

**Сведения о ходе выполнения проекта
по Соглашению №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (4 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 № 4 в период с 1 января по 30 июня 2016 года выполнялись следующие работы:

На четвертом этапе выполнения Соглашения проводилась разработка методов пробоподготовки и характеристики выбранных на предыдущих этапах объектов. В частности, проведена характеристика физико-химических свойств природных фоторецепторных нанодисков (из глаз быка и лягушки *Rana temporaris*) при помощи метода малоуглового рассеяния нейтронов исследована супрамолекулярная организация фоторецепторной мембраны. Показано, что функциональной единицей родопсина может быть, как его, преимущественно, мономерное, так и димерное состояние. Охарактеризованы физико-химические свойства и фотоцикл полученных препаратов ESR/ЛБН. Отмечена важность упаковки и свойств липидного бислоя для функционирования фотоактивируемого протонного насоса – бактериородопсина.

Оптимизированы процедуры выделения, очистки и ренатурации рекомбинантного бактериородопсина *Halobacterium salinarum* в липид-детергентных системах для проведения кристаллизационных тестов. Отмечено, что улучшению качества кристаллов может послужить удаление полигистидиновой последовательности на С - конце белка.

Разработаны методы моделирования тестовых карт электронной плотности от макромолекулярных и надмолекулярных объектов, в расчетах учтены радиационные повреждения, влияние дополнительного растворителя и кинетики его испарения.

Разработаны способы манипулирования микро- и нано частиц с применением лазеров.

Проведена тестовая экспрессия генноинженерных конструкций CysLT1 в клетках насекомых, проведена оптимизация конструкций.

Проведена тестовая кристаллизационных экспериментов бактериородопсина из *Halobacterium salinarum*, определено влияние солей $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ на кристаллизацию.

Доработан метод классификации в части поиска пространственных особенностей молекул. Исследована зависимость точности алгоритма от геометрии системы, определены практические требования для возможности нахождения корректного решения. Исследовано влияние деформации системы частиц на изменения дифракционной картины.

Разработаны методы ко-экспрессии в *E.coli* компонентов теломеразного комплекса *O. polymorpha*. Подтверждена теломеразная активность полученных

наночастиц, показана важность для функционирования теломеразы в целом корректного расположения доменов в полноразмерной TERT.

Проведена функциональная характеристика выделенных архитектурных белков *D. Melanogaster* и/или их структурных доменов, в том числе установлена их способность к комплексообразованию.

Подобраны условия кристаллизации очищенных ДНК-связывающих HU-белков паразитических микроорганизмов, определено несколько комбинаций условий кристаллизации, при которых наблюдался рост кристаллов гистоноподобных HU белков

Разработаны процедуры выделения, очистки и встраивания различных родопсинов (бактериородопсина, чанелродопсина, сенсорного родопсина) в наночастицы, в первую очередь в нанодиски и липодиски. Был экспрессирован точечный мутант NpSRII-L159R1/NpHtrIII157, и полученный комплекс также включен в нанодиски и липодиски

Проведена физико-химическая характеристика фрагментов TERT, определены условия стабилизации их растворов

Разработаны методики и протоколы проведения экспериментов и теоретической обработки данных

Основными результатами, полученными на текущем этапе работ в рамках Соглашения о предоставлении субсидии, являются разработанные исполнителями проекта следующие методики: методика экспрессии генетических конструкций представителя класса GPCR - CysLT1, методика *in meso* получения кристаллов нанометрового размера для бактериородопсина из *Halobacterium salinarum*, методика получения родопсина из *Exiguobacterium* в мембране ЛБН в бесклеточной системе экспрессии.

На четвертом этапе Соглашения выполнены работы по созданию чертежей первичного эскизного проекта экспериментального образца лазерного манипулятора (эскизная конструкторская документация и перечисленные методики представлены в виде самостоятельной части отчетной документации за четвертый этап)

Новизна научных решений на данном этапе работы состоит в получении фоторецепторных нанодисков и липодисков и исследовании супрамолекулярной организации фоторецепторной мембраны при помощи метода малоуглового рассеяния нейтронов с вариацией контраста. Данная разновидность методики приводит к изменению кривой малоуглового рассеяния и позволяет «выделять» неоднородности исследуемого объекта. Результаты эксперимента показали, что функциональной единицей родопсина может быть, как его, преимущественно, мономерное, так и димерное состояние. Кроме того, путем введения в C-концевую область белка сайта для гидролиза протеазой FXa, была проведена оптимизация генетической конструкции рекомбинантного бактериородопсина для получения белка с улучшенной кристаллизруемостью. Полученная укороченная конструкция будет практически лишена неупорядоченных аминокислот на карбоксильном конце бактериородопсина.

Иностранном партнером на настоящем этапе работ были разработаны процедуры выделения, очистки и встраивания различных родопсинов (бактериородопсин, чанелродопсин, сенсорного родопсина) в наночастицы, в первую очередь, нанодиски и липодиски, проведена экспрессия NpSRII с изменениями на конкретных участках, направленное нитроксильное спин-

индицирование этого мутанта, и включение подготовленного комплекса NpSRII-L159R1/NpHtrII157 в липодиски и нанодиски.

Проведена физико-химическая характеристика фрагментов TERT и осуществлен поиск условий стабилизации их растворов. Основными исследуемыми параметрами являлись а) растворимость, б) отношение полярных и неполярных групп, в) общий электрический заряд молекулы, г) форма и молекулярная масса молекулы. На данном этапе выполнения проекта Иностранным партнером были обнаружены и зафиксированы 2 полипептида, N-25 и N-2 (соответствующие TERT 155-783 и 178-783), стабилизированные в растворе. Показано, что основной движущей силой дестабилизации белков является конформационная энтропия, заряд-заряд взаимодействие и солевые мостики. При этом гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад в обеспечение стабильности белка, образования водородных связей и полярной группы внутри белка. Представленные результаты исследований термодинамики денатурации белка подтверждают, что наличие водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий полярных групп должны внести большой вклад в энтальпию для сворачивания белка.

Научно-технические результаты, полученные в результате выполнения четвертого 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 № 4 не было создано РИД.

Все задачи этапа работ №4 выполнены в полном объеме и в соответствии с Планом-графиком исполнения обязательств и Техническим заданием Соглашения о представлении субсидий №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года. Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.