

**Сведения о ходе выполнения проекта  
по Соглашению №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (5 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 № 5 в период с 1 июня по 31 декабря 2016 года выполнялись следующие работы:

- Нарботаны миллиграммовые количества препарата ESR/ЛБН. Показано, что полученный препарат ESR/ЛБН находился в растворимой и активной форме. Полученный препарат исследовали спектрофотометрически, спектр указывает на высокий уровень ренатурации и чистоту полученного препарата. и рекомбинантного бактериородопсина *Halobacterium salinarum* в составе липид-детергентной системы для физико-химических исследований, был получен препарат рекомбинантного БР в количестве 12 мг в мицеллах DDM для проведения физико-химических исследований. Было показано, что хранение темноадаптированных препаратов БР при +4 °С в течение 1 месяца не сказывается на качество спектров. Препараты БР отличались термостабильностью (нагрев до 40 °С в течение 1 суток). Экспозицию при дневном свете в течение 6 час без изменения спектральных характеристик успешно выдерживали образцы БР в 1%DMPC-1%CHAPS и DDM, однако в мицеллах NG при этих условиях происходило 40%-ное обесцвечивание препарата.
- Разработана методика ко-экспрессии компонентов теломеразного комплекса *O. polymorpha* на основе штамма клеток *E. Coli*, позволяющая нарабатывать одновременно как минимум два компонента теломеразного комплекса. Методика получения минимального теломеразного комплекса *O. polymorpha*

- в *E.coli* позволяет обогащать лизат клеток-продуцентов частицами теломеразного комплекса не менее чем в 5 раз.
- Разработаны методики получения архитектурных белков *D. Melanogaster*, участвующих в формировании инсуляторных комплексов, а также НУ-белков паразитических микроорганизмов, включающие не более 3 стадий очистки. Целевые белки наработаны препаративно (не менее 10 мг каждого). Чистота полученных препаратов по данным ЭФ в ПААГ и/или масс-спектрометрии составляет не менее 95%. Полученные белки стабильны в растворе в концентрации не менее 5 мг/мл. В результате проведенной работы были найдены несколько условий кристаллизации, в которых наблюдался рост кристаллов ДНК-связывающих НУ-белков паразитических микроорганизмов с олигонуклеотидными дуплексами, пригодных для проведения рентгеноструктурного анализа.
  - Рассчитаны тестовые карты электронной плотности для отобранных макромолекулярных и надмолекулярных объектов, разработана методика расчета упомянутых карт. Для каждой системы было построено 30 карт электронной плотности от конфигураций, близких к начальной. Проведён анализ дифракционных изображений, которые содержат дифракционную картину нескольких частиц одного типа. Был изучен подход к восстановлению структуры одиночной частицы на основе исследуемых дифракционных изображений. Исследованы преимущества и недостатки предложенного подхода. Определены рекомендации для восстановления структуры одиночных частиц на основе дифракционных изображений в экспериментах на лазерах на свободных электронах.
  - Полученные наборы тестовых карт электронной плотности были усреднены и сохранены в итоговые карты высокого разрешения для молекулярной структуры канального родопсина и надмолекулярной структуры родопсина в мембране РОРС. Полученные карты высокого разрешения были огрублены при помощи фильтра Гаусса с ядром 1.5 Å
  - Разработана методика очистки генетических конструкций представителя класса GPCR - CysLT1 и проведены процедуры очистки различных конструкций CysLT1. Методом иммуноблоттинга определялось наличие

целевого белка, чистота белка анализировалась электрофоретическим методом.

- Разработана методика оценки функциональности генетических конструкций представителя класса GPCR - CysLT1 и проведены функциональные тесты различных конструкций CysLT1. Для CysLT1 были проанализированы генетические конструкции, протестированы 6 коммерчески доступных лигандов, апробированы 3 варианта мицелл детергента, проанализированы концентрации солей, имидазола, глицерина, буферные системы, объемы промывочных буферов, а также обработка ферментами, осуществляющими дегликозилирование белка и удаление N-концевых тагов. Был разработан протокол, при котором из литра культуры выделяется 0,4 мг чистого белка в мономерном состоянии с температурой плавления, близкой к 70 °С.
- Произведена препаративная наработка выбранных фрагментов TERT. Произведен скрининг условий получения микрокристаллов. Полученная методом классического дифракционного анализа структура орTEN в дальнейшем может служить референсной точкой для валидации данных, полученных с микрокристаллов орTEN методом XFEL.
- Отработаны методы оценки функционального состояния с помощью оптической и ЭСР спектроскопии выделенных в препаративных количествах различных родопсинов (бактериородопсина, чанелродопсина, сенсорного родопсина) после их встраивания в наночастицы, в первую очередь в нанодиски и липодиски.
- Проведена характеристика образцов микрокристаллов N- домена TERT и наночастиц теломеразного комплекса.

Иностранном партнером отработаны методы оценки функционального состояния с помощью оптической и ЭСР спектроскопии выделенных в препаративных количествах различных родопсинов (бактериородопсина, чанелродопсина, сенсорного родопсина) после их встраивания в наночастицы, в первую очередь в нанодиски и липодиски, а также осуществлена характеристика образцов микрокристаллов N- домена TERT и наночастиц теломеразного комплекса.

На пятом 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, наработанные препаративные количества препаратов ЛБН, выбранных фрагментов TERT и рекомбинантного бактериородопсина. Выполнен скрининг условий получения кристаллов архитектурных белков D.Melanogaster и/или их структурных доменов. Осуществлен подбор олигонуклеотидных дуплексов, моделирующих ДНК, связывающихся с NU-белками. Проведены работы по подбору условий кристаллизации комплексов NU-белков с олигонуклеотидными дуплексами. Нарботанные на данном этапе препараты белка и разработанные методики и протоколы позволят на следующем, шестом, этапе работ перейти к подготовке полученных препаратов к структурным исследованиям.

Новизна научных решений на данном этапе работы состоит в разработанной методике ко-экспрессии компонентов теломеразного комплекса O.polymorpha на основе штамма клеток E. Coli, позволяющей нарабатывать одновременно как минимум два компонента теломеразного комплекса, а также в разработанной методике получения минимального теломеразного комплекса O. polymorpha в E.coli, которая позволяет обогащать лизат клеток-продуцентов частицами теломеразного комплекса не менее чем в 5 раз.

Полученные результаты полностью соответствуют пункту 5 «Разработка методик и протоколов проведения экспериментов и теоретической обработки данных» 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 № 5 была разработана программа для ЭВМ "Программа для сборки и анализа корреляций двугранных углов полипептидных структур", свидетельство №2017616699 от 10.06.2017.

Все задачи этапа работ №5 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. Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.