

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2025.01.068>

УДК 004.75:004.942

**І.В. Булгаков**, <https://orcid.org/0000-0001-7031-234X>

**О.В. Раєвський**, <https://orcid.org/0000-0002-7596-6294>

**Я.Б. Блюм**, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ, Україна

E-mail: [elihbul@gmail.com](mailto:elihbul@gmail.com)

## Реконструкція моделі мультипротеїнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин

Представлена академіком НАН України С.О. Костеріним

Дослідження спрямовано на вивчення молекулярної природи взаємодії білків ортологів ATG12-ATG5-ATG16 та ATG8 систем кон'югації рослин і людини з подальшим докінгом *in silico* для здійснення подальшої інтеграції в мультимерний комплекс з додаванням білка, що взаємодіє з фосфоінозитидом 2 (WIPI2), та їх відтворення за участю тваринних ортологів систем кон'югації біогенезу аутофагосом.

Грунтовне розуміння теоретичних і практичних аспектів сучасних комп'ютерних технологій має важливе значення для розроблення надійних обчислювальних методів. Впровадження цих методів у поєднанні з глибоким аналізом наукової літератури створює міцну основу для дослідження конформаційних змін білків. Створюючи розрахункові варіації відомої структури білка і забезпечуючи відповідний контент для відтворення та інтерпретації конформаційних змін, можна ідентифікувати функціональні стани, які відповідають специфічним вимогам певної системи. Методи комп'ютерного моделювання дають можливість будувати структурні моделі і відтворювати міжмолекулярні взаємодії. Це дає змогу краще оцінити потенційну взаємодію між майбутніми інгібіторами або лігандами та мішенню. Автори використали моделювання *in silico* для прогнозування та з'ясування потенційних взаємодій між компонентами мультибілкового комплексу.

Вивчено і виявлено особливості молекулярної взаємодії між ортологами ATG12, ATG5 та ATG16 і ATG8 у системах кон'югації рослин і людини. За допомогою методів класичної біоінформатики і молекулярного моделювання створено і повною мірою опрацьовано модель відповідного комплексу з рослинних білків, з можливістю подальшого його перенесення на мембрану та детального розгляду функцій його окремих елементів.

**Ключові слова:** аутофагія, *Arabidopsis thaliana*, ATG білки, молекулярна динаміка.

Ц и т у в а н н я: Булгаков І.В., Раєвський О.В., Блюм Я.Б. Реконструкція моделі мультипротеїнового комплексу, критичного для ліпідизації білка ATG8 під час формування аутофагосоми у рослин. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2025. № 1. С. 68—76. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2025.01.068>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

**Вступ.** Аутофагія є еволюційно консервативним процесом внутрішньоклітинної деградації білків у еукаріотичних організмах, і хоча її молекулярні механізми у рослин споріднені до формування аутофагії у дріжджів і ссавців, рослини характеризуються певними унікальними характеристиками цього процесу [1]. Згідно з сучасними уявленнями, у рослин відомо три типи аутофагії, а саме макроаутофагія, мікроаутофагія та мегааутофагія [1, 2]. Саме макроаутофагія відіграє істотну роль у підтриманні клітинної цілісності та регуляції різноманітних біологічних функцій, зокрема ембріонального розвитку, проростання насіння, росту коренів, пагонів і розвитку квіток, старіння листя, а також врожайності та відповіді рослини на дію стресових чинників [2, 3].

У процесі макроаутофагії виникають невеликі двомембранні структури — так звані ізоляційні мембрани, які в процесі росту поглинають цитоплазму включно з органелами. У разі закриття такої мембранної формації виникає везикула, яка називається аутофагосою. Утворення аутофагосоми оркеструється протеїнами, пов'язаними з аутофагією (ATG), які є висококонсервативними у еукаріотів. З часу ідентифікації в клітинах дріжджів перших білків ATG описано понад 30 генів ATG [4—6]. Більшість основних білків ATG мають рослинні гомологи [1, 7, 8]

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 unc-51-подібної кінази 1 (ULK1). Найцікавіший і незрозумілий етап має місце у початковій фазі, коли убіквітинподібний білок Atg8 кон'югує з головною групою мембранного ліпиду фосфатидилетаноламіну [9]. Процес кон'югації білка Atg8 забезпечується ферментами Atg7 і Atg3. Водночас убіквітинподібний білок Atg12 кон'югує з лізиновим залишком Atg5 за участі Atg7 і Atg10. Потім кон'югат Atg12-Atg5 нековалентно асоціюється з Atg16 і переноситься на фагофор.

Отже, узгоджений механізм у випадку клітин ссавців вже показаний, за винятком окремих деталей. Встановлено, що ссавці мають ортологи більшості дріжджових білків Atg, а також продукують специфічні фактори, притаманні лише вищим еукаріотам. На жаль, чіткої картини для рослинних організмів досі немає через брак експериментальних даних. Для розуміння процесів, що відбуваються в рослинних клітинах ми спробували отримати відповідну інформацію за допомогою методів біоінформатики.

Глибоке розуміння теоретичних і практичних аспектів сучасних обчислювальних технологій є необхідним для розроблення надійних обчислювальних методів. Впровадження цих методів у поєднанні з глибоким аналізом наукової літератури забезпечує міцний фундамент для дослідження змін білків. Створюючи розраховані варіації відомої структури білка і забезпечуючи відповідний контент для відтворення та інтерпретації конформаційних змін, можна ідентифікувати функціональні стани, які відповідають специфічним вимогам певної системи. За допомогою методів комп'ютерного моделювання *in silico* можна будувати структурні моделі та відтворювати міжмолекулярні взаємодії. Це дає змогу краще оцінити потенційну взаємодію між майбутніми інгібіторами або лігандами та мішенню. Автори використали моделювання *in silico* для прогнозування та з'ясування потенційних взаємодій між компонентами мультибілкового комплексу.

Дослідження спрямовано на вивчення молекулярної природи взаємодії білків ортологів ATG12-ATG5-ATG16 та ATG8 систем кон'югації рослин і людини з подальшим *in silico*

докінгом для здійснення майбутньої інтеграції в мультимерний комплекс з додаванням білка, що взаємодіє з фосфоінозитидом 2 (WIP12), та їх подальшого відтворення за участю тваринних ортологів систем кон'югації біогенезу аутофагосом.

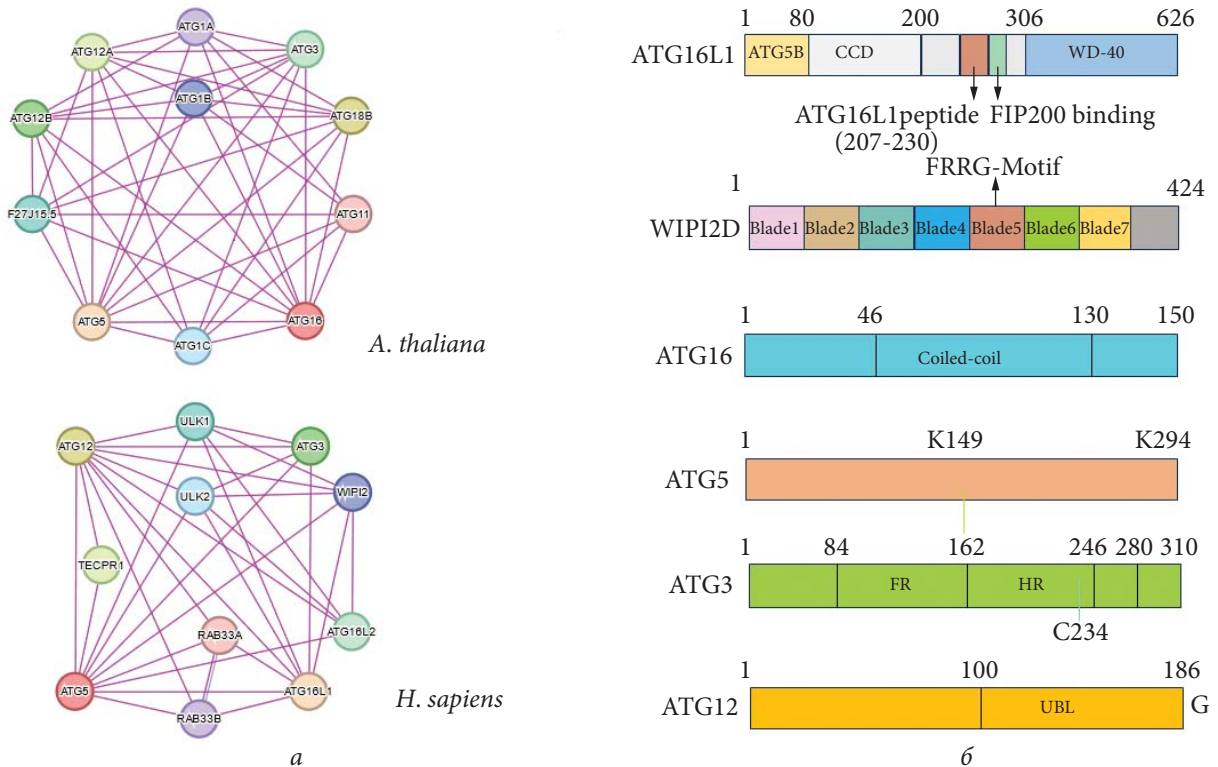
**Мета** дослідження — визначення відмінностей між ортологами білків двох систем кон'югації: E3 убіквітинподібної лігази ATG12-ATG5-ATG16 (перша система) і ATG8 (друга система) із *Arabidopsis thaliana* та *Homo sapiens*. Відповідно, завдання передбачали вирівнювання амінокислотних послідовностей і реконструкцію тривимірних моделей ATG білків рослин. Крім отримання фундаментальних знань щодо консервативності структур комплексу E3-подібної лігази та ATG8 на міжвидовому рівні, ми підготували матеріал, необхідний для вивчення функціонування всього комплексу на поверхні мембрани, а також для розроблення та пошуку інгібіторів взаємодії компонентів цього етапу процесу аутофагії рослин.

**Матеріали та методи.** Амінокислотні послідовності ATG білків, використаних у дослідженні, було отримано з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) [10]. Пошук послідовностей ATG білків із *A. thaliana*, гомологічних тваринним білкам першої (убіквітинподібної) та другої (ATG8) систем кон'югації, здійснювали за допомогою онлайн-сервісу і NCBI BLAST з алгоритмом BLASTp [11]. Використання пропусків і штрафів за пропуски сприяло оптимізації попарного вирівнювання послідовностей. Послідовності вирівнюються на вимогу з E-значенням нижче порогового, яке за замовчуванням встановлено на 0,01.

З метою оптимізації аналізу для кожного запиту реєстрували найменше значення E, а також кількість упорядкованих послідовностей, що містять значення  $E \leq 1$  або 10. Вирівнювання амінокислотних послідовностей виконували за допомогою програми Bioedit [12] з алгоритмом ClustalX (V. 2.0) (<https://www.clustal.org>) [13] і відповідних вагових матриць BLOSUM62 [14]. Архітектуру домену білків було встановлено за результатами аналізу профілю за допомогою SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) та мережевих інструментів STRING [15].

Побудовані 3D моделі цільових ATG білків були оптимізовані методом молекулярної динаміки короткої дії (50 нс) з використанням GROMACS 2020 (<https://www.gromacs.org>) у CHARMM36 силовому полі [16]. Моделі було перевірено за допомогою вбудованих у GROMACS функцій RMSD, розрахунку енергії тощо. Крім того, всі моделі перевірено за допомогою MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) і QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean>) серверів. Усі молекулярно-динамічні розрахунки виконано з використанням ресурсів ґрід-кластеру Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України (<http://grid.ifbg.org.ua/ganglia/>) і Українського національного ґрід-ресурсу ([http://ung.bitp.kiev.ua/resources\\_arc](http://ung.bitp.kiev.ua/resources_arc)).

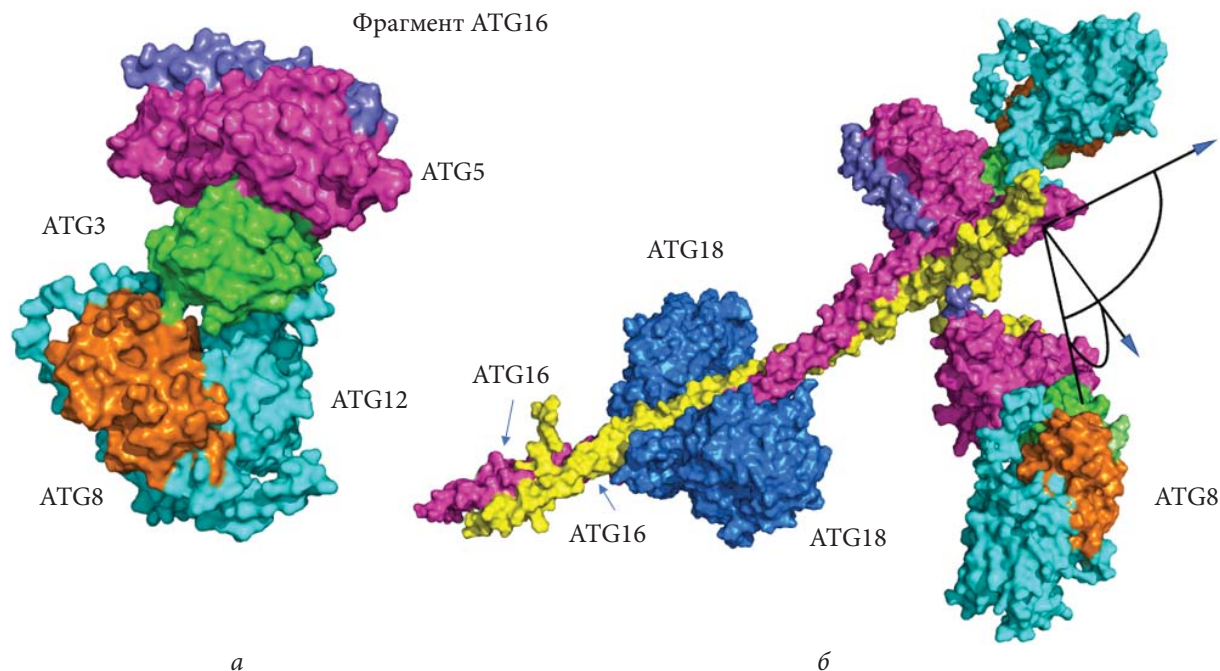
**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати пошуку в базах даних дали можливість чітко зрозуміти, що рослинна клітина загалом має той самий набір білків, залучених до регуляції процесів аутофагії на етапах елонгації та дозрівання аутофагосоми, що і в людини. Для цього нами виконано ряд послідовних вирівнювань гомологічних білків із комплексу ATG12-ATG5-ATG16L1 людини та арабідопсису і визначено особливості їх видоспецифічної доменної організації (рис. 1). Результати вирівнювання показали як високий рівень подібності між парами послідовностей, так і рівномірність розташування ідентичних залишків у послідовностях.



**Рис. 1.** а: Схематичне зображення карти білок-білкових контактів між представниками родини ATG-білків. б: Визначена доменна архітектура білків систем кон'югації. Умовні позначення: ATG5B- зв'язувальна ділянка формує N-кінцевий субдомен; CCD — спіральний домен котушки; FR — гнучка ділянка; HR — ділянка зв'язування;  $\beta$  — шпилька з  $\beta$ -складок; UBL — убіквітинподібний домен; Blade — пропелерна лопать WD40-подібного протеїну

Ступінь гомології білкових пар коливається залежно від досліджуваного білка. Так, для ATG3 встановлено найвищий рівень гомології у 46 % з перекриттям послідовностей Q9NT62 та Q0WWQ1 на 90 %. Для інших учасників E3-подібного макрокомплексу ATG12-ATG5-ATG16L1 і пари ATG3-ATG8 ступінь подібності коливався в межах 28—40 %: результати порівняння послідовностей ATG16 (Q676U5 проти Q6NNP0) та ATG5 (Q9N1Y0 проти Q9FFI2) свідчать про 28 % подібності, а ATG12 (O94817 проти Q8S924) продемонстрували майже 41 % подібності. Такі значення на сьогодні є прийнятними для передбачення тривимірної моделі і ділянок білок-білкових взаємодій на основі шаблонних структур. Наявність довгих структурованих ділянок відрізняє макрокомплекс WIPI2-ATG12-ATG5-ATG16-ATG3 від макрокомплексу ATG1, який є ініціатором аутофагії та відіграє ключову роль на багатьох етапах цього процесу, починаючи з формування аутофагосоми і закінчуючи її асоціацією із мембраною. Особливо цікавою є участь у обох процесах елементів цитоскелету (більшою мірою актину та міозину) через утворення жорсткого каркаса на поверхні везикули та білка ATG8, який і є основним тригерним модулятором функціонального стану аутофагосоми [17]. Ступінь подібності між ATG8 та білком LC3 людини становить лише 37 % при тому, що ізоформи рослинного білка (ATG8a-i) значно різняться між собою.





**Рис. 2.** 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)

За допомогою AlphaFold2 [18] нами отримано структурну модель E2-подібної кон'югази ATG3 у комплексі з білком ATG8. Передбачуваний комплекс ATG3-ATG8 набуває конформації, сумісної як зі зв'язуванням з E1-подібним гомодимером ATG7 на попередньому етапі, так і з утворенням тіофірного зв'язку між каталітичним бічним ланцюгом Cys264 ATG3 і С-кінцевим Gly120 ATG8, що призводить до утворення кон'югату із субстратом E2. Ядро структури білка ATG3 людини має архітектурну подібність до білків Atg3 дріжджів та арабідопсису, як повідомлялося раніше [19]. Воно має внутрішньо неупорядковану ділянку, яка утворює петлю з ~100 залишків, що містить ATG12-зв'язувальну послідовність амінокислот. Міжмолекулярний  $\beta$ -шар, передбачений AlphaFold між залишками ATG3 від 90 до 110 і  $\beta$ 2 ATG8 у нашій структурній моделі, узгоджується з наявністю неканонічного LIR-мотиву в гнучкій ділянці ATG3, який, як нещодавно було продемонстровано, є важливим для ліпідизації ATG8 [20].

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  $\alpha$ -спіральною ділянкою). Це дало можливість нам реконструювати його структуру шляхом підбору геометричних параметрів. Отримана спіральна структура доволі гармонійно узгоджується зі структурами (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 вдалося розробити атомістичну модель з прогнозованими структурами ATG, згенеровану за допомогою AlphaFold2 (рис. 2). Комплекс ATG12-ATG5-ATG16 забезпечує перенесення білка ATG8 з білка ATG3 на фосфотидилета-

ноламін. Результатом взаємодії всіх цих білків є ліпідизація і заякорювання убіхітинподібного білка ATG8 у мембрані, що є характерною ознакою біогенезу аутофагосом [9].

Використовуючи кристалічні структури білків різних організмів, що входять до системи кон'югації ATG8 (ATG3) і забезпечують перенесення його на мембрану (ATG12, ATG5 та ATG16), ми побудували майже повну модель відповідного комплексу з рослинних гомологів. Усі окремі моделі та остаточний комплекс із фрагментом білка ATG16 було релаксовано за допомогою молекулярної динаміки з метою отримання первинної конформації системи в момент суміщення її елементів. У такий спосіб ми стабілізували всі інтерфейси взаємодії і підготували модель для створення асоційованого з мембраною комплексу і вивчення механіки заякорювання ліпідизованого ATG8. Наразі залишається невідомою точна архітектура комплексу ATG16-ATG18. Відомо, що білок ATG16 доставляється до мембран за допомогою WIPI2, причому WIPI2 зв'язується з білком ATG16 через W2IR (WIPI2 interacting region) ділянку (залишки 207—230). У свою чергу, в арабідопсису є ціла родина подібних білків ATG18, які виконують ту саму функцію.

**Висновки.** З використанням амінокислотних послідовностей ATG білків людини здійснено вирівнювання проти бази даних сиквенсів їх рослинних гомологів і визначено ряд гомологів з подібною доменною структурою. Результати аналізу кристалічних даних щодо взаємодії білків комплексу першої та другої системи ATG кон'югації тваринного походження свідчать про можливість побудови відповідного макрокомплексу з організму *A. thaliana* на поверхні ліпідного шару аутофагосоми. Зважаючи на це, нами було реконструйовано кожний з досліджуваних рослинних ATG білків систем ATG12~ATG5-ATG16 та ATG3-ATG8 для формування інтерфейсів взаємодії. Комплекси ATG12—ATG5-ATG3-ATG8 рослинного і тваринного походження пройшли всі етапи перевірки і взаємну геометрію їх компонентів було підтверджено. 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 в організмі рослин.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Bassham D.C., Laporte M., Marty F., Moriyasu Y., Ohsumi Y., Olsen L.J., Yoshimoto K. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*. 2006. **2**, № 1. P. 2—11. <https://doi.org/10.4161/auto.2092>
2. Yagy M., Yoshimoto K. New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. *J. Exp. Bot.* 2024. **75**, № 5. P. 1234—1251. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad459>
3. Zientara-Rytter K., Sirko A. To deliver or to degrade — an interplay of the ubiquitin-proteasome system, autophagy and vesicular transport in plants. *FEBS J.* 2016. **283**, № 19. P. 3534—3555. <https://doi.org/10.1111/febs.13712>
4. Harding T.M., Morano K.A., Scott S.V., Klionsky D.J. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell. Biol.* 1995. **131**, № 3. P. 591—602. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.591>
5. He C., Klionsky D.J. Atg9 Trafficking in Autophagy-Related Pathways. *Autophagy*. 2007. **3**, № 3. P. 271—274. <https://doi.org/10.4161/auto.3912>
6. Yang Z., Klionsky D.J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. **335**. P. 1—32. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1)
7. Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* 2002. **129**, № 3. P. 1181—1193. <https://doi.org/10.1104/pp.011024>

8. Ketelaar T., Voss C., Dimmock S.A., Thumm M., Hussey P.J. Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett.* 2004. **567**, № 2-3. P. 302—306. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.088>
9. Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. **27**. P. 107—132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
10. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023. **51**, Iss. D1. P. D523—D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
11. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. **25**, Iss. 17. P. 3389—3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
12. Eargle J., Wright D., Luthey-Schulten Z. Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics.* 2006. **22**, № 4. P. 504—506. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti825>
13. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007. **23**, № 21. P. 2947—2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
14. Wu M., Yang Y., Wang H., Xu Y. A deep learning method to more accurately recall known lysine acetylation sites. *BMC Bioinformatics.* 2019. **20**, № 1. 49. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2632-9>
15. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021. **49**, Iss. D1. P. D605—D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
16. Huang J., MacKerell A.D., Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 2013. **34**, № 25, pp. 2135—2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
17. Kast D.J., Dominguez R. The cytoskeleton-autophagy connection. *Curr. Biol.* 2017. **27**, № 8. P. R318—R326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.061>
18. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Židek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S., Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022. **50**, Iss. D1. P. D439—D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
19. Ye Y., Tyndall E.R., Bui V., Bewley M.C., Wang G., Hong X., Shen Y., Flanagan J.M., Wang H.G., Tian F. Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3-phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy. *Nat. Commun.* 2023. **14**. 5503. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41243-4>
20. Rao S., Skulsuppaisarn M., StrongL. M., Ren X., Lazarou M., Hurley J.H., Hummer G. Three-step docking by WIPI2, ATG16L1, and ATG3 delivers LC3 to the phagophore. *Sci. Adv.* 2024. **10**, № 6. ead8027. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ad8027>

Надійшла до редакції 10.12.2024

## REFERENCES

1. Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J. & Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, 2, No. 1, pp. 2-11. <https://doi.org/10.4161/auto.2092>
2. Yagyu, M. & Yoshimoto, K. (2024). New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. *J. Exp. Bot.*, 75, No. 5, pp. 1234-1251. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad459>
3. Zientara-Rytter, K. & Sirko, A. (2016). To deliver or to degrade — an interplay of the ubiquitin-proteasome system, autophagy and vesicular transport in plants. *FEBS J.*, 283, No. 19, pp. 3534-3555. <https://doi.org/10.1111/febs.13712>
4. Harding, T. M., Morano, K. A., Scott, S. V. & Klionsky, D. J. (1995). Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell. Biol.*, 131, No. 3, pp. 591-602. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.591>
5. He, C. & Klionsky, D. J. (2007). Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy*, 3, No. 3, pp. 271-274. <https://doi.org/10.4161/auto.3912>

6. Yang, Z. & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 335, pp. 1-32. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1)
7. Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S. & Ohsumi, Y. (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.*, 129, No. 3, pp. 1181-1193. <https://doi.org/10.1104/pp.011024>
8. Ketelaar, T., Voss, C., Dimmock, S. A., Thumm, M. & Hussey, P. J. (2004). Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett.*, 567, No. 2-3, pp. 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.088>
9. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, pp. 107-132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
10. The UniProt Consortium (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.*, 51, Iss. D1, pp. D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
11. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, Iss. 17, pp. 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
12. Eargle, J., Wright, D. & Luthey-Schulten, Z. (2006). Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics*, 22, No. 4, pp. 504-506. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti825>
13. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, No. 21, pp. 2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
14. Wu, M., Yang, Y., Wang, H. & Xu, Y. (2019). A deep learning method to more accurately recall known lysine acetylation sites. *BMC Bioinformatics*, 20, No. 1, 49. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2632-9>
15. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J. & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.*, 49, Iss. D1, pp. D605-D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
16. Huang, J. & MacKerell, A. D., Jr. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.*, 34, No. 25, pp. 2135-2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
17. Kast, D. J. & Dominguez, R. (2017). The cytoskeleton-autophagy connection. *Curr. Biol.*, 27, No. 8, pp. R318-R326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.061>
18. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D. & Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.*, 50, Iss. D1, pp. D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
19. Ye, Y., Tyndall, E. R., Bui, V., Bewley, M. C., Wang, G., Hong, X., Shen, Y., Flanagan, J. M., Wang, H. G. & Tian, F. (2023). Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3-phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy. *Nat. Commun.*, 14, 5503. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41243-4>
20. Rao, S., Skulsuppaisarn, M., Strong, L. M., Ren, X., Lazarou, M., Hurley, J. H. & Hummer, G. (2024). Three-step docking by WIPI2, ATG16L1, and ATG3 delivers LC3 to the phagophore. *Sci. Adv.*, 10, No. 6, eadj8027. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adj8027>

Received 10.12.2024



E. V. Bulgakov, <https://orcid.org/0000-0001-7031-234X>

A. V. Rayevsky, <https://orcid.org/0000-0002-7596-6294>

Ya. B. Blume, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: elihbul@gmail.com

## RECONSTRUCTION OF A MODEL OF A MULTIPROTEIN COMPLEX CRITICAL FOR ATG8 LIPIDATION DURING AUTOPHAGOSOME FORMATION IN PLANTS

Autophagy represents a fundamental cellular process, whereby molecules and subcellular elements, including nucleic acids, proteins, lipids, and organelles, are eliminated through lysosome-mediated degradation. This process plays a crucial role in maintaining cellular homeostasis, promotes differentiation, supports development and contributes to cell survival.

The research is devoted to the study of the molecular nature of the interaction of proteins of the ATG12-ATG5-ATG16 and ATG8 orthologs of plant and human conjugation systems with subsequent *in silico* docking for the implementation of future integration into a multimeric complex with the addition of phosphoinositide interacting protein 2 (WIPI2), and their subsequent reproduction with animal orthologs of autophagosome biogenesis mating systems.

A thorough comprehension of both theoretical and practical aspects of modern computing is essential for the development of robust computational methods. The introduction of these methods combined with an in-depth review of the scientific literature provides a solid foundation for the study of protein conformational changes. By creating calculated variations of a known protein structure and providing the appropriate content for reproduction and interpretation of conformational changes, it is possible to identify functional states that align with the specific requirements of a given system. The employment of computer modeling methodologies permits the construction of structural models and the replication of intermolecular interactions. This enables an enhanced evaluation of the prospective interaction between future inhibitors or ligands and the target. The authors utilized *in silico* modeling to predict and elucidate potential interactions between the components of a multi-protein complex.

**Keywords:** *autophagy, Arabidopsis thaliana, ATG proteins, molecular dynamics.*