

**Резюме проекта НИР, выполняемого  
в рамках ФЦП  
«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-  
технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы»  
Итоговое**

**Номер контракта:** № 11.519.11.2002 от «18» августа 2011 г.

**Тема:** «Исследование АТФ – зависимой динамики олигомеризации белков семейства TIR49 на индивидуальных молекулах ДНК»

**Приоритетное направление:** Науки о жизни, Индустрия наносистем

**Критическая технология:** Биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных, Клеточные технологии, Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии, Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств, Нанотехнологии и наноматериалы, Технологии биоинженерии.

**Период выполнения:** С «18» августа 2011 г. по «08» мая 2013 г.

**Плановое финансирование проекта:**

Бюджетные средства – 7,0 млн. руб.,

Внебюджетные средства – 7,0 млн. руб.

**Исполнитель:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» (ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»), г. Санкт-Петербург.

**Ключевые слова:** белки, лазерный пинцет, одномолекулярный уровень, TIR49a/TIR49b, Rvb1/Rvb2, понтин, репин, АТФ, ДНК, субдифракционная флюоресцентная микроскопия, оптическая лазерная ловушка, ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, магнитная ловушка, основы технологии на одномолекулярном уровне.

## **1. Цель исследования, разработки**

1.1 Настоящий проект направлен на решение одной из фундаментальных проблем биологии, состоящей в установлении связи между структурой и функцией жизненно важных белков TIR49, принадлежащих к суперсемейству AAA+ а также на стимулирование развития международных интеграционных процессов в науке и содействие формированию устойчивых кооперационных связей российских и иностранных научно-исследовательских организаций и университетов, направленных на создание технологий, соответствующих мировому уровню, либо превосходящих его, получение международных патентов и привлечение молодых ученых и специалистов к исследованиям в рамках международной кооперации с научно-исследовательскими организациями стран Европейского Союза; выполнение международных обязательств Российской Федерации по развитию научно-технического сотрудничества со странами Европейского Союза.

1.2. Целью реализованного проекта являлось исследование структуры и свойств белков TIR 49 и процессов их взаимодействия с ДНК в *in vitro* условиях. В результате этого исследования получены как результаты фундаментального характера, так и разработаны уникальные молекулярно биологические и одномолекулярные методы и методики характеризации комплексов белок-ДНК и сформулированы основы одномолекулярной технологии необходимой для этих целей.

Разработанная научно-техническая продукция может быть использована для создания

а) основ технологии исследования свойств ДНК связывающих белковых комплексов одномолекулярными методами

б) создания методов и алгоритмов построения белковых комплексов с ДНК.

в) рационального дизайна новых лекарственных препаратов для регуляции белков TIR49a/TIR49b в живых клетках.

д) развития научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области физико-химической молекулярной и клеточной биологии, и повышения квалификации специалистов биохимического и медико-биологического профиля.

## **2. Основные результаты проекта**

*1) Краткое описание основных полученных результатов*

С помощью масс-спектрометрической методики, разработанной на предыдущих этапах, основанной на определении пептидных карт комплексов белка TIR49 с ДНК после ограниченного протеолиза определены сайты связывания TIR49a с двунитовой ДНК. Сравнение полученных данных с аналогичными результатами по поиску сайта связывания белка с однонитовой ДНК показывает, что один из пептидов, а именно 334 – 339, фактически попадает в сайт связывания для обоих типов ДНК.

Выполнены исследования по построению моделей олигомерных комплексов человеческих белков TIR49a/TIR49b отдельно и в комплексе с нуклеотидными кофакторами и ДНК. Впервые показана принципиальная возможность связывания днднк в области центрального канала гексамерного кольца белка и определены наиболее вероятные аминокислотные остатки, которые находятся в прямом контакте с ДНК.

Проведено сравнение с экспериментальными данными, показавшее полное конформационное согласие относительно связывания ДНК с R339 расположенное внутри кольца, а также возможности связывания в доменах Д2 и Д3.

Проведены дополнительные исследования по влиянию нуклеотидных кофакторов на свойства ДНК-белковых комплексов методом оптической ловушки. Результаты экспериментов показали, что в отсутствие АТФ комплекс белок – ДНК либо образуется филамент со своими индивидуальными механобиологическими свойствами, либо происходит разрыв связей между спиральями с образованием однонитовой ДНК, длина которой близка к сумме однонитевых спиралей днднк. В присутствии же АТФ в результате гидролиза филаментная структура разрушается.

Проведены дополнительные патентные исследования и подана заявка на свидетельство о государственной регистрации на программу ЭВМ: Программный комплекс «SeqOPT». Программа «SeqOPT» предназначена для конструирования высокостабильных  $\alpha$ -спиралей мономерных пептидов и глобулярных белков. Программа реализует новый метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей на основе туннельного алгоритма и статистическо-механической модели AGADIR описывающей переходы спираль-клубок в пептидах.

Проведена технико-экономическая оценка результатов НИР и выработаны рекомендации и предложения по использованию ее результатов. Разработан также проект технического задания для проведения последующих НИР и проведено внедрение результатов работы, включая в образовательный процесс.

#### *2) Основные характеристики созданной научной продукции*

Разработанная основа технологии исследования свойств ДНК белковых комплексов с использованием методов оптической и магнитной ловушек позволяет измерять изменения линейных размеров ДНК с нанометровой точностью, силы взаимодействия на уровне долей пиконьютонов и определять наличие однонитевых разрывов.

#### *3) Оценка элементов новизны научных (конструкторских, технологических) решений*

Визуализация комплекса TIR49-ДНК на одномолекулярном уровне позволила выявить наличие участков ДНК с различной эластичностью.

#### *4) Сопоставление с результатами работ, определяющими мировой уровень.*

Впервые наблюдаются и охарактеризованы участки ДНК, связанные с белком TIR49.

### **3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках исследования, разработки**

В ходе выполнения НИР была оформлена заявка на государственную регистрацию программы ЭВМ SEQOPT ("Входящий номер заявки" - № 2013612172 от 22.03.2013). Программа «SeqOPT» предназначена для конструирования высокостабильных  $\alpha$ -спиралей мономерных пептидов и глобулярных белков. Программа реализует новый метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей на основе туннельного алгоритма и статистическо-механической модели AGADIR описывающей переходы спираль-клубок в пептидах.

Также было оформлено ноу-хау на изделие, позволяющее проводить исследование свойств ДНК на одномолекулярном уровне – «Камера для молекулярного комбинга ДНК»

### **4. Назначение и область применения результатов проекта**

Раздел должен содержать:

1) Высоко консервативные белки TIR49a/TIR49b играют важную роль в канцерогенезе человека и являются совершенно необходимыми для жизнедеятельности дрожжей и высших эукариот. Широкая вовлеченность пары этих консервативных белков в большой диапазон биологических процессов живой клетки представляет практический интерес как возможных мишеней при конструировании новых лекарственных форм для лечения многих заболеваний человека. Проведенные исследования создают необходимый базис для различных биомедицинских приложений. Полученные результаты могут быть использованы прежде всего в понимании роли белков TIR 49 в сигнальных процессах на клеточном и организменном уровнях. Кроме того, разработанные методы и методики могут быть использованы научным сообществом, занимающимся исследованиями процессов олигомеризации белковых структур и образованием комплексов белок-ДНК.

2) Практическим внедрением результатов является перспектива адаптации исследовательскими группами предложенной основы технологии исследования свойств ДНК связывающих белковых комплексов одномолекулярными методами.

3) Полученные результаты могут быть востребованы для рационального дизайна новых лекарственных препаратов для регуляции белков TIR49a/ TIR49b в живых клетках.

### 5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Эффект от внедрения полученных результатов следует ожидать в отдаленном будущем в области повышения качества жизни и снижения риска смертности за счет разработки рационального дизайна новых лекарственных препаратов для регуляции белков TIR49a/TIR49b в живых клетках. В настоящее же время полученные результаты уже используются как в образовательном процессе – на кафедре биофизики СПбГПУ в курсе лабораторных работ – “Специальный физический практикум - современные методы исследования биологических систем” и лабораторной работе по исследованию физических факторов, влияющих на конформационную стабильность белков и конструированию высокостабильных альфа-спиральных пептидов, так и в подготавливаемой разработке бюджетной версии оптической ловушки, для внедрения ее в приборостроительные организации.

### 6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Возможной формой коммерциализации результатов проекта является предоставление лицензии на право использования результатов интеллектуальной деятельности.

Проректор по научной работе  
ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»



Д.Ю. Райчук

Научный руководитель проекта  
профессор

М.Г. Петухов