

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУЛГАКОВ ІЛЛЯ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 004.75:004.942

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ І МОДЕЛЮВАННЯ КОМПЛЕКСУ
БІЛКІВ, ВІДПОВІДАЛЬНИХ ЗА АСОЦІАЦІЮ ФАГОСОМИ З
МІКРОТРУБОЧКАМИ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ**

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне джерело

_____І.В.Булгаков

Науковий керівник Ярослав Борисович Блюм, д.б.н., проф., академік НАН
України

Київ–2025

АНОТАЦІЯ

Булгаков І.В. Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини.

– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія). – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена формуванню уявлення про перебіг та ключові ланки процесу ініціації аутофагії у рослин на прикладі *A.thaliana*; визначенню подібності рослинних білків до більш відомих гомологів або ортологів з клітин тварин та дріжджів; моделюванню низки АТГ білків з подальшим передбаченням організації їх у комплекси *in silico*; встановленню особливостей міжбілкових взаємодій із можливим підтвердженням стабільності досліджуваних мультимерних комплексів, що передують збиранню PAS–преаутофагосомної структури на етапі ініціації аутофагії.

Аутофагія відіграє важливу роль у розвитку та диференціації клітини, бере участь у пригніченні росту пухлин і може бути пов’язана з подовженням тривалості життя. Аутофагія також відіграє різноманітні ролі у формуванні вродженого та адаптивного імунітету, наприклад, у стійкості до вторгнення патогенних мікроорганізмів.

Згідно з результатами досліджень, рослини демонструють три різні, але невиключні форми аутофагії: макроаутофагія, мікроаутофагія та мегааутофагія. Нас цікавить макроаутофагія, тому що саме під час макроаутофагії клітинні рештки захоплюються біOMEMбранними структурами аутофагосоми, які секвеструють їх. Розрізняють неселективну та селективну макроаутофагію. Селективна аутофагія передбачає розпізнавання рецепторів і лігандів для деградації певних вантажів (пошкоджених білків і небажаних органел).

Розвиток селективної макроаутофагії розпочинається із специфічного розпізнавання деяких внутрішньоклітинних пошкоджених або надлишкових органел, які оточуються мембранами і транспортуються у вакуолі для деградації. Для виконання цих процесів розпізнавання зазвичай необхідна участь специфічних білків–рецепторів вантажу, які взаємодіють з одним з ключових членів групи аутофагічних білків (ATG), ATG8, через свій ATG8–взаємодіючий мотив, щоб допомогти у розпізнаванні субстрату. Аутофагічна мембрана, що містить ATG8, здатна слугувати док–платформою, яка дозволяє рецепторам аутофагії вибірково ідентифікувати та зв'язувати об'єкти, що підлягають деградації, таким чином опосередковуючи процес селективної макроаутофагії.

Зазвичай аутофагія у рослин активується під час стресу, а її регуляція здійснюється низкою *AuTophagy*–споріднених генів (ATG). Саме формація аутофагосом керується білками ATG, а ліпіди є основними компонентами аутофагічних мембран і забезпечують динамічне мембранне ремоделювання. Виявлено, що кожна стадія шляху аутофагії характеризується наявністю мембран, які, в свою чергу, визначаються їх ліпідним та білковим компонентами. Зважаючи на певні прогалини в розумінні процесів, що відбуваються під час аутофагії у тварин, різні стадії формування аутофагосом, стало питання про можливість відтворення частини ініціюючих комплексів з рослинних клітин. Для цього було вирішено визначити їх склад та відмінності у різних модельних організмах та реконструювати структури та геометрію методами молекулярного моделювання.

Ретельний огляд літератури, що охоплює тему дисертації, показав, що мультибілковий комплекс Atg1, утворений протеїнкіназою ATG1 та білками ATG13, ATG17, ATG29 і ATG31, є необхідним для ініціації формування аутофагосом. На формування самого комплексу Atg1 впливає стан фосфорилування ATG13, який діє як адаптерний білок, що зв'язує ATG1 та субкомплекс ATG17 (ATG17–ATG31–ATG29). Для розуміння необхідності модифікацій та їх ефекту на рослинний аналог комплексу було проведено ряд

досліджень рухливості рослинних гомологів цих молекул в різних функціональних станах. Визначення конформаційних змін передувало наступним крокам збірки комплексу *in silico*. Для цього було визначено рівень подібності тваринних та рослинних протеїнів і передбачено характер та геометрію взаємодії саме для рослинного комплексу.

Наше дослідження демонструє комплексне ремоделювання цих ключових компонентів, а також їхні критично важливі взаємодії з білком ATG8 під час дозрівання аутофагосоми. ATG8 відіграє подвійну роль як у біогенезі аутофагосом, так і в рекрутуванні ATG8–взаємодіючих мотивів (W/F/Y–X–X–L/I/V) із закріпленими на них селективними рецепторами аутофагії (SARs). Окремо створено модель другого комплексу, необхідного для утворення фагофору та його росту. Використовуючи кристалічні структури білків різних організмів, що входять до системи кон'югації ATG8 (із ATG3) та забезпечують перенесення його на мембрану (ATG12, ATG5 та ATG16), ми побудували майже повну модель другого критичного комплексу із рослинних гомологів. Таким чином було показано можливість формування подібного комплексу в рослинній клітині.

Як і для більшості мембранозв'язаних органел та везикул, різні аспекти динамічної поведінки аутофагії (каскади реакцій, що регулюють механізми деградації та видалення надлишкових або дисфункціональних клітинних компонентів всередині клітини) зумовлені механізмами їхньої взаємодії з цитоскелетом, особливо з мікротрубочками. Загалом мікротрубочки можна розглядати як полімер із α - і β -мономерів або функціональних (їхні гетеродимери) елементів. Було показано, що багато білків (білки асоційовані із мікротрубочками, ферменти тощо) по-різному взаємодіють з цими елементами, і характер цих взаємодій залежить від участі самих протеїнів у процесах, пов'язаних з клітинним циклом. ATG8 відноситься до першої групи білків асоційованих із мікротрубочками, серед яких є моторні білки, які є важливими для нейронного транспорту, такі як кінезинові та динейнові мотори.

Відомо що мікротрубочка це динамічна структура, якій властива здатність як росту, так і керованої деструкції. На ці процеси опосередковано впливають посттрансляційні модифікації і більшою мірою фосфорилювання та ацетилювання. При цьому в межах процесу аутофагії ацетилювання мікротрубочок є значно важливішим за фосфорилювання. Моделювання ацетильованих амінокислот дозволило спостерігати за індукованими змінами в динаміці та визначати їх вплив на геометрію як окремих елементів так і макромолекулярних комплексів. Досліджено вплив ацетилювання ключових амінокислотних залишків α -тубуліну рослин (K40, K60, K112, K163, K326 та K394) на утворення та стабільність мікротрубочок. Встановлено і продемонстровано як ацетилювання певних залишків може впливати на рівень згортання білка, проте не суттєво змінювати його вторинну структуру або процес формування α/β -гетеродимерів тубуліну, і навпаки.

Проведено порівняльний аналіз ATG8 *A. thaliana* та її тваринних ортологів, визначено потенційні сайти ацетилювання, що вже були підтверджені експериментально. Побудовано просторові моделі ATG8 та її ізоформ із *A. thaliana*, а за допомогою молекулярної динаміки проведено кластеризацію за конформаційною мінливістю досліджуваних AIM-сайтів. На основі отриманих результатів описано механізми взаємодії ATG8 *A. thaliana* з різними адаптерними пептидами, для чого розроблено протоколи пептид-білкового докінгу з подальшою оцінкою стабільності комплексів. Аналіз послідовностей та білкових взаємодій виявив роль FYWE (ортолога людського FYCO1) у зв'язуванні з ATG8, що може відбуватися як із мембранами, так і з тубуліном мікротрубочок. Ця інформація формує потенціал для продовження дослідження в цьому напрямку.

Спираючись на експериментальні данні проведено дослідження впливу ацетилювання тубуліну на контакти мікротрубочки та ATG8 білка. Моделювання молекулярної динаміки комплексів ATG8 з α -тубуліном показало, що ацетильована форма K40 α -тубуліну утворює значно стабільніший комплекс з ATG8 порівняно з неацетильованим аналогом.

Ключовим аспектом залишається вивчення взаємодій між аутофагосою та мікротрубочками за участю ATG8. Сформульовано висновки щодо впливу посттрансляційних модифікацій на нативну структуру моделей білків цитоскелету *in silico* та його потенційний вплив на стабільність комплексів із ATG8 і розвиток всього каскаду. Створено модель для досліджень посттрансляційних модифікацій на поверхні мікротрубочок та продемонстровано масштабні ефекти від модифікацій на прикладі ацетилювання ряду амінокислот α -тубуліну.

Частина даних, отриманих шляхом моделювання посттрансляційних модифікацій ATG8, зокрема ліпидування та ацетилювання, для рослин описана та показана вперше. Ліпидування впливає на локалізацію та характер взаємодії білка з мембраною, тоді як ацетилювання переважно модулює міцність контактів із білками-партнерами. Після ліпидування ATG8 демонструє два варіанти орієнтації на мембрані, відмінні від поведінки людського аналога LC3. Дослідження впливу ацетилювання на ATG8 показало, що модифікація одного з залишків пари K49/K51 не спричинює суттєвих порушень функцій білка в аутофагії, проте ацетилювання обох призводить до втрати здатності зв'язувати субстрат через надмірну рухливість сайту.

У роботі визначено тривимірні структури ключових білків, пов'язаних із ініціацією аутофагії в клітинах *A. thaliana*. Методами *in silico* ідентифіковано основні ділянки взаємодії між білками ATG та їхніми платформами (мембранами, мікротрубочками), а також проаналізовано вплив ацетилювання на ATG8 та тубуліни. Розроблено комп'ютерні моделі та протоколи для подальшого дослідження механізмів посттрансляційних модифікацій.

Визначено та валідовані на різних об'єктах, із кореляцією відносно експериментальних даних, оптимальні параметри різних біоінформатичних інструментів та необхідні налаштування для процедур докінгу, симуляцій. Методологічний підхід включав:

- Вивчення та застосування універсальної програми для вирівнювання множинних послідовностей для білків та нуклеїнових кислот;

- Інструменти для докінгу білків, що дозволяють визначити межі контактної поверхні;
- Розрахунки та аналіз траєкторій (графічне представлення структурної динаміки, електростатичних взаємодій та взаємодій Леннарда-Джонса).

Алгоритми штучного інтелекту були використані для перехресної валідації перед проведенням всебічної перевірки молекулярної динаміки. В результаті було створено набір оптимізованих білкових конструкцій для моделювання білкових взаємодій та аналізу молекулярної рухливості за допомогою методів *in silico*.

Процес аутофагії є цікавим для досліджень фундаментального та практичного характеру. Водночас є багато невирішених питань, на які можна спробувати відповісти без прямого залучення експериментальних методів. Тому ми намагалися варіювати розрахункові методи та задачі у цьому широкому та відносно мало вивченому просторі молекулярної біології. При цьому, рослинні білки, залучені в каскад реакції, що являє собою підготовку, розпізнавання об'єкта та формування ряду макрокомплексів та органел, вивчені значно гірші порівняно із тваринними та дріжджовими гомологами. Тому ми акцентували увагу на порівняння будови, структури та функціональних епітопів цих молекул у модельних рослин та досліджених представників тварин. Актуальності подібним теоретичним та експериментальним дослідженням додає той факт, що деякі ланки процесу досі виявляються нез'ясованими через відсутність експериментальних або теоретичних досліджень коротких переходів між основними етапами. Результати роботи можуть бути використанні у закладах вищої освіти викладачами та студентами різних спеціальностей.

Ключові слова: ATG–білки, тубулін, посттрансляційні модифікації, ацетилювання, молекулярна динаміка, білок–білковий докінг.

SUMMARY

Bulgakov E.V. Bioinformatic analysis and modeling of the protein complex responsible for phagosome-microtubule association in plant cells. – Manuscript.

Thesis is for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy (PhD), specialty 091 Biology (Field of Study 09 – Biology). – Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to the formation of an understanding of the process and key stages of autophagy initiation in plants using *A. thaliana* as an example; the identification of similarities between plant proteins and more well-known homologs or orthologs from animal and yeast cells; the modeling of a series of ATG proteins with subsequent prediction of their organization into complexes *in silico*; and the determination of features of protein-protein interactions with possible confirmation of the stability of the studied multimeric complexes that precede the assembly of the PAS–pre-autophagosomal structure during autophagy initiation. Autophagy plays a crucial role in cell development and differentiation, participates in tumor growth suppression, and may be linked to lifespan extension. Autophagy also fulfills diverse roles in the formation of innate and adaptive immunity, such as resistance to pathogenic microorganism invasion. According to research findings, plants exhibit three distinct but non-exclusive forms of autophagy: macroautophagy, microautophagy, and mega–autophagy. We focus on macroautophagy because it involves the engulfment of cellular debris by double-membrane autophagosome structures that sequester them. Macroautophagy can be either non-selective or selective. Selective autophagy involves the recognition of receptors and ligands for the degradation of specific cargo (damaged proteins and unwanted organelles). The development of selective macroautophagy begins with the specific recognition of certain intracellular damaged or excess organelles, which are then surrounded by membranes and transported to vacuoles for degradation. To carry out these recognition processes, the involvement of specific cargo receptor proteins is usually

required. These proteins interact with one of the key members of the autophagy-related protein (ATG) group, ATG8, through their ATG8-interacting motif to assist in substrate recognition. The autophagic membrane containing ATG8 can serve as a docking platform, allowing autophagy receptors to selectively identify and bind degradation targets, thereby mediating the process of selective macroautophagy. Typically, autophagy in plants is activated under stress conditions, and its regulation is controlled by a set of *AuTophagy-related* (ATG) *genes*. The formation of autophagosomes is governed by ATG proteins, with lipids serving as the primary components of autophagic membranes, enabling dynamic membrane remodeling.

It has been established that each stage of the autophagy pathway is characterized by the presence of membranes, which, in turn, are defined by their lipid and protein composition. Given certain gaps in the understanding of autophagy processes in animals, particularly the stages of autophagosome formation, the question arose regarding the possibility of reconstructing some of the initiating complexes from plant cells. To address this, it was decided to determine their composition and differences across various model organisms and to reconstruct their structures and geometry using molecular modeling methods. A thorough review of literature related to the dissertation topic revealed that the multiprotein Atg1 complex, composed of the ATG1 kinase and the proteins ATG13, ATG17, ATG29, and ATG31, is essential for initiating autophagosome formation. The assembly of this complex is influenced by the phosphorylation state of ATG13, which acts as an adaptor protein linking ATG1 and the ATG17 subcomplex (ATG17–ATG31–ATG29). To understand the necessity of modifications and their effect on the plant counterpart of this complex, a series of studies were conducted on the mobility of plant homologs of these molecules in different functional states. Determining conformational changes preceded subsequent steps in *in silico* complex assembly. For this purpose, the degree of similarity between animal and plant proteins was assessed, and the nature and geometry of interactions were predicted specifically for the plant complex. Our study demonstrates the comprehensive remodeling of these key components, as well as their critical interactions with ATG8 during autophagosome

maturation. ATG8 plays a dual role, both in autophagosome biogenesis and in recruiting ATG8-interacting motifs (W/F/Y–X–X–L/I/V) along with their associated selective autophagy receptors (SARs). Additionally, a model of the second essential complex for phagophore formation and expansion was developed. Using crystal structures of proteins from various organisms involved in the ATG8 conjugation system (with ATG3) and facilitating its membrane tethering (ATG12, ATG5, and ATG16), we constructed a nearly complete model of the second critical complex using plant homologs. This confirmed the possibility of such a complex forming in plant cells. Like most membrane-bound organelles and vesicles, various aspects of autophagy dynamics reaction cascades regulating degradation mechanisms and the removal of excess or dysfunctional cellular components are governed by their interactions with the cytoskeleton, particularly microtubules. Microtubules can be viewed as polymers consisting of α - and β -monomers (or their heterodimeric functional units). It has been shown that many proteins (microtubule-associated proteins, enzymes, etc.) interact with these elements in different ways, and the nature of these interactions depends on the proteins involvement in cell cycle-related processes. ATG8 belongs to the first group of microtubule-associated proteins, which includes motor proteins critical for neuronal transport, such as kinesins and dyneins.

Microtubules are dynamic structures capable of both growth and controlled disassembly. These processes are indirectly influenced by post-translational modifications (PTMs), particularly phosphorylation and acetylation. However, in the context of autophagy, microtubule acetylation appears to be far more significant than phosphorylation. Modeling acetylated amino acids allowed us to observe induced changes in dynamics and assess their impact on the geometry of individual elements as well as macromolecular complexes. The effect of acetylation on key lysine residues (K40, K60, K112, K163, K326, and K394) in plant α -tubulin was investigated, revealing how acetylation influences protein folding without drastically altering secondary structure or α/β -tubulin heterodimer formation and *vice versa*.

A comparative analysis of *A. thaliana* ATG8 and its animal orthologs was conducted, identifying potential acetylation sites that have been experimentally

confirmed. Three-dimensional models of ATG8 and its isoforms from *A. thaliana* were constructed, and molecular dynamics simulations were used to cluster conformational variability in the studied AIM (ATG8-interacting motif) sites. Based on these results, the mechanisms of *A. thaliana* ATG8 interactions with various adapter peptides were described, leading to the development of peptide-protein docking protocols with subsequent stability assessments of the complexes. Sequence and protein interaction analyses revealed the role of FYWE (an ortholog of human FYCO1) in binding ATG8, which can occur both with membranes and microtubule-associated tubulin. This finding opens new avenues for further research in this direction. Leveraging experimental data, we investigated the impact of tubulin acetylation on microtubule-ATG8 interactions. Molecular dynamics simulations of ATG8- α -tubulin complexes showed that the acetylated form of K40 α -tubulin forms a significantly more stable complex with ATG8 compared to its non-acetylated counterpart. A key focus remains the study of interactions between autophagosomes and microtubules involving ATG8. Conclusions were drawn regarding the influence of PTMs on the native structure of cytoskeletal protein models *in silico* and their potential effect on complex stability with ATG8 and the overall autophagy cascade. A model for studying PTMs on microtubule surfaces was developed, demonstrating large-scale acetylation effects on α -tubulin residues. Some of the data obtained through modeling PTMs of ATG8 particularly lipidation and acetylation are described and presented for plants for the first time. Lipidation affects protein localization and membrane interaction patterns, while acetylation primarily modulates binding strength with partner proteins. After lipidation, ATG8 exhibits two distinct membrane orientations, differing from the behavior of its human counterpart, LC3. Studies on acetylation's impact revealed that modifying one residue in the K49/K51 pair does not significantly impair ATG8's autophagy-related functions, but simultaneous acetylation of both residues leads to substrate-binding loss due to excessive motif mobility.

This work determined the 3D structures of key proteins involved in autophagy initiation in *A. thaliana*. *In silico* methods identified core interaction sites between

ATG proteins and their platforms (membranes, microtubules), alongside an analysis of acetylation effects on ATG8 and tubulins. Computational models and protocols were developed for further investigation of PTM mechanisms. Optimal parameters for various bioinformatics tools and docking/simulation procedures were defined and validated across multiple datasets, with correlation to experimental data. The methodological approach included:

- The study and application of a universal program for aligning multiple sequences of proteins and nucleic acids;
- Protein-protein docking software to delineate interfacial contact zones;
- Calculations and trajectory analyses (graphical representation of structural dynamics, electrostatic and Lennard-Jones interactions).

AI algorithms were employed for cross-validation before extensive molecular dynamics verification. As a result, a suite of optimized protein constructs was generated for modeling protein interactions and analyzing molecular mobility via *in silico* methods. Autophagy is a compelling subject for both fundamental and applied research. Yet, many unresolved questions persist some of which can be addressed without direct experimental intervention. Thus, we explored diverse computational approaches in this vast and underexplored domain of molecular biology. Notably, plant proteins involved in the cascade encompassing target recognition, complex assembly, and organelle formation remain far less studied than their animal and yeast homologs. Therefore, we focused on comparing the architecture, structure, and functional epitopes of these molecules in model plants versus well-characterized animal systems. The relevance of such theoretical and experimental studies is further underscored by the fact that certain transitional steps between major autophagy stages remain elusive due to a lack of experimental or theoretical data. The results of this work may be utilized in higher education by instructors and students across various disciplines.

Key words: ATG–proteins, tubulins, post–translational modifications, molecular dynamics, protein–protein docking.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція моделі мультипротейнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. Допов Нац акад наук Укр. 2025;1:68–76. DOI: 10.15407/dopovidi2025.01.068. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

2. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Реконструкція геометрії молекул ATG13 та ATG101 у процесі складання комплексу. Фактори експер евол орг. 2024;35:146–50. DOI: 10.7124/FEEO.v35.1676. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, проведення молекулярно-біологічного аналізу, узагальнення та інтерпретація результатів, написання статті).*

3. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Дослідження ATG білків, залучених до формування комплексу ATG1, його взаємодії з білком ATG8 в процесі дозрівання аутофагосом. Фактори експер евол орг. 2023;32:136–41. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1550. *(Особистий внесок здобувача: опрацювання та узагальнення результатів, провадження експериментальних досліджень, написання статті).*

Статті у наукових виданнях, індексованих в базах даних Web of Science, Scopus, Google Scholar

4. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Sharifi M, Samofalova D, Ozheredov D, Karpov P, Pantano S, Blume Ya. *In silico* induced effect of N-ε-lysine acetylation on microtubule stability and subsequent interaction of microtubule-associated proteins. Cell Biol Int. 2023;47(9):1547–57. DOI: 10.1002/cbin.12052 *(Особистий внесок здобувача: приймав участь у аналізі літературних джерел, у розробці схеми досліджень, постановці експериментів, написанні статті) (Scopus/WoS, Q2)*

Публікації, що додатково висвітлюють результати дослідження:

5. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume R, Novozhylov D, Stykhylias M, Ozheredov S, et al. Lysine Acetylation of Plant α -Tubulins: Scaling Up the Local Effect to Large System Transformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2025 Jun 4. DOI: 10.1002/prot.26846 Epub ahead of print. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних періоджерел, участь у розробці планів досліджень, постановка експериментів та написання статті)* (Scopus/WoS, **Q1**)
6. **Bulgakov E**, Rayevsky A, Stykhylias M, Ozheredov S, Spivak S, Blume Ya. Structural flexibility and shape similarity contribute to exclusive functions of certain ATG8 isoforms in the autophagy process. 28 August 2024, PREPRINT (Version 1) available at Research Square DOI: 10.21203/rs.3.rs-4831294/v1 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume Ya. Structural preconditions for the ATG8 functioning and the effect of lipidation and acetylation on its regulatory mechanism. *B*: 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation; 2024 Sept. 11–13; Lviv, Ukraine. 2024. P. 12.
2. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків задля ідентифікації сайтів зв'язування ATG8. *B*: IV конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія»; 2025 Трав 16–18; Київ, Україна. К.: 2024. с. 6.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ТА МЕХАНІЗМИ АУТОФАГІЇ	25
1.1. Органели та клітинні структури, залучені до процесів аутофагії	30
1.2. Найважливіші родини білків, асоційованих з аутофагією у тварин	34
1.3. Найважливіші родини білків, асоційованих з аутофагією у рослин	41
РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ ЕТАПИ ТА ТИПИ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН	48
2.1. Етапи процесу аутофагії	48
2.2. Мікроаутофагія	53
2.3. Макроаутофагія	54
2.4. Мега–аутофагія	56
РОЗДІЛ 3. ЗАЛУЧЕННЯ ЦИТОСКЕЛЕТУ ДО РОЗВИТКУ ПРОЦЕСУ АУТОФАГІЇ	57
3.1. Роль цитоскелету у розвитку процесу аутофагії	57
3.2. Роль білку ATG8 у залученні мікротрубочок до розвитку аутофагії	59
РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	61
4.1. Матеріали	61
4.2. Методи	61
РОЗДІЛ 5. РОЛЬ БІЛКІВ РОДИНИ ATG У ФОРМУВАННІ АУТОФАГОСОМИ	67
5.1. Головний комплекс ATG1 та порівняльна характеристика його складових елементів на міжвидовому рівні	67
5.2. Визначення структурних передумов для формування	

	комплексів–інтермедіатів у складі ATG1 і окреслення функціональних відмінностей макрокомплексів для різних організмів	70
5.3.	Реконструкція структури ATG8 рослин та моделювання ефектів від його ацетилювання та ліпидування	78
5.4.	Порівняння послідовностей різних ізотипів ATG8 як ключового триггеру процесу аутофагії у рослин	81
5.5.	Порівняльна характеристика рослинних ортологів групи білків ATG, що утворюють комплекс каталізу ліпідації	84
5.6.	Формування рослинного комплексу ATG3–ATG5–ATG7–ATG12–ATG16 та передбачення сайтів зв’язування білків партнерів	89
РОЗДІЛ 6.	УЧАСТЬ МІКРОТРУБОЧОК, ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ ТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ, У РОЗВИТКУ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ	93
6.1.	Особливості будови інтерфейсів білок–білкових взаємодій тубулінів рослин та тварин на прикладі молекули α -тубуліну	93
6.2.	Розробка структури фрагменту мікротрубочки рослини та тварин для дослідження впливу посттрансляційних модифікацій	104
РОЗДІЛ 7.	РОЛЬ ATG8 ТА ВПЛИВ ЙОГО МОДИФІКАЦІЙ (АЦЕТИЛЮВАННЯ, ЛІПІДУВАННЯ) НА ВЗАЄМОДІЮ З ТУБУЛІНОМ У ПРОЦЕСАХ АУТОФАГІЇ	116
7.1.	Оцінка селективності ізотипів ATG8 відносно білків адаптерів та рецепторів	117
7.2.	Сайти ацетилювання на поверхні молекул тубуліну. Ідентифікація та перевірка можливості зв’язування	

	17
ATG8	128
7.3. Дослідження ефектів від модифікацій ATG8 на взаємодію із мішенями–аутофагічними рецепторами та адаптерами	133
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	139
ВИСНОВКИ	143
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	146
ДОДАТОК	185

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MT–мікротрубочки

ГТФ–гуанозин–3–фосфорна кислота

ГДФ–гуанозин–2–фосфорна кислота

PI3P–фосфатидилінозитол–3–фосфат

PE–фосфатидилетаноламін

МД–молекулярна динаміка

MAP–білки асоційовані з мікротрубочками

RMSF–середньоквадратичне флуктуація

RMSD–середньоквадратичне відхилення

Rg–радіус гірації

PPI–білок–білкові взаємодії

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Термін «аутофагія», який походить від грецького «поїдання самого себе», був вперше запропонований Крістіаном де Дювом понад 40 років тому і значною мірою ґрунтувався на спостереженні деградації мітохондрій та інших внутрішньоклітинних структур у лізосомах печінки щурів, перфузованих глюкагоном – гормоном підшлункової залози [1, 2]. Віднедавна дослідження аутофагії привертає до себе увагу, одночасно з цим з'явився значний масив досліджень у численних лабораторіях, які підкреслюють фізіологічну важливість цього процесу [3, 4]. У той же час, рослинні системи вважаються цінними моделями для вирішення фундаментальних питань організації мікротрубочок (MT) завдяки їхній значній практичній користі. Ацетилювання білків є дуже поширеною модифікацією білків, причому швидкість ацетилювання може модулюватися в клітинах у різних біологічних станах, і ці зміни можуть бути виявлені на молекулярному рівні. Ацетилювання Lys є важливою посттрансляційною модифікацією, що регулює функції білків, включно з тими, що беруть участь в аутофагії та динаміці цитоскелета [5]. Наприклад, ацетилювання тубулінів може впливати на стабільність мікротрубочок і, отже, на транспорт аутофагосом [6]. Об'єднання цих тем може допомогти у створенні нових терапевтичних стратегій, направлених на відновлення нормальних клітинних процесів.

Водночас, залишається незрозумілим, яким чином відбувається складний процес утворення везикул. Формация аутофагосом керується білками ATG, однак саме ліпіди є основними компонентами аутофагічних мембран. На даний момент макрокомплекси білків із цієї родини описані краще для тварин, а у рослин елементи комплексів представлені гомологами та ортологами. Експериментально показано, що рослинні та тваринні білки із цих комплексів мають відмінності в структурі та функціях.

Останнім часом накопичується все більше доказів того, що деякі білки ATG мають здатність безпосередньо взаємодіяти з мембранами, переносити

ліпіди між мембранами і регулювати ліпідний метаболізм. Також відкривається нова роль різних мембранних ліпідів у формуванні аутофагосом. Так серед ATG білків найцікавішим є ATG8, невеликий протеїн, залучений у формування контактів із мікротрубочками, мембранними утвореннями, іншими ATG білками та специфічними партнерами для розпізнавання вантажу для деградації.

Дослідження молекулярних механізмів аутофагії призвело до відкриття його важливості в пухлиногенезі, ліпідному обміні, нейродегенерації та деградації внутрішньоклітинних патогенів. Незважаючи на те, що ліпідний склад аутофагосом залишається нез'ясованим, відомо, що фосфатидилінозитол-3-фосфат (PI3P) і фосфатидилетаноламін (PE) відіграють визначальну роль у формуванні аутофагосом [7].

Вивчення 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. Для того, щоб краще зрозуміти процес структурних змін та подальшої взаємодії ключових елементів, що контактують із фагосомою, було змодельовано ефект ацетилювання за допомогою методів *in silico*.

Мета і завдання дослідження.

Відтворити структури ключових учасників ансамблю ATG-білків та дослідити їхні елементи розпізнавання і взаємодії за допомогою моделювання комплексів із одночасним визначенням функціональних станів у процесі дозрівання аутофагосоми рослини.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити ряд рослинних білків, які беруть участь у формуванні «ранніх» аутофагосом та їх дозріванні.
2. Змодельувати серію білків ATG з дослідженням комплексу серин/треонінової протеїнкінази ATG1 (I система кон'югації ATG білків).

3. Змодельовати ключові білкові комплекси, що беруть участь в ініціації процесів аутофагії та формування аутофагосоми (II система кон'югації ATG білків).

4. Змодельовати ефект ацетилювання ряду ключових амінокислот на взаємодію між структурними елементами мікротрубочками. Визначити вплив посттрансляційної модифікації α -тубуліну на зв'язування ATG8.

5. Дослідити особливості функціонування тригерного білка ATG8 у рослин, визначити структурні передумови для його специфічної участі в селективній аутофагії.

6. Змодельовати ефект ліпідації та ацетилювання ATG8 на контакт із фагосомою, для з'ясування особливостей взаємодії із мембраною у рослинній клітині.

Об'єкт дослідження – біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин.

Предмет дослідження – ATG білки, залучені у формування першого та другого комплексу (Atg1 та ATG3–ATG5–ATG7–ATG16), їх взаємодії з білком ATG8 на етапах ініціації процесу утворення аутофагосом.

Методи дослідження. В роботі були використані методи класичної та структурної біоінформатики. Використовуючи публічно доступні бази даних проводилось вирівнювання послідовностей, аналіз подібності та пошук шаблонів для моделювання за гомологією. На основі побудованих за гомологією структур проводився молекулярний білок–білковий докінг та молекулярна динаміка з урахуванням різних силових полів. Вбудовані в пакет для симуляції молекулярної динаміки інструменти аналізу траєкторій та поведінки білка, енергетичні ландшафти використовувались разом із сторонніми для дослідження стабільності окремих структур та макромолекулярних комплексів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджено всі ATG білки рослинного походження, що залучені у формування першого та другого комплексу (Atg1 та ATG3–ATG5–ATG7–ATG16), передбачено механізм їх

взаємодії з білком ATG8 на етапах ініціації процесу утворення аутофагосом. Вперше продемонстровано ефект ацетилювання на елементах цитоскелету (від мономерних до полімерних) та визначено ключові залишки, що піддаються ацетилюванню, на поверхні α -тубуліну. Досліджено особливості взаємодії ключового білка ATG8 рослинного походження із мікротрубочками.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено модельний комплекс для дослідження посттрансляційних модифікацій амінокислот тубулінів та їх взаємодії із оточенням в ансамблі мікротрубочки або MAP білками. Спираючись на отримані дані щодо селективної взаємодії ATG8 із партнерами та протоколу підготовки білок-білкових комплексів, закладено основу для пошуку інгібіторів, навіть селективного характеру, взаємодії із рядом білків-субстратів ATG8.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної науково-дослідницької роботи «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (номер держреєстрації 0120U100937, 2020–2024 рр.) у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було обрано тему наукового дослідження та визначено концепцію, сформульовано мету та основні завдання роботи, проведено обговорення отриманих даних. Результати, викладені у дисертації, автор отримав особисто та за безпосередньої участі у виконанні розрахунків. Здобувач самостійно провів пошук та аналіз літератури з тематики дослідження, виконав практичну частину роботи, обробку та попередній аналіз даних. Планування окремих етапів роботи, аналіз отриманих експериментальних даних, обговорення результатів дослідження, висновків дисертаційної роботи та підготовку наукових публікацій проводили спільно з співробітниками лабораторії Біоінформатики та структурної біології.

Наукові роботи опубліковано у співавторстві з співробітниками ДУ «ІХБГ НАН України» к.б.н. Раєвським О.В., к.б.н. Співак С.І., к.б.н. Ожерєдовим С.П., д.б.н. Карповим П.А., д.б.н. Блюмом Я.Б. та іноземними колегами Sharifi M, Ph.D. та Pantano S, Ph.D.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково–практичних конференціях: IV–й Конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (16–18 травня 2024 р. Київ, Україна), (VII) 7th Congress of the All–Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» (11–13 вересня 2024 р., Львів, Україна)

Публікації. Результати дисертації відображені у одній статті у міжнародному фаховому виданні (належить до наукометричних баз Scopus/Web of Science, Q2), в 3 статтях вітчизняних фахових видань та 2 тезах доповідей на українській та міжнародній наукових конференціях. Дві статті у міжнародних фахових виданнях (належить до наукометричних баз Scopus/Web of Science, Q1) додатково висвітлюють результати досліджень.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатку. Дисертація містить 27 рисунків, 3 таблиці, список використаних джерел, який складається з 351 посилань. Загальний обсяг рукопису становить 187 сторінок.

Автор висловлює особливу вдячність за підтримку та сприяння в проведенні досліджень Ярославу Борисовичу Блюму, професору, доктору біологічних наук, академіку Національної академії наук України, який здійснював наукове керівництво та надавав важливі методичні рекомендації в процесі проведення експериментів.

Усім співробітникам Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» та відділу геноміки та молекулярної біотехнології.

РОЗДІЛ 1

ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ТА МЕХАНІЗМИ АУТОФАГІЇ

Аутофагія це процес керованої внутрішньоклітинної деградації, який полягає у секвестрації небажаних компонентів у двомембранні пухирці, так звані аутофагосоми, які потім доставляються у деградаційну органелу (вакуолю/лізосому в залежності від організму) для розщеплення та переробки [8, 9]. Дані експериментів з фізіології вказують на те, що цей процес нівелює ефекти від стресових станів різної природи. Аутофагія відіграє важливу роль у клітинному розвитку та диференціації, бере участь у пригніченні росту пухлин і може бути пов'язана з подовженням тривалості життя [9]. Аутофагія також відіграє різноманітні ролі у формуванні вродженого та адаптивного імунітету, наприклад, у стійкості до вторгнення патогенних мікроорганізмів.

Аутофагічні процеси відбуваються в усіх еукаріотичних клітинах. У дріжджів вони підтримуються на базальному рівні за нормальних умов росту клітин та індукуються голодуванням. У тваринних клітинах аутофагія є конститутивно активною і піддається пригніченню або подальшій індукції у відповідь на дію специфічних гормонів або інших еліситорів (екзогенні агенти) [10, 11, 12]. Аутофагія виконує «господарські» функції, такі як видалення агрегованих і неправильно згорнутих білків та очищення пошкоджених органел. Вона також напряду пов'язана із розвитком, клітинною диференціацією, захистом від патогенів, голодом та іншими стресовими реакціями, а її інтеграція визначається відповідними транскрипційними факторами [13].

Іншими словами, метою аутофагії є підтримання гомеостазу за допомогою процесів внутрішньоклітинної рециркуляції та регуляції метаболізму [14]. У рослинних клітинах *A. thaliana* аутофагія, яка є консервативним механізмом згідно з дослідженням [15], відіграє ключову роль в ефективній рециркуляції асимільованого азоту, фіксованого вуглецю, заліза,

марганцю, фосфору, сірки та цинку. Прискорене старіння часто спостерігається у рослин з порушенням аутофагії, що свідчить про критичний взаємозв'язок між аутофагією та надходженням цих поживних речовин [16].

Численні докази вказують на незмінну роль аутофагії у реакціях рослин на різноманітні фактори розвитку та довкілля, наприклад фундаментальній ролі у репродуктивності представників чоловічої статі у рослин [17], підтриманні кореневої меристеми, реакції на дефіцит поживних речовин, а також біотичних та абіотичних механізмах реагування на стрес. В останніх дослідженнях показано, що, подібно до нерослинних систем, модуляція ключових білків у механізмі аутофагії рослин за допомогою посттрансляційних модифікацій, таких як, убіквітинування, ліпідизація, фосфорилування та ацетилювання, широко задіяна в ініціації та прогресуванні аутофагії [18, 19].

Окрім своєї ролі в реакціях на біотичний стрес, аутофагія відіграє незамінну роль у реакціях рослин на різні абіотичні стреси, включаючи засолення, посуху, спеку, стрес ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), охолодження та гіпоксію, більшість з яких призводять до осмотичних або окислювальних криз [19]. Аутофагія необхідна рослинам для забезпечення солестійкості, оскільки вона сприяє поглинанню іонів Na^+ безпосередньо у вакуолях і видаленню пошкоджених білків [20]. Це опосередковано свідчить про те [21], що швидкий білковий обмін через аутофагію є передумовою стійкості виду *Arabidopsis thaliana* до сольового стресу. Цей висновок був підтверджений кількісним визначенням сумісних осмолітів, як продемонстровано в дослідженні [21], що аутофагія взагалі відіграє вирішальну роль в адаптації до сольового стресу [22].

Одним з підходів до вивчення аутофагії є визначення клітинної кислотності, враховуючи, що лізосоми і вакуолі зливаються з клітинами, які піддаються аутофагії [23]. Як показали попередні дослідження, злиття аутолізосоми (або аутофагосоми) з ендосомою — обидва типи везикул [24]. вимагає участі розчинного N-етилmaleїмід-чутливого фактора прикріплення (SNARE-білків), Rab-ГТФаз та гомотипного комплексу вакуолярного злиття і

сортування білків (HOPS). Цей механізм подібний до інших процесів злиття везикул під час внутрішньоклітинного транспорту [25]. Результати іншого дослідження [26] також виявили залучення мікротрубочок до процесу аутофагії, що запускається абіотичними стимулами. Водночас, стрес-залежні зміни коекспресії генів α -тубуліну та ATG8 вказують на функціональну роль цитоскелета мікротрубочок у процесі аутофагії. У клітинах дріжджів і тварин мікротрубочки (MT) відіграють важливу роль у дозріванні та переміщенні аутофагосом. Зазначений процес відбувається завдяки динамічним перетворенням стану мікротрубочок та посттрансляційними модифікаціям тубуліну [23].

Як остаточно встановлено [27], аутофагія відіграє ключову роль у клітинному розвитку та диференціації. Водночас, аутофагія пов'язана з широким спектром захворювань, включаючи рак і нейродегенеративні розлади, такі як хвороби Альцгеймера, Паркінсона та Хантінгтона [28, 12, 9]. Зрештою, аутофагія відіграє вирішальну роль як у вродженому, так і в адаптивному імунітеті [29]. Візьмемо, наприклад, її здатність знищувати інвазійні патогени, включаючи віруси, паразити і бактерії. Важливо, що аутофагія може також брати участь у II типі запрограмованої клітинної смерті, відмінному від апоптозу, хоча фізіологічне значення першого ще не до кінця зрозуміле [30]. Незважаючи на те, що спершу аутофагія була визначена як відповідь на клітинний стрес, все більше доказів свідчить про те, що вона виконує різноманітні фізіологічні ролі протягом усього життя ссавців, включаючи регуляцію росту, розвитку та старіння [31].

Відкриття генів Atg у дріжджів сприяло розвитку механістичного розуміння аутофагії, тим самим підкресливши її ключову роль у різноманітних біологічних процесах [32]. Потім були проведені широкі морфологічні та фармакологічні дослідження, що розмежували основні етапи цього процесу [33, 10]. Дослідження різних грибів дозволили ідентифікувати окремі молекулярні компоненти, які беруть участь в аутофагії – відомо 31 ген, пов'язаний з аутофагією (ATG) [28, 10].

З часу першої ідентифікації гена аутофагії за допомогою генетичних скринінгів у *Saccharomyces cerevisiae* було виявлено безліч генів і білків, пов'язаних з аутофагією [34, 2]. У дріжджів ідентифіковано понад 41 генів ATG, 16 з яких визначено як основні гени ATG (наприклад, ATG1, ATG10, ATG12, ATG13, ATG14, ATG16 і ATG18) через їх необхідність як для неселективної, так і для селективної аутофагії, на додаток до їх еволюційної консервативності [35]. Продукти генів ATG11 (також відомий як RB1CC1) і ATG101 можна вважати найбільш поширеними з усієї родини ATG і вони регулюють формування аутофагосоми на етапах індукції (зазвичай викликана метаболічними стресами, такими як голод), зародження і розтягнення мембрани в ендоплазматичному ретикулумі, закриття, а також зв'язування і злиття з лізосомами [36]. Зокрема, виявлено, що збільшення кількості молекул ATG8 залежить від розміру аутофагосоми [37], тоді як кількість молекул ATG9 пов'язана з кількістю самих аутофагосом [38]. Подальші дослідження визначили роль ATG6 у процесі програмованої загибелі клітин [39], опосередкованої аутофагією, і пов'язали її з лімфомою, гепатоцелюлярною карциномою та іншими видами раку [40]. Нарешті, було проведено кілька досліджень з метою ідентифікації регуляторів шляху аутофагії. В одному з таких досліджень Бернارد та ін. [41], ідентифікували лізиндеметилазу 4A (KDM4A/Rph1) як транскрипційний репресор аутофагії та, використовуючи широкомасштабний аналіз експресії ATG, виявили численні нові регулятори аутофагії [42]. Незважаючи на це, багато молекул пов'язаних з аутофагією наразі є невідкритими в силу обмежень експериментальних методів [43].

Комплекс Atg1 у *S. cerevisiae* відрізняється відсутністю ATG101, який у інших видів утворює комплекс з ATG13 і стабілізує його. Крім того, комплекс Atg1 містить ATG29 і ATG31 із ATG17 [44, 45, 46]. Крім того, у *S. cerevisiae* відсутній VMP1, білок ендоплазматичного ретикулуму (ER), ген якого розташований поряд із геном ДНКазу А *Escherichia coli* (DedA), який необхідний для аутофагії у багатьох інших видів, включаючи *Metazoa*, *Dictyostelium* і, можливо, зелених водоростей. І нарешті, *S. cerevisiae* має

окремий шлях спрямування з цитоплазми у вакуолі (Cvt) [47], який є біосинтетичним і доставляє вакуолярні гідролази до вакуолі. Власне, *Schizosaccharomyces pombe* має ще один біосинтетичний шлях, який називається NBR1–опосередкований шлях вакуолярного спрямування [48, 49].

Пізніше було відкрито ключову роль убіквітин–подібного шляху кон'югації в аутофагії. Далі було показано, що ATG12 та ATG5, кон'югують один з одним (ATG12 утворює стабільний кон'югат з K149 ATG5). Цей процес залежить від активності ATG7 та ATG10, а також E1 та E2–подібних ферментів відповідно [50, 51]. У 2000 році Осумі опублікував звіт про ідентифікацію третього специфічного для аутофагії убіквітин–подібного білка (UBL), означеного як вищезгаданий ATG8. Примітно, що на відміну від будь-якого іншого відомого UBL, відкритий С–кінцевий гліцин ATG8 був кон'югований з аміногрупою ліпиду, а саме PE, яким, збагачена мембрана аутофагосоми [47]. Каталізатором реакції кон'югації ATG8–PE [7] є E1–подібні ферменти ATG7 та E2–подібні ферменти ATG3 [52, 53], а стабільний кон'югат ATG12–ATG5 у комплексі з ATG16 функціонує як E3–лігаза [54, 51]. Далі було фундаментальне відкриття ролі убіквітиноподібних білків (UBL) ATG5, ATG12 та ATG8 у формуванні двомембранної везикули, аутофагосоми, яка є функціональною одиницею аутофагії [51]. Цікаво, що у тварин також ідентифіковано окремий шлях аутофагії, опосередкований шаперонами, який не залежить від везикул. Цей процес передбачає залучення специфічних транспортерів задля сприяння прямому імпорту субстратів до місця деградації [8]. Доказів того, що такий шлях існує в рослинах, ще не виявлено, і схоже, що гени рослин не кодують аналоги транспортерів з супроводом, знайдених у тварин (наприклад, LAMP–2A) [55]. Як показали Сезгін та ін. [56], функція інтегральних або асоційованих мембранних білків залежить не тільки від взаємодії з іншими білками, але й від ліпідів. На додаток до сайтів прямого зв'язування з ліпідами, ідентифікованих для різних пероксисомних білків [57], характеристики мембранного ліпідного середовища, такі як порядок або плинність ліпідів і склад ліпідної мембрани, є важливими факторами для функціональності мембранних білків. Ефективність

мембранного зв'язування та інтеграції білків визначається цими факторами, а також організацією, рухливістю та взаємодією білків у мембрані та на ній [56]. Тому детальне знання про упорядковування та склад ліпідних мембран має вирішальне значення для розуміння функцій білків і для втручання в їхнє функціонування [58]. Виявлено, що кожна стадія шляху аутофагії характеризується наявністю мембран, які, в свою чергу, визначаються їх ліпідним та білковим компонентами. Різні комбінації та співвідношення ліпідів, на додаток до їх асиметричного розподілу, який є специфічним для кожної клітини, можуть впливати на властивості мембрани, такі як плинність, кривизна та електростатика. Дослідження [59], визначили ліпідний склад деяких органел, пов'язаних з аутофагією, але для повного розуміння цих взаємозв'язків потрібні подальші дослідження.

1.1. Органели та клітинні структури, залучені до процесів аутофагії

До процесів аутофагії залучені різні органели та клітинні структури, які забезпечують виявлення, захоплення, транспортування і деградацію клітинних компонентів.

Лізосоми/вакуолі–гідролітична система клітини. Процес аутофагії індукується клітинами, які потребують підвищеного вироблення поживних речовин та енергії, наприклад, під час голодування, вивільнення фактора росту або в періоди підвищеної потреби в енергії [60]. Азотне або вуглецеве голодування також запускає аутофагію в рослинних клітинах [61].

Процес утворення везикуло–подібних цитоплазматичних компонентів із аутофагосоми по суті тотожний макроаутофагії, яка була описана в клітинах ссавців і рослин [3]. Індукція аутофагії призводить до утворення чашоподібних мембран у цитоплазмі, які називаються ізоляційними мембранами (або фагофором). Вони розширюються, набуваючи сферичної форми, і врешті–решт конденсуються, утворюючи подвійні мембранно–зв'язані структури, які називаються аутофагосомами [3].

Лізосома та вакуоль, компартмент у тваринних клітинах, та еквівалентна їй вакуоля у дріжджів утворюють літичне середовище, яке містить гідролази. Ці компартменти відокремлені від цитоплазми і тому можуть руйнувати будь-який клітинний компонент, включаючи цілі органели [8]. Етап лізису везикул залежить від кислого рН просвіту вакуолі та протеїнази В, яка активує вакуолярні зимогени в процесі розщеплення [22]. Лізосома є єдиною органелою, пов'язаною з аутофагією, яку можна легко очистити, та лізосоми в печінці щурів містять 39 % РН (фосфатидилхоліну), 14 % РЕ (фосфатидилетаноламіну), 5 % РІ, 2 % PS (фосфатидилсерину), 1% кардіоліпіну, 1 % РА (фосфатидил) і 20 % сфінгомієліну [62, 63], свідчать дані [64], 50.4 % РС (фосфатидилхолін) і 24.6% РЕ (фосфатидилетаноламіну) є переважаючими фосфоліпідами у мембрані вакуолі як рослин, так і дріжджів, наступним за кількістю 6.6 % РІ (фосфатидилінозитол). Нещодавно повідомлялося, що ліпідний склад мембран у дріжджів, які можуть представляти дріжджовий фагофор, аутофагосому та аутолізосому, містить 38 % РС, 37 % РІ, 19 % РЕ, 3 % PS, 3 % РА і багатий на ненасичені фосфоліпіди. Це спостереження узгоджується з динамічними властивостями фагофора [65, 59].

Ендоплазматичний ретикулум. Дослідники клітин ссавців дійшли спільної думки про те, що мембрана аутофагосом є похідною від мембрани ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), хоча дані свідчать про те, що кілька клітинних компартментів, таких як Гольджі, плазматична мембрана та мітохондрії сприяють розширенню мембрани аутофагосом [66].

Дослідження виявили тісний зв'язок мембрани фагофора з ендоплазматичним ретикулумом [67] разом з проміжним компартментом ER–Golgi (ERGIC) [35, 68, 13]. Отже, ЕР є джерелом мембран для формування фагофору (початкової структури аутофагосом) та бере участь у ініціації аутофагічного процесу. Дослідження дріжджів свідчать, що компоненти COPII, які беруть участь у проходженні везикул між ЕР і комплексом Гольджі (наприклад, Sec12, Sec16, Sec23 і Sec24), залучені до формування аутофагії [35].

Втім, мутації у відповідних генах не впливають на шлях Cvt (cytoplasm-to-vacuole targeting pathway—шлях таргетування від цитоплазми до вакуолі) [11]. У клітинах ссавців джерелом цих мембран вважається безрибосомна ділянка ER [69].

Мітохондрії. Ряд досліджень свідчить про те, що існує зв'язок між мітохондріями та утворенням аутофагосом. Так було продемонстровано, що ряд мітохондріальних білків (наприклад, smARF, Bif-1/EndophillinB) позитивно регулюють аутофагію [70], а зародження аутофагосом відбувається безпосередньо вздовж мітохондрій. А самі мітохондрії також можуть бути об'єктами аутофагії (мітофагія) [71]. Сучасна парадигма полягає в тому, що убіквітинована зовнішня мембрана мітохондрій є основною мішенню для поглинання аутофагосомами під час мітофагії [8, 72]. Повідомлення про взаємодію аутофагії та мітохондрій часто приписують мітофагії, але дані свідчать про те [71], що мітохондрії беруть участь у формуванні аутофагів.

Ендосоми. Аутофагосома зливається з ранніми і пізніми ендосомами, утворюючи амфісому, яка потім зливається з лізосоною, утворюючи аутолізосому. Молекулярні механізми, відповідальні за ці події злиття, налічують десятки білків, більшість з яких є спільними для ендоцитарного шляху. [8].

Подібним чином, утворення аутолізосоми шляхом злиття аутофагосоми та лізосоми [73, 13]. Оскільки лізосоми постійно отримують матеріали з ендоцитарного шляху [74], ці аутолізосоми повинні містити невластиві їм матеріали. Припускають, що ці процеси злиття формують амфісоми перед злиттям з лізосомами [75, 76]. Злиття ж з ендосомами може забезпечити механізми реалізації цього процесу [77].

Комплекси білків аутофагії (ATG-білки). Хоча ATG-білки не є органелами, вони утворюють критично важливі структури, які забезпечують ключові етапи аутофагії. Так рецептором аутофагії може бути будь-який білок, здатний зв'язувати субстрати аутофагії, забезпечуючи їх розпізнання аутофагічними структурами та подальшу деградацію в лізосомах [78].

Більшість рецепторів макроаутофагії містять еволюційно консервативну LC3–взаємодіючу ділянку (LIR) [79], яка дозволяє їм наближати субстрати до LC3–позитивних аутофагосом. До таких рецепторів належать p62, NBR1, OPTN, NDP52, BNIP3, BNIP3L, ATG34, FUNDC1, PNB2, TRIM5, TAX1BP1, Atg19 та Atg32 [8, 72, 80]. ATG–білки беруть участь у всіх стадіях аутофагії, включаючи ініціацію, нуклеацію, розширення мембрани та утворення аутофагосом. Наприклад, ULK1–комплекс–відповідає за ініціацію процесу; ATG5–ATG12–забезпечує кон’югацію білків; LC3 (ATG8)–інтегрується в мембрану фагофора.

Ефективність мікроаутофагічних реакцій, зокрема утворення аутофагосом, їх злиття з лізосомами та подальшої деградації, залежить від двох убіквітин–подібних систем кон’югації [78]. Перша система опосередкована ATG7 і ATG10, які каталізують кон’югацію ATG5 з ATG12 у складі мультипротеїнового комплексу, що включає ATG16L1 [50]. Друга система регулюється кіназним комплексом ATG1/13, який розпізнає дефіцит поживних речовин і запускає аутофагію. Обидві системи пов’язані із процесами формування аутофагофору, а для цього залучаються додаткові комплекси білків. Трансмембранний комплекс ATG9/2/18 забезпечує розширення фагофора шляхом доставки мембранного матеріалу з ендоплазматичного ретикулуму, мережі транс–Гольджі та мітохондрій. Комплекс фосфатидилінозитол–3–кінази (PI3K) класу III, до якого входить ATG6 (Beclin–1 у ссавців), відповідає за нуклеацію везикул. При цьому відбувається кон’югації ATG8/ATG12, який декорує мембрану фагофора: ATG8 (LC3) ковалентно зв’язується з фосфатидилетаноламіном (PE); ATG12 кон’югує з ATG5, утворюючи комплекс, який залучає ATG16L1 [7, 81].

Активація ATG8 і ATG12 відбувається за участю ATG7, після чого вони переносяться до E2–ензимів (ATG3 і ATG10) і зв’язуються зі своїми субстратами. Далі кон’югат ATG12–ATG5 асоціює з ATG16L1, формуючи E3–лігазну активність, яка інтегрує ATG8–PE у мембрану фагофора, що розширюється [82, 7].

Комплекс Гольджі. Першим ідентифікованим джерелом мембран для аутофагосом був ЕР, подальші дослідження виявили, що апарат Гольджі також відіграє важливу роль у цьому процесі [66]. Після синтезу в ЕР білки транспортуються через проміжний компартмент ЕР–Гольджі до апарату Гольджі, який потім направляє їх до кінцевих пунктів призначення, зокрема до лізосом для деградації [68]. Одним із ключових білків, пов'язаних із доставкою мембранних елементів для аутофагосом, є ATG9 – єдиний трансмембранний білок серед ATG–білків. Він локалізується не лише в PAS, але й у периферійних ділянках клітини, зокрема в транс–Гольджі та пізніх ендосомах. Дослідження показали, що ATG9–вмісні везикули, які походять із тілець Гольджі, беруть участь у ініціації утворення аутофагосом [24]. Крім того, ATG9 взаємодіє з WIPI–1/ATG18, що забезпечує його рух від транс–Гольджі та ендосом до PAS. Цей процес, ймовірно, сприяє транспорту фосфоліпідів або готових мембранних фрагментів, необхідних для розширення фагофора [18].

1.2. Найважливіші родини білків, асоційованих з аутофагією у тварин

ATG–білки (Autophagy–related proteins). Справжній прорив у дослідженні цього процесу стався лише в 1990–х роках із відкриттям генів, пов'язаних з аутофагією (ATG) [83, 84].

Відкриття цих генів у дріжджах та їхніх ортологів у вищих еукаріотів підтвердило еволюційну консервативність аутофагічного апарату [10]. Генетичні дослідження на *S. cerevisiae* дозволили ідентифікувати 35 генів ATG, серед яких ATG1–10, 12–14, 16–18, 29 та 31 є найважливішими для формування канонічних аутофагосом [3]. Ці відкриття стали можливими завдяки морфологічним дослідженням та спостереженню за утворенням аутофагосом та ряду біохімічних підходів, включаючи генетичний скринінг мутацій, що порушують аутофагію [69]. Усі ATG–білки контролюють етапи аутофагії і їх умовно можна поділити на групи за функціями: ініціація процесу (ULK1/ATG1–комплекс), нуклеація (PI3K–комплекс із Beclin–1/ATG6),

розширення мембрани (ATG9, ATG2–ATG18) та кон'югація білків (ATG5–ATG12, LC3/ATG8–PE) [7]

Основні ATG–вмісні комплекси та їх функції. У тварин ULK1–комплекс (або Atg1) складається із серін/треонінових кіназ ULK1 та ULK2, регуляторного білка ATG13, FIP200 (що взаємодіє з кіназами родини FAK), ATG10 (стабілізує комплекс) та виконує ключову роль у ініціації аутофагії. Цей комплекс інтегрує сигнали від сенсорів поживних речовин (наприклад, mTORC1) та ініціює формування фагофора [66].

PI3K–комплекс класу III (нуклеація аутофагії) складається із VPS34, Beclin–1 (ATG6), що є центральним регулятором взаємодії, ATG14L (забезпечує специфічність взаємодії), p150 (VPS15) та утворює фосфатидилінозитол–3–фосфат (PI3P), необхідний для нуклеації фагофора. Баланс між PI3K та фосфатазами (MTMR3, Jumpy) регулює рівні PI3P [85]. Комплекс формує спеціалізовані домени мембрани, багаті на PI3P, які рекрутують ефекторні білки (наприклад, WIPI2) [66].

ATG12–ATG5–ATG16L1 комплекс (розширення площі мембрани) забезпечує подовження фагофора через систему кон'югації LC3/ATG8. ATG12 кон'югує з ATG5 (за участю ATG7 та ATG10) далі зв'язується з ATG16L1, утворюючи олігомер (~800 кДа у ссавців). Взагалі, комплекс діє як E3–лігаза для системи LC3 та ліпіда [82]. Локалізується на зовнішній поверхні фагофора і регулює правильне розширення мембрани, а після завершення формування аутофагосоми він дисоціює [69]. Комплекс необхідний для подовження, але не ініціації мембрани [82].

Beclin–1 і PI3K–комплексу. Beclin–1 (ATG6) є основним компонентом PI3K–комплексу класу III, який відіграє вирішальну роль у ініціації аутофагії шляхом утворення фосфатидилінозитол–3–фосфату (PI3P). До складу комплексу входять VPS34 (каталітична підодиниця PI3K), p150 (VPS15, регуляторна підодиниця), ATG14L (специфічний для аутофагії адаптер), Beclin–1 (основний регуляторний білок) [66]. Активність Beclin–1 знаходиться під строгим контролем кількох механізмів. У стані спокою Beclin–1 зв'язаний із

антиапоптотичним білком Bcl-2, що пригнічує його функцію. Під час стресу mIRE1 α m (ендоплазматичний ретикулум-асоційований сенсор) активує mJNK-шлях m через TRAF2, що призводить до фосфорилювання Bcl-2 та звільнення Beclin-1 [13].

ULK1-комплекс фосфорилює Beclin-1 по залишку Ser14, що посилює його взаємодію з VPS34 та сприяє формуванню PI3P-багатих доменів [13]. Специфічний для ссавців білок AMBRA1 зв'язує Beclin-1 з ULK1-комплексом, сприяючи його димеризації та подальшій активації. Також AMBRA1 опосередковує рекрутування Beclin-1 до екзоцистного комплексу, що важливо для правильного формування фагофора [66]. Beclin-1-комплекс забезпечує генерацію PI3P, готуючи платформу для рекрутування ефекторних білків (наприклад, WIPI2). Цікаво, що комплекс інтегрує сигнали від ULK1, стресу ER та інших шляхів для точного контролю аутофагії. А завдяки взаємодії з ATG14L комплекс забезпечує специфічність саме до аутофагії (а не інших процесів, що залучають VPS34). Тобто, Beclin-1-комплекс є центральним інтегратором сигналів, що контролюють ініціацію аутофагії. Ці механізми забезпечують точну відповідь клітини на зміни умов навколишнього середовища та метаболічні потреби.

Структура та біогенез LC3. LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), відомий як ATG8 у дріжджів, належить до родини білків ATG, які відіграють центральну роль у формуванні та функціонуванні аутофагосом [86]. Процес активації LC3 включає кілька послідовних етапів: протеолітичну обробку, кон'югацію з фосфатидилетаноламіном (PE) та декон'югацію [7].

Так, після синтезу LC3-I піддається обробці протеазою ATG4, що призводить до утворення цитозольної форми LC3. За участю ферментів E1 (ATG7), E2 (ATG3) та E3-лігазного комплексу ATG12-ATG5-ATG16L молекула LC3-I ковалентно зв'язується з PE [82, 7]. Ця реакція призводить до утворення мембрано-асоційованої форми LC3-II, яка інтегрується в мембрану аутофагосоми [84]. А після завершення формування аутофагосоми ATG4 може здійснювати зворотну реакцію, відщеплюючи LC3-II від мембрани для

подальшого рециклінгу білка. LC3 виконує кілька критичних функцій у процесі аутофагії: по–перше, бере участь у подовженні мембрани та закритті аутофагосом, а, по–друге, через взаємодію з рецепторними та адаптерними білками (p62, NBR1, Nix у ссавців; ATG19, ATG32 у дріжджів) LC3 забезпечує специфічне зв'язування субстратів, що підлягають деградації [82, 79]. Ця взаємодія відбувається через спеціальні мотиви LIR/AIM (LC3–interacting region/Atg8–interacting motif) [79] або (GIMs), (у випадку GABARAP–interacting motif) [87], у складі адаптерних білків [88]. Дослідження останніх років виявили чотири основні убіквітин–зв'язуючі рецептори аутофагії у ссавців: p62, NBR1, NDP52 та оптінейрин, кожен з яких має унікальні особливості функціонування [89]. Ці рецептори можуть працювати як синергічно, так і незалежно, залежно від характеру вантажу, що підлягає деградації. Наприклад, було показано, що p62 і NBR1 часто діють спільно при націлюванні поліубіквітинованих білкових агрегатів до аутофагосом [82, 90]. LC3/ATG8 є ключовим білком, який інтегрує механізми формування аутофагосом, селективного включення вантажу та моніторингу аутофагічної активності. У цього білка є великий діагностичний та терапевтичний потенціали. Наразі аналіз проб LC3 широко використовується для оцінки стану аутофагії при різних патологіях, включаючи нейродегенеративні захворювання та рак. В свою чергу, модуляція активності LC3 може бути перспективним підходом для корекції порушень аутофагії [88].

GABARAP (GABA type A receptor–associated proteins). ABARAP (GABA receptor–associated protein) належить до родини білків ATG8, яка включає також LC3 та GATE–16. Ці білки мають структурну схожість, але виконують різні функції на різних етапах аутофагії. GABARAP був спочатку ідентифікований як білок, що взаємодіє з γ –аміномасляною кислотою (GABA) рецепторами та цитоскелетом [82, 91]. У дріжджів існує лише один білок ATG8, а у ссавців еволюційно з'явилися три основні підродини–LC3 (MAP1LC3A, B, C), GABARAP (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2) та GATE–16 (останнім часом класифікується як GABARAPL2) [82, 92]. Спільним між GABARAP і LC3 є те, що обидва зазнають послідовних модифікацій. Знову

процесинг кінцевого пептиду ATG4 протеазою активує білок, який потім піддається кон'югації із фосфатидилетаноламіном (PE) за участю комплексу E1–E2–E3–подібного ферментів (ATG7, ATG3 та ATG12–ATG5–ATG16L1) [82, 7, 69]. І хоча GABARAP і LC3 мають схожі механізми активації, вони відрізняються за своїми функціями. Так основна функція LC3 білка це елонгація мембрани фагофора, при чому локалізується він переважно на ранніх аутофагосомах. І має широкий спектр білкових взаємодій (p62, NBR1, тощо). В свою чергу, GABARAP регулює процес злиття аутофагосом з лізосомами, що відбувається вже із пізніми аутофагосомами [93, 94]. Ну а його мішенями для білок–білкових контактів є рецептори GABA та білки цитоскелету [95].

Сучасні дослідження показують, що GABARAP залучений на останніх стадіях формування аутофагосом [96]. Власне, бере участь у процесі дозрівання аутофагосом і сприяє злиттю аутофагосом з лізосомами. А надалі може взаємодіяти з компонентами SNARE–комплексу, що забезпечує правильне позиціонування аутофагосом у клітині. Ці особливості роблять GABARAP важливим об'єктом для подальших досліджень механізмів аутофагії та розробки нових терапевтичних підходів.

Rab–білки (Rab GTPases). Процес злиття аутофагосом з лізосомами є складним і строго регульованим механізмом, який залежить від координованої роботи численних білкових комплексів. Дослідження, проведені на дріжджах і ссавцях, виявили ключову роль білків SNARE у цьому процесі. У дріжджах до них належать Vam3, Vam7, Vti1 та Ykt6, тоді як у ссавців цю функцію виконує, зокрема, syntaxin 17. Ці білки діють разом із гомологами NSF, SNAP та GDI (Sec17, Sec18, Sec19), утворюючи молекулярний механізм, який забезпечує специфічне розпізнавання та злиття мембран [11]. Особливу роль у регуляції цих процесів відіграють Rab–ГТФази. Білок Ypt7 у дріжджах та його гомолог Rab7 у ссавцях є критично важливими для фінального етапу злиття аутофагосом з лізосомами. Вони взаємодіють із комплексом HOPS (гомотипне злиття і сортування білків у вакуолях), який стабілізує SNARE–комплекси та сприяє ефективному злиттю мембран. Після успішного злиття лізосомальні

гідролази отримують доступ до вмісту аутофагосоми, ініціюючи процес деградації її внутрішньої мембрани та вмісту [88]. Формування самої аутофагосоми також залежить від везикулярного транспорту. Додаткові мембранні компоненти надходять від апарату Гольджі у вигляді ATG9–збагачених везикул. Цей процес регулюється транспортними комплексами, зокрема TRAPP (транспортна білкова частинка), а також за участю Rab–ГТФаз, таких як Rab1, Rab11 та Rab33B [97]. Останній, взаємодіючи з комплексом ATG16L1, відіграє особливу роль у доставці мембранного матеріалу до місця формування ізоляційної мембрани [66].

Цікаво, що процеси аутофагії тісно пов'язані з ендоцитозним шляхом. Клатрин–вкриті везикули, що утворюються в результаті інвагінації плазматичної мембрани, проходять складний шлях перетворення. Спочатку вони стають RAB5–позитивними ранніми ендосомами, які згодом дозрівають до RAB7–позитивних пізніх ендосом або мультивезикулярних тілець (MBT). Останні характеризуються наявністю численних інтралюмінальних везикул і утворюються за участю комплексів ESCRT (ендосомальний комплекс, необхідний для транспорту). Ця складна мережа взаємодій підкреслює високий рівень інтеграції між різними транспортними шляхами в клітині та демонструє, як клітина координує процеси деградації та рециклінгу своїх компонентів [66].

SNARE–білки. Процес злиття аутофагосом з лізосомами – критичний етап аутофагії, що регулюється ключовими білковими комплексами. Білок PLEKHM1, який є ефектором Rab7, відіграє центральну роль у координації злиття мембран. Він діє як молекулярний міст, зв'язуючи HOPS–комплекс (гомотипного злиття і сортування білків у вакуолях) з LC3/GABARAP на поверхні аутофагосом [98]. HOPS–комплекс, зокрема його компоненти VPS33A та VPS16, безпосередньо взаємодіє з синтаксином 17 (STX17)–основним SNARE–білком аутофагосом [99]. Ця взаємодія стабілізує SNARE–комплекс і забезпечує ефективне злиття мембран. SNARE–білки є ключовими виконавцями злиття: STX17 (аутофагосома), SNAP29 (адаптер) та VAMP8 (лізосома) формують стабільний комплекс для механічного зближення мембран

[100]. Важливим механізмом регуляції є ацетилювання STX17 білком CREBBP: при голодуванні деацетилювання покращує рекрутування SNAP29 [101]. Процес злиття також залежить від білків RUBCNL/Pacer (прискорює аутофагію, взаємодіючи з STX17), активності Rab7 (контролює час і місце злиття). А ендосоми (наприклад через сортуючі комплекси ESCRT) можуть модулювати процес завершення злиття [102]. Успішне злиття призводить до утворення аутолізосоми та деградації вмісту, що дозволяє клітині точно регулювати аутофагію.

mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Мішень рапаміцину ссавців (mTOR), не будучи структурним білком аутофагії, виступає основним негативним регулятором цього процесу. Його регуляторний вплив реалізується через комплекс mTORC1, який у стані активності пригнічує ініціацію аутофагії. У тварин це відбувається шляхом фосфорилування ключових компонентів ULK1-комплексу, зокрема ULK1/2 та ATG13, що блокує формування фагофора [103]. Проте при дефіциті поживних речовин, особливо амінокислот, активність mTORC1 значно знижується, що призводить до його дисоціації від ULK-комплексу та активації останнього [103]. Цей механізм є основним способом ініціації аутофагії у відповідь на голодування. Паралельно існує альтернативний шлях активації аутофагії через 5'-АМФ-активовану протеїнкіназу (АМРК) [104], який активується при енергетичному дефіциті клітини. АМРК виконує подвійну функцію: з одного боку, вона пригнічує mTORC1, а з іншого—безпосередньо активує ULK1 шляхом фосфорилування [105]. Таке двонаправлене регулювання забезпечує надійний запуск аутофагії при різних стресових умовах, включаючи не тільки дефіцит поживних речовин, але й фізичне навантаження чи тепловий стрес [106]. Важливим регулятором аутофагії є також транскрипційний фактор ЕВ (TFEB), який координує експресію генів, пов'язаних як з аутофагією, так і з лізосомальним біогенезом. Активність TFEB знаходиться під контролем як mTOR (через фосфорилування), так і АМРК (через фолікулін, FLCN). При інгібуванні mTOR або активації АМРК відбувається ядерна транслокація TFEB, що призводить до

підвищення експресії генів, необхідних для формування та функціонування аутофагосом і лізосом [107]. Після ініціації аутофагії за участю ULK1–комплексу процес прогресує через стадії нуклеації мембрани, формування фагофора, його подовження та дозрівання. Завершальною фазою є злиття аутофагосом з лізосомою, де відбувається деградація вмісту та його подальша рециркуляція в клітині [84]. Таким чином, хоча mTOR і не входить до складу аутофагічного апарату, його регуляторний вплив є визначальним для контролю цього процесу.

1.3. Найважливіші родини білків, асоційованих з аутофагією у рослин

У рослин аутофагія має подібні механізми до тих, перебігають у тваринних клітинах, але є й специфічні особливості. Рослини також мають набір білків ATG, однак деякі родини білків мають відмінну регуляцію або унікальні варіанти.

ATG–білки (Autophagy–related proteins). Найважливішим відкриттям стало те, що механізми аутофагії виявилися високо консервативними в еволюції. Білки, виявлені в дріжджах, мали свої гомологи у тварин, а пізніше—і в рослинах. Ця консервативність стала основою для подальших досліджень, оскільки дозволила переносити знання, отримані на простих модельних організмах, на вищі еукаріоти [27]. Молекулярний апарат аутофагії побудований на двох основних груп білків. Перші це консервативні ATG–білки, які утворюють основний апарат для формування аутофагосом. Другі – додаткові рецептори, які забезпечують селективність процесу для конкретних субстратів [108]. Дослідження на дріжджах, ссавцях і рослинах (зокрема на *Arabidopsis thaliana*) виявили дивовижну подібність в організації цієї системи. Незалежно від організму, процес включає етапи формування фагофора (ізоляційної мембрани), рекрутування вантажу, злиття з вакуолю та деградацію вмісту [71]. Геномні дослідження підтвердили наявність повноцінної системи аутофагії у рослин. Так, у *Arabidopsis thaliana* було ідентифіковано понад 30

генів ATG, а в рисі (*Oryza sativa*)—33 гомологи. Подібні системи виявлені також у тютюну, кукурудзі та інших рослин [109, 110]. Консервативність аутофагії свідчить про критичну роль у підтриманні клітинного гомеостазу у всіх еукаріотів, від найпростіших дріжджів до складних багатоклітинних організмів, включаючи рослини [71].

Atg1–комплекс, що відповідає за ініціацію формування аутофагосом. Дослідження комплексу ATG1/13 у *Arabidopsis thaliana* виявили його ключову роль як регулятора та мішені аутофагії, демонструючи вражаючу еволюційну консервацію цього механізму. За допомогою біоінформатичного аналізу (BLAST) у геномі екотипу Columbia–0 були ідентифіковані ортологи основних субодиниць комплексу—ATG1a/1b (кіназні компоненти), ATG13a/13b (регуляторні субодиниці), ATG101 (консервативний кофактор), FIP200 або ATG17 (структурний компонент) [81, 4, 111]. Цікаво, що на відміну від дріжджів, у *Arabidopsis* (як і у тварин) не виявлено гомологів ATG11, ATG29 та ATG31, що вказує на дивергенцію деяких регуляторних механізмів у рослин. Аналіз геномної організації чотирьох генів Atg1 виявив високий ступінь консервативності екзон–інтронної структури, що свідчить про їх походження від спільного предкового гена [81]. Експериментальні дослідження підтвердили, що комплекс ATG1/13 у *Arabidopsis* зберігає ключові функції, аналогічні до інших еукаріот. Формування комплексу забезпечується білками ATG1a та ATG13a, які локалізуються разом у аутофагосомах і вакуолях [81]. Як і в тварин, ATG1/13 *Arabidopsis* фосфорилує ключові субстрати та взаємодіє з іншими компонентами аутофагічного апарату (наприклад, ATG8) [112]. Мутації в ATG13 призводять до порушення транспорту ATG8–декорованих аутофагосом у вакуолю [81, 113]. Незважаючи на консервативність, комплекс ATG1/13 у рослин має особливості. Серед них необхідно відзначити наявність декількох ізоформ (ATG1a/1b, ATG13a/13b) – можливо, для тонкої регуляції, та зв'язок із вакуолярною системою – ключовою органелою рослинних клітин. І ще, можлива участь у стресових відповідях, специфічних для рослин [81].

PI3K–комплекс (VPS34): включає ATG6 (Beclin–1 гомолог).

Поліфосфоінозитиди (PPIs) є ключовими сигнальними молекулами, що визначають ідентичність мембранних компартментів у рослин, регулюючи везикулярний транспорт від ЕР до вакуолей [114, 115]. Центральну роль у ініціації аутофагії відіграє PI3K класу III (VPS34), який синтезує фосфатидилінозитол–3–фосфат (PI3P)–критичний маркер мембран фагофора. У рослин цей комплекс включає VPS34, VPS15, ATG6 та альтернативні регулятори (ATG14, VPS38) [31, 116]. Генетичні дослідження *Arabidopsis* показали, що мутанти *vps34*, *atg6* чи *vps15* зберігають життєздатність, незважаючи на порушення аутофагії [116]. Формування фагофора потребує координації ATG1–кіназного комплексу (ініціація процесу та ATG9–ATG2–ATG18 системи) та ATG9–ATG2–ATG18 системи (доставка ліпідів), де PI3P забезпечує рекрутинг WIPI–білків (ATG18) та асоціацію ATG8–PE [117].

На відміну від тварин, рослинний PI3K–комплекс демонструє пластичність: мутанти часто виживають із додатковими фенотипами (розвиток органів, стрес, трафік) [118; неопублік. дані Liu et al.]. Це свідчить про еволюційні адаптації рослин до регуляції аутофагії. Ці механізми забезпечують точний контроль над інтенсивністю аутофагічного потоку, формують селективність щодо специфічних субстратів, інтегрує аутофагію із іншими клітинними процесами [51].

ATG12–ATG5–ATG16–комплекс: залучений до кон'югації ATG8.

Процес формування аутофагосом у рослинах регулюється складною системою убіквітин–подібних білків, серед яких центральне місце займає ATG8 – рослинний гомолог LC3. Зріла форма ATG8 спочатку активується за допомогою АТФ–залежного ферменту ATG7, який функціонує за принципом, аналогічним E1–убіквітин–активуючим ферментам. Після активації ATG8 переноситься на кон'югуючий фермент ATG3 (аналог E2), де готується до заключного етапу–ковалентного зв'язування з фосфатидилетаноламіном (PE) мембрани фагофора [51]. Ключовим моментом у цьому процесі є участь гексамерного лігазного комплексу, що складається з білків ATG5, ATG16 та

кон'югату ATG12–ATG5. Формування цього комплексу починається з утворення ковалентного зв'язку між ATG12 та ATG5, що каталізується тими ж ферментами ATG7 і ATG10. Ця реакція призводить до утворення ізопептидного зв'язку між С–кінцевим гліцином ATG12 та консервативним Lys у складі ATG5 [82]. Отриманий кон'югат ATG12–ATG5 потім асоціює з димерним білком ATG16, утворюючи стабільний комплекс, який виконує функцію E3–лігази, необхідної для ефективного зв'язування ATG8 з PE [54, 118].

ATG8 (LC3 гомолог). Рослини мають більше ізоформ ATG8, ніж тварини (*Arabidopsis* 9 генів, ссавці ≤ 6), що дозволяє тонко регулювати аутофагію при стресі [118]. ATG8 у рослин виконує кілька критичних функцій: від маркування мембран аутофагосом до участі у селективному рекрутингу вантажу для деградації. Його асоціація з мембранами є надійним маркером аутофагічної активності, що широко використовується в дослідженнях [116]. Система кон'югації ATG8 тісно пов'язана з попередньої убіквітин–подібною системою, що включає ATG12. Ці дві системи, незважаючи на свою незалежність, функціонально взаємопов'язані через комплекс ATG12–ATG5–ATG16, який виступає критичним фактором у біогенезі аутофагосом. Кон'югат ATG12–ATG5 не тільки забезпечує E3–лігазну активність для ATG8–PE, але й бере участь у правильній локалізації цього процесу на мембрані фагофора [50]. Цей механізм консервативний у рослин, незважаючи на їх унікальність (клітинна стінка, вакуоль) [119]. У процесах селективної аутофагії рослин ключову роль відіграють ATG8 та спеціалізовані рецепторні білки, які забезпечують розпізнавання та доставку вантажу до аутофагосом. Серед них особливе місце займає білок NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1), який у тваринних клітинах функціонує як аналог іншого відомого рецептора–p62/SQSTM1.

Ключовий рецептор–NBR1, який поєднує функції тваринних p62 і NBR1. Він олігомеризується через PB1–домен і зв'язує убіквітиновані білки для деградації [120, 121]. Рецептори (наприклад, NBR1) зв'язують вантаж і ATG8 на аутофагосомах, забезпечуючи деградацію пошкоджених білків або патогенів (ксенофагія) [51, 122]. Виявлено у *Arabidopsis* та *Nicotiana tabacum* [123].

Містить PB1 (олігомеризація), ZZ, NBR1/FW та UBA–домени (зв'язування убіквітину). Однак точні механізми взаємодії цих доменів з убіквітином потребують подальшого вивчення.

RAB–білки. Процес аутофагії у рослинах залежить від везикулярного транспорту, де ключову роль відіграють RAB–ГТФази. Особливо важливим є злиття аутофагосом з вакуолями, хоча механізми у рослин досі вивчаються [24]. Злиття потребує дії білкових комплексів, зокрема SNARE, HOPS та RAB–ГТФаз. У *Arabidopsis thaliana* виявлено вісім гомологів RAB7, з яких підгрупа RABG3 найбільш пов'язана з аутофагією [124]. Білок RABG3b має критичне значення: його активна форма посилює аутофагію, а мутантні форми її пригнічують. Це свідчить про ключову роль RABG3b у формуванні аутофагосом [24]. Транспорт аутофагосом залежить від взаємодії PI3P, ATG8, адаптера FYCO1 та RAB7, що рухаються за допомогою кінезинів. У злитті з вакуолею беруть участь VTI12 та інші білки (CHMP1, FREE1 тощо). Функція RABG3B ще не до кінця з'ясована, але він може діяти аналогічно дріжджовим гомологам [125].

SNARE–білки. SNARE–білки (Soluble NSF Attachment Protein REceptors) відіграють ключову роль у злитті мембран, зокрема при формуванні аутофагосом та їх злитті з вакуолями у рослин. На відміну від тваринних систем, ці механізми у рослин вивчені недостатньо. Експериментально підтверджено участь SNARE–білка VTI12 у цьому процесі [125]. Він є ортологом дріжджового Vti1 і входить до складу розчинного N–етилмалеїмід–чутливого фактору. Дослідження на мутантах *Arabidopsis* з порушеним геном VTI1 показали, що за нормальних умов фенотип не змінюється, але при дефіциті поживних речовин спостерігається прискорене старіння, що вказує на його роль у аутофагії. Крім того, VTI12 бере участь у транспорті запасних білків до вакуолі [126]. Хоча рослини експресують багато SNARE–білків (наприклад, для захисту від патогенів [83] або секреторного транспорту [127]), лише VTI12 безпосередньо задіяний у злитті аутофагосом з вакуолями [125]. Інші SNARE–білки, такі як VTI11, VAMP711, SYP22/SYP21 та SYP51, можуть

регулювати мембранне злиття і транспортування білків у вакуолярних шляхах, зокрема у превакуолярному компартменті (PVC) та тонопласті [126, 128].

TOR–кіназа. Кіназа TOR (Target of Rapamycin), яка належить до родини фосфатидилінозитол–3–кіназ, є ключовим регулятором клітинного метаболізму та проліферації, що чутливо реагує на наявність поживних речовин у клітині [129, 130]. Цей фермент виконує функцію центрального сенсора енергетичного статусу клітини, інтегруючи сигнали про доступність амінокислот, глюкози та інших важливих метаболітів. Як показали численні дослідження, TOR–кіназа виступає потужним негативним регулятором процесу аутофагії [131]. У умовах достатнього живлення активна форма TOR пригнічує аутофагію через фосфорилування ключового білка ATG13 [105]. Це посттрансляційне модифікування знижує здатність ATG13 взаємодіяти з кіназою ATG1, утворюючи функціональний комплекс, необхідний для ініціації формування аутофагосом [105]. Утворений комплекс ініціює каскад фосфорильованих реакцій, які забезпечують рекрутування інших білків аутофагічного апарату, необхідних для формування та розширення фагофорної мембрани [111]. Дослідження на різних модельних організмах продемонстрували, що фармакологічне інгібування TOR (наприклад, рапаміцином) достатньо для індукції аутофагії навіть за наявності поживних речовин, що відкриває перспективи для терапевтичного застосування цих механізмів [131]. Таким чином, TOR–залежна регуляція аутофагії представляє собою тонко налаштовану систему, яка забезпечує баланс між анаболічними та катаболічними процесами в клітині. Подальше вивчення молекулярних механізмів цієї регуляції може мати важливе значення для розуміння патогенезу різних захворювань, пов'язаних із порушенням клітинного метаболізму.

SnRK1 (SNF1–Related Kinase 1). У рослин існує консервована система регуляції аутофагії, аналогічна тваринній. Ключові регулятори–AMP–активована протеїнкіназа (SnRK1/KIN10) та TOR–кіназа–діють як антагоністи [132]. Сімейство протеїнкіназ SNF1/AMPK/SnRK1 виконує у еукаріотів

ключову роль у підтримці енергетичного гомеостазу. У *Arabidopsis thaliana* цю функцію здійснює комплекс SnRK1, який структурно та функціонально є ортологом тваринної AMPK та дріжджової Snf-1 кінази.

Ця подібність вказує на еволюційно консервований характер механізмів регуляції клітинного метаболізму [133]. **SnRK1** підтримує енергетичний гомеостаз через три субодиниці (α , β , γ) [134]. Каталітичні субодиниці **KIN10/KIN11** активують аутофагію при дефіциті енергії, функціонуючи вище за TOR-кіназу [135]. Підвищення їх експресії під час гіпоксії підтверджує роль у стрес-толерантності [136]. SnRK1 може фосфорилувати **ATG1**—ключовий ініціатор аутофагосом, що узгоджується з їх взаємодією з TOR [137]. Подібність регуляторних механізмів аутофагії у рослин і тварин відкриває нові можливості для порівняльного аналізу еволюції клітинних сигнальних шляхів та розробки стратегій управління цими процесами у біотехнологічних цілях.

РОЗДІЛ 2

ОСНОВНІ ЕТАПИ ТА ТИПИ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН

2.1. Етапи процесу аутофагії

Ініціація аутофагії. Індукція аутофагії супроводжується появою в цитоплазмі чашоподібної мембранної структури, відомої як фагофор (хоча вона також має альтернативну назву—ізоляційна мембрана або ІМ). Згодом фагофор подовжується, щоб вмістити субстрати, з якими він повинен взаємодіяти, після чого він закривається і ущільнюється, утворюючи аутофагосому—структуру, яка характеризується наявністю подвійної мембрани [138]. Аутофагосоми у дріжджів утворюються в одній точці—PAS [46], де відбувається ініціація, нуклеація, подовження і закриття чашоподібної мембрани—попередника—фагофора. Початковий етап ініціації аутофагії контролюється комплексом ATG1–ATG13–ATG17, який інгібується кіназою—мішенню рапаміцину (TOR) у присутності поживних речовин. У ссавців ініціаторний комплекс еволюційно консервативний: ULK1 і ULK2 є гомологами Ser/Thr–кінази ATG1, а mATG13 і FIP200 (також відомий як RB1CC1) представляють ATG13 і ATG17, відповідно [139]. Зародження фагофора, тобто ініціація формування фагофора, індукується внаслідок активації та належного локалізації основних механізмів аутофагії [140, 141]. Зазначені механізми підлягають ретельному регуляторному процесу, що включає різні посттрансляційні модифікації, такі як фосфорилювання та убіквітинування. Яскравими прикладами цього є мішені кінази рапаміцину ссавців (mTOR) та АМФ–активованої кінази (АМРК) [104], які обернено регулюють аутофагію шляхом фосфорилювання ключових компонентів основного механізму аутофагії, включаючи субодиниць комплексів ULK та РІКЗСЗ, що сприяють росту клітин [103, 142].

Відомий науковий дослідник аутофагії та білків ATG8; Хітоші Накатогава з Токійського технологічного інституту, разом з іншими колегами;

Nakatogawa та ін. [3, 32, 143] ідентифікували 19 з понад 40 білків ATG, задіяних в індукованій, в умовах нестачі поживних речовин аутофагії. Ключові білки Atg складаються з шести функціональних одиниць: кіназний комплекс Atg1; везикули ATG9; фосфатидилінозитол (PI) 3-кіназа (PI3K) комплекс I; комплекс ATG2–ATG18; система кон'югації ATG12 та система кон'югації ATG8. Реагуючи на дію харчового стресу, ці білки взаємодіють один з одним, впорядковано локалізуються в місці утворення аутофагосом та формують PAS [3, 144, 145] в якій генерується попередник аутофагосомальної мембрани. Молекулярні основи організації PAS, включаючи те, як білки Atg рекрутуються до PAS, є ключовим питанням, яке необхідно вирішити для розуміння «нуклеаційного» етапу формування аутофагосом [146]. Є дві можливі моделі взаємозв'язку між PAS та IM. У першій моделі PAS генерує IM; у другій–PAS безпосередньо перетворюється на IM. У дріжджів ATG8 та більшість інших білків Atg все ще локалізуються в PAS навіть після утворення аутофагосом [144, 46] що, схоже, підтверджує першу модель. У ссавців мембрана у формі півмісяця, декорована ATG5, перетворюється на зрілу аутофагосому, після чого ATG5 відходить від мембрани аутофагосом [147, 148].

Основні ланки етапу ініціації формування аутофагосом. Як зазначено в роботі [149], після тривалих досліджень було ідентифіковано близько 20 основних білків ATG, які відіграють ключову роль у процесі формування аутофагосом. Їх можна поділити на кілька груп, зокрема: комплекс ATG1, фосфатидилінозитол–3-кіназний комплекс (PI3K–комплекс), везикули ATG9, комплекс ATG2–ATG18 та системи кон'югації ATG [150]. Для утворення фагосом необхідна серин/треонінова кіназа ATG1 (unc-51–подібна кіназа 1, ULK1 у ссавців). У дріжджів ATG1 утворює комплекс з регуляторними білками ATG13, ATG17, ATG29 і ATG31 у відповідь на сигнали, що індукують аутофагію [130, 151]. Отже, комплекс функціонує як каркас, полегшуючи таким чином організацію PAS, динамічної збірки білків Atg, під час ініціації утворення везикул, пов'язаних з аутофагією [3, 151, 152]. Показано, що утворення комплексу PAS–скаффолду посилює кіназну активність ATG1 [130]

яка, в свою чергу, регулює локалізацію PAS наступних за ним білків Atg, певно, через фосфорилювання певних протеїнів [153]. Вважається, що основним і досить складним комплексом ініціації аутофагії є кіназний комплекс Atg1. Аутофагія сильно індукується голодуванням, а PAS—це структура, що утворюється при накопиченні білків Atg [46]. Утворення аутофагосом запускається самим PAS, який збирається комплексом Atg1. Це первинний контур, який збирається, тоді як функціональні зміни в активності аутофагосом забезпечуються окремим кластером білків, таких як ATG5, ATG7 та ATG8 [153]. Як було показано в дослідженнях на *A. thaliana*, білки ATG1 взаємодіють з білками ATG11, ATG13 та ATG101, які сприяють зв'язуванню комплексу ATG1/13 з мембранами аутофагів [154]. Таким чином, протеїнкіназа ATG1 є ключовим регулятором активації аутофагії і відіграє стрижневу роль на багатьох етапах цього процесу, від утворення аутофагосом до їхнього зв'язування з мембраною, за участі ATG8. Згідно наявних літературних даних [155], голодування сильно індукує аутофагію—процес, який сам по собі підлягає регуляції за допомогою сенсора Tor—кіназного комплексу 1 (TORC1) та його субстрату ATG13 [156, 157, 130]. В умовах надлишку поживних речовин ATG13 гіперфосфорилюється внаслідок активності TORC1. У разі індукованого голодуванням пригнічення TORC1 відбувається швидке дефосфорилювання ATG13, що ініціює збірку PAS і, як наслідок, формування фагосом. Попередні дослідження встановили [155], що ATG13 взаємодіє з Atg1, єдиною ідентифікованою протеїнкіназою, яка вважається необхідною для аутофагії. Комплекс ATG1–ATG13 згодом взаємодіє з комплексом ATG17–ATG29–ATG31, який конституціонально утворюється як PAS–скафолд–підкомплекс [130, 158]. Важливо зазначити, що ці взаємодії зрештою призводять до утворення комплексу ATG1–ATG13–ATG17–ATG29–ATG31 (комплекс Atg1; комплекс ULK1 у ссавців) [151, 152]. У цій якості комплекс функціонує як каркас для PAS, таким чином рекрутуючи наступні білки ATG до PAS та ініціюючи формування аутолізосом.

Елонгація аутофагосоми. Розширення мембрани фагофора відбувається одночасно з поглинанням субстратів, призначених для деградації. Вважається, що після стимуляції макроаутофагія вимагає мобілізації мільйонів молекул ліпідів на клітину для росту аутофагосоми [142]. Постулюється три потенційні механізми, що сприяють подовженню мембрани фагофора: доставка, опосередкована везикулами, пряма екструзія з попередньо існуючих органел та пряма доставка, опосередкована білком–переносником ліпідів [142, 59].

Найбільш заплутаним питанням щодо ролі систем кон'югації ATG є те, чи потрібні вони для елонгації мембран. У дріжджів ATG8 виявився необхідним для етапу елонгації, оскільки аутофагічні структури, навіть частково подовжені мембрани, не накопичуються в клітинах ATG8 [159, 160]. Точний механізм ATG8–опосередкованого подовження мембран залишається невідомим. Активність ATG8 щодо зв'язування/злиття мембран [161, 162] потенційно може сприяти аутофагічній елонгації [163]. Водночас ATG8 високо експресується під час аутофагії [159]. Ця експресія необхідна для розширення ІМ [164]. У процесі формування аутофагосом ATG8–PE локалізується в ІМ [159], що також свідчить про його роль в експансії ІМ [148].

Експансія або розширення аутофагосоми. Експансія фагофора супроводжується дефіцитом трансмембранних білків [165, 166], це що свідчить про те, що розширення мембрани пов'язане, насамперед, з надходженням ліпідів [142]. Сучасна точка зору [162] полягає в тому, що розширення фагофора вимагає забезпечення і подальшого злиття мембранного матеріалу нехарактеризованого походження. Кілька досліджень залучили як дріжджовий ATG8 [161], так і людські LC3 і GATE–16 [167], до процесів злиття, що лежать в основі експансії фагофора. У клітинному середовищі спостерігається подовження головної осі везикул, що індукується білками ATG8 за рахунок фузогенної активності. У цьому дослідженні [162], найефективніші аналоги ATG8, а саме GATE–16 і GABARAP, викликали значний ріст везикул, утворюючи сферичні структури. На противагу цьому, LC3, менш ефективний фузоген, призводив до утворення витягнутих, арахісоподібних структур.

Одна з версій щодо джерела ліпідів полягає в тому, що ліпіди переносяться структурою, яка містить трансмембранний білок ATG9. У моделі рециркуляції ATG9, ATG9 доставляє ліпіди до PAS або IM, що розширюється, і рециркулює назад до цитоплазматичного пулу, щоб рекрутувати ліпіди для доставки [168, 148].

Дозрівання аутофагосом. Відомо, що аутофагічний та ендоцитарний шляхи є гілками лізосомальної травної системи [74, 169]. Перший відповідає за деградацію цитоплазматичних компонентів, тоді як другий – за деградацію екзогенних речовин. Незважаючи на відсутність прямих доказів, біохімічні та морфологічні дані підтримують гіпотезу про те, що аутофагічний та ендоцитарний шляхи можуть протікати паралельно [74, 169]. Утворення аутофагічної вакуолі (AV) ініціюється сегрегацією цитоплазматичних ділянок за допомогою фагофора [170], який згодом генерує зародкові або незрілі аутофагічні вакуолі (AVi). Після поглинання білків лізосомальної мембрани, закислення рН і гідролаз, AVi стає вразливою до деградації (AVd) [94]. Мембрана, що її оточує, стає рівномірною по ширині, а вміст розпадається. Цей процес дезінтеграції є характерною ознакою AVi. В контексті аутофагії переважає точка зору, що AV зазнають злиття з попередніми лізосомами [171], що призводить до набуття кислотних гідролаз і зустрічі з екзогенними матеріалами. Це свідчить про конвергенцію аутофагічного та ендоцитарного шляхів на лізосомальному рівні [172]. Отримані результати [173] свідчать про те, що дозрівання (AVis–аутофагічних везикул) може включати низку подій: (а) включення мембранних білків лізосом; (б) закислення вакуолі; і (в) набуття гідролаз. Доведено, що у процесі дозрівання аутофагосом дріжджовий ATG8–PE індукуює агрегацію ліпосом *in vitro* [161], що проливає світло на можливу роль цього білка в біогенезі (AP–аутофагосом) [162]. Нарешті, злиття новоутворених вакуолей з існуючими призводить до вивільнення внутрішніх везикул, що містять вантаж, так званих «аутофагічних тілець», всередину вакуолі. Далі відбувається деградація цих тілець всередині вакуолі [149].

2.2. Мікроаутофагія

Транспортування білків до вакуолей/лізосом задля деградації здійснюється за допомогою різних механізмів [12]. Згідно з результатами досліджень, рослини демонструють три різні, але невиключні форми аутофагії: мікроаутофагія, макроаутофагія та мегааутофагія [55]. Встановлено, що мікроаутофагія супроводжується двома специфічними мембранними процесами, а саме: інвагінацією та розщепленням вакуолярної мембрани [174]. Мікроаутофагія – це прямий ендоцитоз і деградація вантажу вакуолями, при якому відбувається пряме поглинання цитоплазматичного вмісту тваринними лізосомами або вакуолею у рослин [175]. Можливі класифікації процесу можуть ґрунтуватися на локалізації мікроаутофагії (ендосоми проти лізосом) або морфології проміжних продуктів поглинання (інвагінації мембрани проти розширень) [176]. На тваринах було вперше продемонстровано тип мікроаутофагії із поділом, що вимагає ESCRT (ендосомальний сортувальний комплекс, необхідний для транспортування), зазначений механізм поглинає пори у плазматичних мембранах, які мають форму пунктиру, і видаляє пори з плазматичної мембрани при регульованій загибелі клітин, апоптозі, некроптозі, піроптозі, фероптозі та аутофагії [177], а також для розщеплення мембрани, але, можливо, і для брунькування мембрани [178]. Тип злиття мікроаутофагії продукує мікроаутофагічні тільця за іншим механізмом – утворюються інвагінації або розширення мембрани, які потім зливаються шляхом злиття з фагофороподібними білками, такими як ATG30 і ATG39, що зв'язують вантаж з основним механізмом аутофагії [175]. Основу аутофагічного вантажу в цьому випадку складають мембранні білки вакуолі, які мітяться убіквітином для розпізнавання ESCRT і деградує задля ремоделюванню вакуолі [179, 180]. Примітно, що невеликі мікроаутофагічні тільця іноді виявляються пов'язаними між собою [181]. Зазвичай конкатенатні інтралюмінальні везикули рідко зустрічаються у дріжджів, але є поширеними в ендосомах рослин [182]. Можливо, їх утворення індукується за певних обставин [175].

2.3. Макроаутофагія

Селективна та неселективна аутофагія. Процес аутофагії здатний до селективності, оскільки він може формувати аутофагосоми навколо дискретного вантажу, виключаючи решту цитоплазми [183]. Відповідно, саме під час макроаутофагії клітинні рештки захоплюються бімембранними структурами аутофагосом, які секвеструють їх. Цей процес призводить до випадкової деградації об'ємних білків та ідентифікації субстратів аутофагії спеціалізованими рецепторами, які вибірково усувають певні компоненти [175, 184, 185]. Розрізняють неселективну та селективну макроаутофагію. Макроаутофагія, основний лізосомозалежний шлях деградації білків, індукується за умов азотного та/або вуглецевого та цинкового голодування [174, 186, 187]. Неселективна (об'ємна або загальна) аутофагія не потребує рецепторів і лігандів і не має критеріїв до вибору вантажу. Аутофагічна мембрана, що містить ATG8, здатна слугувати док-платформою, яка дозволяє рецепторам аутофагії вибірково ідентифікувати та зв'язувати вантажі, що підлягають деградації, таким чином опосередковуючи процес селективної макроаутофагії. Натомість неселективна макроаутофагія не потребує рецепторів аутофагії для селективного руйнування вантажу [188]. Ключ до розуміння специфіки аутофагії дала ідентифікація та характеристика селективних рецепторів аутофагії, таких як p62/SQSTM1 ссавців (секвестосома-1, також відома як p62) та дріжджів ATG19, які зв'язують вантаж з аутофагічним апаратом і спричиняють спрямоване формування аутофагосом [189, 190]. Саме ці білки розпізнають аутофагічний вантаж і, зв'язуючись з невеликими убіквітиноподібними модифікаторами (UBL)–ATG8/LC3/GABARAPs та ATG5, опосередковують формування селективних аутофагосом [139]. Рекрутинг вантажу до PAS, де формується аутофагічна везикула, залежить від взаємодії між рецептором і скаффолдом (білки–скаффолди селективно об'єднують специфічні білки в межах сигнального шляху

і забезпечують вибірккову просторову орієнтацію та часову координацію для полегшення та сприяння взаємодії між взаємодіючими білками). Так ATG11 є найбільш часто використовуваним скаффолд-білком, який опосередковує кілька типів селективної макроаутофагії, включаючи шлях спрямування з цитоплазми у вакуолі, мітофагія, пексофагія та ретикулофагія [191]. Одне з небагатьох досліджень особливостей рослинної аутофагії, на прикладі *Arabidopsis thaliana*, виявило, що ATG11, акцесорний білок комплексу ATG1–ATG13, виступає в ролі скаффолду, який з'єднує комплекс з аутофагічними мембранами [192]. Протеїни ATG11, ATG101, ATG1 та ATG13 взаємодіють між собою та з ATG8, зокрема ATG1 зв'язаний з ATG8 через канонічний ATG8–взаємодіючий мотив (AIM–ATG Inetracting Motif) [154]. Вплив ATG11 на правильну поведінку комплексу ATG1–ATG13 та вірну доставку аутофагічних везикул до вакуолі, ймовірно, відбувається саме через його взаємодію з ATG8 [192, 193].

Дослідження кожного додаткового вантажу селективної аутофагії спонукало до введення нової назви, тому наразі зростає кількість шляхів і відповідних термінів, визнаних у галузі селективної аутофагії [51]. Отже, пероксисоми [194, 195] та мітохондрії [196, 197] уперше були великими субстратами, котрі селективно зазнали деградації внаслідок аутофагії, що призвело до появи відповідних термінів «пексофагія» та «мітофагія» як опису зазначених процесів деградації [51].

Формування фагофору під час макроаутофагії називають процесом *de novo*, щоб відрізнити його від утворення везикул по всьому секреторному шляху [174]. Ключовим моментом є те, що фагофор розширюється для секвестрації вантажу різного розміру. До вантажів належать також частинки глікогену, краплі ліпідів, середні тіла, що утворюються під час цитокінезу, та гранули зимогену, які є мішенню для деградації макроаутофагами [191]. Детальніше про ці шляхи селективної аутофагії описано в низці оглядів [198, 199, 51].

2.4 Мега–аутофагія

Існує і більш прямий різновид аутофагії, відомий як мега–аутофагія. Мега–аутофагія це екстремальний процес аутофагії, що реалізується шляхом інфільтрації або розриву мембрани вакуолі, що сприяє прямому вивільненню вакуолярних гідролаз у цитоплазму беручи участь у деградації цитоплазматичних компонентів. Зокрема, мега–аутофагія часто відбувається під час запрограмованої клітинної загибелі (PCD)–процесу, що є невід’ємною частиною різних біологічних контекстів, таких як розвиток рослин та відповідь на патогени [55, 188]. Зазначений феномен може спостерігатися в контексті розвитку різних процесів, включаючи ксилогенез, або у відповідь на інвазію патогенів, як це ілюструє гіперчутлива відповідь [200, 201]. У рослин результат інфікування та активації аутофагії може змінюватися залежно від способу життя патогена, про що свідчать дослідження [202]. Рослини мають складну імунну систему, найбільш відомою особливістю якої є гіперчутлива відповідь, що асоціюється з PCD та негативна регуляція PCD [203].

РОЗДІЛ 3

ЗАЛУЧЕННЯ ЦИТОСКЕЛЕТУ ДО РОЗВИТКУ ПРОЦЕСУ АУТОФАГІЇ

3.1. Роль цитоскелету у розвитку процесу аутофагії

Як і для більшості мембранозв'язаних органел та везикул, різні аспекти динамічної поведінки аутофагії зумовлені механізмами їхньої взаємодії з цитоскелетом, особливо з МТ [204]. МТ являють собою порожнисті циліндри діаметром приблизно 25 нм, що утворюються шляхом полімеризації димерів α/β -тубуліну. У більшості клітин ссавців збірка інтерфазних МТ відбувається в центросомі та/або в мембранних центрах організації МТ (МТОС), включаючи комплекс Гольджі [205]. γ -Тубулін-вмісні кільцеві комплекси дають початок МТ і взаємодіють з їхніми мінусовими кінцями (для огляду див [206]). Плюсові кінці МТ простягаються до периферії клітини, включаючи субдиниць тубуліну, зв'язані з ГТФ. Зростаючі МТ зазвичай гідролізують ГТФ на суміжних поверхнях мономерів, утворюючи ГТФ-тубуліновий ковпачок [207, 208]. Чергування фаз нарощування та скорочення МТ називається динамічною нестабільністю [209, 205]. МТ є динамічними складними субструктурами. Характеризуються вони одночасно гнучкістю і міцністю, при цьому МТ є життєво важливими для функціонування мережі цитоскелету [111]. Динаміка такої важливої структури модулюється кількістю модифікацій бічних ланцюгів на поверхні білків тубуліну та оборотними реакціями фосфорилування і ацетилювання [210, 211]. Посттрансляційні модифікації на поверхні або на межі білок-білкової взаємодії (PPI) тубулінів можуть впливати на баланс між вищезазначеними процесами, змінюючи ймовірність асоціації MAP з мікротрубочками [212]. Завдяки своєму високому терапевтичному потенціалу МТ широко вивчаються на різних рівнях у тваринних системах [213, 214]. Крім того, рослинні системи також вважаються цінними моделями для

характеристики фундаментальних питань організації МТ та взаємодії MAP завдяки значній практичній зручності, незважаючи на деякі відмінності між цими двома системами [215]. Це особливо цікаво для вивчення опосередкованого впливу на РРІ деяких «господарських» білків [204].

Дослідження продемонстрували зв'язок між мікротрубочками та формуванням аутофагосом [216]. Роль мікротрубочок в ініціації та дозріванні аутофагосом добре відома [216, 217, 218], і зараз зрозуміло, що вони слугують своєрідними треками для руху зрілих аутофагосом, а також з'єднують аутофагосоми та лізосоми для злиття та переробки аутофагосомального вантажу [216, 218]. Таким чином, мікротрубочки забезпечують ініціюючі фокальні точки та координують просторове розташування між незрілими LC3II-вмісними ізоляційними мембранами, ізоляційним вантажем, зрілими аутофагосомами та лізосомами. Набори мікротрубочок співіснують і ацетилюються. Було виявлено, що звичайні неацетильовані мікротрубочки беруть участь у процесі аутофагосомного біогенезу, тоді як ацетильовані мікротрубочки були визначені необхідними для злиття зрілих аутофагосом з лізосомами з утворенням аутолізосом [219, 220]. Більшість класичних білків асоційованих з МТ (MAPs) зв'язуються вздовж мікротрубочкової решітки, регулюючи полімеризацію, пакування та стабілізацію мікротрубочок. Класичні MAP також контролюють руховий транспорт білків, взаємодіють з акцепторним транспортом білків, взаємодіють з актиновим цитоскелетом і беруть участь у різних нейронних сигнальних каскадах [111]. Залежно від способу дії, різні MAP можна розділити на п'ять груп [221, 108]. До першої групи належать моторні білки на основі МТ, які є важливими для нейронного транспорту, такі як кінезинові та динеїнові мотори (власне, сюди ж відноситься ATG8). Друга група складається з регуляторів динаміки МТ, таких як білки, які контролюють позитивний кінець (+TIPs) і деполімеризують МТ [222, 223]. Третя група включає білки, які модулюють кількість МТ, такі як регулятори нуклеації [224], ферменти, які розривають вже існуючі МТ [225, 226], і білки, націлені на мінус-кінці (-TIPs), які стабілізують мінус-кінці [227]. Четверта

група включає ферменти, які модифікують тубулін, таким чином генеруючи різноманітні підтипи МТ шляхом посттрансляційних модифікацій [228, 229]. П'ята група охоплює зшиваючі білки, які вирівнюють філаменти і формують пучки МТ, включаючи класичні MAPs і деякі кінезинові мотори, які регулюють ковзання МТ [230, 231]. Спільна дія численних окремих MAPs забезпечує механізм просторово-часового контролю архітектури цитоскелету МТ нейронів на різних стадіях розвитку [111]. Дослідження структурних особливостей МТ показали, що α -і β -тубуліни утворюють практично ідентичні структури, а їхні кислі С-кінцеві ділянки розташовані на зовнішній поверхні мікротрубочок [232, 233]. Вони показали, що базові ділянки MAP та їхні легкі ланцюги асоціюються з С-кінцевим сегментом тубуліну за допомогою електростатичних взаємодій. На основі цих спостережень можна припустити, що MAP-LC3 може функціонувати як адаптерний білок між мікротрубочками та аутофагосомами, що узгоджується з попередніми повідомленнями про внутрішньоклітинну локалізацію та зв'язуючу активність MAP-LC3 [159, 53, 52, 234, 235].

3.2. Роль білку ATG8 у залученні мікротрубочок до розвитку аутофагії

Цікаво зазначити, що MAP-LC3 модифікується PE аналогічно до ATG8 [234, 235, 236]. Немодифікована та модифікована форми MAP-LC3 позначені як LC3-I та LC3-II, відповідно. Отримані дані [237], свідчать про те, що MAP-LC3 відіграє певну роль у формуванні та/або внутрішньоклітинному транспортуванні аутофагосом у клітинах ссавців. Аналіз зв'язування [237] однозначно показав, що N-кінцевий субдомен LC3-I є незамінним для зв'язування як очищеного тубуліну, так і мікротрубочок. Мікротрубочки, як відомо, утворені парами α -і β -тубулінів, і обидва ці ізотипи тубуліну мають ряд кислотних залишків на С-кінцевій ділянці, які сприяють зв'язуванню між MAPs і мікротрубочками. Особливе значення серед білків аутофагії має невеликий ліпідний модифікатор ATG8. Незважаючи на те, що дріжджі

характеризуються наявністю самого лише білка ATG8, ссавці мають щонайменше шість гомологів, які можна розділити на еволюційно відокремлені білки легкого ланцюга 3 мікротрубочок 1A/1B (LC3A, LC3B, LC3C) та білки, асоційовані з рецепторами γ -аміномасляної кислоти (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2/GATE-16) [238, 239]. Спільною рисою всіх членів родини ATG8 є убіквітиноподібна структура серцевини з двома унікальними N-кінцевими спіралями та консервативним гліцином на C-кінці, що дозволяє їм бути ліпідованими [235, 238, 240, 241]. Додатковими гомологами ATG8 у людини є GABARAP та GATE-16, структура яких вивчена методами рентгенівської кристалографії та ЯМР-спектроскопії [240, 242]. ATG8 існує у двох формах: цитозольній (за умов достатку поживних речовин) та мембранно-асоційованій (під час аутофагії), де він регулює розмір аутофагосом через вплив на вигин мембран [159]. Після завершення аутофагії ATG4 відщеплює ATG8 від мембрани для повторного використання [53]. Механізми злиття аутофагосом з лізосомами у ссавців (за участю LAMP-2 та Rab7) та дріжджів (Ypt7, SNARE-білки та HOPS-комплекс) мають як схожості, так і відмінності [243]. У рослин ATG8 виконує подвійну функцію: бере участь у біогенезі аутофагосом та рекрутуванні селективних рецепторів через W/F/Y-XX-L/I/V-мотиви [82, 244]. Ключові питання наразі стосуються ролі цитоскелету у транспортуванні аутофагосом та специфіки взаємодії ATG8 з мікротрубочками [217], що залишається в центрі уваги науковців.

РОЗДІЛ 4

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Матеріали

Амінокислотні послідовності ATG білків рослин та людини отримано з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org) [245]. Структури білкових молекул було взято із баз даних моделей, передбачених методами машинного навчання (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), та банку тривимірних структур, експериментально перевічених та депонованих (<https://www.rcsb.org/>).

4.2. Методи

Аналіз та реконструкції білкових структур. Для аналізу множинного вирівнювання послідовностей ізотипів цих білків людини, дріжджів та рослин було використано BioEdit [246, 247]. Набір параметрів включав матриці порівняння Blosum62 та методи попарного вирівнювання Zero (Zero End-gap Global Alignment) із «пенальті» за абсолютний розрив у 2,4 бали (оптимальне значення для розпізнавання структурної подібності). Потім були проаналізовані всі рослинні послідовності, розділені на групи за схожістю та обчислені відповідні ступені подібності. Структури були реконструйовані за алгоритмів методів штучного інтелекту AlphaFold 2 та Boltz-1x (www.github.com/jwohlwend/boltz) із відбором енергетично вигідних конформацій за сумою балів різних оцінювальних функцій.

Моделювання квантової молекулярної динаміки. Моделювання молекулярної динаміки силового поля дозволяє моделювати молекули на рівні атомів. Для управління взаємодією між атомами застосовуються силові поля, що являють собою емпіричні рівняння на основі інформації, отриманої за рахунок квантового моделювання. Оскільки моделювання молекулярної

динаміки силового поля використовує менше деталей, ніж квантове моделювання, воно здатне моделювати системи, значно більших розмірів протягом більш тривалого періоду часу. Грубозерниста молекулярна динаміка (coarse-grained molecular dynamics simulations) [248], зменшує кількість ступенів свободи в модельованій системі шляхом групування кількох атомів в одну взаємодію. Це спрощує час та обчислювані потужності для розрахунку багатоатомних систем. Відповідно до поставлених в роботі задач найбільш оптимальним є проведення грубозернистої молекулярної динаміки з подальшим перерахунком в молекулярну динаміку силового поля. Це зменшує час та обчислювальні ресурси на розрахунки багатоатомних систем протягом тривалого часу, а також дозволяє оцінити специфічні хімічні взаємодії у системі.

Підготовка компонентів систем для молекулярної динаміки. Одночасне вирівнювання декількох послідовностей (MSA) було виконано за допомогою програми ClustalX2.1 [249], (<http://en.bio-soft.net>). MSA є потужним біоінформатичним інструментом для оцінки та вимірювання ступеня подібності між послідовностями, вивчення закономірностей та мінливості. Ацетилювання амінокислотних залишків в молекулі альфа-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 [250], був змінений шляхом впровадження додаткової інформації про структуру ацетилюваного Lys згідно даних літератури та офіційного веб-сайту CHARMM [250, 251, 252]. Останні 10 залишків від С-кінця молекули тубуліну, які зазвичай є дуже гнучкими і тому відсутні в рентгенівських структурах, були також реконструйовані, але не враховувались під час остаточного аналізу [253]. Молекулу ГТФ було введено до моделі просторової структури з використанням зовнішніх параметрів топології, створених на сервері SwissParam [254]. Ефекти ацетилювання тубуліну [255] оцінювали за результатами обрахунку молекулярної динаміки в

програмному пакеті GROMACS 2020. Для мінімізації енергії системи використовували повноатомне силове поле CHARMM36 [250] за алгоритмом спуску на 20000 кроків з інтервалом ітерацій 2 фс. Врівноваження розчинника здійснювали із застосуванням позиційних обмежень, накладених 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 постійної константи тиску (1 бар) [256]. Довгі незв'язані взаємодії прораховували з використанням методу Particle–Mesh–Ewald (PME) [257, 258]. Всі досліджувані окремі молекули та їх комплекси були релаксовані шляхом обрахунку короткотривалої молекулярної динаміки (МД) протягом 500 нс.

Підбір силових полів та параметрів молекулярної динаміки. На основі аналізу силових полів було обрано силове поле CHARMM36 [250] (версія 2022), оскільки воно відповідає поставленим задачам, а саме молекулярній динаміці білок–білкових комплексів з ацетильованим залишком Lys. Обрана топологія для ацетильованих залишків Lys найбільш оптимально сумісна з даними силовими полями. Оптимальним часом молекулярної динаміки, достатнім для оцінки взаємодій у сайті зв'язування білок–білкових комплексів, було обрано час від 150 до 500 нс, довжина симуляції могла змінюватись в залежності від тенденцій в поведінці досліджуваних білків. Суттєвий вклад ацетилування та вплив на стабільність мікротрубочок можливо пояснюється імовірністю взаємодії з різними білками, асоційованими з мікротрубочками [255].

На основі аналізу літератури і пошуку за гомологією [259], сайти ацетилування тубуліну були встановлені як у рослин, так і тварин. Послідовності тубуліну людини та рослин α -4A (P68366 і Q0WV25) ланцюги

тубуліну β -4 (P04350 і P24636) були взяті з бази даних UniProt (<http://www.uniprot.org>), а структурні шаблони—з бази даних білків RCSB (www.rcsb.org). Попередньо були отримані повноатомні структури тубулінів. Зокрема останні 10 залишків С-кінцевого хвоста тубуліну, які зазвичай дуже гнучкі та відсутні в експериментально встановлених структурах, були реконструйовані задля забезпечення повного уявлення про четвертинну структуру. Останні 10 залишків С-кінцевого хвоста тубулінів, які зазвичай дуже гнучкі і відсутні на рентгенограмах, були реконструйовані для забезпечення повного уявлення про четвертинне оточення, але не були включені до жодного аналізу. Оригінальний набір даних топології залишків, який входить до пакету силових полів CHARMM36 [250], було модифіковано шляхом включення додаткової інформації з літератури та офіційного веб-сайту CHARMM [250, 251, 252]. Потім нами були використали вихідні дані повноатомного силового поля як вхідні координати для збільшення конформаційної вибірки з використанням силового поля SIRAH для моделювання CG [248, 260, 261]. Параметри CG для ацетильованих залишків Lys (AcKs) були валідовані в кооперації із розробниками силового поля SIRAH на наших об'єктах. Параметри координат і топологій ацетильованих залишків Lys (AcKs) для моделювання в силовому полі CHARMM [250, 251, 252], були присутні у внутрішніх бібліотеках силового поля, що дозволило проаналізувати вплив ацетилювання на основі підходу моделювання молекулярної динаміки (МД) з використанням програмного пакету GROMACS 2019. Зібрана решітка мікротрубочок (три з'єднані тримери рослинного β - α - β тубуліну) зі зв'язаними молекулами ГТФ і ГДФ була згенерована на основі аналогічно організованого комплексу [PDBID: 5JCO] і релаксована протягом 10 нс у повноатомному силовому полі CHARMM36 [250], а потім змодельована на рівні CG протягом 1 мкс. [262]. Мультибілковий комплекс розчиняли в молекулах чистої води в межах розрахункової області на відстані 30 Å від білкових молекул. Усі файли параметрів для подальшої мінімізації енергії, покрокового врівноваження обмежень і кінцевого розрахунку МД були розроблені для GROMACS [263 264,

265, 266], і не потребували модифікацій. Фінальна процедура ‘backmapping’ (зворотне перетворення ‘кульок’ CG в атоми), пристосована для отримання мінімізованих повноатомних моделей, була виконана за допомогою комбінації програмного забезпечення VMD 1.9.3 (генерація файлу білкової структури) та AmberTools 18 (процедура мінімізації) [267, 248]. Стабільність білкової структури та тривимірну деформацію аналізували за допомогою вбудованих інструментів GROMACS [263, 264, 265, 266], та візуалізували за допомогою програм PyMol 1.5 та VMD 1.9.3. Аналіз білкових комплексів включав серію стандартних методів порівняння–RMSF/RMSD (Root Mean Square Fluctuation/Deviation–середньоквадратичне флуктуація/відхилення), Rg (Radius of gyration–радіус гірації), розрахунок площі поділу PPI (protein–protein interaction–білок–білкові взаємодії) та конформаційну кластеризацію траєкторії МД. Для аналізу поверхні ми використовували вбудований інструмент аналізу головних компонент (Principle Component Analysis) Дослідження сегментів та окремих ділянок поверхні проводили за допомогою індексації атомних номерів відповідних амінокислотних залишків. Найстабільніші ділянки, які розглядалися як найбільш ймовірний інтерфейс для зв’язування білків асоційованих з мікротрубочками (MAP), були отримані шляхом кластеризації значень RMSD індексованих атомів протягом другої половини симуляції МД, яка відповідала розслабленому стану. Візуалізація взаємодії PPI була представлена за допомогою інструментів PyMol, а розрахунки проводили за допомогою скриптів Python.

Молекулярний білок–білковий докінг. Всі розрахунки зі стикування PPI були виконані за допомогою локальної інсталяції програми HADDOCK 2.4, яка також підтримує стикування CG [268, 269]. Докінг проводили на основі протоколу неоднозначних обмежень взаємодії (Ambiguous Interaction Restraints, AIR). Для цього в тубуліні визначались всі доступні для розчинника залишки на поверхні, які можуть взаємодіяти з іншими тубулінами в мікротрубочці та MAP білками, принаймні з одним важким атомом в межах $3.9\text{\AA}$ від будь–якого важкого атома молекули–партнера. Параметри вибірки зберігалися в

HADDOCK за замовчуванням: 1000 моделей було згенеровано для мінімізації енергії жорсткого тіла (it0), 200—для уточнення напівгнучкого сегмента (it1), після чого було виконано 200 кроків оптимізації води (itw). Прогнозування місця зв'язування тубуліну і білку ATG8 проводили за допомогою елементів алгоритму ODA [270], в середовищі PRED-PPI [271] і на сервері MetaPPI (<http://projects.biotec.tu-dresden.de/metappi/>), спираючись на результати досліджень, пов'язаних з білком LC3 [272]. Також було проведено RMSD-кластеризацію траєкторій молекулярної динаміки білку 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 білку ATG8 та α -тубуліну було використано програмне забезпечення Molsoft ICM-browser [273], що передбачає гнучку процедуру докінгу, сканування вихідних позицій з подальшою мінімізацією комплексів ліганд-рецептора.

Для обробки конформаційної зміни області сайту зв'язування нами було використано метод кластеризації на основі RMSD (середньоквадратичне відхилення) зі стандартним набором параметрів. Наприклад, нами було створено окремий розділ у індекс файлі задля фіксації зміни саме на поверхнях АІМ ізотипів ATG8. Усі кластери були відсортовані за кількістю конформацій, щоб визначити найбільший із них, з подальшою оцінкою розподілу цих конформацій протягом періоду моделювання МД. Найбільший кластер, конформації якого зустрічалися протягом всієї траєкторії, відповідав найбільш стабільному стану сайтам зв'язування, а структура центроїда такого кластера використовувалась для подальшого дослідження. Для аналізу рухливості окремих вторинних елементів було використано метод RMSF (середньоквадратичне коливання) з використанням вбудованих інструментів GROMACS [263, 264, 265, 266].

РОЗДІЛ 5

РОЛЬ БІЛКІВ РОДИНИ ATG У ФОРМУВАННІ АУТОФАГОСОМИ

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 даний момент відомо, що найважливіші ролі в аутофагії всіх видів грають консервативні ATG білки. ATG комплексоутворювачі, або ініціатори аутофагії, залучаються у реакції синергічно або послідовно [150, 274]. Їх структурний кістяк збирається на самому початку, тоді як функціональні зміни активності аутофагосом забезпечуються на пізніх етапах ініціації окремим кластером білків, наприклад ATG5, ATG7 та ATG8 [153].

5.1. Головний комплекс ATG1 та порівняльна характеристика його складових елементів на міжвидовому рівні

Ключовий ініціатор аутофагії *S. Cerevisiae* це серин/треонінова протеїнкіназа ATG1, яка утворює пентамерний комплекс з ATG13, ATG17, ATG29 та ATG31 [151, 130, 275]. Взаємодія з ATG13 посилює кіназну активність ATG1 [81]. На даний момент відомо, що він та ортологи його складових існують у всіх організмів у тій чи іншій формі (табл. 5.1). Відомо, що у *A. thaliana* білки ATG1 взаємодіють із білками ATG11, ATG13 та ATG101, які допомагають зв'язувати комплекс ATG1/13 з аутофагічними мембранами [154]. В цьому комплексі ATG1 разом зі своїм функціональним компонентом ATG13 здійснює як структурну, так і регулюючу функцію в утворенні аутофагосом [276]. Отже, протеїнкіназа ATG1 є провідним регулятором активації аутофагії [277], і займає провідне місце на багатьох етапах цього процесу, проходячи шлях від утворення аутофагосом до її асоціації з мембраною за участі ATG8.

Нами було досліджено особливості будови, функцій та порівняно послідовності цих білків у рослин, тварин та дріжджів.

Таблиця 5.1

Архітектурний ансамбль протеїнкіназного комплексу Atg1

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
Ser/Thr kinase ATG1	(ULK1)/(ULK2)	ATG1a, ATG1b, ATG1c, ATG1t
ATG13	mATG13	ATG13a, ATG13b
ATG17	FIP200	ATG11
ATG29	ATG101	ATG101
ATG31	Відсутній	Відсутній

Білок ULK1 ссавців утворює тетрамерний комплекс з білками ATG13, ATG101 та FIP200, який також відомий як RB1CC1 (комплекс ULK1) [278, 279, 280, 281]. Функції кінази ULK2 в аутофагічних процесах не відрізняються від ULK1 [282]. Комплекс ATG1–ATG13 зберігається від дріжджів до ссавців і є важливим для аутофагії у дріжджів (рис. 5.1). Відомо, що участь ATG13 в аутофагії підтверджена у різних видів [279, 281, 283, 284]. Відповідно, у *Arabidopsis* також формується комплекс ATG1–ATG13, що, ймовірно, являє собою еволюційно консервативний механізм контролю активності ATG1–кінази у відповідь на відсутність поживних речовин [285].

В рослин, судячи з рівня гомології, ATG11 виконує ряд функцій, подібних до тваринного FIP200, який регулює різноманітні клітинні функції, такі як розмір, проліферація та міграція клітин та слугує білком–підмостком (каркасом) у селективній аутофагії задля організації PAS [286]. Везикули, що містять ATG17 і незначні кількості приєднаних до них ATG9, такі комплекси є попередниками фагофора, значно вигнуті і за формою нагадують півмісяць [287]. FIP200 (також відомий як RB1CC1) – великий, згідно передбаченням, білок із довгих пучків α –спіралей, який функціонально нагадує два білки–скафолди ATG17 та ATG11 у дріжджах [277, 288].

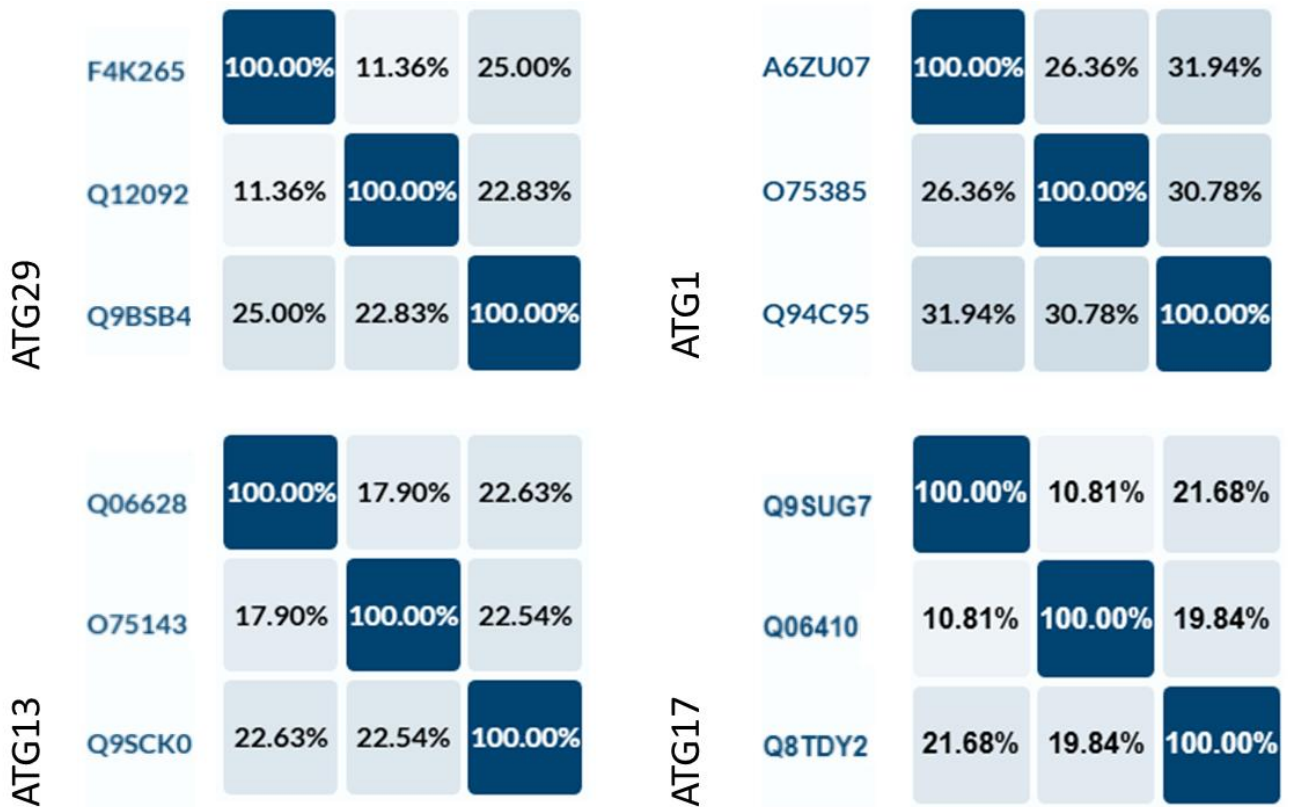


Рис. 5.1 Гомологія досліджуваних рослинних білків з комплексу Atg1 відносно гомологів та ортологів з інших організмів. Представлено у вигляді матриці відсоткової ідентичності

Відомо, що α -спіраль FIP200 та аутофаговий адаптер NDP52 алостерично активують рекрутинг комплексу ULK1 на мембрані [289]. Білок ATG101 еволюційно консервативний в еукаріотів, однак послідовність ATG101 не схожа на послідовність ATG29 або ATG31 [45]. ATG31 і ATG29 відіграють ключову роль у стабілізації унікальної кривизни ATG17. Коли ATG31 і ATG29 видаляються, ATG17 приймає декілька конформацій замість однієї [290].

Таким чином, незважаючи на відмінності в складі і кількості білків – основне ядро сформоване гомологічними білками, а функціональна одиниця у вигляді макрокомплексу функціонує однаково у тварин та рослин. Через невпорядковані структурні елементи, що супроводжують глобулярні частини регуляторних білків, моделювання комплексів таких білків стикається із рядом складнощів, вирішення яких і стало основною задачею.

5.2. Визначення структурних передумов для формування комплексів–інтермедіатів у складі ATG1 і окреслення функціональних відмінностей макрокомплексів для різних організмів

За результатами дослідження встановлено, що ATG1/ULK і ATG13 є фосфопротейнами, і що їхня активність значною мірою регулюється фосфорилуванням під дією поживних протеїнкіназ, таких як мішень рапаміцину (TOR), а також аутофосфорилуванням ATG1/ULK [285]. Відтак, це дозволяє зробити висновок, що загалом цей поліпротейновий комплекс слід розглядати як провідну ланку ініціації аутофагії. Серин/треонін–кіназа ATG1 була першим регулятором аутофагії, ідентифікованим за допомогою генетичних скринінгів у дріжджів для основних генів аутофагії [291]. Нам було необхідно реконструювати структури цих білків у їх природньому, інакше кажучи, функціональному стані, для чого було використано методи введення точок фосфорилування критичних сайтів, що впливають на ефективність взаємодій між цими білками [292]. Ми відштовхувались від даних про те, що протеїни ATG11, ATG101, ATG1 та ATG13 взаємодіють між собою та з ATG8, зокрема ATG1 зв'язаний з ATG8 через канонічний ATG8–взаємодіючий мотив або AIM (ATG Inetracting Motif у рослин, що є аналогом LIR у LC3–зв'язуючих білків) [154]. Вплив ATG11 на правильну поведінку комплексу ATG1–ATG13 та вірну доставку аутофагічних везикул до вакуолі, ймовірно, відбувається саме через його взаємодію з білком ATG8 [192]. На сьогоднішній день досліджено зв'язок комплексу Atg1 з ізоляційною мембраною прямою взаємодією з ATG8. Процес взаємодії між білками ATG1 та ATG8 передбачає наявність AIM, розташованої в центральній області ATG1 [193]. Процес фосфорилування є надзвичайно важливим сигналом для запуску аутофагії і антагоністично регулюється двома консервативними комплексами Ser/Thr протеїнкіназ, TOR (мішень рапаміцину) [103] і AMPK (AMP–регульована кіназа) [133]. З'являється дедалі більше доказів того, що активність аутофагії ретельно

регулюється посттрансляційними модифікаціями (PTM), які здатні змінювати структурну конформацію, стабільність, ферментативну активність та субклітинну локалізацію білків ATG та інших допоміжних регуляторів аутофагії [150]. Гіперфосфорилування ATG13 спричинює зниження спорідненості між ATG1, і в подальшому інгібує ініціацію аутофагії в умовах, збагачених поживними речовинами [293]. ATG1 (Q94C95) забезпечує асоціацію з ATG13 і ATG11, беручи участь у селективній аутофагії. Структурний рослинний ортолог представлений білком, розділеним на три домени: N-кінцевий кіназний домен, С-кінцевий глобулярний домен і нативний домен, який їх з'єднує (рис. 5.2).

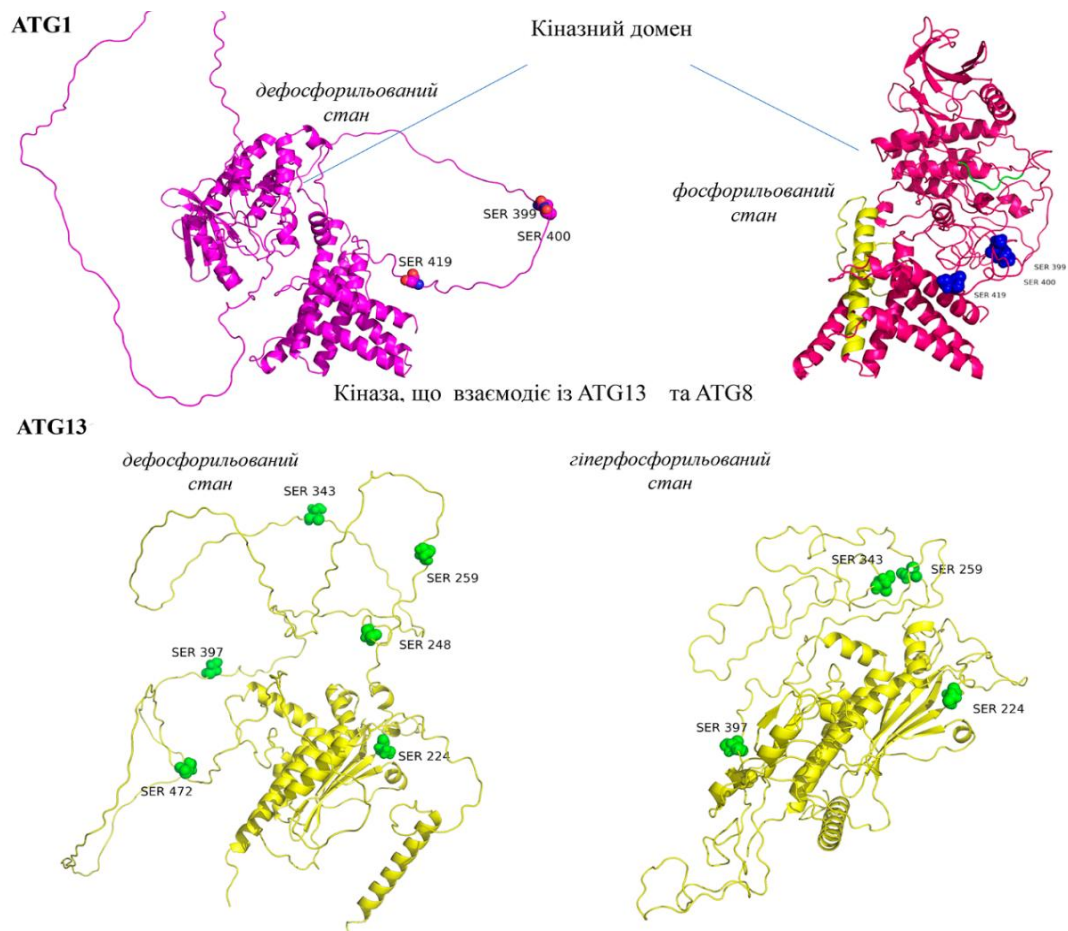


Рис. 5.2 Структурна організація білків ATG1 і ATG13. Розташування сайтів фосфорилування показано сферами і продемонстровано структурні зміни в молекулах залежно від їхнього стану (внесення посттрансляційних модифікацій) після тривалої молекулярної динаміки

Глобулярний домен ATG1 складається з двох трьохспіральных 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-кінця. Відомо, що деякі з них багаті на фосфорильовані залишки Ser, але їхнє значення невідоме. Результати молекулярної динаміки ATG1 свідчать про активну доступність цієї ділянки (жовтий колір на рис. 5.2), незважаючи на фосфорилування (синій колір на рис. 5.2). Таким чином ступінь її фосфорилування відіграє вирішальну роль лише для кіназних функцій. ATG1 містить ATG8-зв'язувальний мотив у своїй неструктурованій ділянці, через яку безпосередньо зв'язується з ATG8, що, вірогідно, є необхідним для локалізації ATG1 у секвестральній мембрані. Натомість, рослинний білок ATG13 (Q9SCK0) структурно розділений на два домени, N-кінцевий глобулярний домен і C-кінцевий нативний домен. 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 (Nor1p, Rev7p and MAD2). Цей NORMA домен необхідний для локалізації специфічних аутофагічних комплексів PI3K у PAS. Починаючи інактивацію TOR шляхом голодування або фармакологічного інгібування, ATG13 швидко дефосфорильовується [294]. Дослідження функціональної стабільності ATG13 було зосереджено на сайтах взаємодії із білками-партнерами, 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 гіперфосфорилуванні двох основних залишків S224 та S259. Лабільна структура з двома tMIT-мотивами,

що 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 після симуляції довжиною у 500 нс [292]. У одному з досліджень [81], показано, що ATG13a та ATG13b *Arabidopsis* містять однакові межі інтронів та екзонів. Їхні сіквенси вважаються колінеарними по всій довжині 603 та 625 залишків, відповідно. Тому вся вищезазначена характеристика справедлива і для білка ATG13b, пов'язаного з аутофагією. Однак різниця між цими двома білками є значною: було виявлено лише близько 20% подібності, що свідчить про низький ступінь гомології. Виходячи з цих показників, ми вирішили працювати з першою ізоформою білка 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, С-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% ідентичності. Однак подібні 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 кластери і використані в процесі формування білкового комплексу. Це має багато спільного з гнучким докінгом, оскільки жорсткі центральні частини білків завжди добре прилягають до шаблону, в той час як для подальшого дослідження придатними виявилися лише кілька кластерів із траєкторій, коли неупорядковані петлі одного партнера не

перекриваються з іншим об'єктом. Таким чином, білки ATG13 та ATG101 були вирівняні крок за кроком за допомогою методу вирівнювання на основі співставлення лише C α -атомів структури, відкидаючи додаткову рухливість амінокислотних бічних ланцюгів. Після відбору найбільш прийнятних конформацій нами було проведено молекулярно-динамічне моделювання гетеродимеру, яке тривало 250 нс, що цілком достатньо для релаксації структур, в нашому випадку, але може бути недостатнім для більш ретельної ідентифікації конформерів (рис. 5.3). 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. Остання третина часової шкали відображає зменшення структурної рухливості та остаточну стабілізацію комплексу. Інтерфейс взаємодії окремо оцінювали за допомогою декількох скриптів на мові Python, реалізованих у середовищі PyMol. Синім кольором показано ділянки, що не залучені до міжбілкових взаємодій, а жовтим кольором – інтерфейси білок-білкових взаємодій. 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 [295]. Така модель білок-білкових взаємодій відповідає передбаченням, адже жодні з модифікованих амінокислотних залишків не потрапили в передбачені докінгом ділянки взаємодій.

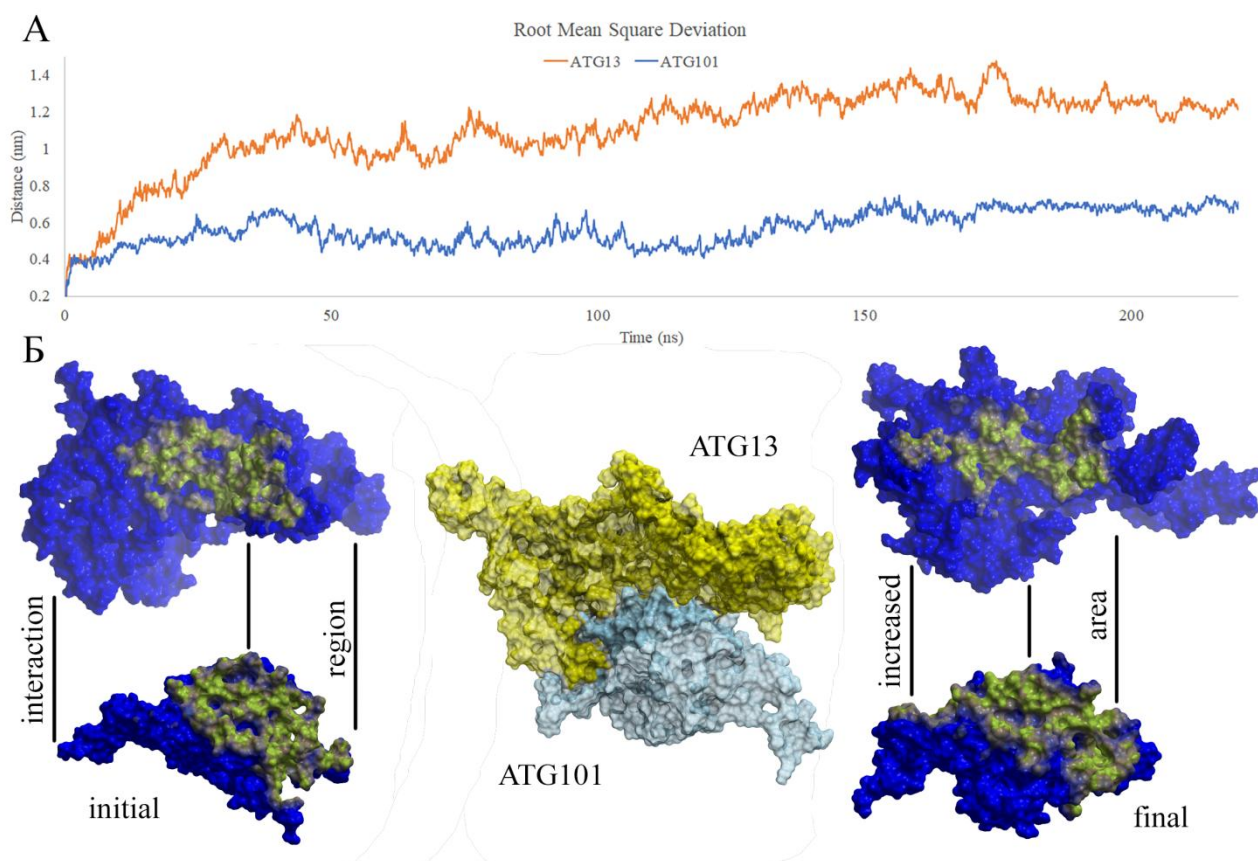


Рис. 5.3 Зміни у інтерфейсі взаємодії білків ATG13 та ATG101, що утворюють гетеродимерний комплекс. RMSD-графік демонструє помірне відхилення атомних координат від початкового стану. (А). Області білок-білкового інтерфейсу, позначені світлими вкрапленнями, відповідають ділянкам кожного білка, покритим білком-партнером у початковому та кінцевому станах симуляції (Б)

Аналогічно до інших білків типу ATG11/RB1CC1, ATG11 з *Arabidopsis* містить 4 передбачувані мотиви спіральної спіралі (CC), за якими слідує С-кінцевий домен ATG11. Протомер ATG11 має характерну серпоподібну структуру, що складається з чотирьох α -спіралей, а гомодимеризація утворена контактами С-кінців призводить до формування загальної для ATG11/RB1CC1 типу білків S-подібної структури. Найбільшим білком комплексу є ATG11 (Q9SUG7), він же є і білком-скаффолдом, платформою для взаємного розташування всіх інших білків-елементів комплексу (рис. 5.4). Спираючись на

аналіз послідовностей, ми виділили ділянки 522–552, яка відповідає за зв'язування із ATG1, та ділянку 546–583, що відповідає за гомодимеризацію. З іншого боку, ATG13 має ATG11–зв'язуючу ділянку, яка містить Ser428 і Ser429.

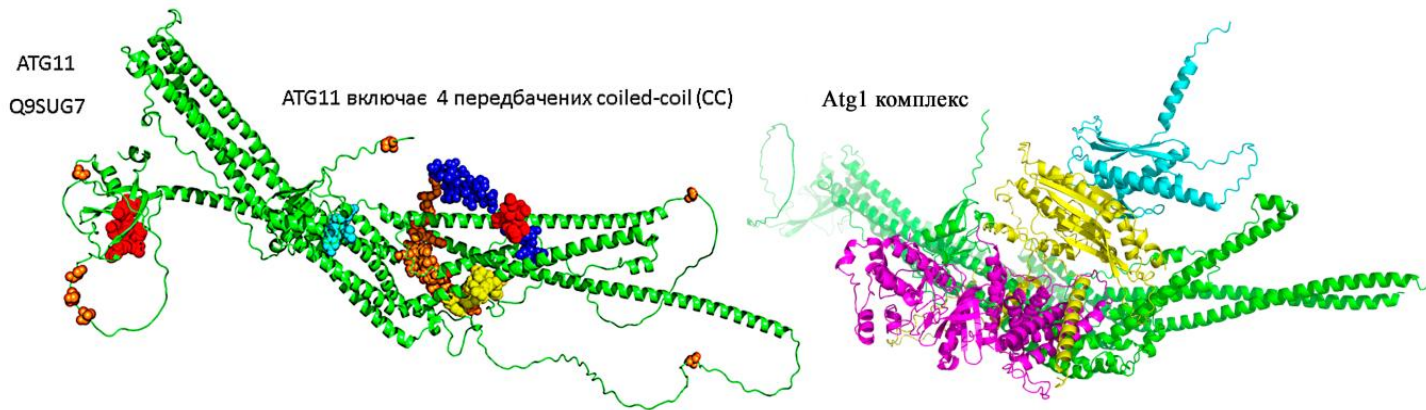


Рис. 5.4 Визначення сайтів РРІ на поверхні ATG11. На поверхні молекули (показано зеленим) визначено ділянку 522–552, що відповідає за зв'язування із ATG1 (показано синім) та 546–583, яка відповідає за гомодимеризацію. Червоним маркером показані ділянки взаємодії із ATG8. ATG17–подібний домен включає послідовність Y–X–X–X–L/V/I–X–E–V/I–X–RR–R/K (жовтим), що, ймовірно, також бере участь у рекрутуванні ATG8 та ATG9. Сайти фосфорилювання показані помаранчевим. Передбачений комплекс Atg1, отриманий в результаті послідовного молекулярного докінгу ATG13 (жовтий), ATG101 (жовтий) та ATG1 (рожевий) на платформу білка ATG11

Ці залишки при фосфорилюванні беруть участь в утворенні водневих зв'язків з ділянками 122–126 рослинного білка ATG11. В результаті молекулярної динаміки ATG1 ефекту від фосфорилювання (помаранчевий колір) не було виявлено, можливо, він критичний для взаємодії. Сама конструкція ATG11 є досить жорсткою і протягом 200 нс не змінювала типу укладки [292]. Наступний етап передбачав використання ATG11 для

молекулярного білок–білкового докінгу із іншими компонентами Atg1 комплексу (рис. 5.5).

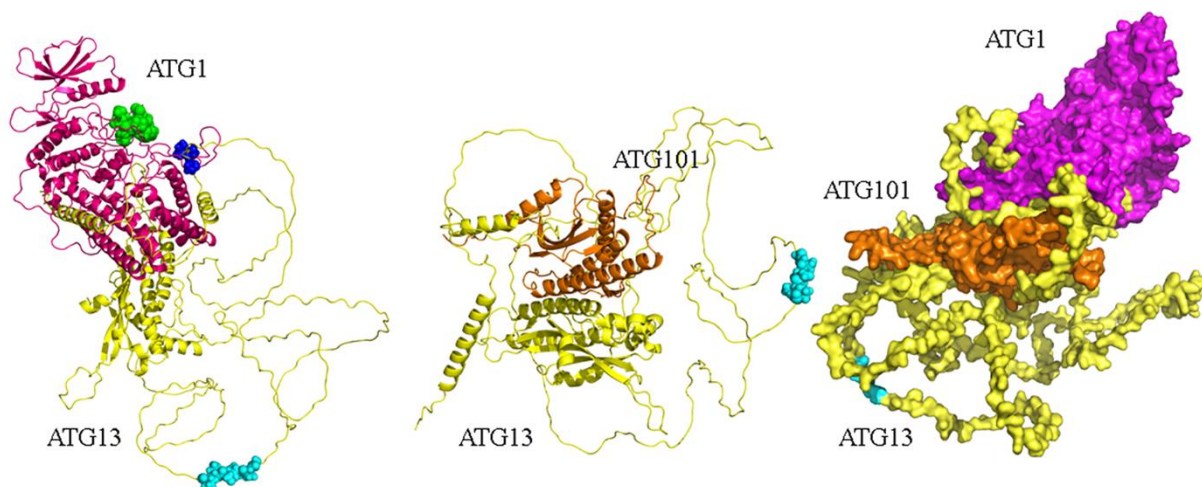


Рис. 5.5 Результати послідовного докінгу ATG1 та ATG101 на поверхню ATG13. Зеленим кольором показано ділянку зв'язування ATG8, біля активного сайту кінрази ATG1. Блакитним кольором на поверхні ATG1 показано ділянку зв'язування ATG11, передбачену на основі комплексу із організму *Lachancea thermotolerans*. Взаємне розташування білків комплексу, отриманих в результаті докінгу, спираючись на існуючі структури (4P1W, 4P1N, 4YK8, 5C5O) допускає існування такої конструкції

Водночас було створено та релаксована модель ще одного білка, який не зв'язується безпосередньо із ATG11. Цей малий білок ATG101 (F4K265), який не має жодних сайтів посттрансляційних модифікацій та за результатами молекулярної динаміки є надзвичайно стабільним. Використовуючи молекулярний докінг як інструмент для формування цілого комплексу рослинного походження нами було отримано досить цікавий результат, що дозволяє порівнювати моделі тваринного та рослинного походження. Всі передбачені інтерфейси білок–білкових взаємодій задіяні, а їх аналіз підтверджує щільність контактів. Проте, молекулярна динаміка такого комплексу є занадто складною на даний час через велику кількість невпорядкованих елементів. Ця модель може слугувати задля пошуку інших взаємодій, наприклад білків ATG8 або ATG9 [292]. В результаті структурних

маніпуляцій нами була отримана високоякісна 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–білкового докінгу, що є частиною доступних інструментів для дослідження білок–білкових взаємодій та можливості утворення комплексів. Вона відкриває шлях до реконструкції великого комплексу ATG1 з метою виявлення сайтів зв'язування ATG8 на рухомих патернах, які можуть бути стабілізовані міцно зв'язаними білками [295].

5.3. Реконструкція структури ATG8 рослин та моделювання ефектів від його ацетилювання та ліпидування

Початкова ідея передбачала з'ясувати, який вплив гіперацетилювання має на стабільність і динаміку мікротрубочок, а також на їхню здатність взаємодіяти з білками MAP. Результати досліджень вказують на те, що ацетилювані мікротрубочки необхідні для злиття аутофагосом з лізосомами, що має вирішальне значення для регуляції аутофагії [296]. Фокусом нашого аналізу обрано місце зв'язування моторних білків кінезинів та LC3/ATG8, які беруть участь у каскаді дозрівання і транспортуванні зрілих аутофагосом. Прагнучи виявити співвідношення з біохімічними результатами, ми вирішили створити структурні моделі тубуліну у комплексі з білком ATG8 задля встановлення стану ацетилювання α -тубулінів та залежності карти білок–білкових взаємодій до таких змін. Для реконструкції Uniprot використовував кристалізований гомолог білка ATG8 з *S. tuberosum* Q8LEM4 [PDBID: 5L83]. За основу було взято високий рівень схожості послідовності з *A. thaliana* (86 %), а також розподіл подібних/ідентичних залишків по всій довжині вирівнювання (рис. 5.5). Порівняльний аналіз виявив помітну різницю між рослинним білком ATG8 та його людським ортологом, MAP1LC3B (Uniprot: Q9GZQ8), причому рівень амінокислотної подібності становить лише 37 %. Тим не менш, отримані

результати відзначають збереження критичних залишків Arg з позитивним зарядом, які раніше були ідентифіковані як такі, що відіграють ключову роль у взаємодії з С-кінцевим хвостом α -тубуліну. Ці залишки зберігають свою просторову конфігурацію в білковій послідовності (рис. 5.6). Як раніше було продемонстровано на прикладі взаємодії α -тубуліну людини з ключовими амінокислотними залишками білка LC3 (MAR 1A/1B, легкий ланцюг 3B), вдалося ідентифікувати сайт зв'язування на поверхні молекули тубуліну [297, 204].

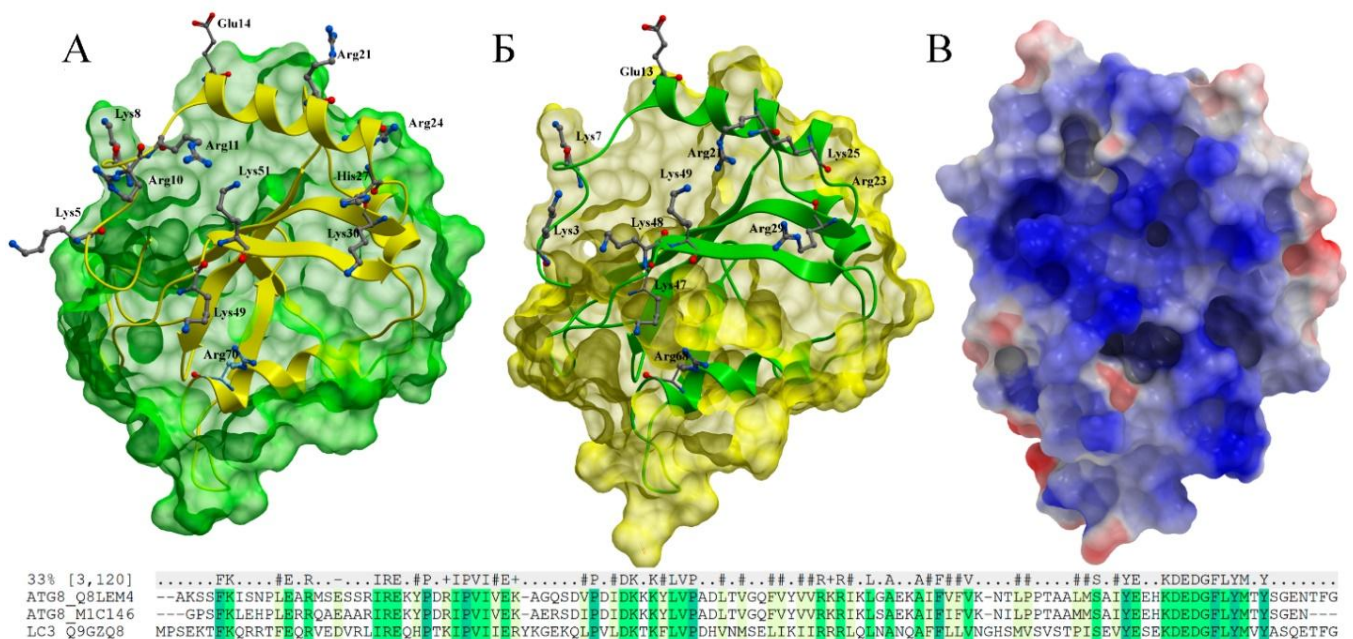


Рис. 5.6 Результати вирівнювання молекули білка LC3 людини (А) з його рослинним гомологом ATG8 *A. thaliana* (Б) з припущенням/зазначенням, що сайт зв'язування α -тубуліну знаходиться в N-кінцевій ділянці білка LC3. Повне структурне представлення білка подано у вигляді стрічкової/поверхневої моделі з ідентифікацією подібних до людини структурних елементів, що беруть участь в РРІ. Електростатичні карти обох структур демонструють позитивний заряд у відповідній області (В)

Дійсно, С-кінцевий хвіст α -тубуліну має здатність зв'язуватися з цим MAR, тоді як позитивно заряджена поверхня молекули білка ATG8 здатна ідеально контактувати з негативно зарядженим С-кінцевим хвостом α -

тубуліну. Після ретельного співставлення результатів з існуючими літературними даними надійність симуляції була максимізована завдяки використанню візуального накладання, прогнозування та білок–білкового докінгу (PPI). Однак слід зазначити, що контакти з мікротрубочками є лише однією з властивостей, які були продемонстровані експериментальним шляхом для ATG8 на інших модельних об'єктах. Ще одним відомим фактом є кон'югація білків ATG8 з фосфатидилетаноламіном (PE), опосередкована серією етапів за участю білків ATG (рис. 5.7). Зв'язування ATG8 з PE опосередковане E3-подібним комплексом ATG5–ATG12–ATG16. Асоціація білків ATG8 з аутофатичною мембраною є оборотною (регулюється активністю ATG4).

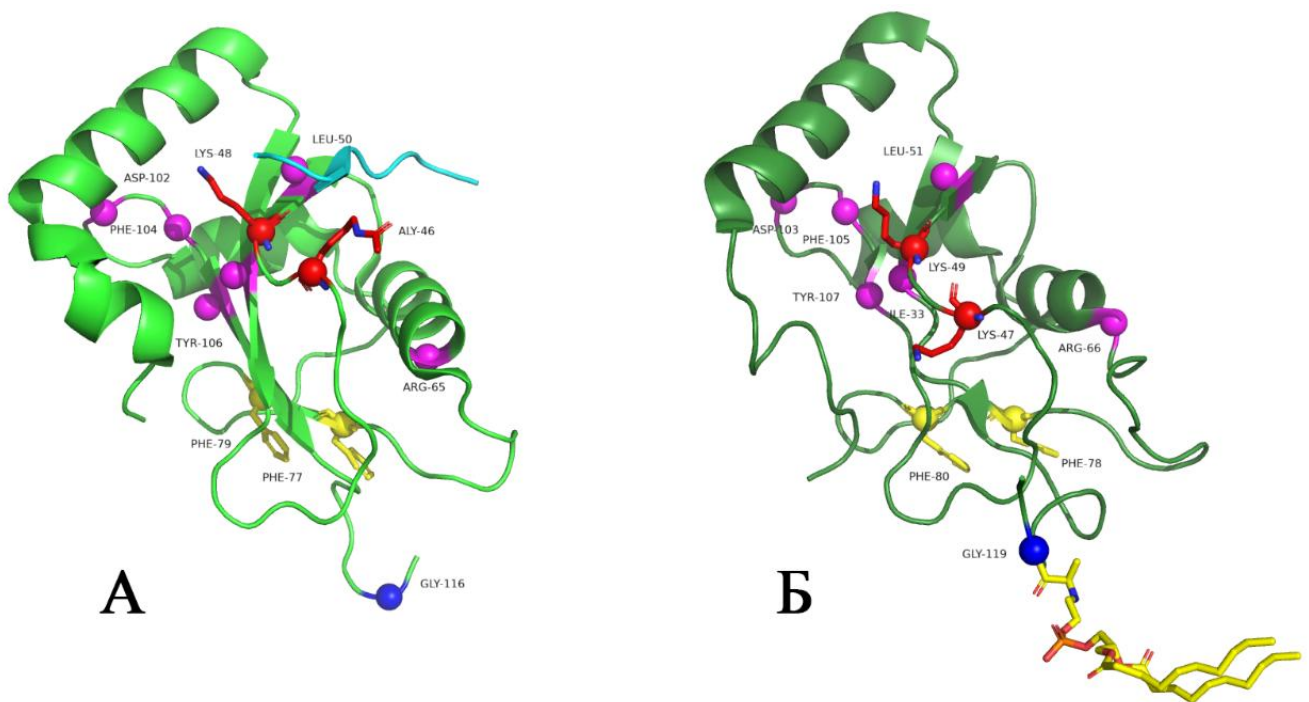


Рис. 5.7 Структура молекул LC3 (А) та ATG8 (Б), білків ортологів із організмів людини та *A. thaliana*. Конструкції супроводжуються маркуванням амінокислот, які можуть бути ацетильованими (червоним), ліпідованими (синім) або впливати на функцію білка (рожевим). Блакитним кольором позначено фрагмент адаптерного білка TP53INP2/DOR зі структури 8T33

Більшість робіт були виконані на тваринних білках, тому в нашому випадку ми покладались на два фактори: подібність тваринного LC3 та рослинного ATG8; наявні гомологи ATG3–ATG5–ATG12–ATG16 в організмі *A. thaliana*. Виходячи з цього ми вирішили показати наявні точки взаємодій ATG8 з мембраною, з аутофагічними адаптерами вантажу. На аутофагічній мембрані білки ATG8 кон'юговані з PE–ліпідами, що дозволяє їм опосередковувати події злиття мембран, що призводять до біогенезу аутофагосом [161]. Модифікація ацетилювання служить молекулярним перемикачем для білків, регулюючи їх активність. Коли до білка додається ацетильна група, це може вплинути на його конформацію, стабільність і взаємодію з іншими молекулами. Зокрема, ацетилювання часто призводить до активації білка, впливаючи на його роль у різних клітинних процесах. Нещодавно було показано, що ядерне/цитоплазматичне переміщення LC3 потребує деацетилювання двох залишків Lys (K49 і K51 у LC3B), які консервативні у білках родини ATG8 [82, 298].

5.4. Порівняння послідовностей різних ізотипів ATG8 як ключового триггеру процесу аутофагії у рослин

Аналіз зведених даних про сіквенси ATG8 із *A. thaliana* свідчить про невизначеність щодо глибинних структурних змін, відповідальних за деякі специфічні функції, притаманні окремим ізотипам білка ATG8. Для розкриття зазначених питань була проведена серія досліджень ізотипів білка ATG8. Ця інформація в подальшому дослідженні була використана разом із використанням методів симуляцій молекулярної динаміки, спрямованих на визначення різниці між стабільними конформаціями (протягом певного часу симуляції) інтерфейсів взаємодії ізоформ ATG8 із білками партнерами.

Після об'єднання всіх даних про участь ATG8 з *A. thaliana* в процесах аутофагії, було виявлено, що залишається багато невизначеності щодо можливості структурних змін, які б пояснили деякі специфічні функції,

притаманні окремим ізотипам цього білка. Спираючись на ці дані, ми провели серію симуляцій молекулярної динаміки, спрямованих на визначення відмінностей між стабільними конформаціями інтерфейсних патернів або, навпаки, пояснення спостережуваних ізотип–специфічних особливостей (функцій, білкових партнерів) шляхом вловлення перехідних станів у ключових елементах. У рослин активація аутофагії регулюється за участі декількох генів, пов’язаними з ATG, зокрема, ATG8. Він відіграє подвійну роль як у біогенезі аутофагосом, так і в рекрутуванні мотиву, що взаємодіє з ATG8 (W/F/Y–X–X–L/I/V) із закріпленими селективними рецепторами аутофагії (SAR) [244, 82]. У цьому процесі білки ATG8 зв’язуються з SAR за допомогою мотивів, що взаємодіють з ATG8 [82]. Такий мотив або називають AIM, або мотивом, що взаємодіє з убіквітином (UIM), що відповідає LC3–взаємодіючій області (LIR) [79, 299], сайту стикування AIM (LDS) або сайту зв’язування UIM (UDS) ATG8, відповідно [300]. За допомогою AIM різні форми ATG8 взаємодіють з білками–адаптерами/рецепторами, щоб залучити специфічні транспортні для деградації шляхом вибіркової аутофагії (рис. 5.8). У людини існує шість ортологів ATG8, більшість функцій яких вважаються залежними від їх посттрансляційних модифікацій і адресації до мембран через кон’югацію з фосфатидилетаноламіном. У дріжджах є один білок ATG8. У свою чергу родина ATG8 *Arabidopsis* складається з дев’яти генів ATG8, які називаються ATG8a до ATG8i [48]. Білки цієї родини демонструють від 41 до 99 % ідентичності один з одним і від 47 % до 73 % ідентичності з дріжджовим білком. Білки AtATG8 також демонструють значну ідентичність (від 33 до 41 %) з легким ланцюгом 3 (LC3) з MAP1A та 1B ссавців, білком–модулятором транспорту мембрани Гольджі Gate 16 (між 48 і 60 %) і білком GABARAP (42–59 %). Цікаво, що локалізація ATG8 залежить від рівня та складу поживних речовин у клітині і може бути локалізована або в везикулах, асоційованих з ендоплазматичним ретикулумом, або в цитоплазмі. Канонічний ATG8–взаємодіючий мотив (сAIM), також відомий як LC3–взаємодіюча область (LIR), є добре охарактеризованим коротким лінійним мотивом, який взаємодіє з

ATG8, утворюючи паралельний β -лист з β -листом 2 в ATG8 [79, 92, 82]. Мотив сAIM представлено консенсусною послідовністю WXXL, де W — ароматичний залишок (W/F/Y), L — аліфатичний гідрофобний залишок (L/I/V), а X може бути будь-яким залишком [244]. З аналізу послідовностей видно, що особливих відмінностей у будові, власне, інтерфейсів взаємодій, немає, тому причиною різної функціональності є, насамперед, різний час та рівень експресії і, в свою чергу, різна локалізація в клітині [82].

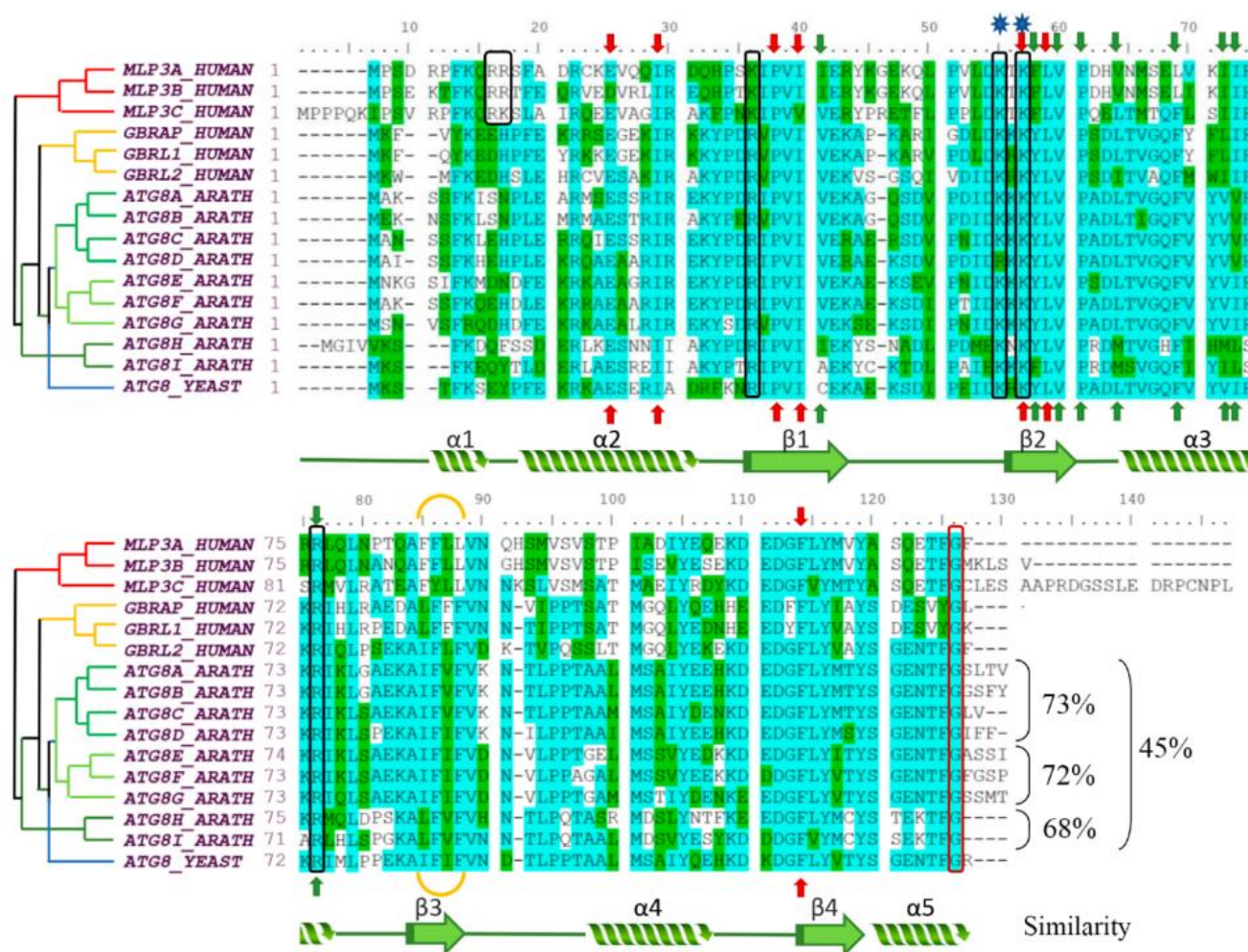


Рис. 5.8 Сайт зв'язування LDS на поверхні ATG8 представлений двома гідрофобними кишнями, відповідальними за розпізнавання амінокислот Trp і Leu в мотиві LIR/AIM (WXXL). Кишені позначені як W-сайт і L-сайт, а залишки, що утворюють ці кишені, позначені червоною та зеленою стрілками відповідно. Основні залишки, відповідальні за іонну взаємодію з кислотними

залишками в AIM, обведені чорним квадратом. Потенційні сайти ацетилювання (K49 і K51 в *A. thaliana*) позначені зірочками, основна послідовність UDS (сайт взаємодії мотиву, що взаємодіє із убіквітином) позначена жовтими дужками, а сайт кон'югації PE показано в червоному полі

Так, для ряду білків (що зустрічаються в різних компартментах) була передбачена можливість контактів з різними ізотипами ATG8 [301]. І навпаки, деякі білки виявляли селективність проти певних ізотипів, саме це і викликало більше за все питань.

5.5. Порівняльна характеристика рослинних ортологів групи білків ATG, що утворюють комплекс каталізу ліпідації

Аутофагічний каскад можна розділити на окремі етапи, а саме: контроль за допомогою клітинних сигнальних шляхів, нуклеація, подовження і злиття везикул з лізосомами (у випадку рослин з вакуолями). Ініціатором каскаду аутофагії в клітинах ссавців є комплекс ULK1. Найбільш цікавий та незрозумілий етап має місце у початковій фазі, коли убіквітин-подібний білок ATG8 кон'югує з головною групою мембранного ліпиду фосфатидилетаноламіну [302]. Процес кон'югації білку ATG8 забезпечується ферментами ATG7 і ATG3. У той же час убіквітин-подібний білок ATG12 кон'югує з Lys залишком ATG5 за участі ATG7 і ATG10. Потім кон'югат ATG12–ATG5 нековалентно асоціюється з ATG16 і переноситься на фагофор.

Результати пошуку в базах даних дали можливість чітко зрозуміти, що рослинна клітина загалом має той самий набір білків, залучених до регуляції процесів аутофагії на етапах елонгації та дозрівання аутофагосоми, що і в людини. Для цього нами було проведено ряд послідовних вирівнювань гомологічних білків з комплексу ATG12–ATG5–ATG16L1 людини та арабідопсису та визначено особливості їх видоспецифічної доменної організації (рис. 5.9). Результати вирівнювання показали як високий рівень подібності між

парами послідовностей, так і рівномірність розташування ідентичних залишків у послідовностях [303]. Ступінь гомології білкових пар коливається в залежності від досліджуваного білка. Так для ATG3 показано найвищий рівень гомології у 46 % при перекритті послідовностей Q9NT62 та Q0WWQ1 на 90 %. Для інших учасників E3-подібного макрокомплексу ATG12–ATG5–ATG16L1 та пари ATG3–ATG8 ступінь подібності коливалась в межах 28–40 %—результати порівняння послідовностей ATG16 (Q676U5 проти Q6NNP0) та ATG5 (Q9H1Y0 проти Q9FFI2) свідчать про 28 % подібності, а пара ATG12 (O94817 проти Q8S924) продемонструвала майже 41 % подібності.

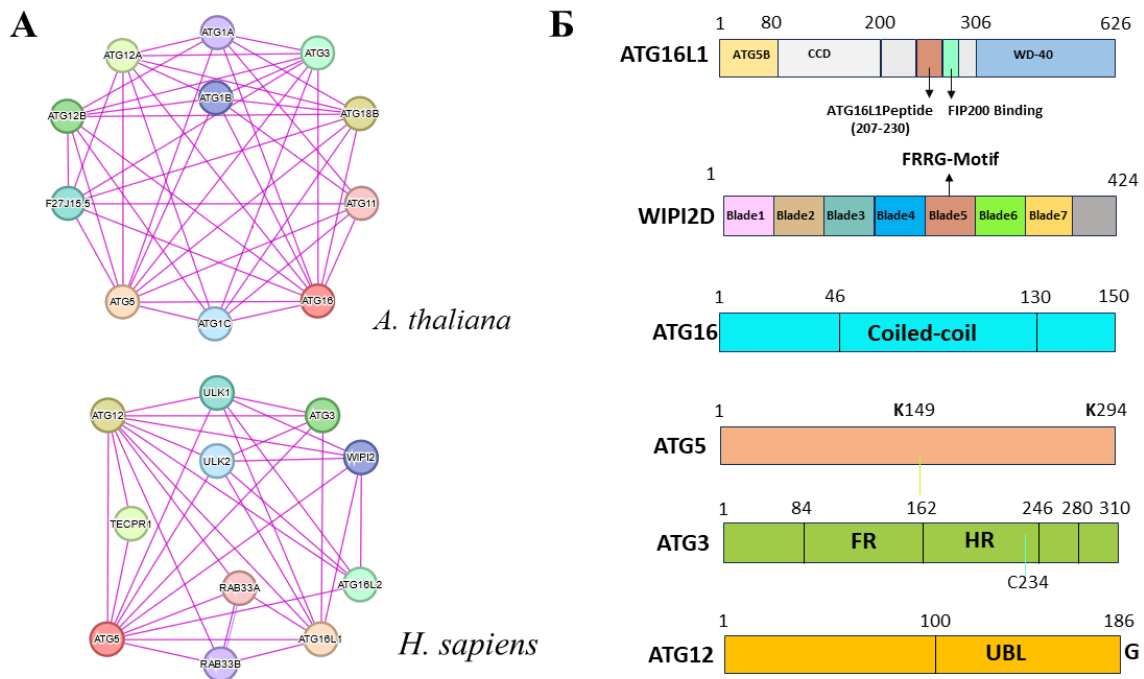


Рис. 5.9 Схематичне зображення карти білок–білкових контактів між представниками родини ATG–білків (А). Визначена доменна архітектура білків систем кон'югації (Б). Умовні позначення: ATG5 В–зв'язуюча ділянка формує N–кінцевий субдомен, CCD–спіральний домен котушки, FR–гнучка ділянка, HR–ділянка зв'язування, а β –шпилька з β –складок. UBL–убіквітин-подібний домен [47], Blade–пропелерна лопать WD40–подібного протеїну

Такі значення на сьогоднішній день є прийнятними для передбачення тривимірної моделі і ділянок білок–білкових взаємодій, спираючись на шаблонні структури. Узагальнюючи, даний комплекс є відносно консервативним, а його елементи зустрічаються в різних класах організмів (табл. 5.2). Наявність довгих структурованих ділянок відрізняє макрокомплекс WIPI2–ATG12–ATG5–ATG16–ATG3 від макрокомплекса Atg1, який є ініціатором аутофагії та відіграє ключову роль у багатьох етапах цього процесу, починаючи з формування аутофагосоми і закінчуючи її асоціацією з мембраною. Особливо цікавою видається участь у обох процесах елементів цитоскелету (більшою мірою актин та міозин), через утворення жорсткого каркасу на поверхні везикули та білку ATG8, який і є основним тригерним модулятором функціонального стану аутофагосоми [304]. Ступінь подібності між ATG8 та білком LC3 людини складає лише 37 % при тому, що ізоформи рослинного білка (ATG8a–i) значною відрізняються між собою. ATG3 це динамічний білок, який не має жорсткої структури. Насправді, приблизно третина послідовностей ATG3/ATG3 відсутня в кристалічній структурі [305]. Структура ATG3/ATG3 нагадує молоток, що складається з області головки (CCD) та області рукоятки (HR). Ділянка ядра з α/β –складкою топологічно подібна до канонічних ферментів E2, таких як убіквітин–кон’югуючий фермент 9 (Ubc9), хоча вони мають незначну гомологію послідовностей один з одним. LC3/ATG8 зазвичай зв’язується з каталітичними активними центрами ATG3/ATG3 через тіоефірний зв’язок [306]. ATG3 діє як E2–подібний фермент у системі ліпідоутворення ATG8/LC3 і є необхідним для приєднання ліпідної частини до ATG8/LC3 [52, 307]. ATG3 та його гомологи поширені в еукаріотів, включаючи гриби, та вищих еукаріотів, таких як ссавці, комахи та рослини. Більше того, їхні амінокислотні послідовності у різних видів є високо консервативними [291, 308, 309]. ATG3 сприяє утворенню аутофагосом, взаємодіючи з ATG7, ATG8, ATG12 та ліпідною мембраною. Нещодавнє дослідження показало, що ATG3 людини індукує агрегацію мембрани *in vitro*, вказуючи на те, що ATG3 сприяє стримуванню везикул, які передують злиттю

при подовженні аутофагосом, а це означає, що функція ATG3 в біогенезі аутофагосом може бути більш складною [310]. ATG3 також необхідний для ліпидування ATG8/LC3, не тільки для канонічної аутофагії, але й для неканонічного ліпидування LC3 [311]. Трансляція ATG3 також впливає на аутофагію у ссавців, *Caenorhabditis elegans* та дріжджів. LC3/ATG8 зазвичай зв'язується з каталітичними активними центрами ATG3/ATG3 через тіоефірний зв'язок [306]. У ссавців молекулярний шаперон кластерин (CLU) може сприяти стабільності гетерокомплексу ATG3–LC3 та ліпідизації LC3 через пряму взаємодію з білком LC3, а комплекс ATG3–LC3 значно зменшується в клітинах, що не містять CLU [312]. У дріжджів ATG3 є субстратом гістон–ацетилтрансферази Esa1, а ацетилювання Lys19 і Lys48 ATG3 позитивно регулює аутофагію, сприяючи утворенню кон'югатів ATG3–ATG8 і ATG8–PE.

ATG3 безпосередньо взаємодіє з ATG8 через послідовність WEDL в HR–ATG8 безпосередньо взаємодіє з ATG3 через HR (14), а ATG3 HR має тіоефірний зв'язок WXXL (Trp 270–Glu 271–Asp 272–Leu 273) послідовності [306].

Таблиця 5.2

Білки системи кон'югації AuTophagy-related1 (ATG) в різних організмах

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
ATG3 (P40344)	ATG3 (Q9NT62)	ATG3 (Q0WWQ1)
ATG4 (ATG4)	ATG4 ізоформи a–d (Q8WYN0, Q9Y4P1, Q96DT6, Q86TL0)	ATG4a (Q8S929) ATG4b (Q9M1Y0)
ATG5 (Q12380)	ATG5 (Q9H1Y0)	ATG5 (Q9FFI2)
ATG7 (P38862)	ATG7 (O95352)	ATG7 (Q94CD5)
ATG10 (Q07879)	ATG10 (Q9H0Y0)	ATG10 (Q8VZ52)
ATG12 (P38316)	ATG12 (O94817)	ATG12a; ATG12b
ATG16 (Q03818)	ATG16L1 (Q676U5)	ATG16 (Q6NNP0)

ATG4 функціонує як декон'югуючий фермент, який розщеплює амідний зв'язок між ATG8 та PE [7, 53]. На пізніх стадіях біогенезу везикул ATG4

асоціюється із зовнішньою мембраною аутофагосоми, де він розщеплює амідний зв'язок між ATG8 і PE [7, 313]. Дослідження, проведене на дріжджах, виявило мотив APEAR (ATG8–PE асоціативний регіон), відповідальний за рекрутування ATG4 до ліпідної до ліпідної форми ATG8 під час дозрівання аутофагосоми [314]. Цікаво, що мотив APEAR зберігається в ортолозі ATG4B, але не в ортолозі ATG4A *Arabidopsis* [314]. Це вказує на потенційну функціональну диверсифікацію цих ортологів у процесингу ATG8 [313]. Можна припустити, що ці дві ізоформи можуть легко ліпідизуватися і використовуватися для біогенезу аутофагосом у мутанта ATG4a/b [314].

У системі аутофагії дріжджів ATG5 є одним з основних білків аутофагії [315]. ATG5 утворює комплекс з убіквітиноподібними білками ATG12 та ATG16 і розташовується на преаутофагосомній структурі та на зовнішній поверхні ізоляційної мембрани під час аутофагії [316]. Також, ATG5 зв'язується з SAR через мотив взаємодії ATG8 дріжджових SAR (ATG19) та дріжджових SARs (ATG19 та ATG34) та область взаємодії LC3 людських SARs (p62/SQSTM1, NDP52 та OPTN) [82, 317, 51]. ATG5 утворює комплекс з ATG12 та ATG16, що регулює ліпідний обмін та локалізацію ATG8. Комплекс з ATG12 та ATG16, що регулює ліпідизацію та локалізацію ATG8 у клітинах дріжджів та ссавців [316]. Досліджуючи послідовності генів ATG16 у людини та арабідопсису, ми змогли ідентифікувати сайти зв'язування, необхідні для утворення гомодимеру (залишки з 70 по 225 у рослинному білку ATG16 представлені α -спіральною ділянкою). Як у дріжджів, так і у ссавців рекрутування комплексу ATG16/ATG16L до місця формування аутофагосоми залежить від PI3-фосфату (PI3P), що продукується PI3K комплексом I [318, 148]. Механізм кон'югації полягає в тому, що ATG12–5 зв'язується з ATG16L1, утворюючи комплекс ATG12–ATG5–ATG16L1 (E3-подібний), який разом з ATG7 (E1-подібний) та ATG3 (E2-подібний) опосередковує ковалентне приєднання членів родини ATG8 підродин LC3 та GABARAP до PE (фосфатидиллетаноламіну) в мембрані аутофага [82, 7]. Перед ліпидуванням новосинтезовані pro-LC3 і pro-GABARAP білки відщеплюються протеазами

ATG4, які також відщеплюють білки LC3/GABARAP, кон'юговані із зовнішньою мембраною аутофагосом, перед злиттям з вакуолею/лізосоною [87].

5.6. Формування рослинного комплексу ATG3–ATG5–ATG7–ATG12–ATG16 та передбачення сайтів зв'язування білків партнерів

За допомогою AlphaFold2 [319], нами отримано структурну модель E2–подібної кон'югази ATG3 у комплексі з білком ATG8 [303]. Передбачуваний комплекс ATG3–ATG8 набуває конформації, сумісної як зі зв'язуванням з E1–подібним гомодимером ATG7 на попередньому етапі, так і з утворенням тіоефірного зв'язку між каталітичним бічним ланцюгом Cys264 ATG3 і C–кінцевим Gly120 ATG8, що призводить до утворення кон'югату з субстратом E2. Ядро структури білку ATG3 людини має архітектурну подібність до білків ATG3 дріжджів та арабідопсису, як повідомлялося раніше [320]. Воно має внутрішньо невпорядковану ділянку, яка утворює петлю з ~100 залишків, що містить ATG12–зв'язуючу послідовність амінокислот. Міжмолекулярний β –шар, передбачений AlphaFold між залишками ATG3 від 90 до 110 і β 2 ATG8 в нашій структурній моделі, узгоджується з наявністю неканонічного LIR–мотиву в гнучкій ділянці ATG3, який, як нещодавно було продемонстровано [303], є важливим для ліпідизації ATG8 [79, 321]. Це дозволило нам реконструювати його структуру шляхом підбору геометричних параметрів. Отримана спіральна структура добре узгоджується зі структурами даними (PDBID: 6Y09) мишачого ортолога, в якому було закристалізовано область домену, що відповідає описаній ділянці. У поєднанні з кристалографічними структурами ATG12–ATG5 у мономерному комплексі ATG16 зі зв'язаним фрагментом ATG3, нам вдалось розробити атомістичну модель у комплексі із іншими прогнозованими структурами ATG [303], згенеровану за допомогою AlphaFold2 [319] (рис. 5.10). Комплекс ATG12–ATG5–ATG16 забезпечує перенесення білку ATG8 з білку ATG3 на фосфотидилетаноламін. Результатом

взаємодії всіх цих білків є ліпідизація і заякорювання убіквітин-подібного білка ATG8 в мембрані, що є характерною ознакою біогенезу аутофагосом [302]. Використовуючи кристалічні структури білків різних організмів, що входять до системи кон'югації ATG8 (ATG3) та забезпечують перенесення його на мембрану (ATG12, ATG5 та ATG16), ми побудували майже повну модель відповідного комплексу із рослинних гомологів.

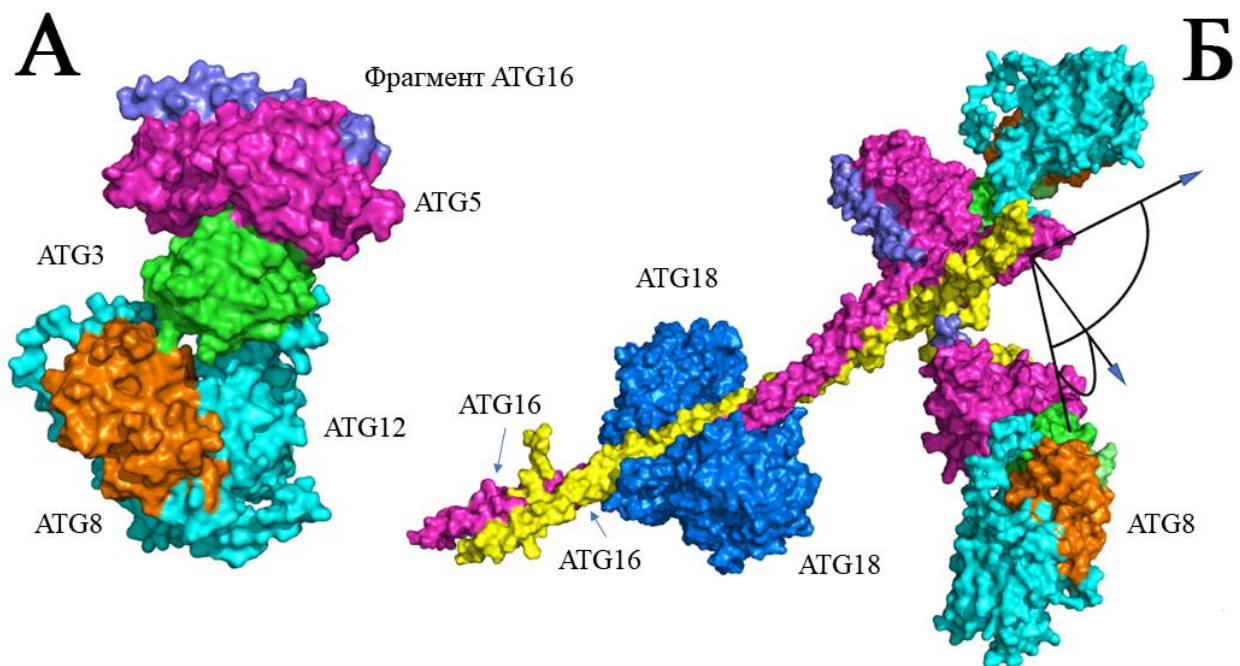


Рис. 5.10 Реконструкція мембранного комплексу кон'югації ATG8. Геометрія розташування білків ATG у комплексі першої системи кон'югації, залученому до процесу елонгації фагофору (А). Механістична модель комплексу ATG12~ATG5~ATG16 та ATG3~ATG8 з *A.thaliana* (Б)

Всі окремі моделі та остаточний комплекс були релаксовані за допомогою молекулярної динаміки з метою отримання первинної конформації системи в момент суміщення її елементів. Таким чином ми стабілізували всі інтерфейси взаємодії і підготували модель створення асоційованого із мембраною комплексу і вивчення механіки заякорювання ліпідизованого ATG8 [303]. Наразі залишається невідомою точна архітектура комплексу ATG16~ATG18.

Відомо, що білок ATG16 доставляється до мембран за допомогою фосфоінозитид–взаємодіючого білка 2 (WIPI2), при чому WIPI2 зв’язується з білком ATG16 через W2IR (WIPI2 interacting region) ділянку (залишки 207–230). В свою чергу, у *Arabidopsis* є ціла родина подібних білків ATG18, які виконують ту саму функцію. На разі наша увага сфокусована на супутніх білках ATG16L1, WIPI2 та FYCO1 та їх взаємодії із мембраною та елементами цитоскелету. Мембранна взаємодія ATG16L1 досягається за допомогою кількох взаємодій; амфіпатична спіраль поблизу N–термінального кінця забезпечує зв’язування з мембраною та необхідна для ліпідації ATG8, консервативних залишків у домені спіралі разом з його взаємодією з фосфатидилінозитол–3–фосфатом (PtdIns(3)P) ефекторним білком WIPI2 забезпечують зв’язування з PtdIns(3)P. Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновки про консервативність родини ATG білків у різних царствах та можливість реконструкції складних макрокомплексів. Орієнтуючись на ці дані ми провели порівняльний аналіз ATG8 *A. thaliana* та їх ортологів тваринного походження. Так було визначено потенційні сайти їх ацетилювання і надалі побудовані просторові моделі ATG8 рослини для дослідження ефектів модифікації. Дана модель може бути використана для пошуку інгібіторів міжбілкових взаємодій власне у самому комплексі та створення функціональної убіквітиноподібної системи кон’югації ATG на поверхні ліпідної мембрани з метою дослідження окремих ланок каскаду ліпідизації ATG8 у рослин [303].

Висновки до Розділу 5:

1. Проведено вирівнювання амінокислотних послідовностей ATG білків людини проти бази даних сіквенсів їх рослинних гомологів і доведено високий ступінь подібності цих білків на рівні доменної організації та інтерфейсів білок–білкових взаємодій.
2. Результати аналізу кристалографічних даних щодо взаємодії білків комплексу першої та другої системи ATG кон’югації тваринного походження

засвідчили можливість побудови відповідного макрокомплексу для *A. thaliana* на поверхні ліпідного шару аутофагосоми.

3. Змодельовано тривимірні моделі рослинних гомологів білків першої та другої системи ATG кон'югації і отримано структури, необхідні для молекулярного білок–білкового докінгу та подальшої інтерпретації взаємодії комплексу другої системи ATG кон'югації з молекулою білку ATG8.

4. Проведено порівняльний аналіз ізотипів білка ATG8 *A. thaliana* та їх ортологів тваринного походження, визначено потенційні сайти їх ацетилювання та побудовано просторові моделі білку ATG8 *A. thaliana*.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. **Булгаков ІВ, Раєвський ОВ.** Дослідження ATG білків, залучених до формування комплексу ATG1, його взаємодії з білком ATG8 в процесі дозрівання аутофагосом. Фактори експер евол орг. 2023;32:136–41. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1550

2. **Булгаков ІВ, Раєвський ОВ.** Реконструкція геометрії молекул ATG13 та ATG101 у процесі складання комплексу. Фактори експер евол орг. 2024;35:146–50. DOI: 10.7124/FEEO.v35.1676

3. **Булгаков ІВ, Раєвський ОВ.** Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків задля ідентифікації сайтів зв'язування ATG8. В: IV конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія»; 2025 Трав 16–18; Київ, Україна. К.: 2024. с. 6.

4. **Булгаков ІВ, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ.** Реконструкція моделі мультипротеїнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. Допов Нац акад наук Укр. 2025;1:68–76. DOI: 10.15407/dopovidi2025.01.068

РОЗДІЛ 6

УЧАСТЬ МІКРОТРУБОЧОК, ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ ТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ, У РОЗВИТКУ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ

Незважаючи на інтенсивні дослідження мікротрубочок рослин, а також структурні та функціональні дані, механізми, що лежать в основі оборотної стабілізації та дестабілізації МТ, поки що залишаються не до кінця з'ясованими. Динаміка такої важливої структури модулюється модифікаціями бічних ланцюгів на поверхні молекул тубуліну та оборотними реакціями їх фосфорилування і ацетилювання та інш. [210, 211]. У той же час вплив більшості передбачуваних сайтів ацетилювання ще не досліджено експериментально [322], а для рослин ці процеси, взагалі, майже не досліджені. Дослідження взаємодії ATG білків з такими елементами цитоскелету, такими як тубулін, може допомогти зрозуміти механізми транспорту та злиття аутофагосом.

6.1. Особливості будови інтерфейсів білок–білкових взаємодій тубулінів рослин та тварин на прикладі молекули α -тубуліну

Для з'ясування цього питання нами було проведено порівняльне дослідження [323]. окремих молекул α -тубуліну з ацетильованими та неацетильованими залишками K40 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 (рис. 6.1) дозволяють інтерпретувати такий взаємозв'язок. Наприклад, нами спостерігалась експозиція у водне середовище неацетильованого залишку K40,

який є дуже гнучким у порівнянні з ацетильованою формою, і всі залишки навколо положення Lys40 (помаранчевий колір стрічки внизу картинки) залишаються у своєму невідпорядкованому стані як в матриці (α -тубулін *S. scrofa*) із закристалізованого димеру, так і в деацетильованому α -тубуліні по залишку K40 з *A. thaliana*.

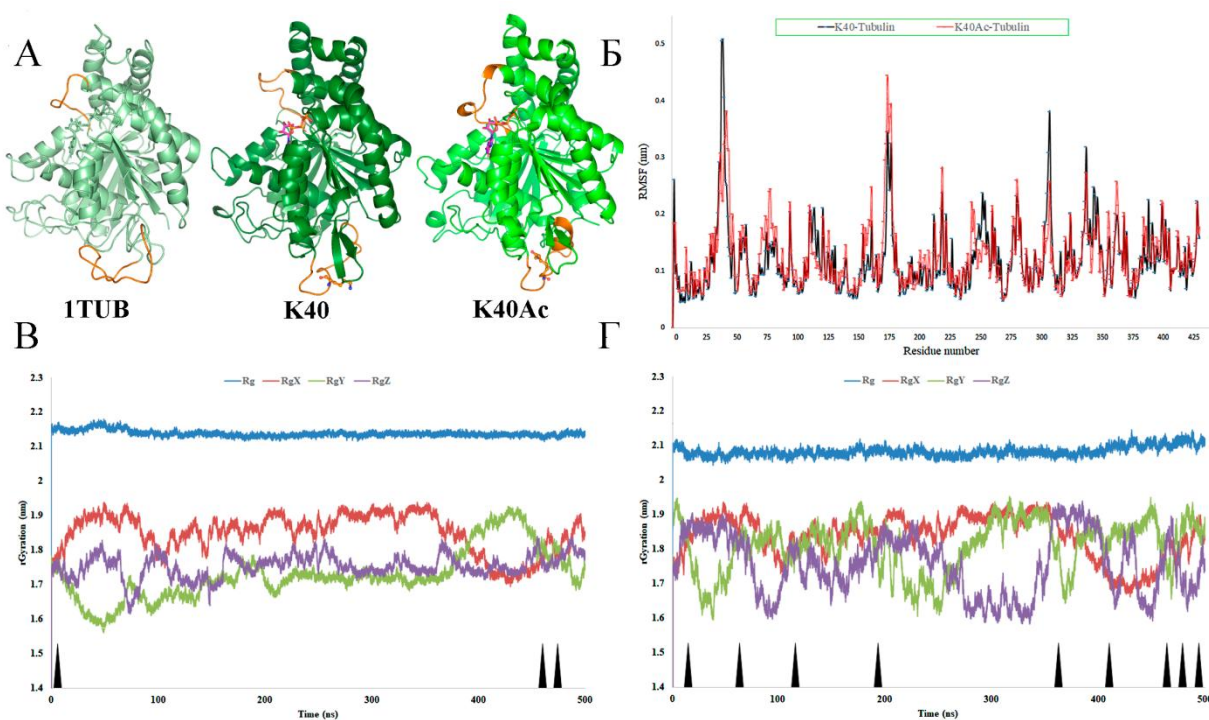


Рис. 6.1 Найбільш стабільні конформації немодифікованого та K40Ac α -тубуліну після МД, вирівняні до структури закристалізованого димеру [1TUB] для візуалізації локальних змін у двох окремих моделях (А). Діаграма RMSF, з даними по окремих залишках (Б), та два графіки, що демонструють різницю в радіусі гірації, кількості конвергенцій (позначених піками),—розраховані для деацетильованого та ацетильованого білків (В та Г, відповідно)

У той же час було виявлено, що після кепування залишку K40 ацетильною групою ця невідпорядкована область перетворюється у α -спіраль, а сам ацетильований залишок орієнтується всередину білка. Верхня петля вихідної структури 1TUB (пофарбована у помаранчевий в обох структурах), яка

бере участь у процесі димеризації тубуліну, подібна до орієнтації та конформації петлі у ацетильованій форми. Це означає, що взаємодія тубулін–тубулін може бути порушена, при цьому верхня петля також помітно структурується. Цікаво, що після введення ацетильної групи вся структура білку стає більш стабільною, що відображається у частоті конвергенції між усіма трьома графіками в радіусі ділянок обертання. Це дозволяє зробити висновок, що ацетилювання K40 стабілізує просторову структуру окремого досліджуваного білку та сприяє утворенню білок–білковим взаємодій. Проте слід зазначити, що ефект від будь–яких змін в частині білка може розсіюватися, не стикаючись із стеричними перешкодами від сусідніх мономерів.

Доступ до позиції K40 стерично унеможливлений, оскільки цей залишок розташований на внутрішній поверхні пластинки мікротрубочки (рис. 6.1). Це означає, що не очевидно, коли відбувається процес ацетилювання і як ця посттрансляційна модифікація впливає на дистальні сайти зв'язування MAP. Однак було виявлено, що збірка МТ значно сповільнюється, коли K40 ацетилюється в ізольованих тубулінах [324]. На противагу цьому, сайти ацетилювання K112 і K394, що знаходяться на зовнішньому боці МТ, можуть безпосередньо впливати на асоціацію MAP. Нещодавно було показано, що роль K40 і K394 є критично важливою для процесу реорганізації цитоскелету як в організмі людини, так і рослин [325]. Крім того, ацетилювання тубуліну може впливати на жорсткість архітектури мікротрубочок і збільшувати поздовжні контакти між протофіламентами МТ [326]. Ці зміни впливають на специфіку зв'язування багатьох білків MAP, які взаємодіють з поверхнею мікротрубочок [327]. Було показано, що всі три позиції можуть бути ацетильовані як у розчинному (мономерному) стані, так і в складі МТ, що стало підставою для того, щоб розпочати три моделювання молекулярної динаміки мономеру α –тубуліну, ацетильованого в кожному положенні. Детально умови та методи порівняльного аналізу траєкторій описано в нещодавній статті [297], присвяченій ефектам N–ацетильованого K40. Тут ми демонструємо результати

моделювання симуляцій, проведених на неацетильованому α -тубуліні та α -тубуліні з N-ацетильованими K40, K112 та K394 (рис. 6.2).

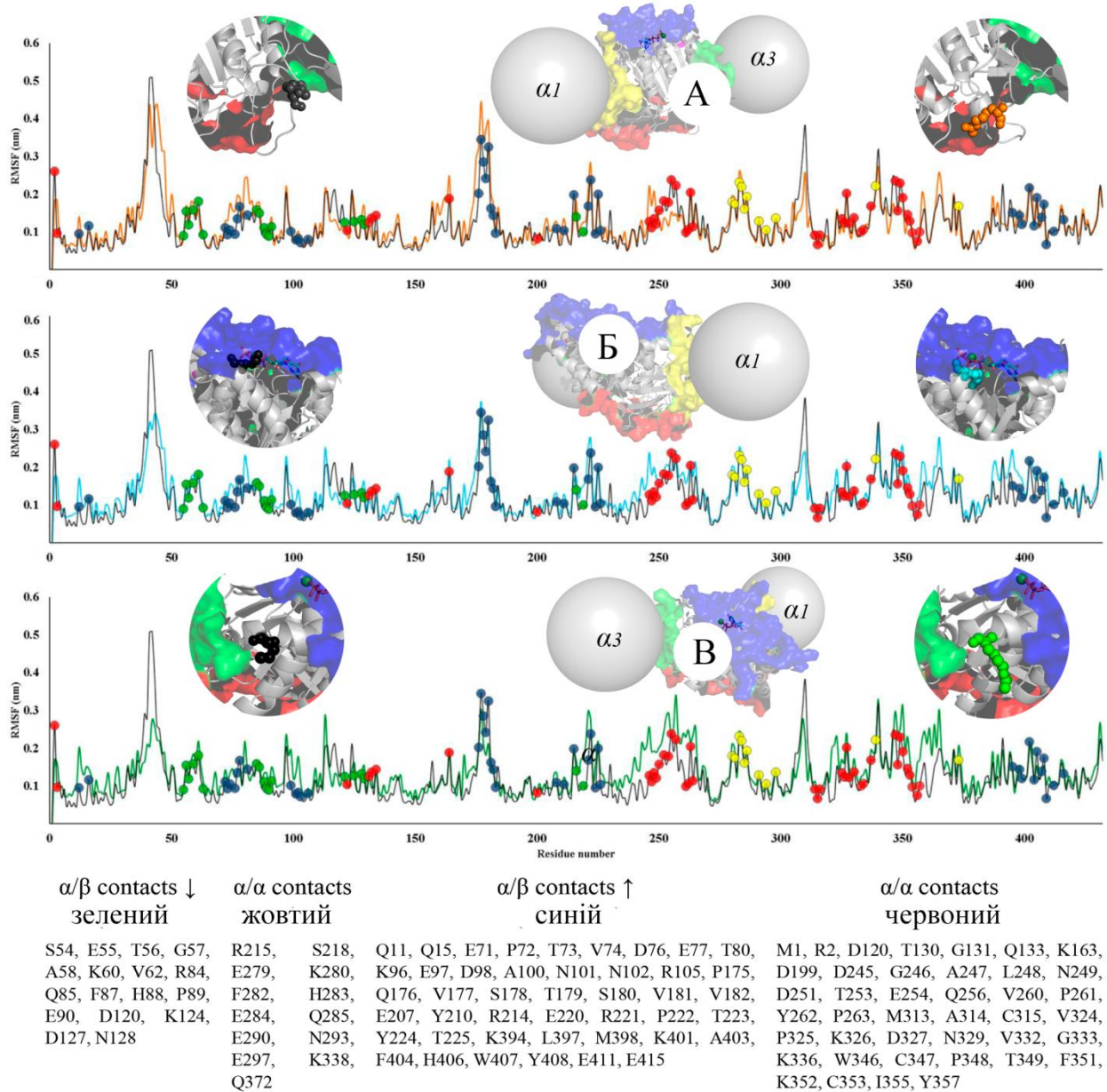


Рис. 6.2 Графічне зображення структурних змін у розчинних молекулах-тубуліну *A.thaliana*, спричинених ацетилюванням у положеннях K40 (помаранчевий), K112 (зелений) та K394 (блакитний) (А, Б та В, відповідно). Графіки RMSF, орієнтовані на залишки ацетильованих білків, порівнюються з графіками, отриманими з траєкторії деацетильованого тубуліну. Кольоровими точками позначено залишки, які формують відповідні інтерфейси РРІ, що

відображають їхню гнучкість вздовж МД. Перелічені залишки є тими, що беруть участь у перехідних RPI–взаємодіях кожного α -тубуліну в МТ людини

Цікаво, що після ацетилювання всі залишки Lys змінювали свою початкову конформацію, яка піддавалася впливу розчинника–взаємодіяли з поверхнею білка. Наприклад, AsK40 утворює H–зв'язки з Q358 і H28 або іншою парою, D245 і E27, зменшуючи гнучкість ділянки петлі. Слід зазначити, що залишки K40 і K394 розташовані поблизу інтердимерного інтерфейсу, і їх ацетилювання посилює поздовжні, але не поперечні зв'язки між молекулами α - і β -тубуліну [212, 324].

Аналіз графіків RMSF дозволяє зробити висновки, що ацетилювання α -тубуліну в положенні 112 призводить до найменшого впливу на структуру мономеру з усіх трьох досліджених. Примітно, що ця модифікована амінокислота піддається впливу розчинника і не бере участі в жодних очевидних міжмолекулярних взаємодіях у МТ. У контексті МТ більш імовірно, що ацетилювання є або стерично несприятливим, або модифікація не впливає на вже зібрані МТ. Можливо, що ацетильований розчинний димер або мономер може бути просто вилучений з процесу полімеризації [211]. Результати нашого дослідження показали [297], що ацетилювання в положенні K112 не має критичного впливу на конформацію білка, тому це положення було усунуто з подальшого етапу моделювання МД. Для аналізу впливу ацетилювання на формування гетеродимеру були вибрані ще три позиції K60, K163 і K326 на основі даних ацетилому *A.thaliana*, а модель використовувалась та сама (мономер α -тубуліну у вихідному релаксованому стані). Сайти ацетилювання розташовані на відстані не менше 30–40Å від контактних поверхонь з іншими білками. Вихідні траєкторії моделювання порівнювали з початковим і кінцевим кадрами МД деацетильованого α -тубуліну [323]. Рухливість модифікованої амінокислоти K163Ac була схожа з показниками її ж у деацетильованому стані. Був зафіксований перехід між упорядкованим і невпорядкованим станами в трьох окремих ділянках молекули, які потенційно відповідають за утворення

димеру та подальше включення його до протофіламенту. Конформаційна стабільність корової структури молекули тубуліну була подібна у всіх досліджуваних траєкторій МД, але деякі елементи вторинної структури білків із K163Ac і K326Ac поступово деформувались. Це впливає на сусідні елементи вторинної структури (на 70–86 залишки). Ймовірно, це пов'язано зі зростанням рухливості залишків, що входять до цих ділянок, та розтягуванням ланцюга в цілому. При цьому, тільки K60Ac мономер зберіг свою компактність і конформацію всіх згаданих спіралей і β -листа, утвореного 53–63 залишками. Отже, результати аналізу свідчать про те, що димеризація ацетильованого білка є нормальним процесом та вимагає лише певної жорсткості контактних залишків, а, незважаючи на деяку різницю в загальній гнучкості ацетильованого та деацетильованого стану білку, локалізація та рельєф його вторинних структур зберігається. Ми використовували інтактний білок як еталонну молекулу для аналізу графіків RMSF усіх трьох ацетильованих моделей (рис. 6.3). Зміни в α -спіралі (показано червоним) чітко відображають структурну відповідь на введене ацетилювання в різних положеннях. Як виявлено нами [323], найбільш критична зміна на поверхні була встановлена для області 70–86 амінокислот, що зводилась до утворення α -спіралі, яка, ймовірно, опосередковано впливає на білок-білковий інтерфейс між субодиницями гетеродимера. З графіка RMSF видно, що білки не зазнали значних структурних змін впорядкованості, лише три згорнуті фрагменти були розгорнуті (рис. 6.3). Кольорові рамки на графіках відповідають розташуванню вторинних структур, які визначають певну різницю у перебудовах між трьома моделями. Інша область (260–270 залишками), яка відрізняється на всіх трьох графіках, відповідає гнучкому циклу і не видається важливою для дослідження. Також було зроблено припущення, що крім стеричних змін може відбуватися перерозподіл зарядів на поверхні молекули тубуліну в залежності від позиції його ацетилювання. Електростатична карта K163Ac виявила продовговату негативно заряджену поверхню, тоді як області K60Ac і K326Ac є менш зарядженими та розділені на дві ділянки (на малюнку чорними рамками).

Порівняльний аналіз [323] з неацетильованою формою тубуліну визначив схожість між електростатичними зарядами поверхонь відповідних регіонів K60Ac, K326Ac та інтактного білка.

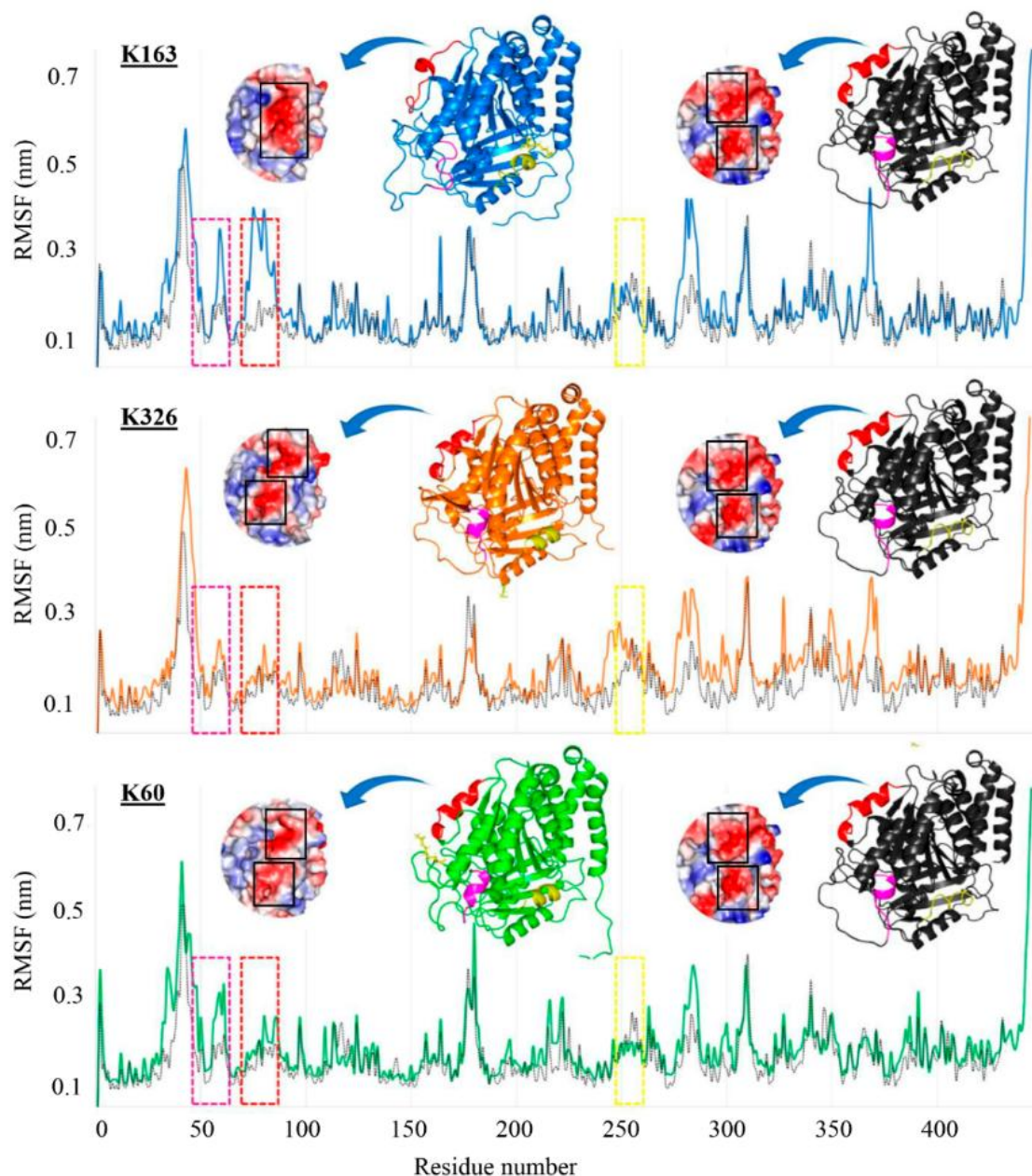


Рис. 6.3 Вплив ацетилювання по позиціях K163, K326 і K60 на флуктуації молекули α -тубуліну, елементи вторинної структури та заряд поверхні. На графіку RMSF кольоровим наведені показники для ацетильованого білку та сірим для не ацетильованого. Рамками на графіку показані зміни ступеня стабільності окремих ділянок структури (показані на поверхні білка).

Цікаво, що дві інші спіралі (44–51 та 250–257 залишки), які зазнають певної дестабілізації, можуть впливати на точність латеральної взаємодії. Слід зазначити, що кількість внутрішніх молекулярних водневих зв'язків, утворених вторинними структурами також зменшилася вдвічі в місцях, близьких до дестабілізованої вторинної структур. В той же час, спостерігалось зростання кількості стекінгових взаємодій навколо сайтів ацетилювання порівняно з інтактним білком навіть у K163Ac. Отже, можна зазначити, що ацетилювання K60Ac стабілізує зовнішній шар (поверхневі залишки) мономерної структури α -тубуліну, тоді як K163Ac може обумовити деформацію вторинних структурних елементів, які беруть участь у взаємодії α/β -субодиниць тубуліну при утворенні гетеродимера, або впливають на поведінку гетеродимера у складі протофіламента. Також нами був проведений аналіз впливу ацетилювання на стабільність вже утворених димерних комплексів (рис. 6.4). Як показали результати МД у випадку K163Ac відбувається значне зменшення кількості водневих зв'язків між поверхнями α - та β -тубуліну. Модифікація K60Ac супроводжувалася посиленням водневих зв'язків, але не стекінг-взаємодій. Яскравим доказом процесу дестабілізації був графік RMSF структури димеру. По-перше, обидві субодиниці в моделі K163Ac були надмірно гнучкими, тоді як у випадку з K60Ac і K326Ac графіки для них були плавними і практично ідентичними. Цікаво, що не було істотних відмінностей між траєкторіями димерів, утворених з двох попередньо релаксованих субодиниць, незалежно від моменту введення ацетильованого Lys (до або після димеризації). Це можна пояснити взаємним структурним стримуванням субодиниць і ступенем енергетичного мінімуму великих молекул. Кількість міжмолекулярних H-зв'язків у моделі K163Ac була найменшою серед інших комплексів. Цікаво, що не було явних причин такої розбіжності в просторовому розташуванні субодиниць димерів.

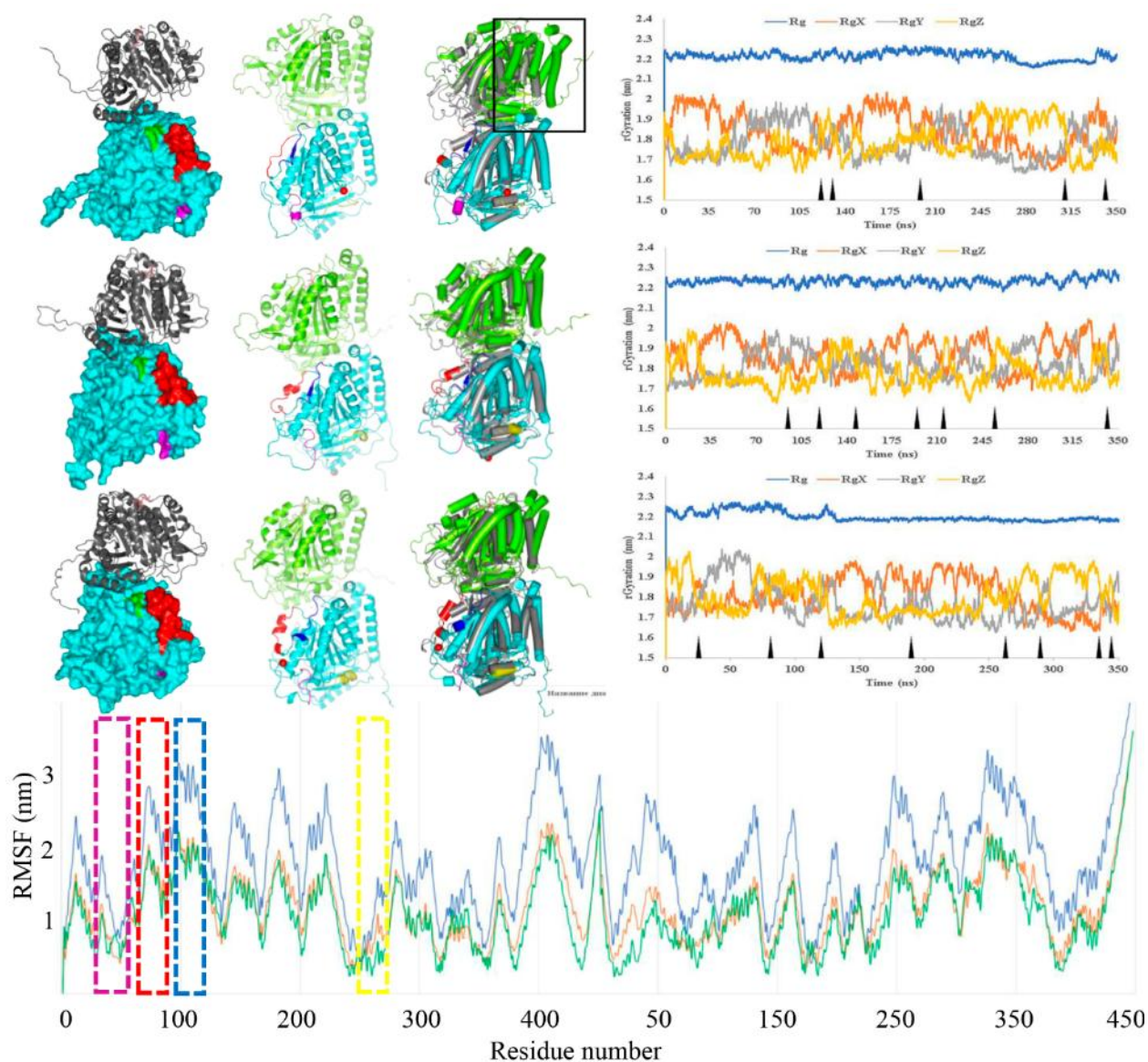


Рис. 6.4 Три моделі димерів тубулінів із ацетилюванням по позиціях K163, K326 і K60 (α -тубулін забарвлений блакитним кольором) накладаються на інтактний гетеродимер (чорний) для демонстрації структурних змін разом із порівнянням показників рухливості на графіках RMSF та Rg. Кольорові рамки на графіку акцентують увагу на змінах в рухливості окремих ділянок білка, забарвлених у відповідний колір

Щоб оцінити рухливість окремих сегментів білка, нами було розраховано радіус обертання білка під час моделювання. Ділянки ацетильованих білків відрізнялися від деацетильованого α -тубуліну, демонструючи інший рівень

компактності. Найменша кількість точок конвергенції на графіках радіусів гірації була показана для K163Ac і найбільша для комплексу K60Ac.

Нарешті, ми проаналізували графік RMSF, розрахувавши обидві субодиниці як єдиний об'єкт, щоб відобразити загальний діапазон структурної рухливості. Поверхня молекул α -тубуліну забарвлена відповідно до кольору ділянок/рамки на графіку RMSF. Загалом молекула β -тубуліну не зазнавала структурних перебудов, однак було виявлено нахил її структури в бік відносно α -тубуліну у випадку залишків K326Ac і K163Ac. Ми зафіксували різну кількість Н-зв'язків, які були стабільними через МД, і сформували внутрішньо ланцюгові (ланцюг А це α -тубулін, ланцюг В це β -тубулін) взаємодії для K326Ac (R105_A, R221_A, K401_A, F404_A, E411_A, D98_A, E97_A, K96_A; R163_B, R2_B, Q132_B, I259_B, Y426_B, P260_B, R252_B, I346_B), K163Ac (N101_A, V181_A, V182_A, H406_A, W407_A ; N257_B, K351_B, I259_B, P260_B, Q425_B) і K60Ac (F404_A, W407_A, S180_A, T179_A, E97_A, N101_A, R221_A, E220_A, L70_A, W40_A; R47_B, R2_B, N257_B, D328_B, K325_B, V256_B, P260_B, T179_B). У всіх симуляціях спостерігалася одна міжланцюгова стекинг-взаємодія між K401_A та W345_B. Таким чином, дистальний сайт ацетилювання може впливати на ймовірність взаємодії між димерами і кількість контактів між мономерами [323]. У випадку K163Ac, незважаючи на відсутність серйозних структурних змін у структурі α -тубуліну, спостерігали деякі зміни в орієнтації прилеглої молекули β -тубуліну. З іншого боку, відповідні графіки компактності (радіус обертання) показали найбільшу кількість точок конвергенції, виявлену для моделі K60Ac. Нами виявлені три структурні тенденції, притаманні кожній окремій моделі—три області, про які ми згадували вище, мали подібні перехідні стани, як у формі розчинного мономеру α -тубуліну. Крім того, нитка β -листа (88–97 залишків) зникла в моделі K163Ac ближче до середини моделювання (200 нс). Ми досліджували кількість взаємодій Н-зв'язків, як визначення стабільності вторинної структури та її вплив на оточуючі залишки (табл. 6.1).

Отримані результати [323], незважаючи на відсутність структурних та біохімічних даних, дозволяють припустити, що ацетилювання деяких Lys може бути критичним для впровадження гетеродимеру в мікротрубочку, але не процесу гетеродимеризації.

Таблиця 6.1

Водневі зв'язки, утворені амінокислотами трьох мотивів

	DDAFNTFF (46–53)	PTVIDEVRTGTYRQ (72–85)	VDVTEFQTNL (250–259)
K60Ac, Initial	T51, N50, F52/ R2, C4, R64	E85, Y83, R79, I75, V74, T73/ K60, L86, L92, S94, D69, Q71	V250, Q254, D251, E256, L259/ E133, S241, K352, N380, V260, D199
K60Ac Final	D46, D47, N50, F52, F53, T51/ D245, K40, C4, R64	Y83, R84, Q77, T73/ I30, F87, L86, E15, Q71	V250, Q254, E256, L259/ K352, S241, V260, N380
K60Ac dimer	T51, F52/ L242, R64	I30, L86/ Y83	V250, E256, L259/ S241, S165, V260, N380
K163Ac, Initial	T51, F52, F53/ R64, C4, R2	T73, V74, I75, R79, Y83, Q85/ S69, S94, E71, L86, K60, L92	V250, E254, L259, Q256/ S241, V260, K352, N380
K163Ac monomer	R64, C4, L242/ N50, T51	T73, R79, T82, Y83/ E22, I30, L86, F87, S94	L259, D251/ N380, K352
K163Ac Dimer	F49, A48, N50, T51, T51, F52/ L242, R64, G45	E85, Y83/ D33, L86, F87	V250, N258, L259/ S241, K352, N380
K326Ac,	N50, F53, F52,	E85, Y83, R79, I75,	V250, Q254, E256, L259/

Initial	T51/ R64, C4, L242	V74, T73/ K60, L86, L92, S94, D69, Q71	S241, K352, D199, V260, N380
K326Ac Final	D46, D47, T51, N50, F53/ M1, R2, R243, C4, R64	R84, Y83, T82/ F87, L86, Q22	Q254, E256, L259/ K352, S165, V260, N380
K326Ac Dimer	D47, N50, F52/ M1, R2, R64	R84, E85, T73/ D33, P32, D69	E256, T257, L259/ S165, V260, N380

6.2. Розробка структури фрагменту мікротрубочки рослини та тварин для дослідження впливу посттрансляційних модифікацій

У цій роботі [297], ми спробували охарактеризувати структурні та динамічні властивості МТ, утворених шляхом ацетилювання окремих залишків Lys на поверхні α -тубулінів. Для цього ми порівнювали як структурні зміни в окремих елементах системи, так і взаємодії всього ансамблю молекул. Як структурна модель нами була використана кристалічна структура полімерного комплексу тубулінів з організму людини (PDBID: 9F3R), а оцінювався вплив гіперацетилювання вже на обох системах у вигляді фрагментів мікротрубочок із тубулінів ссавців і рослин. Lys в положеннях 40, 112 і 394 були обрані через їх просторове розташування на поверхні α -тубуліну та наявні експериментальні підтвердження їх участі в динаміці МТ (рис. 6.5). Щоб зрозуміти роль ацетилювання в реорганізації мікротрубочок та візуалізувати певні структурні зміни, ми змоделювали фрагмент МТ з ацетильованими Lys залишками 40 та 394 [297]. Проведення досліджень кільцевої структури мікротрубочок (навіть одна нитка МТ з PDBID: 6CVN містить 14 димерів) є дуже складним завданням з точки зору обчислювальних вимог і технічної складності через великий розмір системи. Однак сучасні силові поля CG можуть забезпечити точність аналізу значень залишків, порівнянню з експериментальними методами, що

робить їх зручною альтернативою для моделювання великомасштабних систем [248, 261, 328].

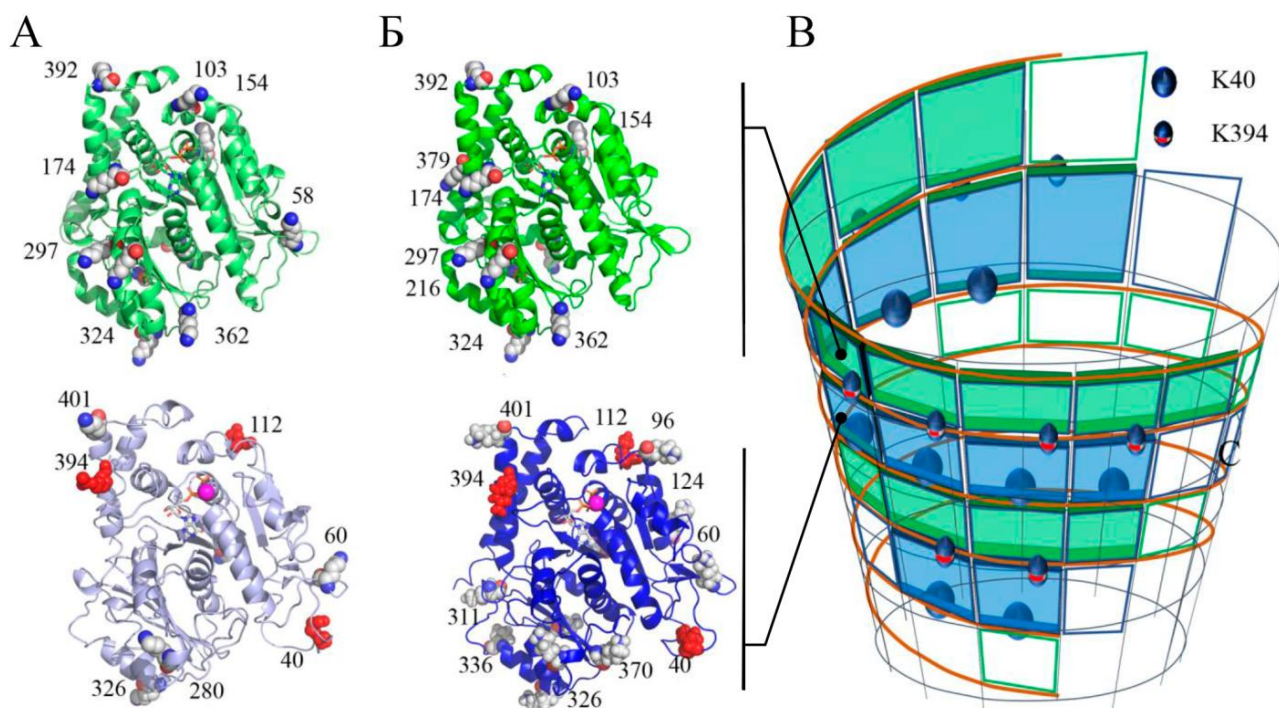


Рис. 6.5 Структурне представлення комплексів тубуліну *A. thaliana* та людини. Проілюстровано передбачені та експериментально підтверджені сайти ацетилювання на поверхні тубулінів *A. thaliana* (А) та людини (Б). α -тубуліни та β -тубуліни забарвлені синім та зеленим кольорами відповідно, а вибрані сайти ацетилювання позначені червоним кольором (В) Схематична структура МТ зі структурними проміжними елементами в процесі збирання мікротрубочки та двома найцікавішими сайтами ацетилювання—K40 і K394

Щоб розширити динамічну вибірку, ми виконали симуляції CG, починаючи з двох конфігурацій, отриманих з вищезгаданого комплексу людини, включаючи 12-мерний пептид, утворений шарами $\alpha\beta\alpha\beta$ (1,135,736 атомів), а також 9-мерний пептид, утворений шарами $\beta\alpha\beta$ (905,253 атоми). Перша система залишалася стабільною до 5 мкс, а зміни у фрагменті структури мікротрубочки були незначними, майже не зачіпаючи крайній ряд α -тубулінів. Така модель дозволяла успішно візуалізувати процес, як показано в

нещодавньому дослідженні, демонструючи, що SIRAH 2.0 здатна показувати деяке послаблення міжмолекулярних контактів і вигинання протофіламентів [329, 330].

CG-моделювання фрагмента MT із *A. thaliana*. Використовуючи молекули ГТФ/ГДФ та іони Mg^{2+} як кофактори, ми спробували відтворити найбільш реалістичний сценарій деградації мікротрубочок рослин. У нормі після вбудовування α - β димеру в лінійні протофіламенти молекула ГТФ, зв'язана із сайтом зв'язування β -тубуліну, поступово гідролізується до ГДФ [331]. Численні випадки деградації ГТФ призводять до зниження стабільності димерів і подальшого порушення МТ. Крім того, молекулярна динаміка ансамблю рослинних тубулінів з АсК у всіх α -тубулінах виявила зміни міжмолекулярних взаємодій. Ми проаналізували найбільш стабільний період МТ, а саме останні 300–400 нс моделювання, коли вся система збалансована і ймовірність випадкових структурних змін є найменшою, але тенденції глобальних переходів вже проглядаються. Найяскравішою ілюстрацією зміни форми моделі можуть бути центроїди великих конформаційних кластерів (рис. 6.6).

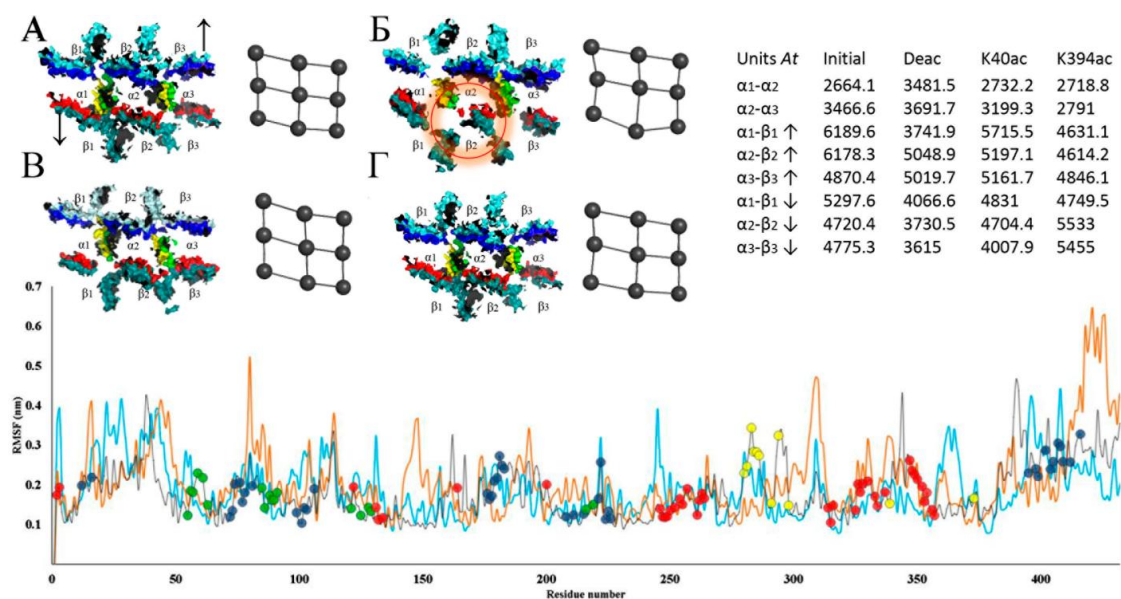


Рис. 6.6 Розташування субодиниць тубуліну рослин у вихідному стані комплексу (А), а також конформації модифікованих комплексів

деацетильованої системи (Б), K40ac (В) та K394ac (Г), отриманих після 400 нс МД, проілюстроване за допомогою міжмолекулярних контактів та ґраток таблиці (вгорі праворуч) наведено розраховані площі перерізу РРІ (калорії на моль на квадратний ангстрем). Графічне зображення структурних змін у центральному, деацетильованому рослинному α -тубуліні та молекулах, модифікованих у позиціях K40 (помаранчевий) і K394 (блакитний)

Цікаво, що при ацетилюванні Lys в положенні 40 спостерігається збільшення набору контактів у комплексі в поздовжньому напрямку. У випадку AcK40 рухливість петлі зменшується, і молекула α -тубуліну здатна утворювати більше контактів з нижнім рядом β -тубулінів. У деацетильованому стані ми спостерігали втрату контактів білок-білкової взаємодії між димерами α/β -тубуліну та дисоціацію молекул ГДФ, які були розташовані на субодиницях β -тубуліну. Намагаючись з'ясувати механічний вплив ацетилювання на структуру тубуліну, нами було проаналізовано радіус гірації та рухливість амінокислотних залишків комплексу тубулінів. Зокрема, ми звернули увагу на зміни поверхні, що призводило до зниження загальної кількості міжмолекулярних контактів молекул. Було показано, що деацетильованому білку притаманне ущільнення білкової складки. Наприклад, на основі аналізу радіусу спіралі центрального α -тубуліну ми дійшли висновку, що ацетильований тубулін є більш компактним, ніж його деацетильована форма, що може демонструвати більшу гнучкість у зовнішніх вторинних структурах. Це узгоджується з повідомленнями про те, що ацетилювання знижує швидкість нуклеації та полімеризації мікротрубочок [324]. Як наслідок, нами спостерігалась деформація початкової геометрії, а, саме, немодифіковані димери тубуліну частково втрачали контакт з нижнім рядом β -тубулінів. У свою чергу, вся структура цього β -тубулінового ланцюга також послаблювалася. У випадках ацетилювання α -тубулінів контакти між білками в комплексах залишалися стабільними, а поздовжні пучки β - α - β -тубулінів зміщувалися назустріч один одному, змінюючи кут нахилу спіралі. Відомо, що

підвищення рівня ацетилювання повинно якимось чином стабілізувати ансамбль МТ, і ці дані узгоджуються з впливом модифікацій K40 і K394 на структурну перебудову під час моделювання МД. Під час моделювання МД молекули ГТФ не змінювали свого розташування, тоді як молекули ГДФ вивільнялися з деацетилюваного комплексу. Це відбувалося в обох рядах β -тубулінів внаслідок деякого зменшення площ взаємодії між димерами в повздовжньому та поперечному напрямках. Натомість ацетилювані комплекси не показали суттєвих змін у розташуванні субстратів [297].

CG-моделювання фрагмента МТ із *H. Sapiens*. Щоб виявити деякі тенденції в поведінці цих двох варіантів ацетилювання, ми також провели подібне моделювання на комплексі білків людини (рис. 6.7). Крім того, комплекси тварин добре вивчені і наші гіпотези можуть бути підкріплені біохімічними та кристалографічними даними. Порівняння поверхні протеїн-протеїнових інтерфейсів і передбачуваних сайтів зв'язування дає цінну інформацію про ще недосліджену подібність сайтів. Ці знання можуть бути корисними на різних етапах комп'ютерних і біохімічних досліджень. На основі результатів МД [297] ми дійшли висновку, що послідовність подій у регуляції МТ має бути такою ж, як і в рослинній системі. Перш за все, зміна форми і розміру кожного α -тубуліну залежить від ступеня ацетилювання і подальшого розриву контактів як у вертикальному, так і в горизонтальному напрямках. Ми виявили, що система білків людини демонструє ще більш помітний ефект ацетилювання, ніж рослинна система. Тут ми посилаємося на значення представлені на рис. 6.6 та 6.7, що відповідають площі збережених контактів між сусідніми субодинацями у випадку їх ацетилюваного стану. Потім ми провели серію симуляцій 9 молекул тубуліну (фрагмент мікротрубочки), щоб визначити ймовірність дисоціації у відповідь на ацетилювання в кожному з цих трьох сайтів (K60, K163, K326) [323]. Таким чином, усі наші моделі, як моделювання молекулярної динаміки проведене для організмів людини, так і для *Arabidopsis* були перевірені за допомогою нашої рослинної моделі МТ [323].

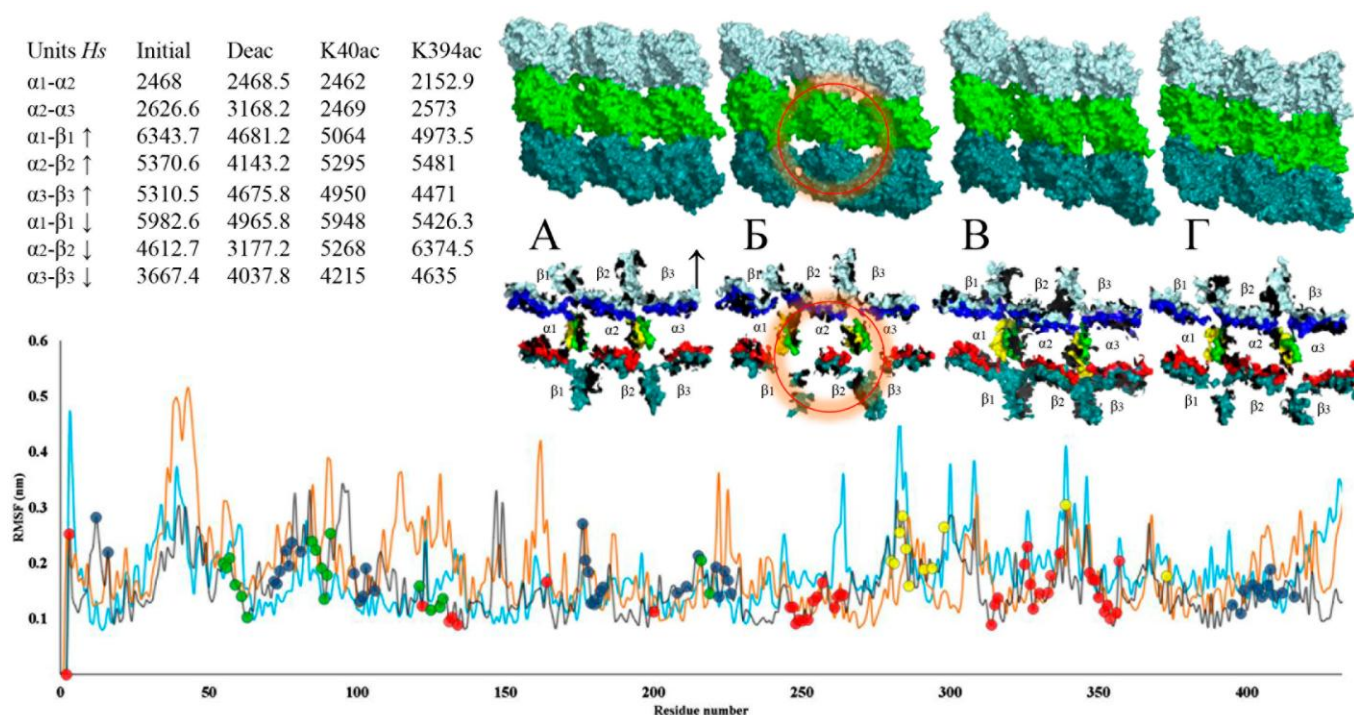


Рис. 6.7. Розраховані площі міжмолекулярних контактів РРІ для різних режимів ацетилювання фрагмента МТ людини. Загальне зображення поверхні (α -тубулін показано зеленим кольором) та візуалізація міжмолекулярних контактів для деацетилюваних, модифікованих K40ac та K394ac комплексів, отриманих після 400 нс МД (А, Б, В та Г, відповідно). Графічне представлення (RMSF) структурних змін у центральній частині, де спостерігається менший "крайовий ефект", деацетилюваного рослинного α -тубуліну та молекул, модифікованих у положеннях K40 (помаранчевий) і K394 (блакитний)

Тут також, оскільки вплив цієї зміни на полімеризацію мікротрубочок раніше було продемонстровано *in vitro*, тому ми досліджували деацетилюваний та ацетилюваний стан K394. K326, розташований у спіралі Н10, на мінус-кінці тубуліну. Ми відтворили взаємодію субодиниць в решітці, демонструючи здатність нашої моделі K394 відповідати за поздовжні взаємодії в межах одного протофіламента. Відомо, що K394 локалізується на зовнішній поверхні та взаємодіє з різними партнерами тубулінів. Раніше дослідження деацетилази HDAC6 виявили ефект мутації в α -тубуліні, яка або імітувала стійке ацетилювання, або блокувала модифікацію в положенні K394. Це впливало на рівень полімеризації мікротрубочок в α -тубуліні ссавців.

І навпаки, ми встановили, що K163 не приймає участі у формуванні ані водневих зв'язків, ані стекінгових взаємодій типу катіон–Рі із оточуючими амінокислотними залишками. У свою чергу, оточений залишками K164 і K166, цей залишок утворює позитивну поверхню на α -тубуліні, необхідну для зв'язування MAP, що також може бути вірним і для γ -тубуліну. Однією з найбільш помітних електростатичних взаємодій для деацетилюваного гетеродимера α/β -тубуліну в положенні K163 є контакт із негативно зарядженим E108 β -тубуліну – він утворює електростатичну взаємодію з позитивно зарядженою областю, що складається із залишків α -тубуліну K163, K164 і K166. Імовірно, ацетилювання в цьому положенні не має сильного впливу на стабільність МТ, тим часом воно може забезпечити важливий ефект на регуляцію асоціації MAP.

Цікаво, що мутації α -тубуліну або в положенні K326, або в мутації K96/K112 у подвійному положенні (петля H3–S4, яка утворює поверхню H3) продемонстрували подібний вплив на швидкість індукованої холодом деполімеризації мікротрубочок, тоді як загальний результат був подібним до змін, спричинених мутацією K394Q або K394R. Ці висновки повністю збігаються з результатами нашого моделювання, оскільки стабільна, навіть більше того, сувора група білків демонструвала нульові зміни в областях взаємодії мономерів (рис. 6.8). При цьому поздовжня і поперечна щільність решітки МТ відображає таку постійність усіх контактів і забезпечує виняткову стабільність усієї мультибілкової системи.

Навіть груба, наближена реконструкція цілих кілець мікротрубочок з решіток тубулінів, що зазнали змін після ацетилювання окремих сайтів, відтворює моделі МТ різної довжини та з різним діаметром пор.

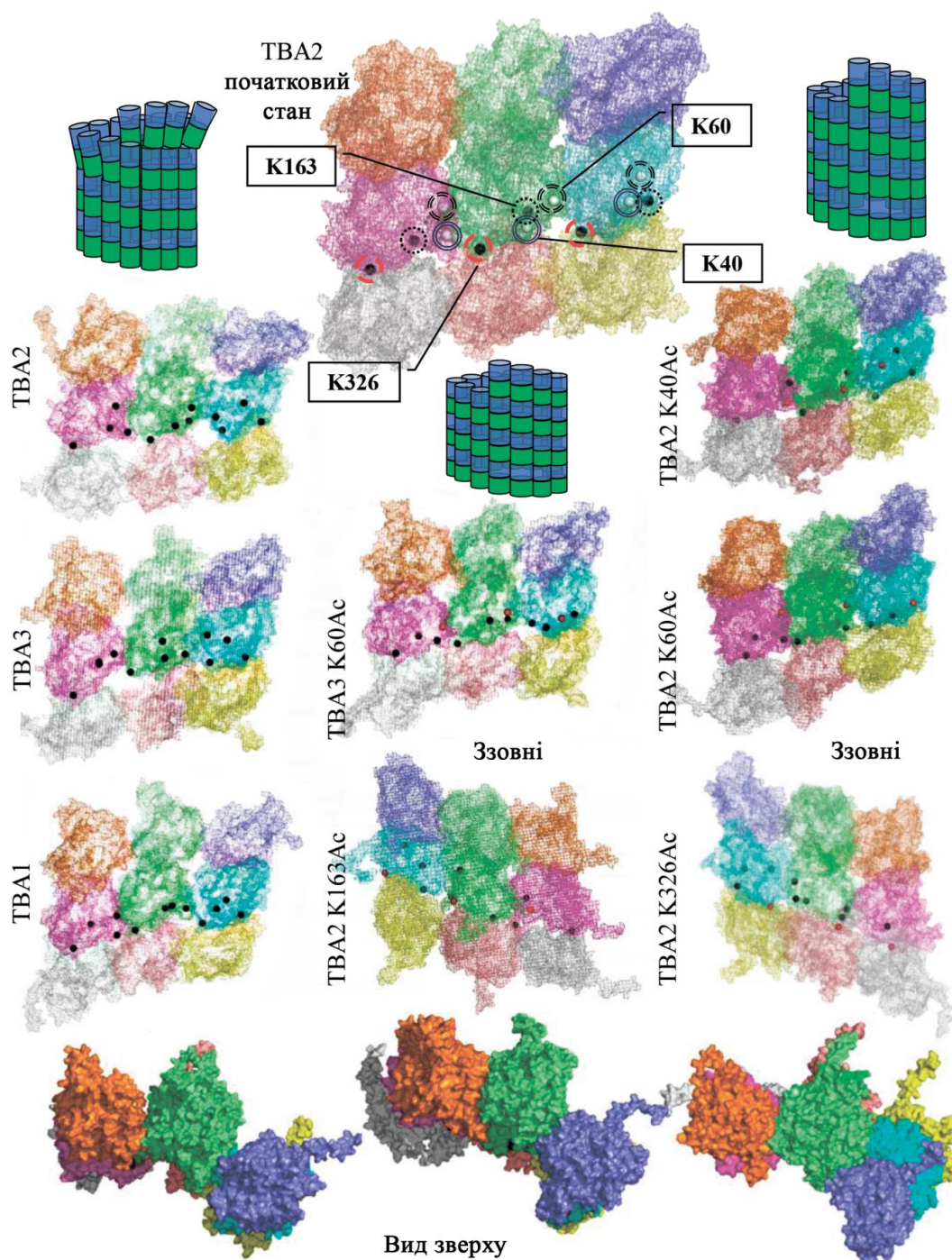


Рис. 6.8 Порівняльна візуалізація різниці між ізотип-специфічними формами решітки α -тубуліну (які зберігали геометрію ансамблю після 100 нс) від довготривалих траєкторій

Ацетилювання запускає локальне ремоделювання петлі α K40, що сприяє росту стабільності у повздовньому напрямку шляхом послаблення бічних

контактів. На даний момент немає припущень, як ацетилювання викликає ефект у випадках K60 і K163, а саме, які структурні препозиції для ефектів.

Наприклад, залишок K60 розташований у точці перетину M-петель α -і β -тубулінів, у K51 від K394, розташованого в петлі H10–S2. Наші попередні дослідження виявили значне витягування протофіламентів у поздовжньому напрямку з деяким ослабленням бічних контактів, коли α -тубулін у K40 був ацетилюваний. Ця модифікація змінює структуру петлі α K40 α -тубуліну, що опосередковано порушує взаємодію K60 з H283 з α -тубулінами сусідніх тубулінових ниток. Вона викликає зсув у структурі α -тубулінової петлі α K40 і подальше зв'язування Lys60 з His283 з α -тубулінів сусідніх тубулінових ниток. Утримуючи K40 біля M-петлі сусіднього α -мономера, він може підтримувати петлю H10–S2, створюючи епітоп для латеральній взаємодії з K60 і H283.

Цікаво, що обидві пари амінокислот K60–H283 є висококонсервативними в послідовності α -тубуліну та можуть забезпечити жорсткість філамента. У результаті всіх цих кроків ми спостерігали вигин поверхні решітки мікротрубочок. Нами було проведено ряд симуляцій молекулярної динаміки, щоб вивчити поведінку ізоформ TBA1, TBA2 і TBA3 (для них характерний різний набір сайтів ацетилювання) у відповідь на введення різних варіантів ацетилювання (досліджувані залишки K60, K163, K326). У верхній частині Рис. 6.8 показано усереднене представлення структури, яке відображає загальну конформацію ансамблів, що включають різні ізотипи α -тубуліну та відповідні сайти ацетилювання [323]. Також у дослідження [323], була включений ізотип TBA1, який не містить Lys в позиції 40, ні в позиції 60. Багатобілкова модель із рядом молекул TBA1 була релаксована за тим же протоколом.

Результати аналізу траєкторії засвідчили дуже низький рівень стабільності решітки, і ближче до кінця симуляції МД ми спостерігали дисоціацію β -тубулінів сусідніх димерів. Це було навіть помітніше, ніж результат нашого попереднього дослідження ансамблю на основі TBA2. Подібно до моделі TBA2, моделювання системи на основі TBA3 продемонструвало вертикальне (повздовжнє) розширення проміжків між

протомерами. Однак ацетилювання K60Ac тубуліну збільшило загальну стабільність без фізичного подовження решітки, досягнутого скручуванням. Звідси ми припускаємо, що ацетилювання, спрямоване або на амінокислоти K40, або на K60, може запобігти взаємодії між ароматичними залишками: H283 в α -тубуліні та Y283 в β -тубуліні (петлі H2–S3 і H10–S2), взаємодіючи з Y282 сусіднього α -тубуліну, що призводить до сильнішої латеральної взаємодії.

Нарешті, механізм залежної від ацетилювання стабілізації мікротрубочок може мати подібні особливості у всіх ізотипах тубуліну з існуючими сайтами ацетилювання в петлі H2–S3. Загалом, ацетилювання цих трьох залишків K60, K163, K326 викликає подовження структури МТ та підвищує її жорсткість і, отже, можливість взаємодії MAP із сильною стабільною поверхнею мікротрубочки. Зростаюча можливість взаємодії з мікротрубочками є критичною для білків аутофагії. За результатами проведеного аналізу можна зробити узагальнюючі висновки щодо подібності просторового розташування ключових амінокислотних залишків та впливу ацетилювання цих амінокислот в молекулі тубуліну на структуру мікротрубочок тваринного та рослинного походження. Визначено, які ділянки на поверхні α -тубулінів зазнають найбільших змін та як це впливає на взаємодії у ряду мономерів. Так, ми змогли визначити, що ацетилювання розглянутих залишків α -тубуліну може змінювати ступінь компактизації окремого α -тубуліну, але не має істотного впливу на його вторинні структури та процеси утворення гетеродимерів. А межах цілого фрагменту нами продемонстровано найменшу стабільність для ізоформи TBA1, яка не містить Lys в 40, ні в 60 позиції порівняно із найбільш стабільним ізотипом TBA2.

Висновки до розділу 6:

1. Результати дослідження впливу ацетилювання ключових амінокислотних залишків α -тубуліну рослин, а, саме, залишків K40, K60, K112, K163, K326 і K394 на формування та стабільність мікротрубочок свідчать про

те, що ацетилювання розглянутих залишків може змінювати ступінь згортання білка, але не має істотного впливу на його вторинну структуру та процеси утворення α/β -гетеродимерів тубуліну.

2. Ацетилювання залишку K60 в динаміці фрагменту мікротрубочки посилює бічні контакти між α -тубулінами, а така ж модифікація залишку K40 впливає на щільність контактів у повздовжньому напрямку, що вказує на важливість цієї посттрансляційної модифікації для стабілізації мікротрубочки. В свою чергу, ацетилювання залишків K112, K394, K163 і K326 α -тубуліну призводить до подовження структури мікротрубочок, підвищує їх жорсткість та, ймовірно, посилює вірогідність взаємодії білків, асоційованих з мікротрубочками, із стабілізованою поверхнею такої мікротрубочки.

3. Результати обрахунку молекулярної динаміки комплексів білку ATG8 з α -тубуліном свідчать про те, що ацетильована форма залишку K40 α -тубуліну в комплексі з білком ATG8 є значно стабільнішою, ніж аналогічний комплекс білку ATG8 з немодифікованим за цим залишком α -тубуліном.

4. Результати аналізу ізотипів α -тубуліну рослинного походження за допомогою методів *in silico* засвідчили, що найнестабільнішим з трьох досліджених є ізотип TBA1, який не містить залишків лізину ні в 40, ні в 60 положеннях, а найбільш стабільним є ізотип TBA2.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікації:

Rayevsky A, **Bulgakov E**, Sharifi M, Samofalova D, Ozheredov D, Karpov P, Pantano S, Blume Ya. *In silico* induced effect of N- ϵ -lysine acetylation on microtubule stability and subsequent interaction of microtubule-associated proteins. Cell Biol Int. 2023;47(9):1547–57. DOI: 10.1002/cbin.12052. (Scopus/WoS, **Q2**)

Публікація, що додатково висвітлюють результати дослідження:

Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume R, Novozhylov D, Stykhylias M, Ozheredov S, et al. Lysine Acetylation of Plant α -Tubulins: Scaling Up the Local Effect to Large

System Transformations. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2025 Jun 4. DOI: 10.1002/prot.26846 Epub ahead of print. (Scopus/WoS, **Q1**)

РОЗДІЛ 7

РОЛЬ ATG8 ТА ВПЛИВ ЙОГО МОДИФІКАЦІЙ (АЦЕТИЛЮВАННЯ, ЛІПІДУВАННЯ) НА ВЗАЄМОДІЮ З ТУБУЛІНОМ У ПРОЦЕСАХ АУТОФАГІЇ

Раніше було досліджено вплив зовнішніх абіотичних чинників (а саме, солі, осмотичного тиску, депривації сахарози та ультрафіолетового випромінювання) на процес індукції аутофагії, який виявляє кореляцію зі збільшенням рівня ацетилювання α -тубуліну у *A. thaliana* [332]. У дослідженні [333], було проведено транскрипційний аналіз коекспресії генів α -тубуліну та *atg8* за дії стресових факторів у проростках *A. thaliana*. Такий аналіз було проведено з метою дослідження взаємозв'язку між мікротрубочками та аутофагією, оскільки вивчення взаємозв'язку між ними має суттєве наукове та практичне значення. Раніше було встановлено, що експресія певних генів α -тубуліну залежить від конкретного стресового фактора. Виявлено, що білок ATG8 як структурний елемент аутофагії безпосередньо залучений до процесу стрес-індукованої аутофагії в клітині. Проведений транскриптомний аналіз підтверджує розвиток аутофагії за цих експериментальних умов, що дозволяє припустити, що вищезгадані гени *atg8* специфічно залучені до стрес-індукованої аутофагії. Однак отримані транскрипційні профілі генів α -тубуліну та *atg8* опосередковано вказують на існування взаємозв'язку між мікротрубочками та аутофагосомами. Зокрема, спостерігали коекспресію генів *tua1* та *atg8e* за умов голодування, *tua3* та *atg8f*—за умов сольового стресу, а також *tua3* та *atg8f*, а також *atg8e* за умов осмотичного стресу.

Убіквітин-подібний білок ATG8, який може бути оброблений цистеїновою протеазою ATG4, що призводить до оголення С-кінцевого гліцину, та ATG8, що дозволяє його рекрутувати до фагофору через приєднання фосфоліпиду—фосфатидилетаноламіну є центральним для аутофагії. У *A. thaliana* білки ATG8 кодуються 9 генами, об'єднаними у 3 кластери на

основі вирівнювання амінокислотних послідовностей [334, 335]. Перший кластер охоплює чотири представники (ATG8A, ATG8C, ATG8D і ATG8F), другий—три (ATG8B, ATG8E і ATG8G), а третій—лише два (ATG8H і ATG8I) [48]. Наявність членів групи ATG8h–i не є строго асоційованою із загальною кількістю гомологів ATG8 у кожного виду [334, 335]. Транскрипційна регуляція генів ATG8 рослин може впливати на процес аутофагії. ATG8a, ATG8b і ATG8h продемонстрували більшу експресію, ніж ATG8d, ATG8e і ATGi, в той час як експресія інших генів суттєво не змінювалась в умовах цукрового голодування та осмотичного стресу [334].

7.1. Оцінка селективності ізотипів ATG8 відносно білків адаптерів та рецепторів

Змодельовані за гомологією або *ab initio* структури представляють статичний стан макромолекули і, зазвичай, цей стан є помірно енергетично вигідним. У водному середовищі, за присутності іонної сили, температурних ефектів та коливання самих молекул розчинника відбувається релаксація молекули, що може супроводжуватись значними перебудовами. Це стосується навіть закристалізованих білкових структур. Присутність інших білкових молекул також може спричинити конформаційні переходи, ступінь яких вже залежить не від амінокислотного складу сайтів зв'язування, а від складу всередині глобули. Розмір та архітектура молекули ATG8 не передбачає масштабних зсувів, проте ми розраховували виявити певні відмінності у формі або фізико–хімічних властивостях сайтів зв'язування [301].

Підібравши панель послідовностей (UniprotKB: Q8LEM4, Q9XEB5, Q8S927, Q9SL04, Q8VYK7, Q8S926, Q8S925, Q9LRP7) ми послідовно отримали всі необхідні структури з бази даних реконструйованих моделей та підготували їх для подальшої релаксації і дослідження міжбілкових взаємодій. Відповідно до розміру білкової молекули та жорсткого каркасу, нами було визначено оптимальний час для симуляції (400 нс), що дозволив досягти рівноважного

стану для білкової структури. Аналіз траєкторії молекулярної динаміки кожного ізо типу ATG8 проводили за допомогою кластеризації на основі показників RMSD (середньо-квадратичного відхилення) для C α атомів відносно початкових координат. Отримані кластери та, відповідно, розмір кожного з них відповідають різним за часом стабільним конформаціям білка. При цьому показовим є аналіз структури саме ділянок LDS та UBA (або UDS, убіквітин-зв'язуючий сайт), а не всього білка. Таким чином, ми могли порівнювати умовну рухливість вторинних структур за кількістю отриманих кластерів, рівномірністю їх розподілу між собою (рис. 7.1).

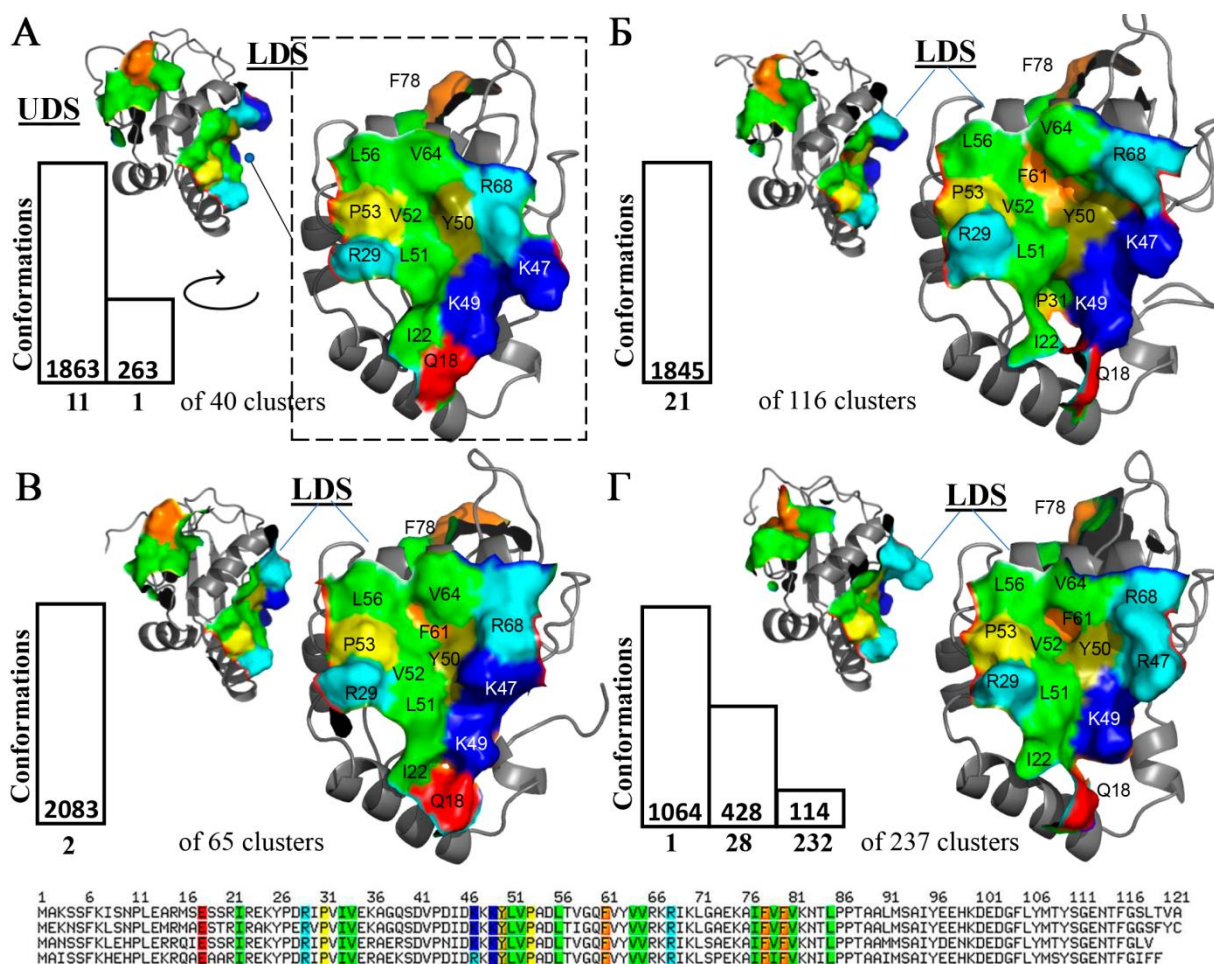


Рис. 7.1 Конформації сайтів зв'язування LDS, отримані за допомогою методу МД (ізотипи ATG8a–d позначені літерами А–Г, відповідно). Продемонстровані найбільш часті конформації LDS відповідно до конформаційного розподілу по відповідних траєкторіях і кількості кадрів у

найвищих кластерах на основі RMSD. Поверхню відображено із застосуванням кольорової схеми із врахуванням властивостей залишків (згрупованих відповідно до значень pK_a та зарядів їхніх бічних ланцюгів)

Так, LDS ATG8a представлений найбільшим кластером з 1863 зрізів (загальна кількість кадрів на траєкторію становила 2500), що має подібне розташування атомів S_α та бічних ланцюгів, які утворюють сайт. Інший кластер представлений лише 263 екземплярами, і LDS обох структур центроїда з цих двох кластерів дещо відрізняються. Загальна кількість кластерів на траєкторію також служить для оцінки стабільності конформації сайту зв'язування. З них найбільш стабільну форму LDS сайтів зв'язування було показано для ATG8a, ATG8c і ATG8f.

У кожному випадку сімейства ATG8 ми вибирали тільки ті кластери, які містили більше 100 кадрів траєкторії. Ми також використовували інформацію про розподіл конформацій з кластера–лідера в межах фреймів від молекулярної траєкторії. Загалом, конформаційна кластеризація, сфокусована на ділянці сайту зв'язування, дозволила встановити існування синглетного домінуючого кластера, що покриває всю траєкторію. Це означає, що кожна центроїдна структура з кластера–лідера відображає загальну конформаційну стабільність досліджуваної області ізотипів по всій МД. Виходячи з цього, ми використали результати кожної симуляції для представлення амінокислотного складу і залежної від структури поверхні сайту зв'язування. Взагалі, математичний аналіз розподілу є досить цікавим і надалі буде залучений в інших проектах. Тут ми представили лише дані розрпховані для ATG8a. Спочатку ми застосували порогове значення = 0,05, 0,06, 0,07 нм для аналізу траєкторії (а саме ATG8a, ATG8e, ATG8i) та отримали 2149–2222 кластери (Linkage, Джарвіс–Патрік або JP). Застосування порогового значення = 0,08, 0,09, 0,1 нм дало, використовуючи метод Linkage – 1513, 492, 40, тоді як метод JP призвів до формування 2176, 1493, 492 кластерів, відповідно. Алгоритми Монте–Карло/Діагоналізація взагалі виявилися незначущими для оцінки.

За зменшенням кількості кластерів (для Linkage) в діапазоні порогових значень 0,09–0,1 ми спробували дослідити простір між піками 40 та 492 кластерів:

- Порогове значення = 0,093, 0,096, 0,098 нм дало, використовуючи метод зв'язування – 221, 109, 74
- Порогове значення = 0,11, 0,13–0,21 нм дало, використовуючи метод JP – 239, 210

Потім ми обробили результати кластеризації методом Linkage (0,07, 0,08, 0,09, 0,093, 0,096, 0,098, 0,1) та отримали абсолютно невідповідні бали Silhouette score (–0,029, –0,215, –0,696, –0,789, –0,825, –0,840, –0,855)

- Надмірна гранулярність: Малі граничні значення (0,05–0,07 нм) генерували понад 2000 кластерів, що відображали шумові ефекти розподілу, а не конкретні біологічні конформації (Silhouette score $\approx$ –0,03).

- Надмірна агрегація: Більші граничні значення (0,1 нм) руйнували значущі відмінності, що призводило до домінантних, але артефактних кластерів (Silhouette score $\approx$ –0,8).

Хоча жоден метод кластеризації не ідеально розрізняє високогнучкі поверхні, наш підхід надавав пріоритет відтворюваності домінантного алгоритму Linkage.

Слід наголосити, що кластеризація мала на меті визначити термодинамічно стабільні стани для докінгу, а не вичерпне розрізнення підстанів. Зрештою, результатом є успішне прогнозування поз зв'язування LIR (підтверджене подальшим MD). Найбільший кластер (83,4% кадрів) представляв консервативний алгоритм Linkage, що спостерігається у >80% траєкторії. Центроїдні структури мали спільні ключові взаємодії, що спостерігаються в кристалічних комплексах (наприклад, гідрофобне пакування LIR). У свою чергу, JP показав, що, незважаючи на збалансовані показники алгоритму Джині (0,32–0,75), вони призвели до надмірної кількості кластерів з одним кадром (наприклад, 1420/1493 при граничному значенні = 0,09 нм), що

приховувало біологічно значущі стани. Його слід використовувати як міру нерівномірного розподілу конформацій незалежно від значень RMSD.

Результати траєкторного аналізу із залученням алгоритмів кластеризації дозволили отримати стабільні конформації та засвідчили, що в молекулах ATG8a, ATG8b, ATG8d, ATG8h та ATG8i чітко окреслені дві каверни (HP1 та HP2), необхідні для взаємодії з відомими AIM. Крім того, ці білки характеризуються спільною формою LDS збоку, що утворює щось на зразок щілини. У той же час, ATG8c, ATG8e та ATG8g мають ще одну спільну форму інтерфейсного профілю (рис. 7.1). За наведених зображень видно, що за однакових умов, незважаючи на схожість послідовностей, сайт зв'язування може набувати різної конформації, що, ймовірно, може впливати на особливості білок–білкових взаємодій. Одним з найважливіших висновків є те, що доступність певних амінокислотних залишків (наприклад, HP1 і HP2, кривизна поверхні) LDS–сайту змінюється при порівнянні ізотипів ATG8a–ATG8d (рис. 7.2).

Ми проаналізували ATG8 на стабільність вторинної структури та формування петель під час симуляції за допомогою графіку середньоквадратичної флуктуації (RMSF) [301], щоб зрозуміти, яка частина ATG8 і з якого ізотипу є менш стабільною (рис. 7.2). Після огляду літератури стало зрозумілим, що білки, які належать до гомологічної групи ATG8, виявляють перевагу у зв'язуванні певних партнерів. В результаті ми обрали три модельні білки для вивчення взаємодії LDS/LIR (LDS/AIM), які були розділені на три групи на основі результатів вирівнювання послідовностей. Ми обрали ATG8a, ATG8e та ATG8i через частоту посилань у публікаціях та велику кількість експериментальних даних, доступних для них.

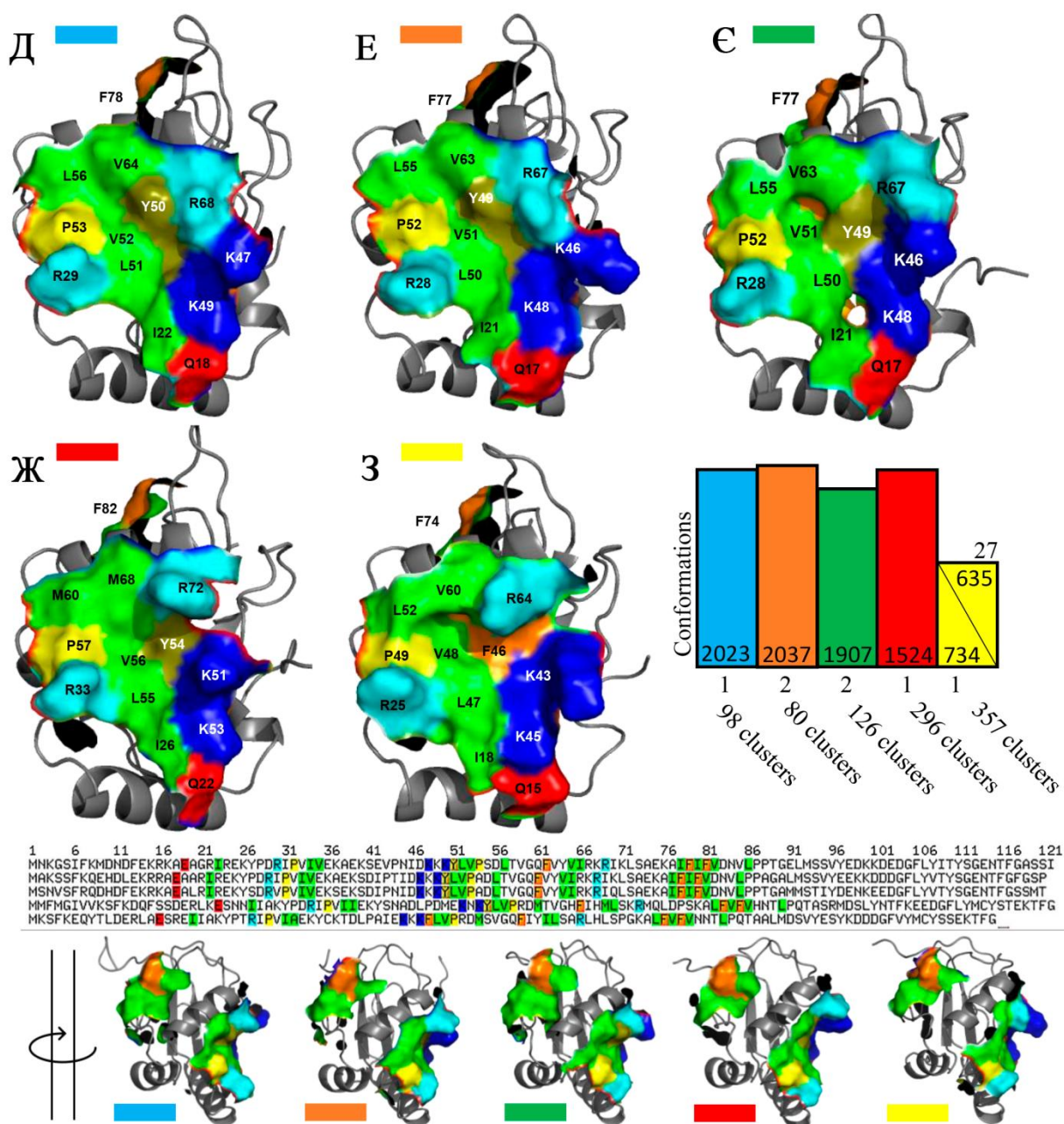


Рис. 7.2 Конформації сайтів зв'язування LDS, отримані за допомогою методу МД (ізотипи ATG8e-і позначені літерами Д-З, відповідно). Продемонстровані найбільш часті конформації LDS відповідно до конформаційного розподілу за відповідними траєкторіями і кількістю кадрів у найвищих кластерах на основі RMSD. Поверхню відображено із застосуванням кольорової схеми з врахуванням властивостей залишків (згрупованих відповідно до значень рКа та зарядів їхніх бічних ланцюгів)

Натомість мотив AIM [79], можна умовно розділити на чотири групи залежно від їхніх функцій та часу появи на початкових стадіях аутофагії. На основі відомої формули послідовності AIM нами було проведено пошук фрагментів партнерів ATG8. Таким чином, знаючи про доведену селективність різних ізотипів ATG8 до певних білкових партнерів, ми спробували оцінити значення конкретних білок–білкових взаємодій. Виходячи з функцій партнерів, певно передбачити, який з ізотипів ATG8 здатний приймати участь у процесі аутофагії та на якій фазі. Додатково ми використали встановлені кристалографічні дані гомологів ATG8 людини та найпростіших для точного визначення докінгових позицій так званих AIM–пептидів. Ці пептиди мають необхідний AIM–патерн (мотив, що канонічно зв'язується з W–та L–сайтами ATG8) та декілька кінцевих залишків для електростатичної взаємодії з негативно зарядженою ділянкою біля LDS–сайту. Після ідентифікації найбільш послідовно присутніх конформацій сайту зв'язування ми провели гнучкий молекулярний докінг пептидів до жорстких структур сайту ATG8s. Як ми і сподівалися, результати докінгу різних варіантів AIM відповідали експериментальним даним [301]. Таблиця значень відображає чіткі переваги взаємодії на основі докінгових позицій, сформованих трьома модельними ізотипами ATG8 та специфічними мотивами (рис. 7.3). Тому ми відібрали 12 найкращих комплексів, виходячи зі значень їхніх оцінювальних функцій та якості взаємодії з гідрофобними кишенями, а потім релаксували їх протягом додаткових 150 нс. У деяких випадках моделювання призводило до утворення щільного міжбілкового контакту або посилення водневих зв'язків. Проте в деяких випадках ми спостерігали повну дисоціацію молекул AIM–пептидів. Ми також відзначили деякі зміни в контурі інтерфейсів взаємодії між ATG8 та його партнерами (особливо на стороні ATG8). Перша група партнерів – SARs, які беруть участь у механізмах аутофагії зв'язування вантажів і можуть взаємодіяти з ATG8 [82, 51]. Зокрема, NBR1 [80] відповідає за відправлення таких поліубіквітинованих агрегатів до аутофагосом, що формуються. Майже всі ізотипи ATG8 містять набір залишків (I22D, Y26E, R29E, K47E, V64D,

R68E), які взаємодіють з так званою убіквітин–асоційованою ділянкою (UBA) NBR1 (660EWDPIIL).

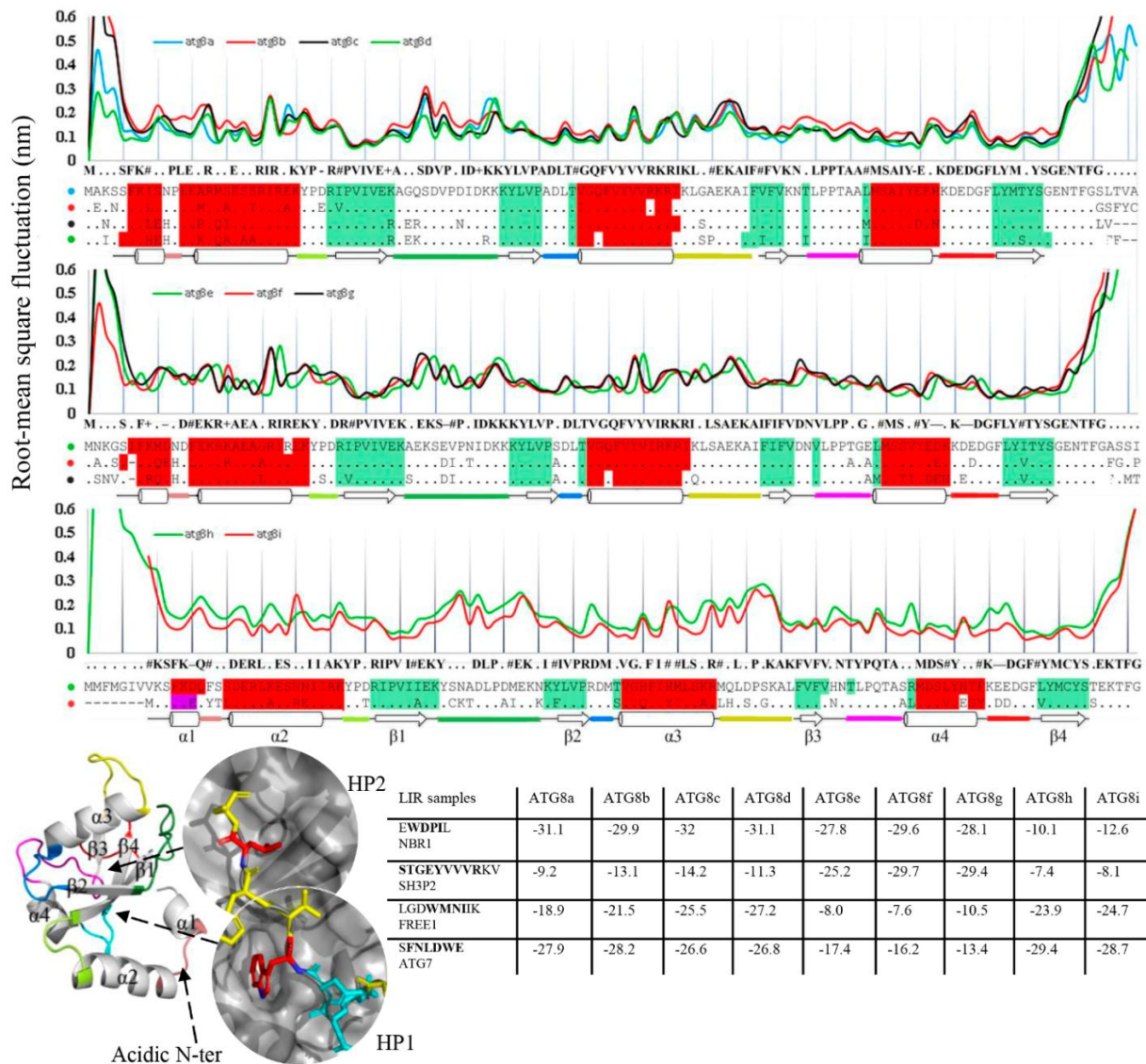


Рис. 7.3 Візуалізація на основі RMSF різного рівня гнучкості, розрахованого для всіх відомих ізотипів ATG8 з *A. thaliana*. α -спіралі та β -шари позначені відповідно до оцінки структури після МД та вирівнювання аналізованих послідовностей. Мультиплікаційне представлення середньостатистичного білка ATG8 з кольоровими невпорядкованими ділянками та позначеними елементами вторинної структури–схема забарвлення подібна для 2D прогнозу та мультиплікаційної моделі. Результати пептид–докінгу представлені в таблиці

Одна з кишень білка ATG8, а саме W-сайт, утворена петлею, що містить Tyr26 і Arg29, між спіраллю-2 і петлею-1. Ця петля може прилипати до AIM-сайту NBR1 залежно від заряду. Цікаво, що AIM-мотив NBR1 (WDPI) дуже схожий на мотив RexRD54 (WEIV), який керує формуванням аутофагосом, зв'язуючи її везикули з аутофагічним компартментом, міченим білком ATG8 [301, 336]. Друга група білків, які взаємодіють з ATG8, представлена сімейством Bin/Amphiphysin/Rvs, члени якого містять як BAR-, так і SSH3-подібні домени (локалізовані на мембрані аутофагосом). Ці білки беруть участь у формуванні фагофора та його закритті під час дозрівання аутофагосом. Білок-адаптер, відомий як SH3P2, відіграє роль у вбудовуванні фагофора в мембрану рослин, але не є необхідним для його руху через процес ендоцитозу. З проаналізованих траєкторій видно (рис. 7.4), що ATG8a та ATG8i майже повністю втратили взаємодію з фрагментом SH3P2 (321STGEYVVVVVRKV). Тоді як ATG8i та SH3P2 повністю дисоціюють після першої половини періоду моделювання. Як ми визначили, взаємодія між V326/Y325 та гідрофобними кишнями зменшується на початку симуляції, але водневі контакти (L51, V52 до Y325; K49, K68 до E324; K49 до S321) з ATG8a зберігаються протягом усього моделювання. Найсильнішу взаємодію показано для комплексу ізотипу ATG8e з SH3P2. Спостерігали як щільне закріплення V320/Y325 в кишнях HP1 і HP2, так і стабільну мережу водневих контактів (L52, V53–V326, V328; E19–Y325; K50–V326, S321). Добре відомо, що ATG8e і ATG8f взаємодіють з SH3P2 під час впливу імітації вуглецю в тестах *in vitro* [337]. Ці результати були опубліковані раніше, і тепер це свідчить про те, що наша модель досить точно відображає наявні дані. Крім того, саме ці два ізотипи, ATG8e та ATG8f, взаємодіють з ATI1 та ATI2, сприяючи деградації ендоплазматичного ретикулуму та формуючи тільця ATI [338, 339]. Особливо слід зауважити, що ATG8e є єдиною моделлю, яка легко дисоціює з наступним пептидом– AIM-мотивом ATG7 (679FNLDWE). ATG7 взаємодіє виключно з С-кінцевим доменом, який необхідний для АТФ-опосередкованої активації С-кінця Gly116

ATG8 (що слугує ферментом E1). Оскільки ATG7 є компонентом третьої аутофагічної групи, яка опосередковує його ліпидування PE, цей комплекс, що складається з ATG1, ATG3, ATG4 і ATG7, ATG8 може безпосередньо регулювати ATG8 при його ліпидуванні PE [82]. Ці взаємодії потенційно можуть індукувати збірку PAS і сприяти аутофагічному обороту, при якому ATG1a транспортується у вакуолю разом з прикрашеними ATG8 аутофагічними клітинами. При цьому відбувається перенесення ATG8 від каталітичного Cys в одному з протомерів ATG7 до ATG3, який зв'язується з N-кінцевим доменом в N-кінцевому домені протилежного протомеру ATG7, комплексованого як субодиниця гомодимеру [82]. У динаміці комплексів ATG7 ми виявили, що ізоформи ATG8a і ATG8i підтримують гідрофобні контакти між HP1/HP2 і W683/L681 (рис. 7.4). Крім того, фрагмент ATG7 утворює міцні водневі зв'язки як з ATG8a (L51 до L681; Y26 до E684; R29, K49 до E684), так і з ATG8i (L49 до L681; Y24 до E684; R27, K47 до E684). Нагадаємо, що ключова взаємодія включає зв'язок між ATG8 і PI3P на аутофагосомах, а тваринний білок, який зв'язується з обома об'єктами, – це FYVE і домен, що містить адаптерні білки 1 (FYCO1), згорнуті в спіраль. FYCO1 належить до четвертої групи [340] адаптерних білків, і на даний момент в *A. thaliana* ідентифіковано до дев'яти гомологів FYCO1. Наше дослідження [301], було зосереджене на FREE1, який селективно взаємодіє з ізоформами ATG8 [341]. Після ліпідизації в мембрані аутофагосоми білки ATG8 запускають взаємодію аутофагосоми з фосфорильованим FREE1, зокрема, через дію KIN10, запускаючи процес закриття аутофагосоми.

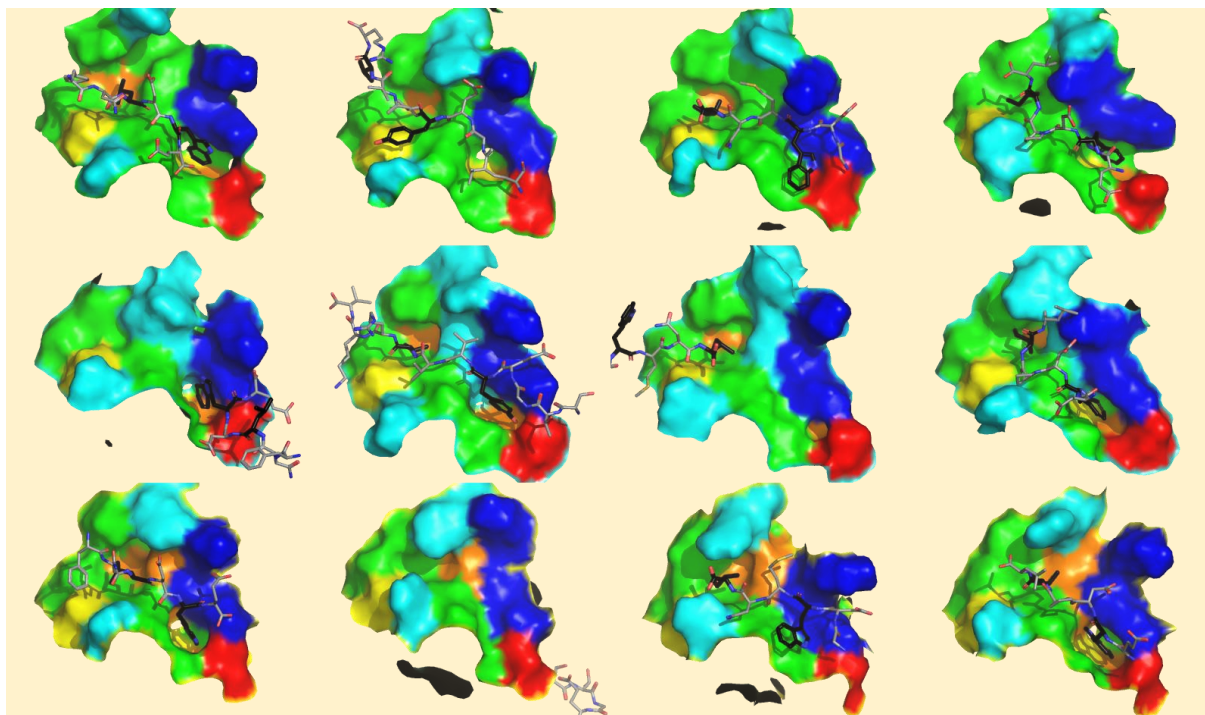


Рис. 7.4 Результати МД-моделювання комплексів ключових ізоформ ATG8 і відповідних рецепторів/адаптерів представлено у вигляді таблиці. Три найбільш вивчені ATG8 ізотипи формують комплекси із чотирма AIM-пептидами з відомою селективністю до окремих ізотипів. За допомогою комбінації представлення у вигляді поверхні ATG8 та скелетів AIM-пептидів показано найстабільніші комплекси та ті, що мають тенденцію до дисоціації після 100 нс МД (ATG8a-SH3P2; ATG8e-ATG7, ATG8e-FREE1; ATG8i-SH3P2)

ATG8a та ATG8i послідовно утримують обидві амінокислоти (I441/W438) фрагмента FREE1 (436GDWMNIK) разом у карманах HP1/HP2. Виявлено, що воднева мережа між амінокислотами фрагмента є більш стабільною в ATG8i (R27-I441, N440; L49, R66-N440; K45, K47, E16-G436) порівняно з ATG8a (L51-M439, I441; K49-M439, G436; E18-W438; K47-D437). Транскрипційна регуляція генів ATG8 рослин може впливати на процес аутофагії. ATG8a, ATG8b і ATG8h продемонстрували вищі рівні експресії, ніж ATG8d, ATG8e і ATGi, в той час як експресія інших генів суттєво не змінювалась в умовах цукрового голодування та осмотичного стресу [334]. Також показано, що ізотип

ATG8b є суттєво важливим для проростання насіння *A. thaliana* [342]. Важливо, що поверхня ATG8 є відносно плоскою і не має чітко виражених особливостей, за винятком жолобка, в який вписується комплементарний амінокислотний ланцюг. Крім того, подібно до взаємодії ATG8 з мікротрубочками, збагачена Arg/Lys ділянка на поверхні ініціює розпізнавання білка–партнера.

Таким чином, зв'язування пептиду призводить до зміни інтерфейсу ATG8, який намагається обернути пептид з найвищою афінністю. Крім того, важливим аспектом є взаємодія між гідрофобними елементами та набором водневих зв'язків між білком і фрагментами адаптера/рецептора. Розпізнавання відбувається завдяки швидкій взаємодії електронегативних амінокислот поблизу LIR–сайту з кластером позитивно заряджених залишків. Далі відбувається просторове впізнавання пептиду шляхом занурення гідрофобних амінокислот у кишені HP1/HP2, що супроводжується утворенням водневих зв'язків. Навіть при незначній розбіжності в розташуванні амінокислот частина пептиду може дисоціювати з поверхнею ATG8 і утримуватися на місці лише одним із закріплених гідрофобних залишків і прилеглими водневими зв'язками.

7.2. Сайти ацетилювання на поверхні молекул тубуліну. Ідентифікація та перевірка можливості зв'язування ATG8

Результати експериментальних досліджень [343], свідчать про тканино–специфічне ацетилювання α –тубуліну як адаптивної відповіді на дію стресових чинників у клітинах *A. thaliana*. З'ясовано, що посттрансляційне ацетилювання забезпечує посилену взаємодію α –тубуліну з білком ATG8, як важливого фактора в залученні мікротрубочок до розвитку аутофагії. Вся додаткова інформація, що стосується особливостей взаємодії білка ATG8 з α –тубуліном, була отримана за результатами аналізу фолдингу білка ATG8 [297, 344].

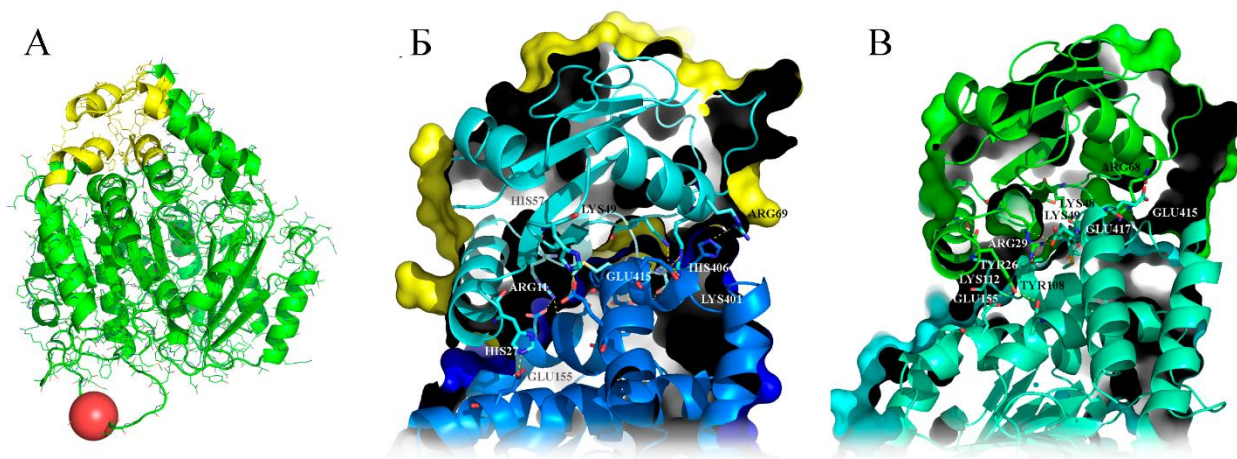


Рис. 7.5 Передбачена тривимірна модель білок–білкової взаємодії α -тубуліну з аутофагічними білками LC3/ATG8. Структури молекули α -тубуліну із запропонованим сайтом зв'язування MAP (жовтий) та сайтом його ацетилювання (відмічено кулею) представлено у вигляді поверхні та стрічок (А). Білок LC3/ATG8 (позначений жовтим/зеленим кольором) приєднаний до епітопу тубуліну людини/рослин (Б і В) (темно-сині/блакитні стрічки)

Результати PPI докінгу LC3/ATG8 білків та α -тубуліну демонструють відповідність поверхневих профілів сайту зв'язування MAP та ділянки, сформованої N-кінцем аутофагічних білків (рис. 7.5).

Припущення, викладені вище, узгоджуються з обчислювальними прогнозами, з даними онлайн-серверів (наприклад, прогнозами PPI та MetaPPI), а також з літературними даними [237, 327]. Слідом за встановленням факту, що структура ацетильованого α -тубуліну зазнає змін, молекула білка ATG8 за допомогою симуляції молекулярної динаміки була докована на поверхню молекули тубуліну в початковому та фінальному/стабільному, станах, як це зображено на рис. 7.5. Незважаючи на просторову подібність між ацетильованою та деацетильованою формами α -тубуліну (визначену за допомогою моделювання молекулярної динаміки), виявлено, що лише один комплекс ATG8 з немодифікованим α -тубуліном демонстрував значення функції докінгу, подібні до значень функції докінгу комплексів Lys40Ac. Тому для з'ясування функціонального значення процесу ацетилювання у взаємодії

ATG8/ α -тубуліну проведено обидва моделювання в 500 нс симуляції (K40 та K40Ac форми α -тубуліну). Для підтвердження гіпотези про те, що ацетилювання є важливою передумовою зв'язування ATG8, ми замінили K40Ac на Lys40. Таким чином ми прагнули відстежити будь-яку тенденцію до дисоціації ATG8 від немодифікованого α -тубуліну. Отримані розрахунки молекулярної динаміки комплексу у водному середовищі виявили вищу стабільність і міцність електростатичних взаємодій між білками в комплексі з ацетильованим α -тубуліном (рис. 7.6). Отримані результати дослідження водневих зв'язків, що утворюються між двома білковими інтерфейсами, свідчать про те, що їхня кількість залишалася постійною протягом усієї молекулярної динаміки, за винятком білка з ацетильованим Lys40 (Lys112–Ala14, Tyr108–Arg29, Gly410–Lys48, Glu411–Lys49, Ser193–Tyr26, Glu155–Tyr26, Met413–Arg68, Glu415–Arg68, Glu417–Arg29). І навпаки, в контексті комплексу Lys40- α -тубулін/ATG8 вищезгадані пари взаємодіючих залишків зазнали послідовної елімінації, що призвело до повного розриву контакту.

Застосовуючи структурний аналіз цих траєкторій, було виявлено загальні тенденції у формуванні α -спіралі у відповідь на обмеження ацетильної групи та горизонтальну орієнтацію N-кінцевої спіралі білкової молекули ATG8 (рис. 7.6). На електростатичній карті поверхні обох структур, що відображають стани тубуліну (Lys40/Lys40Ac), не виявлено критичних змін. Однак показано, що позитивно заряджена N-кінцева спіраль ATG8 відштовхує молекулу тубуліну протягом 120 нс. Наступні етапи симуляції показали чіткі передумови для дисоціації молекули білка ATG8 від молекули Lys40 α -тубуліну після моделювання молекулярної динаміки протягом 510 нс. В цілому, повної дисоціації не очікувалося, оскільки при стикуванні не виявилось можливим отримати комплекс білка ATG8 з релаксованим неацетильованим тубуліном.

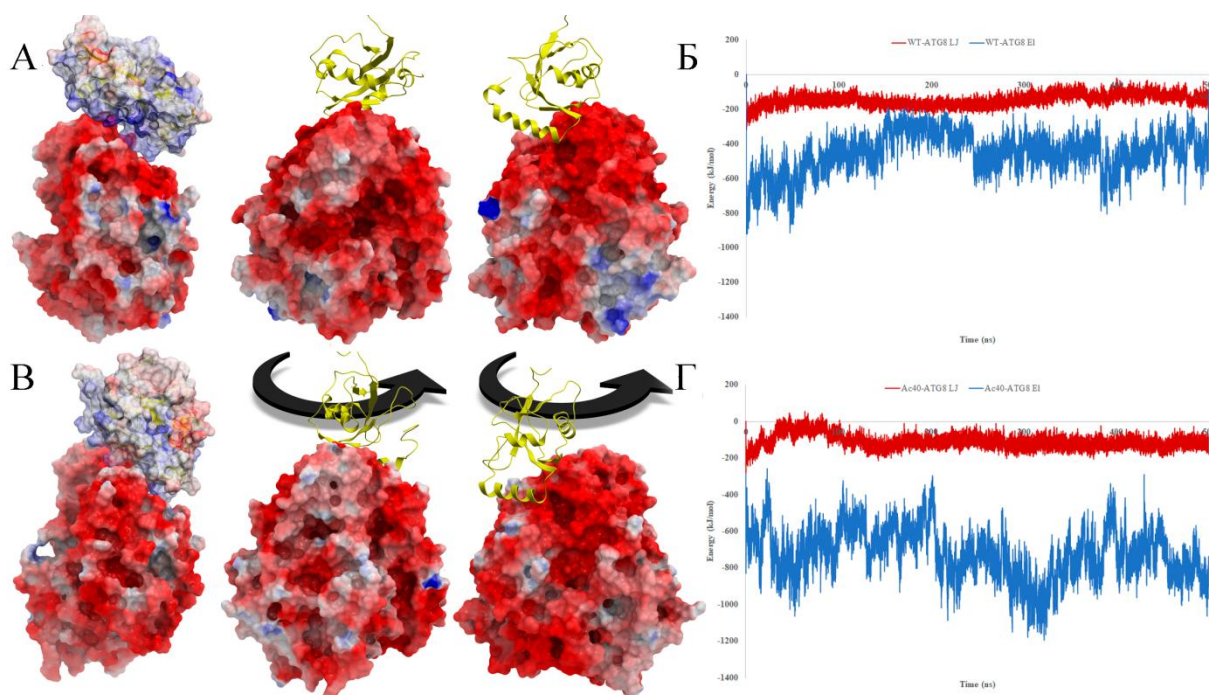


Рис. 7.6 Проекції комплексів тубуліну та білку ATG8 під час 250 нс моделювання молекулярної динаміки із згенерованою електростатичною поверхнею. Деацетильований Lys40- α -тубулін утворює щільні контакти з поверхнею ATG8 (А), а графік електростатичної та Ван-дер-Ваальсової енергій описує поведінку системи в динаміці (Б). Комплекс Lys40Ac- α -тубулін/ATG8 та енергії його взаємодії (В і Г)

Додатково окреслено гіпотетичну систему, оскільки за результатами докінгу встановлено, що утворення комплексу аутофагічного білка з немодифікованим α -тубуліном є суттєво менш вірогідним. Серед розглянутих факторів єдиним переконливим поясненням такої поведінки комплексу є флуктуації розміру білка Lys40- α -тубуліну в трьох вимірах, зокрема, на бічній і передній поверхнях, які, як видається, не беруть участі ні в димеризації тубуліну, ні в полімеризації ланцюга. Для дослідження впливу ацетилювання на асоціацію МТ-МАР ми підготували моделі докінгу білок-білок, використовуючи результати, описані вище. Ми ретельно перевірили особливості зв'язування LC3 (гомолога ATG8 в клітинах людини) на поверхні тубуліну, сам факт існування комплексів до того був експериментально

доведений та не супроводжувався детальною інформацією [204]. Виходячи з цього, ми планували визначити механістичні передумови структурних змін всієї МТ (рис. 7.7) [345].

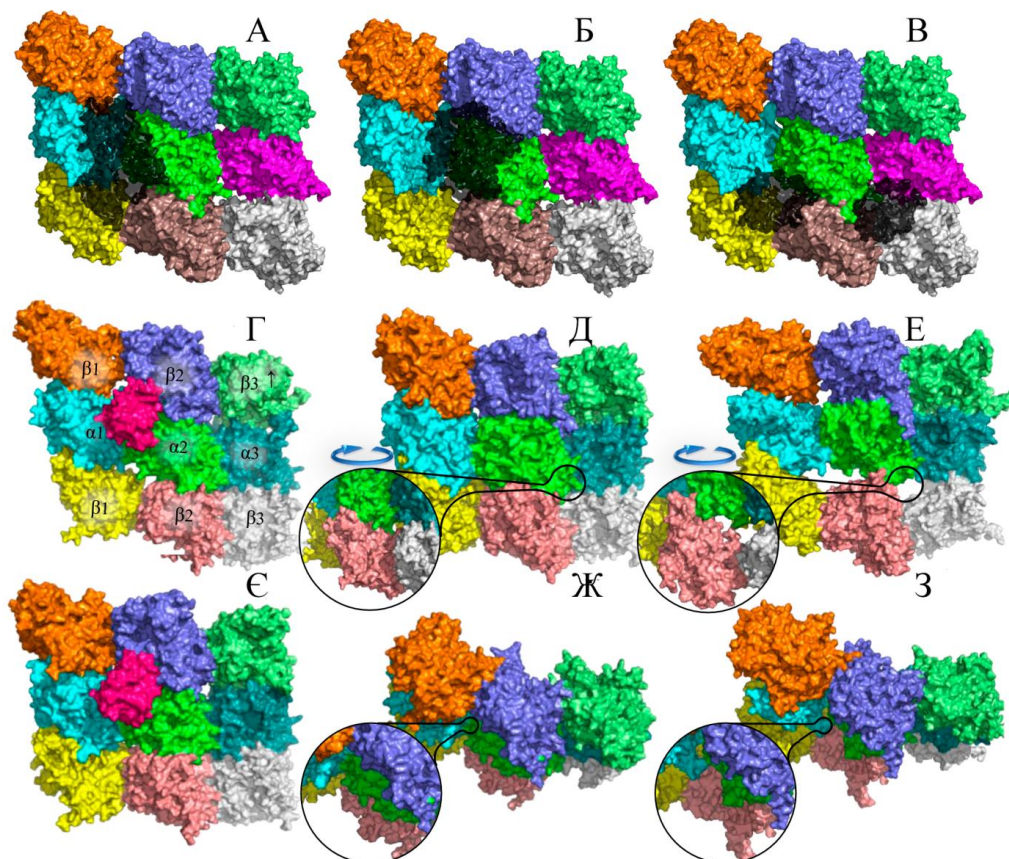


Рис. 7.7 Просторова суперпозиція фрагментів мікротрубочок людини, ко-кристалізованих у комплексі з набором позитивно заряджених MAP в області негативно зарядженого С-кінця тубуліну (PDBID: 5KX3, 6ZPI, 3JAK). На рисунку представлені тирозинлігази тубуліну (А), кінезиноподібний білок (Б) і білки EB3 (В). Аналогічно, молекула ATG8 (пурпурного кольору) щільно взаємодіє з релаксованим фрагментом рослинної МТ, що містить ацетильовані залишки K40 і K394 α -тубуліну (Г і Д, відповідно). Фронтальне та вертикальне зображення початкового стану (Е, Є) та кінцевого (стабільні), релаксованого (Ж, З) фрагмента МТ з деацетильованим α -тубуліном (нестабільні)

Набір кінцевих залишків Arg з ATG8, подібний до критичних амінокислот з LC3, було використано для обмеження AIRs у моделі HADDOCK PPI. У свою чергу, на основі наших попередніх досліджень було обрано C-кінцеві залишки α -тубуліну, як епітопну мітку для зв'язування ATG8 з ансамблем з *A. thaliana* [262]. Результати докінгу PPI виявили точний збіг профілів поверхні для ацетильованих систем, як нещодавно було показано для ацетилтрансферази α -тубуліну (рис. 7.7) [215, 346, 347]. У випадку деформованої деацетильованої системи результати докінгу вихідних комплексів не засвідчили достатньо близького розташування молекули ATG8 на поверхні МТ. Для цього ми зібрали фрагмент рослинної мікротрубочки, що складається з дев'яти тубулінів, і використали його як модельний об'єкт разом з існуючим комплексом людини [297, 215, 348]. Потім білкові комплекси людина-рослина, триплети тубулінів, зібрані в решітчасту клітину, були змодельовані протягом 1 мкс за допомогою грубозернистого силового поля.

Проаналізовано чіткі деформації поверхні взаємодії MAP, а також міжмолекулярних контактів. Початкові координати були використані для дослідження структурного сценарію, в якому пов'язаний з ATG8 міг взаємодіяти з фрагментом МТ. Описані вище результати докінгу свідчать про можливість взаємодії ATG8 з уже ацетильованим тубуліном. Окрім того, вважаємо, що при такому характері взаємодії зберігається доступним сайт UBA, який може взаємодіяти з білками-ортологами FYCO1 рослинного походження, наприклад FYWE/FREE.

7.3. Дослідження ефектів від модифікацій ATG8 на взаємодію із мішенями–аутофагічними рецепторами та адаптерами

Особливість ATG8 полягає в тому, що він задіяний у багатьох процесах, що відбуваються в абсолютно різних середовищах, тому і його білкові партнери різні. Основна причиною є структурні характеристики, полярність однієї сторони та гідрофобність. Так, специфічна вставка β -ізотипу є

посттрансляційно модифікованою областю в ATG16L1 і включає підтверджений сайт фосфорилування для ULK1 на S278. ATG4В взаємодіє з білками ATG8 через його каталітичне ядро (CC) і N-кінцеву та C-кінцеву LC3-взаємодіючу область (LIR).

За результатами молекулярної динаміки можна зазначити, що жодна з мутацій не впливає на структуру білка. Проте, Tyr49 і Leu50 розташовані у функціональному домені ATG8, і їх заміна на гідрофобні залишки може покращити взаємодію з мембраною (збільшують ймовірність кластеризації ліпосом). Навпаки, заміна дуже полярних чи сильно гідрофобних амінокислот на Ala (F104A, Y106A та R65A) сильно погіршують силу зв'язування з мембраною. Це можна побачити за результатами моделювання методом молекулярної динаміки протягом 200 нс (рис. 7.8). Проводячи аналогію з дослідженнями за допомогою мутагенезу інших гомологів ATG8 з тварин та рослин (Uniprot: Q9GZQ8, C0IQA9, Q8LEM4), ми визначили, що залишки Ile32, Lys48, Leu50, Arg65, Asp102, Phe104 і Tyr106 є високо консервативними в ATG8 різних організмів, а їх модифікація/заміщення значно змінює ефективність аутофагії. Власне, залишки Tyr49, Leu50, Phe77 і Phe79 були описані як важливі для функціональності ATG8, оскільки мутаційні зміни в цих положеннях впливають на активність білка [349]. Дослідження з використанням методів молекулярної динаміки і з наступною інтерпретацією траєкторій демонструють повторюване розташування ATG8 відносно мембрани у людини. Так, після зв'язування ліпідованого ATG8 з мембраною він змінює свою орієнтацію відносно поверхні мембрани, а залишки Phe77 і Phe79 знаходяться у гідрофобній області, що в майбутньому має взаємодіяти з ATG4. Цей процес є необхідним для видалення тваринного ATG8 (LC3) з мембрани та доставки його в цитоплазму.

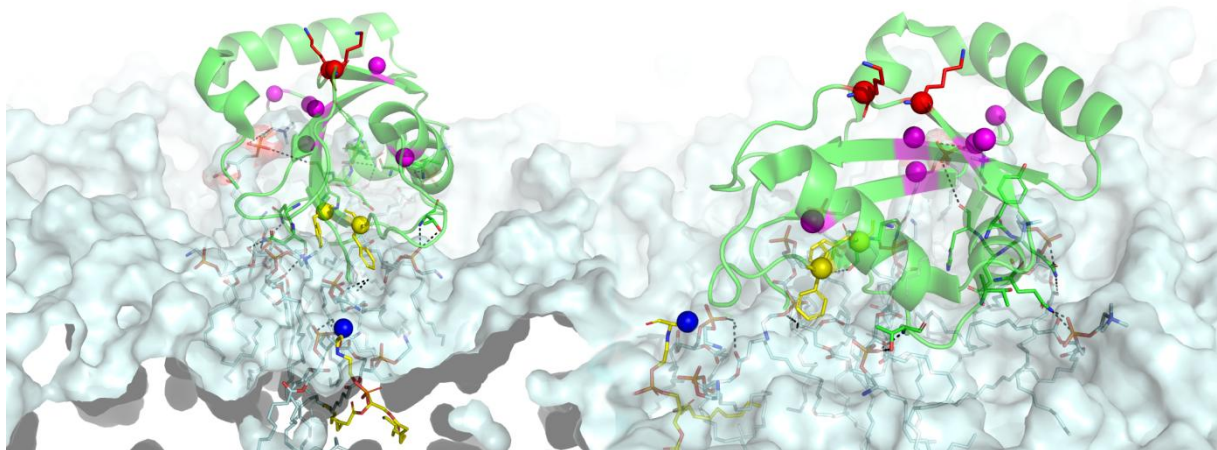


Рис. 7.8 Модель зв'язування ліпідованого ATG8 *Arabidopsis* з мембраною. Залишки Phe77 і Phe79 показані жовтими сферами, Tyr49 та Tyr51 – червоним, група залишків перевічених на інших моделях (Ile32, Lys48, Leu50, Arg65, Asp102, Phe104 і Tyr106) – рожевим кольором. Заякорювання ліпідованого хвоста у мембрані показано синім кольором. Контакти із мембраною в першому випадку забезпечується петлею (Asn81, Asn82 та Thr87) та α -спіраллю (Gln93, Gln96, Glu97, His98 та Glu101) (дві перспективи). Друга найбільш стабільна орієнтація ATG8 зберігається за рахунок міцного контакту між мембраною та α -спіраллю (Arg65, Lys66, Arg67)

Проте, наші симуляції рослинного ATG8 показали формування двох орієнтацій білка. Перша існує за рахунок участі двох кластерів, що включають петлю (Asn81, Asn82 та Thr87) та α -спіраль (Gln93, Gln96, Glu97, His98 та Glu101), які взаємодіють із ліпідами. При цьому білок прилягає поверхнею та UBA сайтом до мембрани. Друга орієнтація, подібна до описаної вище тваринної моделі, більш ймовірна через свою відносну стабільність та збереження функціональності білка – можливість участі у білок-білкових взаємодіях. Тут залучена α -спіраль (Arg65, Lys66, Arg67) і обидва сайти залишаються вільними для взаємодії із ATG4b або FYWE (рослинний аналог білка FYCO1). Це відповідає нашим результатам білок-білкових взаємодій з рецепторами та адаптерами. При високому рівні подібності рослинного та

тваринного білків ATG8 всіма цими даними можна пояснити перебіг реакцій у рослинній клітині. Основні компоненти, задіяні в системі ліпідації ATG8, націлені на ацетилювання самого білка ATG8 [350]. Людський LC3 (включаючи інші білки сімейства ATG8) може бути ацетильований або EP300, або його близькоспорідненим CREBBP (CREB–зв’язуючий білок) по позиціях K49 і K51. В свою чергу у *Arabidopsis* є ортолог CBP/p300, що може виконувати таку саму функцію. Базуючись на високій гомології між ферментами рослин і тварин, ми припускаємо, що активований SIR1 (Q9FE17, гомолог SIRT1 тварин) може деацетильовувати ядерний ATG8, щоб ініціювати його транслокацію та сприяти ініціації аутофагії [70]. Ацетилювання ATG8 в обох сайтах відіграє негативну роль в аутофагії, пригнічуючи перерозподіл ядерного та цитоплазматичного ATG8. Механізм переміщення ATG8 в цитоплазму на даний момент не з’ясований, але зупинка зв’язування ATG8 з ATG7 є очевидною.

Цікаво, що лише повне ацетилювання ATG8, а саме в обох сайтах, може пригнічувати його зв’язування з ATG7, що призводить до зменшення утворення ATG8–PE. Для аналізу поверхні сайту AIM молекули ATG8 з кепованими ацетильними групами Lys використовувався метод головних компонент, який більш наочно відобразив поведінку амінокислот сайту зв’язування без прив’язки до конкретних координат та атомів. Як можна помітити, деацетильована форма (показано червоним кольором) характеризується явною локалізацією зсувів, а ацетильована–навпаки, розмиті обриси відповідають підвищеній мобільності елементів (рис. 7.9). Власне, відбувається деформація поверхні, нейтралізація поверхневого заряду, що спричинює як зниження ймовірності контакту із рецептором/адаптером, так і послаблення цього зв’язку. Передумовами для таких висновків стали експериментальні дані щодо функціонування LC3 та наші моделювання ефектів від ацетилювання на поверхні LDS–сайту зв’язування ATG8 [301, 351]. Саме так показано, що ацетилювання ATG8 в обох сайтах стабілізує ATG8 (рис. 7.9).

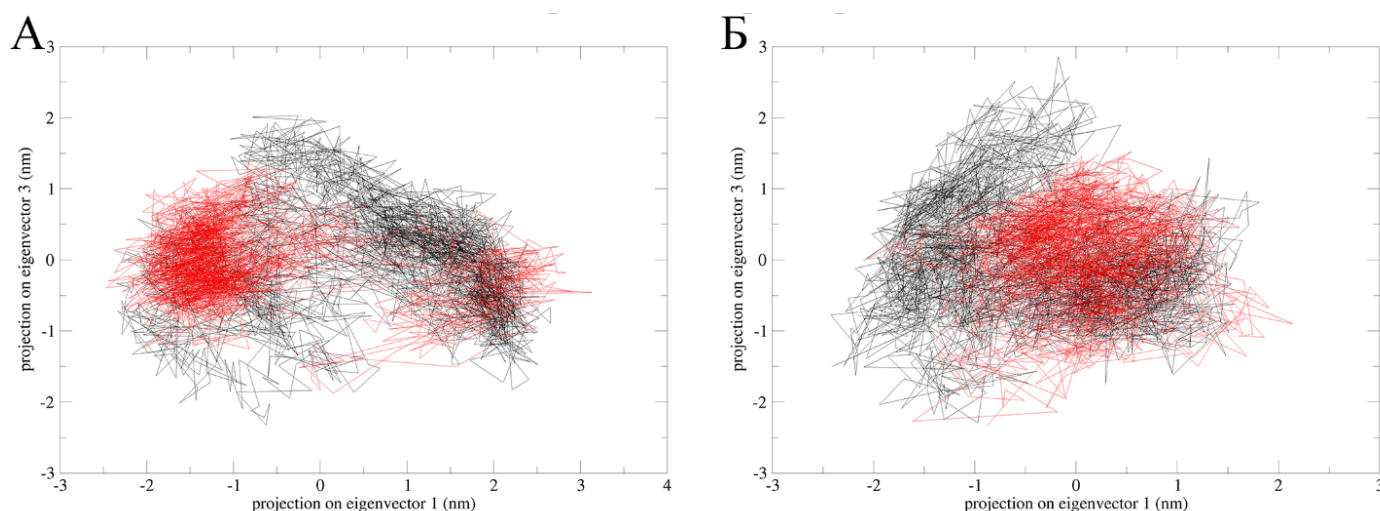


Рис. 7.9 Аналіз симуляції молекулярної динаміки на прикладі виокремленого сайту AIM із деацетильованими (червоні траєкторії) та ацетильованими Lys 49 та 51 в молекулі ATG8a (А) та ATG8h (Б). Графік віддзеркалює рухливість амінокислот, визначену методом PCA для наочності

Висновки до розділу 7:

1. Побудовано просторові моделі білку ATG8 *A. thaliana* та здійснено їх кластеризацію за конформаційною мінливістю досліджуваних сайтів LDS (LIR)/AIM docking site). Спираючись на отримані дані, продемонстровано механізм спорідненості ATG8 *A. thaliana* з різними адаптерними пептидами.
2. Встановлено, що ліпидування білку ATG8 визначає розташування та характер його взаємодії з мембраною. Моделювання молекули білку ATG8 після ліпйдації дозволило виявити два варіанти розташування ATG8 та характер його взаємодії з мембраною, демонструючи відмінності у точках такої взаємодії у порівнянні з білком LC3 людини.
3. Результати аналізу впливу ацетилювання одного амінокислотного залишка з пари залишків K49 та K51 амінокислотної послідовності білку ATG8 засвідчили відсутність значного впливу цієї модифікації на функціональну здатність ATG8 брати участь в процесах аутофагії. При ацетилюванні обох цих залишків зв'язування субстрату унеможливорюється через надмірну рухливість залишків, що формують сайт LDS.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція моделі мультипротеїнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. Допов Нац акад наук Укр. 2025;1:68–76. DOI: 10.15407/dopovidi2025.01.068

2. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume Ya. Structural preconditions for the ATG8 functioning and the effect of lipidation and acetylation on its regulatory mechanism. *B*: 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation; 2024 Sept. 11–13; Lviv, Ukraine. 2024. P. 12.

Публікації, що додатково висвітлюють результати дослідження:

Bulgakov E, Rayevsky A, Stykhylias M, Ozheredov S, Spivak S, Blume Ya. Structural flexibility and shape similarity contribute to exclusive functions of certain ATG8 isoforms in the autophagy process. 28 August 2024, PREPRINT (Version 1) available at Research Square DOI: 10.21203/rs.3.rs-4831294/v1

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі наведено оригінальні дані, які чітко демонструють механізми взаємодії білкових комплексів, що відносяться до різних систем клітини, під час ініціації процесів аутофагії у рослин. На даний час вивчення фізіологічної ролі аутофагії при стресі є однією з актуальних проблем біології, оскільки в залежності від ступеня пошкодження клітин цей процес може сприяти або виживанню, або загибелі клітин. Аутофагосоми – це рухливі структури, для руху яких потрібні МТ. Основна увага приділяється білку ATG8, що залучений в роботу систем кон'югації та цитоскелету під час аутофагічних процесів в клітині.

Використовуючи амінокислотні послідовності ATG білків людини проведено вирівнювання проти бази даних сіквенсів їх рослинних гомологів і визначено ряд гомологів з подібною доменною структурою. Таким чином можна зробити висновки про консервативність родини ATG білків у різних царствах та можливість реконструкції складних макрокомплексів з його участю. Так було досліджено сіквенси та змодельовано тривимірні моделі рослинних гомологів білків першої та другої системи ATG кон'югації. Це відноситься до обох систем кон'югації–Atg1 та ATG3–16 комплексів. Результати аналізу кристалографічних даних щодо взаємодії білків комплексу першої та другої системи ATG кон'югації тваринного походження засвідчили можливість побудови відповідного макрокомплексу для білків з *A. thaliana* на поверхні ліпідного шару аутофагосоми. Спираючись на отримані дані, підготовлені моделі та побудовані комплекси, що певним чином доводить не тільки структурну, а й функціональну подібність цих елементів (ATG білків).

У той же час, у результаті проведених симуляцій нами отримано структури, необхідні для молекулярного білок–білкового докінгу та подальшої інтерпретації взаємодії комплексу з молекулою ATG8. Білок ATG8 є структурною одиницею аутофагосом і безпосередньо бере участь у розвитку стрес–індукованої аутофагії у клітині. Проведено порівняльний аналіз ATG8 *A.*

thaliana та їх ортологів тваринного походження. Визначені потенційні сайти їх ацетилювання, ці дані перевірені в доступних базах даних анотованих посттрансляційних модифікацій. Дана модель може бути використана для пошуку інгібіторів міжбілкових взаємодій власне у самому комплексі та створення функціональної убіквітиноподібні системи кон'югації ATG на поверхні ліпідної мембрани з метою дослідження окремих ланок каскаду ліпідизації ATG8 в організмі рослин.

Побудовані просторові моделі ATG8 *A. thaliana* і побудовані просторові моделі різних ізотипів ATG8 *A. thaliana*. Після моделювання методами молекулярної динаміки здійснено їх кластеризацію за конформаційною мінливістю досліджуваних сайтів (AIM). Спираючись на отриманні дані, продемонстровано механізм спорідненості білка ATG8 *A. thaliana* з різними адаптерними пептидами. Для цього було розроблено протоколи пептид–білкового докінгу з наступною перевіркою ймовірної дисоціації комплексів.

Встановлено, що порушення МТ призводить до значного зменшення кількості зрілих аутофагосом, але не впливає на тривалість їх життя або злиття з вакуолями/лізосомами. Попередньо були розроблені та валідовані цілі системи макромолекулярних комплексів, що віддзеркалюють поведінку фрагментів мікротрубочок і здатні демонструвати зміни в залежності від внесення модифікацій, мутацій, тощо. Так, вивчаючи один з найбільш важливих для аутофагії типів посттрансляційних модифікацій–ацетилювання, ми показали, що ацетилювання окремих (в нашому два послідовні панелі амінокислот) залишків α -тубулінів може змінювати ступінь згортання білка, але не має істотного впливу на його вторинні структури та процеси утворення гетеродимерів. Особливу увагу було приділено рослинним системам білків.

Отже, нами досліджено вплив ацетилювання ключових залишків α -тубуліну рослин, а, саме, на K40, K60, K112, K163, K326 і K394 на формування та стабільність МТ. В результаті нами встановлено, що ацетилювання K60 в динаміці збільшує бічні контакти між α -тубулінами, а зміни в K40 впливають на щільність контактів у повздовжньому напрямку, отже вказують на їх

структурну функцію. Ацетилювання залишків K112, K394, K163 і K326 викликає подовження структури МТ, підвищує її жорсткість та, ймовірно, збільшує вірогідність взаємодії MAP із сильною стабільною поверхнею.

В повномірній структурі особливо цікаво було спостерігати за перебігом масштабних конформаційних змін та подальшою деструкцією геометрії макрокомплексів тубулінів. За результатами проведеного аналізу можна зробити узагальнюючі висновки щодо подібності просторового розташування ключових амінокислотних залишків та впливу ацетилювання цих амінокислот на структуру мікротрубочок тваринного та рослинного походження. Визначено, які ділянки на поверхні молекул α -тубуліну зазнають найбільших змін та як це впливає на взаємодії у ряду мономерів. Так, нам вдалось визначити, що ацетилювання розглянутих залишків α -тубуліну може змінювати ступінь компактизації окремої молекули α -тубуліну, але не має істотного впливу на його вторинні структури та процеси утворення гетеродимерів. А межах цілого фрагменту ми продемонстрували найменшу стабільність для ізотипу TBA1, послідовність якщо не містить Lys ні в 40, ні в 60 позиції, порівняно з найбільш стабільним ізотипом TBA2.

Аналіз результатів обрахунку молекулярної динаміки комплексів ATG8 з α -тубуліном продемонстрував, що ацетильована форма K40 α -тубуліну в комплексі з ATG8 є значно стабільнішою, ніж аналогічний комплекс ATG8 з неацетильованим α -тубуліном. Ключовим залишається питання взаємодій між аутофагосою та мікротрубочками за участі ATG8. Аналізуючи дані сіквенсів та анованих білок-білкових взаємодій, ми визначили роль FYWE, ортолога FYCO1 з клітин людини, у контактах з ATG8, що може бути зв'язаний як із мембраною, так і з тубулінами мікротрубочок. Частина інформації ми отримали при моделюванні таких типів посттрансляційних модифікацій ATG8, як ліпидування та ацетилювання. Перше визначає розташування та характер взаємодії білка із мембраною, а друге більше впливає на міцність контактів із білками партнерами. ATG8 після ліпйдації показало два варіанти розташування ATG8 та характер взаємодії білка із мембраною, демонструючи відмінності у

точках взаємодії із LC3 людини. В свою чергу, аналіз впливу ацетилювання передбачає значний вплив на функціональну здатність ATG8 брати участь в процесах аутофагії. Так, ацетилювання одного залишка з пари K49, K51 продемонструвало відсутність значного впливу на функціональну здатність білка ATG8 брати участь в процесах аутофагії. При ацетилюванні обох із них зв'язування субстрату унеможлиблюється через надмірну рухливість залишків, що формують сайт.

У дисертаційній роботі визначені тривимірні структури основних учасників первинного етапу, а саме ініціації, аутофагії у клітинах *A. thaliana*. За допомогою методів *in silico* були визначені та досліджені основні ділянки взаємодій між білками ATG та їх платформами для збірки у комплекси (мембрани, мікротрубочки). Охарактеризовано вплив ацетилювання на поведінку ключових білків (ATG8, α -і β -тубуліну). Розроблено та представлено комп'ютерні моделі та протоколи, необхідні для подальших досліджень та аналізу аналогічних механізмів посттрансляційних модифікацій інших мішеней.

Таким чином, отримані результати створюють вихідну платформу для подальшого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів ATG8 та їх взаємодії з іншими клітинними компонентами (мікротрубочками, мембранними структурами) у розвитку аутофагії рослин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено біоінформатичний аналіз і реконструйовано тривимірні структури основних учасників первинного етапу аутофагії, а саме, ініціації, у клітинах *Arabidopsis thaliana*, а також змодельовано комплекс білків родини ATG, що відповідають за асоціацію фагосом з мікротрубочками рослинної клітини. Визначено основні ділянки взаємодії між білками ATG та мікротрубочками і мембранними структурами для збірки ортологів у комплекси і охарактеризовано вплив ацетилювання на поведінку ключових білків (ATG8, α - і β -тубуліну), що дозволило створити вихідну платформу для поглибленого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів білку ATG8 до розвитку аутофагії у рослин.

1. Проведено вирівнювання амінокислотних послідовностей ATG білків людини проти бази даних сіквенсів їх рослинних гомологів і доведено високий ступінь подібності цих білків на рівні доменної організації та інтерфейсів білок–білкових взаємодій.

2. Результати аналізу кристалографічних даних щодо взаємодії білків комплексу першої та другої системи ATG кон'югації тваринного походження засвідчили можливість побудови відповідного макрокомплексу для *A. thaliana* на поверхні ліпідного шару аутофагосом.

3. Змодельовано тривимірні моделі рослинних гомологів білків першої та другої системи ATG кон'югації і отримано структури, необхідні для молекулярного білок–білкового докінгу та подальшої інтерпретації взаємодії комплексу другої системи ATG кон'югації з молекулою білку ATG8.

4. Проведено порівняльний аналіз ізотипів білка ATG8 *A. thaliana* та їх ортологів тваринного походження, визначено потенційні сайти їх ацетилювання та побудовано просторові моделі білку ATG8 *A. thaliana*.

5. Результати дослідження впливу ацетилювання ключових амінокислотних залишків α -тубуліну рослин, а саме, залишків K40, K60, K112, K163, K326 і K394 на формування та стабільність мікротрубочок свідчать про

те, що ацетилювання розглянутих залишків може змінювати ступінь згортання білка, але не має істотного впливу на його вторинну структуру та процеси утворення α/β -гетеродимерів тубуліну.

6. Ацетилювання залишку K60 в динаміці фрагменту мікротрубочки посилює бічні контакти між α -тубулінами, а така ж модифікація залишку K40 впливає на щільність контактів у повздовжньому напрямку, що вказує на важливість цієї посттрансляційної модифікації для стабілізації мікротрубочки. В свою чергу, ацетилювання залишків K112, K394, K163 і K326 α -тубуліну призводить до подовження структури мікротрубочок, підвищує їх жорсткість та, ймовірно, посилює вірогідність взаємодії білків, асоційованих з мікротрубочками, із стабілізованою поверхнею такої мікротрубочки.

7. Результати обрахунку молекулярної динаміки комплексів білку ATG8 з α -тубуліном свідчать про те, що ацетильована форма залишку K40 α -тубуліну в комплексі з білком ATG8 є значно стабільнішою, ніж аналогічний комплекс білку ATG8 з немодифікованим за цим залишком α -тубуліном.

8. Результати аналізу ізотипів α -тубуліну рослинного походження за допомогою методів *in silico* засвідчили, що найнестабільнішим з трьох досліджених є ізотип TBA1, який не містить залишків лізину ні в 40, ні в 60 положеннях, а найбільш стабільним є ізотип TBA2.

9. Побудовано просторові моделі білку ATG8 *A. thaliana* та здійснено їх кластеризацію за конформаційною мінливістю досліджуваних сайтів LDS (LIR)/AIM docking site). Спираючись на отримані дані, продемонстровано механізм спорідненості ATG8 *A. thaliana* з різними адаптерними пептидами.

10. Встановлено, що ліпидування білку ATG8 визначає розташування та характер його взаємодії з мембраною. Моделювання молекули білку ATG8 після ліпідації дозволило виявити два варіанти розташування ATG8 та характер його взаємодії з мембраною, демонструючи відмінності у точках такої взаємодії у порівнянні з білком LC3 людини.

11. Результати аналізу впливу ацетилювання одного амінокислотного залишка з пари залишків K49 та K51 амінокислотної послідовності білку ATG8

засвідчили відсутність значного впливу цієї модифікації на функціональну здатність ATG8 брати участь в процесах аутофагії. При ацетилюванні обох цих залишків зв'язування субстрату унеможлиблюється через надмірну рухливість залишків, що формують сайт LDS.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967 May;33(2):437–49. DOI: 10.1083/jcb.33.2.437
2. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3–12. DOI: 10.1002/path.2697
3. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul;10(7):458–67. DOI: 10.1038/nrm2708
4. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9. DOI: 10.1038/ncb1007–1102
5. Ding P, Ma Z, Liu D, Pan M, Li H, Feng Y, et al. Lysine Acetylation/Deacetylation Modification of Immune-Related Molecules in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022 May 2;13:1–18. DOI: 10.3389/fimmu.2022.865975
6. Blasl AT, Schulze S, Qin C, Graf LG, Vogt R, Lammers M. Post-translational lysine ac(et)ylation in health, ageing and disease. *Biol Chem.* 2022 Aug 23;403(2):151–94. DOI: 10.1515/hsz–2021–0139
7. Nguyen TN, Lazarou M. A unifying model for the role of the ATG8 system in autophagy. *J Cell Sci.* 2022 Jun 1;135(11):1–6. DOI: 10.1242/jcs.258997
8. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811–36. DOI: 10.15252/emboj.201796697
9. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004 Nov 5;306(5698):990–95. DOI: 10.1126/science.1099993
10. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:1–32. DOI: 10.1007/978–3–642–00302–8_1

11. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*. 2003 Mar–Apr;9(3–4):65–76. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1430730/>
12. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self–digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069–75. DOI: 10.1038/nature06639
13. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci*. 2017 Nov 1;188:53–67. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.08.029
14. Yang J, Yuan L, Liu F, Li L, Liu J, Chen Y, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of autophagy in kidney diseases. *Front Pharmacol*. 2022 Aug 11;13:1–13. DOI: 10.3389/fphar.2022.974829
15. Eguchi M, Kazuhiko K, Amane M, Ishida H. Autophagy is induced under Zn limitation and contributes to Zn–limited stress tolerance in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). *Soil Sci Plant Nutr*. 2017 Jul 4;63(4):342–50. DOI: 10.1080/00380768.2017.1360750
16. Lornac A, Have M, Chardon F, Soulay F, Clement G, Avice JC, et al. Autophagy Controls Sulphur Metabolism in the Rosette Leaves of *Arabidopsis* and Facilitates S Remobilization to the Seeds. *Cells*. 2020 Jan 31;9(2):1–18. DOI: 10.3390/cells9020332
17. Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, et al. OsATG7 is required for autophagy–dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*. 2014 May;10(5):878–88. DOI: 10.4161/auto.28279
18. Wani WY, Boyer–Guittaut M, Dodson M, Chatham J, Darley–Usmar V, Zhang J. Regulation of autophagy by protein post–translational modification. *Lab Invest*. 2015 Jan;95(1):14–25. DOI: 10.1038/labinvest.2014.131
19. Qi H, Xia FN, Xiao S. Autophagy in plants: Physiological roles and post–translational regulation. *J Integr Plant Biol*. 2021 Jan;63(1):161–79. DOI: 10.1111/jipb.12941

20. Laude J, Scarsini M, Nef C, Bowler C. Evolutionary conservation and metabolic significance of autophagy in algae. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2024 Nov 18;379(1914):1–16. DOI: 10.1098/rstb.2023.0368
21. Luo L, Zhang P, Zhu R, Fu J, Su J, Zheng J, et al. Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*. 2017 Aug 22;8:1–13. DOI: 10.3389/fpls.2017.01459
22. Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A, Bergounioux C, Blume Ya. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol Int*. 2019 Sep;43(9):1056–64. DOI: 10.1002/cbin.10843
23. Yemets A, Shadrina R, Blume R, Plokhovska S, Blume Ya. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *NPJ Microgravity*. 2024 Mar 18;10(1):1–16. DOI: 10.1038/s41526–024–00381–9
24. Yoshimoto K, Ohsumi Y. Unveiling the Molecular Mechanisms of Plant Autophagy–From Autophagosomes to Vacuoles in Plants. *Plant Cell Physiol*. 2018 Jul 1;59(7):1337–44. DOI: 10.1093/pcp/pcy112
25. Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol*. 2017 Feb 17;429(4):486–96. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.01.002
26. Fedyna VD, Lytvyn DI, Blium YB. Microtubule cytoskeleton participates in realization of autophagy, which is crucial for cell surviving under the influence of stressful stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Factors Exp Evol Org*. 2016;19:47–50. Available from: <http://jnas.nbu.gov.ua/article/UJRN–0000612602>
27. Levine B, Klionsky DJ. Development by self–digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):463–77. DOI: 10.1016/s1534–5807(04)00099–1
28. Huang J, Klionsky DJ. Autophagy and human disease. *Cell Cycle*. 2007 Aug 1;6(15):1837–49. DOI: 10.4161/cc.6.15.4511

29. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007 Oct;7(10):767–77. DOI: 10.1038/nri2161
30. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(10):2679–88. DOI: 10.1172/JCI26390
31. Wang L, Ye X, Zhao T. The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2019 Apr;94(2):503–16. DOI: 10.1111/brv.12464
32. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014 Dec 24;24(1):9–23. DOI: 10.1038/cr.2013.169
33. Devenish RJ, Klionsky DJ. Autophagy: mechanism and physiological relevance ‘brewed’ from yeast studies. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012 Jun 1;4(4):1354–63. DOI: 10.2741/s337
34. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* 1992 Oct;119(2):301–11. DOI: 10.1083/jcb.119.2.301
35. Wen X, Klionsky DJ. An overview of macroautophagy in yeast. *J Mol Biol.* 2016 May 8;428(9 Pt A):1681–99. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.021
36. Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med.* 2020 Oct 15;383(16):1564–76. DOI: 10.1056/NEJMr2022774
37. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell.* 2008 May 28;19(8):3290–8. DOI: 10.1091/mbc.e07–12–1292
38. Jin M, He D, Backues SK, Freeberg MA, Liu X, Kim JK, et al. Transcriptional regulation by Pho23 modulates the frequency of autophagosome formation. *Curr Biol.* 2014 Jun 16;24(12):1314–22. DOI: 10.1016/j.cub.2014.04.048
39. Kurusu T, Kuchitsu K. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants. *J Plant Res.* 2017 May;130(3):491–9. DOI: 10.1007/s10265–017–0934–4

40. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol–3–kinase complex. *Nat Cell Biol.* 2009 Apr;11(4):468–76. DOI: 10.1038/ncb1854
41. Bernard A, Jin M, González–Rodríguez P, Füllgrabe J, Delorme–Axford E, Backues SK, et al. Rph1/KDM4 mediates nutrient–limitation signaling that leads to the transcriptional induction of autophagy. *Curr Biol.* 2015 Mar 2;25(5):546–55. DOI: 10.1016/j.cub.2014.12.049
42. Bernard A, Jin M, Xu Z, Klionsky DJ. A large–scale analysis of autophagy–related gene expression identifies new regulators of autophagy. *Autophagy.* 2015 Nov 2;11(11):2114–22. DOI: 10.1080/15548627.2015.1099796
43. Huang F, Guo W, Chen L, Feng K, Huang T, Cai YD. Identifying Autophagy–Associated Proteins and Chemicals with a Random Walk–Based Method within Heterogeneous Interaction Network. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2024 Jan 17;29(1):1–10. DOI: 10.31083/j.fbl2901021
44. Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y. ATG17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell.* 2005 May;16(5):2544–53. DOI: 10.1091/mbc.e04–08–0669
45. Noda NN, Mizushima N. Atg101: Not Just an Accessory Subunit in the Autophagy–initiation Complex. *Cell Struct Funct.* 2016;41(1):13–20. DOI: 10.1247/csf.15013
46. Zhi X, Feng W, Rong Y, Liu R. Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Mar;75(5):815–31. DOI: 10.1007/s00018–017–2657–z
47. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin–like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Mar;2:211–6. DOI: 10.1038/35056522
48. Sun S, Feng L, Chung KP, Lee KM, Cheung HH, Luo M, et al. Mechanistic insights into an atypical interaction between ATG8 and SH3P2 in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy.* 2022 Jun;18(6):1350–66. DOI: 10.1080/15548627.2021.1976965

49. Yamamoto H, Zhang S, Mizushima N. Autophagy genes in biology and disease. *Nat Rev Genet.* 2023 Jan 12;24(6):382–400. DOI: 10.1038/s41576-022-00562-w
50. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998 Sep 24;395(6700):395–8. DOI: 10.1038/26506
51. Kirkin V. History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol.* 2020 Jan 3;432(1):3–27. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.010
52. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* 2000 Nov 23;408(6811):488–92. DOI: 10.1038/35044114
53. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16;151(2):263–76. DOI: 10.1083/jcb.151.2.263
54. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12–Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Dec 28;282(52):37298–302. DOI: 10.1074/jbc.C700195200
55. Marshall RS, Vierstra RD. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annu Rev Plant Biol.* 2018 Apr 29;69:173–08. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040606
56. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jun;18(6):361–74. DOI: 10.1038/nrm.2017.16
57. Shiozawa K, Goda N, Shimizu T, Mizuguchi K, Kondo N, Shimozawa N, et al. The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97. *FEBS J.* 2006 Nov;273(21):4959–71. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05494.x

58. Reglinski K, Steinfert–Effelsberg L, Sezgin E, Klose C, Platta HW, Girzalsky W, et al. Fluidity and Lipid Composition of Membranes of Peroxisomes, Mitochondria and the ER From Oleic Acid–Induced *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Oct 29;8:1–12. DOI: 10.3389/fcell.2020.574363
59. Li L, Tong M, Fu Y, Chen F, Zhang S, Chen H, et al. Lipids and membrane–associated proteins in autophagy. *Protein Cell*. 2021 Jul;12(7):520–44. DOI: 10.1007/s13238–020–00793–9
60. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018
61. Moriyasu Y, Ohsumi Y. Autophagy in Tobacco Suspension–Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation. *Plant Physiol*. 1996 Aug;111(4):1233–41. DOI: 10.1104/pp.111.4.1233
62. Wherrett JR, Huterer S. Enrichment of bis–(monoacylglyceryl) phosphate in lysosomes from rat liver. *J Biol Chem*. 1972;247(13):4114–20. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021–9258\(19\)45047–3/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021–9258(19)45047–3/pdf)
63. de la Ballina NR, Villalba A, Cao A. Differences in proteomic profile between two haemocyte types, granulocytes and hyalinocytes, of the flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2020 May;100:456–66. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.03.033
64. Zhang C, Hicks GR, Raikhel NV. Molecular Composition of Plant Vacuoles: Important but Less Understood Regulations and Roles of Tonoplast Lipids. *Plants (Basel)*. 2015 Jun 11;4(2):320–33. DOI: 10.3390/plants4020320
65. Schütter M, Giavalisco P, Brodesser S, Graef M. Local Fatty Acid Channeling into Phospholipid Synthesis Drives Phagophore Expansion during Autophagy. *Cell*. 2020 Jan 9;180(1):1–30. DOI: 10.1016/j.cell.2019.12.005
66. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Dec;14(12):759–74. DOI: 10.1038/nrm3696.

67. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Chapter 10 Monitoring Autophagy by Electron Microscopy in Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* 2009;452:143–64. DOI: 10.1016/S0076–6879(08)03610–0
68. Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R. The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife.* 2013 Aug 6;2:1–23. DOI: 10.7554/eLife.00947
69. Mariño G, López-Otín C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jun;61(12):1439–54. DOI: 10.1007/s00018–004–4012–4
70. Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD–dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 4;105(9):3374–9. DOI: 10.1073/pnas.0712145105
71. Hailey DW, Rambold AS, Satpute–Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 2010 May 14;141(4):656–67. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.009
72. Wei Y, Chiang WC, Sumpter R Jr, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell.* 2017 Jan 12;168(1–2):224–38. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.042
73. Ganley IG. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem.* 2013;55:65–78. DOI: 10.1042/bse0550065
74. Høyvik H, Gordon PB, Seglen PO. Convergence of autophagic and endocytic pathways at the level of the lysosome. *Biochem Soc Trans.* 1987 Oct;15(5):964–5. DOI: 10.1042/bst0150964
75. Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):329–45. DOI: 10.1083/jcb.111.2.329
76. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes

with both early and late endosomes. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):21883–92. DOI: 10.1074/jbc.273.34.21883

77. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007 Nov 15;21(22):2861–73. DOI: 10.1101/gad.1599207

78. Noda NN, Inagaki F. Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys*. 2015;44:101–22. DOI: 10.1146/annurev-biophys-060414-034248

79. Birgisdottir ÅB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif – crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*. 2013 Aug 1;126(Pt 15):3237–47. DOI: 10.1242/jcs.126128

80. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol*. 2020 Jan 3;432(1):80–103. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.07.016

81. Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2021 Dec 3;33(12):3743–44. DOI: 10.1093/plcell/koab212

82. Wesch N, Kirkin V, Rogov VV. Atg8–Family Proteins–Structural Features and Molecular Interactions in Autophagy and Beyond. *Cells*. 2020 Sep 1;9(9):1–25. DOI: 10.3390/cells9092008

83. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008 Aug;4(6):740–3. DOI: 10.4161/auto.6398

84. Aman Y, Schmauck–Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*. 2021 Aug;1(8):634–50. DOI: 10.1038/s43587-021-00098-4

85. Brouhard GJ, Rice LM. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *J Cell Biol*. 2014 Nov 10;207(3):323–34. DOI: 10.1083/jcb.201407095

86. Varga VB, Keresztes F, Sigmond T, Vellai T, Kovács T. The evolutionary and functional divergence of the Atg8 autophagy protein superfamily. *Biol Futur*. 2022 Dec;73(4):375–84. DOI: 10.1007/s42977-022-00123-6

87. Leboutet R, Largeau C, Müller L, Prigent M, Quinet G, Rodriguez MS, et al. LGG–1/GABARAP lipidation is not required for autophagy and development in *Caenorhabditis elegans*. *eLife*. 2023 Jul 3;12:1–27. DOI: 10.7554/eLife.85748
88. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*. 2018 Apr 23;20(5):521–7. DOI: 10.1038/s41556–018–0092–5
89. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*. 2009 Feb 27;33(4):505–16. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.01.020
90. Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, Kim S, et al. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci*. 2013 Feb 15;126(Pt 4):939–52. DOI: 10.1242/jcs.114819
91. Wang H, Olsen RW. Binding of the GABAA Receptor–Associated Protein (GABARAP) to Microtubules and Microfilaments Suggests Involvement of the Cytoskeleton in GABARAPGABAA Receptor Interaction. *J Neurochem*. 2000 Aug;75(2):644–55. DOI: 10.1046/j.1471–4159.2000.0750644.x
92. von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein Á, Bloor S, Rutherford TJ, et al. An essential role for the ATG8 ortholog LC3C in antibacterial autophagy. *Autophagy*. 2013 May;9(5):784–6. DOI: 10.4161/auto.23698
93. Li F, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS, et al. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell*. 2015 May;27(5):1389–408. DOI: 10.1105/tpc.15.00158
94. Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*. 1990 Jun;110(6):1923–33. DOI: 10.1083/jcb.110.6.1923
95. Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem*. 1994 Apr 15;269(15):11492–7. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021–9258\(19\)78150–2/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021–9258(19)78150–2/pdf)

96. Mende H, Khatri A, Lange C, Poveda–Cuevas SA, Tascher G, Covarrubias–Pinto A, et al. An atypical GABARAP binding module drives the pro–autophagic potential of the AML–associated NPM1c variant. *Cell Rep.* 2023 Dec 26;42(12):1–29. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113484
97. Lynch–Day MA, Bhandari D, Menon S, Huang J, Cai H, Bartholomew CR, et al. Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 27;107(17):7811–6. DOI: 10.1073/pnas.1000063107
98. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome–lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell.* 2015 Jan 8;57(1):39–54. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.006
99. Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, et al. The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell.* 2014 Apr;25(8):1327–37. DOI: 10.1091/mbc.E13–08–0447
100. Itakura E, Kishi–Itakura C, Mizushima N. The hairpin–type tail–anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell.* 2012 Dec 7;151(6):1256–69. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.001
101. Shen Q, Shi Y, Liu J, Su H, Huang J, Zhang Y, et al. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation. *Autophagy.* 2021;17(5):1157–69. DOI: 10.1080/15548627.2020.1752471
102. Xu Y, Wan W. Acetylation in the regulation of autophagy. *Autophagy.* 2023 May;19(2):379–87. DOI: 10.1080/15548627.2022.2062112
103. Wang Q, Hou S. Type one protein phosphatase regulates fixed–carbon starvation–induced autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2022 Oct 27;34(11):4531–53. DOI: 10.1093/plcell/koac251

104. Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer*. 2021 Mar;108(3):304–22. DOI: 10.1016/j.bulcan.2020.11.004
105. Meijer AJ, Codogno P. AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy*. 2007 May–Jun;3(3):238–40. DOI: 10.4161/auto.3710
106. Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation—the role of ULK1 and Beclin1–PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*. 2013 Oct;23(5):301–9. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.05.007
107. Kim S, Choi KJ, Cho SJ, Yun SM, Jeon JP, Koh YH, et al. Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors. *Sci Rep*. 2016 Apr 26;6:1–13. DOI: 10.1038/srep24933
108. Karki S, Holzbaur EL. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Feb;11(1):45–53. DOI: 10.1016/s0955-0674(99)80006-4
109. Kwon SI, Park OK. Autophagy in plants. *J Plant Biol*. 2008 Sep;51(5):313–20. DOI: 10.1007/BF03036132
110. Li W, Chen M, Wang E, Hu L, Hawkesford MJ, Zhong L, et al. Genome-wide analysis of autophagy-associated genes in foxtail millet (*Setaria italica* L.) and characterization of the function of SiATG8a in conferring tolerance to nitrogen starvation in rice. *BMC Genomics*. 2016 Oct 12;17(1):1–16. DOI: 10.1186/s12864-016-3113-4
111. Tortosa E, Kapitein LC, Hoogenraad CC. Microtubule Organization and Microtubule-Associated Proteins (MAPs). In: Emoto K, Wong R, Huang E, Hoogenraad C, editors. *Dendrites: Development and Disease*. Tokyo: Springer Japan; 2016. 608 p. DOI: 10.1007/978-4-431-56050-0_3
112. Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol*. 2005 Aug;138(4):2097–110. DOI: 10.1104/pp.105.060673

113. Chung T, Phillips AR, Vierstra RD. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *Plant J.* 2010 May;62(3):483–93. DOI: 10.1111/j.1365–313X.2010.04166.x
114. Gerth K, Lin F, Menzel W, Krishnamoorthy P, Stenzel I, Heilmann M, et al. Guilt by Association: A Phenotype-Based View of the Plant Phosphoinositide Network. *Annu Rev Plant Biol.* 2017 Apr 28;68:349–74. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-041022
115. Liu F, Hu W, Li F, Marshall RS, Zarza X, Munnik T, et al. AUTOPHAGY-RELATED14 and Its Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Complex Promote Autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2020 Dec;32(12):3939–60. DOI: 10.1105/tpc.20.00285
116. Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem.* 2013;55:39–50. DOI: 10.1042/bse0550039
117. Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2005 May;42(4):535–46. DOI: 10.1111/j.1365–313X.2005.02397.x
118. Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, Otomo T. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Jan;20(1):59–66. DOI: 10.1038/nsmb.2431
119. Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang HY, Jiang FJ, Zou S, et al. Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy.* 2012 Jun;8(6):883–92. DOI: 10.4161/auto.19652
120. Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy.* 2011 Sep;7(9):993–1010. DOI: 10.4161/auto.7.9.16389

121. Kirkin V, Rogov VV. A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell*. 2019 Oct 17;76(2):268–85. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.005
122. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*. 2016 May 8;428(9 Pt A):1714–24. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.004
123. Zientara–Rytter K, Lukomska J, Moniuszko G, Gwozdecki R, Surowiecki P, Lewandowska M, et al. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy*. 2011 Oct;7(10):1145–58. DOI: 10.4161/auto.7.10.16617
124. Pereira–Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP–binding proteins. *J Mol Biol*. 2001 Nov 2;313(4):889–901. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5072
125. Stefaniak S, Wojtyła Ł, Pietrowska–Borek M, Borek S. Completing Autophagy: Formation and Degradation of the Autophagic Body and Metabolite Salvage in Plants. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 23;21(6):1–17. DOI: 10.3390/ijms21062205
126. Sanmartín M, Ordóñez A, Sohn EJ, Robert S, Sánchez–Serrano JJ, Surpin MA, et al. Divergent functions of VTI12 and VTI11 in trafficking to storage and lytic vacuoles in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3645–50. DOI: 10.1073/pnas.0611147104
127. Aman Y, Schmauck–Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*. 2021 Aug;1(8):634–50. DOI: 10.1038/s43587–021–00098–4
128. Sanderfoot AA, Kovaleva V, Bassham DC, Raikhel NV. Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell. *Mol Biol Cell*. 2001 Dec;12(12):3733–43. DOI: 10.1091/mbc.12.12.3733
129. Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Dec;9(6):782–7. DOI: 10.1016/s0955–0674(97)80078–6

130. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18;150(6):1507–13. DOI: 10.1083/jcb.150.6.1507
131. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1344–8. DOI: 10.1126/science.1193497
132. Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, et al. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):6422–7. DOI: 10.1073/pnas.092141899
133. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):132–41. DOI: 10.1038/ncb2152
134. Crozet P, Jammes F, Valot B, Ambard-Bretteville F, Nessler S, Hodges M, et al. Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem.* 2010 Apr 16;285(16):12071–7. DOI: 10.1074/jbc.M109.079194
135. Soto-Burgos J, Bassham DC. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2017 Aug 4;12(8):1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0182591
136. Chen L, Liao B, Qi H, Xie LJ, Huang L, Tan WJ, et al. Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy.* 2015;11(12):2233–46. DOI: 10.1080/15548627.2015.1112483
137. Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2010 Jul 29;5(7):1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0011883
138. Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov.* 2020 May 26;6(1):1–18. DOI: 10.1038/s41421-020-0161-3
139. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for

selective autophagy. *Mol Cell*. 2014 Jan 23;53(2):167–78. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.12.014

140. Mercer TJ, Gubas A, Tooze SA. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *J Biol Chem*. 2018 Apr 13;293(15):5386–95. DOI: 10.1074/jbc.R117.810366

141. Walker SA, Ktistakis NT. Autophagosome Biogenesis Machinery. *J Mol Biol*. 2020 Apr 3;432(8):2449–61. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.10.027

142. Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A. Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J Cell Biol*. 2020 Jun 1;219(6):1–18. DOI: 10.1083/jcb.202002085

143. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):124–31. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.11.014

144. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*. 2001 Nov 1;20(21):5971–81. DOI: 10.1093/emboj/20.21.5971

145. Suzuki K, Ohsumi Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett*. 2010 Apr 2;584(7):1280–6. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.001

146. Harada K, Kotani T, Kirisako H, Sakoh–Nakatogawa M, Oikawa Y, Kimura Y, et al. Two distinct mechanisms target the autophagy-related E3 complex to the pre-autophagosomal structure. *Elife*. 2019 Feb 27;8:1–17. DOI: 10.7554/eLife.43088

147. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 2001 Feb 19;152(4):657–68. DOI: 10.1083/jcb.152.4.657

148. Suzuki K, Ohsumi Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2007 May 22;581(11):2156–61. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.096

149. Kraft C, Reggiori F. Phagophore closure, autophagosome maturation and autophagosome fusion during macroautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2024 Jan;598(1):73–83. DOI: 10.1002/1873–3468.14720

150. Li H, Liao Y, Zheng X, Zhuang X, Gao C, Zhou J. Shedding Light on the Role of Phosphorylation in Plant Autophagy. *FEBS Lett.* 2022 Sep;596(17):2172–85. DOI: 10.1002/1873–3468.14352

151. Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):2039–50. DOI: 10.1091/mbc.e07–10–1048

152. Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2008 Feb;19(2):668–81. DOI: 10.1091/mbc.e07–08–0826

153. Nakatogawa H, Ohbayashi S, Sakoh–Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, et al. 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 Aug 17;287(34):28503–7. DOI: 10.1074/jbc.C112.387514

154. Li F, Chung T, Vierstra RD. AUTOPHAGY–RELATED11 plays a critical role in general autophagy– and senescence–induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2014 Feb;26(2):788–807. DOI: 10.1105/tpc.113.120014

155. Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo–Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, et al. Structural basis of starvation–induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Jun;21(6):513–21. DOI: 10.1038/nsmb.2822

156. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13;273(7):3963–6. DOI: 10.1074/jbc.273.7.3963
157. Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, et al. Tor Directly Controls the Atg1 Kinase Complex to Regulate Autophagy. *Mol Cell Biol*. 2010 Feb;30(4):1049–58. DOI: 10.1128/MCB.01344–09
158. Kabeya Y, Noda NN, Fujioka Y, Suzuki K, Inagaki F, Ohsumi Y. Characterization of the ATG17–Atg29–Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 27;389(4):612–5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.09.034
159. Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*. 1999 Oct 18;147(2):435–46. DOI: 10.1083/jcb.147.2.435
160. Noda T, Fujita N, Yoshimori T. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ*. 2009 Jul;16(7):984–90. DOI: 10.1038/cdd.2009.54
161. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):165–78. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.021
162. Landajuela A, Hervás JH, Antón Z, Montes LR, Gil D, Valle M, et al. Lipid Geometry and Bilayer Curvature Modulate LC3/GABARAP-Mediated Model Autophagosomal Elongation. *Biophys J*. 2016 Jan 19;110(2):411–22. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.11.3524
163. Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2020 Apr;63:1–10. DOI: 10.1016/j.ceb.2019.12.001
164. Abeliovich H, Dunn WA Jr, Kim J, Klionsky DJ. Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol*. 2000 Nov 27;151(5):1025–34. DOI: 10.1083/jcb.151.5.1025
165. Baba M, Osumi M, Ohsumi Y. Analysis of the Membrane Structures Involved in Autophagy in Yeast by Freeze–Replica Method. *Cell Struct Funct*. 1995 Dec;20(6):465–71. DOI: 10.1247/csf.20.465

166. Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze–fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol.* 2000 Dec;79(12):871–82. DOI: 10.1078/0171–9335–00125
167. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. LC3 and GATE–16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev Cell.* 2011 Apr 19;20(4):444–54. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.02.006
168. Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ. The Atg1–Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre–autophagosomal structure. *Dev Cell.* 2004 Jan;6(1):79–90. DOI: 10.1016/s1534–5807(03)00402–7
169. Rabouille C, Strous GJ, Crapo JD, Geuze HJ, Slot JW. The differential degradation of two cytosolic proteins as a tool to monitor autophagy in hepatocytes by immunocytochemistry. *J Cell Biol.* 1993 Feb;120(4):897–908. DOI: 10.1083/jcb.120.4.897
170. Gómez–Virgilio L, Silva–Lucero MD, Flores–Morelos DS, Gallardo–Nieto J, Lopez–Toledo G, Abarca–Fernandez AM, et al. Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells.* 2022 Jul 22;11(15):1–40. DOI: 10.3390/cells11152262
171. Arstila AU, Trump BF. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol.* 1968 Nov;53(5):687–733. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2013521>
172. Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol.* 1997 Jan 13;136(1):61–70. DOI: 10.1083/jcb.136.1.61
173. Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):1935–45. DOI: 10.1083/jcb.110.6.1935

174. Yagyu M, Yoshimoto K. New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. *J Exp Bot.* 2024 Feb 28;75(5):1234–51. DOI: 10.1093/jxb/erad459
175. Schuck S. Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci.* 2020 Sep 9;133(17):1–10. DOI: 10.1242/jcs.246322
176. Oku M, Sakai Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays.* 2018 Jun;40(6):1–6. DOI: 10.1002/bies.201800008
177. Yang Y, Wang M, Zhang YY, Zhao SZ, Gu S. The endosomal sorting complex required for transport repairs the membrane to delay cell death. *Front Oncol.* 2022 Oct 18;12:1–15. DOI: 10.3389/fonc.2022.1007446
178. Schäfer JA, Schessner JP, Bircham PW, Tsuji T, Funaya C, Schaeff K, et al. ESCRT machinery mediates selective microautophagy of endoplasmic reticulum in yeast. *EMBO J.* 2020 Jan 15;39(2):1–20. DOI: 10.15252/embj.2019102586
179. Zhu L, Jorgensen JR, Li M, Chuang YS, Emr SD. ESCRTs function directly on the lysosome membrane to downregulate ubiquitinated lysosomal membrane proteins. *Elife.* 2017 Jun 29;6:1–20. DOI: 10.7554/eLife.26403
180. Yang X, Zhang W, Wen X, Bulinski PJ, Chomchai DA, Arines FM, et al. TORC1 regulates vacuole membrane composition through ubiquitin- and ESCRT-dependent microautophagy. *J Cell Biol.* 2020 Mar 2;219(3):1–24. DOI: 10.1083/jcb.201902127
181. Li J, Breker M, Graham M, Schuldiner M, Hochstrasser M. AMPK regulates ESCRT-dependent microautophagy of proteasomes concomitant with proteasome storage granule assembly during glucose starvation. *PLoS Genet.* 2019 Nov 18;15(11):1–27. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008387
182. Buono RA, Leier A, Paez-Valencia J, Pennington J, Goodman K, Miller N, et al. ESCRT-mediated vesicle concatenation in plant endosomes. *J Cell Biol.* 2017 Jul 3;216(7):2167–77. DOI: 10.1083/jcb.201612040

183. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 1966;28:435–92. DOI: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
184. Luong AM, Koestel J, Bhati KK, Batoko H. Cargo receptors and adaptors for selective autophagy in plant cells. *FEBS Lett.* 2022 Sep;596(17):2104–32. DOI: 10.1002/1873–3468.14412
185. Zhu X, Li W, Zhang N, Duan H, Jin H, Chen Z, et al. Identification of autophagy–related genes ATG18 subfamily genes in potato (*Solanum tuberosum* L.) and the role of StATG18a gene in heat stress. *Front Plant Sci.* 2024 Aug 27;15:1–15. DOI: 10.3389/fpls.2024.1439972
186. Shinozaki D, Merkulova EA, Naya L, Horie T, Kanno Y, Seo M, et al. Autophagy Increases Zinc Bioavailability to Avoid Light–Mediated Reactive Oxygen Species Production under Zinc Deficiency. *Plant Physiol.* 2020 Mar;182(3):1284–96. DOI: 10.1104/pp.19.01522
187. Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, et al. Processing of ATG8s, ubiquitin–like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell.* 2004 Nov;16(11):2967–83. DOI: 10.1105/tpc.104.025395
188. Li Y, Xu X, Qi G, Cui D, Huang C, Sui X, et al. Mechanisms of autophagy function and regulation in plant growth, development, and response to abiotic stress. *Crop J.* 2023 Dec;11(6):1611–25. DOI: 10.1016/j.cj.2023.09.005
189. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011 Mar;7(3):279–96. DOI: 10.4161/auto.7.3.14487
190. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell.* 2009 May 15;34(3):259–69. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.04.026
191. Jin M, Liu X, Klionsky DJ. SnapShot: Selective autophagy. *Cell.* 2013 Jan 17;152(1–2):1–6. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.004
192. Li F, Vierstra RD. *Arabidopsis* ATG11, a scaffold that links the ATG1–ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy.* 2014 Aug;10(8):1466–7. DOI: 10.4161/auto.29320

193. Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. Atg8–family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.* 2010 Apr 2;584(7):1379–85. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.01.018
194. Hutchins MU, Veenhuis M, Klionsky DJ. Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci.* 1999 Nov;112(Pt 22):4079–87. DOI: 10.1242/jcs.112.22.4079
195. Tuttle DL, Dunn WA Jr. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Cell Sci.* 1995 Jan;108(Pt 1):25–35. DOI: 10.1242/jcs.108.1.25
196. Kim I, Lemasters JJ. Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP–LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 Jan;300(2):308–17. DOI: 10.1152/ajpcell.00056.2010
197. Kim I, Rodriguez–Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jun 15;462(2):245–53. DOI: 10.1016/j.abb.2007.03.034
198. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2014 Jun;16(6):495–501. DOI: 10.1038/ncb2979
199. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2018 Mar;20(3):233–42. DOI: 10.1038/s41556–018–0037–z
200. 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 Jul 11;14(7):1–16. DOI: 10.3390/toxins14070474
201. Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh–Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell.* 2005 May 20;121(4):567–77. DOI: 10.1016/j.cell.2005.03.007
202. Coll NS, Epple P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 2011 Aug;18(8):1247–56. DOI: 10.1038/cdd.2011.37

203. Yang M, Liu Y. Autophagy in plant viral infection. *FEBS Lett.* 2022 Sep;596(17):2152–62. DOI: 10.1002/1873–3468.14349
204. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev.* 2009 Aug;84(3):431–48. DOI: 10.1111/j.1469–185X.2009.00082.x
205. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Poüs C. Autophagy and microtubules – new story, old players. *J Cell Sci.* 2013 Mar 1;126(5):1071–80. DOI: 10.1242/jcs.115626
206. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Oct 12;12(11):709–21. DOI: 10.1038/nrm3209
207. David-Pfeuty T, Erickson HP, Pantaloni D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5372–6. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5372
208. Dimitrov A, Quesnoit M, Moutel S, Cantaloube I, Poüs C, Perez F. Detection of GTP-Tubulin Conformation *in Vivo* Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. *Science.* 2008 Nov 28;322(5906):1353–6. DOI: 10.1126/science.1165401
209. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984 Nov 15–21;312(5991):237–42. DOI: 10.1038/312237a0
210. Samofalova D, Karpov P, Raevsky A, Blume Ya. Protein phosphatases potentially associated with regulation of microtubules, their spatial structure reconstruction and analysis. *Cell Biol Int.* 2019 Sep;43(9):1081–90. DOI: 10.1002/cbin.10810
211. Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 21;18(10):1–18. DOI: 10.3390/ijms18102207
212. Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, Nachury MV, Toso DB, Löhr T, et al. Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 21;116(21):10366–71. DOI: 10.1073/pnas.1900441116

213. Čermák V, Dostál V, Jelínek M, Libusová L, Kovář J, Rösel D, et al. Microtubule–targeting agents and their impact on cancer treatment. *Eur J Cell Biol*. 2020 May;99(4):1–14. DOI: 10.1016/j.ejcb.2020.151075
214. Marchisella F, Coffey ET, Hollos P. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2016 Oct;73(10):596–611. DOI: 10.1002/cm.21300
215. Rayevsky A, Sharifi M, Samofalova D, Karpov P, Blume Ya. Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins. *Cell Biol Int*. 2019 Sep;43(9):1040–8. DOI: 10.1002/cbin.10887
216. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation–induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281(47):36303–16. DOI: 10.1074/jbc.M607031200
217. Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M, Hussey PJ. *Arabidopsis* homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett*. 2004 Jun 4;567(2–3):302–6. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.04.088
218. Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 2006 Feb;7(2):129–45. DOI: 10.1111/j.1600–0854.2005.00368.x
219. Xie R, Nguyen S, McKeegan WL, Liu L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol*. 2010 Nov 22;11:1–12. DOI: 10.1186/1471–2121–11–89
220. Xie R, Nguyen S, McKeegan K, Wang F, McKeegan WL, Liu L. Microtubule–associated protein 1S (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10367–77. DOI: 10.1074/jbc.M110.206532
221. Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*. 2010 Nov 18;68(4):610–38. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.039

222. Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):309–22. DOI: 10.1038/nrm2369
223. Walczak CE, Gayek S, Ohi R. Microtubule–depolymerizing kinesins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29:417–41. DOI: 10.1146/annurev–cellbio–101512–122345
224. Lüders J, Stearns T. Microtubule–organizing centres: a re–evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Feb;8(2):161–7. DOI: 10.1038/nrm2100
225. Roll–Mecak A, McNally FJ. Microtubule–severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Feb;22(1):96–103. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.11.001
226. Sharp DJ, Ross JL. Microtubule–severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci.* 2012 Jun 1;125(Pt 11):2561–9. DOI: 10.1242/jcs.101139
227. Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule minus–end–targeting proteins. *Curr Biol.* 2015 Feb 16;25(4):162–71. DOI: 10.1016/j.cub.2014.12.027
228. Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Feb;20(1):71–6. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.11.010
229. Janke C, Bulinski JC. Post–translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Nov 16;12(12):773–86. DOI: 10.1038/nrm3227
230. Bratman SV, Chang F. Mechanisms for maintaining microtubule bundles. *Trends Cell Biol.* 2008 Dec;18(12):580–6. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.09.004
231. Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule–associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev.* 1995 Oct;75(4):835–64. DOI: 10.1152/physrev.1995.75.4.835
232. Wolf SG, Nogales E, Kikkawa M, Gratzinger D, Hirokawa N, Downing KH. Interpreting a medium–resolution model of tubulin: comparison of zinc–sheet and microtubule structure. *J Mol Biol.* 1996 Oct 4;262(4):485–501. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0530

233. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 1998 Jan 8;391(6663):199–203. DOI: 10.1038/34465

234. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000 Nov 1;19(21):5720–8. DOI: 10.1093/emboj/19.21.5720

235. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani–Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form–II formation. *J Cell Sci*. 2004 Jun 1;117(13):2805–12. DOI: 10.1242/jcs.01131

236. Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu–Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin–1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule–associated protein light chain 3– and GABAA receptor–associated protein–phospholipid conjugates. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36268–76. DOI: 10.1074/jbc.M401461200

237. Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I, Ueno T, Kanematsu T, Mori Y, et al. Solution structure of microtubule–associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24610–7. DOI: 10.1074/jbc.M413565200

238. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy–related ubiquitin–like protein family. *Genome Biol*. 2011 Jul 27;12(7):1–11. DOI: 10.1186/gb–2011–12–7–226

239. Jatana N, Ascher DB, Pires DEV, Gokhale RS, Thukral L. Human LC3 and GABARAP subfamily members achieve functional specificity via specific structural modulations. *Autophagy*. 2020 Feb;16(2):239–55. DOI: 10.1080/15548627.2019.1606636

240. Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE–16, Membrane Transport Modulator and Mammalian Ortholog of Autophagocytosis Factor Aut7p. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25445–50. DOI: 10.1074/jbc.C000307200

241. Barz S, Kriegenburg F, Sánchez–Martín P, Kraft C. Small but mighty: Atg8s and Rabs in membrane dynamics during autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021 Aug;1868(9):1–17. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.119064
242. Stangler T, Mayr LM, Dingley AJ, Luge C, Willbold D. Sequence–specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of human GABA receptor associated protein. *J Biomol NMR.* 2001 Oct;21(2):183–4. DOI: 10.1023/a:1012416810974
243. Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 2004 Sep 15;117(Pt 20):4837–48. DOI: 10.1242/jcs.01370
244. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin–Dependent and Independent Signals in Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 2016 Jan;26(1):6–16. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.08.010
245. UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018 Mar 16;46(5):2699. DOI: 10.1093/nar/gky092.
246. Eargle J, Wright D, Luthey–Schulten Z. Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics.* 2006 Feb 15;22(4):504–6. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti825
247. Hall TA. BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;(41):95–8. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr–14998u1.29
248. Machado MR, Pantano S. SIRAH tools: mapping, backmapping and visualization of coarse–grained models. *Bioinformatics.* 2016 May 15;32(10):1568–70. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw020
249. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404
250. Huang J, MacKerell AD Jr. CHARMM36 all–atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem.* 2013 Sep 30;34(25):2135–45. DOI: 10.1002/jcc.23354

251. Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, et al. CHARMM–GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput.* 2016 Jan 12;12(1):405–13. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00935
252. MacKerell AD Jr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL Jr, Evanseck JD, Field MJ, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B.* 1998 Apr 30;102(18):3586–616. DOI: 10.1021/jp973084f
253. Freedman H, Luchko T, Luduena RF, Tuszynski JA. Molecular dynamics modeling of tubulin C-terminal tail interactions with the microtubule surface. *Proteins.* 2011 Oct;79(10):2968–82. DOI: 10.1002/prot.23155
254. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem.* 2011 Aug;32(11):2359–68. DOI: 10.1002/jcc.21816
255. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington’s disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci.* 2007 Mar 28;27(13):3571–83. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0037–07.2007
256. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys.* 1981 Dec 1;52(12):7182–90. DOI: 10.1063/1.328693
257. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys.* 1995 Nov 15;103(19):8577–93. DOI: 10.1063/1.470117
258. Liu Y, Hu C, Zhao C. Efficient parallel implementation of Ewald summation in molecular dynamics simulations on multi-core platforms. *Comput Phys Commun.* 2011 May;182(5):1111–9. DOI: 10.1016/j.cpc.2011.01.007
259. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2;46(W1):296–303. DOI: 10.1093/nar/gky427

260. Darré L, Machado MR, Pantano S. Coarse-grained models of water. *WIREs Comput Mol Sci*. 2012 Jun 6;2(6):921–30. DOI: 10.1002/wcms.1097
261. Machado MR, Barrera EE, Klein F, Sónora M, Silva S, Pantano S. The SIRAH 2.0 Force Field: Altius, Fortius, Citius. *J Chem Theory Comput*. 2019 Apr 9;15(4):2719–33. DOI: 10.1021/acs.jctc.9b00006
262. Rayevsky A, Samofalova D, Ozheredov S, Karpov P, Blume Ya. The Role of Posttranslational Acetylation in the Association of Autophagy Protein ATG8 with Microtubules in Plant Cells. *Cytol Genet*. 2021 Nov 29;55:510–8. DOI: 10.3103/S0095452721060128
263. Páll S, Abraham MJ, Kutzner C, Hess B, Lindahl E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In: Markidis S, Laure E, editors. *Solving Software Challenges for Exascale*. Cham: Springer; 2015. p. 3–27. DOI: 10.1007/978-3-319-15976-8_1
264. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun*. 1995 Sep 2;91(1):43–56. DOI: 10.1016/0010-4655(95)00042-E
265. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015 Sep;1–2:19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
266. Pronk S, Pall S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013 Apr 1;29(7):845–54. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt055
267. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996 Feb;14(1):33–8. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
268. van Zundert GCP, Rodrigues J, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):720–5. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.014

269. van Zundert GCP, Melquiond ASJ, Bonvin A. Integrative Modeling of Biomolecular Complexes: HADDOCKing with Cryo–Electron Microscopy Data. *Structure*. 2015 May 5;23(5):949–60. DOI: 10.1016/j.str.2015.03.014
270. Fernández–Recio J, Totrov M, Abagyan R. Soft protein–protein docking in internal coordinates. *Protein Sci*. 2002 Feb;11(2):280–91. DOI: 10.1110/ps.19202
271. Yu J, Guo M, Needham CJ, Huang Y, Cai L, Westhead DR. Simple sequence–based kernels do not predict protein–protein interactions. *Bioinformatics*. 2010 Oct 15;26(20):2610–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq483
272. Kraft LJ, Manral P, Dowler J, Kenworthy AK. Nuclear LC3 Associates with Slowly Diffusing Complexes that Survey the Nucleolus. *Traffic*. 2016 Apr;17(4):369–99. DOI: 10.1111/tra.12372
273. Grosdidier S, Totrov M, Fernández–Recio J. Computer applications for prediction of protein–protein interactions and rational drug design. *Adv Appl Bioinform Chem*. 2009 Nov;2:101–23. DOI: 10.2147/AABC.S6272
274. Zientara–Rytter K, Subramani S. Mechanistic Insights into the Role of Atg11 in Selective Autophagy. *J Mol Biol*. 2020 Jan 3;432(1):104–22. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.06.017
275. Kabeya Y, Kawamata T, Suzuki K, Ohsumi Y. Cts1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 4;356(2):405–10. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.02.150
276. Meyer MD, Winzeler J, Taylor SM, Kilgore A, Edicha K, Chitwood C, et al. Mapping Critical Residues in ATG11's Coiled–Coil 2 Domain that Block Multiple Interactions and Disrupt Selective Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 18;9:1–40. DOI: 10.3389/fcell.2021.775364
277. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):132–9. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.12.004
278. Ke PY. Molecular Mechanism of Autophagosome–Lysosome Fusion in Mammalian Cells. *Cells*. 2024 Mar 13;13(6):1–34. DOI: 10.3390/cells13060500

279. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12297–305. DOI: 10.1074/jbc.M900573200
280. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK–Atg13–FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):1992–2003. DOI: 10.1091/mbc.e08–12–1249
281. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient–dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):1981–91. DOI: 10.1091/mbc.e08–12–1248
282. McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EYW. Regulation of nutrient–sensitive autophagy by uncoordinated 51–like kinases 1 and 2. *Autophagy.* 2013 Mar;9(3):361–73. DOI: 10.4161/auto.23066
283. Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA. Kinase–inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C–terminal domains using an Atg13–independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2009 Jan;29(1):157–71. DOI: 10.1128/MCB.01082–08
284. Chang YY, Neufeld TP. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR–mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):2004–14. DOI: 10.1091/mbc.e08–12–1250
285. Li F, Vierstra RD. Regulator and substrate: dual roles for the ATG1–ATG13 kinase complex during autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Autophagy.* 2012 Jun;8(6):982–4. DOI: 10.4161/auto.20240
286. Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre–autophagosomal structure organization. *Genes Cells.* 2007 Feb;12(2):209–18. DOI: 10.1111/j.1365–2443.2007.01050.x
287. Ragusa MJ, Stanley RE, Hurley JH. Architecture of the ATG17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis. *Cell.* 2012 Dec 21;151(7):1501–12. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.028

288. Lin MG, Hurley JH. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Apr;39:61–8. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.02.010
289. Shi X, Yokom AL, Wang C, Young LN, Youle RJ, Hurley JH. ULK complex organization in autophagy by a C-shaped FIP200 N-terminal domain dimer. *J Cell Biol.* 2020 Jul 6;219(7):1–21. DOI: 10.1083/jcb.201911047
290. Chew LH, Setiাপutra D, Klionsky DJ, Yip CK. Structural characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* autophagy regulatory complex ATG17–Atg31–Atg29. *Autophagy.* 2013 Oct;9(10):1467–74. DOI: 10.4161/auto.25687
291. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy–defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993 Oct 25;333(1–2):169–74. DOI: 10.1016/0014–5793(93)80398–e
292. Булгаков ІВ, Раєвський ОВ. Дослідження ATG білків, залучених до формування комплексу ATG1, його взаємодії з білком ATG8 у процесі дозрівання аутофагосом. *Фактори експер евол орг.* 2023;32:136–41. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1550
293. Wang J, Xu C, Sun Q, Xu J, Chai Y, Berg G, et al. Post-translational regulation of autophagy is involved in intra-microbiome suppression of fungal pathogens. *Microbiome.* 2021 Jun 6;9(1):1–18. DOI: 10.1186/s40168–021–01077–y
294. Puente C, Hendrickson RC, Jiang X. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem.* 2016 Mar 11;291(11):6026–35. DOI: 10.1074/jbc.M115.689646
295. Булгаков ІВ, Раєвський ОВ. Реконструкція геометрії молекул ATG13 та ATG101 у процесі складання комплексу. *Фактори експер евол орг.* 2024;35:146–50. DOI: 10.7124/FEEO.v35.1676
296. Zeng XW, Liu CC, Han N, Bian HW, Zhu MY. Progress on the autophagic regulators and receptors in plants. *Yi Chuan.* 2016 Jul 20;38(7):644–50. DOI: 10.16288/j.ycz.15–525
297. Rayevsky A, Bulgakov E, Sharifi M, Samofalova D, Ozheredov D, Karpov P, et al. *In silico* induced effect of N-ε-lysine acetylation on microtubule

stability and subsequent interaction of microtubule-associated proteins. *Cell Biol Int*. 2023 Sep;47(9):1547–57. DOI: 10.1002/cbin.12052 (Scopus/WoS, **Q2**)

298. Popelka H, Klionsky DJ. The role of the N terminus of lipidated human Atg8-family proteins in cis-membrane association. *Autophagy*. 2024 Jan;20(1):1–3. DOI: 10.1080/15548627.2023.2272233

299. Martens S, Fracchiolla D. Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discov*. 2020 May 5;6:1–11. DOI: 10.1038/s41421-020-0155-1

300. Bu F, Yang M, Guo X, Huang W, Chen L. Multiple Functions of ATG8 Family Proteins in Plant Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Jun 10;8:1–13. DOI: 10.3389/fcell.2020.00466

301. Bulgakov E, Rayevsky A, Stykhylias M, Ozheredov S, Spivak S, Blume Ya. Structural flexibility and shape similarity contribute to exclusive functions of certain ATG8 isoforms in the autophagy process. 28 August 2024, PREPRINT (Version 1) available at Research Square DOI:10.21203/rs.3.rs-4831294/v1

302. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107–32. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005

303. Булгаков ІВ, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція моделі мультипротеїнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. *Допов Нац акад наук Укр*. 2025;1:68–76. DOI: 10.15407/dopovidi2025.01.068

304. Kast DJ, Dominguez R. The Cytoskeleton–Autophagy Connection. *Curr Biol*. 2017 Apr 24;27(8):318–26. DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.061

305. Popelka H, Uversky VN, Klionsky DJ. Identification of Atg3 as an intrinsically disordered polypeptide yields insights into the molecular dynamics of autophagy-related proteins in yeast. *Autophagy*. 2014 Jun;10(6):1093–104. DOI: 10.4161/auto.28616

306. Yamada Y, Suzuki NN, Hanada T, Ichimura Y, Kumeta H, Fujioka Y, et al. The Crystal Structure of Atg3, an Autophagy-related Ubiquitin Carrier Protein

(E2) Enzyme that Mediates Atg8 Lipidation. *J Biol Chem.* 2007 Mar 16;282(11):8036–43. DOI: 10.1074/jbc.M611473200

307. Tanida I, Nishitani T, Nemoto T, Ueno T, Kominami E. Mammalian Apg12p, but not the Apg12p.Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Sep 6;296(5):1164–70. DOI: 10.1016/s0006–291x(02)02057–0

308. Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 6;339(1):437–42. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.211

309. Hanada T, Satomi Y, Takao T, Ohsumi Y. The amino-terminal region of Atg3 is essential for association with phosphatidylethanolamine in Atg8 lipidation. *FEBS Lett.* 2009 Apr 2;583(7):1078–83. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.009

310. Hervás JH, Landajuela A, Antón Z, Shnyrova AV, Goñi FM, Alonso A. Human ATG3 binding to lipid bilayers: role of lipid geometry, and electric charge. *Sci Rep.* 2017 Nov 15;7(1):1–15. DOI: 10.1038/s41598–017–15057–6

311. Gao Y, Liu Y, Hong L, Yang Z, Cai X, Chen X, et al. Golgi-associated LC3 lipidation requires V-ATPase in noncanonical autophagy. *Cell Death Dis.* 2016 Aug 11;7(8):1–12. DOI: 10.1038/cddis.2016.236

312. Zhang F, Kumano M, Beraldi E, Fazli L, Du C, Moore S, et al. Clusterin facilitates stress-induced lipidation of LC3 and autophagosome biogenesis to enhance cancer cell survival. *Nat Commun.* 2014 Dec 12;5:1–13. DOI: 10.1038/ncomms6775

313. Zou Y, Ohlsson JA, Holla S, Sabljic I, Leong JX, Ballhaus F, et al. ATG8 delipidation is not universally critical for autophagy in plants. *Nat Commun.* 2025 Jan 5;16(1):1–19. DOI: 10.1038/s41467–024–55754–1

314. Abreu S, Kriegenburg F, Gómez-Sánchez R, Mari M, Sánchez-Wandelmer J, Rasmussen MS, et al. Conserved Atg8 recognition sites mediate Atg4 association with autophagosomal membranes and Atg8 deconjugation. *EMBO Rep.* 2017 May;18(5):765–80. DOI: 10.15252/embr.201643146

315. Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the Role of Autophagy–Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2018 Oct 17;9:1–15. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02334
316. Bo T, Kang Y, Liu Y, Xu J, Wang W. Atg5 Regulates Selective Autophagy of the Parental Macronucleus during Tetrahymena Sexual Reproduction. *Cells*. 2021 Nov 8;10(11):1–16. DOI: 10.3390/cells10113071
317. Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P–binding protein Alfy. *Mol Cell*. 2010 Apr 23;38(2):265–79. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.04.007
318. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*. 2010 Aug;6(6):764–76. DOI: 10.4161/auto.6.6.12709
319. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein–sequence space with high–accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):439–44. DOI: 10.1093/nar/gkab1061
320. Ye Y, Tyndall ER, Bui V, Bewley MC, Wang G, Hong X, et al. Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3–phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy. *Nat Commun*. 2023 Sep 7;14(1):1–12. DOI: 10.1038/s41467-023-41243-4
321. Rao S, Skulsuppaisarn M, Strong LM, Ren X, Lazarou M, Hurley JH, et al. Three–step docking by WIPI2, ATG16L1, and ATG3 delivers LC3 to the phagophore. *Sci Adv*. 2024 Feb 9;10(6):1–12. DOI: 10.1126/sciadv.adj8027
322. Liu N, Xiong Y, Ren Y, Zhang L, He X, Wang X, et al. Proteomic Profiling and Functional Characterization of Multiple Post–Translational Modifications of Tubulin. *J Proteome Res*. 2015 Aug 7;14(8):3292–304. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00308

323. Rayevsky A, Bulgakov E, Blume R, Novozhylov D, Stykhylias M, Ozheredov S, et al. Lysine Acetylation of Plant α -Tubulins: Scaling Up the Local Effect to Large System Transformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2025 Jun 4. DOI: 10.1002/prot.26846 Epub ahead of print. (Scopus/WoS, **Q1**)

324. Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury MV. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol*. 2017 Apr;19(4):391–8. DOI: 10.1038/ncb3481

325. Liu N, Xiong Y, Li S, Ren Y, He Q, Gao S, et al. New HDAC6-mediated deacetylation sites of tubulin in the mouse brain identified by quantitative mass spectrometry. *Sci Rep*. 2015 Nov 19;5:1–9. DOI: 10.1038/srep16869

326. Schaedel L, John K, Gaillard J, Nachury MV, Blanchoin L, Théry M. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater*. 2015 Nov;14(11):1156–63. DOI: 10.1038/nmat4396

327. Littauer UZ, Givon D, Thierauf M, Ginzburg I, Ponstingl H. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Oct;83(19):7162–6. DOI: 10.1073/pnas.83.19.7162

328. Darré L, Machado MR, Brandner AF, González HC, Ferreira S, Pantano S. SIRAH: a structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation and long-range electrostatics. *J Chem Theory Comput*. 2015 Feb 10;11(2):723–39. DOI: 10.1021/ct5007746

329. Fedorov VA, Orekhov PS, Kholina EG, Zhmurov AA, Ataullakhanov FI, Kovalenko IB, et al. Mechanical properties of tubulin intra- and inter-dimer interfaces and their implications for microtubule dynamic instability. *PLoS Comput Biol*. 2019 Aug 30;15(8):1–25. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007327

330. Manka SW, Moores CA. Microtubule structure by cryo-EM: snapshots of dynamic instability. *Essays Biochem*. 2018 Aug 30;62(6):737–51. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007327

331. Howard J, Hyman AA. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*. 2003 Apr 17;422(6933):753–8. DOI: 10.1038/nature01600

332. Kravets E, Yemets A, Blume Ya. Cytoskeleton and nucleoskeleton involvement in processes of cytomixis in plants. *Cell Biol Int*. 2019 Sep;43(9):999–1009. DOI: 10.1002/cbin.10842

333. Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A, Blume Ya. Influence of sucrose starvation, osmotic and salt stresses on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules. *Bull Ukr Soc Genet Breed*. 2017 Mar 29;15(2):174–80. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.15.2.876

334. Wang P, Nolan TM, Yin Y, Bassham DC. Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in *Arabidopsis*. *Autophagy*. 2020 Jan;16(1):123–39. DOI: 10.1080/15548627.2019.1598753

335. Kellner R, De la Concepcion JC, Maqbool A, Kamoun S, Dagdas YF. ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification? *Trends Plant Sci*. 2017 Mar;22(3):204–14. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.11.015

336. Pandey P, Leary AY, Tumtas Y, Savage Z, Dagvadorj B, Duggan C, et al. An oomycete effector subverts host vesicle trafficking to channel starvation-induced autophagy to the pathogen interface. *Elife*. 2021 Aug 23;10:1–35. DOI: 10.7554/eLife.65285

337. Zhuang X, Wang H, Lam SK, Gao C, Wang X, Cai Y, et al. BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2013 Nov;25(11):4596–615. DOI: 10.1105/tpc.113.118307

338. Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell*. 2012 Jan;24(1):288–303. DOI: 10.1105/tpc.111.093112

339. Avin-Wittenberg T, Michaeli S, Honig A, Galili G. ATI1, a newly identified atg8-interacting protein, binds two different Atg8 homologs. *Plant Signal Behav*. 2012 Jun;7(6):685–7. DOI: 10.4161/psb.20030

340. Wywiał E, Singh SM. Identification and structural characterization of FYVE domain-containing proteins of *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biol. 2010 Aug 2;10:1–15. DOI: 10.1186/1471-2229-10-157
341. Zeng Y, Li B, Huang S, Li H, Cao W, Chen Y, et al. The plant unique ESCRT component FREE1 regulates autophagosome closure. Nat Commun. 2023 Mar 30;14(1):1–17. DOI: 10.1038/s41467-023-37185-6
342. Miklaszewska M, Zienkiewicz K, Klugier-Borowska E, Rygielski M, Feussner I, Zienkiewicz A. CALEOSIN 1 interaction with AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 8 facilitates lipid droplet microautophagy in seedlings. Plant Physiol. 2023 Nov 22;193(4):2361–80. DOI: 10.1093/plphys/kiad471
343. Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A, Blume Ya. Expression profiling of kinesins, involved in the development of autophagy in *Arabidopsis thaliana*, and the role of tubulin acetylation in the interaction of Atg8 protein with microtubules. Fakt Eksp Evol Org. 2018 Sep 9;22:162–8. DOI: 10.7124/FEEO.v22.942
344. Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, et al. Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. Mol Cell. 2011 Nov 4;44(3):462–75. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.035
345. Rayevsky A, Sharifi M, Samofalova D, Demchuk O, Karpov P, Blume Ya. *In silico* mechanistic model of microtubule assembly inhibition by selective chromone derivatives. J Mol Struct. 2021 May;1241:1–8. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.130633
346. Leverett CA, Sukuru SC, Vetelino BC, Musto S, Parris K, Pandit J, et al. Design, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of Novel Tubulysin Analogues as ADC Payloads. ACS Med Chem Lett. 2016 Aug 26;7(11):999–1004. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.6b00274
347. Atherton J, Hummel JJ, Olieric N, Locke J, Peña A, Rosenfeld SS, et al. The mechanism of kinesin inhibition by kinesin-binding protein. Elife. 2020 Nov 30;9:1–30. DOI: 10.7554/eLife.61481

348. Vemu A, Atherton J, Spector JO, Szyk A, Moores CA, Roll-Mecak A. Structure and Dynamics of Single-isoform Recombinant Neuronal Human Tubulin. *J Biol Chem*. 2016 Jun 17;291(25):12907–15. DOI: 10.1074/jbc.C116.731133
349. Zhang W, Nishimura T, Gahlot D, Saito C, Davis C, Jefferies HBJ, et al. Autophagosome membrane expansion is mediated by the N-terminus and cis-membrane association of human ATG8s. *Elife*. 2023 Jun 8;12:1–26. DOI: 10.7554/eLife.89185
350. Yi C, Ma M, Ran L, Jingxiang Z, Tong J, Zhu J, et al. Function and Molecular Mechanism of Acetylation in Autophagy Regulation. *Science*. 2012 Apr 27;336(6080):474–7. DOI: 10.1126/science.1216990
351. Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*. 2015 Feb 5;57(3):456–66. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.013

ДОДАТОК

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція моделі мультипротейнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. Допов Нац акад наук Укр. 2025;1:68–76. DOI: 10.15407/dopovidi2025.01.068. (*Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).

2. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Реконструкція геометрії молекул ATG13 та ATG101 у процесі складання комплексу. Фактори експер евол орг. 2024;35:146–50. DOI: 10.7124/FEEO.v35.1676 (*Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, проведення молекулярно-біологічного аналізу, узагальнення та інтерпретація результатів, написання статті*).

3. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Дослідження ATG білків, залучених до формування комплексу ATG1, його взаємодії з білком ATG8 в процесі дозрівання аутофагосом. Фактори експер евол орг. 2023;32:136–41. DOI: 10.7124/FEEO.v32.1550. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та узагальнення результатів, провадження експериментальних досліджень, написання статті*).

Статті у наукових виданнях, індексованих в базах даних Web of Science, Scopus, Google Scholar

4. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Sharifi M, Samofalova D, Ozheredov D, Karpov P, Pantano S, Blume Ya. *In silico* induced effect of N-ε-lysine acetylation on microtubule stability and subsequent interaction of microtubule-associated proteins. Cell Biol Int. 2023;47(9):1547–57. DOI: 10.1002/cbin.12052

(Особистий внесок здобувача: приймав участь у аналізі літературних джерел, розробці схеми досліджень, постановці експериментів, написанні статті) (Scopus/WoS, Q2)

Публікації, що додатково висвітлюють результати дослідження:

5. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume R, Novozhylov D, Stykhylias M, Ozheredov S, et al. Lysine Acetylation of Plant α -Tubulins: Scaling Up the Local Effect to Large System Transformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2025 Jun 4. DOI: 10.1002/prot.26846 Epub ahead of print. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних періоджерел, участь у розробці планів досліджень, постановка експериментів та написання статті) (Scopus/WoS, Q1)*

6. **Bulgakov E**, Rayevsky A, Stykhylias M, Ozheredov S, Spivak S, Blume Ya. Structural flexibility and shape similarity contribute to exclusive functions of certain ATG8 isoforms in the autophagy process. 28 August 2024, PREPRINT (Version 1) available at Research Square DOI:10.21203/rs.3.rs-4831294/v1 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Rayevsky A, **Bulgakov E**, Blume Ya. Structural preconditions for the ATG8 functioning and the effect of lipidation and acetylation on its regulatory mechanism. *B: 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation; 2024 Sept. 11–13; Lviv, Ukraine. 2024. P. 12.*

2. **Булгаков ІВ**, Раєвський ОВ. Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків задля ідентифікації сайтів зв'язування ATG8 *B: IV*

конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (16–18 травня 2024 р.); Київ, Україна. Київ: 2024. С. 6.