

Федеральное государственное автономное учреждение высшего
профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

на правах рукописи

Усачев Константин Сергеевич

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ АМИЛОИДОГЕННЫХ А β
ПЕПТИДОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С МОДЕЛЬНЫМИ
МЕМБРАНАМИ В РАСТВОРАХ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯМР**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре общей физики и в лаборатории ЯМР Института физики Казанского (Приволжского) Федерального Университета

Научный руководитель: **Клочков Владимир Васильевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Скоринкин Андрей Иванович**
доктор физико-математических наук,
доцент кафедры радиоэлектроники
Института физики К(П)ФУ, г. Казань

Зуев Юрий Федорович
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией биофизической
химии наносистем Казанского института
биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г.
Казань

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова, г. Москва

Защита состоится «26» декабря 2013 года в 16:30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» ноября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор

 М.В. Еремин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Одним из наиболее эффективных методов изучения структуры биологических макромолекул в растворе является спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Традиционно исследования пространственного строения органических соединений в растворах основаны на использовании современных подходов в ЯМР, таких как двумерная ЯМР NOESY спектроскопия (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера), которая позволяет определять межпротонные расстояния между магнитными ядрами, отстоящими друг от друга на расстоянии до 5 Å; а так же гетероядерная корреляционная спектроскопия (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и др.), позволяющая регистрировать такие ЯМР параметры как константы остаточного диполь-дипольного взаимодействия (в английском варианте RDC - Residual Dipolar Coupling) $^1D_{\text{CH}}$, которые в свою очередь несут информацию об углах между вектором внешнего магнитного поля и направлением C-H связей. Современные расчетные методы позволяют на основе полученных данных из экспериментов ЯМР определять конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) исследуемых соединений.

Болезнь Альцгеймера (БА; также сенильная деменция альцгеймеровского типа) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга. Бляшки состоят из фибрилл, образованных в результате агрегации малых пептидов длиной в 39-43 аминокислотных остатков, именуемых амилоидными A β -пептидами. Эти пептиды являются продуктом энзиматического расщепления более крупного белка-предшественника бета-амилоида (ПБА).

Нейротоксичное действие A β пептидов проявляется в результате их взаимодействия с клеточной мембраной. Предполагается, что A β пептиды, непосредственно нарушают работу мембран нейронов вызывая образование пор, что приводит к изменениям ионного гомеостаза. Отсюда описание пространственного строения комплекса «A β пептид–мембрана», также как и строение A β пептидов в растворе, позволит подойти к пониманию механизмов протекающих на поверхности клеток, что может дать возможность поиска лекарственных препаратов, ингибирующих образование сенильных бляшек.

Цель и задачи исследования.

Целью диссертационной работы являлось определение пространственной структуры A β пептидов с нативным содержанием изотопов и их комплексов с модельными биологическими мембранами в растворе методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения, включая двумерные.

Объекты исследования.

В рамках данной работы в качестве объектов исследования были выбраны следующие Аβ пептиды (аминокислотные последовательности в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB (International Union of Pure and Applied Chemistry; International Union of Biochemistry and Molecular Biology) приведены на рисунке 1): Аβ₁₋₄₀; arc-Аβ₁₋₄₀(E22G), для которого известно, что точечная мутация в позиции E22 ускоряет процессы олигомеризации Аβ пептидов и образования фибрилл и приводит к развитию БА в более раннем возрасте (52-57 лет). А также активные фрагменты пептида Аβ₁₋₄₀: Аβ₁₀₋₃₅, который содержит сайты связывания холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (АВАД) (участок с V12 по D23 аминокислотные остатки), а также содержит область аминокислотной последовательности с высокой степенью сродства с энзимами и каталазами (I31–M35); Аβ₁₃₋₂₃, который, как предполагается, является самостоятельным сайтом связывания олигомеров, а также содержит предполагаемый центр агрегации; Аβ₁₆₋₂₂, который, как предполагается, является центром агрегации Аβ пептидов.

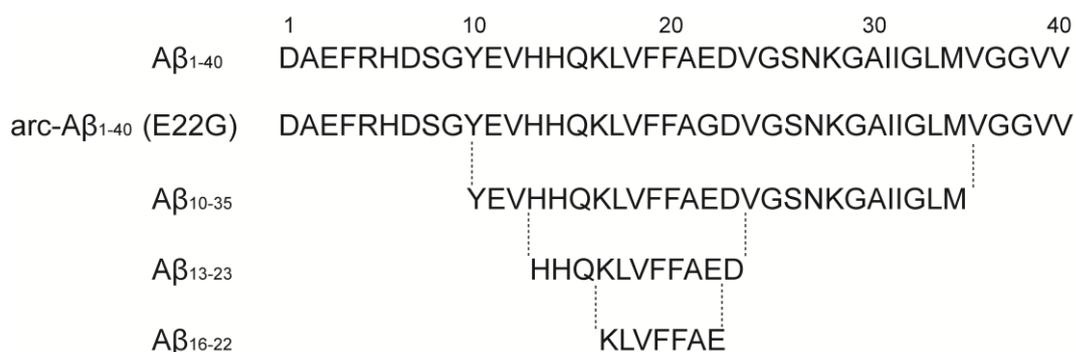


Рисунок 1. Аминокислотные последовательности исследованных пептидов в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB.

В качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны нами использовались мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН, C₁₂H₂₅OSO₃Na).

Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. определение конформации и геометрических параметров (координаты атомов в pdb формате) пептидов в растворе с мицеллами ДСН методом двумерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения;
2. выявление участков аминокислотной последовательности, отвечающих за комплексообразование Аβ пептидов с модельной мембраной;
3. построение модели комплекса «пептид-поверхность модельной мембраны» на основе полученных экспериментальных данных.

Методы исследования и использованная аппаратура.

При решении поставленных задач использовались методы двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов ЯМР в различных растворителях и средах, а также теоретическое моделирование молекулярной структуры. Регистрацию 1D и 2D (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C) спектров ЯМР проводили на ЯМР спектрометре AVANCE II-500 (Bruker) (500 МГц (^1H), 125,76 МГц (^{13}C)) при температуре 293 К. Отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H проводилось с помощью стандартной методики на основе совместного использования 2D ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY спектроскопии; сигналы ядер ^{13}C были отнесены посредством 2D ^1H - ^{13}C HSQC экспериментов. Полученные экспериментальные данные о межпротонных расстояниях использовались в качестве входных данных для расчета пространственной структуры пептидов методом молекулярной динамики в программе Xplor-NIH.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Научная новизна.

1. На основе экспериментальных данных ЯМР спектроскопии высокого разрешения установлено наличие вторичной структуры в виде 3_{10} -спирали для $\text{A}\beta$ пептидов: $\text{A}\beta_{16-22}$, $\text{A}\beta_{13-23}$, $\text{A}\beta_{10-35}$ и $\text{arg-A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН.
2. Определено положение $\text{A}\beta$ пептидов на поверхности мицеллы ДСН, предложена модель комплекса «пептид-поверхность биологической мембраны».
3. Установлено, что процесс комплексообразования пептида с мицеллой происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29-M35.
4. Впервые получена пространственная структура пептида $\text{arg-A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе ДСН. Установлено, что точечная мутация в аминокислотной последовательности в позиции E22 ведет к изменению во вторичной структуре бета-амилоида в области с 13 по 23 аминокислотного остатка, и к тому, что данная область перестает участвовать в процессе комплексообразования пептида с мицеллой ДСН.
5. Полученные данные о пространственном строении $\text{A}\beta$ пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула бета-амилоида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки. Взаимодействие $\text{A}\beta$ пептидов с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, нарушающих работу мембран нейронов.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается: согласием с другими исследованиями, проводимыми в этом направлении с помощью других подходов в спектроскопии ЯМР (например, подход, основанный на использовании парамагнитных агентов в экспериментах ЯМР); использованием современного ЯМР оборудования и программного обеспечения; методик, адекватных задачам исследования.

Научная и практическая значимость работы.

Установленные спектральные параметры ЯМР и измеренные межпротонные расстояния в изученных соединениях могут быть использованы в качестве справочного материала. Координаты атомов (в pdb формате), входящих в состав изученных пептидов, определенные путем анализа экспериментальных значений межпротонных расстояний могут быть использованы при сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей (в частном случае фрагментов цепей полипептидов).

Полученные данные о пространственном строении Аβ пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула Аβ пептида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки.

Личный вклад автора.

Участие при постановке целей и задач исследования. Регистрация одно- и двумерных спектров ЯМР, написание статей по теме проведенных исследований. Автору принадлежат результаты интерпретации спектров ЯМР (информация о геометрии исследованных соединений) и результаты компьютерного моделирования молекулярных структур.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих российских и международных семинарах и конференциях: Итоговые конференции Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань, 2010, 2012); V Всероссийская конференция “Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях” (г. Казань, 2011); III Региональная научно-практическая конференция с международным участием «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений» (г. Казань, 2011); II международный симпозиум КФУ – РИКЕН, посвященный междисциплинарным исследованиям (г. Казань, 2012); конкурс на соискание именных стипендий мэра г. Казани (г. Казань, 2012).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа на отдельных этапах поддерживалась грантами РФФИ (09-03-00077а), Министерства образования и науки РТ (12-03-97040), Министерства

образования и науки РФ (К(П)ФУ, 2.2792.2011), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (02.740.11.0702).

Изученные в работе соединения синтезированы в лаборатории пептидного синтеза отделения химии поверхностных явлений технического университета Лулео под руководством доктора физико-математических наук Филиппова А.В. (Luleå University of Technology, Luleå, SE-91187, Sweden).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 работы в реферируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 161 (включая 28 страниц приложения) страницах машинописного текста и содержит 64 рисунка, 20 таблиц; включает введение, три главы, основные результаты и выводы, список литературы из 131 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором изложены основные положения теории спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Рассмотрено теоретическое обоснование гомоядерных (COSY, TOCSY) и гетероядерных (HMQC, HSQC) корреляционных экспериментов ЯМР. Рассмотрены особенности спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и NOESY спектроскопии, а также спектроскопии ЯМР ориентированных молекул в лиотропных жидкостях.

Во второй главе описаны объекты и методы исследования. Приведено описание процесса приготовления образцов для ЯМР исследований, а так же описаны параметры экспериментов ЯМР и расчетов пространственной структуры исследуемых молекул.

Третья глава посвящена результатам и обсуждению исследования пространственной структуры Аβ пептидов и их комплексов с мицеллами ДСН в растворах методом ЯМР. Приведен литературный обзор, касающийся строения белков. Обсуждаются некоторые Аβ пептиды, участвующие в механизме развития болезни Альцгеймера, а также мицеллы на основе додецилсульфата натрия, использующиеся в качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны. Используя подход, основанный на анализе экспериментально полученных межпротонных расстояний с помощью метода молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH, определены конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) Аβ пептидов Аβ₁₆₋₂₂, Аβ₁₃₋₂₃, Аβ₁₀₋₃₅, Аβ₁₋₄₀, arc-Аβ₁₋₄₀ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. На основе рассчитанных структур Аβ пептидов

растворе с мицеллами ДСН были определены участки аминокислотной последовательности, отвечающих за комплексообразование Аβ пептидов с модельной мембраной, а также построены модели комплексов: пептид – модель поверхности биологической мембраны (мицеллы на основе ДСН).

Структура пептида Аβ₁₆₋₂₂ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Для создания лекарственных препаратов препятствующих развитию сенильной деменции необходимо иметь точную информацию о механизме агрегации Аβ пептидов. Предполагается, что ядром агрегации является активный участок пептида Аβ₁₋₄₀ между 16 и 22 аминокислотными остатками [1]. По этой причине пространственное строение фрагмента Аβ₁₆₋₂₂ (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu) представляет самостоятельный интерес.

Гептапептид Аβ₁₆₋₂₂ был растворен в 20 мМ растворе фосфатного буфера при pH = 7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ¹H использовался подход, основанный на совместном использовании 2D ¹H-¹H TOCSY и ¹H-¹H NOESY методик ЯМР. К сожалению, в силу того, что молекулы гептапептида Аβ₁₆₋₂₂ попадают под условие быстрого движения, в спектрах 2D ¹H-¹H NOESY экспериментов ЯМР в растворе наблюдалось небольшое количество кросс-пиков, и практически все они были между протонами внутри аминокислотных остатков. Для установления структуры, помимо межпротонных расстояний использовались значения констант спин-спинового взаимодействия (между амидными протонами и протонами альфа групп аминокислотных остатков), определенные из 2D ¹H-¹H TOCSY спектра. Значение полученных констант скалярного спин-спинового взаимодействия, в свою очередь, накладывают ограничения на величины двугранных углов исследуемой молекулы. Также для определения структуры исследуемого пептида был использован метод, основанный на анализе величин констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия. Исследуемый гептапептид растворялся в ориентированной жидкокристаллической среде представляющей собой смесь n-алкилполи(этилен)гликоля (C₁₂E₅, где 12 – число атомов углерода в n-алкильной группе и 5 – число единиц гликоля в поли-этилен гликоле) (чистота ≥98%, Sigma), нормального спирта (гексанол) и исходного буферного раствора.

Диполь-дипольное взаимодействие (ДДВ) между магнитными ядрами внутри молекулы помещенной в растворе полностью усредняется вследствие хаотичного движения молекул. Если же растворить молекулу в лиотропной жидкокристаллической среде, то поступательное и вращательное движение молекул перестанет быть изотропным, так как будет присутствовать взаимодействия с магнитно-ориентированными молекулярными образованиями. Эта проявляется в ЯМР спектрах, в виде констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия (Рис.2).

Из двумерных ¹H-¹³C HSQC-HECADE спектров ЯМР (Рис.2) были определены величины констант остаточного ДДВ, которые в свою очередь, зависят от угла между направлениями магнитного поля и C-H связи.

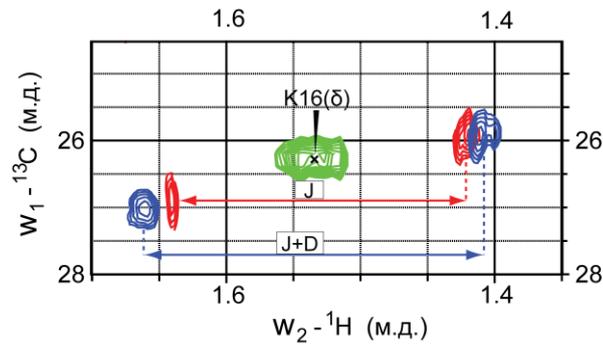


Рисунок 2. Суперпозиция областей $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 2D спектров ЯМР гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$: $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC спектр $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе 20 мМ фосфатного буфера при $\text{pH} = 7.3$ (центральный кросс-пик); $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC-HECADE спектр ЯМР $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе 20 мМ фосфатного буфера при $\text{pH} = 7.3$ (2 внутренних пика); $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC-HECADE спектр ЯМР $\text{A}\beta_{16-22}$ в смеси n-алкил-поли(этилен)гликоля (C_{12}E_5), нормального спирта (гексанол) и исходного фосфатного буфера (2 внешних пика).

Таблица 1. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$\text{A}\beta_{16-22}$
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	72
Внутриостаточные	29
Последовательные ($ i-j =1$)	26
Среднего диапазона ($1 < i-j < 4$)	17
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	
КССВ J_{HNCH}	
константы остаточного ДДВ $^1D_{\text{CH}}$	
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
3_{10} -спиральный регион 16-22	$0,10 \pm 0,05$

Небольшое число экспериментально полученных межпротонных расстояний, констант спин-спинового взаимодействия между амидными протонами и протонами альфа групп, а так же констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, к сожалению, не позволяют рассчитать точную 3D структуру пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера ($\text{pH}=7,3$) структура гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ соответствует случайному клубку.

Для исследования комплексов олигопептид-поверхность мембраны доступно два варианта синтетической модели поверхности мембраны клетки: мицеллы на основе ПАВ, и небольшие фосфолипидные везикулы. Среда, которая наиболее близко соответствует нативному бислою липида, состоит из фосфолипидных везикул, минимальный размер частиц которых составляет 250 - 300 Å в диаметре.

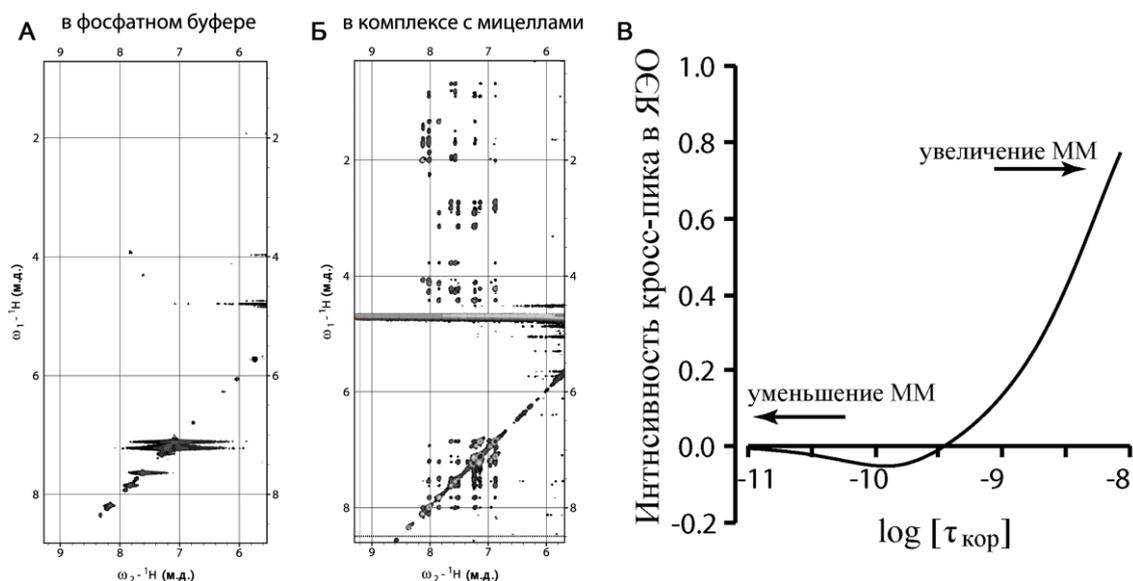


Рисунок 3. Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$: А) в растворе 20 мМ фосфатного буфера, $\text{pH} = 7.3$, Б) в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. В) Зависимость ЯЭО от времени корреляции. Для пептида длиной в 20 аминокислотных остатков на спектрометре с частотой 500 МГц время корреляции ~ 1 нсек ($\log \tau_{\text{кор}} = -9$).

Частицы такого размера имеют большое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 4 \times 10^{-6}$ с). Длинные времена корреляции приводят к коротким значениям времен поперечной релаксации T_2 , что в свою очередь приводит к уширению резонансных сигналов в спектрах ЯМР и к увеличению спиновой диффузии в ^1H NOE экспериментах. Короткие времена поперечной релаксации T_2 , приводят к уменьшению информативности 2D ЯМР экспериментов (TOCSY, HSQC, HMBSC, NOESY), необходимых как для отнесения резонансных сигналов, так и для определения пространственной структуры белков в комплексе. Кроме фосфолипидов, формирующих бислои или мультибислои в водных средах, существуют и другие органические соединения, формирующие мицеллярные системы, в которых мицеллы рассредоточены по всему объему, находящиеся в быстром обмене с мономерными структурами. ККМ ПАВ является концентрацией ПАВ в растворе, при которой в системе образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы. Полярная группа мицелл ПАВ веществ в водной среде расположена на оболочке мицеллы, которая является гидрофильной, а центральная часть мицеллы является гидрофобной. В водном растворе мицеллы ведут себя как глобулярные белки, содержащие от 60 мономерных молекул, при этом частицы такого размера имеют относительно небольшое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 5 \times 10^{-8}$ с). Интересным, с точки зрения ЯМР спектроскопии, является то, что при связывании олигопептида с мицеллами образуется комплекс олигопептид-мицелла, молекулярная масса которого становится больше, чем у несвязанного олигопептида, что может перевести олигопептид из разряда малых молекул, подпадающих под условие быстрого обмена, в разряд молекул, подпадающих под условие медленного обмена.

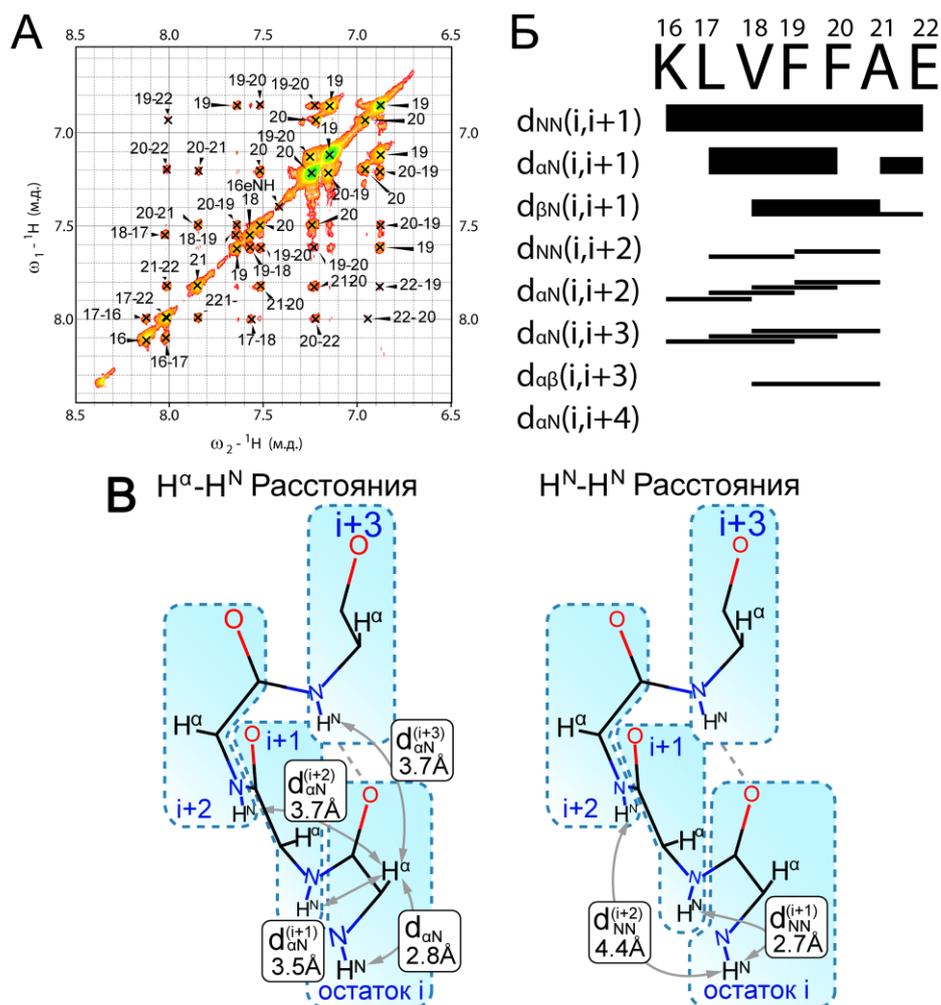


Рисунок 4. А) Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. Б) Межпротонные контакты ЯЭО для $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе с мицеллами ДСН. Толщина линий соответствует интенсивности ЯЭО контактов. В) Характерные межатомные расстояния конформации пептида в виде 3_{10} -спирали.

Последнее обстоятельство позволяет использовать спектроскопию ЯМР NOESY при решении структурных задач и для небольших по количеству аминокислотных остатков белков и олигопептидов (Рис.3).

В спектрах ^1H - ^1H NOESY (Рис.3,4) гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе с мицеллами ДСН наблюдалось значительное увеличение кросс-пиков, к тому же если в буферном растворе сигналы были с разными фазами, то в растворе с мицеллами все сигналы стали с положительной фазой. Данные факты являются свидетельством увеличения размера исследуемого вещества и подтверждением того, что образовался комплекс пептид-мицелла.

Отметим, что практически для всех аминокислотных остатков наблюдались кросс-пики между протонами альфа групп i -го аминокислотного остатка и NH протонами $i+2$ -го и $i+3$ -го (Рис.4). Также величины некоторых расстояний являются характерными для вторичной структуры называемой 3_{10} спиралью.

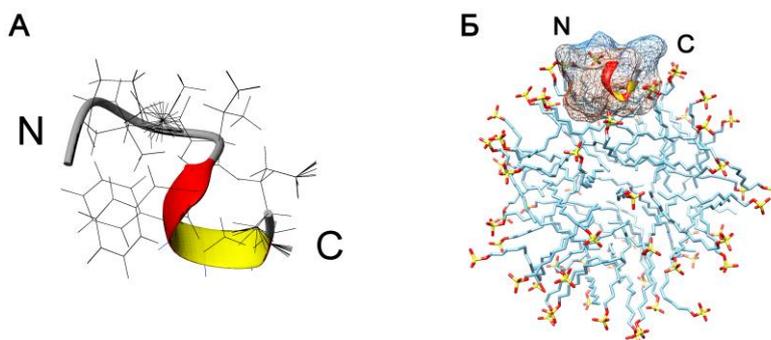


Рисунок 5. А) Структура гептапептида $A\beta_{16-22}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «гептапептид $A\beta_{16-22}$ – мицелла на основе ДСН».

Экспериментально полученные межпротонные расстояния использовались как входные данные для расчетов структуры методом молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH. Полученная структура пептида в растворе с мицеллами ДСН приведена на рисунке 5А. В спектрах гептапептида в водном растворе и в растворе с мицеллами ДСН, наблюдалось, что химические сдвиги протонов α - и β - групп F19, F20 и β -группы L17 сместились в область сильных полей, а химические сдвиги K16, V18 и E22 сместились в слабые поля. Это связано с тем, что вследствие взаимодействия аминокислотных остатков пептида с электроотрицательно заряженной поверхностью мицеллы произошло изменение конформации пептида. На основе этих данных была построена модель исследуемого комплекса (Рис.5Б). Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным установлено, что взаимодействие гептапептида $A\beta_{16-22}$ с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20.

Структура пептида $A\beta_{13-23}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Конформация пептида в виде 3_{10} спирали является менее энергетически выгодной чем, например, в виде α -спирали, по этой причине, для более детального изучения центрального фрагмента пептида $A\beta_{1-40}$, был синтезирован участок с 13 по 23 аминокислотный остаток ($A\beta_{13-23}$). К сожалению, так же как и для гептапептида $A\beta_{16-22}$ для $A\beta_{13-23}$, небольшого числа экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{13-23}$ так же соответствует случайному клубку. Далее бета-пептид $A\beta_{13-23}$ исследовался в растворе ДСН.

Наличие множества ЯЭО контактов среднего диапазона $dNN_{(i,i+1)}$, $d\alpha N_{(i,i+3)}$, and $d\alpha N_{(i,i+2)}$ указывает на то, что присутствует упорядоченная структура пептида, предположительно в виде 3_{10} спирали (Рис. 6). На основе большого количества ЯЭО контактов среднего диапазона была рассчитана 3D структура $A\beta_{13-23}$ в растворе с мицеллами ДСН методом молекулярной динамики (Рис.7А).

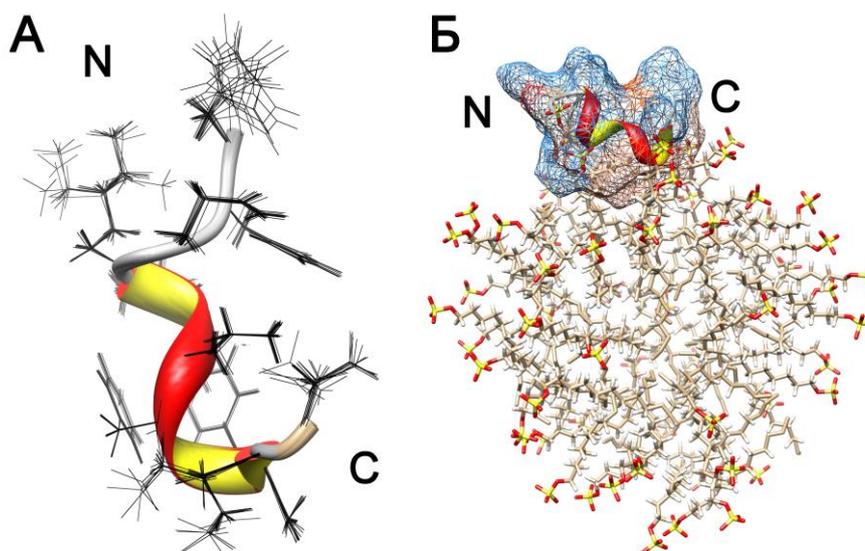


Рисунок 7. А) Структура пептида $A\beta_{13-23}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «пептид $A\beta_{13-23}$ – мицелла на основе ДСН».

Сопоставляя структуру пептида $A\beta_{13-23}$ в растворе с мицеллами ДСН с полученными ранее структурами для гептапептида $A\beta_{16-22}$ в том же растворе, можно установить хорошее соответствие данных структур в указанной области. Более того, так же как и у гептапептида $A\beta_{16-22}$ у данного пептида наблюдалось наличие гидрофобной области между 17 и 20 аминокислотными остатками. На основе полученных данных была построена структура комплекса «пептид-мицелла» для $A\beta_{13-23}$ (Рис.7Б). Причем, определено, что аминокислотные остатки L17, F19 и F20 ориентированы к поверхности мицеллы, в то время как остальные остатки аминного и карбоксильного концов ориентированы в противоположную сторону.

В работе [2] было установлено, что аминокислотный остаток A21 играет важную роль в стабилизации структуры альфа-спирали для пептида $A\beta_{11-28}$, а так же для его «арктической» и «итальянской» мутации. Результаты расчетов методом молекулярной динамики структуры комплекса «пептид-мицелла» в указанной работе показали что, $A\beta_{11-28}$ скорее всего расположен на поверхности мицеллы, что коррелирует с нашими экспериментальными данными и результатами. Согласно полученным нами экспериментальным данным было установлено, что взаимодействие $A\beta_{13-23}$ с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20. Известно, что область $A\beta$ пептида с V12 по D23 аминокислотные остатки является сайтом связывания для холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (ABAD). Таким образом, взаимодействие пептида $A\beta_{13-23}$ с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, которые нарушают работу мембран нейронов [3].

Структура пептида $A\beta_{10-35}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Для более детального изучения механизма взаимодействия $A\beta$ пептида с поверхностью мицеллы ДСН, был синтезирован более крупный пептид $A\beta_{10-35}$, состоящий из 26 аминокислотных остатков, для которого наблюдалось лучшая растворимость в водном растворе, чем для полноразмерного $A\beta_{1-40}$. Так же как и для пептидов $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$ для данного пептида наблюдалось небольшое число экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, что так же было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{10-35}$ так же соответствует случайному клубку.

Пептид $A\beta_{10-35}$ был растворен в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D 1H - 1H TOCSY и 1H - 1H NOESY методик ЯМР. С помощью 2D 1H - 1H NOESY спектров ЯМР с вариацией времени смешивания τ_m (75, 100, 120, 200 мс) были определены межпротонные расстояния для аминокислотных остатков пептида $A\beta_{10-35}$.

К сожалению, для однозначного расчета пространственной структуры пептида $A\beta_{10-35}$ из 26-ти аминокислотных остатков полученных 15 расстояний было недостаточно. Поэтому для повышения качества расчетов структуры исследуемого пептида было решено использовать методику, основанную на анализе констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия. Однако, так же как и в случае с $A\beta_{16-22}$ и $A\beta_{13-23}$ для $A\beta_{10-35}$, небольшого числа экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{10-35}$ так же соответствует случайному клубку.

Таблица 3. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$A\beta_{10-35}$
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	151
Внутриостаточные	81
Последовательные ($ i-j =1$)	44
Среднего диапазона ($1 < i-j < 4$)	26
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
3_{10} -спиральный регион 13-19	0,70±0,24

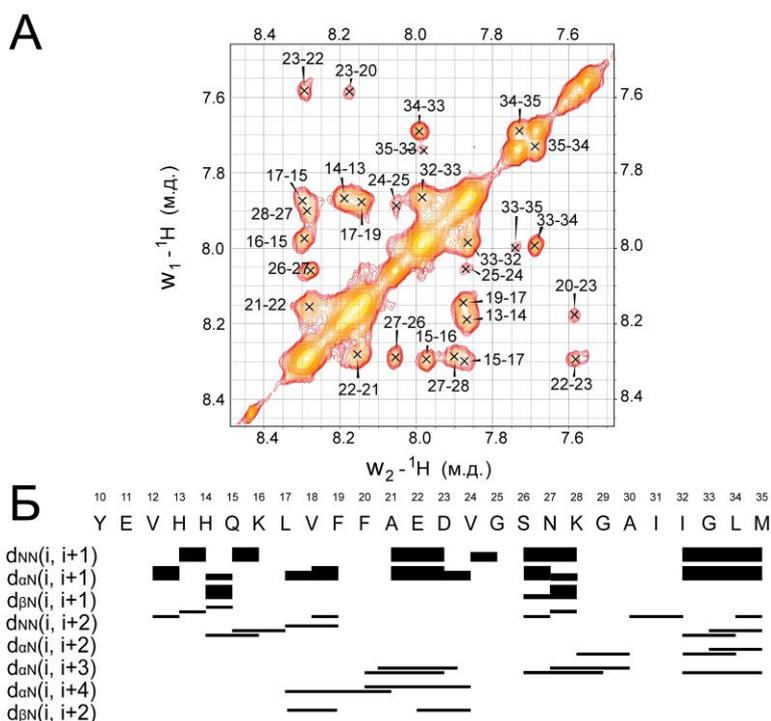


Рисунок 8. А) Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. Б) Межпротонные контакты ЯЭО для $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе с мицеллами ДСН. Часть ЯЭО контактов не приведена вследствие перекрытия и уширения сигналов.

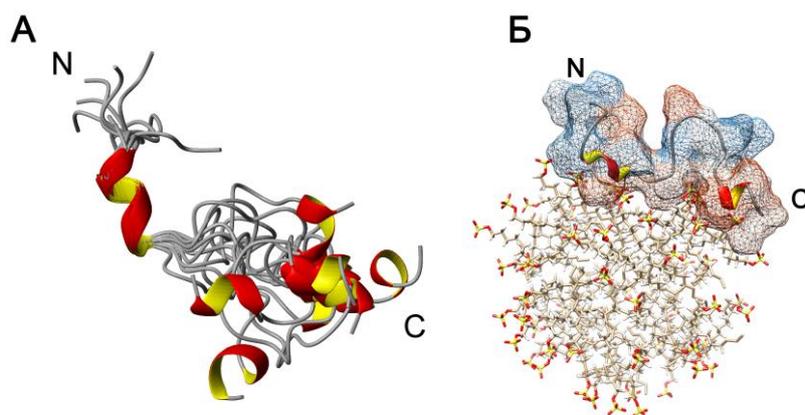


Рисунок 9. А) Структура пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ – мицелла на основе ДСН.

Как говорилось ранее, особое значение для биохимических исследований представляет структура $\text{A}\beta$ пептидов в комплексе с модельными биологическими мембранами. По аналогичной методике, как это было показано для $\text{A}\beta_{13-23}$ и $\text{A}\beta_{16-22}$, $\text{A}\beta_{10-35}$ был растворен в растворе с мицеллами ДСН. В отличие от NOESY спектров ЯМР $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе, в растворе с мицеллами ДСН наблюдалось большое количество ЯЭО контактов, как между протонами внутри аминокислотных остатков, так и между различными аминокислотными остатками (Рис.8). Большое количество ЯЭО контактов среднего диапазона позволяет рассчитать методом молекулярной динамики 3D структуру пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе с мицеллами ДСН. (Рис.9А). Для данного пептида в растворе с

мицеллами ДСН наблюдалось наличие двух областей со спиральной конформацией на участках от Н13 до F19 и от G29 до M35. Также на данных участках наблюдались две гидрофобные области. Повторяя все аналогичные процедуры, что и для предыдущих пептидов в растворе с мицеллами ДСН, была определена структура комплекса «пептид $A\beta_{10-35}$ – мицелла ДСН» (Рис.9Б). Таким образом, определено, что пептид $A\beta_{10-35}$ взаимодействует с поверхностью мицеллы двумя областями, в которые входят аминокислотные остатки 13-19 и 29-35. Известно, что область $A\beta$ пептида с V12 по D23 аминокислотные остатки является сайтом связывания для холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (ABAD), а также область аминокислотной последовательности с I31 по M35 обладает высокой степенью сродства к энзимам и каталазам [4]. Таким образом, взаимодействие пептида $A\beta_{10-35}$ с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, которые нарушают работу мембран нейронов.

Структура пептида $A\beta_{1-40}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. На основе экспериментально полученных структур $A\beta$ пептидов в растворе с мицеллами ДСН нами было установлено, что $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$ и $A\beta_{10-35}$ образуют комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 13-20 и 29-35), а так же что, взаимодействие пептида с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20. Полученные результаты позволяют подойти к изучению структуры в растворе и в комплексе с модельными мембранами полноразмерного пептида $A\beta_{1-40}$. Пептид $A\beta_{1-40}$ растворялся в 20 мМ фосфатном буфере при рН=7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D 1H - 1H TOCSY и 1H - 1H NOESY методик.

Таблица 4. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$A\beta_{1-40}$	
	р-р (рН=7,3)	ДСН
Всего ЯЭО контактов	34	57
Внутриостаточные	4	44
Последовательные ($ i-j =1$)	26	7
Среднего диапазона ($1< i-j <4$)	3	5
Дальнего диапазона ($ i-j >4$)	1	1
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур		
3_{10} -спиральный регион 13-23	1,17±0,35	1,15±0,40
3_{10} -спиральный регион 35-40		0,91±0,36

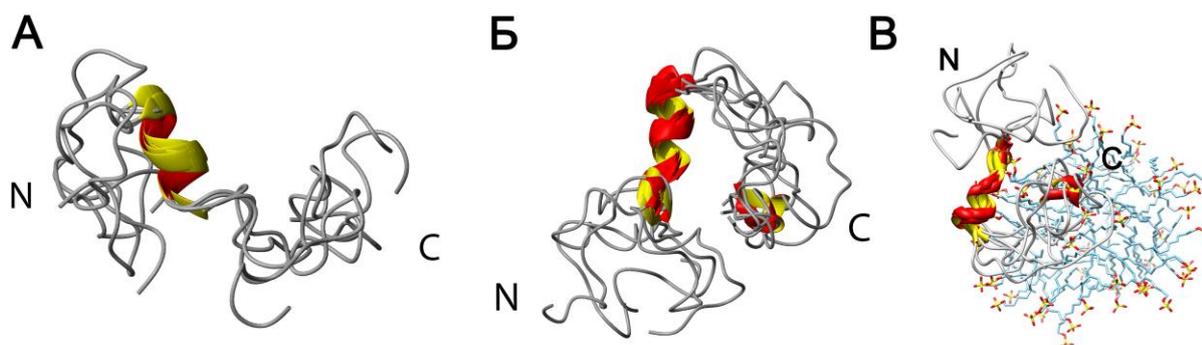


Рисунок 10. А) Структура $A\beta_{1-40}$ в 20 мМ фосфатном буфере при $pH = 7,3$, 293 К. Б) Структура $A\beta_{1-40}$ в водном растворе (90% $H_2O + 10\% D_2O$) с мицеллами ДСН. В) Строение комплекса « $A\beta_{1-40}$ – мицелла на основе ДСН».

Для определения межпротонных расстояний, напрямую характеризующих пространственную геометрию пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе, записывались 2D NOESY спектры ЯМР с вариацией времени смешивания τ_m (75, 100, 120, 200 мс). Наблюдались кросс-пики в 2D $^1H-^1H$ NOESY спектрах ЯМР между сигналами протонов исследуемого соединения, относящихся к различным аминокислотным остаткам. С целью определения пространственного строения пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе, были проведены расчеты по методу молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH. В качестве исходных экспериментальных данных использовали межпротонные расстояния, полученные из анализа интенсивностей кросс-пиков ЯМР NOESY спектров. Было рассчитано 1000 структур и выбрано 10 с минимальной энергией (Рис.10А). Анализируя полученные данные можно установить, что существует упорядоченная структура со стороны аминного конца, также присутствует вторичная структура на участке с 13 по 23 аминокислотный остаток. Полученные результаты также согласуются с другими исследованиями $A\beta$ пептидов.

Согласно работе [4] $A\beta_{1-40}$ образует комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35). В указанной работе использовался подход, основанный на использовании парамагнитных агентов в экспериментах ЯМР. В растворе ДСН в структуре $A\beta_{1-40}$ наблюдались две альфа-спирали состоящие из аминокислотных остатков 15–24 и 29–35, окруженных подвижными неупорядоченными участками. В качестве результата данных исследований авторы построили схематическое изображение комплекса «пептид– мицелла ДСН» В рамках нашей работы с помощью спектроскопии 2D $^1H-^1H$ NOESY исследован комплекс « $A\beta_{1-40}$ – мицелла ДСН» и определена структура данного комплекса. По аналогичной методике, как это было показано для $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{16-22}$ и $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{1-40}$ был растворен в растворе с мицеллами ДСН. На основе экспериментально определенных межпротонных расстояний из 2D $^1H-^1H$ NOESY спектров (Рис.11) была рассчитана структура пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе с мицеллами ДСН (Рис.10Б).

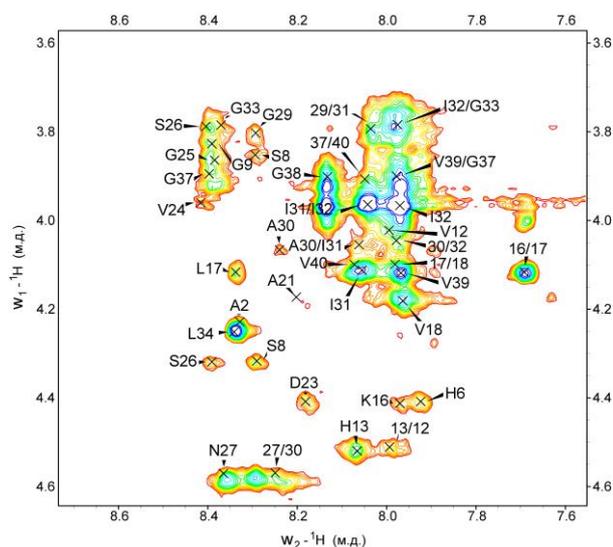


Рисунок 11. Область ^1H - ^1H NOESY спектра ЯМР $\text{A}\beta_{1-40}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К.

На основе полученных экспериментальных данных, было установлено наличие структурных различий для пептида в буферном растворе и для пептида находящимся в комплексе с модельной мембраной, а так же наблюдались изменения химических сдвигов у протонов различных аминокислотных остатков. Это обусловлено тем, что вследствие взаимодействия аминокислотных остатков пептида с электроотрицательно заряженной поверхностью мицеллы произошло изменение конформации пептида. На основе этих данных была построена модель исследуемого комплекса (Рис.10В). Как и предполагалось в работе [4], $\text{A}\beta_{1-40}$ образует комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35). Сравнивая полученную структуру $\text{A}\beta_{1-40}$ в растворе с мицеллами ДСН со структурами $\text{A}\beta_{16-22}$, $\text{A}\beta_{13-23}$, $\text{A}\beta_{10-35}$ в этом же растворе, наблюдается хорошее соответствие полученных структур. Таким образом, для $\text{A}\beta$ пептидов было установлено, что в процессе комплексообразования пептида с мицеллой важную роль играют аминокислотные остатки 17-20 и 29-35.

Структура пептида arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. E22G точечная «арктическая» мутация» пептида $\text{A}\beta_{1-40}$ (arc- $\text{A}\beta_{1-40}$) и $\text{A}\beta_{1-42}$ (arc- $\text{A}\beta_{1-42}$) является редкой мутацией обнаруженной у нескольких семей в северной Швеции. Данная мутация приводит к развитию болезни Альцгеймера в более раннем возрасте (52-57 лет). Арктическая мутация ПБА, на сегодняшний день, является единственной известной мутацией внутри β -амилоида, которая обладает более типично выраженной клинической картиной болезни Альцгеймера.

Пептид arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) обладает большими скоростями агрегации в растворе, что накладывает ограничения на время экспериментов ЯМР, поэтому в рамках нашей работы был исследован arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН, т.к. в данном растворе агрегация не наблюдалась в течение трех дней.

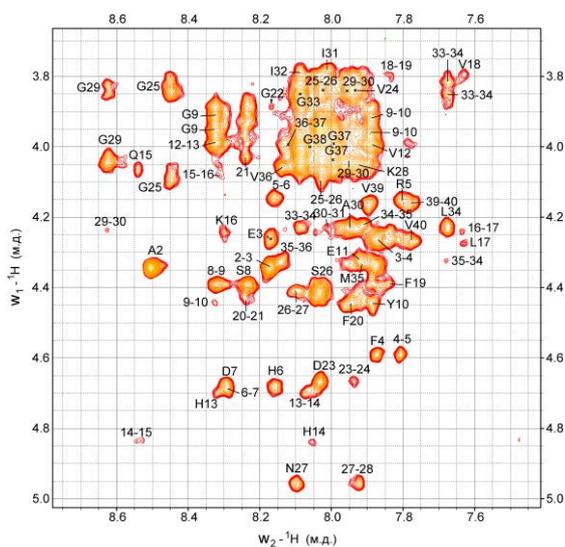


Рисунок 12. Область ^1H - ^1H NOESY спектра ЯМР (500 МГц) arc-A β_{1-40} (E22G) в водном растворе (90% H₂O + 10% D₂O) с мицеллами ДСН. Время смешивания $t_m=0.5$ с.

Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY методик. В отличие от ^1H - ^1H NOESY спектров ЯМР для A β_{1-40} в растворе с мицеллами ДСН для «арктической» мутации данного пептида наблюдалось существенное увеличение количества ЯЭО контактов (Рис.12, 13). Это является свидетельством того, что структура данного пептида является более упорядоченной.

Также, для arc-A β_{1-40} (E22G) в 100% растворе D₂O наблюдались сигналы некоторых амидных протонов аминокислотных остатков, что указывает на замедленный обмен протонов на дейтерий для данных групп (Рис.13). На основе полученных данных можно предположить, что указанные амидные протоны участвуют в образовании водородных связей и образуют вторичную структуру пептида.

Таблица 5. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	arc-A β_{1-40} (E22G)
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	373
Внутриостаточные	224
Последовательные ($ i-j =1$)	107
Среднего диапазона ($1< i-j <4$)	38
Дальнего диапазона ($ i-j >4$)	4
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
регион 9-35	1.15±0.40

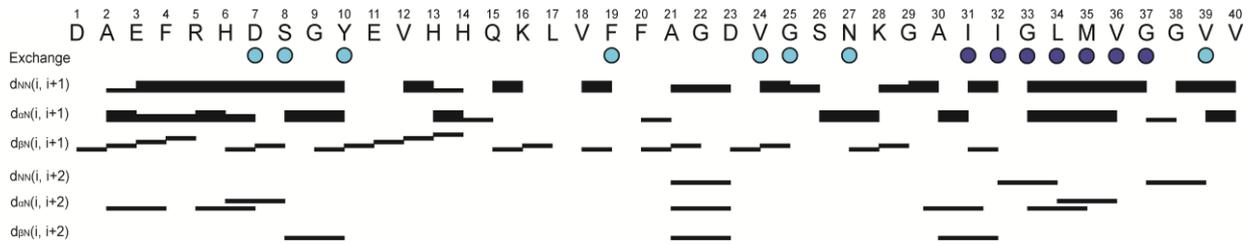


Рисунок 13. Межпротонные контакты ЯЭО для arc-A β ₁₋₄₀ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. Часть ЯЭО контактов не приведена вследствие перекрытия и уширения сигналов; светлыми кружками отмечены амидные протоны с замедленным обменом протонов на дейтерий в 100% растворе D₂O (менее 2 часов), темными кружками отмечены амидные протоны, для которых обмен протонов на дейтерий происходил более 24 часов.

Экспериментально полученные межпротонные расстояния использовались как входные данные для расчетов в программе XPLOR-NIH. Было рассчитано 1000 структур и выбрано 10 с минимальной энергией (Рис.14А). В отличие от пептида A β ₁₋₄₀ в растворе ДСН, в структуре arc-A β ₁₋₄₀ (E22G) присутствовал только один β ₁₀-спиральный регион (аминокислотные остатки 30-35). К тому же на данном участке присутствовала гидрофобная область, и аналогично предыдущим рассуждениям для A β пептидов, была построена модель комплекса пептида arc-A β ₁₋₄₀ (E22G) с мицеллой ДСН (Рис.14Б).

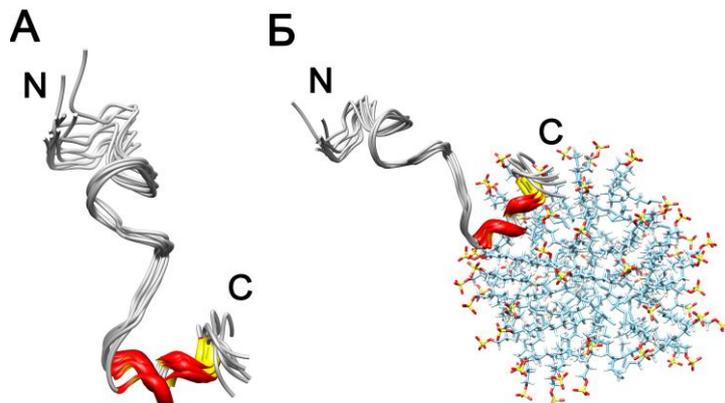


Рисунок 14. А) Структура пептида arc-A β ₁₋₄₀(E22G) в водном растворе (90% H₂O + 10% D₂O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «пептид arc-A β ₁₋₄₀(E22G) – мицелла на основе ДСН».

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На основе экспериментальных данных двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов ЯМР и теоретического моделирования молекулярной структуры (с использованием программы XPLOR-NIH) определены конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) пептидов A β ₁₋₄₀, arc-A β ₁₋₄₀ (E22G), A β ₁₀₋₃₅, A β ₁₃₋₂₃, A β ₁₆₋₂₂ с нативным содержанием изотопов и их комплексов с модельными биологическими мембранами в растворе.

2. Установлено наличие вторичной структуры в виде 3_{10} -спирали в растворе с мицеллами ДСН для пептидов $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{10-35}$ и *arg*- $A\beta_{1-40}$ (E22G).
3. Определено положение $A\beta$ пептидов на поверхности мицеллы ДСН, предложена модель комплекса «пептид-поверхность мицеллы». Установлено, что процесс комплексообразования пептида с мицеллой происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29-M35.
4. Впервые установлена пространственная структура пептида *arg*- $A\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе ДСН. Установлено, что точечная мутация в аминокислотной последовательности в позиции E22 ведет к изменению во вторичной структуре пептида в области с 13 по 23 аминокислотного остатка, и к тому, что данная область перестает участвовать в процессе комплексообразования пептида с мицеллой ДСН.
5. Полученные данные о пространственном строении $A\beta$ пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула бета-амилоида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки. Взаимодействие $A\beta$ пептидов с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, нарушающих работу мембран нейронов.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balbach J. J. Amyloid fibril formation by A beta(16-22), a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR / J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, R. Tycko // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39, № 45. – P. 13748-13759.
2. Rodziewicz-Motowidlo S. The Arctic mutation alters helix length and type in the 11-28 beta-amyloid peptide monomer-CD, NMR and MD studies in an SDS micelle / S. Rodziewicz-Motowidlo, P. Czaplewska, E. Sikorska, M. Spodzieja, A. S. Kolodziejczyk // *Journal of Structural Biology*. – 2008. – V. 164, № 2. – P. 199-209.
3. Rauk A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? / A. Rauk // *Dalton Transactions*. – 2008. – V. 10. – P. 1273-1282.
4. Jarvet J. Positioning of the Alzheimer A beta(1-40) peptide in SDS micelles using NMR and paramagnetic probes / J. Jarvet, J. Danielsson, P. Damberg, M. Oleszczuk, A. Graeslund // *Journal of Biomolecular Nmr*. – 2007. – V. 39, № 1. – P. 63-72.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Усачев, К.С.** Пространственное строение гептапептида $A\beta_{16-22}$ в растворе и комплексе гептапептид – модель биологической мембраны. / К.С. Усачев, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, О.Н. Анцуткин, С. Афонин, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. – 2011. – Т. 153, кн. 3. – С. 91-106.
2. **Usachev, K.S.** Spatial structure of heptapeptide $A\beta_{16-22}$ (beta-amyloid $A\beta_{1-40}$ active fragment) in solution and in complex with a biological membrane model / K.S. Usachev, S.V. Efimov, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, S. Afonin, V.V. Klochkov // Magnetic Resonance in Chemistry – 2012. – V. 50, № 12. – P. 779-834.
3. **Usachev, K.S.** Spatial structure of beta-amyloid $A\beta_{1-40}$ in complex with a biological membrane model / K.S. Usachev, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // Advances in Alzheimer's Disease – 2012. – V. 1, № 3. – P. 22-29.
4. **Usachev, K.S.** Solution structures of Alzheimer's amyloid $A\beta_{13-23}$ peptide: NMR studies in solution and in SDS / K.S. Usachev, A.V. Filippov, E.A. Filippova, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // Journal of Molecular Structure. – 2013. – №. 1049. – P. 436-440.
5. **Usachev, K.S.** Use of a combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy to determine the structure of Alzheimer's amyloid $A\beta_{10-35}$ peptide in solution and in SDS micelles/ K.S. Usachev, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // European Biophysics Journal – 2013. – V. 42. – P. 1-8. – doi: 10.1007/s00249-013-0928-7.
6. **Усачев, К.С.** Определение структуры бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ (активного фрагмента бета-амилоида $A\beta_{1-40}$) в растворе методами ЯМР спектроскопии и анализ констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия / К.С. Усачев, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань, 2011, 141 с.
7. Блохин, Д.С. Пространственное строение некоторых олигопептидов в растворе и комплексе: олигопептид – модель биологической мембраны / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, И.З. Рахматуллин, **К.С. Усачев**, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань, 2011, 141 с.
8. Блохин, Д.С. Пространственное строение некоторых олигопептидов в растворе и комплексе: олигопептид – модель биологической мембраны / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, И.З. Рахматуллин, **К.С. Усачев**, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов III Региональной научно-практической конференции с международным участием «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений», Казань, 2011, 32 с.

