

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) 859-13-22РЕКОНСТРУКЦІЯ ГЕОМЕТРІЇ МОЛЕКУЛ ATG13 ТА ATG101
У ПРОЦЕСІ СКЛАДАННЯ КОМПЛЕКСУ

Мета. Асоційовані субпротеїни, що утворюють мультибілковий комплекс ATG1 у рослин та ссавців, зокрема ULK1 у людини, є оркестровими протеїнказними atg-одинацями у протистоянні до стимулів стресу різної природи. Визначальне значення в дослідженні сфокусовано на молекулярній природі взаємодії ATG13 і ATG101 з подальшим стикуванням *in silico* з метою реалізації майбутньої інтеграції у мультимерний комплекс, що призводить до збирання PAS-преаутофагосомної структури на першому етапі ініціювання аутофагії. **Методи.** Моделювання білкових структур проводили за гомологією, використовуючи AlphaFold, та з застосуванням програми GROMACS 5.0 втілили молекулярну динаміку (МД) залучаючи силове поле Charmm36. **Результати.** Впроваджуючи методи комп'ютерного моделювання, створено комплекс протеїнказних atg-одинаць для обох білків ATG13 та ATG101 з відображенням інтерфейсу взаємодії та конфірмаційної поведінки задля подальшого інтерпретування при утворенні майбутнього збирання до мультибілкової платформи ULK1/ATG1. **Висновки.** Отримано високоякісну модель-платформу для проведення нами подальшого послідовного дослідження білок-білок-докінгу та білок-білкових взаємодій з можливістю реконструкції великого комплексу ULK1/ATG1 з метою виявлення сайтів зв'язування ATG8.

Ключові слова: *A. thaliana*, ATG (AuTophagy-related), Білок-білковий докінг, ATG101, ATG13.

Аутофагія функціонує як альтернативна форма постачання ключових енергетичних метаболітів під час дефіциту поживних речовин і спрацьовує, насамперед, з метою забезпечення цілісності клітини. Вона також тісно пов'язана з внутрішньою регуляцією клітини, активуючись у відповідь на фактори клітинної регуляції або самостійно ініціюючи процеси деградації. З цими

функціями аутофагії тісно пов'язана регуляція метаболізму, а метаболічна стадія клітини, в свою чергу, впливає на характер і ступінь ініціації аутофагії. Аналогічно, сама по собі її секретація діє як адаптивний клітинний механізм для боротьби зі стресовими стимулами, такими як голод, окислення та інвазія патогенів. У рослинах також були виявлені регулятори та рецептори аутофагії [1]. Аутофагія рослин відіграє певну роль у статевому розмноженні [2]. Циклопальдієва кислота, основний фітотоксичний метаболіт *Diplodia cupressi* (sp. nov. Phillips and Alves), індукує запрограмовану загибель клітин та аутофагію в *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [3].

Всі режими аутофагії підпорядковуються головному молекулярному механізму, який керує клітиною і утворює секвестровані везикули – аутофагосоми, які є визначною морфологічною ознакою цього динамічного процесу. Додаткові компоненти пристосовують аутофагію до мінливих потреб клітини [4]. Центральним елементом цього комплексу є створення аутофагосом – двомембранних везикул, відповідальних за транспортування цитоплазматичного матеріалу до лізосом.

Утворення аутофагосом, характерна риса аутофагії, динамічно регулюється ядром структурно та функціонально консервативних білків, які кодуються генами, пов'язаними з аутофагією (ATGs) [5]. Безліч комплексів генів, пов'язаних з аутофагією (ATG), та кіназними шляхами відіграють ключову роль на кожному етапі аутофагії [6]. Протягом останнього десятиліття було ідентифіковано численні гени, пов'язані з аутофагією (ATG), які необхідні для селективних та/або неселективних функцій аутофагії. Після отримання сигналу до аутофагії білки Atg, які є невід'ємною частиною загального аутофагічного механізму, в першу чергу збираються в безпосередній близькості до фагофора в структурі, відомій як сайт збірки фагофора (PAS) або преаутофагосомальна структура.

© БУЛГАКОВ І. В., РАЄВСЬКИЙ О. В.

Для спрощення наведених вище розмежувань ініціацію аутофагії поділяють на кілька етапів, включаючи (1) ініціацію аутофагії; (2) біогенез аутофагії; (3) розширення фагофора; (4) формування аутофагосоми; (5) злиття з лізосоною; і (6) реформування лізосоми [5]. Фагофор розширюється і врешті-решт перетворюється на зрілу аутофагосому, в якій щільна подвійна мембрана огортає вантаж. Після цього зовнішня мембрана аутофагосоми швидко зливається з мембраною лізосоми, піддаючи деградації її внутрішню мембрану та обгорнутий вміст під дією лізосомальних гідролаз. Зрештою, ці продукти деградації потрапляють назад у цитозоль і використовуються для синтезу білка та інших клітинних функцій [5].

Ключову роль на ранніх етапах цього шляху відіграє мультибілковий комплекс, утворений пов'язаними з аутофагією протеїнкіназами 1 (Atg1) та ATG13, Atg17, Atg29 і Atg31 (ULK1, ATG13, FIP200 і ATG101 у людини) [7]. Цей фактор аутофагії необхідний для формування аутофагосом. У рослинах він також стабілізує ATG13, захищаючи його від протеасомної деградації [8]. Асоціюється з комплексом, що складається з ATG13, ULK1 та RB1CC1; приєднання до цього комплексу вимагає присутності ATG13 [9]. На формування комплексу Atg1 впливає стан фосфорилування ATG13, який діє як адаптерний білок, що зв'язує Atg1 та субкомплекс Atg17 (Atg17-Atg31-Atg29) [10, 11]. Зокрема, Atg1 сса-вців (ULK1/2) взаємодіє з ATG13 та FIP200. Також було виявлено, що ATG101 зв'язує ULK-Atg13-FIP200, діючи безпосередньо на ATG13 [5, 9]. Ці результати [9], свідчать про те, що на очевидні стабільні рівні ATG101, ATG13 та ULK1 впливають ATG101 та ATG13, що підтверджує ідею про те, що ці фактори аутофагії утворюють стабільний комплекс. Ці дані свідчать про те, що ATG13 і ULK1 дефосфорилуються за відсутності ATG101. Таким чином, ATG101 є важливим не тільки для стабільності, але й для базального фосфорилування ATG13 та ULK1. Отже, до основного комплексу залучаються ULK1, RB1CC1, ATG13 і ATG101 [11].

Питанням взаємодії цих двох білків у складі мультимерного комплексу присвячено багато досліджень. Нашою основною метою було побудувати стабільний комплекс типу ATG13-ATG101 з добре згорнутою структурою для подальшої інтеграції в більший комплекс з іншими ATG. Задля досягнення цієї мети ми підготували відповідні конфорації білків ATG13 та

ATG101, отримані з *A. thaliana*, та використали симуляцію докінгу для отримання початкового димеру, а потім релаксували його за допомогою MD-симуляції.

Матеріали і методи

Амінокислотні послідовності ATG13 та ATG101 людини отримано з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org) [12]. Вирівнювання послідовностей проводилось в програмі Clustal W [13]. Моделювання білкових структур за гомологією проводили за допомогою AlphaFold [14]. Для повноцінної роботи програму скампілювали 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 5.0 [15], використовуючи силове поле Charmm36, що передбачає можливість дослідження фосфорильованих амінокислот [16]. Для створення сталої температури системи під час МД при 310 K і тиску 1 бар, що забезпечувався баростатом Паррінелло-Рахмана, було увімкнено 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 відстаней Верле [17].

Стабільність конструкцій визначалась за допомогою вбудованих інструментів для розрахунку середнього квадратичного відхилення атомів білкової молекули від початкового стану.

Результати та обговорення

Протеїнкіназний комплекс ATG1-ATG13 регулює подальші події, необхідні для загортання аутофагосом та/або їхньої вакуолярної доставки. Зазвичай ATG13 (Q9SCK0) стає мішенню аутофагії за нестачі поживних речовин. Пов'язана з аутофагією ізоформа білка 13a (ATG13a) також бере участь в аутофагії в залежності від умов поживного середовища.

В одному з опублікованих досліджень [18], показано, що ATG13a та ATG13b *Arabidopsis* містять однакові межі інтронів та екзонів. Їхні сіквенци вважаються колінеарними по всій довжині – 603 та 625 залишків, відповідно. Тому вся вищезазначена характеристика справедлива і для білка 13b, пов'язаного з аутофагією (ATG13b).

Однак різниця між цими двома білками є значною – було виявлено лише близько 20 % подібності, що свідчить про низький ступінь подібності. Виходячи з цих показників, ми вирішили працювати з першим білком і побудували його структурну модель за допомогою AlphaFold. Молекула ATG101 (F4K265) також була побудована за допомогою AlphaFold. Потім обидві структури релаксували незалежно у великих боксах, заповнених молекулами води, протягом 100 нс, щоб виключити структурне перекриття, яке є наслідком існування сильно неупорядкованих ділянок в обох білках. Наприклад, на відміну від структурованого N-кінця, C-кінець ATG13 є внутрішньо неупорядкованим у всіх ортологів.

Загалом, ступінь подібності між рослинними та людськими/дріжджовими парами білків ATG13 та ATG101 є вкрай низьким, близько 20–30 відсотків ідентичності. Однак позитивні та ідентичні залишки рівномірно розподілені по всій послідовності, що дозволяє припустити, що весь набір вторинних структур повинен розташовуватися подібно до того, як це відбувається в доступних кристалічних структурах (PDB: 4YK8, 5C50). Потім ми застосували надійний та

досить ефективний метод структурної суперпозиції, використовуючи кристалічну структуру людини. Попередньо отримані траєкторії білків були розбиті на рамки і використані в процесі формування білкового комплексу. Це має багато спільного з гнучким докінгом, оскільки жорсткі центральні частини білків завжди добре прилягають до шаблону, у той час, як для подальшого дослідження придатними виявилися лише кілька рамок із траєкторій, коли неупорядковані петлі одного партнера не перекриваються з іншим. Таким чином, білки ATG13 та ATG101 були вирівняні крок за кроком за допомогою методу С-альфа-співставлення.

Після відбору найбільш прийнятних конформацій ми провели молекулярно-динамічне моделювання гетеродимеру, яке тривало 250 нс, що цілком достатньо для релаксації структур, але може бути недостатнім для більш ретельної ідентифікації конформерів (рис.). Як видно з графіка RMSD (середньоквадратичного відхилення), білки комплексу досягають стабільного стану через 150 нс, коли рівень флуктуацій зменшується і коливається в межах 0,1–0,2 нм.

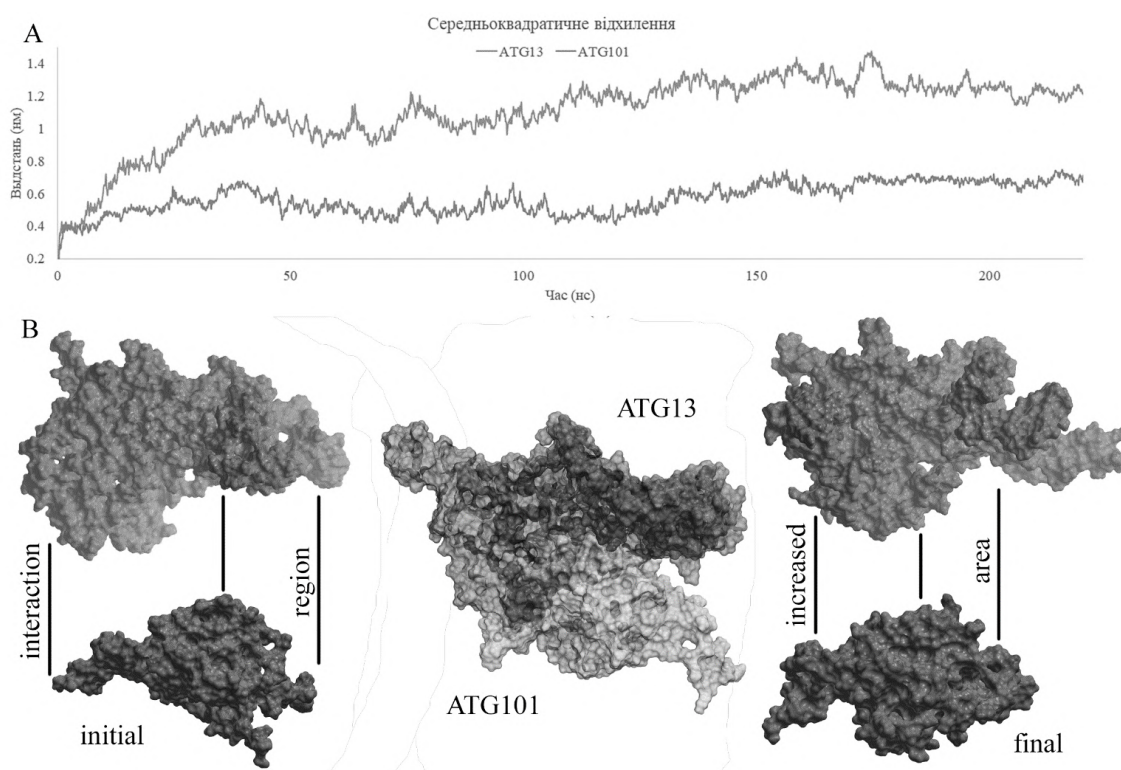


Рис. RMSD-графік демонструє помірне відхилення атомних координат від початкового стану. Остання третина часової шкали відображає зменшення структурної рухливості та остаточну стабілізацію комплексу (А). Області білок-білкового інтерфейсу, позначені світлими вкрапленнями, відповідають ділянкам кожного білка, покритим білком-партнером у початковому та кінцевому станах симуляції (Б).

Інтерфейс взаємодії також оцінювали за допомогою декількох скриптів на python, реалізованих у середовищі PyMol. Очевидно, що в процесі молекулярної динаміки площа контакту збільшилася для обох білків, особливо для ATG101, який рекрутує білок ATG13, обертаючи його навколо себе. Кількість контактів між залишками та загальна стабільність комплексу свідчить про досягнення кінцевої мети етапу досліджень.

Висновки

У результаті структурних маніпуляцій ми отримали високоякісну модель для подальших

досліджень. Вона може бути використана для моделювання в наближеному силовому полі без ризику колапсу системи через внутрішній енергетичний дисбаланс. Наразі модель є платформою для проведення процедур білок-білок-докінгу, що є частиною доступних інструментів для дослідження білок-білкових взаємодій та можливості утворення комплексів. У найближчих планах – реконструкція великого комплексу ULK1/ATG1 з метою виявлення сайтів зв'язування ATG8 на рухомих патернах, які можуть бути стабілізовані міцно зв'язаними білками.

References

- Zeng X., Liu C., Han N., Bian H., Zhu M. Progress on the autophagic regulators and receptors in plants. *Yi chuan = Hereditas*. 2016. Vol. 38 (7). P. 644–650. doi: 10.16288/j.ycz.15-525.
- Kurusu T., Kuchitsu K. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants. *Journal of plant research*. 2017. Vol. 130 (3). P. 491–499. doi: 10.1007/s10265-017-0934-4.
- Samperna S., Masi M., Vurro M., Evidente A., Marra M. Cyclopaldic Acid, the Main Phytotoxic Metabolite of *Diplodia cupressi*, Induces Programmed Cell Death and Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Toxins (Basel)*. 2022. Vol. 14 (7). P. 474. doi: 10.3390/toxins14070474.
- Xie Z., Klionsky D. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*. 2007. Vol. 9 (10). P. 1102–1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102.
- Zhi X., Feng W., Rong Y., Liu R. Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2018. Vol. 75 (5). P. 815–831. doi: 10.1007/s00018-017-2657-z.
- Ke, P.-Y. Molecular Mechanism of Autophagosome–Lysosome Fusion in Mammalian Cells. *Cells*. 2024. Vol. 13 (6). P. 500. doi: 10.3390/cells13060500.
- Stanley R., Ragusa M., Hurley J. The beginning of the end: how scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. *Trends in cell biology*. 2014. Vol. 24 (1). P. 73–81. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.008.
- Mercer C., Kaliappan A., Dennis P. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 2009. Vol. 5 (5). P. 649–662. doi: 10.4161/auto.5.5.8249.
- Hosokawa N., Sasaki T., Iemura S., Natsume T., Hara T., Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*. 2009. Vol. 5 (7). P. 973–979. doi: 10.4161/auto.5.7.9296.
- Fujioka Y., Suzuki S., Yamamoto H., Kondo-Kakuta C., Kimura Y., Hirano H., Akada R., Inagaki F., Ohsumi Y., Noda N. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & molecular biology*. 2014. Vol. 21 (6). P. 513–521. doi: 10.1038/nsmb.2822.
- Kabeya Y., Kamada Y., Baba M., Takikawa H., Sasaki M., Ohsumi Y. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Molecular biology of the cell*. 2005. Vol. 16 (5). P. 2544–2553. doi: 10.1091/mbc.e04-08-0669.
- UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 2018. Vol. 46 (5) P. 2699. doi: 10.1093/nar/gky092.
- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T., Higgins D. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007. Vol. 23 (21). P. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F., de Beer T., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*. 2018. Vol. 46 (1). P. W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427.
- Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M., Smith J., Kasson P., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013. Vol. 29 (7). P. 845–854. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055.
- MacKerell A., Bashford D., Bellott M., Dunbrack L., Evanseck J., Field M., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D., Prodhom B., Reiher W., Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry*. 1998. Vol. 102 (18). P. 3586–3616. doi: 10.1021/jp973084f.
- Abraham M., Teemu M., Roland S., Szilárd P., Jeremy C S., Berk H., Erik L. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*. 2015. Vol. 1–2. P. 19–25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- Suttangkakul A., Li F., Chung T., Vierstra R. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2011. Vol. 23 (10). P. 3761–3779. doi: 10.1105/tpc.111.090993.

BULGAKOV E. V., RAYEVSKY O. V.

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

RECONSTRUCTING OF THE GEOMETRY OF ATG13 AND ATG101 MOLECULES WHILE ASSEMBLING THE COMPLEX

Aim. Associated subproteins which constitute the ATG1 multi-protein complex in plants and mammals, including ULK1 in humans, are orchestral protein kinase atg-units in resistance to stress stimuli across their different nature. The goals of this endeavour were to characterize the molecular nature of the interaction of ATG13 with ATG101, followed by *in silico* docking to catch the plausible ensuing integration into a multimeric complex ULK1/ATG1, which initiates the assembly of a PAS-preautophagosomal structure in the first step of autophagy initiation. **Methods.** Protein structures were modeled by homology using AlphaFold, and molecular dynamics (MD) was performed using GROMACS 5.0 with the Charmm36. **Results.** By implementing computer modeling methods, a complex of protein kinase atg-units for both ATG13 and ATG101 proteins, reflecting the interaction interface and conformational properties, was constructed for detailed interpretation while forming the forthcoming assembly of the ULK1/ATG1 multi-protein platform. **Conclusions.** This study provides a high-quality model platform for further sequential studies of protein-protein docking and protein-protein interactions with the possibility of reconstructing a model of the full ULK1/ATG1 complex to identify ATG8 binding sites.

Keywords: *A. thaliana*, ATG (AuTophagy-related), Protein-protein docking, ATG101, ATG13.