Том 153, кн. 1

Естественные науки

2011

УДК 541.12.038.2:536.75:536.728

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ДЕКАПЕПТИДА Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly В КОМПЛЕКСЕ ПРОТЕИН – МИЦЕЛЛЫ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков

Аннотация

Методами спектроскопии ЯМР ¹Н и двумерной ЯМР (TOCSY, NOESY) спектроскопии исследована пространственная структура комплекса декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly – мицеллы додецилсульфата натрия в водном растворе. Комплексообразование подтверждено изменением химических сдвигов ЯМР ¹Н спектров декапептида, знаками и величинами NOE эффектов в присутствии додецилсульфата натрия. Методами двумерной ЯМР (TOCSY, NOESY) спектроскопии определено пространственное строение декапептида в этом комплексе.

Ключевые слова: олигопептид, мицеллы, ЯМР ¹Н спектроскопия, двумерная ЯМР (TOCSY, NOESY) спектроскопия.

Введение

Белки играют исключительно важную роль в живой природе. Каждый белок обладает свойственной только ему пространственной конформацией, и именно пространственная структура белка определяет его свойства. При исследовании особенностей пространственной структуры и функций белков в ряде случаев оказывается полезным использовать их короткие фрагменты – олигопептиды. Известно, что большая часть биохимических процессов протекает на поверхности мембраны клетки. Описание пространственного строения комплекса олигопептид – поверхность мембраны, равно как и строение олигопептида в комплексе, позволяет достигнуть фундаментального понимания механизмов протекающих на поверхности клеток биохимических процессов.

Протеины могут взаимодействовать с мембраной клетки преимущественно двумя способами: проникать сквозь бислой (и тогда говорят об интегральных мембранных белках) или образовывать комплекс с поверхностью бислоя (периферийные или внешние мембранные белки) [1]. Протеины, взаимодействующие с биологическими мембранами, являются амфифильными, при этом гидрофобная составляющая пептидов взаимодействует с ацильной частью липидной цепочки за счет ван-дер-ваальсовых сил [1]. В качестве примеров первых исследований комплексов протеин – мембрана можно привести исследования методом ЯМР-спектроскопии амфифильных пептидов, таких, как мелиттин (melittin), пептид из пчелиного яда (26 аминокислотных остатков) и пептид δ-гемолизин (δ-hemolysin), которые имеют тенденцию агрегировать в водном растворе. Они связываются с поверхностью мембраны, однако приводят к гибели клетки, если их концентрация достаточно высока [2, 3].

Известно, что хорошей моделью мембранной поверхности, подходящей для структурных исследований методом ЯМР-спектроскопии [2, 4–7], являются мицелла и милеллярные комплексы. Одной из наиболее полных работ, выполненных в этом направлении, является работа [8], в которой методами спектроскопии ЯМР (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) изучается структура комплекса протеин (Gly-Leu-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Asp-Asp-Lys-Lys) – мицеллы.

При исследовании комплексов протеин – поверхность мембраны в качестве модели мембран используют мицеллы на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ) или небольшие фосфолипидные везикулы [1, 8]. Среда, которая наиболее близко соответствует нативному бислою липида, состоит из фосфолипидных везикул, минимальный размер частиц которых составляет 250–300 Å в диаметре. Частицы такого размера имеют большое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 4.10^{-6}$ c). Длинные времена корреляции приводят к коротким значениям времен поперечной релаксации T₂, что, в свою очередь, приводит к уширению резонансных сигналов в спектрах ЯМР и к увеличению спиновой диффузии в ¹Н NOE экспериментах [9]. Короткие времена поперечной релаксации T_2 приводят к уменьшению информативности двумерных ЯМР-экспериментов (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY), необходимых как для отнесения резонансных сигналов, так и для определения пространственной структуры протеинов в комплексе [9–11]. Таким образом, частицы такого размера являются неподходящими для двумерных экспериментов, и отсюда следует, что структурные исследования, использующие внутримолекулярные ¹Н NOE-эксперименты, ограничены в случае молекул с большой молекулярной массой.

Известно, что поверхностно-активные вещества, образованные амфифильными молекулами, содержат гидрофобные и гидрофильные участки. При этом формирующиеся мицеллярные системы находятся в быстром обмене с мономерными структурами. Критической концентрацией мицеллообразования поверхностно-активных веществ является концентрация ПАВ в растворе, при которой в системе образуются устойчивые мицеллы. Полярные группы поверхностно-активных веществ в водной среде расположены на оболочке мицеллы, которая является гидрофильной, а центральная часть мицеллы является гидрофобной [12].

В водном растворе мицеллы ведут себя как глобулярные белки. Они содержат от 60 мономерных молекул, при этом частицы такого размера имеют относительно небольшое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 5 \cdot 10^{-8}$ с) [1]. Интересным с точки зрения ЯМР-спектроскопии является то, что при связывании протеина с мицеллами образуется комплекс протеин – мицелла, молекулярная масса которого становится больше, чем у несвязанного протеина, что может перевести протеин из разряда малых молекул, подпадающих под условие быстрого обмена, в разряд молекул, подпадающих под условие медленного обмена [9, 10]. Последнее обстоятельство позволяет использовать спектроскопию ЯМР NOESY при решении структурных задач и для небольших по количеству аминокислотных остатков протеинов. Мицеллярные системы на основе додецилсульфата натрия (ДСН) образуются в воде при минимальной концентрации 8.1 мМ [1]. Большинство протеинов связывается с мицеллами ДСН в следующем весовом соотношении: 1.4 г ДСН и 1 г протеина [4]. Мицеллы ДСН могут быть использованы для моделирования поведения протеинов на биологических мембранах для небольших гидрофобных протеинов, которые образуют комплексы, связываясь непосредственно с мицеллой ДСН. Отметим, что у синтетических мицелл ДСН, подобно многим биологическим мембранам, имеется поверхностно-отрицательный заряд. От величины этого заряда зависит критическая концентрация мицеллобразования ДСН при формировании мицеллы. Присутствие соли (NaCl для систем ДСН) в растворе позволяет формироваться мицеллам при меньшей концентрации ДСН [1].

В настоящей работе методами ЯМР ¹Н и двумерной ЯМР (TOCSY, NOESY) спектроскопии изучено пространственное строение комплекса декапептид Vallle-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly – мицеллы ДСН, которые являются моделью поверхности мембраны клетки в водном растворе. Определена пространственная структура данного декапептида в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия.

Экспериментальная часть

Декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly был синтезирован методом твердофазного синтеза [14] с использованием аминокислот, защищенных 9-флуоренилметокси-карбонильными группами, при контроле процесса по проводимости реакционной смеси. Затем декапептид был выделен методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии в градиенте вода –ацетонитрил, лиофилизован и хранился при температуре –75 °C до использования. Мицеллярный раствор додецилсульфата натрия в H₂O + D₂O (90% + 10%) готовили при концентрации 5.72 г/л ДСН. Декапептид смешивали с мицеллярным раствором непосредственно перед измерениями.

Регистрацию спектров ЯМР ¹Н (500 МГц) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе с ДСН в водном растворе проводили на ЯМР спектрометре AVANCE II-500 фирмы Bruker. Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации по линии резонанса ²Н. При записи спектров ЯМР ¹Н использовали 90°-импульсы и задержки между импульсами равнялись 2 с; ширина спектра была 9.40 м.д.; число накоплений от 10. Двумерный спектр 2D TOCSY [15] использовали для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ¹Н декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly.

При проведении двумерных ЯМР-экспериментов (NOESY-модификация) в молекулярной системе время задержки между последовательностями импульсов было втрое большим, чем усредненное время продольной релаксации T_1 для протонов декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly. Спектры записывали с использованием фазочувствительной методики для 1024 точек F2координаты и 256 точек F1-координаты; использовали экспоненциальную фильтрацию вдоль обеих координат. Параметр времени смешивания τ_m выбирали равным 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 и 0.30 с.



Рис. 1. Структурная формула декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly



Рис. 2. Структурная формула додецилсульфата натрия

Обсуждение результатов

Декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly (рис. 1) относится к классу водорастворимых олигопептидов, обладающих фармакологическим (противовоспалительным) действием. Ранее [15], используя подход, основанный на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами ¹³С и ¹H, разделенных одной химической связью (¹D) [16, 17], было установлено пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly относительно небольшой молекулы, частично ориентированной в лиотропной жидкокристаллической среде.

Этот подход к установлению строения декапептида был использован потому, что приложение известного метода двумерной ЯМР NOESY спектроскопии к определению пространственного строения относительно малых молекул, подпадающих под условие быстрого движения ($\omega_0 \tau_c \ll 1$, ω_0 – угловая скорость прецессии магнитных ядер), не всегда эффективно [9–11, 18, 19]. Последнее обусловлено малыми временами корреляции τ_c таких молекул в растворе, что приводит к слабым по интенсивностям кросс-пикам в двумерных спектрах ЯМР NOESY.

В настоящей работе методами ЯМР ¹Н спектроскопии и двумерной ЯМР (TOCSY, NOESY) спектроскопии исследовано пространственное строение комплекса декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly – синтетическая модель поверхности мембраны клетки (мицеллярные системы на основе додецилсульфата натрия) и строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в этом комплексе в водном растворе.

Определение концентрации додецилсульфата натрия (рис. 2) в воде, при которой образуются мицеллы, проводили с помощью ЯМР ¹Н спектроскопии.



Рис. 3. Спектры ЯМР ¹H (500 МГц) додецилсульфата натрия в водном растворе (700 мкл $H_2O + D_2O$ (90% + 10%)) при различном содержании ДСН, *T* 298 К



Рис. 4. Зависимость разности химических сдвигов $CH_3(1)$ и $CH_2(12)$ ДСН от концентрации додецилсульфата натрия в водном растворе

Для этого были сняты спектры ЯМР ¹Н при различных концентрациях ДСН в водном растворе (рис. 3). Как видно из рисунка, при изменении концентрации ДСН происходит смещение сигналов ЯМР ¹Н, что объяснимо с позиций быстрого химического обмена между мономерами ДСН и мицеллярной формой на его основе. Рассмотрим более подробно изменение разности ($\Delta\delta$, м.д.) химических сдвигов протонов метиленовой группы CH₂(12) (рис. 2) и метильной группы CH₃(1) от концентрации ДСН в водном растворе, которое представлено на рис. 4. Из рисунка видно, что при концентрациях ДСН в растворе менее чем 1.4 г/л додецилсульфат натрия существует в мономерной форме; в области концентраций от 1.4 до 4.3 г/л в растворе присутствуют как мономерная, так и мицеллярная формы. При концентрациях ДСН более чем 4.3 г/л в растворе реализуется лишь мицеллярная форма, поскольку разность ($\Delta\delta$, м.д.) химических сдвигов протонов метиленовой группы CH₂(1) и метильной группы CH₃ остается неизменной.



Рис. 5. Спектр ЯМР ¹H (500 МГц) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Gly в растворе $H_2O + D_2O$ с додецилсульфатом натрия (5.7 г/л), находящимся в мицеллярном состоянии (звездочкой отмечен сигнал от протонов воды); *T* 298 K, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ¹H ТМС

Табл. 1

Химические сдвиги ЯМР ¹Н протонов ($\delta_{\rm H}$, м.д., относительно ТМС) для декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Gly, растворенного в $\rm H_2O + D_2O$ с додецилсульфатом натрия (4 мг на 700 мкл), находящимся в мицеллярном состоянии (в скобках указаны химические сдвиги декапептида в $\rm D_2O$); *T* 298 K, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ¹Н ТМС

α	ß	γ1	γ ₂	α	ß	γ 11	γ _{1"}	γ ₂	δ
СН	CH	CH ₃	CH ₃	CH	СН	CH ₂	CH ₂	CH ₃	CH ₃
Val	Val	Val	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
3.85	1.91	0.93	0.83	4.20	1.64	1.47	1.15	0.87	0.82
				(4.17)	(1.72)	(1.45)			
α	β	γ	δ	3	ζ	А	β	α	β
CH	CH ₂	CH_2	CH ₂	CH_2	NH ₂	CH	CH_2	CH	CH
Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr
4.30	1.71	1.47	1.87	3.00	7.41	4.44	3.93 3.86	4.28	4.24
	(1.64)	(1.39)	(1.72)	(2.94)		(4.47)			
γ	α	β	α	В	γ	δ_1	δ_2	α	
CH ₃	СН	CH ₃	СН	CH_2	СН	CH ₃	CH ₃	CH_2	
Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	
1.14	4.33	1.38	4.40	1.63	1.55	0.86	0.89	3.79	
NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH		-
Val	Ile	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly		
8.14	8.01	8.03	8.16	7.96	8.15	7.81	7.83		

Спектр ЯМР ¹Н декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе с мицеллами додецилсульфата натрия представлен на рис. 5 (химические сдвиги приведены в табл. 1). Большие по интенсивности сигналы на спектре принадлежат ДСН.



Рис. 6. Двумерный спектр ЯМР ТОСЅҮ (¹Н 500 МГц) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе $H_2O + D_2O$ с додецилсульфатом натрия (4 мг на 700 мкл), находящимся в мицеллярном состоянии (звездочкой отмечен сигнал от не полностью подавленной воды); *T* 298 К, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ¹Н ТМС

Отнесение сигналов в спектре ЯМР ¹Н декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе $H_2O + D_2O$ с ДСН произведенов соответствии с литературными данными [20, 21] и на основании двумерного эксперимента ЯМР ТОСЅҮ (рис. 6), а также химических сдвигов сигналов спектра ЯМР ¹Н данного декапептида в D_2O [15]. Двумерный ТОСЅҰ был использован для выявления по кросс-пикам сигналов атомов водорода, принадлежащих одной аминокислоте.

При сравнении химических сдвигов декапептида с ДСН (табл. 1) и без ДСН (табл. 1 в скобках) можно видеть изменения в их значениях. Отличие химических сдвигов в данных растворах может быть обусловлено изменением конформации молекулы декапептида и образованием комплекса декапептид – мицеллы ДСН. Далее, в двумерном спектре ЯМР ¹Н NOESY декапептида наблюдались кросс-пики того же знака, что и основные сигналы, расположенные вдоль диагонали двумерного спектра. Последнее характерно для больших молекул. Все вышеприведенные факты подтверждают образование комплекса декапептид – мицеллы на основе додецилсульфат натрия.

Для определения межпротонных расстояний, напрямую характеризующих пространственную геометрию декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе в растворе, записывались двумерные спектры ЯМР NOESY



Рис. 7. Двумерный спектр ЯМР NOESY (¹H 500 МГц) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе $H_2O + D_2O$ с додецилсульфатом натрия, находящимся в мицеллярном состоянии. Время смешивания τ_m 0.3 с (звездочкой отмечен сигнал от не полностью подавленной воды); *T* 298 K, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ¹H ТМС

(рис. 7) с вариацией времени смешивания τ_m . Наблюдались кросс-пики в двумерных спектрах ЯМР NOESY между сигналами протонов исследуемого соединения, относящихся к различным аминокислотным фрагментам. Анализируя и обрабатывая данные кросс-пики с использованием методики [22], были получены приближенные межпротонные расстояния. Данные приведены в табл. 2. В качестве калибровочной интенсивности кросс-пиков был выбран кросс-пик между метиленовыми протонами Ile С γ_1 H₁ – Ile С γ_1 H₂, на основании того, что протоны в нем принадлежат одному углеродному атому, а расстояние между ними не может быть изменено при изменении внешних условий (определялось различными методами и принято равным 1.72 Å).

С целью определения пространственного строения декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе $H_2O + D_2O$ с ДСН были проведены расчеты по методу молекулярной механики в программе DYNAMO [23], в которой в качестве исходных экспериментальных данных использовали межпротонные расстояния (табл. 2), рассчитанные на основе анализа интегральных значений кросс-пиков спектров ЯМР NOESY данного декапептида. Экспериментально полученные межпротонные расстояния для декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфат натрием. Звездочкой обозначено калибровочное расстояние

Пара протонов	Межпротонное расстояние r, Å			
Ile $C\gamma_1H_1$ – Ile $C\gamma_1H_2$	1,72*			
Val NH – Ile $C\gamma_1 H_2$	2.53 ± 0.51			
Val NH – Val $C\gamma_2H_3$	4.10 ± 0.82			
Ala NH – Ala CαH	2.31 ± 0.46			
Leu NH – Ala CαH	2.44 ± 0.49			
Ser NH – Ser CaH	1.98 ± 0.25			
Thr NH – Ser CαH	1.91 ± 0.18			
Val C α H – Ile C γ_1 H ₂	2.96 ± 0.59			
Lys C α H – Lys C δ H ₂	2.43 ± 0.49			
Thr NH – Ser C β H ₂	2.87 ± 0.57			
Ser NH – Ser C β H ₂	2.54 ± 0.51			
Ile NH – Lys C δ H ₂	2.60 ± 0.52			
Lys NH – Lys $C\delta H_2$	2.76 ± 0.55			
Ser NH – Lys CδH ₂	2.90 ± 0.58			
Ile NH – Ile CαH	2.03 ± 0.31			
Ser NH – Thr CaH	3.32 ± 0.67			
Leu NH – Thr CαH	3.62 ± 0.72			



Рис. 8. Конформация декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия, рассчитанная в программе DYNAMO с использованием экспериментально определенных межпротонных расстояний

Расчеты в программе DYNAMO с помощью метода молекулярной динамики, использующие экспериментальные значения межпротонных расстояний, позволили выбрать единственную структуру (рис. 8) как наиболее выгодную структуру для декапептида. Координаты атомов пространственной структуры декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия в $H_2O + D_2O$ можно получить у авторов работы. Модель комплекса декапептид – мицеллы, представленная на рис. 9, построена на основе

Табл. 2



Рис. 9. Модель декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе с мицеллой додецилсульфата натрия

гидрофильных свойств отдельных участков молекулы декапептида. Данная структура декапептида в комплексе с мицеллой (рис. 9) объясняет причину отсутствия кросс-пиков на спектрах ЯМР NOESY между молекулами декапептида и додецилсульфата натрия, так как пептид не проникает в мицеллу, а располагается на ее поверхности своими гидрофильными концами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00077а), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Министерства образования РФ.

Summary

D.S. Blokhin, S.V. Efimov, A.V. Klochkov, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, A.V. Aganov, V.V. Klochkov. Spatial Structure of Decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly in Its Complex with Sodium Dodecyl Sulfate Micelles.

Spatial structure of the complex of decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly and sodium dodecyl sulfate micelles in aqueous solution was studied by ¹H NMR spectroscopy and two-dimensional NMR (TOCSY, NOESY) spectroscopy. The complexation was confirmed by the change in chemical shifts of ¹H NMR spectra of the decapeptide and by the signs and values of NOEs in the presence of sodium dodecyl sulfate. Spatial structure of the decapeptide in the complex was determined by two-dimensional NMR (TOCSY, NOESY) spectroscopy.

Key words: oligopeptide, micelles, ¹H NMR spectroscopy, two-dimensional NMR (TOCSY, NOESY) spectroscopy.

Литература

- Henry G.D., Sykes B.D. Studying membrane protein structure in solution. Methods to Study Membrane Protein Structure in Solution // Methods Enzimol. – 1994. – V. 239. – P. 515–535.
- Lee K.H., Fitton J.E., Wüthrich K. Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of δ-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – V. 911. – P. 144–153.
- Brown L.R., Braun W., Kumar A., Wüthrich K. High resolution nuclear magnetic resonance studies of the conformation and orientation of melittin bound to a lipid-water interface // Biophys. J. – 1982. – V. 37. – P. 319–328.
- Inagaki F., Shimada I., Kawaguchi K., Hirano M., Teresawa I., Ikura T., Go N. Structure of melittin bound to perdeuterated dodecylphosphocholine micelles as studied by twodimensional NMR and distance geometry calculations // Biochem. – 1989. – V. 28. – P. 5985–5991.
- Braun W., Wider G., Lee K.H., Wüthrich K. Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by ¹H nuclear magnetic resonance // J. Mol. Biol. – 1983. – V. 169. – P. 921– 948.
- Motta A., Pastore A., Goud N.A, Castiglione Morelli M.A. Solution conformation of salmon calcitonin in sodium dodecyl sulfate micelles as determined by two-dimensional NMR and distance geometry calculations // Biochem. – 1991. – V. 30. – P. 10444–10450.
- Malikayil J.A., Edwards J.V., McLean L.R. Micelle-bound conformations of a bombesin/ gastrin releasing peptide receptor agonist and an antagonist by two-dimensional NMR and restrained molecular dynamics // Biochem. – 1992. – V. 31. – P. 7043–7049.
- Wang G., Keifer P., Peterkofsky A. Solution structure of the N-terminal amphitropic domain of Escherichia coli glucose-specific enzyme IIA in membrane-mimetic micelles // Protein Sci. – 2003. – V. 12. – P. 1087–1096.
- 9. *Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A.* Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Oxford : Oxford Univ. Press, 1987. 610 p.
- 10. Van de Ven F.J.M., Frank J.M. Multidimensional NMR in liquids: basic principles and experimental methods. N. Y.; Toronto: Wiley-VCH, 1995. 399 p.
- 11. Berger S., Braun S. 200 and More NMR Experiments. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. 810 p.
- Tanford C. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. N. Y.: Wiley, 1973. – 208 p.
- 13. *Nozaki Y., Reynolds J., Tanford C.* Conformational states of a hydrophobic protein. The coat protein of fd bacteriophage // Biochem. 1978. V. 17. P. 1239–1246.
- 14. *Merrifield R.B.* Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide // J. Am. Chem. Soc. 1963. V. 106. P. 2149–2154.
- 15. Блохин Д.С., Ефимов С.В., Клочков А.В., Юльметов А.Р., Филиппов А.В., Клочков В.В. Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенное анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2010. – Т. 152, кн. 3 – С. 36–47.
- 16. *Tjandra N., Bax A.* Direct Measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium // Science. 1997. V. 278. P. 1111–1114.
- 17. *Alba E., Tjandra N.* NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution // Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectros. 2002. V. 40. P. 175–197.

- Klochkov V.V., Khairutdinov B.I., Klochkov A.V., Shtyrlin V.G., Shaykhutdinov R.A. A spatial structure of triglycine determined by the residual dipolar couplings analysis // Appl. Magn. Reson. – 2003. – V. 25. – P. 113–119.
- Klochkov A.V., Khairutdinov B.I., Tagirov M.S., Klochkov V.V. Determination of the spatial structure of glutathione by residual dipolar coupling analysis // Magn. Reson. Chem. – 2005. – V. 43. – P. 948–951.
- 20. Breitmaier E., Woelter W. ¹³C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. Weinheim, N. Y.: Verlag Chemie, 1978. 322 p.
- 21. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N. Y .: Wiley-VCH, 1986. 396 p.
- Bremer J. Skewed Exchange Spectroscopy. Two-Dimensional Method for the Measurement of Cross Relaxation in Proton NMR Spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. – P. 4691-4696.
- Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // J. Biomol. NMR. 1995. V. 6. – P. 277–293.

Поступила в редакцию 20.12.10

Блохин Дмитрий Сергеевич – студент Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Ефимов Сергей Владимирович – аспирант кафедры общей физики Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Антон Владимирович– кандидат физико-математических наук, ведущий инженер кафедры физики молекулярных систем Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Юльметов Айдар Рафаилович – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры общей физики Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Филиппов Андрей Васильевич – доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики молекулярных систем Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Аганов Альберт Вартанович – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики, директор Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Владимир Васильевич – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: vladimir.klochkov@ksu.ru