

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of  
bioorganic chemistry RAS

Scientific School

Structural biology:  
main problems and  
approaches to their solution

6 June 2019, Moscow

# ORGANIZING COMMITTEE

---

Prof. Alexander Arseniev (chairman)

Prof. Zakhar Shenkarev (vice-chairman)

Dr. Ekaterina Lyukmanova

Prof. Roman Efremov

Dr. Sergey Goncharuk

# PARTNERS AND SPONSORS

---



Russian Science  
Foundation



Helicon Company



Merck Company



NTI Center of  
IBCH RAS

# CONTACTS

---

+7 (903) 274-79-12

ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Ekaterina Lyukmanova

# CONTENTS

---

ABOUT SCHOOL.....	4
ABOUT GRANT.....	5
PROGRAM.....	6
ORAL PRESENTATIONS.....	8
Structural studies of G protein-coupled receptors	
V. G. Cherezov.....	8
Structural mechanisms of AMPA receptor regulation and gating	
E. C. Twomey, M. V. Yelshanskaya and A. I. Sobolevsky.....	9
Spider toxin Hm-3 differently interacts with voltage-sensing domains of Nav1.4 sodium channel and blocks gating pore currents underlying periodic paralysis	
Z.O. Shenkarev.....	10
Elucidating the mechanisms of intracellular signaling using NMR spectroscopy and large fragments of single-pass cell receptors	
K.S. Mineev.....	11
Cryo-EM studies of flaviviruses	
V. Kostyuchenko.....	12
NMR studies of structure and functions of telomerase components	
V. Pol'shakov.....	13
Lipid-mediated mechanism of signal transduction via transmembrane domains of bitopic receptors	
E.V. Bocharov.....	14
OCP-FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria	
N. Sluchanko.....	15
Proteins in membranes: lessons from atomistic simulations	
R. G. Efremov.....	16
Mechanistic understanding of RTK activation via TM mutations	
A. Polyansky.....	17
NTI CENTER OF IBCH RAS.....	18

# ABOUT SCHOOL

---

Structural biology is a rapidly developing field of life sciences. It is structural studies that allow us to look into the mechanisms of individual components of a living cell - proteins, lipids, nucleic acids at the molecular and atomic level. Knowledge of the spatial structure of various cellular targets: receptors, ion channels and supramolecular complexes, as well as an understanding of the mechanisms of their interaction with ligands and biological membranes makes it possible to implement rational drug design.

To highlight the latest achievements and newest methods in the field of structural research, IBCh RAS holds a school for young scientists "Structural biology: main problems and approaches to their solution". The scientific program of the School includes lectures by leading scientists working in various fields of molecular biology and representing the basic structural methods, namely, X-ray Crystallography, Cryo-Electron Microscopy, NMR-spectroscopy and computer modeling. During the school, students will have an outstanding opportunity to become familiar with various methods and approaches to obtain and study complex biological objects: membrane receptors and virus particles. The reports of famous scientists, leaders in the field of structural biology, will allow them to get into the details of the latest research and give an understanding of this field of science in general.

The school was supported by the grant of the Russian Science Foundation (RNF) No. 19-74-30014 "Structural biology of membrane proteins for the development of new drugs and diagnostics"; Head: Doctor of Chemical Sciences, Professor Arseniev A.S. The grant was received on the event "Research by world-class research laboratories in the framework of the implementation of the priorities of the scientific and technological development of the Russian Federation" Presidential program of research projects.

Структурная биология – быстро развивающаяся область наук о живом. Именно структурные исследования позволяют проследить работу отдельных компонент живой клетки – белков, липидов, нуклеиновых кислот на молекулярном и атомном уровне. Знание пространственной структуры различных клеточных мишеней: рецепторов, ионных каналов и супрамолекулярных комплексов, а также понимание механизмов их взаимодействия с лигандами и биологическими мембранами позволяет решать задачи по рациональной разработке новых лекарственных препаратов направленного действия.

Для освещения последних достижений и новейших методов в области структурных исследований ИБХ РАН проводит школу для молодых ученых «Структурная биология: основные проблемы и подходы к их решению». Научная программа Школы включает лекции ведущих ученых, работающих в различных областях молекулярной биологии и представляющих основные структурные методы, а именно, рентгеновскую кристаллографию, криоэлектронную микроскопию, спектроскопию ЯМР и компьютерное моделирование. В рамках школы слушатели получают уникальную возможность ознакомиться с различными методами и подходами к изучению сложных биологических объектов на примере мембранных рецепторов и вирусных частиц. Доклады ведущих ученых, лидеров в области структурной биологии, позволят проникнуть в детали новейших исследований и дадут понимание этой области науки в целом.

Школа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) 19-74-30014 «Структурная биология мембранных белков для создания новых лекарственных и диагностических средств»; руководитель: доктор химических наук, профессор Арсеньев А.С. Грант получен по мероприятию «Проведение исследований научными лабораториями мирового уровня в рамках реализации приоритетов научно-технологического развития Российской Федерации» Президентской программы исследовательских проектов.

# ABOUT GRANT

---



Russian Science Foundation grant for support of world-class laboratories under the Presidential Research Funding Program

## STRUCTURAL BIOLOGY OF MEMBRANE PROTEINS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS AND DIAGNOSTICS

*Grant RSF 19-74-30014*

The project Lead: Prof. Alexander Arseniev, IBCH RAS

Membrane is one of the main components of a living cell. It is involved in a variety of vital processes; and integral and peripheral membrane proteins, such as receptors, transporters, ion channels are responsible for its major functions. Therefore, it is not surprising that membrane proteins are among the most important objects for the development of modern "targeted" drugs and early diagnostics. On the other hand, rational design of biologically active compounds requires a deep understanding of the structural organization and functioning of their protein targets. Main achievements in this area are provided by the X-ray crystallography and Cryo-electron microscopy, however, both methods suffer from several problems, which often are not overcome.

The grant from the Russian science foundation (project 19-74-30014) is devoted to the study of several important classes of membrane proteins, including the single-pass cell receptors, ion channels, membrane penetrating ribosome-inactivating protein toxins and luciferases. The complex approach, including the NMR spectroscopy, optical microscopy, protein engineering and computer simulations will be applied. As a project goal, we intend to use the structural data to develop novel antitumor drugs and their delivery systems, potassium channel blockers and luciferin-based test systems. Additionally, the obtained data will lie in the basement of our understanding of major principles of the folding and functioning of membrane proteins.

Мембрана является одним из основных компонентов живой клетки. Она вовлечена в широкий круг важнейших процессов, при этом интегральные и периферические мембранные белки, такие как рецепторы, транспортеры и ионные каналы, отвечают за большую часть ее функций. Неудивительно, что мембранные белки - одни из наиболее важных объектов для разработки современных лекарств направленного действия и средств ранней диагностики. С другой стороны, направленный поиск биологически активных соединений требует глубокого понимания структурной организации и функционирования их белков-мишеней. Основные достижения в данной области сделаны методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии, однако, оба подхода сталкиваются с рядом проблем, которые не всегда преодолимы.

В рамках гранта для лабораторий мирового уровня Президентской программы исследовательских проектов Российского научного фонда (проект № 19-74-30014) планируется применить комплексный подход, включающий в себя ЯМР-спектроскопию, оптическую микроскопию, белковую инженерию и компьютерное моделирование. Планируется изучить нескольких важнейших классов мембранных белков, а именно: клеточные рецепторы с одним трансмембранным сегментом, ионные каналы, рибосом-инактивирующие белки, способные проникать через мембрану, и люциферазы. В качестве конечной цели проекта планируется использовать структурные данные для разработки новых противоопухолевых агентов и систем их доставки, блокаторов калиевых каналов и основанных на люциферинах тест-систем. Полученные результаты лягут в основу понимания базовых принципов фолдинга и функционирования мембранных белков.

# PROGRAM

06 June 2019 (Thursday), 3<sup>rd</sup> floor, small conference hall IBCH RAS

9:30 REGISTRATION

9:45 SCHOOL OPENING (Welcome to small conference hall)

10:00 – 10:15 Academician Alexander Gabibov, IBCH RAS Greeting

10:15 – 10:45 Prof. Vadim Cherezov, University of Southern California and Moscow Institute of Physics and Technology Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors

10:45 – 11:15 Prof. Alexander Sobolevsky, Columbia University Structural mechanisms of AMPA receptor regulation and gating

11:15 – 11:45 Prof. Zakhar Shenkarev, IBCH RAS Spider toxin Hm-3 differently interacts with voltage-sensing domains of Nav1.4 sodium channel

11:45 – 12:15 Dr. Konstantin Mineev, IBCH RAS Elucidating the mechanisms of intracellular signaling using NMR spectroscopy and large fragments of single-pass cell receptors

12:15 – 12:35 *Coffee-break*

12:35 – 13:05 Prof. Victor Kostyuchenko, Duke-NUS Medical School. Cryo-EM Studies of flaviviruses

13:05 – 13:35 Prof. Vladimir Polshakov, Lomonosov Moscow State University NMR studies of structure and functions of telomerase components

13:35 – 14:05	Dr. Eduard Bocharov, IBCH RAS	Lipid-mediated mechanism of signal transduction via transmembrane domains of bitopic receptors
14:05 – 15:05	<i>Lunch Time</i>	
15:05 – 15:30	Dr. Nikolai Sluchanko, Federal Research Center of Biotechnology RAS	OCP-FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria
15:30 – 16:00	Prof. Roman Efremov, IBCH RAS	Proteins in membranes: lessons from atomistic simulations
16:00 – 16:30	Dr. Anton Polyansky, Department of Structural and Computational Biology, Max F. Perutz Laboratories	Mechanistic understanding of RTK activation via TM mutations
16:30 – 17:00	Structural biology department tour	
17:00	SCHOOL CLOSING	
19:30	<i>Social event</i>	

# ORAL PRESENTATIONS

---



## STRUCTURAL STUDIES OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

V. G. Cherezov

*Moscow Institute of Physics and Technology, University of Southern California*

G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) represent the largest superfamily of membrane proteins produced in the human body. Cell signaling mediated by GPCRs plays a key role in all vital physiological processes, as well as in various pathologies such as cancer, immune disorders, cardiovascular disease, chronic pain, drug addiction, etc. A central role of GPCRs in cell signaling and their convenient location on the cell surface led to their recognition as promising pharmaceutical drug targets. Following decades of intensive research, structure-function studies of this superfamily have finally been enabled in 2007 by multiple breakthroughs in technology that included receptor stabilization, crystallization in a membrane environment, and microcrystallography.

This talk will summarize key milestones in our understanding of the mechanisms of ligand recognition, allosteric modulation, and signal transduction across the membrane, contributed by over a decade of structural studies of GPCRs. Recent advancements in X-ray free electron lasers and cryo-electron microscopy open up new opportunities and promise to further accelerate structure-function studies of the whole GPCR superfamily.

Рецепторы сопряженные с G-белком (GPCR) представляют из себя наиболее многочисленное суперсемейство белков экспрессирующихся в мембранах клеток человека. Передача клеточных сигналов через GPCR рецепторы играет ключевую роль во всех жизненно важных физиологических процессах, а также во многих патогенезах, таких как онкологические заболевания, расстройства иммунной системы, заболевания сердечно-сосудистой системы, хронические боли, наркотическая зависимость, и т.д. Центральная роль GPCR рецепторов в передаче межклеточных сигналов, а также их расположение на поверхности клетки, привели к широкому признанию GPCR рецепторов в качестве важных мишеней для разработки лекарств. После нескольких десятилетий интенсивных научных разработок, исследования структуры и функции рецепторов в конце концов стали возможными в 2007 году благодаря технологическим прорывам в областях стабилизации рецепторов, кристаллизации в нативном мембранном окружении и микрокристаллографии.

Этот доклад осветит основные вехи в нашем понимании механизмов распознавания лигандов, аллостерической модуляции и передачи сигналов через клеточные мембраны, которые были открыты в течение последней декады. Недавние успехи в разработке и развитии рентгеновских лазеров на свободных электронах и крио-электронной микроскопии открывают новые перспективы в исследованиях структуры и функции GPCR рецепторов.





## STRUCTURAL MECHANISMS OF AMPA RECEPTOR REGULATION AND GATING

E. C. Twomey, M. V. Yelshanskaya and A. I. Sobolevsky

*Columbia University*

AMPA receptors mediate fast excitatory neurotransmission and are critical for the central nervous system development and function. Aberrancies in AMPA receptor-mediated signaling are associated with numerous neurological disorders. We used X-ray crystallography and cryo-electron microscopy to solve structures of AMPA receptors and their complexes with auxiliary subunits in the closed, open and desensitized states. The iris-like ion channel opening is accompanied by kinking of two diagonal pore-forming M3 helices at a highly conserved alanine gating hinge as well as loosening of the selectivity filter formed by the extended portions of the re-entrant M2 loops. During desensitization, the interface between monomers of the ligand-binding domain dimers undergoes changes, which cause dimers to lose their local two-fold rotational symmetry and lead to an overall shortening and twisting of the receptor. Channel opening can be stopped by noncompetitive inhibitors that bind to the closed-state receptor, at the interface between the ion channel and linkers connecting it to the ligand-binding domains, and act as wedges between the transmembrane segments, thereby preventing gating rearrangements. Alternatively, calcium-permeable AMPA receptors can be blocked by polyamine toxins and their synthetic analogs, which occlude the channel pore and prevent ionic conductance acting as corks plugging a bottle. These blockers have minimal interference with channel gating and can be trapped inside the pore after channel closure. Our findings provide a framework for understanding gating and regulation across the family of ionotropic glutamate receptors, their role in excitatory neurotransmission and their potential as targets for drug development.

Как проводники нейротрансмиссии в подавляющем большинстве возбуждающих синапсов нашего мозга, АМПА рецепторы играют важную роль в формировании и функционировании центральной нервной системы (ЦНС). Неудивительно, что нарушения функционирования АМПА рецепторов приводят к многочисленным неврологическим заболеваниям. С помощью методов рентгеноструктурного анализа и крио-электронной микроскопии мы определили структуры АМПА рецепторов и их комплексов с окружающими регуляторными мембранными белками в закрытом, открытом и десенситизированном состояниях. Диафрагмальное открывание АМПА рецепторного канала сопровождается изломом двух диагонально-расположенных поруобразующих М3  $\alpha$ -спиралей в районе высококонсервативного аланина, а также расширением селективного фильтра, образованного растянутыми частями М2 сегментов. Десенситизация АМПА рецепторов сопровождается изменениями поверхности взаимодействия между лиганд-связывающими доменами (ЛСД) в контексте образуемых ими ЛСД димеров. При этом ЛСД димеры теряют локальную симметрию 2-го порядка, что в свою очередь приводит к укорочению и скручиванию всего рецептора. Открывание канала может быть остановлено с помощью неконкурентных ингибиторов, которые в закрытом состоянии связываются на границе между ионным каналом и линкерами, связывающими канал с ЛСД. Такие ингибиторы вклиниваются между трансмембранными доменами, препятствуя таким образом преобразованиям воротного механизма канала. Альтернативно, проницаемые для кальция АМПА рецепторы могут быть заблокированы полиаминовыми токсинами и их синтетическими аналогами, которые препятствуют протеканию ионного тока, закупоривая пору канала как пробка, затыкающая бутылку. Такие блокаторы практически не взаимодействуют с воротным механизмом канала и могут быть заперты внутри его поры после закрывания. Наши исследования помогают лучше понять как действует воротный механизм глутаматных рецепторов, какова роль глутаматных рецепторов в нейротрансмиссии, а также предоставляют новую информацию для разработки будущих лекарственных средств.



## SPIDER TOXIN Hm-3 DIFFERENTLY INTERACTS WITH VOLTAGE-SENSING DOMAINS OF NAV1.4 SODIUM CHANNEL AND BLOCKS GATING PORE CURRENTS UNDERLYING PERIODIC PARALYSIS

Z.O. Shenkarev

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS*

Voltage-gated Na<sup>+</sup> (Nav) channels contain domains that have discrete functionalities. The central pore domain allows current flow and provides ion selectivity, whereas peripherally located four voltage-sensing domains (VSD-I/IV) are needed for voltage-dependent gating. Certain mutations trigger a leak current through VSDs leading to various diseases. For example,

hypokalemic periodic paralysis (HypoPP) type 2 is caused by mutations in the S4 voltage-sensing segments of VSDs in the skeletal muscle channel Nav<sub>v</sub>1.4. The gating modifier toxin Hm-3 (crab spider *Heriades melloteei*) inhibits leak (gating pore) currents through such mutant channels and represents useful hit for HypoPP therapy.

To investigate molecular basis of Hm-3 interaction with Nav<sub>v</sub>1.4 channel, we studied isolated VSD-I and VSD-II by NMR in membrane mimicking environment. Hm-3 partitions into micelles through a hydrophobic cluster formed by aromatic residues and interacts with both VSDs by the prolonged positively charged beta-hairpin. The toxin binds to different sites on the domains. On VSD-I Hm-3 interacts with the S3b helix and S3–S4 extracellular loop forming two salt bridges with conserved E208 and D211 residues, while on VSD-II the toxin binds to the S1-S2 extracellular loop interacting with E604 and D606 side chains. Nevertheless, in the both cases the allosteric changes in S4 helix conformation induced by the bound toxin block the gating pore currents. In the obtained complexes, the toxin forms lot of the stabilizing contacts with the lipids surrounding the VSDs. This suggests membrane-mediated mechanism of Hm-3/Nav<sub>v</sub>1.4 interaction.

Потенциал-чувствительные Na<sup>+</sup> (Nav) каналы имеют модульную организацию и включают в себя несколько мембранных доменов. Центральный поровый домен обеспечивает селективное прохождение ионов, а периферийно расположенные четыре потенциал-чувствительных домена (ПЧД-I/IV) отвечают за управления воротами канала в ответ на изменение трансмембранного (ТМ) потенциала. Некоторые мутации приводят к возникновению токов утечки через ПЧД, приводя к различным заболеваниям. Например, гипокалиемический и нормокалиемический периодический параличи вызываются мутациями в ТМ сегментах S4 ПЧД канала скелетных мышц человека Nav1.4. Токсин паука *Heriades melloteei* Hm-3, влияющий на потенциал-зависимую активацию каналов Nav, ингибирует токи утечки через мутантные варианты Nav1.4 и может рассматриваться как прообраз новых лекарственных препаратов для лечения нейромышечных заболеваний.

Для исследования молекулярного механизма взаимодействия токсина Hm-3 с Nav1.4, мы использовали отдельные фрагменты канала, соответствующие ПЧД-I и ПЧД-II, полученные в бесклеточной системе синтеза белка. Методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии в окружении, моделирующем липидную мембрану, было показано, что Hm-3 может взаимодействовать как с ПЧД-I, так и с ПЧД-II. При этом положительно заряженная бета-шпилька токсина взаимодействует с различными сайтами на поверхности ПЧД. На ПЧД-I Hm-3 взаимодействует со спиралью S3b и внеклеточной петлей S3-S4, образуя два солевых мостика с консервативными остатками E208 и D211, в то время как на VSD-II токсин связывается с внеклеточной петлей S1-S2, образуя ионные связи с остатками E604 и D606. Вероятно, в обоих случаях аллостерические изменения конформации спирали S4, вызванные связанным токсином, приводят к блокировке токов утечки. Наблюдаемые стабилизирующие контакты между молекулой токсина и липидами, окружающими ПЧД, указывают на мембранно-опосредованный механизм взаимодействия Hm-3/Nav1.4.



## ELUCIDATING THE MECHANISMS OF INTRACELLULAR SIGNALING USING NMR SPECTROSCOPY AND LARGE FRAGMENTS OF SINGLE-PASS CELL RECEPTORS

K.S. Mineev

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry  
RAS*

Type I or bitopic proteins include a number of cell receptors that regulate the cell cycle and immune response and are involved in the development of many severe diseases, such as cancer and neurodegeneration. Bitopic proteins are usually constituted by large extramembrane domains and just a single transmembrane helix. Such an architecture hinders the

crystallization of full-length proteins, while their increased mobility prevents their cryo-EM studies at high resolution. Spatial structure of single-pass proteins is usually studied with a so-called "divide and conquer" approach, implying that protein is dissected into separate domains, their structure is solved and then the model of a full-size receptor is built. This results in the loss of information about the mutual arrangement of domains and their interactions. We suggest using solution NMR spectroscopy to study the large fragments of type I proteins, which contain several domains, to reconstruct the actual structure of full-size receptors and understand the arrangement of protein in various functional states. In the talk, the examples of such studies of p75, TLR4 and TrkA receptors will be provided.

Мембранные белки I типа или битопные белки включают в себя множество рецепторов, которые регулируют клеточный цикл и иммунный ответ, а также принимают участие в развитии многих тяжелых заболеваний, таких как рак и нейродегенерация. У битопных белков обычно наличествуют большие внеклеточные домены и всего лишь одна трансмембранная спираль. Подобная архитектура препятствует кристаллизации белков, а повышенная подвижность затрудняет их изучение при помощи крио- электронной микроскопии в высоком разрешении. Пространственная структура битопных белков обычно исследуется с применением подхода «разделяй и властвуй», когда белок разделяется на домены, определяется их структура и строится модель полноразмерного рецептора. Это приводит к потере информации о взаимном расположении доменов белка и их взаимодействии. Мы предлагаем изучать крупные фрагменты битопных белков, содержащие несколько различных доменов, чтобы восстановить реальную структуру полноразмерных рецепторов и правильно понять устройство белков в различных функциональных состояниях при помощи ЯМР-спектроскопии в растворе. В докладе представлены примеры подобных исследований рецепторов p75, TLR4, TrkA.

## CRYO-EM STUDIES OF FLAVIVIRUSES

V. Kostyuchenko

*Duke-NUS Medical School*



Flaviviruses, spread via mosquito bites, cause human disease such as dengue fever, West Nile fever, and Zika fever with high degree of severity. There are almost no licensed vaccines and treatment except symptomatic for these diseases. It is important to study the virus structure and interactions with ligands such as receptors and antibodies in order to understand the virus' life cycle with the aim to find possible preventive vaccines and curative drugs. For structural biology work, we employ mostly cryo-EM such as single particle analysis and cryo-electron tomography to study complexes of the virus with

antibody fragments. We obtained subnanometer and near-atomic resolution cryo-EM structures for immature and mature forms of dengue virus serotype 1, dengue virus serotype 4, and Zika virus. We described a possible maturation pathway based on the higher resolution structures. We also described a temperature- dependent structural change that occurs in some strains of the flaviviruses, important for vaccine development. In addition, we described a cryo-EM structure of a complex of a dengue virus and antibody fragment that demonstrates that in some cases cryo-EM is superior to X-ray crystallography as being able to provide a fuller picture of the virus and antibody interactions. Modern cryo-EM allows us a better and more detailed look at the viruses, their life cycle and help the development of a better vaccines and therapeutics.

Флавивирусы переносятся комарами, и являются возбудителями таких опасных болезней, как лихорадка денге, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, и других. До сих пор не удалось создать действенных вакцин против этих болезней, и всё лечение сводится к симптоматическому. Поэтому очень важно понять структурные особенности устройства этих вирусов и механизмы их взаимодействия с рецепторами и антителами. Наша группа использует методы криоэлектронной микроскопии для изучения комплексов этих вирусов с рецепторами и фрагментами антител. Мы получили структуры вируса денге серотип 1 на разных стадиях его формирования, вируса денге серотип 4, вируса Зика. Мы описали возможный путь превращения вирусной частицы из неактивной формы в активную (матурация). Мы также описали температурозависимые структурные изменения в некоторых штаммах вируса денге, что важно для создания действенных вакцин. Также мы показали, что в некоторых случаях структура комплекса вируса с фрагментом антитела, полученная методами крио-ЭМ, даёт более полную картину их взаимодействия, чем структура комплекса фрагментов вирусного белка и антитела, полученных методами рентгеноструктурного анализа. Современная криоэлектронная микроскопия позволяет нам получить гораздо более детальную картину вирусов и их жизненного цикла и открывает дорогу к разработке новых, более действенных противовирусных вакцин и лекарств.



## NMR STUDIES OF STRUCTURE AND FUNCTIONS OF TELOMERASE COMPONENTS

V. Pol'shakov

*Research Centre for Magnetic Tomography and Spectroscopy,  
Lomonosov MSU*

Telomerase is a multisubunit ribonucleoprotein enzyme that is essential for maintaining genome integrity in eukaryotes. A key role of telomerase in cancer and ageing makes it a promising target for the development of cancer therapies and treatments of other age-associated diseases. However, the structure and molecular mechanism of telomerase action are still poorly understood. Telomerase function is based on the dynamic interactions of its catalytic subunit with nucleic acids

(telomerase RNA and telomeric DNA) and several proteins. In budding yeast, telomerase consists of the catalytic subunit, executing the function of the reverse transcriptase (TERT or Est2 protein), telomerase RNA (TLC1) and two regulatory subunits, Est1 and Est3. Each of the four subunits is essential for *in vivo* telomerase function.

We determined NMR solution structure of the N-terminal (TEN) domain of TERT and Est3 subunit from the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. Functional and dynamic properties of both protein have been elucidated. Obtained results indicate that the TEN domain is involved in restricting the size of the heteroduplex during telomere repeat synthesis, and Est3 is involved in regulation of telomerase activity via interaction with the Est1 subunit. The report presents the details of the structural, dynamic and functional studies of the TEN and Est3 proteins. Studies were supported by the Russian Science Foundation (grants 14-14-00598 and 19-14-00115).

Теломераза представляет собой мультисубъединичный рибонуклеопротеиновый фермент, который необходим для поддержания целостности генома у эукариот. Ключевая роль теломеразы в развитии злокачественных заболеваний и контроле старения организма делает ее многообещающей мишенью для разработки методов лечения рака и контроля развития возрастных заболеваний. Однако структура и молекулярный механизм действия теломеразы все еще недостаточно изучены. Функция теломеразы основана на динамическом взаимодействии ее каталитической субъединицы с нуклеиновыми кислотами (теломеразной РНК и теломерной ДНК) и некоторыми белками. Теломераза дрожжей состоит из каталитической субъединицы, выполняющей функцию обратной транскриптазы (TERT или Est2), теломеразной РНК (TLC1) и двух регуляторных белковых субъединиц, Est1 и Est3. Каждая из четырех субъединиц необходима для нормального функционирования теломеразы *in vivo*.

Мы определили структуру ЯМР в растворе для N-концевого (TEN) домена TERT и субъединицы Est3 из термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Были исследованы функциональные и динамические свойства обоих белков. Полученные результаты позволяют предполагать, что TEN домен контролирует ограничение размера гетеродуплекса ДНК-РНК во время синтеза повторов теломер, а Est3 участвует в регуляции активности теломеразы посредством взаимодействия с субъединицей Est1. В докладе представлены детали структурно-динамических и функциональных исследований TEN домена и белка Est3. Исследования проведены при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (гранты 14-14-00598 и 19-14-00115).



## LIPID-MEDIATED MECHANISM OF SIGNAL TRANSDUCTION VIA TRANSMEMBRANE DOMAINS OF BITOPIC RECEPTORS

E.V. Bocharov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS*

The biological function of bitopic membrane proteins having only one transmembrane (TM) segment is provided by a network of various intermolecular interactions in the cell membrane. This class of proteins includes, for example, type I receptors, which are directly involved in the development and maintenance of homeostasis of human tissues. The epidermal growth factor (EGFR/HER) and growth hormone (GHR) receptors serve as

convenient models of type I receptors to show how ligand-induced conformational rearrangements and specific dimerization of extracellular and TM domains lead to allosteric activation of cytoplasmic domains during signal transduction through the cell membrane. Dysregulated signaling from these receptors plays significant roles in promotion of number of human diseases, and their inhibitors have been among the most successful examples of targeted therapy for cancer to date. Using protein engineering, high-resolution NMR spectroscopy in combination with MD-relaxation in an explicit lipid bilayer, we experimentally determined alternative conformations of the juxtamembrane regions and TM domains of EGFR/HER and GHR receptors in different membrane-mimicking environments. Based on recent biophysical and biochemical data, it was shown that the functioning of these bitopic receptors is caused not only by specific protein-protein and protein-lipid interactions, but also by the physical state of the lipid environment, as one of the main components of the self-consistent system of biological membrane. This allowed us to propose new principles underlying signal transduction through the cell membrane, as well as pathogenic mechanisms of a number of oncogenic mutations in the TM domains of the bitopic receptors. The work is supported by the Russian Science Foundation, grant #19-74-30014.

Биологическая функция битопных белков, имеющих только один трансмембранный (TM) сегмент, обеспечивается сетью разнообразных межмолекулярных взаимодействий в клеточной мембране. К этому классу белков принадлежат, например, рецепторы типа I, которые принимают непосредственное участие в развитии и поддержании гомеостаза тканей организма человека. Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR/HER) и гормона роста (GHR) служат удобными моделями рецепторов типа I, чтобы показать, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных и TM доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов при передаче сигнала через мембрану клетки. Нарушения функционирования данных рецепторов приводят к развитию ряда патологий, при том что их ингибиторы являются одними из самых успешных примеров таргетной терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день. Используя белковую инженерию, ЯМР-спектроскопию высокого разрешения в сочетании с МД-релаксацией в явно заданном липидном бислое, мы экспериментально определили альтернативные конформации примембранных участков и TM доменов белков EGFR/HER и GHR в средах, имитирующих липидную мембрану. В свете недавно полученных биофизических и биохимических данных показано, что функционирование данных битопных белков обуславливается не только специфическими белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями, но и физическим состоянием липидного окружения, как одного из главных компонентов самосогласованной системы биологической мембраны. Это позволило нам предложить новые принципы, лежащие в основе сигнальной трансдукции через мембрану клетки, а также механизмы действия ряда патогенных мутаций в TM доменах рецепторов. Работа поддержана Российским научным фондом (проект 19-74-30014).



## OCP-FRP PROTEIN COMPLEX TOPOLOGIES SUGGEST A MECHANISM FOR CONTROLLING HIGH LIGHT TOLERANCE IN CYANOBACTERIA

N. Sluchanko

*FRS «Fundamentals of biotechnology» RAS*

To efficiently control the utilization of the energy absorbed by their light-harvesting complexes, phycobilisomes (PBs), cyanobacteria use an intricate interplay between the Orange Carotenoid Protein (OCP) and the Fluorescence Recovery Protein (FRP). OCP is a two-domain (NTD, CTD) carotenoprotein, reversibly photoswitching from OCP O into a PBs-quenching OCP R form under blue-green light illumination. FRP transiently binds to OCP R and accelerates

its OCP R -OCP O transition to terminate the OCP-mediated photoprotection. Structural biology has so far failed to provide a high resolution picture of this interaction due to its high dynamics.

The solution conformations of FRP dimer and OCP monomer were confirmed by small-angle X-ray scattering (SAXS) and kinetically stable analogs of the OCP photocycle intermediates were obtained by site-directed mutagenesis. By studying the functional interaction of several low-homology FRP variants with *Synechocystis* OCP variants, we were able to discern formation of the intermediate 2:1 and 1:1 complexes, revealing FRP dimer dissociation in the course of its binding to OCP. Engineering of the unique FRP mutants representing constantly monomeric and dimeric forms, disulfide trapping and chemical crosslinking revealed complexes with 1:1, 2:1, and 2:2 stoichiometries. SAXS data, supported by conservativity and electrostatics analyses of proteins, allowed us to reconstruct the topology of different FRP-OCP complexes and to propose the dissociative mechanism regulating high light tolerance in cyanobacteria where FRP binding via its head domain to the OCP-CTD leads to FRP monomerization.

Для эффективного использования энергии, поглощаемой светособирающими комплексами, фикобилисомами (PBs), цианобактерии используют сложное взаимодействие между оранжевым каротиноидным белком (OCP) и белком восстановления флуоресценции (FRP). OCP - двухдоменный (NTD, CTD) каротиноидный белок, который при освещении сине-зеленым светом обратимо переходит из O в R форму, тушащую PBs. FRP связывается с OCP R и ускоряет его OCP R -OCP O переход, отключая OCP-опосредованную фотозащиту. Из-за высокой динамики взаимодействие FRP/OCP не поддается изучению методами структурной биологии с высоким разрешением.

Конформации димера FRP и мономера OCP в растворе были подтверждены малоугловым рентгеновским рассеянием (SAXS), а кинетически стабильные аналоги промежуточных продуктов фотоцикла OCP были получены с помощью сайт- направленного мутагенеза. Изучая функциональное взаимодействие нескольких вариантов FRP с низкой гомологией с вариантами OCP из *Synechocystis*, мы обнаружили образование промежуточных комплексов 2:1 и 1:1, показав диссоциацию димера FRP в ходе его связывания с OCP. Уникальные мономерные и димерные мутанты FRP, метод дисульфидной ловушки и химическое сшивание помогли идентифицировать комплексы с 1:1, 2:1 и 2:2 стехиометрией. По данным SAXS, а также анализа консервативности и электростатики белков, FRP связывается своим головным доменом с OCP-CTD, что позволяет реконструировать топологию комплексов этих белков и предложить диссоциативный механизм, регулирующий толерантность цианобактерий к повышенной освещенности.



## PROTEINS IN MEMBRANES: LESSONS FROM ATOMISTIC SIMULATIONS

R. G. Efremov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS*

Apart from the barrier role, cell membranes provide accommodation of numerous external agents, including membrane proteins (MPs). Recently, it has been shown that the most important property of lipid bilayers is their dynamic heterogeneous character, which critically depends on their local structural features, hydrophobic/electrical properties, etc. Moreover, dynamic behavior of membranes, including stochastic phenomena, should be taken into account. The totality of these factors represents the so-called.

“membrane response”. Study of protein-membrane systems is possible only if mutual influence (adaptation) of partners at the molecular level is taken into account. Atomistic computer modeling, that permits analysis of the structural-dynamic parameters of all components of model membranes - MPs, lipids, water and ions - has been developed. It is established that local changes in the membrane environment play an important role in the binding of membrane-active peptides and peripheral MPs, causing specific clustering of lipids and initiating the formation of defects in the membrane. It is shown that lipids contribute significantly to the free energy of spontaneous dimerization of MPs. The detailed balance of various energy contributions strongly depends on the composition of the membrane and the amino acid sequence of the protein. The assumption is made that the process of association of transmembrane alpha-helices in lipid bilayers has a predominantly entropic character. MPs and their water-lipid environment equally determine the nature of the biological behavior of cell membranes, mutually strongly affecting each other and responding to external influences in a self-consistent manner.

Помимо барьерной функции, клеточные мембраны обеспечивают встраивание многочисленных внешних молекул, включая мембранные белки (МБ). Недавно было установлено, что важнейшим свойством биомембран является их динамическая гетерогенность, которая зависит от локальных структурных, гидрофобных и электрических свойств. Кроме того, необходимо учитывать динамику мембран, в т.ч. стохастические явления. Совокупность этих факторов определяет т.н. «мембранный ответ». Изучение белок-мембранных систем возможно лишь с учетом взаимной адаптации обоих партнеров МБ и липидного бислоя. Представленные в работе методы атомистического моделирования позволяют исследовать структурно-динамические свойства всех компонентов клеточных мембран – МБ, липидов, воды и ионов. Показано, что локальные изменения в бислое играют важнейшую роль в связывании МБ с мембранами, вызывают кластеризацию липидов и образование дефектов в мембране. Энергетический баланс взаимодействий в системе определяется составом мембраны и последовательностью МБ. Высказано предположение о том, что ассоциация трансмембранных спиралей в липидных бислоях обусловлена преимущественно энтропийным вкладом. Мембранные белки и их водно-липидное окружение в равной мере определяют биологическое действие клеточных мембран, сильно влияя друг на друга и согласованно отвечая на внешние сигналы.



## MECHANISTIC UNDERSTANDING OF RTK ACTIVATION VIA TM MUTATIONS

A. Polyansky

*Max F. Perutz Laboratories*



Receptor tyrosine kinases (RTKs) are an important class of membrane proteins, which control cell proliferation and growth. The transmembrane (TM) domains of RTKs comprise single alpha-helix and transmit an allosteric signal from extracellular receptor regions bound to specific ligands to intracellular kinase domains. Mutations in TM domains may lead to constitutive activation of these receptors and cause a number of severe disorders including cancer. To probe the mechanistic aspects of activation of RTKs via TM mutations,

we focus on platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA), an RTK, which plays essential roles in embryo development and is aberrantly activated in a number of neoplasms. We use a computational modeling framework including sequence-based structure prediction and atomistic molecular dynamic simulations to identify and characterize novel mutations modulating dimerization of TM domains and subsequent activation of the receptor, and validate our models by NMR spectroscopy and cell experiments. A synergy of modeling and experimental work allows us to elucidate the structural and dynamic determinants of spontaneous activation of PDGFRA and propose a model for the active and inactive conformational states of its TM dimer in both the wild type and the oncogenic mutant of the receptor.

Рецепторные тирозин-киназы (РТК) – важный класс мембранных белков, регулирующих пролиферацию и рост клеток. Трансмембранные (ТМ) домены РТК состоят из одной альфа-спирали и передают аллостерический сигнал от внеклеточной части рецептора ко внутриклеточным киназным доменам. Мутации в ТМ домене способны активировать рецептор в свободном состоянии (без лиганда), что может приводить к развития серьезных заболеваний, в том числе рака. Для понимания механических аспектов активации РТК, вызванной ТМ мутациями, в качестве модельной системы мы выбрали рецептор тромбоцитарного фактора роста человека (PDGFRa), который играет важную роль в процессе эмбриогенеза, а также активируется в различных опухолях. В исследовании мы использовали вычислительную платформу, включающую структурную биоинформатику и расчеты молекулярной динамики для поиска новых мутаций, модулирующих димеризацию трансмембранных доменов и последующую активацию рецептора, а также ЯМР спектроскопию и эксперименты на клетках для подтверждения полученных моделей. Совместное использование моделирования и экспериментов позволили выявить структурно-динамические детерминанты спонтанной активации рецептора, а также предложить модели активного и неактивного состояний его трансмембранного димера в случае дикого типа и онкогенных мутаций.



Центр НТИ  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова  
Российской академии наук

Разрабатываем и внедряем биотехнологии будущего

Центр Национальной технологической инициативы (ЦНТИ) создан на базе Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН в марте 2018 года для реализации государственной программы мер по формированию принципиально новых рынков и созданию условий для глобального технологического лидерства России к 2035 году – Национальной технологической инициативы.

Основной задачей Центра НТИ является осуществление комплексного развития «сквозной» технологии НТИ – технологии управления свойствами биологических объектов. ЦНТИ является центром кристаллизации новой высокотехнологичной отрасли биотехнологий и выступает организатором совместной деятельности участников концерна «БИООРГАНИКА» – образовательных, научных организаций и хозяйствующий субъектов, включая промышленные предприятия.

В целях повышения эффективности экономики страны, увеличения продолжительности жизни и улучшения качества жизни населения Центр НТИ занимается созданием передовых продуктов и технологий и соединяет результаты исследований фундаментальной науки и потребности существующих рынков НТИ.

Среди направлений деятельности ЦНТИ выделяются следующие:

1. разработка лекарственных препаратов по терапевтическим направлениям:
  - онкологические заболевания,
  - иммунологические патологии,
  - неврологические заболевания,
  - нарушения метаболизма,
  - инфекционные заболевания,
  - сенсорные заболевания,
  - регенеративная медицина;
2. разработка оборудования:
  - прибор управления сердечным ритмом через управление активностью клеток и органов с помощью встроенных в мембраны клеток белков-рецепторов теплового излучения,
  - прибор управления активностью инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы с помощью инструментов термогенетики и мониторинг уровня глюкозы в крови пациентов с диабетом;
3. сервисное направление, оказывающее следующие услуги:
  - разработка технологий производства биофармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм,
  - поиск новых антибиотических и пробиотических препаратов,
  - сборка вирусных частиц высокой степени очистки и титра,
  - проведение доклинических исследований,
  - услуга по оценке действия препаратов на синаптическую передачу и пластичность на единой модульной платформе оптического биоимиджинга.

helicon

CAPRICORN  
SCIENTIFIC



## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ РАБОТ

от немецкой компании  
Capricorn Scientific GmbH

- Высокие стандарты качества по доступной цене
- Компания Capricorn Scientific сертифицирована по стандарту качества ISO 9001:2015

Полный ассортимент  
продукции Capricorn  
Scientific с актуальными  
ценами доступен на  
нашем сайте:



Единый телефон

**8 (800) 770-71-21**

Звонок по России бесплатный

121374, Москва, Кутузовский проспект, 88

[www.helicon.ru](http://www.helicon.ru)

# MERCK

## КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация
- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Криопрезервация



### Первичные клетки

В партнёрстве с Cell Applications Inc. – глобальным поставщиком первичных клеток человека и животных мы предлагаем более 100 различных клеток животных и человека, процитированные в оригинальных научных статьях и патентах.

Cell Applications Inc. ведёт свою историю с 1994 года и постоянно совершенствуется в процессах выделения, очистки, культивирования клеток человека и животных для того чтобы Вы могли использовать их для достижения успехов в своих исследованиях!

### Для каждой клеточной линии мы гарантируем:

- Высокую чистоту;
- Низкое число пассажей;
- Точнейшую характеристику;
- Строжайший контроль качества;
- Оптимизированные среды и реагенты для успешного культивирования.

### ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35

Тел.: +7 (495) 937-33-04

E-mail: [mm.russia@merckgroup.com](mailto:mm.russia@merckgroup.com)

[ruorder@sial.com](mailto:ruorder@sial.com)

[sigmaaldrich.com/primarycells](http://sigmaaldrich.com/primarycells)

[MERCKmillipore.com/cellculture](http://MERCKmillipore.com/cellculture)

