

**Сведения о ходе выполнения проекта  
по Соглашению №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (3 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 № 3 в период с 1 июля по 31 декабря 2015 года выполнялись следующие работы:

На третьем этапе выполнения Соглашения разработаны экспериментальные и теоретические методы исследования выбранных ранее объектов. В частности, получены ЛБН в препаративных количествах, охарактеризованы физико-химические свойства ЛБН, получены липид-белковые фоторецепторные нанодиски, содержащие зрительный белок родопсин из наружных сегментов зрительных клеток сетчатки глаза в препаративных количествах.

Рассчитаны динамические траектории отобранных молекулярных объектов.

Проведены сборка и тестирование экспериментальной схемы манипулятора микро и нано-частиц с применением лазера.

Проведена экспрессия в *E.coli* и очистка мембранного белка бактериородопсина *Halobacterium salinarum* в количествах, необходимых для проведения кристаллизационных тестов при исследовании закономерности кристаллизации *in meso*. Проведены аналитические исследования для разработки генетических конструкций мембранного белка CysLT1. Проведена серия генно-инженерных работ по получению серии генноинженерных конструкций с CysLT1. Исследована связь пространственной структуры макромолекул и различных элементов дифракционной картины. Оптимизирован метод кластеризации изображения. Развёрнута первая очередь комплекса для хранения, обработки и анализа данных XFEL, доработаны и установлены программные компоненты для анализа экспериментальных данных. В качестве базовых программных средств были использованы разработанные алгоритмы для классификации дифракционных изображений, а также для моделирования рассеяния лазерного импульса на отдельных молекулах.

Набор методов был реализован с помощью языка программирования Python и развёрнут в виде тестового макета на Курчатовском центре коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных от исследовательских установок мега-класса».

Программные компоненты для анализа данных были валидированы на экспериментальных данных, полученных на установке LCLS (Stanford)

Выбранные участки гена TERT *O. Polymorpha* клонированы, произведена их экспрессия в *E.coli*, и отобраны фрагменты, экспрессируемые в растворимой форме. Получены экспериментальные образцы ВТВ-домена белка CP190 и N- и C-концевых доменов белка CTCF. На основе проведенных исследований разработаны методики: методика получения кристаллов N-домена TERT

субмикро- и микрометрового размера, методика экспрессии и очистки новых фрагментов TERT O. Polymorpha, методика получения липид-белковых нанодисков, методика генерации динамических траекторий для отобранных молекулярных объектов.

Проведена экспрессия в E.coli и очистка архитектурных белков D. Melanogaster и их структурных доменов, участвующих в формировании инсуляторных комплексов. Получение ряда исследуемых белков в количествах, необходимых для работ по кристаллизации и функциональных исследований.

Осуществлены функциональные исследования Nu-белков паразитических микроорганизмов в части их ДНК связывающей способности и стабильности образующихся ДНК-белковых комплексов. Анализ специфичности NU-белка M. gallisepticum (NUMg) к различным видам поврежденной ДНК, проведенный методом торможения ДНК в геле с использованием синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих различные дефекты спаривания, показал, что при физиологическом значении ионной силы (150мМ NaCl) белок NUMg связывает ДНК, содержащую ошибочное спаривание, по крайней мере, в 100 раз сильнее, чем каноническую дцДНК. Физиологическое значение данного факта чрезвычайно важно, поскольку эти повреждения приводят к летальным мутациям со сдвигом рамки трансляции белка. Соответственно, можно предположить, что NUMg является основным белком M.gallisepticum, связывающим ДНК с ошибочными спариваниями.

Основными результатами, полученными на текущем этапе работ в рамках Соглашения о предоставлении субсидии, являются методические решения, связанные с получением различных белков и комплексов молекул. Полученные объекты исследовались большим количеством физических методов для характеристики их структуры и свойств.

Размер ЛБН, определенный с помощью калибровочных прямых, соответствует примерно 113-115 Å, что удовлетворяет техническим требованиям Соглашения.

Полученные микрокристаллы N-домена TERT O. polymorpha по размерному ряду соответствуют модельным образцам для тестов системы введения биообъектов в пучок.

Полученные фоторецепторные диски из наружных сегментов палочек сетчатки глаза находятся в темновом состоянии, Полученные образцы детергентных мицелл из этих дисков содержат максимально нативный зрительный родопсин, спектральный критерий чистоты которого соответствует принятым стандартам.

Новизна научных решений на данном этапе работы состоит в большом количестве разработанных и оптимизированных методических решений, связанных в первую очередь с получением различных химерных белков. Подобраны условия экспрессии и очистки делеционных мутантов TERT O.polymorpha, а также получения гомогенных по размеру субмикро- и микрокристаллов TEN-домена ор-TERT. Впервые были экспрессированы в E.coli и получены гомогенные препараты следующих химерных белков: ВТВ-домен белков CP190 и Mod(mdg4), ZAD-домены белков Serendipity-d, CG6654, CG7928, Pita, N-концевой домен белка CTCF, С-концевой домен белка CTCF (610-774, 670-774, 705-774), ZAD-домен белка Zw5, Белок CLAMP.

Кроме того, на данном были подобраны условия получения гомогенного и стабильного препарата нанодисков MSP и POPC. Разработан методический подход,

позволяющий получать препарат нанодисков со встроенным в них светочувствительным белковым комплексом сенсорного родопсина и его трансдьюсера (NpSRII/NpHtrII) в миллиграммовых количествах.

Иностранным партнером на настоящем этапе работ был создан метод получения нанолипопротеиновых частиц (нанодисков, НЛП) со встроенным в них светочувствительным белковым комплексом сенсорного родопсина и его трансдьюсера (NpSRII/NpHtrII), выделенным из архейной галобактерии *Natronomonas pharaonis*. Данный методический подход позволяет получать препарат нанодисков в миллиграммовых количествах.

Физико-химические свойства приготовленных в препаративных количествах липодисков и нанодисков были всесторонне изучены. Исследования полученных липодисков показывают, что эти структуры являются монодисперсными наноразмерными носителями для мембранных белков. Размер липодисков может быть измерен с методами динамического светорассеяния, ПЭМ и АСМ. АСМ может использоваться для определения толщины липодисков, но необходимо оптимизировать условия и режим сканирования, чтобы минимизировать воздействие кантилевера на образец.

Гель-проникающая хроматография (SEC) продемонстрировала одиночные пики элюции, свидетельствующие о чистоте полученных препаратов. Стабильность белковых препаратов подтверждается их максимумом поглощения при 500 нм, что характерно для хромофора-ретинала, содержащегося в сенсорном родопсине в его нативном состоянии. Форма и структура собранных нанодисков после очистки с помощью SEC были исследованы с помощью визуализации одиночных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Полученные изображения показали однородные популяции частиц с четко определенными границами дискообразной формы с монодисперсным распределением в размере

Научно-технические результаты, полученные в результате выполнения третьего 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 № 3 получено свидетельство о государственной регистрации на программу для ЭВМ "CDI Center Detection Lib" (Библиотека для определения положения частицы на дифракционных изображениях в экспериментах по когерентной визуализации) № 2015662872 от 04.12.2015.

Полученные результаты полностью соответствуют пункту 3 «Разработка экспериментальных и теоретических методов исследований выбранных объектов» Плана-графика исполнения обязательств при выполнении научных исследований (проекта) (Приложение 2 Соглашения о предоставлении субсидии 14.616.21.0003 от 17.09.2014 г.)