

**Сведения о ходе выполнения проекта
по Соглашению №14.616.21.0003 от 17 сентября 2014 года (2 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 № 2 в период с 1 января по 30 июня 2015 года выполнялись следующие работы:

На втором этапе выполнения Соглашения проведены теоретические исследования поставленных перед ПНИ научных задач, а также выбор объектов исследований. В частности, проведена оптимизация получения липид-белковых нанодисков (ЛБН) для бесклеточной продукции мембранных белков. В рамках выполнения проекта была проведена оптимизация условий ферментации штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28a/MSP для высокоэффективной продукции MSP. В результате наилучшими условиями, обеспечивающими наибольший выход MSP, были выбраны следующие условия: ферментер, содержание кислорода не ниже 30%, перемешивание от 500 до 1000 об/мин, температура 37 °С до индукции и 28 °С после индукции, поток воздуха 1 л/мин, питательная среда ТВ, концентрация индуктора ИПТГ 1 мМ. Конечный выход целевого белка при оптимальных условиях составил 300-400 мг/л бактериальной культуры.

Разработаны протоколы моделирования отобранных макромолекулярных и надмолекулярных объектов. Протокол разработан для моделирования в программе GROMACS в связке с программой VMD. Протокол включает в себя три стадии: сборка системы, релаксация системы и моделирование дегидратации системы.

Для захвата и эффективного охлаждения поступательных степеней свободы частицы в вакууме проведена разработка экспериментальной схемы манипулятора микро- и нано частиц с применением лазеров. Предложена оригинальная реализация алгоритма захвата и охлаждения схемы манипулятора, проведено моделирование электромагнитного поля внутри и вблизи диэлектрического микрошарика, проведено численное моделирование экспериментальной схемы манипулятора микро и наночастиц с фотодиодной системой регистрации.

На основании проведенного исследования различных подходов к получению рекомбинантных светочувствительных белков и, в частности, бактериородопсина *Halobacterium salinarum* в составе липид-детергентных систем обоснован выбор в качестве объекта бактериородопсина *Halobacterium salinarum*.

Разработан алгоритм кластеризации характеристических векторов для модельных данных по дифракции отдельных макромолекул. На данном этапе работ был предложен алгоритм кластеризации характеристических векторов. В основе алгоритма лежит метод главных компонент (Principal Component Analysis). С

помощью данных моделирования была показана применимость метода для кластеризации дифракционных изображений нано-частиц Adenovirus Capside и белка 2BWT. Вместе с тем при анализе данных с экспериментов LCLS были выявлены недостатки метода и сделаны предложения по дальнейшей доработке с использованием метода опорных векторов. Для последующего экспериментального клонирования были рекомендованы 11 вариантов укороченной последовательности каталитической субъединицы (TERT) теломеразы *O. polymorpha*: CatSmall (443-665); TRBD (153-258), RBD (238-369), TRBD_2 (167-258); C-term (557-776), C-term_3(539-776); N-2 (155-783), N-6 (159-783), N-24 (177-783), N-25 (178-783), -N (224-783). Для аффинной очистки этих белков рекомендовано использовать N-концевой таг, включающий His6-фрагмент, S-таг и сайт протеолиза для TEV протеазы.

Проведена экспрессия и очистка мембранного белка бактериородопсина из *Halobacterium salinarum* в липид-детергентной системе. В результате работы был получен препарат (12 мг) очищенного функционально-активного бактериородопсина, ренатурированного с ретиналем, пригодного для проведения дальнейших структурных исследований в соответствии с планом работы.

Выбраны и клонированы не менее 10 архитектурных белков *D. Melanogaster* и /или их структурных доменов, участвующих в формировании инсуляторных комплексов. На основании обзора литературных данных, проведенного на первом этапе настоящего проекта, для последующей работы были отобраны следующие архитектурные белки *D.Melanogaster* и/или их структурные домены N- и C-концевые домены белка CTCF

Б) ZAD-домены белков CG6654, Zw5, Serenditipy-d

В) ВТВ-домен белков CP190, GAF и Tramtrak

Г) Белок CLAMP

Д) ВТВ-домен белка Mod(mdg4)

Соответствующие гены были успешно клонированы в вектор pET32 под контролем T7 промотора. Полученные результаты создают необходимую основу для последующих работ по созданию штаммов *Escherichia coli* - продуцентов целевых белков и оптимизации условий их экспрессии.

На этапе № 2 получение результатов интеллектуальной деятельности не планировалось.