

РОЛЬ ПОСТ-ТРАНСЛЯЦІЙНОГО АЦЕТИЛЮВАННЯ У АСОЦІАЦІЇ БІЛКА АУТОФАГІЇ ATG8 З МІКРОТРУБОЧКАМИ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

О. РАЄВСЬКИЙ^{1,3*}, Д.С. ОЖЕРЕДОВ², Д. САМОФАЛОВА¹,
С.П. ОЖЕРЕДОВ¹, П.А. КАРПОВ¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна

² Інститут високих технологій, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна

³ ТОВ "Енамін", вул. Червоноткацька, 78, Київ, 02094, Україна

E-mail: rayevsky85@gmail.com

*Метою нашої роботи був аналіз механізму впливу ацетилювання залишку Lys40 α -тубуліну TUBA4 з *A. thaliana* на його структуру та взаємодію з білком аутофагії ATG8a. Реконструкцію просторових структур досліджуваних білків здійснювали за гомологією до експериментально доведених кристалічних структур як матриці. Дослідження білок-білкових взаємодій і їх порівняльний аналіз проводили з використанням методів *in silico*. Нами показано, що ацетилювання α -тубуліну по залишку Lys40 призводить до стабілізації його структури в порівнянні з його деацетилюваною формою. Також аналіз результатів обрахунку молекулярної динаміки свідчить про те, що заміна ацетилюваного α -тубуліну в комплексі з білком ATG8 на неацетилювану форму призводить до зменшення кількості контактних амінокислотних залишків та, як наслідок, дестабілізації комплексу в цілому. Отже, ацетилювання α -тубуліну по залишку Lys40 призводить до стабілізації як самого білка, так і його комплексу з білком ATG8.*

Ключові слова: посттрансляційні модифікації, тубулін, ATG8, мікротрубочки, *in silico*, молекулярна динаміка.

Вступ. Аутофагія, відома як висококонсервативний внутрішньоклітинний процес деградації та рециркуляції макромолекул і органел у відповідь на дію стресових чинників навколишнього середовища, патогенний вплив, а також в процесі індивідуального розвитку, притаманна всім еукаріотам, зокрема рослинам (Avin-Wittenberg et al, 2012; Liu and Bassham, 2012; Yoshimoto, 2012). Значну роль у процесі аутофагії відіграють такі структурні елементи цитоскелету, як мікрофіламенти та мікротрубочки (Monastyrskaya et al, 2009; Lytvyn and Blume, 2016).

Зокрема, рядом дослідників підтверджено безпосередню участь мікротрубочок у формуванні (Fass et al, 2006; Olenieva et al, 2019) та трафіку аутофагосом для їх подальшого злиття з лізосомами (Jahreiss et al, 2008) і вакуолями (у випадку рослинної клітини) (Merkulova et al, 2014). Звісно, що до опосередкування взаємодії аутофагосом з мікротрубочками залучені такі моторні білки, як кінезини, динеїни та ряд інших білків, асоційованих з мікротрубочками (Monastyrskaya et al, 2009). Також показано, що лабільні мікротрубочки клітин HeLa здатні локально акумулювати специфічні маркери, які відповідають за формування аутофагосом, в тому числі кон'югати білків Atg12-Atg5 та білок LC3-I (гомолог Atg8 у *Saccharomyces cerevisiae* та *Arabidopsis thaliana*), в той час як стабільні мікротрубочки зв'язують лише дозрілі аутофагосоми (Geeraert et al., 2010). Відомо, що взаємодія різних білків з мікротрубочками ефективно регулюється за допомогою посттрансляційних модифікацій тубуліну (Janke and Magiera, 2020; MacTaggart and Kashina, 2021; Wloga et al, 2017; Verhey et al, 2007; Blume, 2019; Blume et al, 1997; Gardiner, 2019; Parrotta et al, 2014; Smertenko et al, 1997), який, власне, і формує ці філаментні структури як у тварин, так і у рослин.

В останнє десятиріччя особлива увага приділялась вивченню функціональної ролі посттрансляційних модифікацій тубуліну у розвитку процесів аутофагії (McEwan and Dikic, 2011). Перш за все, тубулін у складі стабільних мікротрубочок зазнає посттрансляційних модифікацій, які впливають на ефективність його зв'язування з молекулами мікрооточення, у першу чергу моторними білками та білками, асоційованими з мікротрубочками (Janke and

© О. РАЄВСЬКИЙ, Д.С. ОЖЕРЕДОВ,
Д. САМОФАЛОВА, С.П. ОЖЕРЕДОВ, П.А. КАРПОВ,
Я.Б. БЛЮМ, 2021

Magiera, 2020; Verhey and Gaertig, 2007; Wloga et al, 2017). Найбільш поширеним і добре вивченим серед усіх відомих посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок вважається фосфорилування (Demchuk et al., 2019; Ramkumar et al, 2018; Samofalova et al, 2019). Так, показано, що фосфорилування тубуліну може майже повністю виключити ймовірність полімеризації мікротрубочок (Fourest-Lieuvin et al, 2006). Однак, найбільш критичною посттрансляційною модифікацією тубуліну для процесів аутофагії є саме ацетилювання завдяки його впливу на рівень полімеризації мікротрубочок (Howes et al, 2014; Janke et al, 2017; Takemura et al, 1992). На даний момент отримані експериментальні підтвердження впливу ацетилювання тубуліну на стабільність його гетеродимерів (Chu et al, 2011). В свою чергу, стабілізація гетеродимеру тубуліну підвищує ймовірність утворення стабільних мікротрубочок і забезпечує їх від механічного старіння (Portran et al, 2017). Незважаючи на те, що значна частина компонентів, які беруть участь у цьому процесі, вже описана, сам механізм стабілізації мікротрубочок за рахунок цієї модифікації і досі не з'ясований, а отже потребує подальших досліджень (Eshun-Wilson L et al, 2019).

З огляду на вищесказане, найважливішою у цьому відношенні мішенню для ацетилювання α -тубуліну є його амінокислотний залишок Lys40 (Takemura et al, 1992). Приєднання ацетатної групи до кінцевого азоту в структурі цього залишку (Lys40 – Lys 40Ac) є не єдиним доведеним випадком такого типу посттрансляційної модифікації, проте, що стосується саме α -тубуліну, її роль є надзвичайно важливою для процесів динамічної реорганізації мікротрубочок. Результати ряду досліджень свідчать про участь ацетилтрансферази α TAT, яка є типовою для тваринних клітин, в ацетилюванні α -тубуліну за залишком Lys40 (Eshun-Wilson et al, 2019; Rayevsky et al, 2019), але все ще не зрозуміло, як цей процес відбувається. Вхід до місця ацетилювання стерично недоступний, оскільки він знаходиться в люмені, внутрішній поверхні мікротрубочки (Eshun-Wilson et al, 2019; Xu et al, 2017). Цікаво, що в рослинах не виявлено ані α TAT, ані її гомологів з такою ж передбаченою функцією. Водночас, в клітинах рослин присутні MYST- і p300-подіб-

ні білки, здатні ацетилювати білки, а також деацетилази HDA6/12, які забезпечують зворотний процес (Adamakis et al, 2019; Rayevsky et al, 2016). До складу мікротрубочок *A. thaliana* входять також деацетилаза 14 (HDA14), асоційована з протеїнфосфатазою PP2A (Tran et al, 2012). Ще більш важливо, що у складі мікротрубочок *A. thaliana* виявлена еволюційно високонсервативна гістонацетилтрансфераза ELP3, здатна ацетилювати тубулін (Tran et al, 2012). Білки аутофагії також входять до ряду субстратів цих білків, і найцікавішим є те, що вони можуть контактувати як з мікротрубочками, так і з окремими молекулами α -тубуліну (Suzuki et al, 2014; Mackeh et al, 2013; Geeraert et al, 2010). У той же час ацетилювання мономерів α -тубуліну не перешкоджає процесу полімеризації, навіть якщо всі інші необхідні компоненти є в розчині (Wloga et al, 2017).

Зокрема встановлено, що білок Atg8 *A. thaliana*, гомолог білка LC3 людини, є білком, асоційованим з мікротрубочками (Ketelaar et al, 2004). А нещодавно виявлено, що цей білок у рослин також посилено експресується паралельно з підвищенням рівня ацетилюваного α -тубуліну (Lytvyn et al, 2018; Olenieva et al, 2019). Для того, щоб глибше зрозуміти роль ацетилювання α -тубуліну в реорганізації мікротрубочок в процесі розвитку аутофагії та візуалізувати супутні зміни в його молекулярній структурі, які можуть забезпечувати взаємодію мікротрубочок з білком Atg8, нами було здійснено спробу змодельовати цей процес *in silico*. За допомогою моделювання молекулярної динаміки було успішно визначено особливості поведінки ацетилюваного залишку Lys40 α -тубуліну у порівнянні з його неацетилюваним станом. Ті ж самі вихідні початкові координати були використані для дослідження ситуації, коли α -тубулін перебуває у комплексі з білком ATG8. Завдяки отриманим результатам була побудована структурна модель α -тубуліну в комплексі з ATG8 для дослідження залежності карти їх взаємодії в залежності від зміни стану ацетилювання α -тубуліну.

Матеріали і методи. Для досліджень були використані білки (таблиця), інформація щодо амінокислотних послідовностей яких була взята з відкритої бази даних UniProt (<http://www.uniprot.org>). Пошук матриць для реконструкції

просторової структури досліджуваних білків здійснювали у відкритій базі даних RCSB (www.rcsb.org). Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей цих білків здійснювали за допомогою програми ClustalX2.1 (http://en.bio-soft.net). Для реконструкції молекули α -тубуліну з *A. thaliana* як матрицю використовували експериментально доведені структури тубуліну *Bos taurus* та *Sus scrofa* (PDB ID: 1Z2B, 1TUB), які були обрані завдяки їх високому ступеню гомології (83 %) до білка-мішені (Rayevsky et al, 2019). Для реконструкції білка ATG8 як матрицю використовували гомологічну білкову молекулу із *Solanum tuberosum* (PDB ID: 5L83). Для оцінки якості моделі використовували алгоритм QMEAN (Benkert et al, 2008), тоді як структури тубулінів з *A. thaliana* та *Homo sapiens* були побудовані та оптимізовані уfvb раніше і не потребували додаткового аналізу (Rayevsky et al, 2019, 2021).

Ацетилювання амінокислотного залишку Lys40 в молекулі α -тубуліну моделювали за допомогою програмного пакету PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrodinger, LLC версія 1.5.0.4). Оригінальний масив даних про топологію амінокислотних та нуклеїнових залишків, що входить до пакету силового поля CHARMM36, був змінений шляхом впровадження додаткової інформації про структуру ацетильованого лізину згідно даних літератури та офіційного веб-сайту CHARMM (Grauffel et al., 2010, Lee et al, 2015). Останні 10 залишків від С-кінця молекули тубуліну, які зазвичай є дуже гнучкими і тому відсутні в рентгенівських структурах, були також реконструйова-

ні, але не враховувались під час остаточного аналізу (Freedman et al, 2011). Молекулу ГТФ було введено до моделі просторової структури з використанням зовнішніх параметрів топології, створених на сервері SwissParam (Zoete et al, 2011). Ефекти ацетилювання залишку Lys40 оцінювали за результатами обрахунку молекулярної динаміки в програмному пакеті Gromacs 5.1.4. Для мінімізації енергії системи використовували повноатомне силове поле CHARMM36 за алгоритмом крутого спуску на 20000 кроків з інтервалом ітерацій 2 фс. Врівноваження розчинника здійснювалось із застосуванням позиційних обмежень, накладеними на атоми білкових структур, тоді як молекули розчинника залишались рухливими протягом усіх 100 пс. Кожну систему поміщали в куб, де шар молекули води TIP3P становив 10 Å. Кінцеві системи нейтралізували додаванням іонів Na⁺ та Cl⁻ для досягнення концентрації 150 мМ. Всі обрахунки виконували в періодичних граничних умовах з використанням алгоритму термостату з масштабуванням швидкості для підтримки температури (310 K) та алгоритму баростату Паррінелло-Рахмана для постійного тиску (1 бар) (Parrinello et al, 1981, Bussi et al, 2007). Довгі незв'язані взаємодії прораховували з використанням методу Particle-Mesh-Ewald (PME) (Abraham et al, 2011). Всі досліджувані окремі молекули та їх комплекси були релаксовані шляхом обрахунку короткотривалої молекулярної динаміки (МД) протягом 500 нс.

Прогнозування місця зв'язування тубуліну і білку ATG8 проводили за допомогою алгоритму ODA (Fernandez-Recio et al, 2002) в сере-

Інформація про досліджувані білкові об'єкти

Мішень	Назва білка	Назва гена і його джерело	UniProtKB
Тубулін	Тубулін α -4	TUA4 <i>A. thaliana</i>	Q0WV25
	Тубулін α -4A	TUBA4A <i>H. sapiens</i>	P68366
Убіквітинподібний білок	Білок, пов'язаний з аутофагією 8a	atg8a	Q8LEM4
	Білок, асоційований з мікротрубочками (MAP) 1A/1B light chain 3B	<i>A. thaliana</i> MAP1LC3B <i>H. sapiens</i>	Q9GZQ8

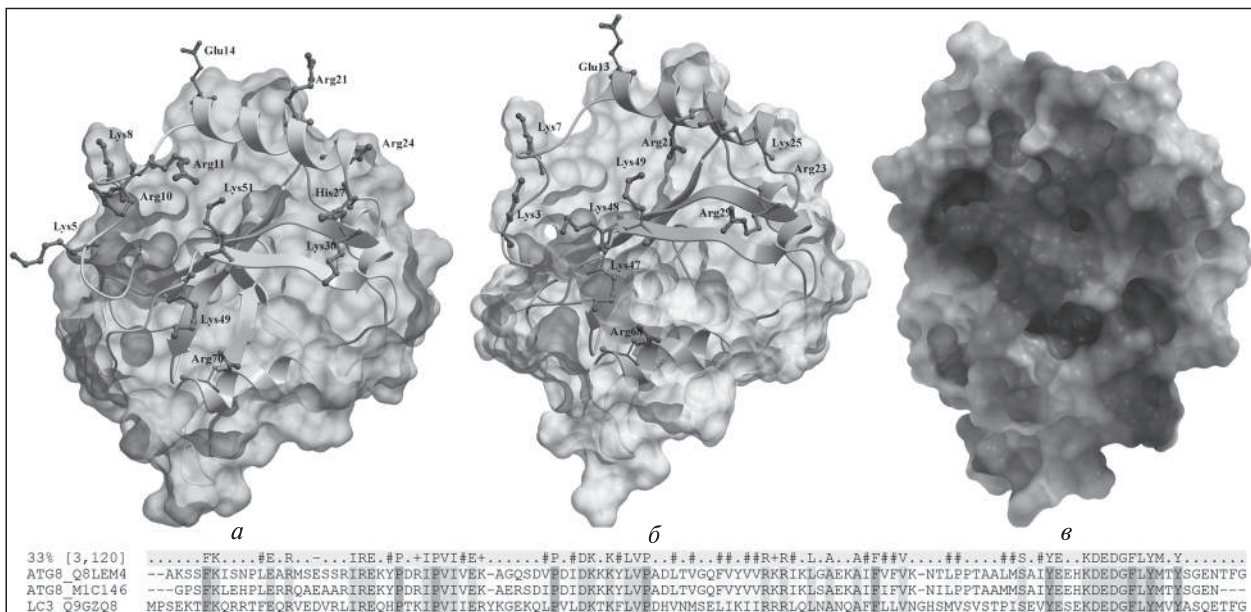


Рис. 1. Білок LC3 людини (а), вирівняний відносно його рослинного гомолога ATG8 *A. thaliana* (б) із запропонованою ділянкою зв'язування α -тубуліну на N-кінцях молекули. Вся структура показана у вигляді стрічки/поверхні і показаними залишками, подібних до людських, що беруть участь в білок-білковій взаємодії. В обох випадках електростатична карта розглянутої області заряджена позитивно (в)

довищі PRED-PPI (Guo et al, 2010) і на сервері MetaPPI (<http://projects.biotec.tu-dresden.de/metappi/>), спираючись на результати досліджень, пов'язаних з білком LC3 (Kraft et al, 2016). Також було проведено RMSD-кластеризацію траєкторій молекулярної динаміки білка ATG8 та α -тубуліну з метою пошуку їх найбільш стабільних та часто повторюваних конформацій після перших 50 нс. Для зондування певних епітопів на поверхнях молекул білка ATG8 та α -тубуліну було використано програмне забезпечення Molsoft (Grosdidier et al, 2009), що передбачає гнучку процедуру докінгу, сканування вихідних позицій з подальшою мінімізацією комплексів ліганд-рецептора.

Результати і обговорення. Оскільки головною мішенню наших досліджень був білок аутофагії ATG8 рослинного походження (Uniprot: Q8LEM4), пов'язаний з аутофагосомами, нами була реконструйована його тривимірна структура. З цією метою був використаний кристалізований гомолог білку ATG8 із *S. tuberosum* [PDBID: 5L83], оскільки він характеризується не лише високим рівнем подібності послідовностей з *A. thaliana* (86 %), а навіть і розподілом подібних/однакових залишків по всій довжині

вирівнювання (рис. 1). Як свідчать результати порівняльного аналізу, білок ATG8 суттєво відрізняється від ортолога MAP1LC3В людини (Uniprot: Q9GZQ8), демонструючи лише 37 % ідентичності. Однак найважливіші позитивно заряджені залишки аргініну, які, як було доведено, мають вирішальне значення для взаємодії з С-кінцевим хвостом молекули α -тубуліну, є консервативними та займають однакове положення (рис. 1).

Раніше нами вже повідомлялось про результати аналізу поверхні та інтерфейсу білок-білкової взаємодії реконструйованого (рослини/тварини) фрагменту мікротрубочок та зондування його поверхні (Rayevsky et al, 2019). Фізично залишок Lys40 знаходиться далеко від контактної поверхні димеризації субодиниць тубуліну. Саме тому це не повинно безпосередньо впливати на процес димеризації, і це припущення збігається з результатами уже відомих досліджень, які також свідчать на користь того, що не існує температурно-залежного впливу на полімеризацію модифікованих димерів тубуліну (Howes et al, 2014; Maruta, 1986; Minoura et al, 2013). Проте вплив ацетилювання α -тубуліну на взаємодію з таким MAP, як білок

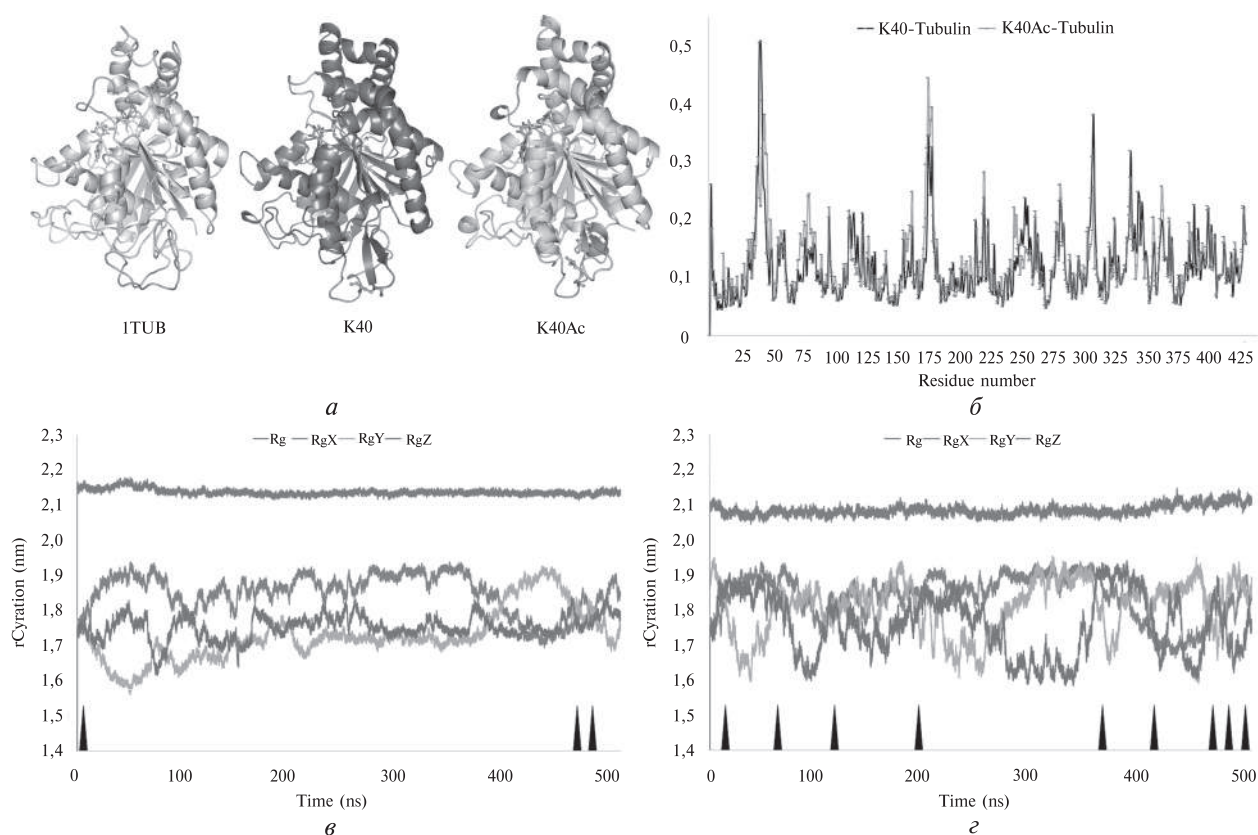


Рис. 2. Найбільш стабільні конформації немодифікованого та ацетилюваного α -тубуліну (Lys40Ac) після молекулярної динаміки, вирівняні до структури закристалізованого димеру тубуліну [1TUB] для візуалізації локальних змін у двох окремих моделях (а). Діаграма RMSF, з даними по окремих залишках (б), та два графіки, що демонструють різницю в радіусі гірації, кількості конвергенцій (позначених піками), — розраховані для деацетилюваного та ацетилюваного білків (в та г, відповідно)

ATG8, сайт зв'язування якого знаходиться дуже близько до поверхні димеризації, потребує подальшого дослідження.

Для з'ясування цього питання нами було проведено порівняльне дослідження окремих молекул α -тубуліну з ацетилюваними та неацетилюваними залишками Lys40 за допомогою молекулярної динаміки. Оскільки ацетилювання позитивно зарядженої амінокислоти зменшує її основність і нейтралізує ефект кінцевого азоту, це, в свою чергу, має змінити загальну картину розподілу заряду і впливати на рухливість деяких окремих амінокислотних залишків. Структурні перестановки, які залежать від стану ацетилювання α -тубуліну, та відповідні відмінності показників на графіках, включених до рис. 2, дозволяють інтерпретувати такий взаємозв'язок. Наприклад, відміча-

ється експозиція у водне середовище неацетилюваного залишку Lys40, який є дуже гнучким у порівнянні з ацетилюваною формою, і всі залишки навколо положення Lys40 залишаються у своєму неупорядкованому стані як в матриці (α -тубулін *S. scrofa*) з димеру, так і в деацетилюваному α -тубуліні по залишку Lys40 з *A. thaliana*.

У той же час було виявлено, що після кепування залишку Lys40 ацетилюваною групою ця неупорядкована область перетворюється у α -спіраль, а сам ацетилюваний залишок орієнтується всередину білка. Верхня петля вихідної структури 1TUB, яка бере участь у процесі димеризації тубуліну, подібна до орієнтації та конформації петлі у ацетилюваній формі. Це означає, що взаємодія тубулін-тубулін може бути порушена, при цьому верхня петля також

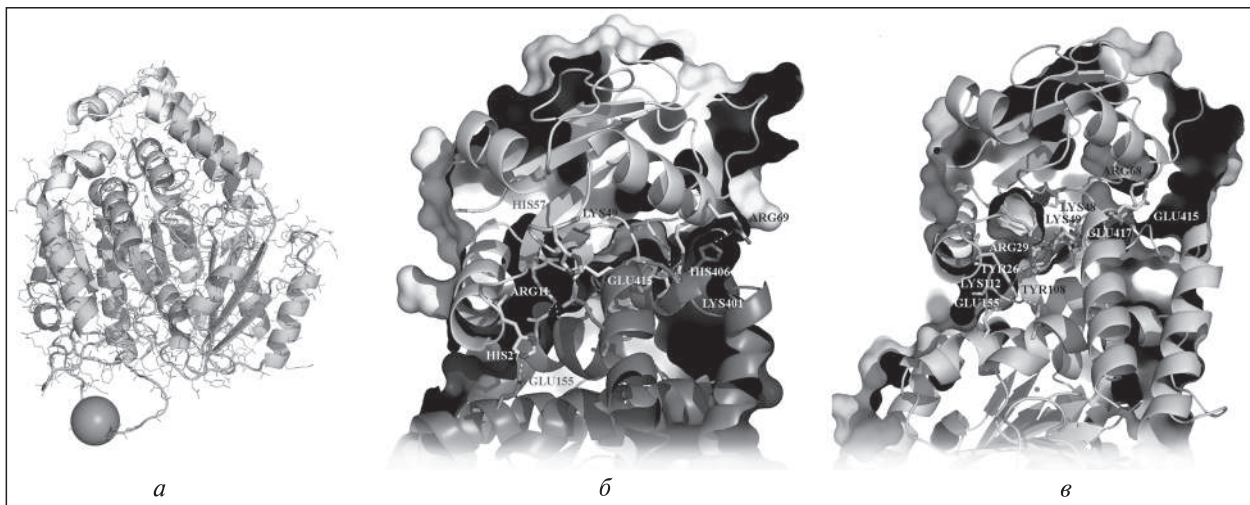


Рис. 3. Прогнозування білково-білкової взаємодії та стикування α -тубуліну з білками аутофагії LC3/Atg8. Зображення поверхні та стрічки молекули α -тубуліну із запропонованим сайтом зв'язування MAP (висвітлена верхня частина) та його місцем ацетилювання, що відмічено кулею (а). Білок LC3/Atg8 (зверху із залишками поверхні Конноллі) прикріплений до епітопу тубуліну людини/рослини (б і в) (знизу)

помітно структурується. Цікаво, що після введення ацетильної групи вся структура білку стає більш стабільною, що відображається у частоті конвергенції між усіма трьома графіками показників радіуса гірації, які відображають ступінь деформації молекули в трьох площинах протягом молекулярної динаміки. Це дозволяє зробити висновок, що ацетилювання Lys40 стабілізує просторову структуру досліджуваного білку та сприяє утворенню білок-білковим взаємодій.

Однак, незважаючи на деяку кореляцію із згаданим вище результатами експериментальних досліджень, нами було вирішено продовжити аналіз впливу ацетилювання залишку Lys40 на комплексі α -тубуліну з білком ATG8. З метою дослідження впливу ацетилювання цього залишку на взаємодію білків мікротрубочок було проведено білково-білкових взаємодій. Ідентифікація сайту зв'язування на поверхні молекули тубуліну базувалась на раніше отриманих даних, що описують взаємодію α -тубуліну людини із ключовими амінокислотними залишками білка LC3 (MAP 1A/1B light chain 3B) з тубуліном людини (Kouno et al, 2005; Monastyrskaya et al, 2009). С-кінцевий хвіст α -тубуліну відповідає за зв'язування з цим MAP. Очевидно, що позитивно заряджена поверхня білку ATG8 могла б чудово контакту-

вати із негативно зарядженим С-кінцевим хвостом α -тубуліну. Подальше порівняння отриманих результатів з літературними даними дозволило нам максимізувати достовірність моделювання шляхом візуального накладання, прогнозування і білок-білкового докінгу.

Вся додаткова інформація, що стосується особливостей взаємодії білка ATG8 з α -тубуліном, була отримана за результатами аналізу фолдингу ATG8 (Noda et al, 2011; Weiergräber et al, 2013). Результати білок-білкового докінгу білків LC3/Atg8 та α -тубуліну демонструють відповідність поверхневих профілів сайту зв'язування N-кінцем аутофагічних білків (рис. 3). Наші припущення відповідають обчислювальним прогнозам, що були виконані онлайн-серверами, передбаченням PPI, серверами MetaPPI та літературними даними (Kouno et al, 2005; Littauer et al, 1986). Після того, як нам вдалось виявити, що структура ацетилюваного α -тубуліну зазнає деяких змін, було проведено докінг молекули білка ATG8 на поверхні молекули тубуліну у початковому стані та найбільш стабільній конформації за умов моделювання молекулярної динаміки, що представлені на рис. 2. Нами визначено, що не зважаючи на всю просторову подібність між ацетилюваними та деацетилюваними формами α -тубуліну (за результатами оцінки молекулярної динаміки),

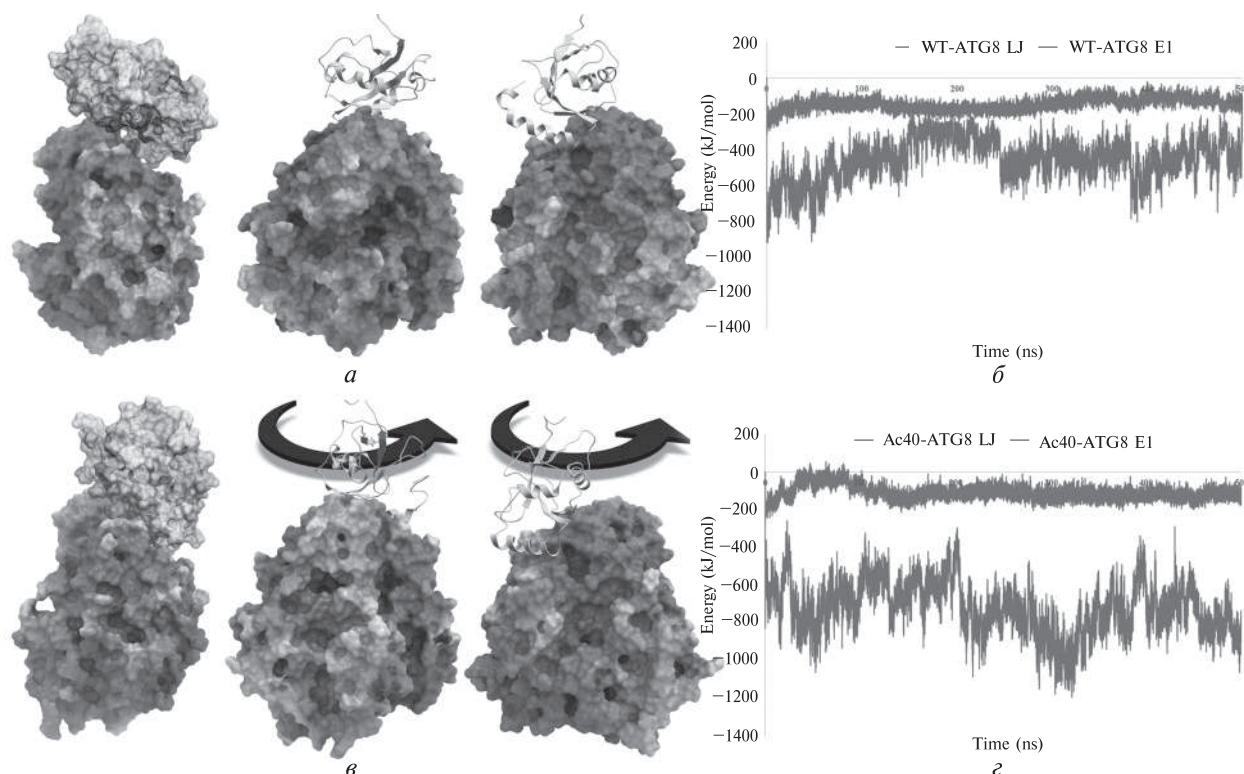


Рис. 4. Різні проекції комплексів тубуліну і ATG8 на 250 нс моделювання молекулярної динаміки із згенерованою електростатичною поверхнею. Ацетилований за залишком Lys40 α -тубулін утворює щільні контакти із поверхнею молекули білка ATG8 (а). Графік електростатичної та Ван-дер-Ваальсової енергій, що описує поведінку системи в динаміці (б). Подібне представлення комплексу Lys40Ac- α -тубуліну/ATG8 та його енергій взаємодії (в, г відповідно)

лише один отриманий комплекс білка ATG8 з немодифікованим α -тубуліном має подібні до комплексів за участю ацетилованого тубуліну показники оцінювальних функцій докінгу. Для визначення функціональної важливості процесу ацетилювання у взаємодії ATG8/ α -тубуліну було проведено два моделювання тривалістю 500 нс (неацетилованої та ацетилованої за залишком Lys40 форм α -тубуліну).

Для підтвердження того, що ацетилювання є виключно важливою передумовою для зв'язування ATG8, ми замінили Lys40Ac на Lys40, намагаючись відслідкувати будь-які тенденції до дисоціації ATG8 від немодифікованого α -тубуліну. Результати обрахунку молекулярної динаміки досліджуваного комплексу у водному оточенні вказують на вищу стабільність та силу електростатичної взаємодії між білками в комплексі з ацетилованим α -тубуліном (рис. 4). Результати аналізу водневих зв'язків,

що утворюються між двома білковими інтерфейсами, свідчать про незмінність їх кількості впродовж усієї молекулярної динаміки лише для білка зацетилованим Lys40 (Lys112-Ala14, Tyr108-Arg29, Gly410-Lys48, Glu411-Lys49, Ser193-Tyr26, Glu155-Tyr26, Met413-Arg68, Glu415-Arg68, Glu417-Arg29). У випадку комплексу неацетилованого α -тубуліну/ATG8 всі згадані пари взаємодіючих залишків зникали один за одним, що призводило до повного порушення контакту.

Структурний аналіз цих траєкторій дозволив нам визначити загальні тенденції утворення α -спіралі у відповідь на обмеження ацетильної групи та горизонтальну орієнтацію N-кінцевої спіралі молекули білка ATG8. Як показано на рис. 4, нами не виявлено жодних критичних змін в електростатичній карті поверхні обох станів тубуліну (Lys40/Lys40Ac). Але в той же час позитивно заряджена N-кін-

цева спіраль молекули білка ATG8 відштовхується від молекули тубуліну на 120 нс, створюючи фізичні передумови для дисоціації молекули білка ATG8 від молекули неацетилюваного α -тубуліну після 510 нс моделювання молекулярної динаміки. Загалом, повної дисоціації нами взагалі не очікувалось, оскільки під час докінгу нам не вдалося отримати комплекс білка ATG8 із релаксованим неацетилюваним тубуліном. Слід зазначити, що описана нами вище система взаємодії є достатньо реалістичною, адже за результатами докінгу формування комплексу білка аутофагії ATG8 з немодифікованим α -тубуліном значно менш ймовірне. Тому причину такої поведінки можна пояснити деякими коливаннями розміру Lys40- α -тубуліну у трьох вимірах, а саме бічних та фронтальних поверхонь, які не задіяні ані в димеризації тубуліну, ані в полімеризації ланцюга.

В цьому контексті важливо нагадати, що ще на дріжджах було встановлено важливість N-кінця молекули білка ATG8 для реалізації його функцій у повному обсязі (Kirisako et al, 2000). Як і у випадку дріжджового білка, так і у випадку білка MAP-LC3 людини його відщеплення цистеїновою протеазою веде до утворення LC3-I, який локалізується в цитозольній фракції (Kosho et al, 2005). В цій же роботі показано, що делеція N-кінцевого субдоміна MAP-LC3 веде до втрати його зв'язування з тубуліном і мікротрубочками. Це викликає додаткові питання про те, якою є роль ацетилювання тубуліну як потенційного сигналу для зміни функціональної ролі білка MAP-LC3 (білка ATG8 у рослин) як адапторного білка між мікротрубочками та аутофагосомами.

Таким чином, в результаті проведених досліджень нам вдалось узагальнити інформацію про структурні аспекти взаємодії білка ATG8 за мікротрубочками, а саме з α -тубуліном, та відтворити *in silico* деякі етапи його взаємодії з ацетилюваним α -тубуліном, намагаючись зрозуміти механічні передумови початкових етапів розвитку процесу аутофагії в рослинних клітинах. Всі результати було отримано завдяки моделюванню та вивченню їх поведінки на молекулярному рівні (особливо α -тубулін та його ацетилювану по Lys40 форму). Найважливішим результатом, отриманим шляхом аналізу

траєкторії молекулярної динаміки є свідчення про те, що структура ацетилюваного тубуліну є значно стабільнішою, ніж його неацетилювана форма.

Подальша ідентифікація сайту зв'язування білка ATG8 на поверхні рослинного тубуліну здійснювалась за рахунок використання методів *in silico*, зокрема за допомогою докування, яке базувалось на результатах попередніх робіт, присвячених з'ясуванню механізму взаємодії білка LC3 та тубуліну людини. Отримані результати докінгу свідчать про можливість взаємодії білка ATG8 з уже ацетилюваним і релаксованим α -тубуліном рослинного походження. Аналіз результатів обрахунку молекулярної динаміки комплексів білка ATG8 з α -тубуліном свідчать про те, що завдяки присутності ацетилюваного залишку Lys40 α -тубуліну його комплекс з цим білком є значно стабільнішим, ніж аналогічний комплекс білка ATG8 з неацетилюваним α -тубуліном. Таким чином, що наявність ацетилюваного залишку Lys40 у складі молекули α -тубуліну є важливою передумовою для стабілізації окремого мономера тубуліну, а також загальної структури мікротрубочок для подальшого їх залучення у розвиток аутофагії у рослин.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить жодних досліджень за участю тварин чи людей, проведених будь-яким із авторів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

THE ROLE OF POST-TRANSLATIONAL ACETYLATION IN THE ASSOCIATION OF ATG8 AUTOPHAGIA PROTEIN WITH MICROTUBULES FROM PLANT CELLS

A. Rayevsky, D.S. Ozheredov, D. Samofalova, S.P. Ozheredov, P.A. Karpov, Ya.B. Blume

Laboratory of Bioinformatics and Structural Biology, Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Osipovskogo St., Kyiv, 04123, Ukraine
Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska Street, Kyiv, 01601, Ukraine

Enamine Ltd., Chervonotkatska Street 78, Kyiv, 02094, Ukraine

E-mail: rayevsky85@gmail.com

At the moment, a number of factors are known that can influence the processes of the cell cycle. One of these factors are post-translational modifications (PTMs) of proteins that cause changes in their structure and, as a consequence, functionality and ability to interact with other proteins of the cell, including microtubule proteins. The aim of our work was a comparative analysis of the mechanism of the effect of PTMs on the structure and activity of proteins by the example of the effect of acetylation of Lys40 in α -tubulin TUBA4 from *A. thaliana* on its interaction with ATG8a. All the studied proteins were reconstructed by homology to the experimentally proven crystal structures. Further comparative analysis of protein-protein interactions was carried out using in silico methods. We have shown that acetylation of α -tubulin at Lys40 leads to stabilization of its structure in comparison with its non-acetylated form. It was also demonstrated using molecular dynamics that the replacement of acetylated α -tubulin in a complex with ATG8 by its non-acetylated form leads to a reduction in the interacting residues and, as a consequence, to a complete breakdown of the contact. Acetylation of α -tubulin at the Lys40 residue leads to the stabilization of both the protein itself and the complex under study with ATG8.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abraham MJ, Gready JE. (2011) Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *J Comp Chem* 32(9):2031–2040. doi:10.1002/jcc.21773
- Adamakis I-DS, Panteris E, Eleftheriou EP. (2019) Tubulin acetylation mediates bisphenol A effects on the microtubule arrays of *Allium cepa* and *Triticum turgidum*. *Biomolecules* 9(5):185. doi: 10.3390/biom9050185
- Avin-Wittenberg T, Honig A, Galili G. (2012) Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249:285–99.
- Benkert P, Tosatto SCE, Schomburg D. (2008) QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins* 71(1):261–277.
- Blume YB. (2019) A journey through plant cytoskeleton: hot spots in signaling and functioning. *Cell Biol Int* 43 (9):978–982. <https://doi.org/10.1002/cbin.11210>
- Blume YB, Smertenko A, Ostapets NN et al. (1997) Post-translational modifications of plant tubulin. *Cell Biol Int* 21(12):917–920.
- Bussi G, Donadio D, Parrinello M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126(1):014101. doi:10.1063/1.2408420
- Chu C-W, Hou F, Zhang J et al. (2011) A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell* 22(4): 448–456. doi: 10.1091/mbc.e10-03-0203
- Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D et al (2019) Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(21):10366–10371. doi: 10.1073/pnas.1900441116
- Fass E, Shvets E, Degani I et al. (2006) Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* 281:36303–36316
- Fernandez-Recio J, Totrov M, Abagyan R. (2002) Screened charge electrostatic model in protein-protein docking simulations. *Pac Symp Biocomput* 7:552–563.
- Fourrest-Lieuvain A, Peris L, Gache V et al. (2006) Microtubule regulation in mitosis: Tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 17:1041–1050. doi: 10.1091/mbc.E05-07-0621
- Freedman H, Luchko T, Luduena RF, Tuszynski JA. (2011) Molecular dynamics modeling of tubulin C-terminal tail interactions with the microtubule surface. *Proteins* 79(10):2968–2982. doi:10.1002/prot.23155
- Gardiner J. (2019) Posttranslational modification of plant microtubules. *Plant Signal Behavior*, 14:10, doi: 10.1080/15592324.2019.1654818
- Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG. (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem* 285(31):24184–24194. doi: 10.1074/jbc.M109.091553
- Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG et al. (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem* 285(31):24184–24194
- Grauffel C, Stote RH, Dejaegere. (2010) A force field parameters for the simulation of modified histone tails. *J Comput Chem* 31(13):2434–2451. doi: 10.1002/jcc.21536
- Grosdidier S, Totrov M, Fernández-Recio J. (2009) Computer applications for prediction of protein-protein interactions and rational drug design. *Adv Appl Bioinform Chem* 2:101–123
- Guo Y, Li M, Pu X et al. (2010) PRED_PPI: a server for predicting protein-protein interactions based on sequence data with probability assignment. *BMC Res Notes* 3:145. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-145>
- Howes SC, Alushin GM, Shida T et al. (2014) Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell* 25(2):257–266. doi:10.1091/mbc.e13-07-0387

- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 9:574–587
- Janke C, Montagnac G (2017) Causes and consequences of microtubule acetylation. *Current Biol* 27(23): 1287–1292. doi: 10.1016/j.cub.2017.10.044
- Janke C, Magiera MM. (2020) The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:307–326. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>
- Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA et al. (2004) Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett* 567(2–3):302–306. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.088>
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H et al. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151(2):263–276. doi: 10.1083/jcb.151.2.263
- Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I et al. (2005) Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J Biol Chem* 280(26):24610–24617. doi: 10.1074/jbc.m413565200
- Kraft LJ, Manral P, Dowler J, Kenworthy AK. (2016) Nuclear LC3 associates with slowly diffusing complexes that survey the nucleolus. *Traffic* 17(4):369–399. doi:10.1111/tra.12372
- Lee J, Cheng X, Swails JM et al. (2015) CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J Chem Theory Comp* 12(1):405–413. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00935
- Littauer UZ, Givon D, Thierauf M et al. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(19):7162–7166. doi: 10.1073/pnas.83.19.7162
- Liu Y, Bassham DC. (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 215–237
- Lytvyn DI, Blume YaB. (2016) Microtubular cytoskeleton in autophagy and programmed cell death development in plants. In: *Programmed Cell Death in Plants and Animals* (Ed. J. Rice), Nova Sci Publ: New York, 1–26.
- Lytvyn DI, Olenieva VD, Yemets AI, Blume YB. (2018) Histochemical analysis of tissue-specific α -tubulin acetylation as a response to autophagy induction by different stress factors in *Arabidopsis thaliana*. *Cyt Genet* 52(4):245–252. doi: 10.3103/s0095452718040059
- Mackeh R., Perdiz D., Lorin S et al. (2013) Autophagy and microtubules – new story, old players. *J Cell Sci* 126(5):1071–1080. doi: 10.1242/jcs.115626
- MacTaggart B, Kashina A. (2021) Posttranslational modifications of the cytoskeleton. *Cytoskeleton*, 1–32. <https://doi.org/10.1002/cm.21679>
- Maruta H. (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol* 103(2):571–579. doi: 10.1083/jcb.103.2.571
- McEwan DG, Dikic I. (2011) The three musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol* 21(4):195–201. doi: 10.1016/j.tcb.2010.12.006.
- Merkulova EA, Guiboileau A, Naya L et al. (2014) Assessment and optimization of autophagy monitoring methods in Arabidopsis roots indicate direct fusion of autophagosomes with vacuoles. *Plant Cell Physiol* 55(4):715–726. doi: 10.1093/pcp/pcu041
- Minoura I, Hachikubo Y, Yamakita Y et al. (2013) Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. *FEBS Lett* 587(21):3450–3455. doi:10.1016/j.febslet.2013.08.032
- Monastyrskaya I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. (2009) Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc* 84(3):431–48
- Noda NN, Ohsumi Y., Inagaki F. (2011) Crystallographic studies on autophagy-related proteins. In: *Current Trends in X-Ray Crystallography* (Chandrasekaran A, ed.) IntechOpen. doi: 10.5772/29509
- Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A et al. (2019) Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol Int* 43:1056–1064. doi: 10.1002/cbin.10843
- Parrinello M, Rahman A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 52(12):7182–7190. doi: 10.1063/1.328693
- Parrotta L, Cresti M, Cai G. (2014) Accumulation and post-translational modifications of plant tubulins. *Plant Biol* 16(3):521–527
- Portran D, Schaedel L, Xu Z et al. (2017) Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* 19(4):391–398. doi: 10.1038/ncb3481
- Raevsky AV, Sharifi M, Samofalova DA et al. (2016) 3D structure prediction of histone acetyltransferase proteins of the MYST family and their interactome in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Model* 22(11):256. doi: 10.1007/s00894-016-3103-0
- Ramkumar A, Jong BY, Ori-McKenney KM. (2018) ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-

- associated proteins. *Dev Dyn* 247:138–155. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24599>
- Rayevsky A, Sharifi M, Samofalova D et al. (2021) *In silico* mechanistic model of microtubule assembly inhibition by selective chromone derivatives. *J Mol Struct* 1241. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130633
- Rayevsky AV, Sharifi M, Samofalova DA et al (2019) Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins. *Cell Biol Int*, 43:1040–1048. doi: 10.1002/cbin.10887
- Samofalova DA, Karpov PA, Raevsky AV, Blume YB. (2019) Protein phosphatases potentially associated with regulation of microtubules, their spatial structure reconstruction and analysis. *Cell Biol Int* 43:1081–1090. doi: 10.1002/cbin.10810
- Smertenko A, Blume YB, Viklický V et al. (1997) Posttranslational modifications and multiple isoforms of tubulin in *Nicotiana tabacum* cells. *Planta*, 201(3): 349–358
- Suzuki H, Tabata K, Morita E et al (2014) Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure* 22(1):47–58. doi: 10.1016/j.str.2013.09.023
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T et al. (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103(4):953–964. doi.org/10.1242/jcs.103.4.953
- Tran HT, Nimick M, Uhrig RG et al. (2012) *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J* 71:263–272
- Verhey KJ, Gaertig J. (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6(17):2152–2160.
- Weiergräber OH, Mohrlüder J, Willbold D. (2013) Atg8 family proteins-autophagy and beyond. In: *Autophagy – A Double-Edged Sword – Cell Survival or Death?*, ed. Y. Bailly (Rijeka: InTech), 13–45.
- Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. (2017) Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *Int J Mol Sci* 18:2207. doi: 10.3390/ijms18102207
- Xu Z., Schaedel L., Portran D et al. (2017) Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* 356(6335):328–332. doi: 10.1126/science.aai8764
- Yoshimoto K. (2012) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol* 53:1355–1365
- Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. (2011) SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comp Chem* 32(11): 2359–2368. doi: 10.1002/jcc.21816

Надійшла в редакцію 01.07.21
Після доопрацювання 11.08.21
Прийнята до друку 18.011.21