

**Сведения о ходе выполнения проекта
по Соглашению №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (6 этап)
(Руководитель проекта – доктор физико-математических наук
Новикова Наталья Николаевна)**

В ходе выполнения проекта «Разработка научных основ применения рентгеновских лазеров на свободных электронах для биологических исследований» по Соглашению о предоставлении субсидии №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI61614X0003) с Министерством образования и науки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» на этапе № 6 в период с 1 января по 31 декабря 2017 года выполнялись следующие работы:

- Проведен анализ и подготовка полученных препаратов ESR/ЛБН для структурных исследований. Проведены исследования полученных препаратов.
- Проведен анализ и подготовка полученных препаратов рекомбинантного бактериородопсина *halobacterium salinarum* для изучения структуры. Проведены исследования полученных препаратов.
- Проведен анализ и подготовка полученных препаратов рекомбинантного родопсина для изучения структуры. Проведены исследования полученные препараты.
- Смоделированы и проведены численные эксперименты по влиянию условий ориентации макромолекулярных и надмолекулярных объектов с использованием оптических методов на структуру и динамику макромолекулярных объектов.
- Проведен анализ характеристик и проведение работ по усовершенствованию экспериментальной схемы для манипулирования и удержания микро- и нано частиц с применением лазеров
- Проведены FRAP-эксперименты с конструкциями CysLT1.
- Проведены кристаллизационные *in meso* эксперименты конструкций CysLT1.

- Исследовано влияние дополнительных частиц (примесь) на дифракционную картину. Исследована множественная дифракция молекул разного типа. Разработан алгоритм определения типа и соотношения количества различных молекул, при множественной дифракции. Определены критерии схожести/различий типов частиц, так же необходимого разрешения дифракционной картины для корректного решения.
- Осуществлен сбор дифракционных данных от полученных образцов кристаллов архитектурных белков *D. Melanogaster* и/или их структурных доменов.
- Получены нанокристаллы комплекса архитектурных белков и/или исследование структуры этого комплекса методом малоуглового рентгеновского рассеяния.
- Осуществлен сбор дифракционных данных от полученных образцов кристаллов ДНК-связывающих HU-белков паразитических микроорганизмов и/или их комплексов с ДНК.
- Проведено обобщение и оценка работ по методам пробоподготовки биологических объектов для исследования с использованием рентгеновских лазеров
- Проведено обобщение и оценка работ по методам манипулирования и удержания микро- и наночастиц
- Проведено обобщение и оценка работ по методам молекулярного моделирования биологических объектов в условиях проведения экспериментов на XFEL.
- Проведено обобщение и оценка разработке методов получения кристаллов мембранных белков нанометрового размера.
- Разработана самообучаемая информационная система для анализа дифракционных изображений, для широкого применения. Выполнена интеграция алгоритмов в единый код с поддержкой автоматического анализа, фильтрации, кластеризации дифракционных изображений. Разработанные алгоритмы оформлены в виде самостоятельного программного продукта. Проведено тестирование алгоритмов на модельных картах.

Иностранным партнером проведена подготовка выделенных в препаративных количествах различных родопсинов (бактериородопсина, чанелродопсина, сенсорного родопсина), встроенных в наночастицы, в первую очередь в нанодиски и липодиски, для структурных исследований, осуществлено тестирование оборудования для введения образца в пучок на примере микрокристаллов N-домена TERT, отработаны условия и протоколы проведения эксперимента, выполнено обобщение и оценка перспектив использования различных родопсинов, встроенных в нанодиски и липодиски для демонстрации эффектов удержания и манипуляции оптическими методами при структурных исследованиях.

На шестом этапе к выполнению работ в качестве соисполнителей были привлечены Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук и Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования "Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова"

Основными результатами, полученными на данном этапе работ в рамках Соглашения о предоставлении субсидии, являются разработанные методики, получения кристаллов нанометрового размера для CysLT1, методика вычислительных экспериментов для моделирования и отбора структур, методика экспрессии и очистки не менее 10 архитектурных белков *D. Melanogaster* и/или их структурных доменов, участвующих в формировании инсуляторных комплексов, протоколы моделирования влияния условий ориентации на структуру и динамику макромолекулярных объектов.

На завершающем этапе работ по проекту разработана эскизная программная документация самообучаемой информационной системы для анализа дифракционных изображений. Перечисленные методики представлены в виде самостоятельной части отчетной документации.

Новизна научных решений на данном этапе работы состоит в том, что на примере бактериородопсина, экспрессированного в *E. coli*, образцам, полученным из *H. Salinarum*, и надмолекулярного объекта – тримера бактериородопсина, было установлено, что электрическое поле практически не влияет на структуру и динамику макромолекулы, но способно достаточно сильно изменять кинетику, связанную с переносом зарядов или перераспределением электронной плотности. Следовательно, при экспериментальном изучении такого типа процессов и

использовании оптического пинцета, необходимо вводить поправки, которые должны быть предварительно оценены методами молекулярного моделирования.

Впервые проведен сбор дифракционных данных для полученных кристаллов ВТВ-доменов белков CP190 и Mod(mdg4), кристаллов комплекса олигонуклеотида с HU-белками Spt и HUMgal. Впервые получены нанокристаллы комплекса двух архитектурных белков - ВТВ-домена белка CP190 и С-концевого домена белка CTCF.

Выработаны правила выбора объектива/объективов экспериментальной системы, которые обеспечивают устойчивый оптический захват частиц с разными физическими свойствами; построены векторные карты сил, формирующих оптическую ловушку; изучено влияние параметров лазерного излучения на жесткость оптической ловушки и предельно возможной скорости захватываемых частиц. Экспериментально продемонстрированы оптический захват и устойчивая левитация частиц в течении длительного времени. Проанализированы различные конфигурации макета, обеспечивающие доставку микрочастиц в зону оптической ловушки. Изучены факторы, влияющие на эффективность отрыва микрочастиц от подложки: физико-химические свойства микрочастиц, способы подготовки поверхности, условия среды. Разработаны протоколы и экспериментально продемонстрировано катапультирование микрочастиц с подложки и доставки микрочастиц в оптическую ловушку: с помощью пьезокерамических элементов разных конфигураций; с помощью ультракоротких лазерных импульсов.

Полученные результаты полностью соответствуют пункту 6 «Проведение модельных экспериментальных исследований. Обобщение и оценка результатов исследований» Плана-графика исполнения обязательств при выполнении научных исследований (проекта) (Приложение 2 Соглашения о предоставлении субсидии 14.616.21.0003 от 17.09.2014 г.)

Научно-технические результаты, полученные в результате выполнения пятого этапа проекта, в целом соответствуют уровню отечественных и зарубежных передовых и перспективных разработок, что было подтверждено при проведении патентных исследований на этапе 1 Соглашения 14.616.21.0003 от 17.09.2014 г. «Выбор направления исследований», в ходе которых был проведён анализ патентов и заявок на изобретения и полезные модели, а также анализ научно-технической документации Российской Федерации, и ведущих в области высоких технологий

стран - США, Германии, Великобритании, Франции, Швейцарии, Японии, Кореи, Китая, Австралии, Бельгии.

На этапе № 6 была разработана программа для ЭВМ "Программа для сборки и анализа корреляций двугранных углов полипептидных структур" (подана заявка на регистрацию в ФИПС №2016000047 от 19.01.2017, получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2017616699 от 10 июня 2017 года), а также программа для ЭВМ "ConvNet classifier for CXDI data" (подана заявка 2017662468 от 01.12.2017).

Все задачи этапа работ №6 выполнены в полном объеме и в соответствии с Планом-графиком исполнения обязательств и Техническим заданием Соглашения о предоставлении субсидий №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года.
