

БУЛГАКОВ І. В.[✉], **РАЄВСЬКИЙ О. В.**

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, ORCID: 0000-0001-7031-234X, 0000-0002-7596-6294

[✉] elihbul@gmail.com, (050) 859-13-22

ДОСЛІДЖЕННЯ АТГ БІЛКІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО ФОРМУВАННЯ КОМПЛЕКСУ Atg1, ЙОГО ВЗАЄМОДІЇ З БІЛКОМ Atg8 У ПРОЦЕСІ ДОЗРІВАННЯ АУТОФАГОСОМ

Мета. Спираючись на чисельні дослідження представників АТГ білків із організмів *H. sapiens* та *S. cerevisiae*, ми вирішили дослідити складові компоненти рослинного комплексу Atg1 та визначити характерні відмінності від АТГ білків іншого походження. Подальші етапи включали визначення впливу фосфорилювання амінокислотних залишків на нативну структуру білкової моделі *in silico* та можливого впливу на стабільність комплексу методом молекулярної динаміки. **Методи.** Методологічно можна виокремити процес розробки моделі за відомою послідовністю в програмі AlphaFold 2.0 та наступний механістичний огляд молекулярної рухливості отриманих конформаційних моделей в результаті проведення молекулярної динаміки в програмі Gromacs 4.5 та силовому полі Charmm36. **Результати.** У результаті створення елементів ансамблю та дослідження процесу комплексоутворення АТГ-білків було виявлено геометричні особливості досліджуваних структур та виявлено сайти зв'язування на поверхні компонентів комплексу Atg1, виходячи з передбачених міжмолекулярних взаємодій або описаних даних з мутагенезу. Додатково було проведено аналіз результатів фосфорилювання на конформаційну рухливість зазначених об'єктів. **Висновки.** Застосовуючи методи комп'ютерного моделювання, створено комплекс Atg1 і змодельовано чотири білки, задіяні в його утворенні. Структурні та молекулярні особливості отриманих моделей визначено на основі передбачуваних міжмолекулярних взаємодій.

Ключові слова: *A. thaliana*, АТГ (AuTophagy-related), пост-трансляційні модифікації (PTM), фосфорилювання, Atg1.

Дослідження процесу ініціації та організації аутофагосом є одним із ключових

для розуміння механізмів існування клітин та цілих організмів. Незважаючи на це, ланки цього каскаду міжбілкових взаємодій досі недостатньо вивчені, особливо це стосується рослинних організмів. На сьогодні відомо, що найважливіші ролі в аутофагії всіх видів грають консервативні АТГ (AuTophagy-related) подібні білки. Atg комплексоутворювачі, або ініціатори аутофагії, залучаються у реакції синергічно або послідовно [1, 2].

Основним та досить складним вважається комплекс ініціації аутофагії, відомий як комплекс кіназ Atg1 [3, 4]. Аутофагія сильно індукується голодуванням, і вперше створюється PAS (місце утворення аутофагосом). PAS є структурою, яка утворена накопиченням білків Atg. Комплекс Atg1 функціонує як тригер для утворення аутофагосом за допомогою складання самого PAS [5]. Це структурний кістяк який збирається в першу чергу, тоді як функціональні зміни активності аутофагосоми забезпечуються окремим кластером білків, наприклад ATG5, ATG7, ATG8 [6].

Відомо, що у *Arabidopsis thaliana* білки АТГ1 взаємодіють із білками АТГ11, АТГ13 та АТГ101, які допомагають зв'язувати комплекс АТГ1/13 з аутофагічними мембранами [7]. Отже, протеїнкіназа АТГ1 є провідним регулятором активації аутофагії і займає провідне місце на багатьох етапах цього процесу, проходячи шлях від утворення аутофагосом до її асоціації з мембраною за участі АТГ8.

Встановлено, що першим компонентом у складі PAS є білок-скаффолд АТГ11 [8]. Одне за небагатьох досліджень особливостей рослинної аутофагії, на прикладі *Arabidopsis thaliana*, виявило, що АТГ11, акцесорний білок комплексу АТГ1-АТГ13, виступає в ролі

скаффолду, який з'єднує комплекс з аутофагічними мембранами [9].

Протеїни ATG11, ATG101, ATG1 та ATG13 взаємодіють між собою та з ATG8, зокрема ATG1 зв'язаний з ATG8 через канонічний ATG8-взаємодіючий мотив (ATG Inetracting Motif). [7]. Вплив ATG11 на правильну поведінку комплексу ATG1-ATG13 та вірну доставку аутофагічних везикул до вакуолі, ймовірно, відбувається саме через його взаємодію з ATG8 [9]. На сьогодні досліджено зв'язок Atg1 з ізоляційною мембраною прямою взаємодією з Atg8. Процес взаємодії між ATG1 та ATG8 передбачає наявність АІМ, розташованої в центральній області ATG1 [10].

Процес фосфорилування є надзвичайно важливим сигналом для запуску аутофагії і антагоністично регулюється двома консервативними комплексами Ser/Thr кіназ, TOR (мішень рапаміцину) і AMPK (AMP-регульована кіназа). З'являється дедалі більше доказів того, що активність аутофагії ретельно регулюється пост-трансляційними модифікаціями (PTM). Зазначені PTM здатні змінювати структурну конформацію, стабільність, ферментативну активність та субклітинну локалізацію білків ATG та інших допоміжних регуляторів аутофагії [1]. Гіперфосфорилування ATG13 спричинює зниження спорідненості між ATG1, і, в подальшому, інгібує ініціацію аутофагії в умовах, збагачених поживними речовинами [11].

Отже, всебічне пізнання особливостей «суперкомплексу» має важливе значення для розробки механізму організації взаємозв'язку між білками аутофагічного апарата. Вивчення літературних джерел, щодо особливостей взаємодії між білками комплексу ATG1 та моніторинг біологічних баз даних засвідчив присутність мутаційних даних та відсутність точних структур білків цих партнерів. Грунтуючись у своїх дослідженнях на відомих, передбачених і кристалізованих фрагментах комплексу з різних організмів, ми спробували сконструювати ряд рослинних ATG-білків і спробувати визначити можливий вплив фосфорилування на їх структуру.

Матеріали і методи

Амінокислотні послідовності ізомерів тубуліну людини отримано з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org/). Моделювання білкових структур за гомологією проводили за допомогою AlphaFold [12]. Для повноцінної

роботи програму скомпілювали на кластері у середовищі віртуальної організації CSLab IFBG для проведення розрахунків на ядрах процесорів, а не відеокарти.

Молекулярну динаміку (МД) проводили у водному середовищі з використанням програми GROMACS 4.5. Білок розчиняли та оптимізували за допомогою 10000 кроків алгоритму найкрутішого спуску та 10000 кроків алгоритму градієнта кон'юганта. Потім систему врівноважували (30000 кроків) і релаксували під час вільного МД у водному середовищі (50–200 нс), використовуючи силове поле Charmm36, яке передбачає можливість дослідження фосфорильованих амінокислот. Для підтримки постійної температури системи під час МД при 310 К і тиску 1 бар, що забезпечувався баростатом Паррінелло-Рахмана, було замінено термостат швидкісного масштабування на більш точний термостат Носе-Гувера. Радіус відсічення 14 Å застосовувався як для кулонівської (електростатичної) взаємодії, так і для взаємодії Леннарда-Джонса (VdW) з використанням методу PME (Particle-mesh Ewald) для розрахунку в схемі відсічення Верле.

Стабільність конструкцій визначалась за допомогою вбудованих інструментів для розрахунку радіусу гірації та середнього квадратичного відхилення атомів білкової молекули. Візуалізацію білкових структур та білок-лігандних комплексів проводили за допомогою програми PyMOL.

Результати та обговорення

Намагаючись краще визначити організацію, регуляцію та функції комплексу Atg1 комплексу в рослинах та отримати молекулярні моделі учасників, ми сконструювали їх *in silico* та провели релаксацію цих структур.

Аутофагічна індукція в значній мірі залежить від серин / треонінової протеїнкінази TOR (мішень рапаміцину), яка фосфорилує центральні білки комплексу Atg. Проведені дослідження на дріжджах і хребетних тваринах засвідчили, що процеси фосфорилування виконують життєво важливу роль у ініціюючій фазі аутофагії, забезпечуючи регуляцію збірки та діяльності кіназного комплексу Atg1 [13]. Відомо про результати досліджень, де запропоновані моделі ініціації аутофагії демонструють дефосфорилування ATG13 і активізують взаємодію з ATG1, який, відповідно, активує аутофагію [14].

ATG1 (Q94C95) забезпечує асоціацію з ATG13 і ATG11, беручи участь у селективній аутофагії. Структурно рослинний ортолог представлений білком, розділеним на три домени: N-кінцевий кіназний домен, C-кінцевий глобулярний домен і нативний домен, який їх з'єднує (рис. 1). Глобулярний домен ATG1 складається з двох трьох-спіральных пучків, які з'єднані в тандемі та тісно взаємодіють один з одним, утворюючи єдину глобулярну структуру. Оскільки кожен триспиральний пучок показав високу структурну схожість із доменом MIT (Microtubule interacting and transport), їх було названо MIT1 і MIT2 з N-кінцевого боку. Відомо, що деякі з них, багаті на

фосфорильовані залишки серину, але їхнє значення невідоме. Результати молекулярної динаміки ATG1 свідчать про активну доступність цієї ділянки (світла α -спіраль у фосфорильованому ATG1 на рис. 1), незважаючи на фосфорильовання (показані сферами на рис. 1), таким чином, її ступінь фосфорильовання відіграє вирішальну роль лише для кіназних функцій. ATG1 містить ATG8-зв'язувальний мотив у своїй неструктурованій ділянці, через яку Atg1 безпосередньо зв'язується з ATG8, що, вірогідно, є необхідним для локалізації ATG1 у секвестральній мембрані.

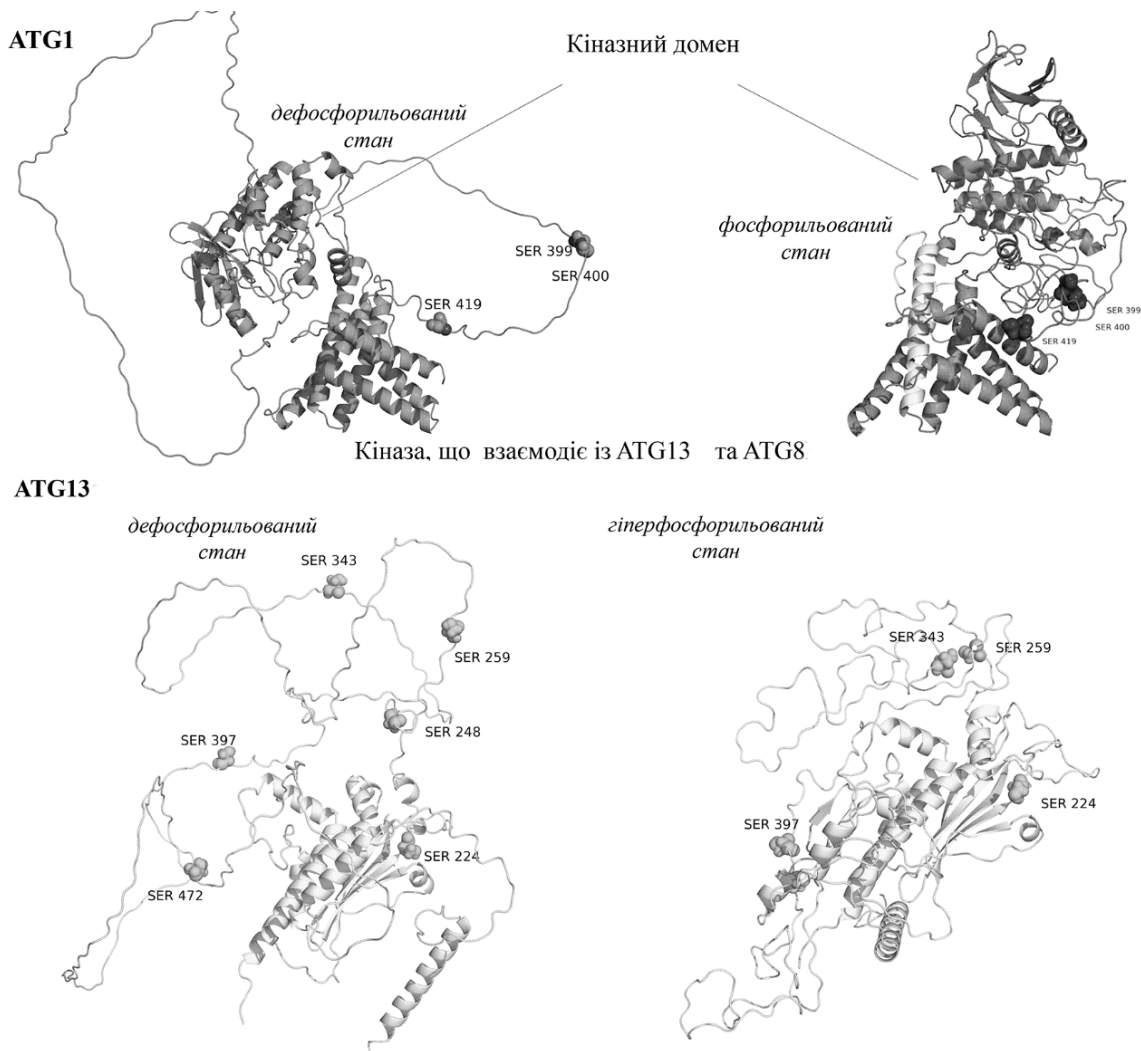


Рис. 1. Структурна організація білків ATG1 і ATG13; розташування сайтів фосфорильовання (показано сферами) і продемонстровано структурні зміни в молекулах залежно від їхнього стану (внесення пост-трансляційних модифікацій) після тривалої молекулярної динаміки.

Натомість, рослинний білок ATG13 (Q9SCK0) структурно розділений на два домени, N-кінцевий глобулярний домен і C-кінцевий нативний домен (рис. 1). Остов складається з 5-ланцюжкового β -шару та 4 α -спіралей з одного боку, а 3-ланцюжковий β -лист доданий до C-кінцевого боку. Глобулярний домен ATG13 має ту саму топологію, що й домен NORMA (Hop1p, Rev7p and MAD2). Цей NORMA домен необхідний для локалізації специфічних аутофагічних комплексів PI3K у PAS.

Починаючи інактивацію TOR (target of rapamycin) шляхом голодування або фармакологічного інгібування, Atg13 швидко дефосфорильовується [15]. Дослідження функціональної стабільності ATG13 було зосереджено на сайтах спільної взаємодії партнерів, які залишалися відкритими під час динаміки фосфорильованого білка (S248, S343, S397, S473). Дефосфорильований білок ATG13 утворює петлю з двома tMIT-мотивами (мотив MIT-взаємодії), завдяки чому може зв'язуватися з ATG1a у відповідних ділянках (тандемний мотив мікротрубочкової взаємодії та транспорту). Відповідно до результатів молекулярної динаміки було продемонстровано, що ефект модифікації залишків помітний лише при одночасному гіперфосфорильованні двох основних залишків S224 та S259.

Лабільна структура з двома tMIT-мотивами, які взаємодіють з ATG1, зберігала свою внутрішню геометрію, водночас, незважаючи на рухливість всієї петлі під час молекулярної динаміки. Виявлено, що на відміну від дефосфорильованого стану, молекула є ще більш стабільною навіть через 500 нс.

Найбільшим білком комплексу є ATG11 (Q9SUG7), він же є і білком-скаффолдом, платформою для взаємного розташування всіх інших білків-елементів комплексу (рис. 2). Аналогічно до інших білків типу Atg11/RB1CC1, Arabidopsis ATG11 містить 4 передбачувані мотиви спіральної спіралі (CC), за якими слідує C-кінцевий домен ATG11. Протомер ATG11 має характерну серпоподібну структуру, що складається з чотирьох α -спіралей, а гомодимеризація через C-кінці призводить до загальної S-подібної структури.

Спируючись на аналіз послідовностей, ми виділили ділянки 522-552, що відповідає за зв'язування із ATG1, і ділянку 546-583, яка відповідає за гомодимеризацію. З іншого боку ATG13 має ATG11-зв'язуючу ділянку, яка містить Ser428 і Ser429. Ці залишки при фосфорильованні беруть участь в утворенні водневих зв'язків з ділянками 122-126 рослинного ATG11.

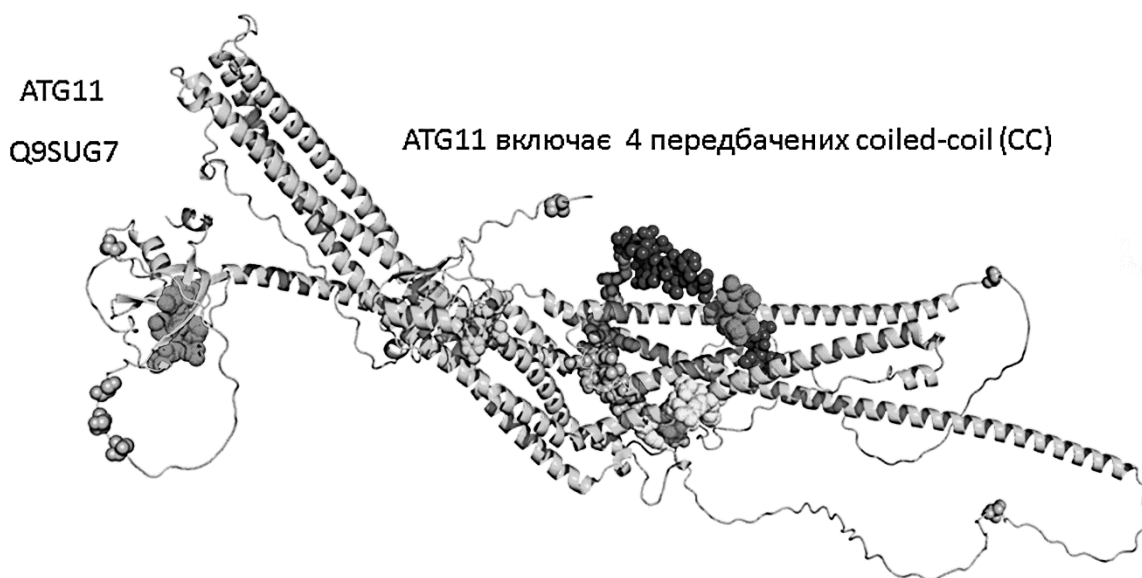


Рис. 2. На поверхні ми змогли виділити ділянки, такі як 522-552, що відповідає за зв'язування із ATG1 (представлена темною поверхнею Конноллі) та ділянка 546-583 відповідає за гомодимеризацію. Червоним маркером показані ділянки взаємодії із ATG8 (на кінцевій ділянці). ATG17-подібний домен включає послідовність Y-X-X-L/V/I-X-E-V/I-X-RR-R/K (представлена світлою поверхнею Конноллі), що, ймовірно, також приймає участь у рекрутуванні ATG8 та ATG9. Сайти фосфорильовання показані сферами.

У результаті молекулярної динаміки ефект від фосфорилування не виявлено, а механізм білок-білкових взаємодій ускладнюється розташуванням сайтів зв'язування на поверхні неструктурованих ділянок. Сама конструкція ATG11 є досить жорсткою і протягом 200 нс не змінили типу укладки. Наступний етап передбачає використання ATG11 для молекулярного білок-білкового докінгу із іншими компонентами Atg1 комплексу.

Водночас було створено і релаксована модель ще одного білка, який не зв'язується безпосередньо із ATG11. Цей малий білок ATG101 (F4K265) не має жодних сайтів посттрансляційних модифікацій та за результатами молекулярної динаміки є надзвичайно стабільним.

Висновки

Підсумовуючи виконану роботу, можна виділити індикатори виконання кожного із етапів поставленої мети. Так було досліджено сиквенс білків комплексу Atg1, змодельовано

чотири 4 білки, які формують комплекс Atg1 та сформульовано їх структурні особливості. У результаті проведених симуляцій ми отримали структури, необхідні для молекулярного білок-білкового докінгу та подальшої інтерпретації взаємодії комплексу з молекулою ATG8. Додатково ми збільшили варіативність конформацій цих молекул шляхом внесення точкового фосфорилування амінокислотних залишків. У свою чергу, це допоможе збільшити ймовірність міжмолекулярної взаємодії або збільшувати спорідненість між цими компонентами під час наступних етапів дослідження, що передбачають молекулярний білок-білковий докінг та довготривалу динаміку отриманих комплексів.

Робота є частиною проекту «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (“Bioinformatic and molecular-cell studies of the structure and functions of the cytoskeleton of plants”) (номер держреєстрації 0120U100937).

References

- Li H., Liao Y., Zheng X., Zhuang X., Gao C., Zhou J. Shedding Light on the Role of Phosphorylation in Plant Autophagy. *FEBS letters*. 2022. Vol. 596 (17). P. 2172–2185. doi: 10.1002/1873-3468.14352.
- Zientara-Rytter K., Subramani S. Mechanistic Insights into the Role of Atg11 in Selective Autophagy. *Journal of molecular biology*. 2020. Vol. 432 (1). P. 104–122. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.017.
- Meyer M. D., Mitchell D., Winzler., Jasmine Taylor, Sophia M. Kilgore., Alex Edicha, Kimberly Chitwood, Chase Spearin, Zachary Silvia, S. K. Nadia Rahman Chakraborty, Ronith Smith, Jesse E. Kennedy, Bridget Zois, Carson Cawthon, Hayley Gilruth, Mukiri Backues, Steven K. Mapping Critical Residues in ATG11's Coiled-Coil 2 Domain that Block Multiple Interactions and Disrupt Selective Autophagy. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022. Vol. 9. 775364. doi: 10.3389/fcell.2021.775364.
- Köfinger J., Ragusa M. J., Lee I. H., Hummer G., Hurley J. H. Solution structure of the Atg1 complex: implications for the architecture of the phagophore assembly site. *Structure*. 1993. Vol. 23 (5). P. 809–818. doi: 10.1016/j.str.2015.02.012.
- Suzuki S. W., Yamamoto H., Oikawa Y., Kondo-Kakuta C., Kimura Y., Hirano H., Ohsumi Y. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. Vol. 112 (11). P. 3350–3355. doi: 10.1073/pnas.1421092112.
- Nakatogawa H., Ohbayashi S., Sakoh-Nakatogawa M., Kakuta S., Suzuki S. W., Kirisako H., Kondo-Kakuta C., Noda N. N., Yamamoto H., Ohsumi Y. The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J Biol Chem*. 2012. Vol. 287 (34). P. 28503–28507. doi: 10.1074/jbc.C112.387514.
- Li Faqiang Chung, Taijoon Vierstra, Richard D. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 2014. Vol. 26 (2). P. 788–807. doi: 10.1105/tpc.113.120014.
- Wen X., Daniel J., Klionsky An overview of macroautophagy in yeast. *Journal of molecular biology*. 2016. Vol. 428 (9 Pt A). P. 1681–1699. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.021.
- Li F., Vierstra R. D. Arabidopsis ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy*. 2014. Vol. 10 (8). P. 1466–1467. doi: 10.4161/auto.29320.
- Noda N. N., Ohsumi Y., Inagaki F. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 584 (7). P. 1379–1385. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.018.
- Wang J., Xu Q., Sun J., Xu Y., Chai G., Berg T., Cernava Z., Ma Y., Chen Post-translational regulation of autophagy is involved in intra-microbiome suppression of fungal pathogens. *Microbiome*. 2021. Vol. 9. doi: 10.1186/s40168-021-01077-y.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F. T., de Beer TAP, Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018. Vol. 46 (1). P. 296–303. doi: 10.1093/nar/gky427.
- Wang Q., Hou S. Type One Protein Phosphatase Regulates Fixed-Carbon Starvation-Induced Autophagy by Dephosphorylating ATG13a to Facilitate ATG1a-ATG13a Formation in *Arabidopsis*. *bioRxiv*. 2022. doi: 10.1101/2022.04.10.487768.

14. Fujioka Y., Suzuki SW., Yamamoto H., Kondo-Kakuta C., Kimura Y., Hirano H., Akada R., Inagaki F., Ohsumi Y., Noda N. N. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2014. Vol. 21 (6). P. 513–521. doi: 10.1038/nsmb.2822.
15. Puente C., Hendrickson R. C., Jiang X. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem.* 2016. Vol. 291 (11). P. 6026–6035. doi: 10.1074/jbc.M115.689646.

BULGAKOV E. V., RAYEVSKY O. V.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osyrovskoho str., 2A*

ANALYSIS OF ATG PROTEINS INVOLVED IN THE FORMATION OF THE ATG1 COMPLEX, THEIR INTERACTION WITH THE ATG8 PROTEIN DURING AUTOPHAGOSOME MATURATION

Aim. Relying on the data from numerous researches on the representatives of ATG proteins from *H.sapiens* and *S.cerevisiae* organisms, we decided to explore the difference between ATG proteins from plant organism. Subsequent stages comprised the determination of *in silico* phosphorylation effects on the native structure of the protein model and the possible influences on the stability of the three-dimensional complex by the molecular dynamics method. **Methods.** Methodologically, one can highlight the process of models elaboration on known sequences in AlphaFold 2.0 program and subsequent mechanistic review of molecular mobility of the obtained conformational models through the molecular dynamics in Gromacs 4.5 program and Charmm36 force field. **Results.** As a result of the model development and exploring the process of ATG-protein complexation, the geometrical specificities of the structures under investigation revealed the binding sites on the surface of the Atg1 complex components. We also suggested some areas for the intermolecular interactions based on the already published data on experimentl mutagenesis. Additively, we performed an analysis of the molecular dynamics simulations in the case of phosphorylation and its effect on the conformational mobility of these objects. **Conclusions.** Applying the computer simulation modelling methods we created the Atg1 complex elements and then analyzed these four proteins participating in the process.

Keywords: *A. thaliana*, ATG (AuTophagy-related), post-translational modifications (PTM), phosphorylation, Atg1.