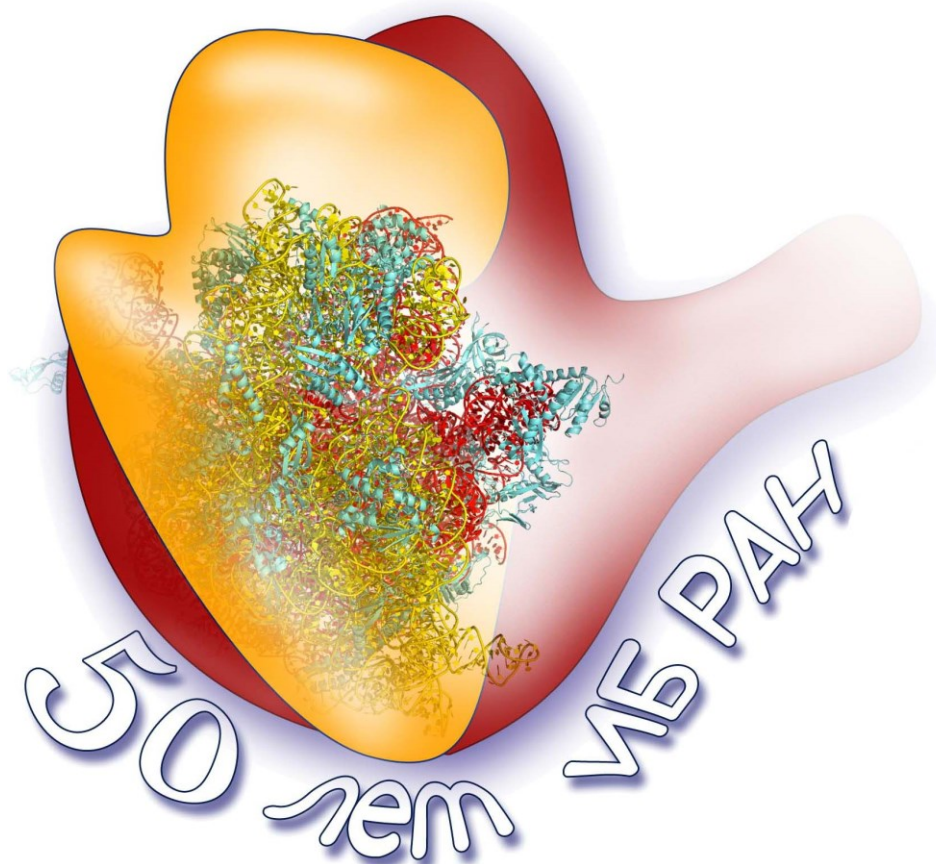


КОНФЕРЕНЦИЯ, ПОСВЯЩЕННАЯ
50-ЛЕТИЮ ИНСТИТУТА БЕЛКА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В КОНТЕКСТЕ СОВРЕМЕННОЙ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ



ПРОГРАММА ТЕЗИСЫ

6 - 9 июня 2017 г.
Пушкино, Институт белка РАН

Оргкомитет конференции:

Сопредседатели: академик А. А. Богданов, д.б.н. В. А. Колб

Члены оргкомитета:

М. М. Юсупов, А.В. Финкельштейн, А.С. Спирин, А. Д. Никулин, Е. Ю. Никонова,
А. А. Минин, М.Н. Брынских

Сотрудники оргкомитета:

О. В. Галзитская, Т. М. Печенкина, Д. В. Росс

Конференция организована при финансовой поддержке

Федерального агентства научных организаций РФ
Российского фонда фундаментальных исследований

Спонсоры конференции



ПУЩИНСКИЕ
ЛАБОРАТОРИИ



ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

6 июня, вторник

10:00 Открытие конференции

10:00-10:30 Вступительное слово сопредседателей оргкомитета Конференции
В.А Колба и А. А. Богданова

10:30 Утренняя сессия

Секция «Биосинтез белка и его регуляция»

Председатель: В. А. Колб

10:30-11:00 М. Yusupov & G. Yusupova «Structural Basis for the Inhibition of the Eukaryotic Ribosome»

11:00-11:30 В. И. Агод и А. П. Гмыль «Стабильность свойств и эволюционный потенциал РНК-вирусов»

11:30-12:00 Кофе-брейк

Секция «Биосинтез белка и его регуляция»

Председатель: Д. Н. Лябин

12:00-12:30 Ж. А. Афонина, А. Г. Мясников, В. А. Широков, В. Д. Васильев, Т. Н. Баймухаметов, И. И. Сорокин, Д. Н. Лябин, А. Л. Васильев, Б. П. Клахольц, А. С. Спирин «Структурная организация эукариотических полирибосом»

12:30-13:00 С. Е. Дмитриев «Факторы инициации трансляции в рибосомном сканировании, выборе стартового кодона и реинициации»

13:00-13:30 А. Г. Рязанов «Альфа-киназы, регуляция синтеза белка и бессмертие зародышевых клеток»

13:30-15:00 Обед

15:00 Дневная сессия

Секция «Биотехнологии. Инструменты исследований»

15:00-15:05 Вступительное слово

15:05-15:30 М. Прохорова (Merck) «Актуальные и перспективные технологии в анализе биомаркеров»

15:30-17:00 Мастер-класс «Мультиплексный анализ биомаркеров xMAP» (первая часть)

17:00 Окончание дневной сессии.

Вечерний клуб (семинарская комната 111).

7 июня, среда

10:00 Утренняя сессия

Секция «Биосинтез белка и его регуляция»

Председатель: Л. П. Овчинников

- 10:00-10:30 И. М. Теренин, В. В. Смирнова, Д. Е. Андреев,
И. Н. Шатский «Механизмы кэп-независимой инициации трансляции у эукариот»
- 10:30-11:00 М. Чекулаева «Механизмы РНК локализации и локальной трансляции в нейронах»
- 11:00-11:30 А. Г. Габдулхаков, И. В. Митрошин, С. В. Тищенко, А. О. Михайлина, Н. А. Невская, С. В. Никонов и М. Б. Гарбер
«Дополнение структуры 50S субчастицы архейной рибосомы»

11:30-12:00 Кофе-брейк

Секция «Структурные и функциональные исследования белков и их комплексов»

Председатель: Е. Ю. Никонова

- 12:00-12:30 E. S. Bochkareva, D. Benhalevy, I. Biran and E. Bibi «Specific recognition of mRNAs encoding integral membrane proteins by constitutively expressed cold shock proteins in *Escherichia coli*»
- 12:30-13:00 S. Steinberg «Regulation of the GTPase activity of the translation elongation factor G»
- 13:00-13:30 М. С. Гельфанд «Сахарное ЛЕГО: от сравнительной геномики и массовых данных к новым генам и их регуляции»

13:30-15:00 Обед

15:00 Дневная сессия

Секция «Структурные и функциональные исследования белков и их комплексов»

Председатель: А. Д. Никулин

- 15:00-15:30 А. Б. Четверин
«30 лет исследований Q β -репликазы: что мы узнали и что предстоит узнать?»
- 15:30-16:00 N. Vasilyev, A. Gao, D. J. Luciano, P. L. Foley, P.-K. Hsieh, J. G. Belasco, A. Serganov
«Surprises at the 5' end of bacterial mRNA»
- 16:00-16:30 С. Н. Рязанцев
«Электронная микроскопия – новая жизнь старого метода»

16:30-17:00 Кофе-брейк

17:00-18:00 Мастер-класс «Мультиплексный анализ биомаркеров xMAP»
(заключительная часть)

18:00 Окончание дневной сессии.

Вечерний клуб (семинарская комната 111).

8 июня, четверг.

10:00. Утренняя сессия

Секция «Биология клетки»

Председатель: Е. С. Надеждина

- 10:00-10:30 А. А. Минин, А. К. Сурин, Л. Я. Иноземцев «Кальпаин нарушает связь митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами»
- 10:30-11:00 V. I. Gelfand «How microtubule motors organize the cytoskeleton»
- 11:00-11:30 N. Lissin, N. Liddy, J. Harper, G. Bossi, S. Paston, P. Molloy, T. Mahon, E. Baston, F. Bianchi, B. Cameron, A. Johnson, P. Todorov, M. Sami, N. Hassan, A. Vuidepot, B. Jakobsen «ImmTAC reagents: high affinity T-cell receptor-based bi-functional biologics for redirected tumour killing»

11:30-12:00 Кофе-брейк

Секция «Развитие теории пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот»

Председатель: А. В. Ефимов

- 12:00-12:30 A. Guskov «A novel mechanism of ribosome dimerization revealed by single-particle cryo-electron microscopy»
- 12:30-13:00 А. Г. Мурзин «Приключения с белковыми структурами»
- 13:00-13:30 A.V. Kajava «Non-globular proteins: from sequence to structure and function»

13:30-15:00 Обед

15:00 Дневная сессия

Секция «Развитие теории пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот»

Председатель: Б. С. Мельник

- 15:00-15:30 С. А. Потехин «Термодинамика стабилизации структуры макромолекул в Институте. Этапы развития»
- 15:30-16:00 Д. Н. Лябин, И. А. Елисеева, А. Н. Доронин, Е. А. Смолин, И. В. Кулаковский, Л. П. Овчинников «Современные подходы к

исследованию функций Y-бокс-связывающего белка 1»

15:30-16:00 Г. В. Семисотнов «Кинетика сворачивания глобулярных белков *in vitro*: от клубка до олигомера»

16:30-17:00 Кофе-брейк

Секция «Развитие теории пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот»

Председатель: А. А. Минин

17:00-17:30 Б. А. Рева «Молекулярная диагностика рака в эпоху персональной медицины»

17:30-18:00 А.В. Финкельштейн «50+ лет самоорганизации»

18:00 Окончание дневной сессии.

Вечерний клуб (семинарская комната 111).

9 июня, пятница

10:00 Торжественное заседание (конференц-зал)

Председатель: В. А. Колб

Выступления академиков А. С. Спирина, Л. П. Овчинникова, гостей, официальных лиц

12:00 Коктейль (холл Института, первый и второй этажи)

12:30 Общая фотография участников конференции (лестница перед Институтом)

14:00 Пикник (поляна за Институтом, неформальный)

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

* Тезисы докладов приведены в авторской редакции

STRUCTURAL BASIS FOR THE INHIBITION OF THE EUKARYOTIC RIBOSOME

Yusupova G, Yusupov M.

Institute of Genetic, Molecular and Cellular Biology, Strasbourg-Illkirch, France

The ribosome is a major target for small-molecule inhibitors. We used X-ray crystallography to determine 16 high-resolution structures of the full 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* in complexes with 12 eukaryote-specific and 4 broad-spectrum inhibitors. All inhibitors were found associated with messenger RNA and transfer RNA binding sites. The study defines common principles of targeting and resistance, provides insights into their mode of action. We also describe the structure of a newly synthesized cyclohexamide analogue in complex with the ribosome. This inhibitor induces cell death in a wide range of in vitro cultivated human cancer cell lines. It is bound to the E-site tRNA CCA-end binding pocket formed by 25S rRNA forming interactions with residues of the protein eL42. This is an unusual feature as so far inhibitory small-molecules targeting the ribosome have mostly been described making contact with rRNA. Amicoumacin A is an antibiotic that was recently shown to target bacterial ribosomes. We have shown that it also inhibits translation in yeast and mammalian systems by affecting translation elongation. Our crystal structure of amicoumacin A on yeast ribosome can be used as a starting point to develop derivatives with a clinical value.

The W255C mutation of the universally conserved ribosomal protein uL3 creates resistance to anisomycin. We have determined structure of the vacant yeast uL3 W255C mutant ribosome and show a disruption of the A site side of the peptidyl-transferase center (PTC). An additional X-ray crystallographic structure of the anisomycin-containing mutant ribosome shows that the presence of this antibiotic restores a "WT-like" configuration to this region of the PTC, providing insight into the resistance mechanism of the mutant.

СТАБИЛЬНОСТЬ СВОЙСТВ И ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РНК-ВИРУСОВ

В. И. Агол и А. П. Гмыль

agol@belozersky.msu.ru

Репликация геномов РНК-содержащих вирусов сопровождается столь значительным числом ошибок, что любая популяция таких вирусов содержит чрезвычайно гетерогенную смесь геномов. Тем не менее, при достаточно постоянных условиях размножения усредненная (консенсусная) последовательность генома вирусных популяций, а также их фенотипические свойства весьма стабильны. Более того, даже вирусы с разного рода повреждениями генома и сниженным в результате этого репродуктивным потенциалом обладают значительной способностью восстанавливать как биологические свойства, так и генетическую структуру. Несмотря на такую консервативность, РНК-вирусы проявляют высокую адаптивную способность к приобретению качественно новых свойств и структур, например, белков и цис-элементов РНК. На примере пикорнавирусов (мелких РНК-вирусов животных, в частности, полиовирусов, других энтеровирусов и кардиовирусов) в докладе, основываясь преимущественно на собственных данных, будет проанализирована природа кажущегося противоречия между стабильностью и изменчивостью РНК-геномов. В основе обоих этих разнонаправленных явлений лежит переплетение общих молекулярных механизмов, таких как дегенеративный характер функциональных элементов белков и РНК, относительно низкая точность репликации, рекомбинация и селекция. Приобретению вирусами качественно новых свойств способствует сочетание повреждения генома (или его функциональная недостаточность при данных условиях) и отсутствие более конкурентно-способных вариантов этого вируса. В популяционной генетике известен принцип Красной королевы: «Чтобы оставаться на своем месте, нужно все время бежать». Можно к этому добавить: «Чтобы убежать вперед, полезно споткнуться».

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

Ж.А. Афонина¹, А.Г. Мясников², В.А. Широков¹, В.Д. Васильев¹, Т.Н. Баймухаметов³, И.И. Сорокин¹, Д.Н. Лябин¹, А.Л. Васильев³, Б.П. Клахольц², А.С. Спирин¹

¹ *Институт белка РАН, Пущино*

² *IGBMC, Strasbourg*

³ *НИЦ Курчатовский институт, Москва*

В процессе синтеза белка в эукариотических клетках образуются полирибосомы. Несколько вариантов пространственной организации полирибосом - циркулярные, зигзагообразные и спиральные конформации, обнаруженные в ранних исследованиях, подтверждены методом криоэлектронной томографии. Циркулярные полисомы привлекают наибольшее внимание из-за их потенциального функционального значения. Общеизвестный механизм циркуляризации полирибосом объясняется, главным образом на основе функциональных данных, опосредованным белками взаимодействием 5'cap-структуры и 3'poly (A) последовательности полисомной мРНК. В рамках этого механизма концы мРНК удерживаются вместе в комплексе с белками eIF4F / PABP, обеспечивая тем самым близость сайтов инициации и терминации, что, в свою очередь, облегчает повторное иницирование путем терминации рибосом. Однако, наши последние данные ставят под сомнение основную роль этого механизма. Мы проанализировали крио-ЭТ трехмерную организацию эукариотических полирибосом, образовавшихся *in vivo* или в бесклеточной системе трансляции с мРНК различной конструкции. Полирибосомы с циркулярной топологией мРНК были обнаружены в лизатах клеток HeLa и в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. Мы обнаружили, что циркулярные полирибосомы формировались в бесклеточной системе не только с экзистированной полиаденилированной мРНК, но также с экзистированной не-полиаденилированной мРНК, а также с мРНК с гетерологичными природными 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (НТО) или с короткими неспецифическими последовательностями (2 и 60 нт соответственно). Таким образом, существует, по-видимому, альтернативный механизм циркуляции мРНК, который не включает в себя специфическое взаимодействие между НТО. Мы выдвигаем гипотезу, что концы полирибосомы удерживает вместе взаимодействие между белками в составе комплексов инициации и терминации/рециклинга.

**ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В РИБОСОМНОМ
СКАНИРОВАНИИ, ВЫБОРЕ СТАРТОВОГО КОДОНА И РЕИНИЦИАЦИИ**

С. Е. Дмитриев

dmitriev_sergey@belozersky.msu.ru

Две основные задачи, которые необходимо решить рибосоме для того, чтобы начать синтез правильного полипептида, – связывание инициаторной Мет-тРНК_i и обнаружение корректного стартового триплета в мРНК. Оба процесса требуют специальных белков – факторов инициации трансляции. Недавние успехи в изучении структуры и функции этих факторов сильно продвинули нас в понимании молекулярных механизмов биосинтеза белка, однако одновременно обнажили и ряд «белых пятен». В докладе будут рассмотрены неканонические пути доставки Мет-тРНК_i на рибосому и некоторые плохо изученные аспекты выбора стартового кодона, в том числе на мРНК с дополнительными вышерасположенными AUG. Будет представлена концепция рибосомного слайдинга, согласно которой узнавание AUG-кодона сканирующим преинициаторным комплексом, образование P_{in}-состояния и остановка сканирования не являются конечной точкой в выборе места начала элонгации: в случае задержки гидролиза eIF2-связанной молекулы GTP 43S комплекс может возобновить движение и «съехать» на нижерасположенный стартовый кодон. Отдельно будут рассмотрены процессы, которые происходят с рибосомой на мРНК, содержащих короткие рамки считывания (uORF). Будут представлены структурные и функциональные аспекты процесса реинициации и участвующие в этом процессе белки, а также механизмы, позволяющие рибосоме сделать выбор между канонической терминацией (с последующей диссоциацией и рециклированием), возобновлением сканирования или отправкой мРНК на нонсенс-опосредованную деградацию (NMD).

ALPHA-KINASES, REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS AND IMMORTALITY OF GERM CELLS

A. G. Ryazanov

ryazanag@rwjms.rutgers.edu

Phosphorylation of elongation factor 2 (eEF2) by eEF2 kinase represents the mechanism of protein synthesis regulation at the elongation stage that was discovered at the Institute of Protein Research (1,2). Sequencing of eEF2K revealed that it has no homology to other protein kinases and represent a new class of protein kinases (3). This class was named alpha-kinases to emphasize that they phosphorylate amino acids located within alpha helices. Later it was found that there are five other alpha-kinases in mammals, the most unusual being channel-kinase TRPM7, a bifunctional protein in which an alpha-kinase domain is fused to an ion channel. This protein plays a key role in the regulation of magnesium homeostasis (4).

For a long time the physiological function of eEF2 kinase remained a mystery. What was the most puzzling is that despite strong effect of eEF2 kinase on global protein synthesis, its knockout in mice did not produce any obvious detrimental effects, but instead makes mice and cells derived from them more resistant to oxidative stress and radiation. This raised a question of why eEF2 kinase is evolutionary conserved if it does not provide any advantage to the organism. Our recent studies demonstrate that while eEF2 kinase is not essential for individual organism, it is essential for maintenance of germline quality and propagation of the species (5). This can help to answer a century-old question of why somatic cells accumulate defects and eventually age and deteriorate, while germ cells do not age and are immortal. It turns out that eEF2 phosphorylation in vivo occurs predominantly in oocytes where it inhibits protein synthesis ensuring selective pressure that results in the elimination of any suboptimal oocyte (5). Thus the eEF2 kinase-mediated inhibition of protein synthesis is an essential step in one of the most fundamental phenomenon in biology, - maintenance of immortality of germ cells.

- (1) Ryazanov et al., Nature, 334, 170-173 (1988);
- (2) Ryazanov and Spirin, New Biol. 2, 843-850 (1990);
- (3) Ryazanov et al., PNAS, 94, 4884-4889 (1997);
- (4) Ryazanova et al., Nature Com., 1, 109 (2010);
- (5) Chu et al., Dev. Cell, 28, 561-572 (2014).

МЕХАНИЗМЫ КЕП-НЕЗАВИСИМОЙ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ

И. М. Теренин, В. В. Смирнова, Д. Е. Андреев, И. Н. Шатский*

shatsky@genebee.msu.su

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ
имени А.Н. Белозерского, Ленинские горы, д.1, стр. 40, Москва 119991.*

Механизмы кеп-независимой трансляции у клеточных эукариотических мРНК являются одной из самых противоречивых проблем в области биосинтеза белка. Первое время после открытия сканирующего механизма инициации трансляции у эукариот и фактора инициации eIF4F исследователи считали, что без кеп-а и eIF4F инициация трансляции или невозможна или протекает на фоновом уровне. Открытие в 1989 году внутренней инициации трансляции у РНК пикорнавирусов, реплицирующихся исключительно в цитоплазме, предложило альтернативный механизм инициации, для которого свободный 5'-конец мРНК и кеп не нужны, а нужны специальные структуры (Internal Ribosome Entry Sites, IRESs). Эти вирусные IRES элементы, расположенные далеко от 5'-конца, направляют 40S субчастицы рибосом на инициаторный кодон. 1991 год сыграл роковую роль в становлении современных спорных представлений о механизме кеп-независимой трансляции у эукариот, когда Masejak и Sarnow показали, что многие эукариотические мРНК продолжают функционировать в клетках, инфицированных полиовирусом, где использование кеп-а невозможно. Это привело к “запугивающей” гипотезе, что IRES-элементы есть и в клеточных мРНК и что они и определяют кеп-независимую инициацию у эукариот. С годами эта гипотеза, не получив строгой экспериментальной проверки, превратилась в “теорию”. Сегодня для многих исследователей кеп-независимая инициация трансляции у клеточных мРНК и IRES-зависимая инициация являются фактически синонимами. На сегодняшний день клеточные IRES’ы “открыты” уже для сотен 5'-НТО клеточных мРНК, включая такие важные матрицы как мРНК для p53, c-Myc, Bcl-2, Apaf-1, XIAP и др., и каждый месяц появляются все новые примеры таких мРНК. Все эти клеточные IRES’ы без исключения были идентифицированы с помощью метода бицистронных кДНК. В докладе будет показано, почему этот метод неизбежно ведет к артефактам, в результате чего на сегодняшний день мы не имеем ни одного достоверного клеточного IRES-элемента. Будут также даны рекомендации как следует правильно доказывать существование IRES'a в той или иной мРНК. Особое внимание будет уделено другим возможным путям кеп-независимой инициации трансляции, не связанным с использованием IRES-элементов. Они основаны на модифицированном сканирующем механизме поиска иницирующего кодона. Совсем свежие публикации в солидных журналах подтверждают существование таких механизмов. Они будут также обсуждаться в докладе. Наконец, будут приведены имеющиеся сведения о белковых факторах, которые вероятно обслуживают кеп-независимую трансляцию. Особенно подробно будут обсуждаться свойства фактора eIF4G2, гомолога большой субъединицы eIF4F, eIF4G1.

**МЕХАНИЗМЫ РНК ЛОКАЛИЗАЦИИ И ЛОКАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В
НЕЙРОНАХ**

М. Чекулаева

ДОПОЛНЕНИЕ СТРУКТУРЫ 50S СУБЧАСТИЦЫ АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ

**А. Г. Габдулхаков, И. В. Митрошин, С. В. Тищенко, А. О. Михайлина,
Н. А. Невская, С. В. Никонов и М. Б. Гарбер**

azat@vega.protres.ru

В начале века появилась серия структур 50S рибосомной субчастицы из галофильной археи *H.marismortui* с высоким разрешением, но боковые выступы Р и L1, а также часть элементов центральной части в этих моделях отсутствовали. В 2013 году нам удалось переуточнить и существенно дополнить модель этой рибосомной субчастицы. Тем не менее, оставались пробелы в структуре подвижных боковых Р- и L1-выступов архейной рибосомы. Для того чтобы заполнить эти пробелы, а также исследовать структурные основы взаимодействия элементов Р-выступа, мы определили пространственные структуры изолированного архейного рибосомного белка L11, комплекса фрагмента 23S рРНК с первыми двумя доменами белка Р0 и этого же комплекса, дополненного белком L11. Кроме того, для детального изучения взаимодействия большой субчастицы архейной рибосомы с антибиотиками тиазольного класса, решена структура комплекса основания Р-выступа архейной рибосомы с тиострептоном. Полученные структуры позволили охарактеризовать траектории движения подвижных доменов архейных рибосомных белков L11 и Р0, а также белок-белковые и рРНК-белковые контакты в составе Р-выступа.

Определенная нами структура специфического L1-связывающего фрагмента 23S рРНК из *H.marismortui* и молекулярно-динамическая модель комплекса этого фрагмента РНК с рибосомным белком L1 из того же организма, были вписаны в структуру 50S рибосомной субчастицы *H.marismortui*. Сравнительный анализ структуры архейной рибосомы с существующими структурами рибосом из других организмов выявил консерватизм РНК-белковых контактов и позволил найти область изгиба спирали 76 в 23S рРНК. В случае *H.marismortui* она располагается в области воббл-пар U2140•G2235 и G2141•U2234. Таким образом, мы видим, что если подвижность Р-выступа зависит от гибкости составляющих его белков, то подвижность L1 выступа обусловлена «шарниром» в спирали рРНК.

SPECIFIC RECOGNITION OF MESSENGER RNAs ENCODING INTEGRAL MEMBRANE PROTEINS BY CONSTITUTIVELY EXPRESSED COLD SHOCK PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI*.

E. S. Bochkareva, D. Benhalevy, I. Biran and E. Bibi

Elena.bochkareva@weizmann.ac.il

Translation-independent mRNA localization represents an emerging concept in cell biology. In order to identify proteins that probably involved in localization of the integral membrane protein encoding mRNAs (MPRs) in *E. coli*, we verified a hypothesis that such mRNAs might be recognized through their uracil-rich segments.

We designed DNA sequences to produce the model untranslatable transcripts that mimic uracil-rich MPRs or cytosolic uracil-normal mRNAs (CPRs). By utilizing in vitro-synthesized biotinylated RNAs and Streptavidin beads pull down method with *E. coli* extracts, we identified a highly specific interaction that takes place between uracil-rich model RNAs and the cold shock proteins CspE and CspC, which are normally expressed under physiological conditions. Co-purification studies with *E. coli* expressing 6His-tagged CspE or CspC confirmed that the specific interaction occurs also *in vivo* with the non-biotinylated uracil-rich model RNAs. Furthermore, high throughput sequence analysis of endogenous RNAs isolated in complexes with 6His-CspE demonstrates overrepresentation of MPRs in these complexes. In addition, over-expression of CspE increased the amount of its most strong binders MPRs in the soluble ribosome-free fraction and on the membrane, and also showed a mild but positive effect on the membrane-expression of the integral membrane proteins. We suggest that the cytosolic complexes of CSPs and particularly of CspE with MPRs might be involved at early stages during MPRs targeting to the membrane.

7 июня _____ Биосинтез белка в контексте современной структурной биологии

**REGULATION OF THE GTPASE ACTIVITY OF THE TRANSLATION
ELONGATION FACTOR G**

S. Steinberg

**САХАРНОЕ ЛЕГО: ОТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ И МАССОВЫХ
ДАННЫХ К НОВЫМ ГЕНАМ И ИХ РЕГУЛЯЦИИ**

М. С. Гельфанд

ТРИДЦАТЬ ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ Q β -РЕПЛИКАЗЫ: ЧТО МЫ УЗНАЛИ И ЧТО ПРЕДСТОИТ УЗНАТЬ?

А. Б. Четверин

Институт белка РАН

Q β -репликаза (РНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Q β) обладает непревзойденной способностью размножать полинуклеотиды *in vitro*. В конце 1985 года в Институте белка была образована группа биохимии вирусных РНК с целью применить эту способность Q β -репликазы для синтеза матричных РНК, используемых в бесклеточной системе трансляции. Хотя практического решения поставленной задачи найдено не было, работа в данном направлении дала ряд неожиданных важных результатов. В частности, разгадана природа "безматричного" синтеза РНК Q β -репликазой, открыта способность молекул РНК к спонтанным рекомбинациям, установлен необычный способ, с помощью которого Q β -репликаза различает свои и чужие матрицы, обнаружена новая функция самого большого рибосомного белка S1, также являющегося одной из репликазных субъединиц. Наконец, получены молекулярные колонии, ставшие основой следующего поколения методов секвенирования нуклеиновых кислот и позволившие по-новому взглянуть на проблему происхождения жизни. Однако до сих пор Q β -репликаза не раскрыла всех своих тайн, и ее исследования сулят новые интересные находки.

SURPRISES AT THE 5' END OF BACTERIAL mRNA

N. Vasilyev¹, A. Gao¹, D. J. Luciano², P. L. Foley², P.-K. Hsieh², J. G. Belasco², and A. Serganov¹

¹*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, ²Kimmel Center for Biology and Medicine at the Skirball Institute and Department of Microbiology, New York University School of Medicine, New York, NY 10016*

mRNA degradation enables rapid changes in protein biosynthesis and affects the adaptability of all organisms to environmental conditions. mRNA degradation is especially important for bacteria, which live in a constantly changing environment. In *Escherichia coli*, hundreds of mRNAs decay through a 5'-end-dependent pathway. It was postulated that the 5'-end-dependent mRNA degradation begins with the conversion of the 5'-terminal triphosphate to a monophosphate by the RNA pyrophosphohydrolase RppH, a member of the Nudix hydrolase superfamily. This event triggers rapid ribonucleolytic attack of mRNA by RNase E as a prelude to further degradative events.

We showed that *Escherichia coli* RppH (EcRppH) requires at least two unpaired nucleotides at the RNA 5' end and prefers either G or A at the second position. To understand the mechanism of RNA recognition and catalysis, we determined the X-ray structures of EcRppH in apo and RNA-bound forms. EcRppH interacts with RNA by a bipartite mechanism involving specific recognition of the 5'-terminal triphosphate and the second nucleotide, thus enabling discrimination against mononucleotides as substrates. The structures and mutational studies suggested a catalytic mechanism and revealed the molecular basis for the preference of the enzyme for RNA substrates bearing guanine in the second position. Together, our data explain the modest sequence specificity of EcRppH and its stringent requirement for at least two unpaired nucleotides at the 5' terminus.

Surprisingly, our structural data suggested that the terminal phosphate at the 5'-triphosphorylated RNA end interferes with the hydrolytic step of the catalysis. Our in vitro kinetics studies showed that EcRppH removes a phosphate from the diphosphorylated RNA ~75-fold more efficiently than it removes pyrophosphate from the triphosphorylated RNA. Therefore, conversion of diphosphorylated RNAs to monophosphorylated ones could be the major function of RppH in cells. Using a new assay, we discovered that several tested cellular mRNAs contain ~50% species in diphosphorylated form in the wild type cells. The content of the diphosphorylated mRNA is higher in the Δ RppH strain. These observations suggest that the 5'-end-dependent RNA degradation requires conversion of the 5'-terminal triphosphate to diphosphate by the activity of a non-identified enzyme. RppH continues the degradation pathway by removing a phosphate from the diphosphorylated mRNA. Thus, our studies challenge a common perception that bacterial mRNAs contain 5'-terminal triphosphate and suggest a new mechanism for the 5'-end-dependent RNA decay.

The 5'-end-dependent mRNA degradation pathway in bacteria could be paralleled with a conceptually similar pathway in eukaryotes. The eukaryotic pathway is triggered by a Nudix hydrolase DCP2, which removes a cap structure from mRNA. Activity of this

enzyme is stimulated by several protein factors. Given principal similarity between 5'-end-dependent degradation in bacteria and eukaryotes, we conducted genetic screening to find protein modulators of the degradation in *E. coli*. We identified the metabolic enzyme diaminopimelate epimerase (DapF) as an accelerator of the 5'-end-dependent mRNA degradation in *E. coli*. Remarkably, DapF directly binds to RppH and stimulates its catalytic activity. DapF converts L,L-diaminopimelate to meso-diaminopimelate, a precursor of L-lysine and an essential component of the bacterial peptidoglycan layer. The ability of DapF to stimulate mRNA degradation has been implicated in the osmotic stress response, amino acid metabolism, and growth phase transitions. These cellular processes are relevant to host-pathogen interactions, and their coordination by RppH may help to explain the importance of this pyrophosphohydrolase for the invasiveness of bacterial pathogens.

To understand the molecular mechanism by which a metabolic enzyme can accelerate RNA degradation, we have determined high-resolution X-ray structures of a quaternary complex comprising *E. coli* RppH, DapF, and their respective substrates. These structures reveal a large binding interface between RppH and DapF that is far from the catalytic site of RppH but somewhat closer to its RNA-binding cleft. This structure and related biochemical data shed light on the mechanism by which DapF stimulates RppH catalysis. The RppH-RNA-DapF complex is the first heteromeric protein assembly involved in bacterial RNA degradation whose structure has been determined in its entirety. The insights gained from these studies may have important implications for the control of mRNA decay in higher organisms due to the functional similarity of the RppH-DapF complex to the protein complexes that decap mRNA in eukaryotes.

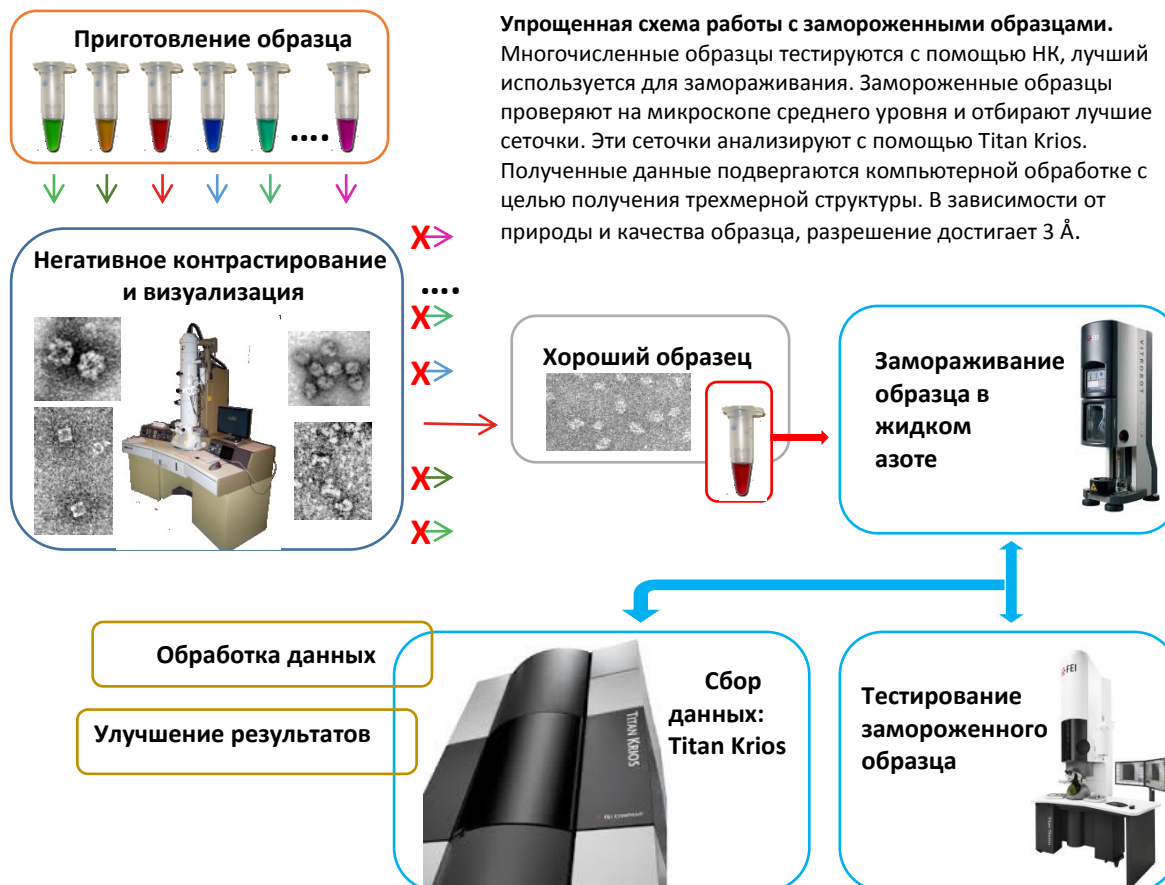
ЭМ – НОВАЯ ЖИЗНЬ СТАРОГО МЕТОДА.

С. Н. Рязанцев и все-все, кто помогал

sryazant@ucla.edu

California NanoSystems Institute at University of California, Los Angeles, USA

Электронная микроскопия (ЭМ) на протяжении последних 50 лет находит широкое применение при исследовании различных биологических объектов. Применительно к биологическим макромолекулам и комплексам (белки, вирусы, рибосомы и пр.) были разработаны методы негативного контрастирования (НК) и оттенения. Оба эти метода широко применялись в Институте Белка. В настоящее время широкое внимание привлекает метод быстрого замораживания (крио-ЭМ) и трехмерной реконструкции индивидуальной частицы, который позволяет решать структуру с разрешением около 3 Å. Этот метод впитал в себя 50-летний опыт ЭМ и является триумфом ЭМ в современной науке. С развитием метода, «второе дыхание» обрели многие классические подходы, включая НК. НК в комбинации с трехмерной реконструкцией индивидуальной частицы позволяет быстро получить модели с разрешением 12-15 Å, что достаточно для молекулярного моделирования. При этом крио-ЭМ имеет свои ограничения, например, по размеру частиц (не менее 150 кДа) и однородности образца. В докладе будет освещено современное состояние ЭМ, обсуждены подходы к решению биологических структур с помощью ЭМ, а также приведены детали метода крио-ЭМ.



8 июня _____ Биосинтез белка в контексте современной структурной биологии

**КАЛЬПАИН НАРУШАЕТ СВЯЗЬ МИТОХОДРИЙ С ВИМЕНТИНОВЫМИ
ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕТАМИ**

А. А. Минин, А. К. Сурин, Л. Я. Иноземцев

HOW MICROTUBULE MOTORS ORGANIZE THE CYTOSKELETON

V. I. Gelfand

ImmTAC REAGENTS: HIGH AFFINITY T CELL RECEPTOR-BASED BI-FUNCTIONAL BIOLOGICS FOR REDIRECTED TUMOUR KILLING

N. Lissin, N. Liddy, J. Harper, G. Bossi, S. Paston, P. Molloy, T. Mahon, E. Baston, F. Bianchi, B. Cameron, A. Johnson, P. Todorov, M. Sami, N. Hassan, A. Vuidepot, B. Jakobsen

nikolai.lissin@immunocore.com

Immunocore Ltd., 101 Park Drive, Milton Park, Abingdon, United Kingdom.

An important group of cancer-associated targets is those presented as MHC class I-restricted peptides. Derived from endogenously processed proteins, and naturally targeted by T cell receptors (TCRs), they represent a much broader repertoire of antigens, compared to those targeted by conventional monoclonal antibodies. However, as a consequence of the negative selection in the thymus, cancer-specific circulating T cells possess low affinity TCRs, which limits their ability to mount a sufficient immune response to destroy tumours. ImmTAC reagents (immune mobilising mTCR against cancer), developed by Immunocore Ltd., are bi-functional biologics comprising soluble high affinity monoclonal T cell receptors (mTCRs) fused to an anti-CD3 single chain antibody. Binding with high affinity to cells presenting a target peptide, even if the peptide is displayed at a low number of copies per cell, ImmTAC reagents are capable of activating unstimulated T cells and re-directing them to release cytokines and kill cancer cells. ImmTAC reagents with specificities to a diverse range of peptide-MHC antigens have been generated and tested. The most advanced ImmTAC reagent, IMCgp100, is an ImmTAC with picomolar affinity to an HLA A2-restricted peptide 280-288, derived from the well-characterised melanoma-associated glycoprotein 100 (gp100). The drug is currently undergoing clinical trials in malignant melanoma in the UK and USA.

.

A NOVEL MECHANISM OF RIBOSOME DIMERIZATION REVEALED BY SINGLE- PARTICLE CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

A. Guskov

University of Groningen

Бактерии способны регулировать активность рибосом через димеризацию 70S рибосом в неактивные 100S комплексы. Мы изучили 100S комплексы рибосом из бактерии *Lactococcus lactis* с помощью крио-электронной микроскопии и обнаружили новый механизм димеризации. В противоположность механизму, установленному при изучении димеризации рибосом в бактерии *Escherichia coli*, где для димеризации необходимо наличие белков hibernation promotion factor (HPF) и ribosome modulation factor (RMF), для димеризации рибосом в *L. lactis* используется двудоменный белок HPF_{long}. N-домен этого белка связывается в том же сайте, что и HPF в *E. coli*, однако C-домен в отличие от RMF, связывается в центре интерфейса димеризации. Более того, в 100S комплексе в *L. lactis* не наблюдаются конформационные изменения в 30S head домене, а последовательность Shine-Dalgarno и вход в туннель мРНК доступны. Деактивация рибосом в *L. lactis* происходит из-за блокировки распознавания мРНК благодаря димеризации HPF_{long}. Биоинформатический и филогенетический анализ показал, что такая димеризация рибосом на основе димеризации белков HPF_{long} является наиболее частым механизмом димеризации рибосом в бактериях.

ПРИКЛЮЧЕНИЯ С БЕЛКОВЫМИ СТРУКТУРАМИ

А. Г. Мурзин

MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge CB2 0QH, UK

От начала в Институте Белка более сорока лет назад, главным предметом моего научного интереса была и остаётся пространственная структура белков. На протяжении всего этого времени, мои исследования в области теоретического анализа и классификации любых белков с известной пространственной структурой давали ответвления в смежные области молекулярной биологии, биохимии, генетики и других дисциплин, породив большое количество совместных проектов с учеными многих стран мира по изучению отдельных белков и белковых (супер)семейств, их вероятного происхождения и эволюции, предсказанию и установлению их структуры и функции. В своем выступлении я расскажу о некоторых наиболее значительных с моей точки зрения “побочных” работах, включая недавнее установление структуры агрегатов тау-белка из мозга пораженного болезнью Альцгеймера.

NON-GLOBULAR PROTEINS : FROM SEQUENCE TO STRUCTURE AND FUNCTION

A.V. Kajava

andrey.kajava@crbm.cnrs.fr

Significant progress has been made in the determination of globular structures with their number today passing over a hundred thousand structures. However, a major portion of proteins carrying fundamental functions also contains non-globular regions that cannot be easily determined neither by experimental structural methods nor by homology modelling. This so-called "dark" proteome mostly consists of intrinsically disordered regions, tandem repeats, amyloidogenic regions, low-complexity sequences and transmembrane domains. The bioinformatics analysis of the "dark" proteome is an emerging concept in protein science. Census and annotation of non-globular proteins requires special computer programs and databases, since the conventional approaches predominantly developed for globular domains have limited success. Discovery of these domains and study of their sequence-structure-function relationship promise to be a fertile direction for research leading to the identification of targets for new medicaments and vaccines. This presentation will provide a survey of current challenges in this area including development of bioinformatics tools for the identification of protein repeats and amyloidogenic regions, prediction of the 3D structure of these proteins, inferring of their functions and links to human diseases.

**ТЕРМОДИНАМИКА СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ МАКРОМОЛЕКУЛ В
ИНСТИТУТЕ. ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ.**

С.А. Потехин

Институт белка РАН.

Доклад представляет собой попытку систематизации основных научных результатов, полученных в лаборатории/группе термодинамики белка Института белка РАН с момента ее организации. В докладе будут сформулированы основные результаты, оценено их значение для понимания принципов организации макромолекул (белки, полинуклеиновые кислоты, липиды, модельные полимеры) и оценке вклада различных физико-химических факторов в энергетику и объемные изменения при конформационных превращениях. Значение новых приборов и методов, созданных при непосредственном участии сотрудников лаборатории, для развития термодинамики стабилизации структуры макромолекул также будет обсуждаться.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ФУНКЦИЙ Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

Д. Н. Лябин, И. А. Елисеева, А. Н. Доронин, Е. А. Смолин, И. В. Кулаковский, Л. П. Овчинников.

lyabin@vega.protres.ru

Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1, YBX1) – это многофункциональный ДНК-, РНК-связывающий белок позвоночных, который входит в семейство белков, содержащих древний, эволюционно консервативный домен холодового шока. В клеточном ядре YB-1 может принимать участие в репликации, репарации, транскрипции ДНК и сплайсинге пре-мРНК. В цитоплазме YB-1 стабилизирует мРНК и участвует в регуляции трансляции, сортировке РНК в микровезикулы. Тем не менее, на настоящий момент нет четкого понимания того, какие при этом клеточные процессы (программы) контролирует YB-1, на каких этапах генной экспрессии он действительно действует и насколько обширно влияние этого белка на экспрессию генов. Одним из всеохватывающих подходов к решению этой проблемы является изучение экспрессии генов в клетках с выключенной и повышенной экспрессией гена *YB-1* современными методами высокопроизводительного секвенирования.

В данной работе мы получили клеточную линию HEK293TΔYB-1, в которой с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9, экспрессия YB-1 была полностью подавлена. Сравнение этой клеточной линии с исходной линией HEK293T и клетками HEK293T, оверэкспрессирующими дополнительный белок YB-1 с плазмиды, позволило установить, что при понижении и повышении количества YB-1 снижается скорость деления клеток. При этом подавление экспрессии YB-1 в клетках не влияет на уровень тотальной трансляции, в то время как оверэкспрессия YB-1 уменьшает тотальную трансляцию примерно на 20-30%. Данные изменения были проанализированы методом рибосомного профайлинга (Ribo-Seq) и высокопроизводительного секвенирования транскриптома (RNA-Seq).

КИНЕТИКА СВОРАЧИВАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ *IN VITRO*: ОТ КЛУБКА ДО ОЛИГОМЕРА

Г. В. Семисотнов

nina@vega.protres.ru

В данной работе приводятся экспериментальные данные и основные результаты исследования кинетических процессов сворачивания глобулярных белков *in vitro*, проводимого в течение 30 лет в лаборатории физики белка Института белка РАН. Формирование структуры белка из развернутого химическими денатурантами (клубкообразного) состояния было исследовано рядом физико-химических методов, отражающих формирование различных уровней структурной организации глобулярного белка (вторичной структуры, гидрофобного ядра, жесткой упаковки боковых групп и четвертичной структуры). Показано, что первым этапом сворачивания белка является формирование значительной части элементов вторичной структуры (и, следовательно, гидрофобных кластеров) белка. Второй этап заключается в формировании гидрофобного ядра глобулярного белка и в его глобуляризации. На третьем этапе происходит достройка (или перестройка) части элементов вторичной структуры и жесткая упаковка боковых групп с восстановлением ферментативной активности. Эти внутримолекулярные процессы существенно разнесены по времени и проявляются в сворачивании всех исследованных глобулярных белков (более 10), различных по типу вторичных структур и топологии укладки полипептидной цепи. Медленные процессы жесткой упаковки боковых групп контролируются как *cis-trans* изомеризацией пролиновых остатков, так и не связанными с пролиновой изомеризацией внутримолекулярными процессами неизвестной природы, и ингибируются при взаимодействии с шаперонами.

Формирование четвертичной (олигомерной) структуры белков зависит от концентрации белка и может происходить как полностью спонтанно, так и контролироваться лигандами и кофакторами.

Финансовая поддержка исследований обеспечивалась грантами Российского научного фонда (грант № 14-24-00157) а также фондов РФФИ, Сороса, Минобрнауки, президиума РАН, HFPS и HHMI.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА В ЭПОХУ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ.

Б. Рева

Институт геномики и многомасштабной биологии при медицинском центре Маунт Синай.

Говоря о молекулярной диагностике рака, необходимо различать две основные задачи: первая задача - это задача ранней и сверхранней диагностики рака. Вторая задача - это определение клинических характеристик конкретного заболевания, что включает в себя определение агрессивности опухоли, прогноз, определение резистентности к определённой химиотерапии, определение генов-водителей рака, активированных молекулярных путей-водителей рака, потенциальных белков-мишеней для лекарств, имеющихся лекарств и резистенции к конкретной направленной терапии.

Основное направление ранней и сверхранней диагностики - это обнаружение мутаций в ДНК крови или в ДНК из смыва внутренних полостей организма. Ведущая гипотеза в поиске мутаций в ДНК крови или в ДНК смыва заключается в том, что если таковые мутации обнаруживаются, то это есть знак того, что человек болен раком. Однако, эта гипотеза была опровергнута парадоксальным образом в недавнем исследовании, проведённом в Нью-Йоркском госпитале Маунт Синай. Было обнаружено, что почти половина женщин, проходящих обследование по поводу менопаузного кровотечения, имеют множественные мутации, обнаруженные в ДНК маточного смыва в ключевых позициях главных раковых онкогенов. Такие мутации наблюдаются во множестве типов раков и свидетельствуют о масштабном процессе онкогенеза. Однако, по статистике заболевают раком не более 10% женщин, которые обращаются по поводу кровотечения. Значит, процессы онкогенеза, во-первых, не всегда заканчиваются заболеванием, во-вторых, они гораздо более распространены, чем следует из статистики заболеваний, в-третьих, существуют естественные механизмы предотвращения развития заболевания, которые необходимо определить и использовать в профилактике раковых заболеваний.

Решение второй задачи молекулярной диагностики базируется на гипотезе о том, что все клинически значимые характеристики заболевания могут быть выведены из основных молекулярных профилей опухоли, т.е. из мутаций ДНК и величин экспрессии генов. Для решения этой задачи мы предложили новый метод молекулярных сигнатур, позволяющий предсказывать клинические характеристики заболевания по величинам экспрессии небольшого количества генов-биомаркеров. В основе данного метода лежит идея гомологического усреднения энергий, предложенная Алексеем Финкельштейном для решения задачи предсказания белковой структуры. Используя большие наборы молекулярных профилей и ключевые клинические характеристики заболевания - продолжительность жизни больных, время возвращения заболевания после первого курса химиотерапии, - мы нашли классификационные гены-маркеры и экспрессионные сигнатуры для предсказания прогноза и эффективности химиотерапии для ~20 разных типов рака.

50+ САМООРГАНИЗАЦИИ

А. В. Финкельштейн

*Лаборатория физики белка Института белка РАН, Пущино, Московская область,
142290, Российская Федерация.
afinkel@vega.protres.ru*

Способность белков спонтанно формировать свои пространственные структуры - давняя загадка молекулярной биологии.

В докладе описаны физические теории, объясняющие возможность быстрой самоорганизации белков (т.е. решающие «парадокс Левинталя» путем оценки времени преодоления свободно-энергетического барьера, разделяющего глобулярные нативные (N) и развернутые (U) состояния белковых цепей, - преодоления как в направлении "от U к N", так и "от N к U". Важную роль в теории играет точка термодинамического (и кинетического) равновесия между состояниями U и N: здесь она получает простейший вид.

Как ни парадоксально, теоретическую оценку времени сворачивания (перехода "от U к N") легче получить из анализа разворачивания белка (перехода "от N к U"), потому что легче наметить хороший путь разворачивания любой структуры белка, чем хороший путь, ведущий к стабильной укладке, которая пока еще неизвестна самой белковой цепи. А так как скорости прямых и обратных реакций равны в точке равновесия (что следует из физического принципа детального равновесия), то, найдя время перехода "от N к U", легко найти и время сворачивания белка (перехода "от U к N") - в хорошем согласии с опытом.

Комплементарный (к теории скоростей переходов) анализ объема конформаций укладок цепи, который нужно, идя "от U к N" в поисках наиболее стабильной структуры белка, просканировать - на уровне формирования и упаковки вторичных структур очерчивает верхний предел времен сворачивания и приводит к аналогичным, хотя и менее точным результатам.

Первая часть этой работы (исследование переходов "от N к U") была поддержана грантами Мед. Института Говарда Хьюза (США), РФФИ и Программы "Молекулярная и Клеточная Биология" Президиума РАН, а её вторая часть (исследование переходов "от U к N") - грантом № 14-24-00157 РФФ.

