

Основные результаты проекта, полученные на втором этапе

1. Осуществлен подбор оптимальных функциональных транскрипционных тестов для проверки активности PARP1 на основе флуоресцентного анализа. Выбрана техника FRET, поскольку данный метод позволяет изучать конформационные переходы, происходящие внутри сложных макромолекулярных комплексов.

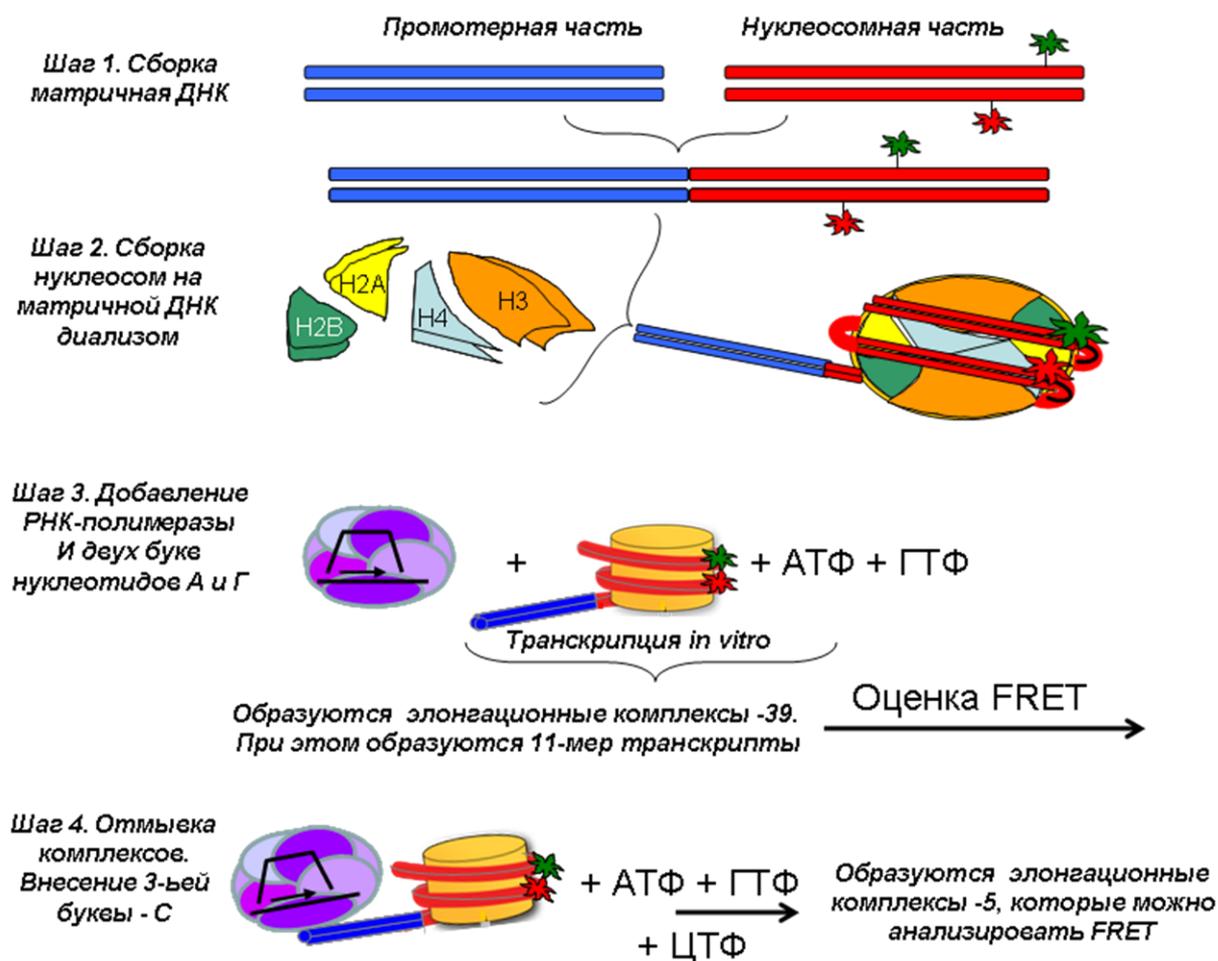


Рисунок 1- Схема функционального транскрипционного теста, который будет применяться для проверки активности PARP1, на основе флуоресцентного анализа. Вначале идет сборка нуклеосом из гистонов на матричной ДНК (шаг 1-2). Затем следует внесение РНК-полимеразного комплекса (фермент, который осуществляет считывание с ДНК информации в виде РНК-транскриптов). Безусловно, РНК-полимераза «умеет» считывать информацию и с ДНК, без нуклеосом. Но, поскольку, задача симитировать условия транскрипции, происходящие в клетке, то необходимо воссоздать условия транскрипции в клеточном хроматине, в котором ДНК обвивает нуклеосомные коры. Далее, после сборки полного РНК-полимеразо-нуклеосомного комплекса (шаг 3) проводят транскрипцию in vitro с использованием добавления двух свободных нуклеотидов: АТФ и ГТФ. Это позволяет получить комплексы, в котором РНК

полимераза успевает транскрибировать 11-мерный олигонуклеотид. При этом, фермент останавливается за 39 нуклеотидов от входа в нуклеосому. Такие комплексы получили название «ЭК-39». Если эти комплексы отмыть (это возможно, поскольку они прикреплены к никелевым гранулам – не показано на рисунке). Затем, если к отмытым ЭК добавить третью букву – ЦТФ, то РНК полимераза продвинется дальше до положения -5 нуклеотидов от входа в нуклеосому. Эта остановка происходит за счет того, что так устроена последовательность матричной ДНК. Комплексы ЭК-5 также можно анализировать FRET. Затем можно двигаться дальше в двух направлениях. Либо получать полноразмерные транскрипты – добавляя все буквы (шаг 5, верхний вариант- «postchase»), либо отмывать и вносить неполный набор букв, добиваясь остановки РНК-полимеразы в разных положениях нуклеосом и получения интермедиатов: ЭК +24, ЭК +25, ЭК +39, ЭК +41, ЭК +42, ЭК +48, ЭК +49 (рисунок 1.2, шаг 5, нижний вариант).

2. Разработаны флуоресцентные методы идентификации и определения структур ключевых интермедиатов, формирующихся в присутствии PARP1: методами FRET.

3. Проведен дизайн и созданы матрицы функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа. Создано 4 вида нуклеосомных матриц с разным расположением меток: серединным, проксимальным, дистальным и на внуклеосомной части ДНК.

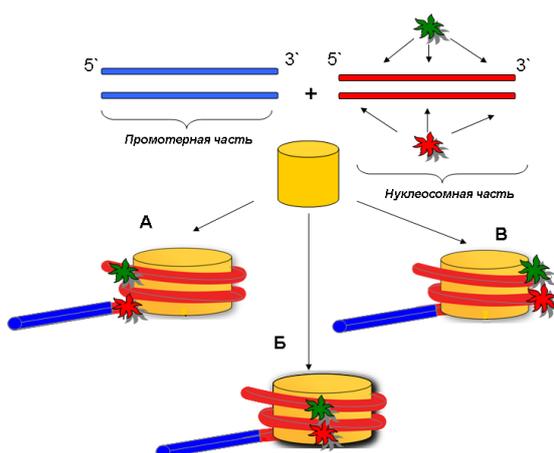


Рисунок 2 - Расположение пар флуоресцентных меток на ДНК-матрице в составе нуклеосомы. На одной нуклеосоме показаны одновременно положения меток при проксимальном, срединном и дистальном мечении. Су3 и Су5 обозначены с учетом их конформационной подвижности красным и зеленым цветом, соответственно

4. Начато создание базы данных, содержащей информацию об ингибиторах PARP1.

В разработанной БД есть вкладки «ОБЩАЯ» и отдельные вкладки, каждая из которых соответствует отдельному соединению – ингибитору PARP1, например:

название	English name	категория	Номер в Pubchem	ссылка в Pubchem	Синонимы	формула	мол.вес г/моль	IC50 нМ	Ki, мМ
1 никотинамид	nicotinamide	1	936	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/936	3 Pyridinecarboxamide, Enduramide, Niacinamide, Nicobion, Vitamin B3, Vitamin PP	C6H6N2O	122,12	210000,00	
2 бензамид	benzamide	1	2331	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2331	Benzamide; Benzoic acid amide; Benzoylamide; 55-21-0; Phenylcarboxamide; Phenylcarboxamide	C7H7NO	121,14	22000,00	
3 3-аминобензамид	3-aminobenzamide	1	1645	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1645	3544-24-9, m-Aminobenzamide, Benzamide, 3-amino-, 3-Aminobenzamide, Benzamide, m-amino-, meta-aminobenzamide, INO-1001	C7H8N2O	136,15	5400-250000	
4 3-нитробензамид	3-Nitrobenzamide	1	12576	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12576	M-NITROBENZAMIDE; 645-09-0; Benzamide, 3-nitro-, Benzamide, m-nitro-, 3-Nitro-benzamide	C7H6N2O3	166,13	200000,00	
5 1,5- дигидроизохинолин	1,5-dihydroisoquinoline	2	91129745	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91129745	1,5-dihydroisoquinoline	C9H9N	131,17	390,00	
6 4-амино-1,8-нафталимид	4-Amino-1,8-naphthalimide	2	1720	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1720	4-ANI	C12H8N2O2	212,2	180,00	
7 2-нитро-6[5H]фенантридинон	2-nitro-6[5H]phenanthridinone	2	157180	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/157180	2-Nitro-6(5H)-phenanthridinone, NSC 113304, PJ 97B	C13H8N2O3	240,21	350,00	

Рисунок 3 - Скриншот первой страницы БД по ингибиторам PARP1

5. Проведено компьютерное моделирование молекулярных поверхностей, задействованных во взаимодействии с PARP1. В качестве объекта моделирования использовали BRCT домен PARP1. Такой выбор обусловлен тем, что домен BRCT обеспечивает ключевые взаимодействие белка PARP1 с различными партнерскими белками. Проведенное молекулярное моделирование позволит найти интерфейс, который будет отличаться от интерфейса, к которому направлены классические ингибиторы PARP.

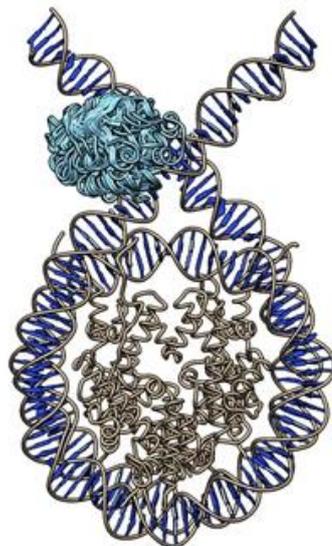


Рисунок 4- 30 наилучших ориентаций движущейся молекулы для докинга домена BRCT на нуклеосому с линкерами.

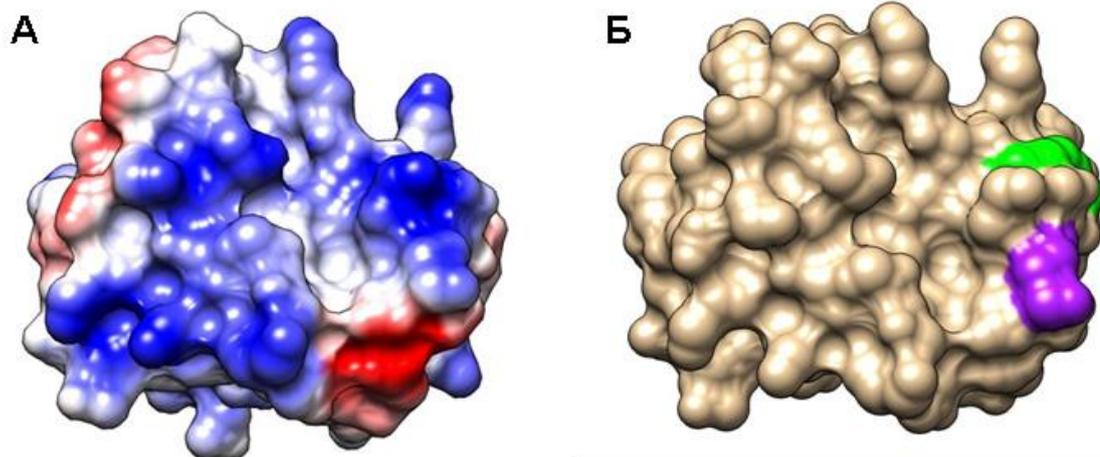


Рисунок 5 - часть А: поверхность домена BRCT, взаимодействующая с ДНК нуклеосомы. Положительно заряженные области – синие, отрицательно заряженные – красные. Часть Б: Внизу: остатки K438 (зеленый) и K441 (фиолетовый) на выявленной поверхности взаимодействия.

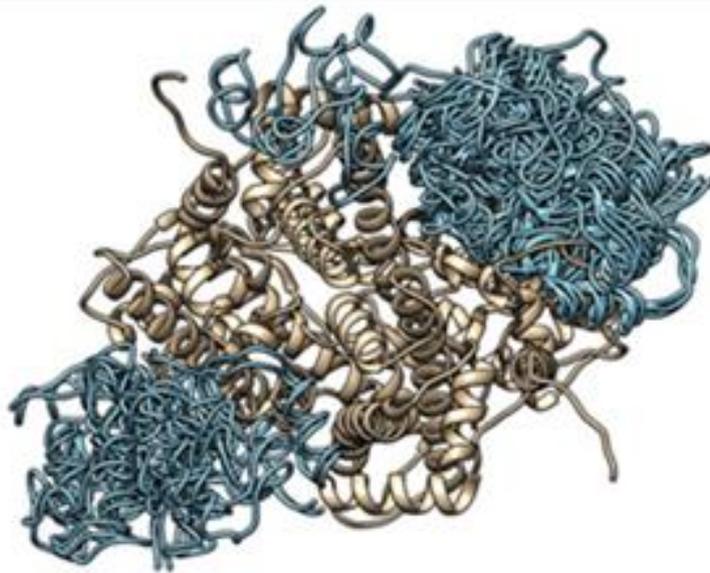


Рисунок 6 - 30 наилучших ориентаций движущейся молекулы для эксперимента по докину домена BRCT на октамер гистонов без ДНК. Ориентации четко кластеризованы и образуют две компактные группы, положение движущихся молекул внутри которых почти идентично.

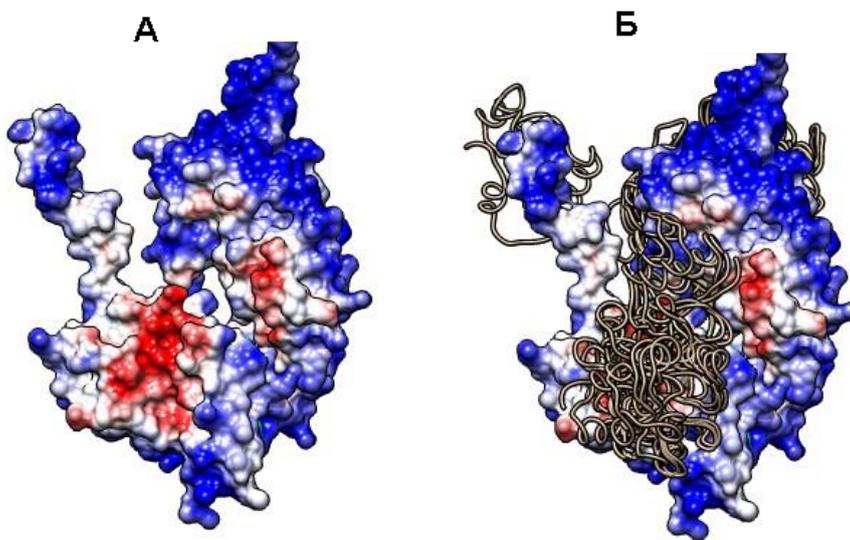


Рисунок 7 - Сайт посадки BRCT на поверхности октамера гистонов. Часть А: электростатика поверхности гистонового октамера, экспонированной в раствор. Отрицательно заряженные области – красные, положительно заряженные – синие. Четко различимы несущие сильный положительный заряд области, взаимодействующие с ДНК, и несущий отрицательный заряд кислый участок – т. н. “acidic patch”. Часть Б: положение домена BRCT на экспонированной в раствор поверхности нуклеосомы. Домен занимает единственную отрицательно заряженную область на этой поверхности.

6. Проведена подготовка реализации технических решений для получения функциональной системы скрининга противо- опухолевых препаратов на основе анализа PARP1.

7. Разработан лабораторный технологический регламент получения функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа белкового фактора PARP1, включающего: методику анализа ключевых интермедиатов, формирующихся в присутствии PARP1 биохимическими и молекулярно-генетическими методами; методику анализа ключевых интермедиатов, формирующихся в присутствии PARP1 флуоресцентными методами.

8. Проведено материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа. 2.9. Проведены необходимые мероприятия по достижению заданных значений программных индикаторов. В частности, в первом полугодии 2015 были опубликованы 3 статьи (все индексируются в Scopus и Web of Science). Статья №1 «Preparation and analysis of positioned mononucleosomes» by O.I. Kulaeva and V.M. Studitsky//Chromatin Protocols, 3rd Edition, in the Methods in Molecular Biology Series//Publisher: Humana Press// 2015; volume 1288, pp:15-26. DOI: 10.1007/978-1-4939-2474-5_2. Индексируется в Scopus и Web of science. Импакт фактор 1.29. Статья №2 «Молекулярные механизмы регуляции транскрипции фактором PARP1», в журнале «Молекулярная Биология» Выходные данные 2015, том 49, №1, стр 99–113, DOI: 10.1134/S0026893315010094. Статья №3 "Ингибиторы PARP1: разработка противоопухолевых препаратов" в журнале Acta Naturae Выходные данные: 2015, том 7 № 3 стр 25 -36.

Результаты проведенной работы были представлены индустриальным партнером в виде постеров на мероприятиях по демонстрации и популяризации результатов и достижений науки. В экспериментальных работах используется оборудование центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова "Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование ", а также установки зарубежной инфраструктуры и УНУ. Показатели "Доля исследователей в возрасте до 39 лет в общей численности исследователей-участников проекта" и "Средний возраст исследователей – участников проекта", «Объем привлеченных внебюджетных средств» превышают запланированные

Таким образом, полученные на этапе результаты соответствуют техническим требованиям к выполняемому проекту. В настоящий момент отчетная документация по второму этапу находится на рассмотрении Министерства образования и науки России.