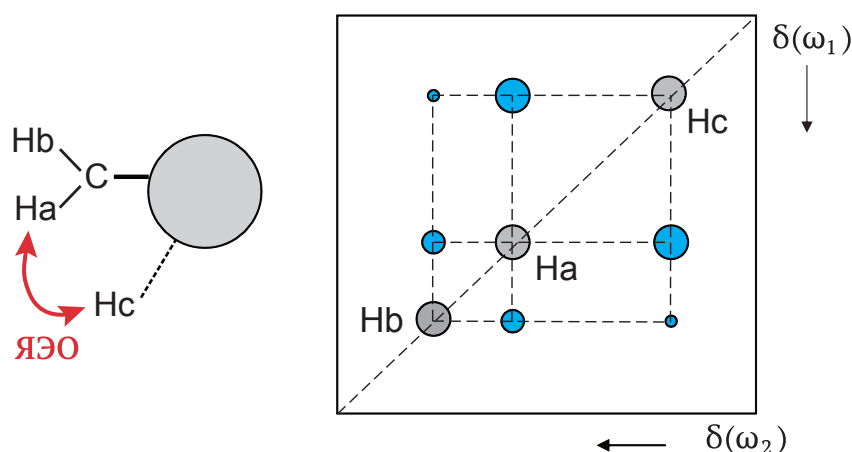


Рисунок 9 — Прямое взаимодействие ядер через пространство в ЯМР-эксперименте 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY приводит к возникновению кросс-пиков в спектре

Идея использования эффекта Оверхаузера заключается в том, что при дополнительном облучении одного из ядер молекулы происходит изменение интенсивностей сигналов ЯМР. Но такие изменения в интенсивностях будут происходить только для тех сигналов ядер, которые находятся пространственно близко друг к другу.

Импульсная последовательность представляет из себя три  $90^\circ$  импульса (рисунок 10) [15].

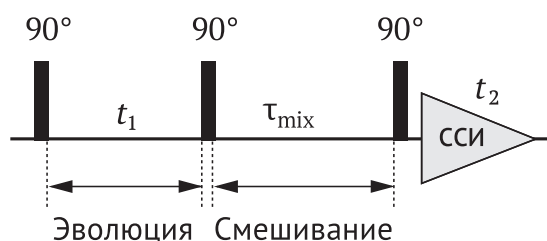


Рисунок 10 — Импульсная последовательность ЯМР-эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY

На первом этапе поданный  $90^\circ$  импульс отвечает за возникновение поперечной спиновой намагниченности, т.е вектор магнитного момента располагается в плоскости  $OXY$ . Далее, в течение времени  $t_1$ , которое называют временем эволюции, спины начинают активно прецессировать. Следующий, второй, импульс создает уже другую намагниченность — продольную, её численное значение совпадает со значением поперечной составляющей намагниченности. Все перечисленные этапы ведут к тому, что происходит изменение спиновых состояний, т.е кросс-релаксация. За счет неё во время смешивания  $\tau_{\text{mix}}$  намагниченность переносится с одного ядра на другое. В момент времени смешивания как раз и проявляется ядерный эффект Оверхаузера. Третий импульс создает поперечную намагниченность из оставшейся продольной. Запись сигналов осуществляется после подачи третьего импульса.

Таким образом, в результате действия импульсной программы NOESY мы видим кросс-пики, связанные с изменением заселенности уровней. Для достижения необходимого соотношения сигнал/шум данная последовательность повторяется многократно.

## 1.12 Эксперимент HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy)

Эксперимент HSQC основан на фиксировании гетероядерных одноквантовых взаимодействий. Данный спектр является двумерным гетероядерным, где по одной из осей отложены значения химических сдвигов ядер водорода  $^1\text{H}$ , а по другой гетероядра, т.е. такого ядра, которое отличается от протона, например, углерода  $^{13}\text{C}$  или азота  $^{15}\text{N}$ . Полученные на спектре пики характеризуют связь между этими ядрами. Для получения большей информации 2D HSQC можно рассматривать в паре с такими экспериментами как NOESY-HSQC или TOCSY-HSQC.

Рассмотрим более подробно импульсную последовательность эксперимента HSQC (рисунок 11). Намагниченность передается с одного ядра на другое ( $^{15}\text{N}$  или  $^{13}\text{C}$ ) через последовательность INEPT. Это означает, что сначала подаётся  $90^\circ$  импульс на частотах ядер водорода, который переносит намагниченность в плоскость  $OXY$ . Далее через время  $\Delta/2$  подается  $180^\circ$  импульс на частотах ядер водорода и углерода одновременно. Данный импульс приведет к тому, что намагниченность будет направлена антипараллельно по отношению к намагниченности, получившейся после  $90^\circ$  импульса. Последний  $90^\circ$  импульс в последовательности INEPT подается также через время  $\Delta/2$  и приводит к тому, что вектор протонной намагниченности направлен вдоль оси  $Z$ , что обеспечивает перенос поляризации от протонов к ядрам углерода. Далее в течение времени  $t_1$  происходит эволюция намагниченности гетероядер. Через определенное время после этого процесса намагниченность передается обратно ядрам водорода через ретро-INEPT.

Запись сигнала в эксперименте HSQC представляет собой серию экспериментов[18]. При записи спектров последовательно увеличивают время задержки для того, чтобы наблюдать сигнал от ядер  $^1\text{H}$  в каждом эксперименте и сигнал от другого ядра в косвенном измерении.

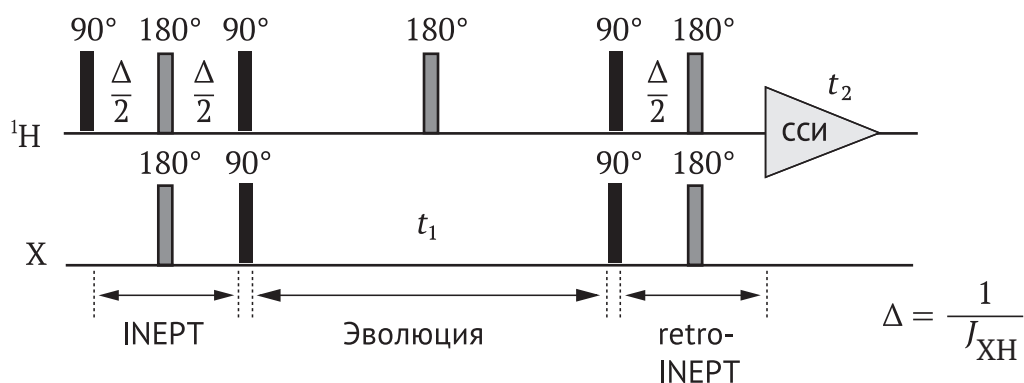


Рисунок 11 — Импульсная последовательность ЯМР спектра HSQC

В результате эксперимента получается двумерный спектр, на котором по горизонтальной оси расположены значения химических сдвигов ядер углерода, а по вертикальной — значения химических сдвигов протонов. Спектр содержит кросс-спики на пересечении частот ядер водорода  $^1\text{H}$  и углерода  $^{13}\text{C}$ , которые соединены друг с другом химической связью.

### 1.13 Эксперимент HMBC (Heteronuclear Multiply Bond Coherence)

Эксперимент HMBC примечателен тем, что дает возможность установить связь между ядрами, которые связаны друг с другом через 2 химические связи или более. Однако нужно понимать, что чем больше химических связей разделяют ядра, тем сложнее уловить сигнал, поэтому в расчет обычно берут не более 4 связи. Также в список достоинств данного эксперимента можно добавить, что с помощью HMBC можно получить информацию о химических сдвигах даже непротонированных ядер.

Физика данного эксперимента базируется на тех же принципах, что и HSQC (рисунок 12), однако есть определенные отличия в импульсной последовательности. В первую очередь, импульсы подаются на ядра с разной задержкой. Эта задержка необходима для того, чтобы слабые взаимодействия перешли в противофазное состояние намагниченностей. Такой подход позволяет зафиксировать взаимодействия дальних ядер.

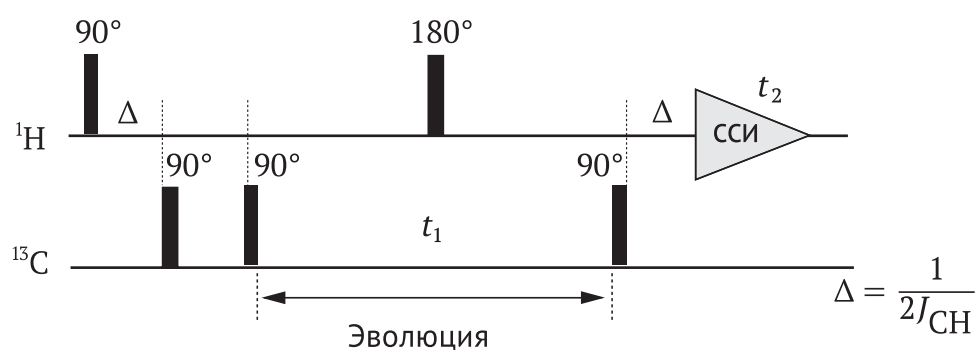


Рисунок 12 — Импульсная последовательность ЯМР спектра НМВС

В результате получается двумерный спектр, на котором по горизонтальной оси расположены значения химических сдвигов ядер углерода  $^{13}\text{C}$ , а по вертикальной — ядер водорода  $^1\text{H}$ . Однако в отличие от эксперимента HSQC, в эксперименте НМВС на спектре обнаруживаются кросс-пики между атомами, которые расположены друг относительно друга через несколько химических связей.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Объект исследования

Пептид SEM1 (49-67) состоит из 19 аминокислотных остатков (рисунок 13), рядом указаны номера рассматриваемых аминокислотных остатков. Пептид был получен методом твёрдофазного синтеза.

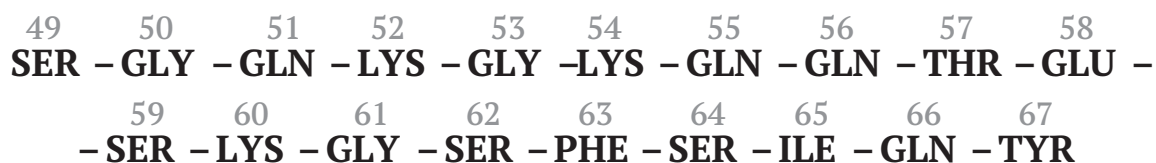


Рисунок 13 — Аминокислотная последовательность пептида SEM1(49-67)

### 2.2 ЯМР спектры пептида SEM1(49-67)

ЯМР-спектры пептида SEM1(49-67) в водном растворе ( $H_2O+D_2O/90\%+10\%$ ) были получены на ЯМР-спектрометрах с рабочей частотой на ядрах водорода 500 МГц (Bruker, AVANCE II 500) и 700 МГц (Bruker, AVANCE III 700) при температуре 298 К. Пептид растворяли в водном растворе (0,8 мг пептида на 0,5 мл раствора) непосредственно перед проведением экспериментов. Параметры, использованные при регистрации спектров, приведены в таблице 1.

Обработка данных производилась с помощью программы Bruker Topspin 3.5. Дальнейший анализ спектров производился с помощью программы CCPNMR 3.0 [19]. Отнесение химических сдвигов водорода было сделано с использованием ЯМР-спектров экспериментов 2D  $^1H-^1H$  TOCSY, 2D  $^1H-^1H$  NOESY.

Таблица 1 — Параметры, использованные при проведении экспериментов ( $TD$  — количество точек при записи спектра,  $NS$  — количество накоплений,  $D1$  — релаксационная задержка,  $P1$  — длительность импульса в  $90^\circ$  для канала  $^1\text{H}$ ,  $P2$  — длительность импульса в  $90^\circ$  для каналов  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ ,  $\tau_{\text{mix}}$  время смешивания)

	$TD$	$NS$	$D1, \text{с}$	$P1/P2, \text{мкс}$	$J, \text{Гц}$	$\tau_{\text{mix}}, \text{с}$
$^1\text{H}$ – $^1\text{H}$ TOCSY	2048x512	16	2.0	7,59		0,08
$^1\text{H}$ – $^1\text{H}$ NOESY	2048x512	16	2.0	7,59		0,3
$^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ HSQC	2048x512	128	1,5	11,58 / 32,70	90	
$^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ HSQC	2048x1024	96	1,5	7,52 / 11,00	145	

В течение всего времени исследования пептида мы отслеживали качество образца путем регистрации одномерных спектров на ядрах  $^1\text{H}$  (рисунок 14). За все время проведения 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.

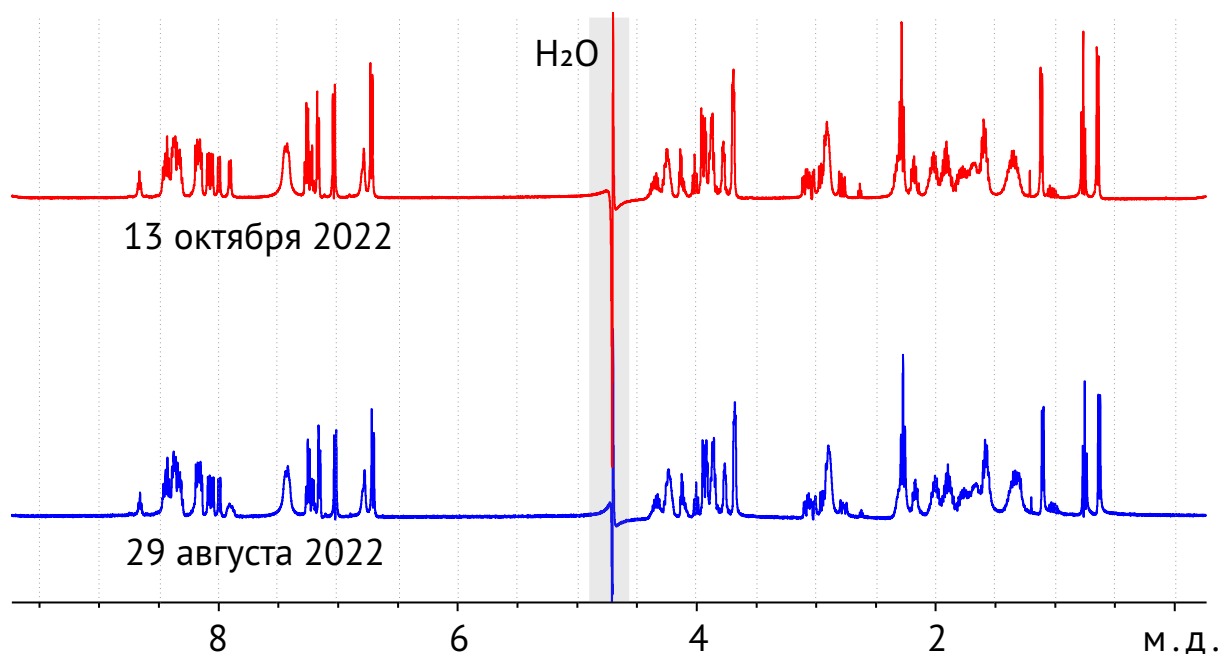


Рисунок 14 — Одномерные спектры ЯМР  $^1\text{H}$  пептида SEM1(49-67). Серым отмечена область остаточного сигнала  $\text{H}_2\text{O}$  (использовалась импульсная последовательность с подавлением сигнала воды)



### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Анализ двумерных спектров ЯМР пептида SEM1(49-67)

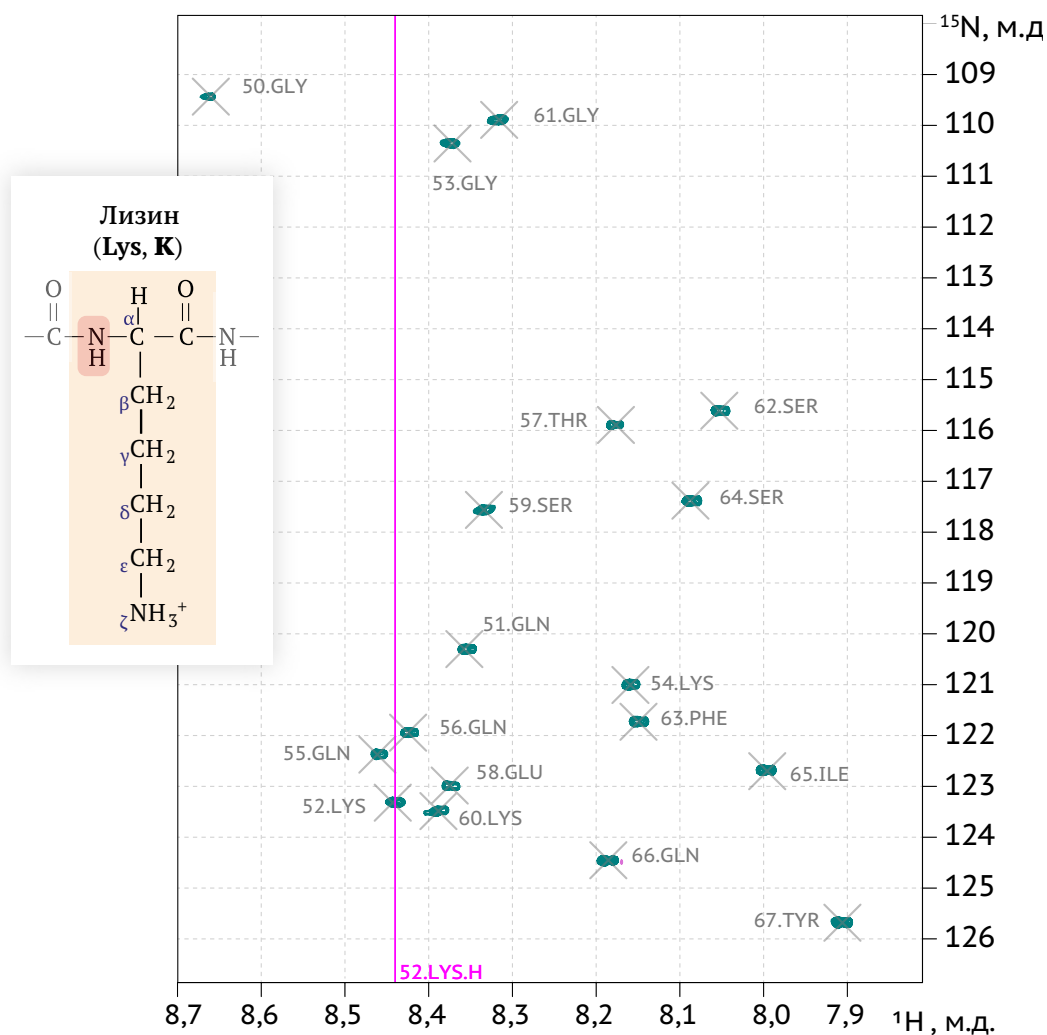


Рисунок 15 — Область ЯМР спектра  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC пептида SEM1(49-67). В качестве примера выделен сигнал, соответствующий NH-группе аминокислотного остатка 52-Lys

С помощью ЯМР-спектра  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (рисунок 15) было определено соответствие сигналов ядер азота ядрам водорода. Параметры эксперимента представлены в таблице 1. На данном этапе были определены химические сдвиги  $\delta_{\text{H}}$  и  $\delta_{\text{N}}$  для всех спиновых систем кроме первого аминокислотного остатка 49-Ser, т.к. из-за его быстрого обмена с  $\text{H}_2\text{O}$  не был определен сигнал, соответствующий его  $\text{NH}_2$ -группе.

Для определения сигналов, соответствующих ядрам в пределах одной спиновой системы, т.е в пределах одного аминокислотного остатка был записан двумерный спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (Рисунок 16). Параметры эксперимента представлены в таблице 1. В данном спектре каждому значению химического сдвига ядра  $^1\text{H}$  NH-группы, найденного из эксперимента  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, соответствуют кросс-пики, соответствующий сигналам ядер  $^1\text{H}$ , принадлежащих другим группам того же самого аминокислотного остатка.

Таблица 2 — Значение химических сдвигов  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta_{\text{H}}$ , м.д.) значения химических сдвигов для аргинина. Литературные данные [20]

	HN	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	H $\delta$	Другие (NH)
Lys	8,22	4,28	1,79; 1,78	1,38	1,61	2,93 7,52

В качестве примера определения типа аминокислотного остатка рассмотрим сигналы ядер  $^1\text{H}$  для аминокислоты 60-Lys, где номер означает порядковый номер аминокислоты в приведенной выше последовательности. В состав данной аминокислоты входят такие группы как: HN, H $\alpha$ , H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ . В таблице 2 указаны литературные данные [20] для значений химических сдвигов  $^1\text{H}$  лизина.

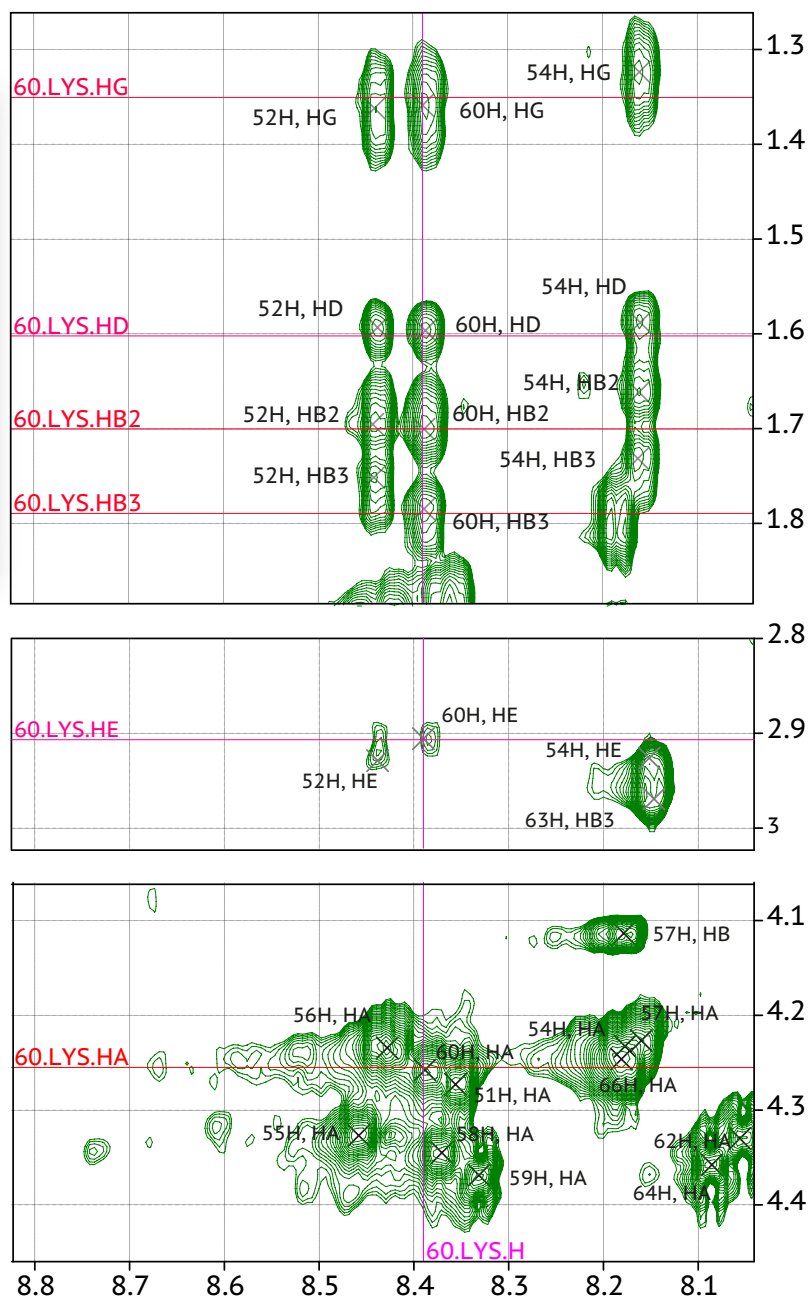
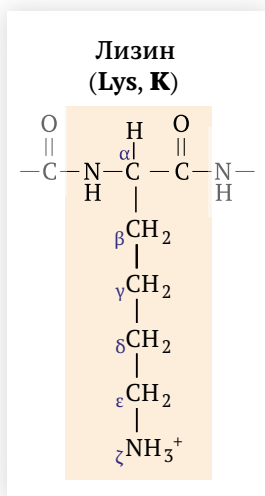


Рисунок 16 — Фрагмент ЯМР спектра TOCSY пептида SEM1(49-67), на пересечении линий находятся кросс-пики, соответствующие одной из протонных групп аминокислотного остатка лизина 60-Lys

Рассмотрим фрагмент спектра с кросс-пиками, значение химического сдвига которых по оси  $f_2$  равно 8,39 м.д. Первый сигнал, соответствующий протонной группе для аминокислоты 60-Lys, имеет химический сдвиг по оси  $f_1$  равный 4,26 м.д. При сравнении с литературными данными (таблица 1) можно сделать вывод, что это сигнал  $H_\alpha$ , протона.

Далее с группой  $H_\alpha$  через спин-спиновое взаимодействие связан протон  $H_\beta$ . Ему соответствуют два сигнала со значениями химических сдвигов равных 1,70 и 1,78 м.д. Следующий кросс-пик со значением химического сдвига равного 1,59 м.д принадлежит  $H_\delta$ , а с дельта группой в свою очередь связан протон  $H_\gamma$ , сигнал от которого наблюдается в области 1,36 м.д.

Таким образом, из анализа сигналов спектра TOCSY мы смогли получить значения химических сдвигов для протонов, которые соответствуют определенному аминокислотному остатку. Дальнейшее определение и приписание аминокислот производилось аналогично на основе сравнения полученных значений с табличными значениями химических сдвигов[20].

Для установления последовательности аминокислотных остатков был записан двумерный спектр  $^1H$ - $^1H$  NOESY (рисунок 17). При записи спектра были установлены параметры, указанные в таблице 1.

Рассмотрим последовательность аминокислотных остатков 63-Ser – 65-Ser. На рисунке на пересечении двух прямых отмечен кросс-пик. Значение химического сдвига по вертикальной шкале равно 8,09 м.д. и соответствует HN-группе 63-Phe, а значение химического сдвига по горизонтальной оси принимает значение 4,61 м.д. и соответствует сигналу  $H_\alpha$  64-Ser. На основании данного сигнала и соответствующих ему значений химических сдвигов можно сделать вывод о том, что аминокислотные

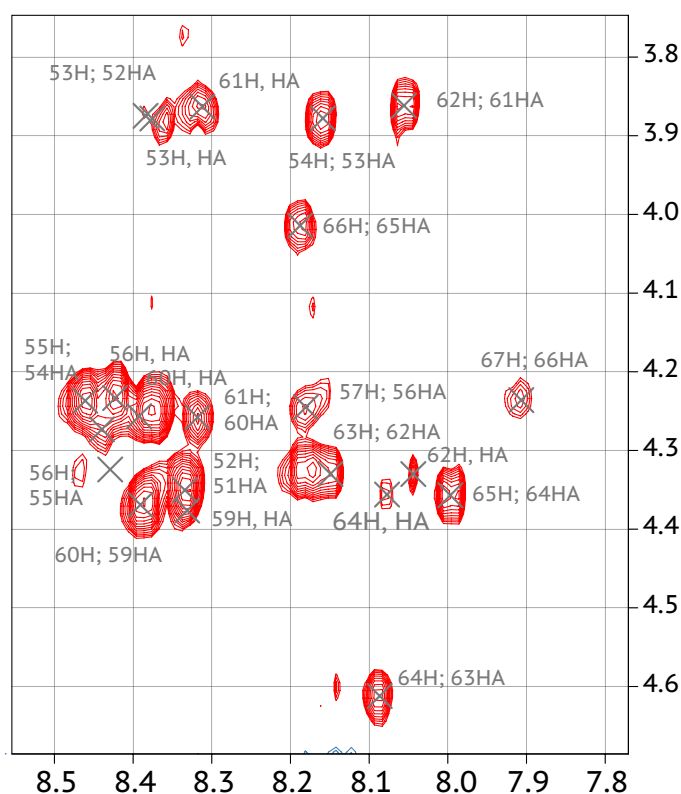


Рисунок 17 — Область сигналов HN–H $\alpha$  ЯМР спектра NOESY

остатки серин и фенилаланин идут друг за другом. В спектре также же наблюдается кросс-пик, соответствующий значениям 799 м.д. и 436 м.д. По данным значениям можно сделать вывод, что эти химические сдвиги принадлежат HN-группе 64-Ser и группе H $\alpha$  65-Ile.

Таким образом, с помощью двумерных экспериментов  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  TOCSY и  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NOESY было проведено отнесение химических сдвигов ядер водорода для всех 19 аминокислотных остатков исследуемого пептида. Полученные значения химических сдвигов ядер водорода приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Значения химических сдвигов  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ , м.д.) пептида SEM1(49-67) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при 298 К

	HN	H $\alpha$	H $\beta$		Остальные группы			
49 SER	—	4,326	3,691					
50 GLY	8,663	3,953						
51 GLN	8,355	4,246	1,884	1,995	2,290	6,782		
52 LYS	8,439	4,238	1,695	1,751	1,365	1,592	2,925	7,432
53 GLY	8,377	3,891						
54 LYS	8,159	4,239	1,659	1,729	1,326	1,580	2,925	7,423
55 GLN	8,460	4,325	1,926	2,021	2,282	6,793		
56 GLN	8,424	4,236	1,902	1,982	2,273	6,788		
57 THR	8,177	4,269	4,116		1,114			
58 GLU	8,371	4,345	2,015		2,328			
59 SER	8,329	4,376	3,768					
60 LYS	8,389	4,255	1,700	1,789	1,350	1,602	2,906	7,429
61 GLY	8,312	3,900						
62 SER	8,053	4,332	3,690		2,96 1,52			
63 PHE	8,148	4,609	3,077	2,956	7,172	7,221	6,717	
64 SER	8,084	4,354	3,702					
65 ILE	7,995	4,015	1,673		1,028	0,762	0,638	
66 GLN	8,181	4,243	1,947	1,912	2,178	6,718		
67 TYR	7,904	4,382	3,036	2,785	7,031	6,723		

Для получения химических сдвигов ядер углерода  $^{13}\text{C}$  был записан спектр  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC, фрагмент спектра представлен на рисунке 18. На данном этапе были определены химические сдвиги  $\delta_{\text{C}}$  и соответствующие им химические сдвиги  $\delta_{\text{H}}$  для всех спиновых систем рассматриваемого образца. Параметры, которые были использованы при проведении эксперимента представлены в таблице 1.

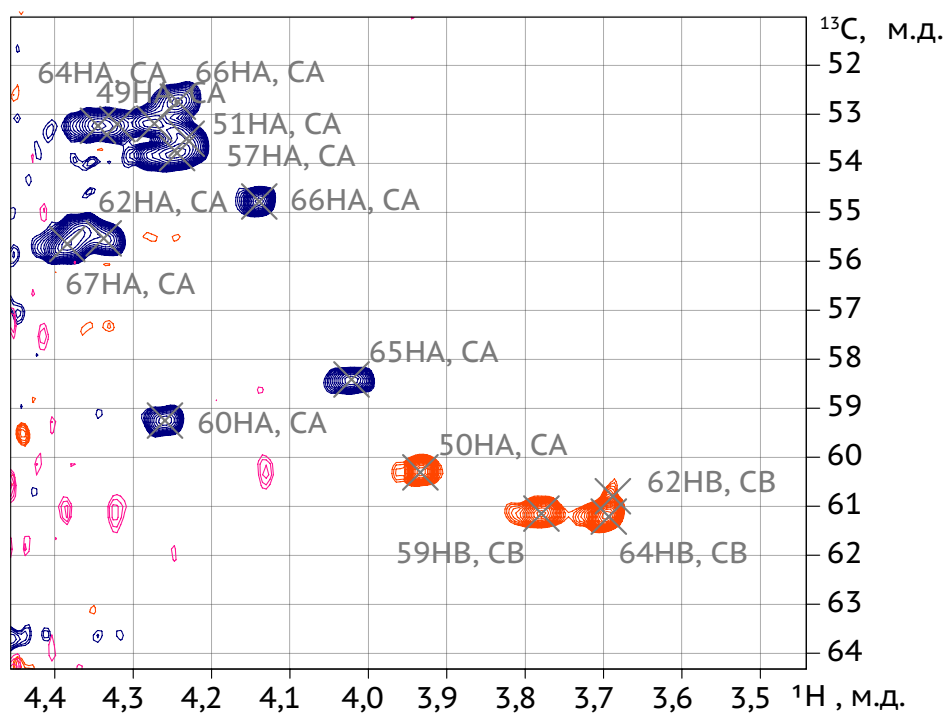


Рисунок 18 — Фрагмент ЯМР спектра  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

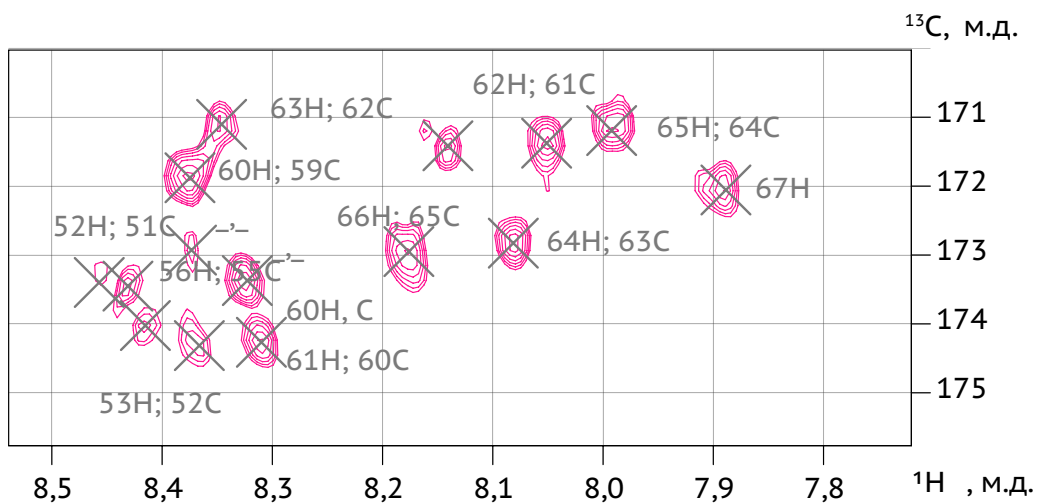


Рисунок 19 — Фрагмент ЯМР спектра  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC пептида SEM1(49-67)

Химические сдвиги углерода СО-групп были определены с помощью анализа спектров  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС (рисунок 19) с учетом данных о химических сдвигах ядер водорода  $^1\text{H}$ , полученных из экспериментов TOCSY и NOESY. Полученные значения химических сдвигов ядер углерода и азота приведены в таблице 4. Полученные значения химических сдвигов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  были депонированы в международную базу данных BioMagResBank под регистрационным номером BMRB 51691.

Таблица 4 — Значения химических сдвигов ядер  $^{15}\text{N}$  ( $\delta_N$ , м.д.) и  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_C$ , м.д.) пептида SEM1(49-67) в водном растворе ( $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$ ) при 298 К

	N	C	C $\alpha$	C $\beta$	Другие			
49 SER	—	172,95	55,59	61,11				
50 GLY	109,43	171,10	42,58					
51 GLN	120,30	173,37	53,18	26,74			31,07	
52 LYS	123,32	174,32	59,24	30,31			22,06	26,36 39,45
53 GLY	110,35	171,21	42,60					
54 LYS	121,00	173,28	53,87	30,34			24,65	26,37 39,31
55 GLN	122,37	173,32	53,14	26,80			31,10	
56 GLN	121,94	177,91	53,42	26,87			30,94	
57 THR	115,89	172,92	59,32	67,11			18,99	
58 GLU	122,98	177,75	55,65	26,84 30,98	178,14			
59 SER	117,56	171,81	55,53	61,14				
60 LYS	123,48	174,04	59,25	30,34			22,05	26,41 39,37
61 GLY	109,89	171,40	46,96					
62 SER	115,61	171,47	55,51	61,03				
63 PHE	121,72	172,79	54,96	36,98			136,18	129,09 127,11 130,43
64 SER	117,38	171,13	55,44	61,21				
65 ILE	122,70	172,88	58,42	36,22			24,67	10,28 14,63
66 GLN	124,45	177,88	53,26	26,83			31,10	
67 TYR	125,68	177,88	55,72	36,42			128,95	130,46 154,31 115,43



### 3.2 Определение пространственной структуры

При определении пространственной структуры объекта исследования SEM1 (49-67) использовались данные об интенсивностях сигналов, полученные из анализа спектров  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY. На основе значений интенсивностей каждого пика были найдены ограничения на межъядерные расстояния. Для количественного анализа спектров использовалась программа XPLOR-NIH[21], при этом использовался следующий метод:

- В спектрах экспериментов  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY нами были вручную помечены все существенные кросс-пики, и определена их относительная интенсивность (проведено их интегрирование).
- Далее в программе XPLOR-NIH[21] производилось автоматическое соотнесение кросс-пиков на основе предварительно полученных химических сдвигов ядер  $^1\text{H}$  (таблица 3). Для процедуры автоматического соотнесения использовался алгоритм PASD[22].
- Из значений интенсивности сигналов в спектрах была получена информация о пространственных ограничениях на межъядерные расстояния. Для определения данных расстояний использовалась метод, описанный в работах [23,24]: сигналы разбиваются на четыре класса в зависимости от их интенсивности: 0–20% (очень слабый), 20–50% (слабый), 50–80% (средний) и 80–100% (сильный), каждому классу соответствует свой диапазон межъядерных расстояний — 1,8–6,0, 1,8–5,0, 1,8–3,3 и 1,8–2,7 ангстрем. В случае, когда одним из атомов является протон метильной группы ( $\text{CH}_3$ ), то к полученному расстоянию прибавляется 0,5 ангстрема[25].

- Значения химических сдвигов для атомов основной цепи пептида  $H_{\alpha}$ , N,  $C_{\alpha}$  и C использовались для определения возможного диапазона двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$  с помощью программы TALOS+.
- После того, как были получены пространственные ограничения на межъядерные расстояния и двугранные углы, данные были внесены в программу XPLOR-NIH, которая позволила получить ансамбль структур с помощью метода симулированного отжига. Данный метод состоит из поочередных автоматизированных процессов. На первом этапе была получена неточная пространственная структура пептида, при создании структуры использовались случайные значения расстояний. Этот шаг был необходим для того чтобы в дальнейшем моделировать структуру. Далее происходил условный нагрев модели пептида до температуры 1000 К, чтобы привести её составляющие в движение, и затем охлаждение до температуры 25 К с использованием загруженных в программу экспериментальных пространственных ограничений.
- Этот процесс повторялся 1000 раз, в результате был получен ансамбль из 1000 структур, соответствующих локальным минимумам энергии. Из этого ансамбля были отобраны наиболее часто повторяющиеся структуры с минимальной энергией которые были уточнены в последующих расчетах с использованием силового поля protein.par [26].

Ансамбль, состоящий из 15 полученных структур, соответствующих минимуму энергии показан на рисунке 20. На рисунке 21 приведен структура пептида с указанием всех атомов.

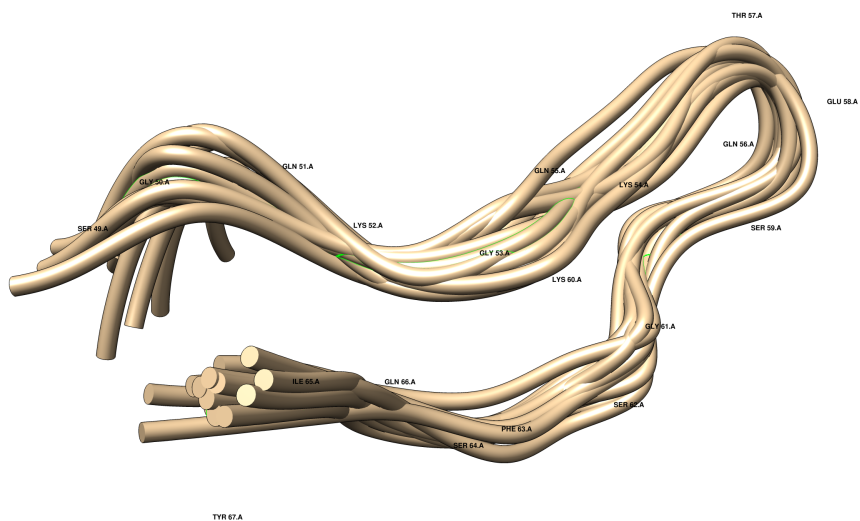


Рисунок 20 — Пространственная структура пептида SEM1(49-67) в виде ансамбля из 15 структур

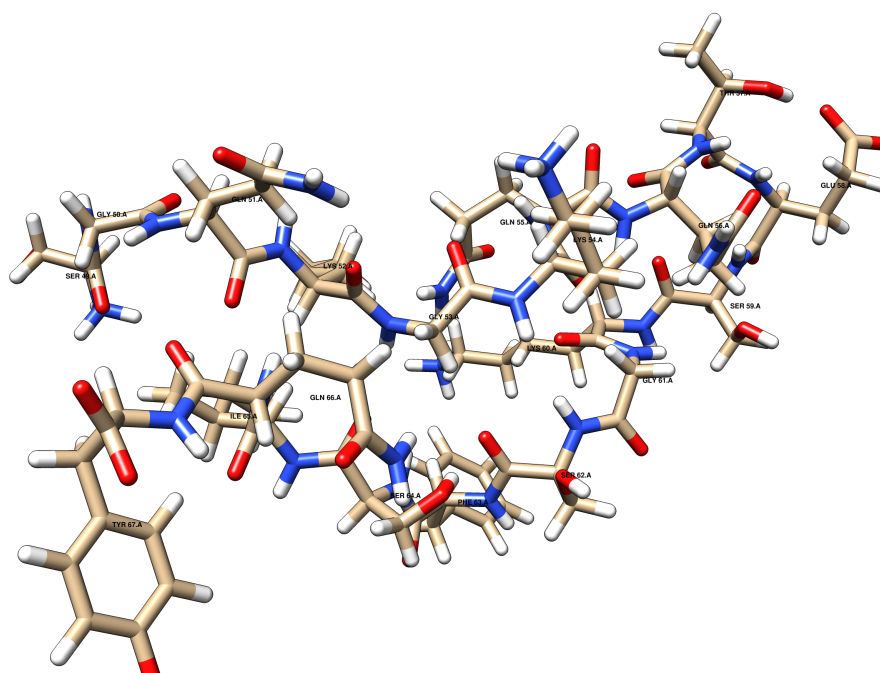


Рисунок 21 — Пространственная структура пептида SEM1(49-67)

Полученная структура была загружена в международную базу данных Protein Data Bank(PDB) под идентификационным номером PDB ID: 8BVZ.

Анализ пространственной структуры показал, что основным типом вторичной структуры пептида SEM1(49-67) является случайный клубок. Полученный ансамбль из 15 структур обладает хорошей сходимостью (таблица 5). При этом пептид SEM1(49-67) имеет подковообразную форму с изгибом в области 57 Thr – 59 Ser.

Таблица 5 — Статистическая информация для структурного ансамбля PAP(85-120)

Межъядерные расстояния	
Всего	67
внутри одного аминокислотного остатка	54
между аминокислотными остатками $i$ и $j$ :	13
последовательными ( $i-j=1$ )	8
средне-удаленными ( $i-j=2...4$ )	2
дальние расстояния( $i-j>4$ )	3
Двугранные углы	
ограничения на угол $\Phi$	17
ограничения на угол $\Psi$	17
Структурная статистика	
кол-во отклонений расстояний от экспериментальных	0
кол-во нарушений ограничений на двугранные углы	0
СКО для отклонений связей (Å)	0,004
СКО для отклонений углов (град.)	0,794
Карта Рамачандрана	
остатки в наиболее благоприятной области (%)	91,4
остатки в дополнительно разрешенной области (%)	5,9
остатки в запрещенной зоне (%)	0,0

Для полученного ансамбля из 15 структур была построена карта Рамачандрана[27] (рисунок 22): 91,4% аминокислотных остатков находятся в разрешенных областях и 5,9% — в допустимых областях. Таким образом карта Рамачандрана подтверждает корректность найденной пространственной структуры пептида SEM1(49-67) [56].

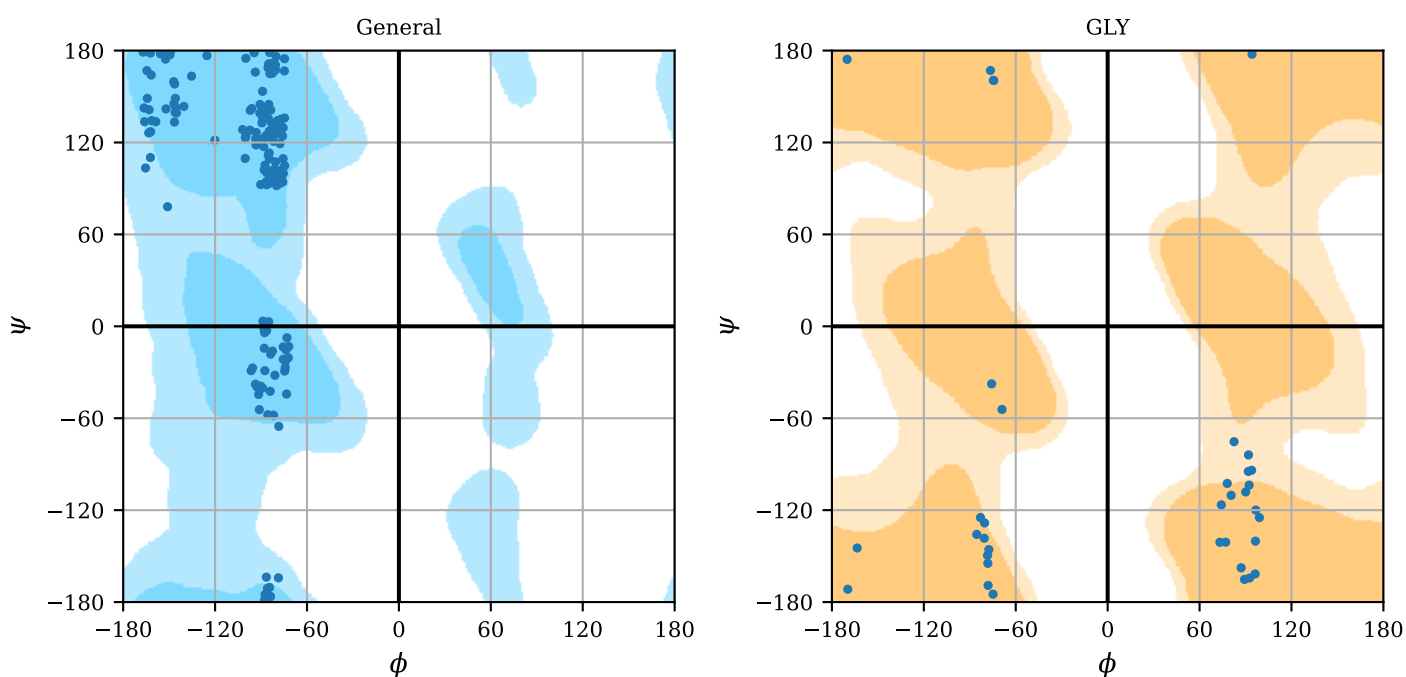


Рисунок 22 — Карта Рамачандрана для пептида SEM1(49-67)  
для ансамбля из 15 структур с минимальной энергией

Полученная в данной работе пространственная информация была использована для получения структуры пептида SEM1(49-107) с использованием комбинированного подхода, основанного на использовании геометрических ограничений отдельных пептидных фрагментов: SEM1(49-67), SEM1(68-85) и SEM1(86-107). Полученные результаты были опубликованы в статье[12].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был использован метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса ЯМР, с помощью которого был исследован фрагмент белка семеногелина — пептид SEM1 (49-67), получены следующие результаты:

- Были зарегистрированы спектры ЯМР: одномерные на ядрах  $^1\text{H}$ , и двумерные: HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ), TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{H}$ ), NOESY ( $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ ) и ROESY ( $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ ).
- Определены значения химических сдвигов ядер водорода  $^1\text{H}$ , азота  $^{15}\text{N}$  и углерода  $^{13}\text{C}$ , значения химических сдвигов были депонированы в базу данных BioMagResBank (BMRB ID 51691).
- Из анализа спектров NOESY и ROESY были определены 67 пространственных ограничения для расстояний между атомами, а также 34 ограничения на двугранные углы из анализа химических сдвигов.
- Впервые была определена пространственная структура пептида SEM1 (49-67) и депонирована в международную базу данных Protein Data Bank (PDB ID: 8BVZ). Для образца установлен тип вторичной структуры в виде случайного клубка.

Результаты исследования использованы в публикации:

Extent of N-Terminus Folding of Semenogelin 1 Cleavage Product Determines Tendency to Amyloid Formation / D. A. Osetrina, A. M. Kusova, A. G. Bikmullin, E. A. Klochkova, A. R. Yulmetov, E. A. Semenova, T. A. Mukhametzyanov, K. S. Usachev, V. V. Klochkov, D. S. Blokhin. — *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — V. 24. — P.8949.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Simon, V.* HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment / V. Simon, P. D. D. Ho, Q. A. Karim. — *The Lancet*. — 2006. — V. 368. — P. 489-504.
2. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics / D. S. Dimitrov, R. L. Willey, H. Sato, L. J. Chang, R. Blumenthal, M. A. Martin. — *Journal of Virology*. — 1993. — V. 67. — P. 2182–2190.
3. *Pomerantz, R. J.* Cross-talk and viral reservoirs / R. J. Pomerantz. — *Nature*. — 2003. — V. 424.
4. Structure, function and antagonism of semen amyloids / A. Röcker, N. R. Roan, J. K. Yadav, M. Fändrich, J. Münch. — *Chemical Communications*. — 2018. — V. 55. — P. 7557–7569.
5. *Дероум, Э. А.* Современные методы ЯМР для химических исследований. / Э. А. Дероум; пер. с англ. Ю. М. Демина. — М.: Мир, 1992. — 403 с.
6. *Lilja, H.* Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa / H. Lilja, P. A. Abrahamsson, A. Lundwall. — *Journal of biological chemistry*. — 1989. — V. 264. — P. 1894–1900.
7. *Robert, M.* Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: Identity with semenogelin / M. Robert, C. Gagnon. — *Biology of reproduction*. — 1996. — V. 55. — P. 813–821.
8. *Robert, M.* Semenogelin I: A coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein / M. Robert, C. Gagnon. — *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 1999. — V. 55. — P. 944–960.

9. *Lamirande, E.* Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function / E. de Lamirande. — *Semin Thromb Hemost.* — 2007. — V. 33. — P. 60-68.
10. Semenogelin, a coagulum macromolecule monitoring factor involved in the first step of fertilization: A prospective review / S. Vickram, K. Rohini, K. Anbarasu, N. Dey, P. Jeyanthi, S. Thanigaivel, P. K. Issac, J. Arockiaraj. — *International Journal of Biological Macromolecules.* — 2022. — V. 209. — P. 951–962.
11. *Шугалей, И. В.* Химия белка: учебное пособие / И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджиу, И. В. Целинский. — СПб.: Проспект Науки, 2010. — 200 с.
12. Extent of N-Terminus Folding of Semenogelin 1 Cleavage Product Determines Tendency to Amyloid Formation / D. A. Osetrina, A. M. Kusova, A. G. Bikmullin, E. A. Klochkova, A. R. Yulmetov, E. A. Semenova, T. A. Mukhametzyanov, K. S. Usachev, V. V. Klochkov, D. S. Blokhin. — *International Journal of Molecular Sciences.* — 2023. — V. 24. — P. 8949.
13. NMR of Proteins and Nucleic Acids-Based Structural Characterization of a Two-Disulfide-Bonded Analogue of the FXIIIa Inhibitor Tridegin: New Insights into Structure-Activity Relationships / T. Schmitz, A. A. Paul George, B. Nubbenmeyer, C. A. Bäuml, T. Steinmetzer, O. Ohlenschläger, A. Biswas, D. Imhof. — *International Journal of Molecular Sciences.* — 2021. — V. 22. — P. 880.
14. *Каратаева, Ф. Х.* Спектроскопия ЯМР в органической химии. Часть I. Общая теория ЯМР. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ : учеб. пособие / Ф. Х. Каратаева, В. В. Клочков. — Казань: Казанский федеральный ун-т, 2012. — 96 с.
15. *Keeler, J.* Understanding NMR Spectroscopy / J. Keeler. — 2nd ed. — John Wiley & Sons, 2010. — 526 pp.
16. *Bax, A.* Two-Dimensional NMR in Liquids / A. Bax. — Dordrecht: Reidel, 1984.



17. Turner, D. L. Basic Two-Dimensional NMR / D. L. Turner. — *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. — 1986. — V. 17. — P. 281-358.
18. 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*.
19. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline / W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue. — *Proteins*. — 2005. — V. 59. — P. 687-696.
20. Wüthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids / K. Wüthrich. — 1st ed. — Wiley-Interscience, 1991.
21. 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.
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. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Schwieters, C. D. Xplor-NIH for molecular structure determination from NMR and other data sources / C. D. Schwieters, G. A. Bermejo, G. M. Clore. — *Protein Science*. — 2018. — V. 27. — P. 26-40.
27. Laskowski, R. A. The ramachandran plot and protein structure validation / R. A. Laskowski, N. Furnham, J. M. Thornton. — *World Scientific*. — 2013. — P. 62-75.