

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

---

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярной биологии

Моторин Никита Андреевич

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА АМИЛОИДНОГО БЕЛКА  
ДРОЖЖЕЙ BGL2P, ПОИСК ОСТАТКОВ АМИНОКИСЛОТ,  
МОДИФИКАЦИИ КОТОРЫХ ВЛИЯЮТ НА ЕГО  
ЗАКРЕПЛЕНИЕ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научные руководители:

профессор, д.б.н. Т.С. Калеева,

Доцент, д.ф-м.н. А.К. Шайтан,

Сотрудник кафедры молекулярной биологии В.В. Рекстина

Биологический факультет МГУ

Кафедра молекулярной биологии

Москва – 2022 г.

## Список сокращений

AA – акриламид

bp – пар нуклеотидов

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

GFP – зелёный флуоресцентный белок

LC-MS/MS - метод жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии

MBA – N,N'-метилен-бисакриламид

OD – оптическая плотность

PAGE – полиакриламидный гель

PBS – натрий-фосфатный буфер

PCR – полимеразная цепная реакция

PEG –полиэтиленгликоль

PMSF – фенилметилсульфотригид

PSA – персульфат аммония

SDS – додецилсульфат натрия

TEMED – тетраметилендиамин

wt – дикий тип штамма *S.cerevisiae* BY4742

$\beta$ -Met –  $\beta$ -меркаптоэтанол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КС – клеточная стенка

ПТМ – посттрансляционные модификации

# Содержание

Список сокращений .....	2
Содержание .....	3
Введение .....	5
Обзор литературы .....	8
Амилоидные белки.....	8
Свойства амилоидов.....	9
Алгоритмы, предсказывающие амилоидные пептиды в белках .....	12
Bgl2p - амилоидный белок клеточной стенки дрожжей .....	13
Посттрансляционные модификации Bgl2p и способы его закрепления в клеточной стенке .....	15
Фосфорилирование как механизм регуляции конформации глобулярных и амилоидных белков .....	17
Глутатионилирование белков.....	18
<b>Материалы и методы.....</b>	<b>20</b>
Реактивы .....	20
Среды для выращивания микроорганизмов.....	20
Штаммы, использованные в работе и условия выращивания .....	20
Использованные плазмиды.....	20
Выбор олигов гидовых РНК и олигов ДНК-матрицы с заменой, режим гибридизации .....	20
Подготовка компетентных клеток <i>E.coli XL1-Blue</i> для наработки плазмид .....	21
Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i> плазмидой .....	21
Выделение плазмид из трансформированных клеток <i>E.coli</i> .....	22
PCR .....	22
Эллюция ДНК из геля .....	22
Трансформация дрожжей .....	22
Выделение геномной ДНК из трансформированных дрожжей для проверки правильности вставки.....	23
Лигирование pWS082 с гидовыми РНК .....	23
Электрофорез ДНК.....	24
Секвенирование ДНК.....	24
Выделение клеточных стенок .....	24
Частичная депротеинизация клеточных стенок .....	24
Экстракция Т- и G-пулов из частично депротеинизированных клеточных стенок .....	25
LC-MS/MS –анализ .....	25
SDS-PAGE-электрофорез .....	25
Вестерн блот .....	26
Окрашивание мембраны антителами .....	26
Получение очищенного препарата Bgl2p.....	27

Условия молекулярно-динамических расчетов и используемые программы.....	27
Построение системы с фосфорилированным белком .....	27
<b>Результаты и обсуждение .....</b>	<b>29</b>
ПТМ Bgl2p из Т-пула штамма <i>pho3Δ</i> .....	29
Получение штамма V84 .....	30
Закрепление и ПТМ Bgl2p штамма V84.....	37
Модель Bgl2p для молекулярно-динамических расчетов: выбор и валидация .....	39
Множественное фосфорилирование Bgl2p: механизм стабилизации .....	43
Единичное фосфорилирование T84: влияние на глобулу Bgl2p и амилоидную фибриллу из пептидов 83-88.....	51
Очищенный препарат Bgl2p способен к формированию фибрилл .....	54
<b>Заключение .....</b>	<b>56</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>58</b>
<b>Личный вклад и благодарности .....</b>	<b>59</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>60</b>

## Введение

Bgl2p – мажорный консервативный и конститутивный амилоидный белок клеточной стенки дрожжей (идентификатор в Uniprot P15703). Данный белок необходим для дрожжей для переживания нагревания и обезвоживания (Sabirzyanov et al., 2018).

Bgl2p после экстракции способен к формированию фибрилл амилоидного типа (Kalebina et al., 2008). В клеточной стенке представлено два по-разному закрепленных SDS-устойчивых белковых пула, мажорным белком в которых и единственным на уровне чувствительности метода электрофореза, является Bgl2p. При этом Bgl2p в этих двух пулах имеет разный набор ПТМ (Rekstina et al., 2020).

Прочно закреплённый Bgl2p, экстрагируемый 6 М раствором гуанидин хлорида (Bgl2p G-пула) и по-видимому обладающий выраженными амилоидными свойствами, содержит молекулы Bgl2p с единичным фосфорилированием по треонину 84 (T84) и молекулы Bgl2p без фосфорилирований. В то время как в менее прочно закрепленном Bgl2p, экстрагируемом раствором 0.1 М триса (Bgl2p Т-пула), было выявлено 11 фосфорилированных остатков (включая T84), распределённых по трём пептидам данного белка, выявленных после трипсинолиз в ходе LC-MS/MS –анализа, а также характерное только для Bgl2p Т-пула глутатионилирование по цистеину 68 (C68) (Rekstina et al., 2020).

Отметим, что единственным из всех идентифицированных сайтов фосфорилирования в составе амилоидогенных пептидов Bgl2p находится T84, тогда как остальные 10 сайтов не находятся в амилоидогенных областях белка (Rekstina et al., 2020, Bezsonov et al., 2013). Этим пептидом является пептид 83-88, способность к фибрилизации которого была ранее доказана (Bezsonov et al., 2013). Вместе с этим, фосфорилирование T84 в штамме дикого типа, в отличие от всех остальных идентифицированных сайтов фосфорилирования, можно рассматривать как наиболее конститутивное, поскольку T84 остаётся фосфорилированным в части молекул всегда - вне зависимости от среды выращивания (диплом Овчаренко 2020-2021). При этом фосфорилирование T84 присутствует как в Bgl2p Т-пула, так и в Bgl2p G-пула (Rekstina et al., 2020).

Также, по данным, полученным в лаборатории Калебиной Т. С., в мутанте с делецией гена *PHO3* (*pho3Δ*) полностью отсутствует Bgl2p G-пула. Неизвестно, может ли отсутствие Bgl2p G-пула, в случае данного штамма, коррелировать с отличием в наборе ПТМ Bgl2p относительно обычных клеток дикого типа. А именно, может ли данный эффект быть

связан с отсутствием важных сигнальных ПТМ, необходимых для перехода части Bgl2p из Т-пула в G-пул (Rekstina et al., 2020). Изучение ПТМ Bgl2p в данном штамме может служить одним из возможных подходов, потенциально способных расширить представление о том, какие ПТМ могут являться сигналами к закреплению Bgl2p в G-пуле, а какие - нет.

Вместе с этим, остаётся неизвестным молекулярный механизм влияния ПТМ на способ закрепления Bgl2p. И может ли этот механизм заключаться в регуляции конформации белка и его способности к фибриллообразованию. В то время, как глутатионилирование по С68, вероятно, не оказывает значимого влияния на конформацию Bgl2p (Rekstina et al., 2020), роль фосфорилирования в регуляции конформации и способности Bgl2p к фибриллизации, подробно изучена не была.

Учитывая принадлежность Bgl2p к семейству маленьких глобулярных и однодоменных белков семейства GH17 с небольшим содержанием элементов  $\beta$ -структуры (Pfam data base) и отсутствие экспонированных на поверхность белка амилоидогенных пептидов (Bezsonov et al., 2013), вероятной является необходимость разупорядочивания глобулярной формы Bgl2p в случае её перехода в амилоидную конформацию. После чего, в формировании кросс- $\beta$ -структуры могут принимать участие амилоидогенные пептиды, расположенные в глобулярной форме в составе гидрофобного ядра, одним из которых является 83-88 (Bezsonov et al., 2013). Значит, оценивая вероятность перехода в амилоидную форму того или иного варианта фосфорилирования Bgl2p, необходимо учитывать значение свободной энергии и конформационную стабильность глобулярной формы, а также, не имея информации о структуре фибриллы Bgl2p, влияние, по всей видимости очень важного фосфорилирования Т84 в составе амилоидогенного пептида 83-88, на стабильность модельной фибриллы.

**Целью** данной работы является поиск посттрансляционных модификаций Bgl2p, имеющих влияние на его конформацию и способствующих его закреплению в КС.

Были поставлены задачи:

- 1) Изучить набор посттрансляционных модификаций Bgl2p в штамме *pho3Δ* с отсутствующим G-пулом Bgl2p.
- 2) Получить мутант с заменой Т84 на V (штамм V84) и изучить влияние этой замены на способ закрепления Bgl2p в КС и его ПТМ.

3) Исследовать влияние множественного фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p с использованием методов молекулярного моделирования.

4) С помощью методов молекулярного моделирования исследовать влияние единичного T84 фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p и амилоидную фибриллу из амилоидогенных пептидов 83-88, объяснить разницу в способе закрепления по-разному модифицированных белков.

5) Изучить способность очищенного от примесных белков Bgl2p к формированию фибрилл амилоидного типа и набора ПТМ в таком препарате.

## Обзор литературы

### Амилоидные белки

Термин "амилоид" (amylon (греч.), amyllum (лат.) - крахмал) был впервые принят Рудольфом Вирховым в 1854 году. Первоначально его применяли в ботанике для обозначения агрегатов крахмальных зёрен в растительной клетке, но впоследствии термин стали использовать для обозначения белковых агрегатов особой структуры и белков, способных эти структуры образовывать (Eisenberg and Jucker, 2012). В настоящее время *амилоидными* называют белки, способные формировать спирально симметричные фибриллы за счёт так называемых *амилоидных (или амилоидогенных) последовательностей* аминокислот – участков, склонных к образованию *кросс-β-структуры*, которая представляет собой фибриллу, в которой β-тяжи расположены перпендикулярно ее оси (Chiti and Dobson, 2006; Sunde et al., 1997; Nelson and Eisenberg, 2006). Организация амилоидной фибриллы была изучена при помощи рентгеновского анализа и последующей интерпретации дифракционной картины (Рис.1.).

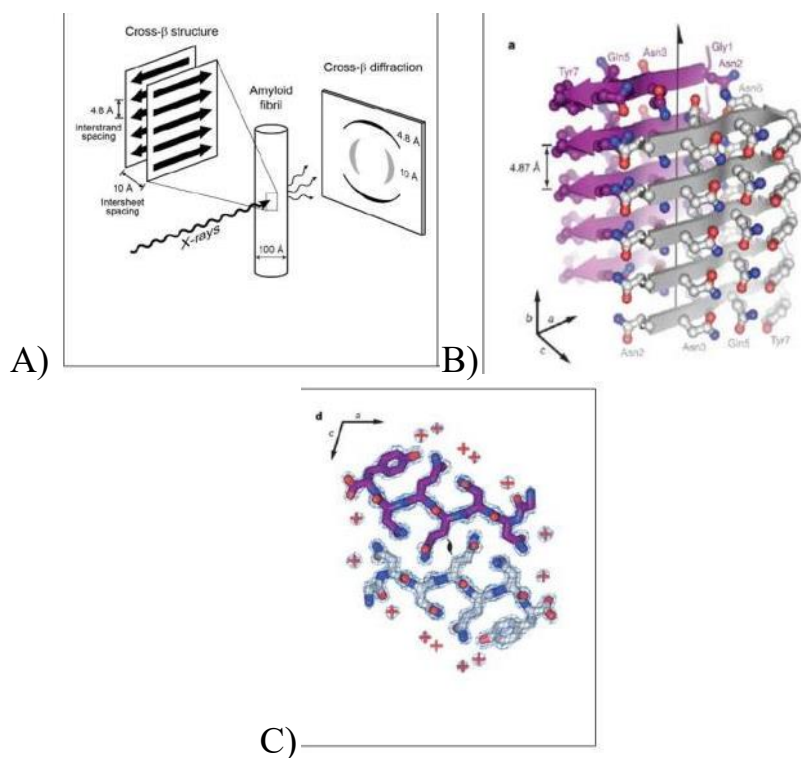


Рис.1. Кросс- β-структура (Eisenberg and Jucker, 2012)

А) Дифракционная картина, наблюдаемая при направлении рентгеновских лучей перпендикулярно оси амилоидной фибриллы; «межниточное» (4,8 Å) и «межлистовое» (10 Å) расстояние. Рефлексы с расстоянием 4,8 Å вдоль меридиана (вертикали) показывает протяженные белковые цепи, идущие



перпендикулярно фибрилле и расположенные на расстоянии 4,8 Å друг от друга. Еще рефлексы на расстоянии ~10 Å вдоль экватора (по горизонтали) показывают, что вытянутые цепи организованы в листы, расположенные на расстоянии ~10 Å друг от друга. Для менее хорошо ориентированных фибрилл оба рефлекса размазаны в круговые кольца.

В) Стерическая структура сегмента (амилоидной) последовательности GNNQQNY дрожжевого приона Sup35. Стрелка соответствует оси фибриллы.

С) Пример стерической молнии (стерической застёжки). Два β-листа рассматриваются вниз по оси. Молекулы воды, показанные красным цветом. Красные карбонильные группы и синие аминные группы образуют водородные связи вверх и вниз между слоями листа.

На рис.1. показана фибрилла амилоида Sup35 (Kushnirov et al., 2007) с типичным для амилоидов типом укладки. Однако необходимо отметить, что возможно формирование амилоидоподобных фибрилл, в основе которых лежит кросс-α-структура, а не кросс-β-структура. В основе такой структуры лежат не β-листы, а α-спирали. Кросс-α-структура во многом аналогична кросс-β-структуре, также имеет стерические молнии на стыке двух так называемых “α-листов” (структур, состоящих из параллельно расположенных α-спиралей) и обладает свойствами, характерными для амилоидов (Tayeb-Fligelman et al., 2017; Zheng et al., 2018).

Однако такой тип укладки является достаточно редким и типичной для амилоидов является именно кросс-β-структура, определяющая ряд характерных для амилоидов особенностей.

### **Свойства амилоидов**

Описывая особенности амилоидных белков, необходимо упомянуть, что амилоидная фибрилла (в состоянии *кросс-β-структуры*) относится к числу наиболее стабильных конформаций белка (Smith et al., 2006). Прочность бывает сопоставимой с прочностью стали (~0,6-1,8 ГПа). Например, амилоиды инсулина имеют прочность на разрыв ~0,6±0,4 ГПа (Benson et al., 2018).

Кросс-β-структура фибриллы амилоидов крайне устойчива к высоким температурам, обработкам кислотами и щелочами, воздействию протеаз, ионными детергентами, SDS (додецилсульфату натрия) и лаурилсаркозинат натрия (Benson et al., 2018). Такая особенность достигается благодаря межмолекулярным водородным связям, а также взаимодействиям между боковыми радикалами соседних полипептидных цепей: гидрофобным взаимодействиям, стэкинг-взаимодействиям и солевым мостикам (LeVine, 1999; Lu et al., 2013). Интересно, что, по всей видимости, именно благодаря аномальной устойчивости амилоида возможно существование некоторых экстремофильных видов архей: например, основным белком оболочки *Methanosaeta thermophila* является амилоид MspA (Dueholm et al., 2015).

Такая невероятная стабильность амилоидов объясняет их положение на энергетическом профиле относительно типичной глобулярной укладки белка: значение свободной энергии амилоида, как правило, значительно меньше такового у глобулярной конформации (Рис.2.) (Cordeiro et al., 2014). Между этими двумя энергетическими минимумами имеется значительный энергетический барьер, для преодоления которого может оказаться необходим ряд факторов, которые так или иначе облегчают переход в амилоидную форму, часто за счёт перехода через некоторый частично денатурированный интермедиат (мутации в амилоидогенных областях, ПТМ, определённые вещества в среде и ряд других факторов.).

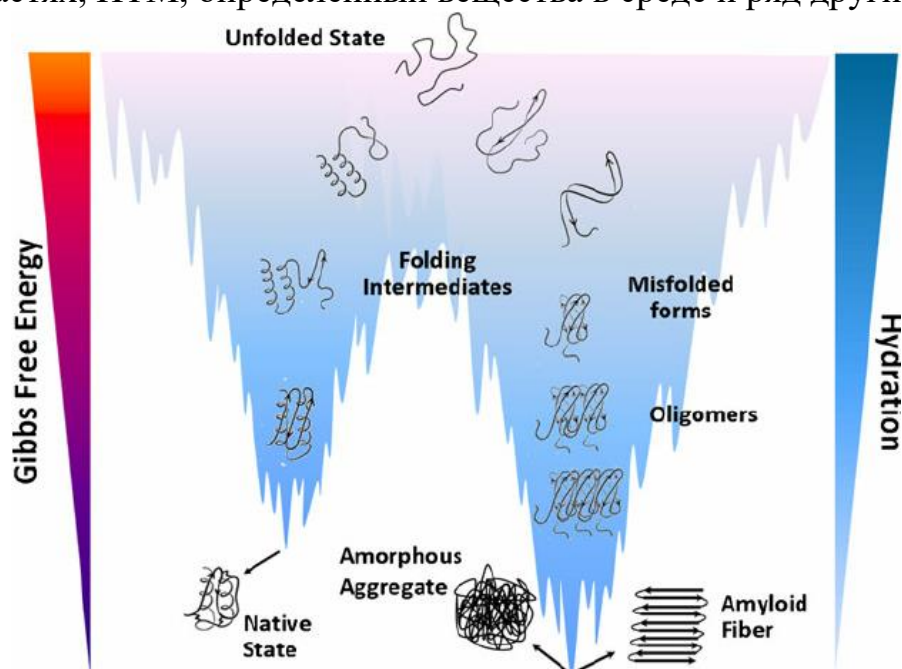


Рис.2. Профиль свободной энергии для амилоидов и белков нативной глобулярной укладки (Cordeiro et al., 2014).

Также амилоиды часто имеют свойство связывать ионы двухвалентных металлов в процессе образования фибриллы. Например, как в случае А $\beta$ -пептида млекопитающих идёт связывание ионов цинка (Kozin et al., 2014).

Показана способность амилоидов связываться с некоторыми ароматическими красителями (например, с тиофлавином Т и Конго красным (Рис.3. А, Б)), формируя окрашенные комплексы, что обусловлено особенностью структуры этих белков (LeVine, 1999). В случае связывания тиофлавина Т, например, реализуются белково-индуцированные фотофизические изменения, приводящие к появлению синей окраски комплекса  $\beta$ -обогащённых областей в молекуле амилоида с тиофлавином Т (Wolfe et al., 2010), хотя, вполне вероятно, подобные

процессы происходят не только в комплексе с  $\beta$ -обогащённой областью, поскольку тиофлавин Т также окрашивает амилоид с кросс- $\alpha$ -структурой в основе фибриллы (Tayeb-Fligelman et al., 2017). Несмотря на то, что Конго красный и тиофлавин Т являются основными веществами для визуализации амилоидов как на гистологических препаратах, так и *in vitro*, существуют и другие молекулы, способные быть маркерами на амилоиды (Рис.3. В).

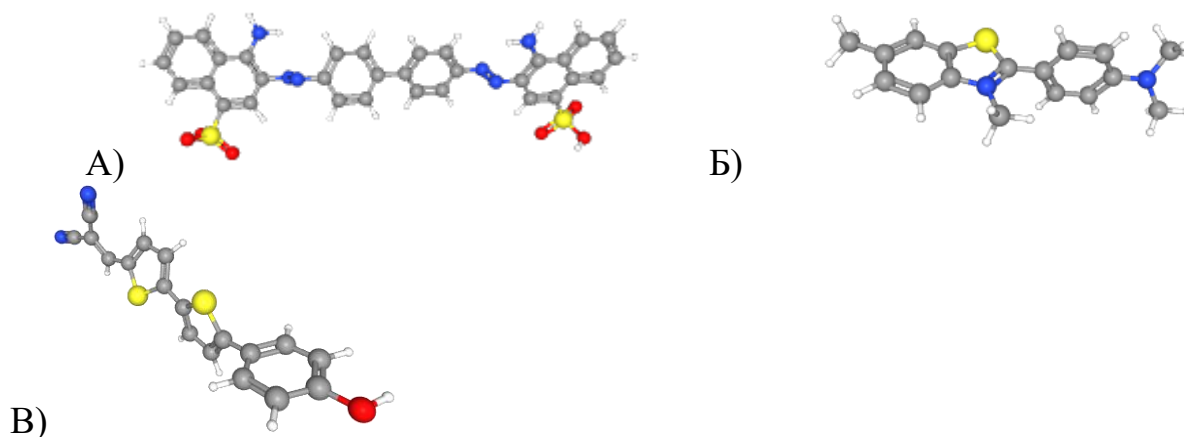


Рис.3. Структура Конго Красного (А) Тиофлавина Т (Б) и NIAD-4 (В) (PubChem).

Серым цветом отмечены атомы углерода, синим – азота, красным – кислорода, жёлтым – серы, белым - водорода.

В основе типичного амилоида находится кросс- $\beta$ -структура, состоящая из двух  $\beta$ -листов. В основе амилоидных фибрилл могут лежать как параллельные, так и антипараллельные  $\beta$ -листы. При этом, потенциально может существовать 8 симметрических классов таких фибрилл, для каждого из которых существует пример амилоида, формирующих в своей основе именно такие по типу симметрии структуры (рис.4.) (Relini et al., 2013).

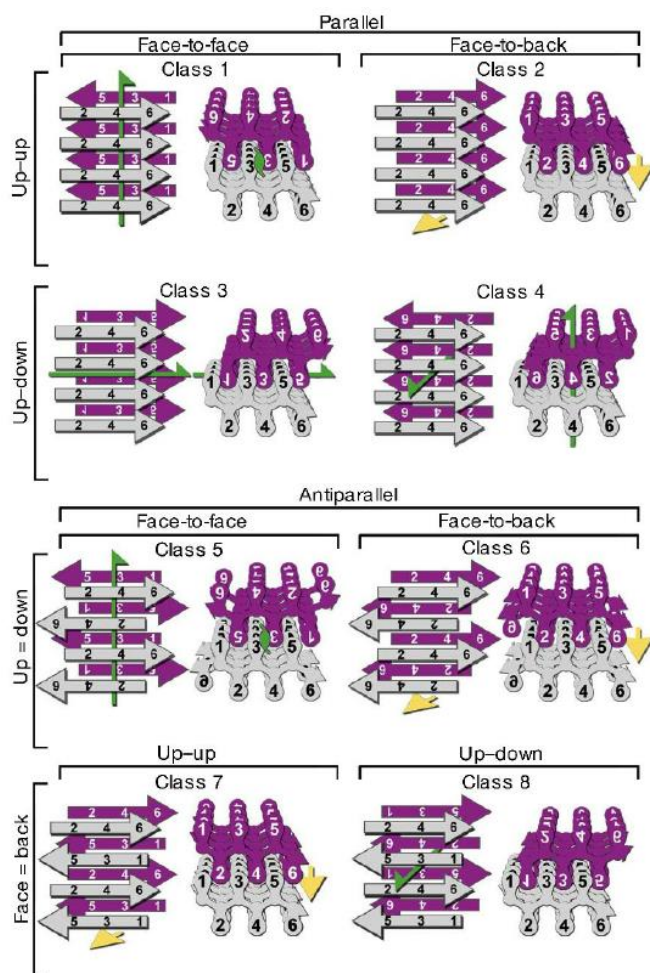


Рис.4. Симметрические классы амилоидов (Relini et al., 2013).

### Алгоритмы, предсказывающие амилоидные пептиды в белках

Отметим, что методы поиска конкретных мотивов, обуславливающих возможность формирования амилоидной фибриллы, за последнее время прошли большой путь от исключительно экспериментального подхода (в котором изучалась способность к фибриллизации целого спектра фрагментов конкретного белка) до эпохи синтеза экспериментальных данных с рядом компьютерных программ, способных предсказывать по аминокислотной последовательности амилоидогенные последовательности в конкретном белке. Так, например, сейчас выделяют три типа организации протофибрилл, но во всех этих типах могут присутствовать так называемые  $\beta$ -аркады ( $\beta$ -arcade), которые представляет собой мотив "нить-петля-нить". Существуют алгоритмы, которые на основании поиска этих структур способны достоверно предсказать амилоидность и амилоидогенность ряда белков (Kajava et al., 2010; Roche et al., 2017; Bondarev et al., 2018).

Хочется отдельно отметить алгоритм CORDAX, использующий продвинутую нейросеть, способную генерировать из входящих данных сиквенса белка потенциальные кросс- $\beta$ -структуры из гексапептидов (Louros et.al, 2020).

### **Bgl2p - амилоидный белок клеточной стенки дрожжей**

Белок Bgl2p (он же белок гена BGL2, GP29, растворимый белок клеточной стенки 9, YGR282C) является мажорным и конститутивным белком клеточной стенки дрожжей (идентификатор в Uniprot P15703). *S.cerevisiae* содержат одну копию этого гена BGL2, который расположен в 7 хромосоме (нуклеотиды 1058724-1057783).

Bgl2p обладает литической эндо- $\beta$ -1,3-глюканазной (т.е. может участвовать в деградации  $\beta$ -глюкана) и синтетической эндо- $\beta$ -1,3-глюканотрансферазной активностью. Bgl2p также важен при расширении клетки во время роста, в процессе конъюгации, и в отделении споры в период спорогенеза (AmyPro).

Bgl2p относится к семейству гликозидных гидролаз 17 (GH17) клана GH-A (data base uniprot 15.02.22). Белок имеет небольшую массу: 31,5–34 кДа в зависимости от видовой принадлежности дрожжей. У пекарских дрожжей имеет длину в 313 аминокислотный остаток, на данное время существуют расхождения о том, какой из двух потенциальных сайтов N-гликозилирования (Asn-202 и Asn-284) является гликозилированным в действительности: одни исследователи считают, что только Asn-284 (Mrsa et. Al, 1993), другие, напротив, что 202 (Rekstina et al., 2020).

Bgl2p является амилоидным белком и обладает рядом характерных для амилоидных белков свойств: он устойчив к гидролизу трипсином и протеиназой K в составе клеточной стенки, а также не может быть экстрагирован из нее с помощью 1 % раствора SDS в воде при 37 °C (в отличие от всех других нековалентно закрепленных в полисахаридной основе белков стенки), при нейтральных и слабокислых значениях pH, выделенный из клеточной стенки Bgl2p фибриллизуется (Kalebina et al., 2008; Bezsonov et al., 2013). Структуры фибриллярного типа, формируемые данным белком после экстракции из КС, представлены на рисунке 5.

С помощью биоинформатического анализа было выявлено несколько амилоидогенных пептидов в составе Bgl2p, после чего экспериментально была изучена их способность к фибриллообразованию (Bezsonov et al., 2013). Амилоидогенные пептиды AEGFTIFVGV, VDSWNVLVAG и VMANAFSYWQ обладают способностью к фибрилляции при значениях pH от 3,2 до 5,0. Амилоидогенные пептиды, за исключением VDSWNVLVAG, могут фибриллироваться также при значениях pH от 5,0 до 7,6 (Bezsonov et al., 2013). Отметим, что в составе молекулы Bgl2p эти

пептиды находятся в составе гидрофобного  $\beta$ -барреля и в случае глобулярной конформации окружены  $\alpha$ -спиралями, на поверхность не экспонированы. Таким образом, участие этих пептидов в фибриллизации полноразмерного Bgl2p возможна в случае значительных конформационных переходов всей молекулы.

Примечательно, что Bgl2p без С-терминальной области не способен к формированию фибриллярных структур (Sabirzyanov et al., 2018). Что может свидетельствовать либо о важности С-конца в формировании фибриллы, либо о влиянии С-конца на конформацию иных важных для фибриллизации областей белка, включая выявленные амилоидогенные пептиды.

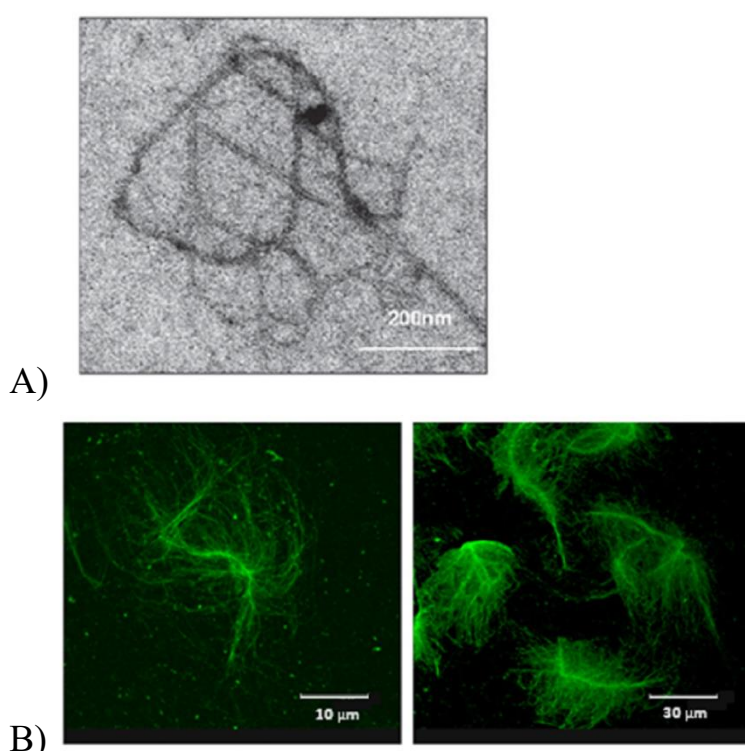


Рис.5. Структура и морфология фибрилл Bgl2p

А) Электронная микроскопия (Kalebina et al., 2008);  
 В) Флуоресцентная микроскопия, окраска фибрилл антителами к Bgl2p (Bezsonov et al., 2013)

Bgl2p, как было сказано ранее, относится к семейству GH17, представители которого имеют крайне консервативную укладку типа TIM-баррель. Ни один из представителей данного семейства по ранее опубликованным данным, не способен к формированию фибрилл амилоидного типа.

Примечательно, что в большинстве своём, белки семейства GH17 - это небольшие белки, содержащий только один домен своего же семейства (база данных белковых семейств pfam

<https://pfam.xfam.org/family/PF00332>), в то время как большинство функциональных амилоидов либо имеют в своем составе несколько доменов, один из которых является амилоидогенным (Ramsook et al., 2010), либо же имеют укладку, обогащенную элементами  $\beta$ -структур (Borelli et al., 2008).

Таким образом, фибрилообразование Bgl2p, по всей видимости, может происходить либо за счёт с-конца (в отсутствии которого белок не закрепляется в КС), либо, в случае глобальной перестройки глобулы и формирование фибриллы с участием пептидов, находящихся в составе гидрофобного ядра глобулы. Одним из возможных таких пептидов является 83-88 АА пептид с экспериментально доказанной, как сказано выше, способностью к фибриллообразованию.

### **Посттрансляционные модификации Bgl2p и способы его закрепления в клеточной стенке**

Bgl2p содержится в двух SDS-устойчивых по-разному закреплённых в КС пулах: в прочно закреплённом G-пуле, экстрагируемом 6 М гуанидин хлоридом и в менее прочно закреплённом Т-пуле, экстрагируемом 0,1 М Трис (Rekstina et al., 2020). Bgl2p G-пула после выделения демонстрирует большую способность к фибриллизации по сравнению с Bgl2p Т-пула. При этом, как было показано в работе 2020 года (Rekstina et al., 2020), Bgl2p Т-пула и Bgl2p G-пула отличаются по набору посттрансляционных модификаций (ПТМ), в особенности по фосфорилированию. С помощью LC-MS/MS анализа было показано, что в G-пуле содержатся молекулы Bgl2p без фосфорилирования и с единичным фосфорилированием по Т84, в Т-пуле же обнаружили 11 сайтов фосфорилирования (включая Т84), распределённых по трём пептидам Bgl2p.

Также в Т-пуле, в отличие от G-пула присутствует глутатионилирование С68, по данным молекулярного моделирования данная модификация располагается на поверхности молекулы и незначительно влияет на конформацию белка (Rekstina et al., 2020) (рис.6.). Фосфорилирования же, напротив, по-видимому, могут



значительно влиять на конформацию белка.

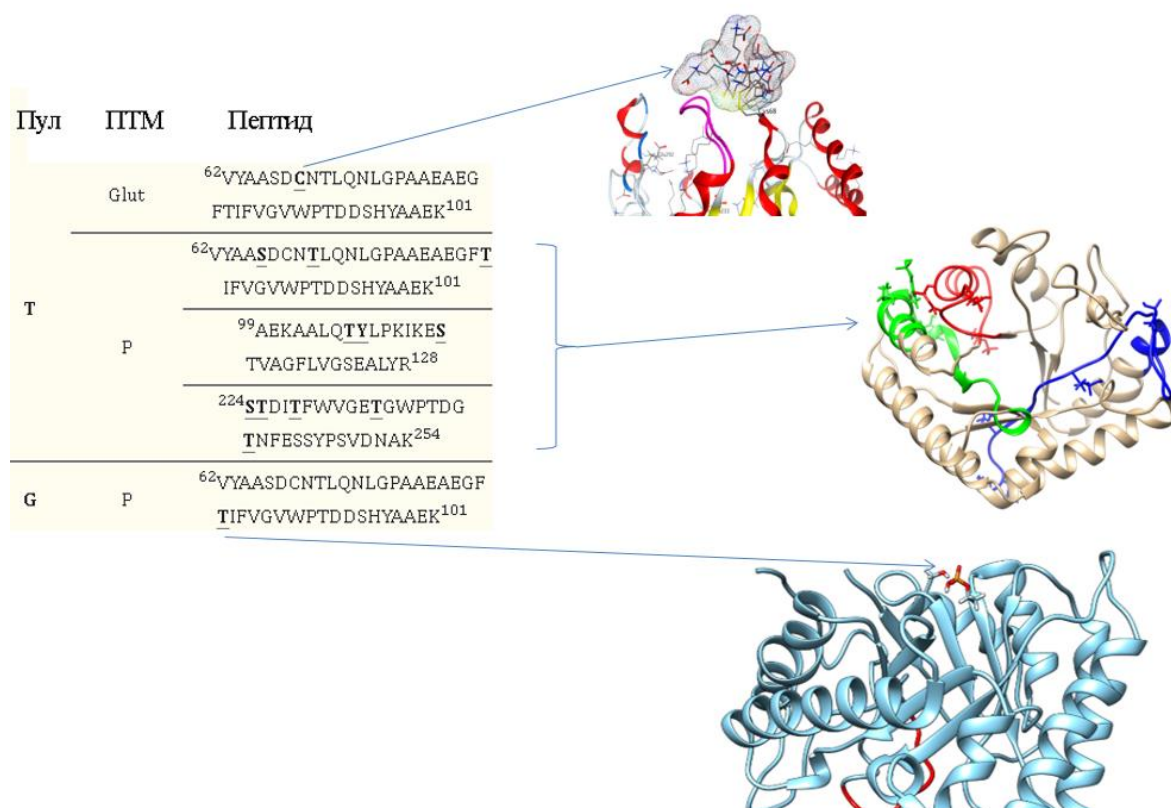


Рис.6. ПТМ Bgl2p в различных пулах (Rekstina et al., 2020 с изменениями).

Отметим, что фосфорилирование T84, в отличие от всех остальных идентифицированных сайтов фосфорилирования можно рассматривать как конститутивное, поскольку T84 остаётся фосфорилированным в части пептидов всегда - вне зависимости от среды выращивания, в то время как при выращивании клеток дикого типа на YNB, а не на YPD, часть сайтов фосфорилирования Bgl2p Т-пула остаются нефосфорилированными (диплом Овчаренко 2020-2021). Также фосфорилирование T84 присутствует как в Bgl2p в составе Т-пула, так и в Bgl2p в составе G-пула. При этом, в процессе закрепления, по-видимому, Bgl2p попадает из Т-пула в G-пул (Rekstina et al., 2020). Суммируя эти данные, можно выдвинуть предположение о том, что фосфорилирование T84 может выступать в качестве сигнала для перехода белка из Т-пула в G-пул.

Необходимо отметить, по данным полученным в группе Т.С. Калебиной (кафедра молекулярной биологии, биологический факультет МГУ), в штамме с делецией гена *PHO3* (*pho3Δ*) Bgl2p отсутствует в G-



пуле, а данных о наборе ПТМ Bgl2p, потенциально способных определять его отсутствие в G-пуле, ранее получено не было.

Вопрос о том, влияют ли модификации на способ закрепления Bgl2p на данный момент остаётся открытым. Также остаётся открытым вопрос о механизме этого влияния, так как с одной стороны, широко известно, что, например фосфорилирование может служить сигналом для определённой внутриклеточной или внеклеточной локализации ряда белков (Makrantonis et al., 2014; Cui et al., 2019), которая может реализовываться в большей степени за счёт определённых белок-белковых взаимодействий.

Однако принадлежность Bgl2p к амилоидным белкам, а также множественность фосфорилирований в одном из пулов (Т-пуле со свойствами не характерными для амилоидов) наталкивает на мысль о возможном конформационно-опосредованном влиянии ПТМ на его закрепление. Поскольку фосфорилирование может способствовать стабилизации как глобулярной, так и фибриллярной конформации различных белков (Nishi et al., 2014; Kitchen et al., 2008; Qi et al., 2011; Miranda et al., 2004; Andrew et al., 2002; Hu et al., 2017; Rezaei-Ghaleh et al., 2016, Kumar et al. 2016, Lyons et al., 2014).

### **Фосфорилирование как механизм регуляции конформации глобулярных и амилоидных белков**

Фосфорилирование – распространённый способ регуляции стабильности белков и их функциональной активности. Фосфорилирование белков может обеспечивать стабилизацию нативной укладки. Механизмы этой стабилизации и функциональной регуляции белков фосфорилированием были хорошо изучены и были детально описаны в обзорных публикациях (Nishi H, Shaytan A et al., 2014; Kitchen et al., 2008). Как правило, это заряд-зарядные взаимодействия сближенных аминокислотных остатков, обеспечивающие стабильность укладки. При этом, на уровне стабилизации элементов вторичной структуры было показано, что фосфорилирование может обеспечить стабилизацию  $\alpha$ -спиральных элементов (Andrew et al., 2002). Существует множество примеров белков, для нормального фолдинга, стабилизации и функциональной активности которых необходимо фосфорилирование, способное влиять как на конформацию активных центров белка, так и иных функционально важных областей (Qi et al., 2011; Miranda et al., 2004).

Как можно догадаться, столь распространённый механизм регуляции фолдинга и функции белка как ПТМ, не обошёл стороной амилоиды. В частности, фосфорилирование может влиять на структуру и динамику амилоидных белков.

Известны примеры того, как фосфорилирование может способствовать фибриллизации амилоидных белков и обеспечивать изменение морфологии фибрилл. Пример - тому фосфорилирование A $\beta$  по S8 (Hu et al, 2017; Rezaei-Ghaleh et al., 2016), а также по S26, в случае с которым происходит стабилизация амилоидных олигомеров и, как следствие, повышение нейротоксичности пептида (Kumar et al. 2016). Оба фосфорилирования, по данным молекулярной динамики, способствуют увеличению области связывающего гидрофобного патча в мономере, что способствует фибриллизации белка (Kumar et al. 2014).

Фосфорилирование Тау-белка может значительно менять его конформацию, регулируя таким образом фибриллизацию и взаимодействие с микротрубочками: в случае двойного фосфорилирования pT231/pS235, происходит формирование переходной  $\alpha$ -спирали (<sup>239</sup>AKSRLQT<sup>245</sup>) за счёт внутримолекулярных взаимодействий с участием фосфатной группы, вместе с этим разрушается зарождающийся паттерн концевой  $\beta$ -листа <sup>226</sup>VAVVR<sup>230</sup> и <sup>244</sup>QTAPVP<sup>249</sup> (Lyons et al., 2014).

Примечательно, что вопрос о роли фосфорилирования как возможного механизма снижения способности к фибриллизации амилоидных белков ранее исследовался не часто, не смотря на общеизвестный и распространённый эффект стабилизации фосфорилированием глобулярной укладки и, в особенности,  $\alpha$ -спиралей (Andrew et al., 2002), не характерных для большинства амилоидов конформацией.

### **Глутатионилирование белков**

Глутатионилирование, как и фосфорилирование может значительно влиять на конформацию белков, регулируя таким образом широк спектр биологических процессов (Musaogullari and Chai, 2020). Известны примеры того, как глутатион может способствовать разупорядочиванию активных центров глобулярных белков (Nameed and Shahul, 2016). Роль данной модификации в регуляции конформации амилоидных белков не была достаточно изучена, однако есть примеры как глутатионилирование может влиять на формирование белковых агрегатов, как например в случае с гемоглобином при серповидно-клеточной анемии, глутатионилирование гемоглобина снижает такую агрегацию (Das et al., 2018).

Однако, в случае глутатионилирования Bgl2p по C68, не было показано значительных конформационных изменений в конфигурации с экспонированным на поверхность глутатионом (Rekstina et al., 2020). Тем

не менее, роль данной модификации как возможного сигнала закрепления Bgl2p на данный момент не изучена.

# Материалы и методы

## Реактивы

Уровень химической чистоты реактивов был не ниже ЧДА. Ферменты были куплены у компании Thermo Fisher Scientific.

## Среды для выращивания микроорганизмов

LB: 0.5% дрожжевой экстракт, 1% триптон, 1% NaCl.

YPD: 1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона, 2% глюкозы.

Селективная среда YNB: 0.67% дрожжевого азотистого компонента без аминокислот; 2% глюкозы; 2% агара; 0.77 г/л смеси необходимых аминокислот.

Для приготовления твёрдых сред добавлять 2-3% агара в дополнение к соответствующим средам.

Для получения отбора трансформантов *E.coli* с плазмидами в среду LB добавлял ампициллин до конечной концентрации 100мг/мл.

## Штаммы, использованные в работе и условия выращивания

Для наработки плазмид использовался штамм *E.coli* XL1-Blue (выращивали на LB при 37°C и 150-200 об/мин).

Был использован штамм *S.cerevisiae* BY4742 с генотипом:

МАТ $\alpha$  *his3 $\Delta$ 1 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 leu2 $\Delta$ 0* (выращивали на YNB или на YPD при 30°C и 150-200 об/мин).

Штамм *S.cerevisiae* с делецией гена *PHO3* (*pho3 $\Delta$* ) имел генотип:

МАТ $\alpha$  *his3 $\Delta$ 1 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 leu2 $\Delta$ 0 pho3::LEU2* (выращивали на YNB без лейцина или на YPD при 30°C и 150-200 об/мин).

## Использованные плазмиды

В работе были использованы плазмиды для CRISPR-Cas мутагенеза: вектор pWS082 и плазида pWS173Leu с маркёром ауксотрофности. Обе плазмиды содержат ген устойчивости к ампицилину и ген GFP как маркёры.

## Выбор олигов гидовых РНК и олигов ДНК-матрицы с заменой, режим гибридизации

Выбор был проведён с использованием сервера <http://crispor.tefor.net/>

Сиквенс выбранных олигов:

T84gRNAfw; GACTGCGTAATGACTGTCGTCTGT

T84gRNArv; AAAC ACAGACGACAGTCATTACGC

Сиквенсы олигов матричной ДНК с необходимой заменой триплета и внесённым сайтом рестрикции рестриктазы PstI для рестрикционного анализа:

T84V-fw;

CGCTGCCTCAGATTGTAACACTTTGCAAACTTAGGTCCTGCAGCTG  
AAGCTGAGGGATTTGTTATCTTTGTCGGTGTTTGGCCAACAGACGAC  
AGTCATTACGCTGCTGAAAAGGCTGCTTTGCAA

T84V-rv;

TTGCAAAGCAGCCTTTTCAGCAGCGTAATGACTGTCGTCTGTTGGCC  
AAACACCGACAAAGATAACAAATCCCTCAGCTTCAGCTGCAGGACC  
TAAGTTTTGCAAAGTGTTACAATCTGAGGCAGCG

Зелёный – внесённый сайт рестрикции, жёлтый – замена триплета, кодирующего T84.

Гибридизацию в случае гидовых олигов и олигов ДНК-матрицы проводили в режиме: 6 мин при 95°C, затем охлаждение на 1°C/мин до 25°C.

#### **Подготовка компетентных клеток *E.coli* XLI-Blue для наработки плазмид**

*E.coli* засевали 5 мл жидкой среды LB, выращивали в течение ночи при 37°C и 150-200 об/мин. Из полученной ночной культуры 1 мл инокулята пересеивали в колбу со 100 мл свежей жидкой среды LB и выращивали в течение 1,5-3 ч при 37°C и 150-200 об/мин. Колбу с подросшей культурой инкубировали 10 мин на льду и все описанные ниже процедуры проводить при охлаждении.

Клетки осаждали в течение 5 мин при 3000g при 4°C. Удаляли супернатант и мягко ресуспендировали осадок в 10 мл холодного 0,1 М CaCl<sub>2</sub>. После чего инкубировали 20 мин на льду. Суспензию осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3000g при 4°C и ресуспендировали осадок в 5 мл холодного 0,1 М CaCl<sub>2</sub> в 15% глицерине. В таком виде хранили в кельвинаторе при -80°C.

#### **Трансформация компетентных клеток *E.coli* плазмидой**

В течение 30 минут на льду инкубировали смесь 100 мкл компетентных клеток и 1 мкл целевой плазмиды, после чего инкубировали смесь 2 мин при 42°C, затем инкубировали смесь на льду и после добавления 900 мкл LB инкубировали полученную смесь 30 мин при 37°C.

Клетки осаждали при 8000 об/мин в течение 1 мин. 100 мкл осадка мягко ресуспендировали и добавляли по 50 мкл на чашку с LB и антибиотиком (ампициллин в случае плазмид pWS082, pWS173Leu) выращивали ночь при 37°C.

### **Выделение плазмид из трансформированных клеток *E.coli*.**

Колонию *E.coli* засекали в 5 мл жидкой LB и выращивать в течение ночи при 37°C и 150-200 об/мин. После осаждения клеток, выделяли плазмиду с помощью коммерческого набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) согласно мануалу. Целостность и чистоту наработанной и очищенной плазмиды проверить рестриктазой PstI, делящей плазмиду pWS173Leu на 12589 и 252 п.о., и разрезающей плазмиду pWS082 1 раз с ожидаемым размером 3906 п.о.

### **PCR**

Использовали Pfu-полимеразу, в зависимости от конкретного праймера и длины амплифицируемого фрагмента, варьировали время элонгации и температуру отжига соответственно.

Типичный алгоритм:

1. { 95°C – 3 мин } x 1 цикл;
2. { 95°C – 30 с, градиент 53°C – 30 с, 72°C – 1 мин } x 30 циклов;
3. { Финальная достройка цепи 53°C – 30 с, 72°C – 2 мин } x 1 цикл;
4. { 12°C } хранение.

### **Эллюция ДНК из геля**

Эллюцию проводили с помощью кита (Gel Extraction Kit).

### **Трансформация дрожжей**

Клетки из ночной культуры, выращенные в 10 мл жидкой среды YPD при 30°C, осаждали на центрифуге Eppendorf Minispin при 1200g в течение 5 мин при 25°C, супернатант сливали в стерильных условиях, осадок ресуспендировали в остатке супернатанта и переносили в эппендорф.

Суспензию центрифугировали в настольной микроцентрифуге Eppendorf Minispin при 12000g в течение 15 с, осадок промывали сначала 1 мл воды, затем 1мл 100мМ ацетата лития, а затем 500 мкл 100 мМ ацетата лития. Осаждали каждый раз при тех же условиях. После последней промывки супернатант аккуратно отбирали стерильными наконечниками и к осадку добавляли 90 мкл смеси для трансформации следующего состава (в расчете на одну трансформацию): 60 мкл 50% PEG-4000; 9 мкл 1М ацетата лития; 10 мкл одноцепочечной ДНК (2 мкг/мкл) (Hering sperm DNA); 6 мкл mQ и 5 мкл плазмиды или целевой ДНК. (10 мкг/мкл) (Hering sperm DNA). Смесь ресуспендировали и инкубировали 30 мин при 30°C, затем 30 мин при 42°C. Осадив суспензию 15 с на 2000g, инкубировали 30 мин при 30°C в 1 мл YNB, после чего осаждали суспензию при таком же режиме осаждения, оставляя 20 мкл осадка клеток. Это количество переносили на соответствующую селективную твердую среду и втирали стерильным шпателем.

Методика взята из выпускной дипломной работы Барсуковой А.С. 2014 года.

#### **Выделение геномной ДНК из трансформированных дрожжей для проверки правильности вставки.**

Клетки из 5 мл ночной культуры промывали TE (10мМ Трис-HCl, pH 8,0; 1мМ EDTA) и переносили в 2 мл эппендорф. Клетки осаждали 2 мин при 600g и к осадку добавляли 0,5 мл TE, 18 мкл β-меркаптоэтанол и 0,25 мл 10% SDS и тщательно перемешивали. Клетки инкубировали 1 час при 55°C. Затем добавляли 380 мкл 9М ацетата аммония и 100 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1). Инкубировали 10 мин при -20°C, центрифугировали 4 мин при 9700g и широким носиком отбирали верхнюю фазу. К ней добавляли 0,7 объема изопропанола и инкубировали 10 мин при +4°C. Затем центрифугировали 5 мин при 12100g и осадок промывали 70% этанолом 3 раза. Осадок сушили при 37°C. Затем добавляли 100 мкл РНКазы А (10 мкг/мл) и инкубировали 10 мин при 37°C. Далее добавляли 50 мкл смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и активно перемешивали. Затем центрифугировали 3 минуты при 9700g, отбирали верхнюю фазу в новую пробирку. К ней добавляли NaCl до конечной концентрации 150-200 мМ и 0,7 объема изопропанола, выдерживали на холоду. Далее центрифугировали 4 минуты при 9700g и дважды промывали 70% этанолом. Сушили в течение 15 минут при 37 °C. Затем растворяли в 20 мкл mQ и использовали для PCR.

Методика взята из выпускной дипломной работы Барсуковой А.С. 2014 года.

#### **Лигирование pWS082 с гидовыми РНК**

Проводили в T4 ligase buffer с добавлением лизгазы T4 компании Thermo Fisher Scientific в течение ночи при комнатной температуре.

### **Электрофорез ДНК**

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле на TAE-буфере (на mQ, Трис 40mM, EDTA 1mM, pH = 7.6 доводили уксусной кислотой).

### **Секвенирование ДНК**

Секвенирование проводила компания “Евроген” по методу Сэнгера.

### **Выделение клеточных стенок**

Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы (19 ч роста), осаждали центрифугированием 10 мин при 2000g на центрифуге Eppendorf Minispin, дважды промывали 0,05M Tris-HCl буфером pH 7,5 и разрушали на шейкере Heidolph (Германия) с помощью стеклянных шариков баллотини (0,5 мм; Sigma) в присутствии 5 mM PMSF и 5 mM EDTA, при охлаждении на льду. Степень разрушения клеток контролировали с помощью светового микроскопа Opton (Германия). Далее использовали препараты КС, содержащие не более 1% неразрушенных клеток. Суспензию отделяли от стеклянных шариков, после чего ее центрифугировали при 3300g в течение 5 мин. При этом компоненты внутриклеточного содержимого оставались в супернатанте, а КС образовывали осадок. Далее полученный препарат клеточных стенок промывали два раза водой, 2 раза 1% сахарозой, 2 раза 1 M NaCl, 2 раза 1% NaCl, 1 раз водой. Указанные обработки, согласно данным, полученным ранее в нашей лаборатории, позволяют полностью отделить КС от внутриклеточного содержимого и компонентов цитоплазматической мембраны. Количество КС оценивали спектрофотометрически – измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Методика взята из выпускной дипломной работы Барсуковой А.С. 2014 года.

### **Частичная депротеинизация клеточных стенок**

Для последующей очистки препарат КС обрабатывали при перемешивании в течение 1 часа при 37 °C 1% SDS (Sigma), далее КС осаждали центрифугированием, промывали 5 раз 0,2 M натрий-ацетатным буфером pH 5,5 и водой. Затем КС в течение 15 мин инкубировали со



смесью бутанол-вода в соотношении 0.7:1 (по объему) и осаждали центрифугированием. Процедуру повторяли три раза. Полученный препарат КС трижды промывали водой. Следует отметить, что отмывка бутанолом служит дополнительным контролем прочности закрепления белков в составе КС и отсутствия их принадлежности к внутриклеточному содержимому. Осадок, содержащий КС, ресуспендировали в 10 мл воды и хранили при 4°C.

Методика взята из выпускной дипломной работы Барсуковой А.С. 2014 года.

### **Экстракция Т- и G-пулов из частично депротеинизированных клеточных стенок**

КС инкубировали с 0,1 М Трис в соотношении 1 оптическая единица на 10 µl 0,1 М Трис в течение 3,5 ч при 30°C без качания. После отделяли экстракт, содержащий Bgl2p от КС путём центрифугирования в течение 2-х мин при 13400 об/мин на центрифуге Minispin (Eppendorf). Полученный экстракт - это Т-фракция (Т-пул, содержащий Bgl2p).

После описанной процедуры дважды промывали осадок КС 0.1М Трис, затем водой. Затем, КС инкубировали в течение 2 часов при 30°C при 200 об/мин в 6 М гуанидингидрохлориде, после чего отделяли экстракт Bgl2p от КС путём центрифугирования в течение 5 мин при 13400 об/мин на центрифуге Minispin (Eppendorf). И полученный экстракт диализовать против воды в течение ночи. Полученный экстракт - это G-фракция (G-пул, содержащий Bgl2p).

Методика взята из публикации 2020 года (Rekstina et al., 2020).

### **LC-MS/MS –анализ**

Проводила лабораторий под руководством Зиганшина Р.Х. по методике, описанной в публикации 2014 года (Kulak et al., 2014).

### **SDS-PAGE-электрофорез**

Электрофорез проводили по методу Лэммли в денатурирующих условиях.

Таблица 1. Реактивы для электрофореза белков

Реактив	12% нижний гель (на 5 мл)	4% верхний гель (на 2.5 мл)
mQ	1.7 мл	1.6 мл

1.5M Трис-НCl, pH 8.9 с 0.4% SDS (нижний) / 0.5M Трис-НCl, pH 6.8 с 0.4% SDS (верхний)	1.25 мл	645 мкл
30% AA + 0.8% MBA	2 мл	354 мкл
PSA 10%	50 мкл	20 мкл
TEMED	7 мкл	3.5 мкл

В качестве белкового маркера использовали 2 мкл Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific, #26612) (120 кДа, 85 кДа, 50 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 20 кДа).

Разделение проводили в электродном буфере (0,025M Tris, 0,193M глицин, 0,1% SDS) при силе тока 70 мА, напряжении 100В в верхнем геле и 180В в нижнем.

Методика взята из выпускной дипломной работы Барсуковой А.С. 2014 года.

### **Вестерн блот**

Полученный в результате электрофореза гель промывали в воде, а затем проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Protran, 0,45  $\mu$ m) в буфере, содержащем 100 мМ Трис-НCl, 192 мМ глицина с добавлением 20 % изопропанола в течении 1-1,5 часов при напряжении 100 В и силе тока 110 мА.

Методика взята из выпускной дипломной работы Солодовникова А.А. 2016 года.

### **Окрашивание мембраны антителами**

Мембрану промывали водой, после чего в течение 10 минут инкубировали в буфере TBS, содержащем 0,05 % Tween-80. Все процедуры проводили на шейкере при 60 оборотах в минуту при комнатной температуре. После этого мембрану 40 минут инкубировали в буфере TBS с 0,05 % Tween-80 и 1 % казеином. Затем мембрану в течение 1 часа инкубировали с антителами к Bgl2p. Далее мембрану дважды по 5 минут отмывали в TBS с Tween-80 и ещё 5 мин в в буфере TBS с 0,05 % Tween-80 и 1 % казеином. После этого мембрану 1 час инкубировали со вторичными антителам, пришитой к ним пероксидазой хрена, а после трижды по 5 минут отмывали в TBS с Tween-80 и ещё трижды по 5 минут в обычном TBS.

По завершении процедуры проводили визуализацию, инкубируя мембрану в буфере с люминогенным субстратом.

Методика взята из выпускной дипломной работы Солодовникова А.А. 2016 года.

### **Получение очищенного препарата Bgl2p**

Проводили электрофорез частично депротеинизированных КС, после его прохождения вырезали тонкую полосу на уровне 33 кДа, массе, соответствующей мономеру Bgl2p. Часть вырезанной полосы в целях контроля чистоты препарата от примесных белков отдавали на протеомный анализ. Вырезанную на уровне 33 кДа полосу помещали в диализный мешок и подвергали электроэлюции в целях очистки от SDS. Электроэлюцию проводили при силе тока 70 мА, 180 В в 0.1 М Трис в течение 3 часов. После чего мешок кипятили и в течение 4 часов диализовали против воды. Полученный препарат кипятили и использовали для приготовления препаратов для электронной микроскопии (препараты готовила Рекстина В.В.).

### **Условия молекулярно-динамических расчетов и используемые программы**

Для всех молекулярно-динамических расчетов была использована модель Bgl2p, взятая из Alphafold. Моделирование проводили, с моделью воды Tip3p в силовом поле Charmm36, при температуре 30<sup>0</sup>С в 150мМ растворе NaCl.

### **Построение системы с фосфорилированным белком**

Для каждой из фосфорилированных позиций изначально проводили замену фосфорилируемого остатка на глутамат и моделировали 50 нс с баростом Берендсена и SD-интегратором Ланжевена с целью проведения длительной релаксации моделируемой системы. Первоначально проводили замену на глутаматы для моделирования отрицательного заряда фосфатной группы, не использовали фосфаты сразу, с целью лучшей релаксации системы и идентификации выгодного ротамера с точки зрения электростатики.

После окончания релаксации заменяли глутаматы на первоначальные аминокислоты. С помощью плагина PyTMs программы Rymol, предусматривающего геометрическую оптимизацию для фосфатных групп, добавляли фосфаты к фосфорилируемым остаткам. Далее запускали 500 нс расчёт с термостатом Нозе-Гувера, баростатом Паринелло-Рамана. Для каждой из 9 моделируемых систем (по-разному фосфорилированные молекулы Bgl2p) получали 5 независимых траекторий для большей

статистической достоверности получаемых результатов. После чего проводили анализ полученных траекторий.

## Результаты и обсуждение

### ПТМ Bgl2p из Т-пула штамма *pho3Δ*

Делеция гена *PHO3* не влияет на содержание белка в КС, как видно из окраски Кумасси геля с нанесёнными экстрактами белка из КС в кипячённую воду. (Рис.7.)

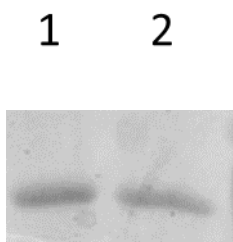


Рис.7. Окраска геля Кумаси: 1 – экстракция из КС wt белка, 2 – экстракция из КС *pho3Δ* белка

Однако в случае штамма *pho3Δ*, весь Bgl2p переходит в Т-пул из G-пула. Анализ распределения Bgl2p по Т- и G-пулам проводили с помощью вестерн-блот анализа, окраска антителами к Bgl2p (Рис.8.).

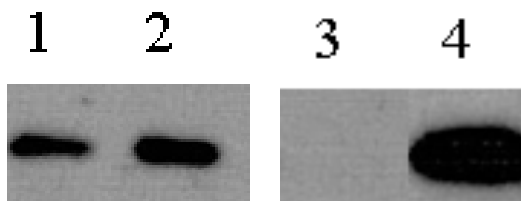


Рис.8.Вестерн-блот анализ. 1 – Bgl2p G-пул wt, 2 – Bgl2p Т-пул wt, 3 – Bgl2p G-пул *pho3Δ*, 4 – Bgl2p Т-пул *pho3Δ*

Данные подтверждают более ранние наблюдения.

После на LC-MS/MS-анализ были взяты Т-фракции обоих штаммов.

В ходе LC-MS/MS-анализа было обнаружено, что Bgl2p Т-пула штамма *pho3Δ* не содержит ни одного фосфорилированного остатка. При этом глутатионилирование С68 сохраняется. В случае штамма wt, Bgl2p в составе Т-пула имел типичный набор множественного фосфорилирования и глутатионилирования С68.

Полученные данные говорят о том, что, глутатионилирование по С68, которое присутствует вне зависимости от наличия Bgl2p в G-пуле, не является сигналом для закрепления Bgl2p в G-пуле.

При этом, фосфорилирования исчезают в штамме с отсутствующим Bgl2p G-пулом и поэтому фосфорилирования потенциально могут быть сигналом для закрепления Bgl2p в G-пуле и при этом, вероятно, не является необходимым для закрепления Bgl2p в T-пуле.

Как было сказано выше, наиболее вероятным сигналом для такого перехода считается фосфорилированный Т84, сохраняющиеся в Bgl2p G- и T-пулов. Поэтому для проверки роли данного фосфорилирования был получен штамм с мутацией данного остатка, препятствующей фосфорилированию.

### Получение штамма V84

Штамм с заменой Т84 на V был получен с использованием вектора pWS082 (Horwitz et al., 2015).

Таблица 2. Сиквенс гена BGL2 (красный – позиция, в которую внесём синонимичную замену для создания сайта рестрикции рестриктаз PstI, зелёный – триплет, кодирующий Т84, который и будем мутировать)

```
ATGCGTTTCTCTACTACACTCGCTACTGCAGCTACTGCGCTATTTTTCACAGCCTCCCAAGTTTCAGCTA
TTGGTGAAC TAGCCTTTAACTTGGGTGTCAAGAACAACGATGGTACTTTGTAAGTCCACTTCCGACTATGAAAC
CGAATTACAAGCTTTGAAGAGCTACACTTCCACCGTCAAAGTTTACGCTGCCTCAGATTGTAACACTTTGCAA
AACTTAGGTCCTGCTGCTGAAGCTGAGGGATTTACTATCTTTGTCGGTGTGGCCAACAGACGACAGTCATT
ACGCTGCTGAAAAGGCTGCTTTGCAAACCTATTTGCCAAAAATTAAGAATCCACTGTTGCTGGTTTCTTGGTT
GGTTCTGAAGCCTTATACCGTAACGATTTGACTGCCTCTCAATTATCAGACAAAATTAATGACGTCCGTAAGTGT
CGTTGCTGACATTTCCGATTCTGACGGAAGTCACTCTGGTAAGCAAGTCGGTACTGTCGATTCCCTGGAATG
TTTTGGTTGCTGGTTACAATTCTGCCGTTATCGAAGCTTCCGATTTTGTATGGCTAACGCGTTCTCCTACTGGC
AAGGTCAAACCATGCAAAATGCCTCTTACTCATTCTTTGATGATATTATGCAAGCTCTACAGGTTATCCAATCT
ACTAAAGGTTCTACCGATATTACCTTCTGGGTGGTGAGACCGGTTGGCCAACGATGGTACCAACTTTGAAA
GTTCTTACCCATCTGTTGACAACGCCAAACAATTCTGGAAAGAAGGTATCTGTTCCATGAGAGCTTGGGGTGT
TAACGTTATTGTTTTGAAGCCTTTGATGAAGATTGGAAGCCAAACACCTCTGGTACCTCTGATGTCGAGAAGC
ACTGGGGTGTTTTCACTTCAAGTGACAATTTGAAATACTCCTTGGACTGTGACTTTTC ATGA
```

Компетентные клетки *E.coli* трансформировали плазмидами pWS173Leu и pWS082 с генами устойчивости к ампициллину и геном GFP в качестве маркёров (Рис.9.).

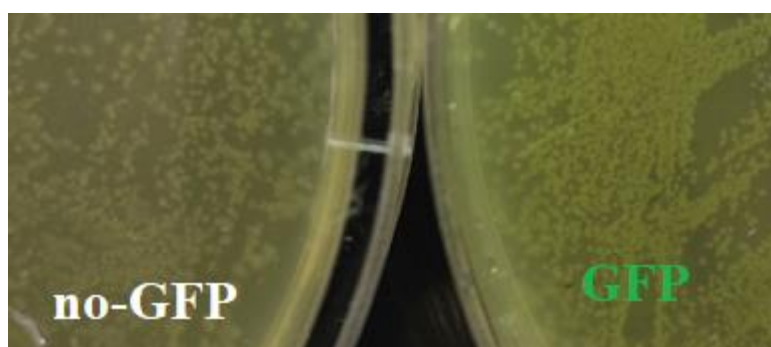


Рис.9. Клетки трансформированные pWS173Leu или pWS082 с зелёным GFP (справа) и клетки *E.coli* wt (слева).

Обе плазмиды выделяли с помощью кита, после чего проверяли с помощью рестрикционного анализа (Рис.10., Рис.11.).



Рис.10. Аналитический электрофорез - проверка плазмиды pWS082 рестриктазой Not1 (ожидаемые длины фрагментов – 1900 и 2000 bp)

1- Метчик, 2-3 – pWS082, 4-5 – pWS082 рестрицированная Not1 (верхняя полоса – недорестрицированная плазмида, т.к. по размеру соответствует основным полосам в дорожках 2 и 3, нижняя полоса – продукты рестрикции, длина 2000 и 1900 bp).

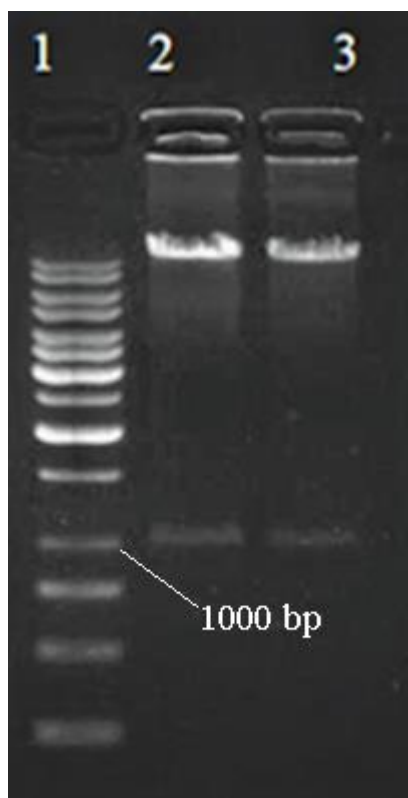


Рис.11. Линеаризация рестриктазой BsmBI плазмиды pWS173Leu, 1030 bp – вырезанный ген GFP (сигнал прошедшей рестрикции, т.к. высокомолекулярная нерестрицированная плазида 13 kbp и второй продукт рестрикции 12 kbp с данным метчиком и в данной процентности геля неразличимы).

1 – метчик, 2+3 – рестрицированная BsmBI плазида pWS173Leu.

При этом рестрикция BsmBI для pWS173Leu - не только анализ, но и необходимая линеаризация, фрагмент 12 kbp после вырезали из геля и экстрагировали для дальнейшего использования при трансформации.

Проверенную плазмиду pWS082 также линеаризовали BsmBI (Рис.12., Рис.13.).





Рис.12. Сайты рестрикции BsmBI в составе pWS082 (отмечены синим).

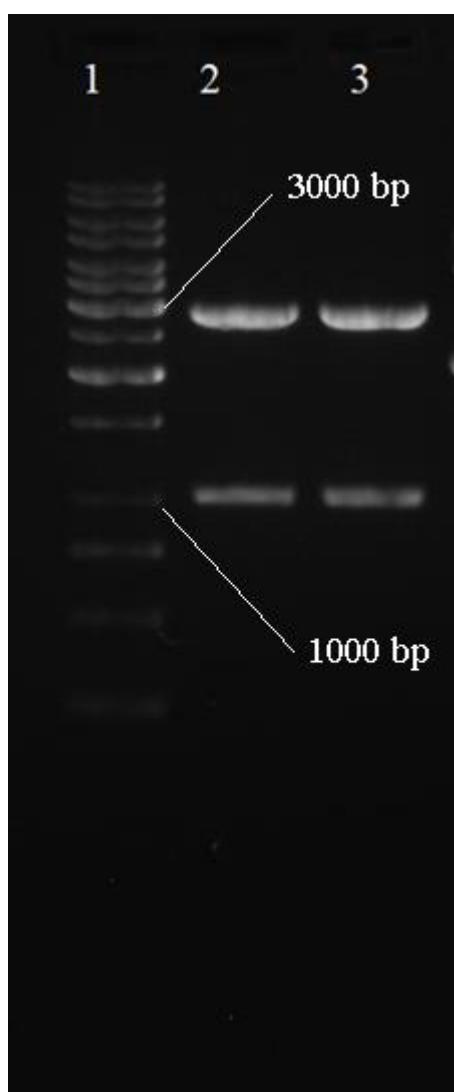


Рис.13. Линеаризация рестриктазой BsmBI плазмиды pWS082.

1 – метчик, 2-3 – рестрицированная BsmBI плазида pWS082 (фрагменты длиной 2876 bp и 1030 bp)

Размеры соотносятся с ожидаемыми, как указано выше.

Линеаризованную pWS082 лигировал с гидовыми РНК, после чего трансформировал в *E.coli*.

Из бактерий выделил плазмиду и поставил PCR для проверки вставки. Праймер – pWS082 (Рис.14.).

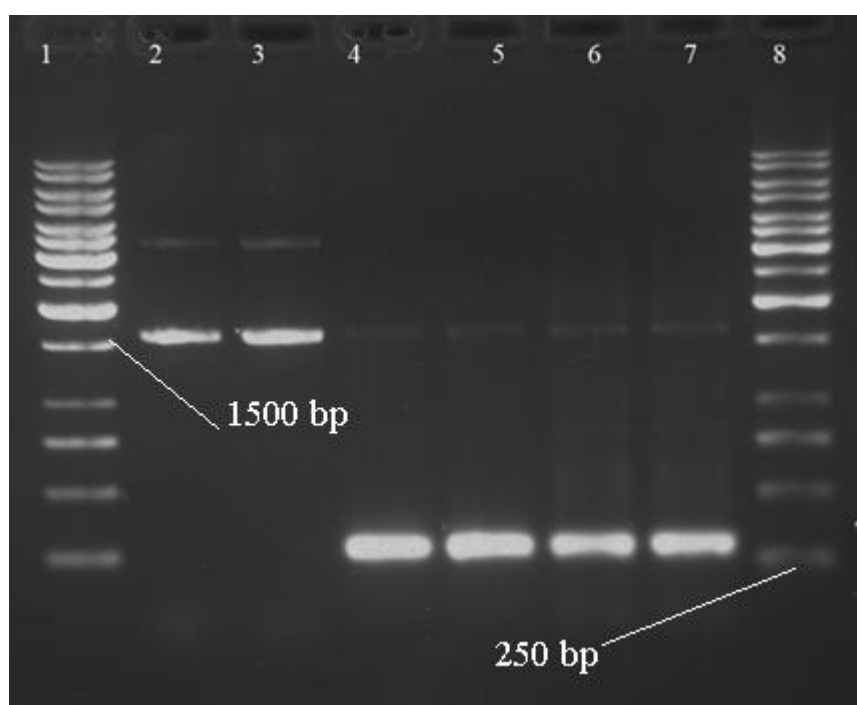


Рис.14. pWS082 после лигирования и клонирования и проверка вставки PCR

1+8 – метчик, 2-3 – pWS082 после лигирования и клонирования, 4-7 – PCR-фрагмент, свидетельствующий о наличии вставки.

Размер вставки действительно 261 bp. Проверенную плазмиду рестрицировали рестриктазой EcoRV (Рис.15., Рис.16.).

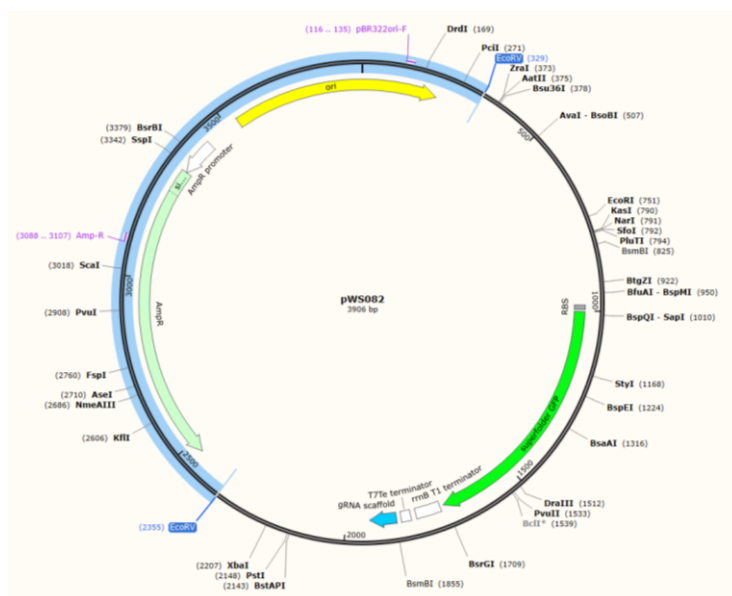


Рис.15. Сайты рестрикции EcoRV в составе плазмиды pWS082.

На схеме (Рис.15.) изображена плаزمида до вырезания гена GFP, в нашем случае фрагменты после рестрикции будет: 2026 и 1030 bp, в составе последнего – вставленные гидовые РНК.

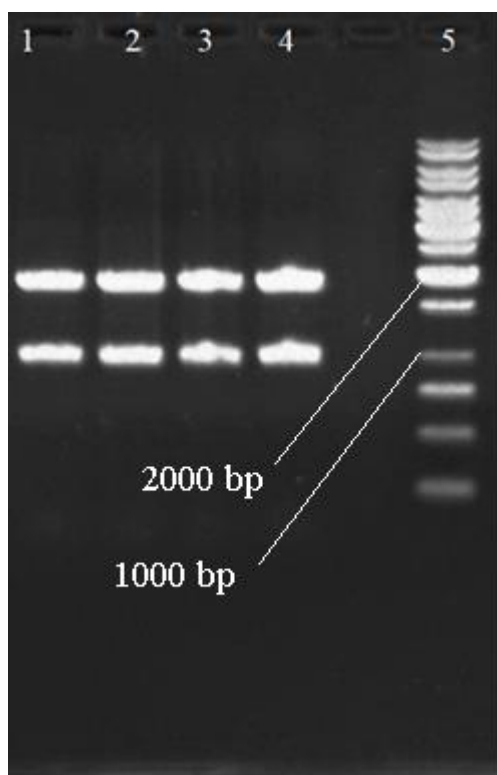


Рис.16. Линеаризация плазмиды pWS082 с вставленными участками гидовой РНК рестриктазой EcoRV.

1-4 – рестрицированная pWS082 рестриктазой EcoRV, 5 –маркёр.

Размеры соотносятся с ожидаемыми, как указано выше.

Далее проводили гибридизацию олигов для ДНК-матрицы с необходимой заменой.

Проводили трансформацию для получения CRISPR-Cas-мутанта. Полученные после трансформации колонии дрожжей проверяли на наличие встроенного сайта рестрикции как признака успешного мутагенеза (Рис.17.).

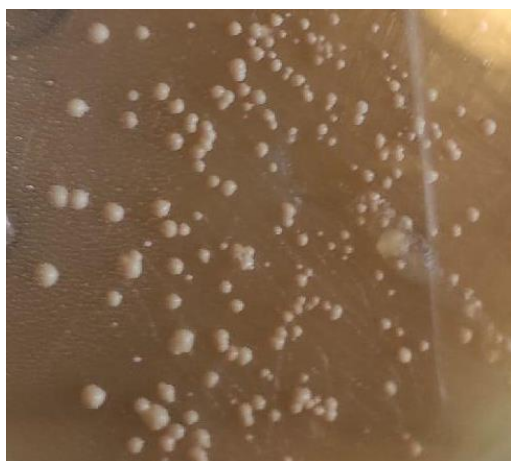


Рис.17. Колонии после трансформации.

Для этого из колоний была выделена ДНК, далее провели амплификацию (праймеры - 193 upstream, 165 downstream) и проводили рестрикционный анализ с рестриктазой PstI.

Ожидаемый размер фрагментов: 1 фрагмент длиной 900 и 2 фрагмента длиной 200 bp (это удачные мутанты, в случае wt 2 фрагмента: один 1100 bp, второй - 200) (Рис.18.).

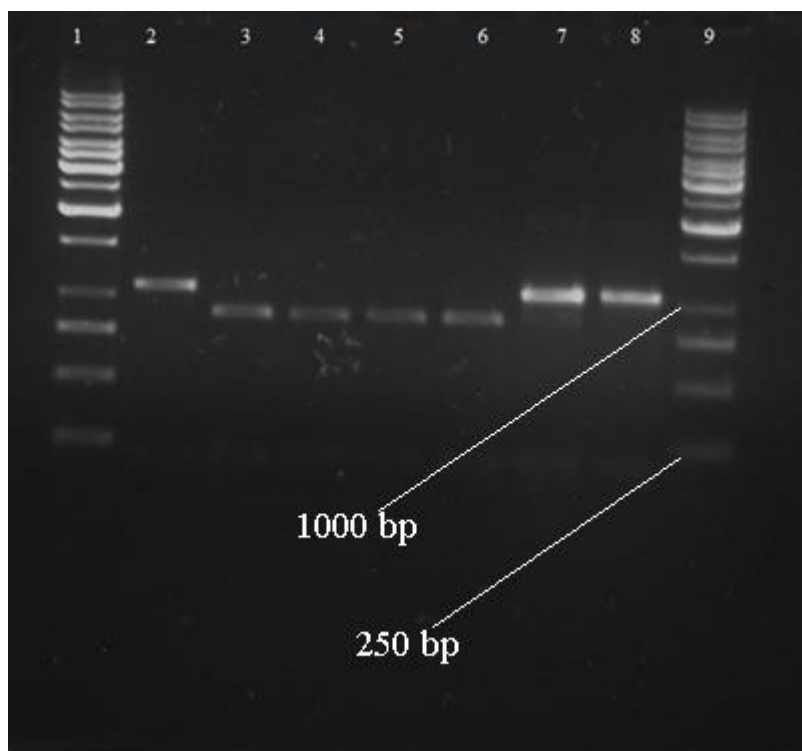


Рис.18. Рестрикционный анализ амплифицированного фрагмента с геном *BGL2*.

1+9 – метчик, 2 – wt, 3-6 – мутант V84 с прошедшей трансформацией, 7-8 – мутант V84 с непрошедшей трансформацией

Размеры соотносятся с ожидаемыми, как указано выше.

Удачные по рестрикционному анализу препараты отдали на секвенирование (Рис.19.).

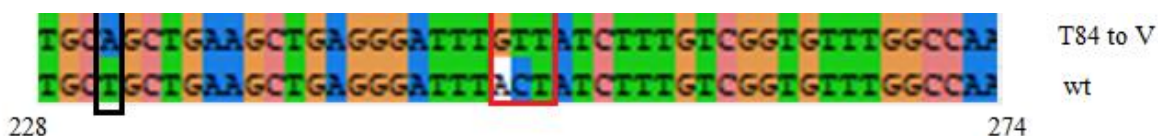


Рис.19. Результат секвенирования по Сэнгеру

По результатам секвенирования можно сделать вывод об успешности проведённого мутагенеза.

### Закрепление и ПТМ Bgl2p штамма V84

Замена T84 на V в полученном штамме не влияет на содержание белка в КС, как видно из окраски Кумасси геля с нанесенными экстрактами белка из КС в кипячёную воду. (Рис.20.)

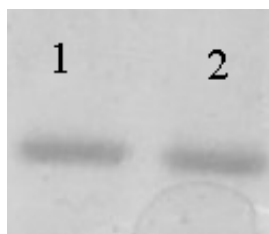


Рис.20. Окраска геля Кумаси: 1 – экстракция из КС wt суммарного белка, 2 - экстракция из КС V84 суммарного белка

Однако в штамме V84 в составе G-пула количество Bgl2p по-видимому снижает своё количество. Анализ распределения Bgl2p по Т- и G-пулам проводили с помощью вестерн-блот анализа, окраска антителами к Bgl2p (Рис.21.).

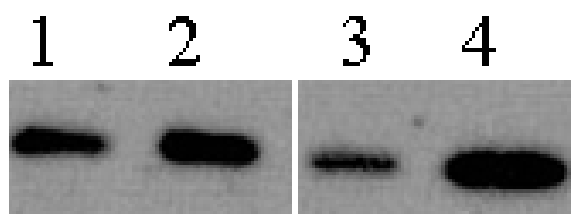


Рис.21. Вестерн-блот анализ. 1 — G-пул Wt, 2 – Т-пул Wt, 3 — G-пул V84, 4 — Т-пул V84

Данные в целом не противоречат гипотезе о возможной роли фосфорилирования Т84 в закреплении Bgl2p в G-пуле. Однако часть белка при мутации всё-таки сохраняется в G-пуле. Поэтому можно сделать предположение о возможных компенсаторных механизмах, реализующихся в отсутствии фосфорилирования Т84.

Анализ ПТМ с помощью LC-MS/MS-анализа показал, что в штамме V84 в составе Bgl2p появляются новые и малоизученные ПТМ в Т-пуле (о-пинакоилфосфорилирование 115) и G-пуле (о-пинакоилфосфорилирование 114).

Такие модификации ранее не были выявлены ни в одном из пулов, ни в одном из мутантных штаммов, что может говорить о возможной компенсаторной роли таких ПТМ, которые необходимы для перехода части Bgl2p в G-пул в том случае, если фосфорилирование Т84 невозможно. Здесь и далее эти модификации будем называть “условно компенсаторными”.

Отметим, что в данном штамме глутатионилирование С68 не было выявлено, что лишний раз подчёркивает вероятную невозможность этой ПТМ выступать в качестве сигнала к закреплению Bgl2p.

## Модель Bgl2p для молекулярно-динамических расчетов: выбор и валидация

В целях проведения всех описанных ранее экспериментов *in silico*, необходимо было построить структурную модель Bgl2p и проверить её качество и конформационную стабильность, так как экспериментально структура данного белка разрешена пока что не была.

В качестве модели структуры Bgl2p была взята модель из AlphaFold, которая удовлетворяет данным коэволюции.

Был проведен длительный (5 мкс) молекулярно-динамический расчет по результатам которого было показано, что белок в целом сохраняет свою конформацию (общая выборка значений, RMSD, рассчитанных в течение всей траектории относительно структуры Bgl2p до моделирования соответствует нормальному распределению) и молекула сохраняет компактность (значение радиуса гирации также не имеет тенденции к увеличению) (Рис.22.). Оба показателя соответствуют нормальному распределению по критериям Пирсона и Шапиро-Уилке. Также основные элементы вторичной структуры сохраняются в ходе расчёта (Рис.23.).

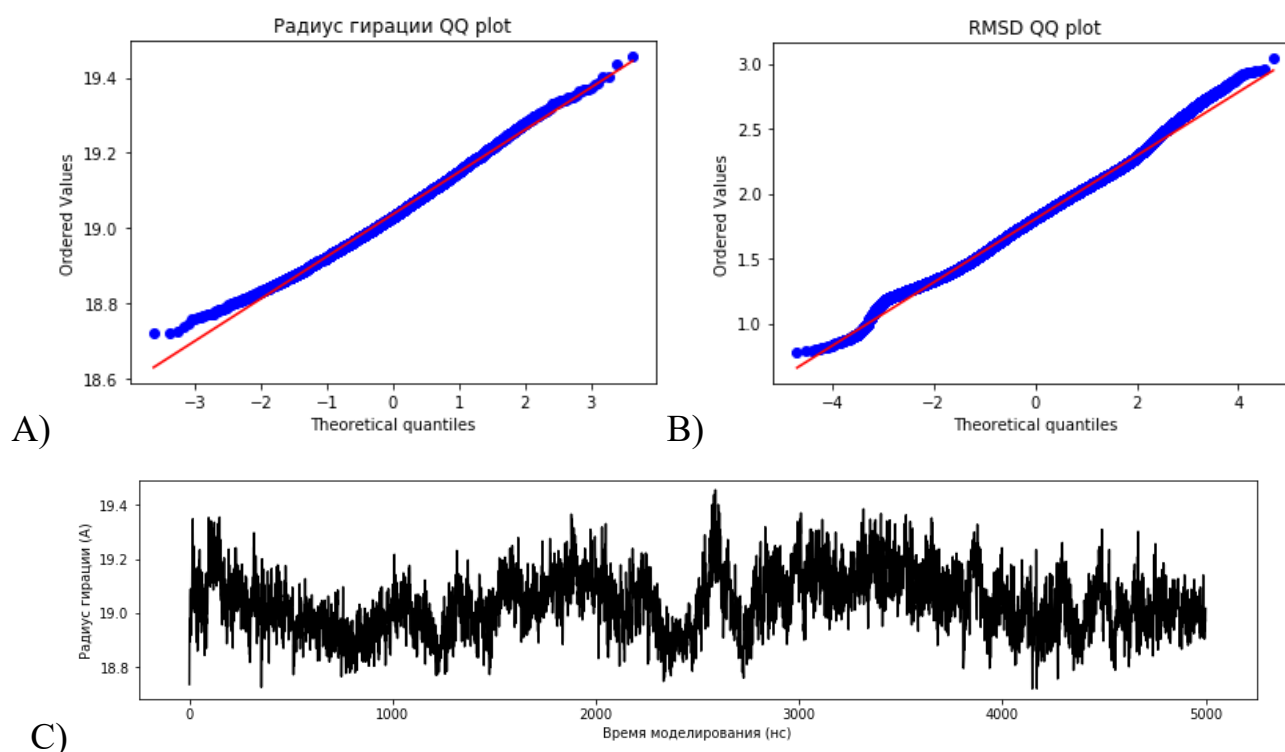




Рис.22.RMSD и радиус гирации.

A) Радиус гирации qqplot B) RMSD qqplot C) Динамика значений радиуса гирации D) Динамика значений RMSD

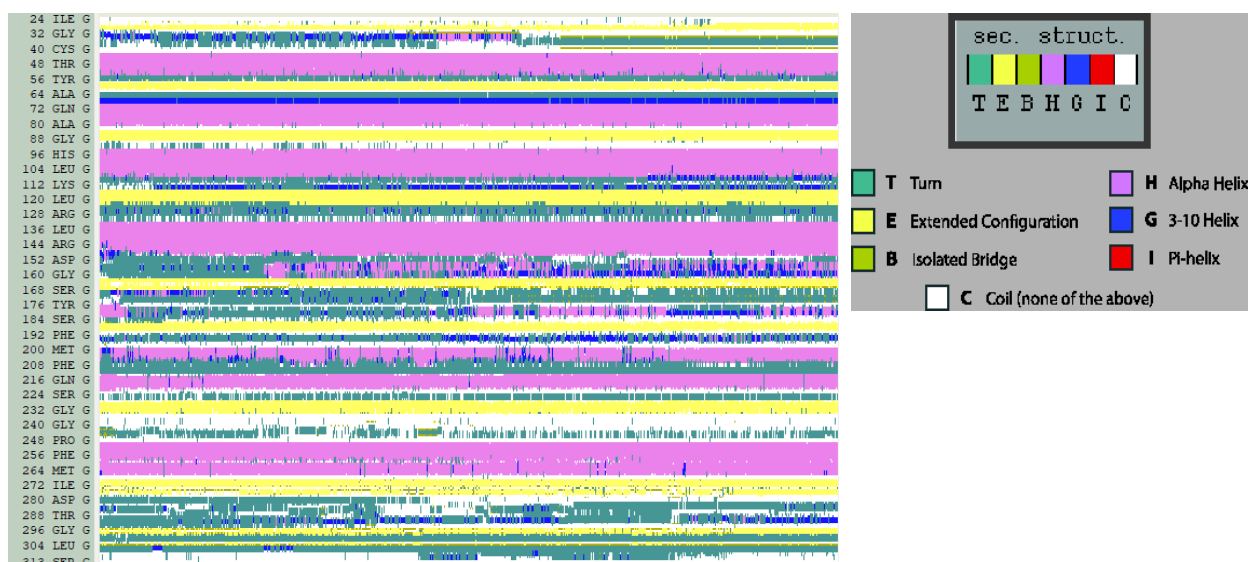


Рис.23. Сохранение основных элементов вторичной структуры Bgl2p.

Ось ОХ графика соответствует времени моделирования, ось ОУ – номер аминокислотного остатка с трёхбуквенным идентификатором, цветом отмечена вторичная структура в соответствии с легендой.

Также наблюдается наличие одного минимума на профиле свободной энергии Bgl2p по координатам RMSD и радиус гирации, что характерно для маленьких глобулярных белков и также может свидетельствовать о качестве модели, отсутствии тенденций к значительным конформационным переходам (Рис.24.).



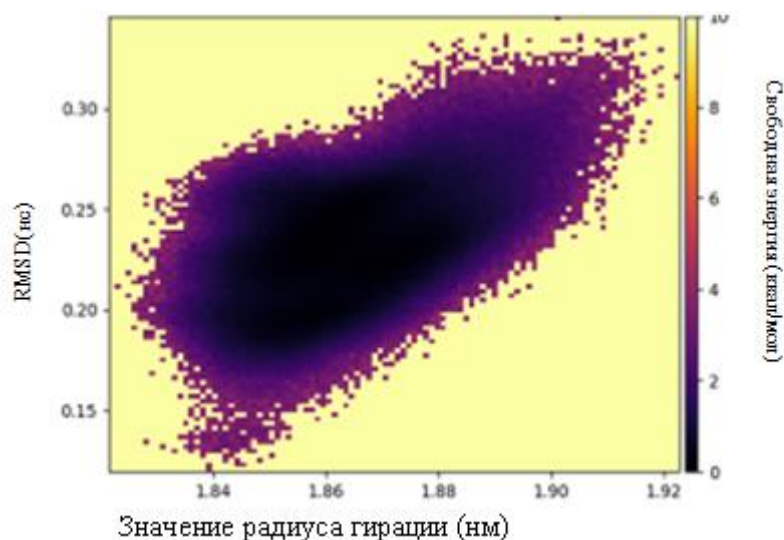


Рис.24. Профиль свободной энергии 5 мкс расчёта.

Энергия рассчитана по координатам Радиус гирации и RMSD.

В целях дополнительной валидации модели, все кристаллические структуры белков эукариот того же семейства были промоделированы в течение 300 нс, после чего были построены энергетические профили по координатам потенциальная энергия глобулы и энтропия по углам боковых групп – модель Bgl2p попадает в диапазон, характерный для семейства GH17, что также характеризует её как качественную (рис.25.).

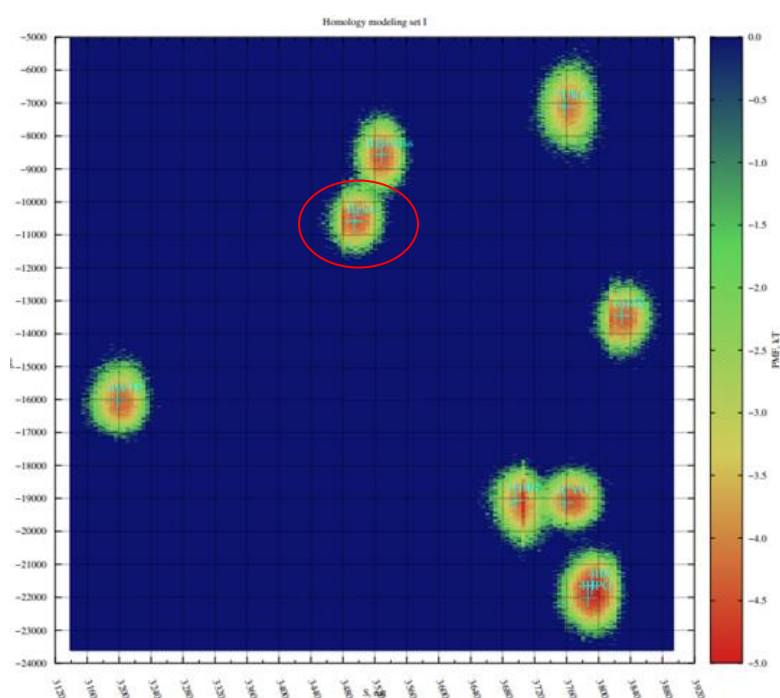


Рис.25. Профиль свободной энергии структур GH17, координаты - потенциальная энергия глобулы (OY) и энтропия по фи-углам боковых групп(OX). Bgl2p отмечен красным кругом.

Также была проведена проверка принадлежности Bgl2p к упорядоченным белкам, в ходе которой было подтверждено, что несмотря на амилоидные свойства, Bgl2p в целом относится к упорядоченным белкам (Рис.26.). Используемые алгоритмы предсказания указаны в легенде рисунка 26.

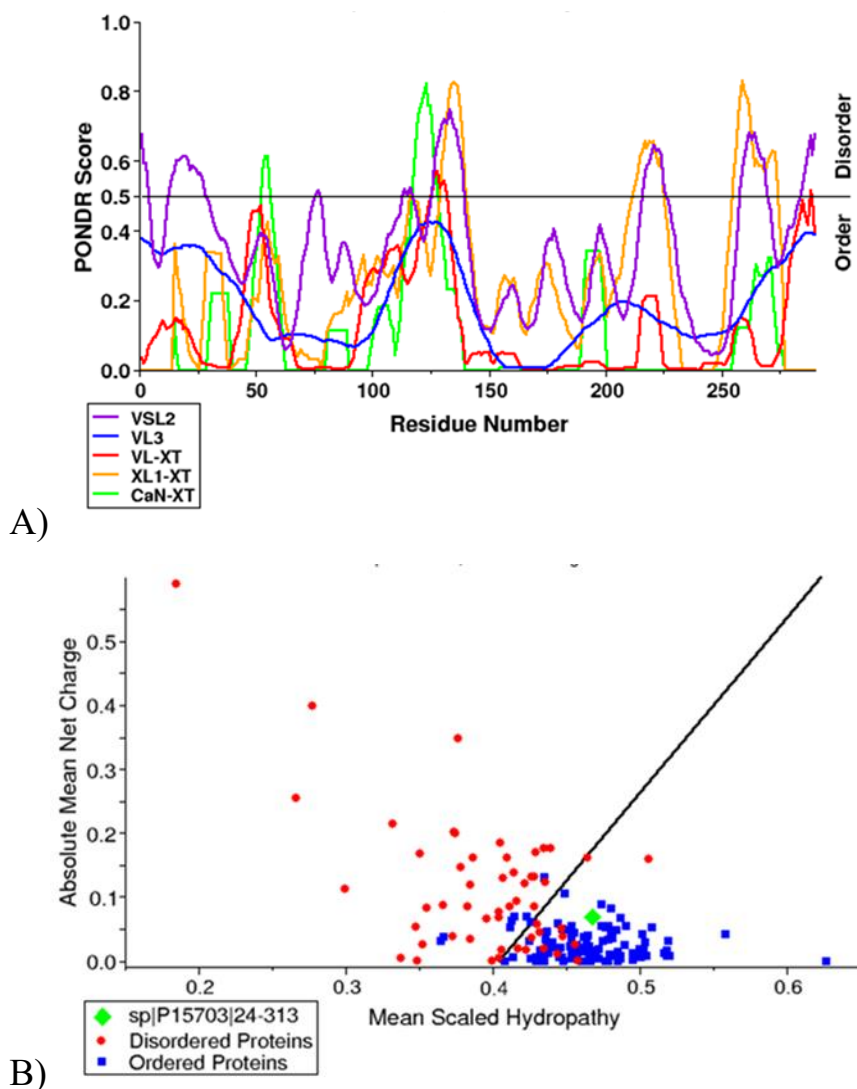


Рис.26. Алгоритмы на основании марковских цепей и нейросетей подтверждают принадлежность Bgl2p к упорядоченным белкам.

A) Предсказание упорядоченных и неупорядоченных областей в Bgl2p на основе различных алгоритмов.

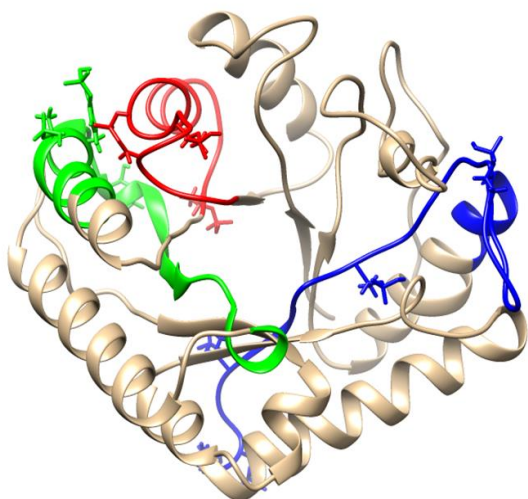
В) График заряд-гидрофобность, характеризующий Bgl2p как, по-видимому, упорядоченный белок.

### Множественное фосфорилирование Bgl2p: механизм стабилизации

Исходя из экспериментальных данных, можно однозначно предсказать, что в амилоидном G-пуле имеется набор нефосфорилированных белков и фосфорилированных по одной позиции (T84). В Т-пуле же было выявлено три пептида с фосфорилированными остатками (пептиды далее обозначим как Tris1 P, Tris 2 P, Tris 3 P), Таким образом, потенциально в Т-пуле может существовать как минимум 7 типов фосфорилированных молекул Bgl2p (Tris 1 P Bgl2p, Tris 2 P Bgl2p, Tris 3 P Bgl2p, Tris 12 P Bgl2p, Tris 13 P Bgl2p, Tris 23 P Bgl2p, Tris 123 P Bgl2p) (Рисунок.27.). В целях упрощения, в данной работе рассматривали варианты молекул, в которых может присутствовать лишь полностью фосфорилированный пептид. Вариант Tris 123 P Bgl2p называли Multiphosphorylated Bgl2p, в то время как единично фосфорилированный Bgl2p по T84 называли Monophosphorylated Bgl2p. В конечном итоге, мы проводили молекулярное моделирование для 8 молекул Bgl2p с фосфорилированием (7 из Т-пула, 1 из G-пула) и для нефосфорилированного Bgl2p.

T	P	62 VYAA <del>SD</del> CNTLQNLGPAAEAEGFI	Tris 1 P
		IFVG <del>V</del> WPTDDSHYAAEK101	
		99 AEKAALQI <del>Y</del> LPKIKES	Tris 2 P
		TVAGFLVGSEALYR128	
		224 SIDI <del>I</del> FWVGEIGWPTDG	Tris 3 P
		INFESSYPSVDNAK254	

В)



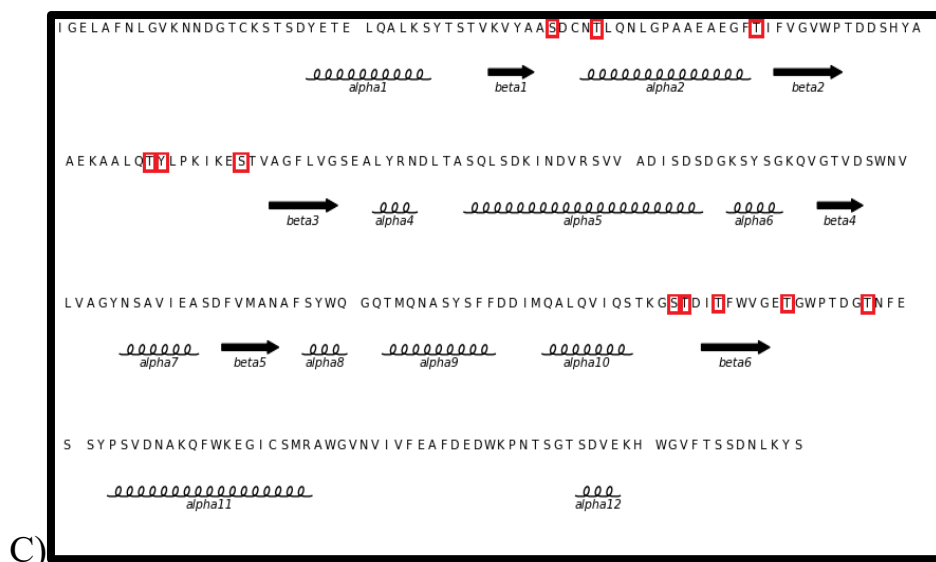


Рисунок 27. Положение фосфорилированных остатков в составе молекулы Bgl2p.

А) Идентифицированные фосфорилированные аминокислоты, данные LC-MS/MS (Rekstina et al., 2020);

В) Пептиды с обнаруженными фосфорилированиями в составе модели молекулы: Красный = Tris1 P, зелёный = Tris2 P, голубой = Tris3 P.

С) Фосфорилированные остатки в составе Bgl2p, красным помечены фосфорилированные аминокислотные остатки, показаны элементы вторичной структуры.

По результатам анализа полученных траекторий, можно сделать вывод о том, что большинство фосфорилированных форм Bgl2p оказываются конформационно стабильными и не имеют явной тенденции к денатурации (низкая дисперсия RMSD (таблица 2) и соответствие выборке значений радиуса гирации нормальному распределению (рис.22.)). Как можно видеть, наиболее компактными, по-видимому, являются Tris123P Bgl2 и Tris2P Bgl2, когда единично фосфорилированный Bgl2p является одним из наименее компактных, также одним из наименее стабильных значений радиуса гирации наблюдается у Tris13P Bgl2 с локальным максимумом, соответствующему наиболее развернутой форме из всех наблюдаемых вариантов (1,95 Å) (Рис.28.).



Рис.28. Распределение значений радиуса гирации.

Проводили анализ количества внутримолекулярных солевых мостиков между основными (аргинин, глутамин, аспарагин) и кислотными радикалами (глутамат, аспартат), что может рассматриваться как параметр, высокое значение которого может свидетельствовать о стабильности белка. По этому параметру, максимум внутримолекулярных солевых мостиков наблюдается у Tris123P Bgl2, минимальное – у Tris13P Bgl2 (Таблица 3).

Таблица 3. Значение свободной энергии, числа ионных мостиков, радиус гирации и RMSD Bgl2p с различным типом фосфорилирования (Сравнительный анализ средних значений для траекторий по-разному фосфорилированных Bgl2p)

Тип фосфорилирования Bgl2p	FoldX свободная энергия	Среднее число ионных мостиков (number)	Средний радиус гирации белка (Å)	Средняя дисперсия RMSD (Å <sup>2</sup> )
Tris1 P Bgl2	167.43	20	19.1	0.12
Tris23 P Bgl2	160.49	21	19.1	0.18
Tris2 P Bgl2	163.54	22	18.7	0.09
Tris3 P Bgl2	175.32	23	19.0	0.17

Tris12 P Bgl2	172.64	18	18.9	0.14
Tris13 P Bgl2	176.57	17	19.1	0.25
Tris123 P Bgl2	151.56	25	18.8	0.07
Единично фосфорилированный по T84 Bgl2	177.41	20	19.1	0.17
Нефосфорилированный Bgl2	170.54	21	19.0	0.16

С помощью программы Plumed были построены профили свободной энергии по координатам  $\alpha$ rmsd и  $\beta$ rmsd (значение функций пропорциональны количеству остатков в составе  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур), глобальные минимумы свободной энергии и координат ей соответствующие им показаны на рисунке 2. В случае фосфорилирований Tris12P Bgl2, Tris23P Bgl2, Tris13P Bgl2, Tris2P Bgl2 и Единично фосфорилированного Bgl2p происходит снижение значений  $\alpha$ rmsd относительно нефосфорилированной формы,  $\beta$ rmsd снижается в случае Tris1P Bgl2, Tris12P Bgl2 и Tris13P Bgl2. Только в случае форм Tris3P Bgl2 и Tris123P Bgl2 не наблюдается снижение данных параметров. В случае Tris123P Bgl2 они максимальны, значение свободной энергии глобулы минимально, что может свидетельствовать о стабилизирующей роли полного фосфорилирования (Рис.29.).

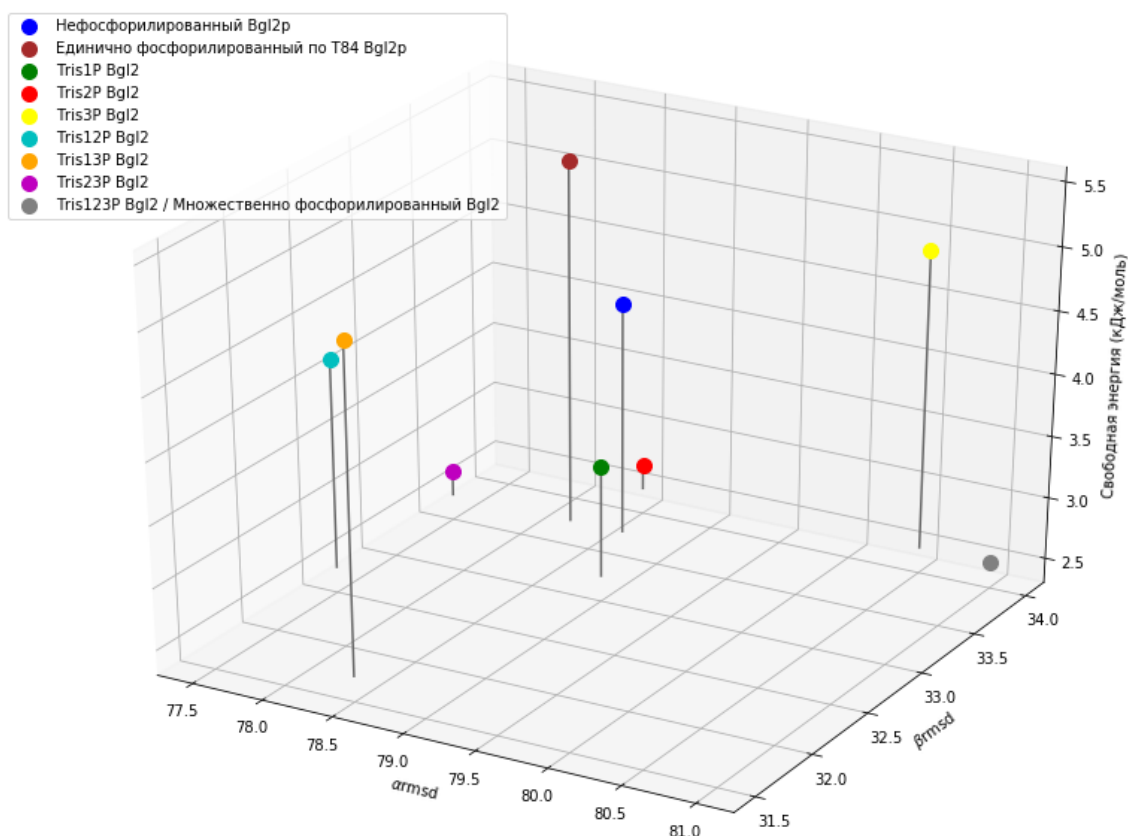


Рис.29. Глобальные энергетические минимумы свободной энергии, рассчитанной по координатам  $\alpha\text{rmsd}$  и  $\beta\text{rmsd}$ .

Полностью фосфорилированный Bgl2p (Tris 123 P Bgl2) оказывается одной из наиболее компактных форм Bgl2p, имеет максимум остатков аминокислот в составе  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -листов, имеет максимум внутримолекулярных ионных мостиков и минимальное значение свободной энергии.

Таким образом, для Bgl2p Т-пула полностью фосфорилированная форма Bgl2p, обеспечивая стабильность глобулярной укладки, может быть мажорной среди всех вариантов фосфорилирования.

В том случае, если множественное фосфорилирование критично не влияет на свободную энергию амилоидной формы, такое фосфорилирование может способствовать снижению способности белка к фибрилизации посредством молекулярных механизмов стабилизации глобулярной конформации.

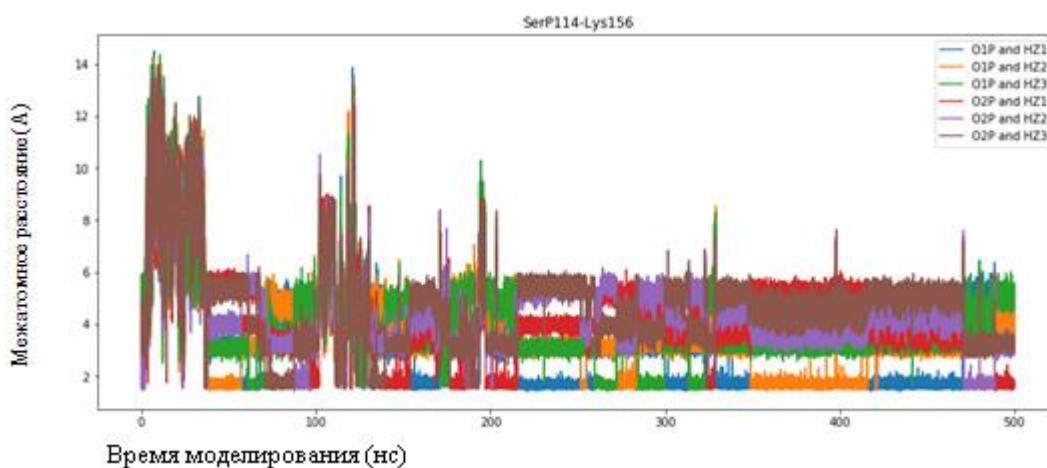
В конформационной стабилизации и снижении конформационной подвижности Bgl2p участвуют фосфатные группы из всех трех



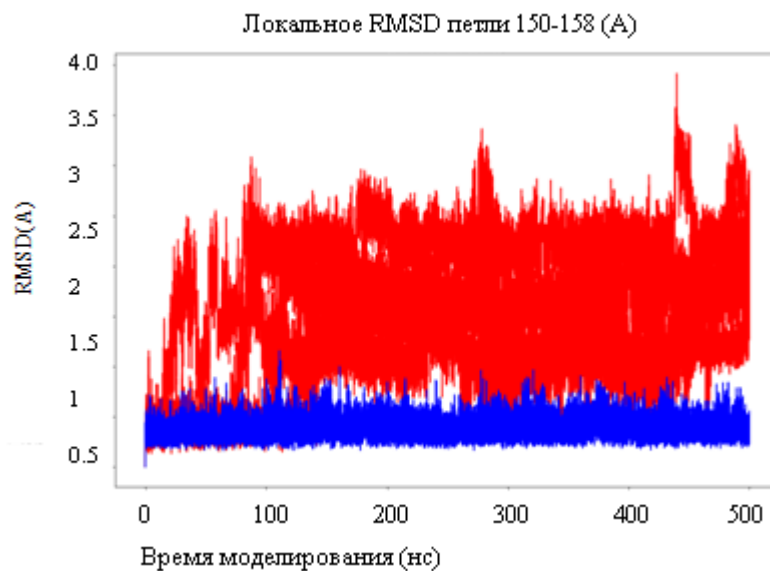
идентифицированных паттернов, что свидетельствует о важности роли фосфорилированных остатков каждого паттерна в конформационной стабилизации Bgl2p. В то время как экспонированные радикалы могут обеспечивать стабилизацию белка за счёт изменения значения энергии сольватации, фосфорилированные остатки вблизи гидрофобного ядра могут повысить стабильность белка в случае взаимодействия с соседними группами. Для объяснения наблюдаемой стабилизации конформации Bgl2p множественным фосфорилированием, рассмотрим пять независимых траекторий множественно-фосфорилированного белка длиной 500 нс и динамику межатомных расстояний, характеризующих водородные связи между этими двумя остатками и их ближайшими соседями.

Множественнофосфорилированная форма Bgl2p демонстрирует статистически достоверное снижение конформационной подвижности петли 150-158. Стабильности петли 150-158, обеспечивается взаимодействием лизина 156 с Фосфатом фосфосерина 114 из второго пептида: формируется ионный мостик, снижающий локальную подвижность данного участка в белке (Рисунок .30.).

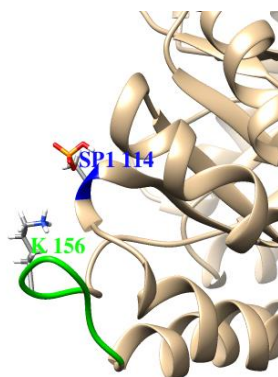
A)







В)

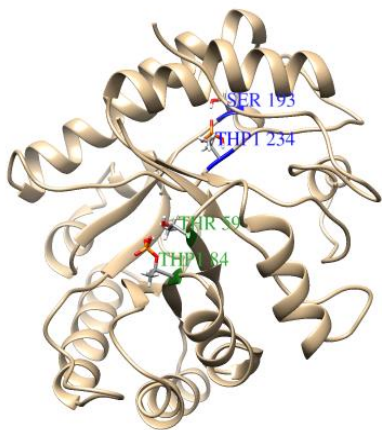


С)

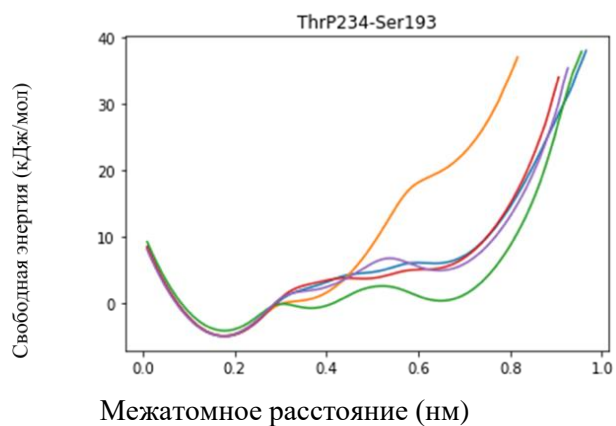
Рис.30.Ионный мостик с участием фосфата SP114 стабилизирует петлю 150-158 АА.

А) График, динамика межатомных расстояний, атомов, формирующих солевой мостик В)Локальная конформационная подвижность петли 150-158, Красный – немодифицированный Bgl2p, Синий -множественнофосфорилированный Bgl2p; С) Положение взаимодействующих остатков в составе Bgl2p (зелёный – петля 150-158)

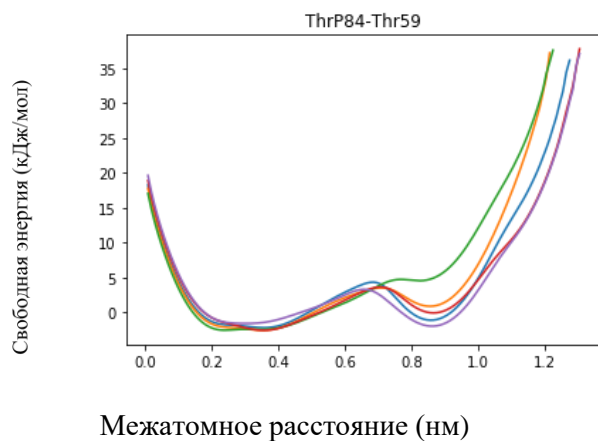
Фосфорилированные аминокислотные остатки из 1 и 3 пептида, расположенные на  $\beta$ -листе гидрофобного ядра формируют водородные связи с гидроксильными группами сближенных аминокислотных остатков, что может способствовать компактности гидрофобного ядра Bgl2p (Рис.31.).



A)



B)



C)

Рис.31. Фосфорилированные остатки пептидов 1 и 3 Bgl2p внутри молекулы и взаимодействующие с ними остатки

A) Положение в составе молекулы: фиолетовой – фосфотреонин 70 и тирозин 46, зелёный – фосфотреонин 234 и серин 193.

B) - C) Энергетические профили, демонстрирующие наличие водородных связей

Также возможно формирование водородных связей между фосфорилированными остатками 66 и 107, что может свидетельствовать о

возможной кооперативности фосфорилирований: формирование водородной связи только в случае фосфорилирований обоих остатков (Рис.32.).

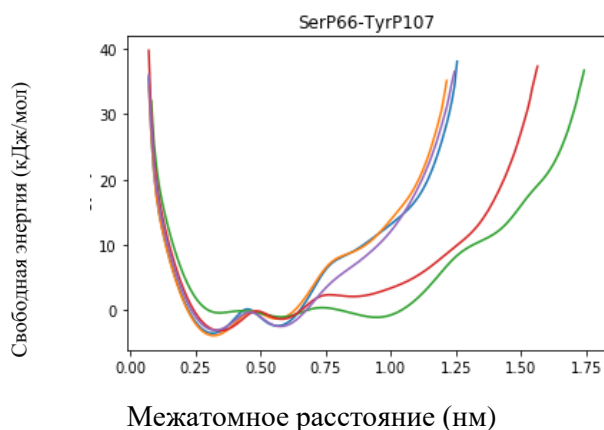


Рис.32. Энергетический профиль, демонстрирует наличие водородных связей между фосфосерином 66 и фосфотирозином 107.

Интерес представляет случай взаимодействия фосфатной группы фосфотреонина 241 с аспаратом 290: несмотря на формирования в ходе динамики солевых мостиков, значительных изменений в конформации петли 280-290, которая могла бы стабилизироваться, не наблюдается. Дело в том, что данная петля принимает участие в формировании каталитической щели и посттрансляционные модификации данной области могли бы быть регулятором активности Vgl2p. Возможно, реализующиеся взаимодействие оказывает значимый эффект на конформацию на одной из стадий катализа в комплексе с продуктом или субстратом.

#### **Единичное фосфорилирование Т84: влияние на глобулу Vgl2p и амилоидную фибриллу из пептидов 83-88 АК**

Как было сказано выше, фосфорилирование Т84 обеспечивает некоторое увеличение радиуса гирации, повышение свободной энергии сольватации и снижение доли  $\alpha$ - и  $\beta$ -элементов в глобуле. Что в совокупности говорит о некоторой дестабилизации глобулы фосфорилированием Т84.

Фосфорилирование Т84 располагается в составе пептида, идентифицированного как потенциально амилоидогенной. При построении фибриллы из этих пептидов использовался сервер Cordax, применяющий нейросетевые алгоритмы. Полученную фибриллу фосфорилировали по Т84 и ставили молекулярнодинамический расчёт

фосфорилированной и нефосфорилированной фибриллы в течение 150 нс. Фосфорилирование обеспечивает формирование дополнительных водородных связей, включая связи между фосфорилированными группами в составе одного  $\beta$ -листа, фосфорилированная фибрилла показала себя более устойчивой, с большим количеством водородных связей (Рис.33.). Остальные фосфорилирования не располагаются на амилоидогенных областях и, по-видимому влияют на фибриллообразование в большей степени именно через стабилизацию нативной структуры.

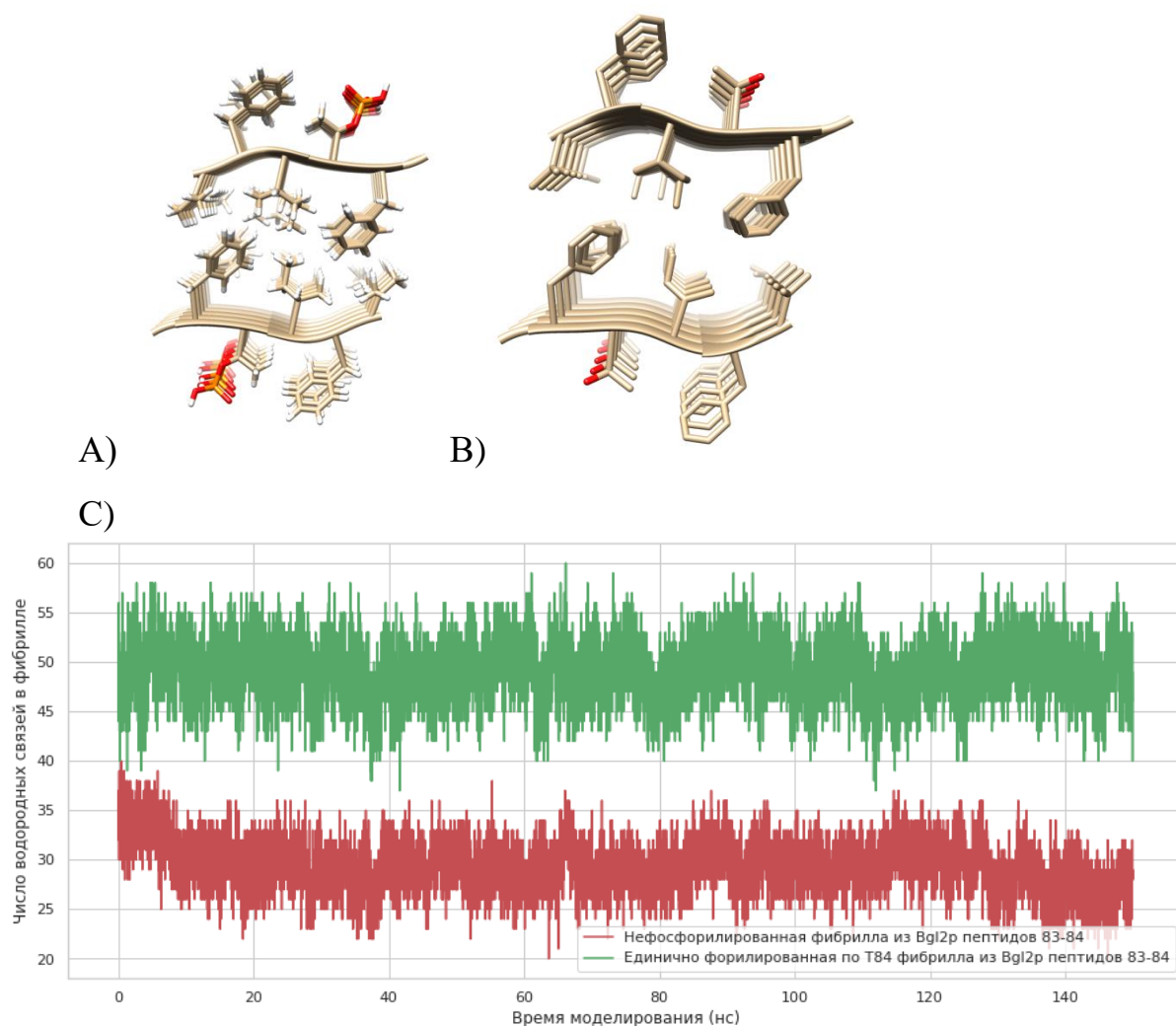


Рис.33. Фосфорилирование Т84 амилоидной фибриллы из пептида 83-88 способствует стабилизации фибриллы за счёт увеличения числа водородных связей

А) Модель фибриллы с фосфорилирование Т84, В) Модель фибриллы без фосфорилирования, С) Динамика числа водородных связей.

К сожалению, отсутствие данных о структуре амилоидной фибриллы не даёт возможности оценить влияние фосфорилирования на значение

свободной энергии фибриллы из полноразмерных молекул Bgl2p и построить профиль свободной энергии для глобулярной и фибриллярной формы в одной системе координат.

Однако, так как Bgl2p – это однодоменный маленький белок, все амилоидные пептиды которого находятся в составе гидрофобного ядра, формирование фибрилл амилоидного типа может требовать разупорядочивания глобулярной формы. И в таком случае, высокая вероятность того, что пептид 83-88 с доказанной способностью к фибриллизации и идентифицированный как один из наиболее способных к агрегации, может участвовать в формировании фибриллы.

В случае единично фосфорилированного Bgl2p, стабилизация амилоидной фибриллы из пептида 83-88 фосфорилированием T84 и небольшой дестабилизирующий эффект данного фосфорилирования на глобулярную форму, в совокупности могут способствовать амилоидизации единично-фосфорилированного белка. Что объясняет наличие единично фосфорилированного Bgl2p в составе G-пула с повышенной, по-видимому, способностью к фибриллизации.

Остальные 10 фосфорилирований не располагаются на амилоидных пептидах, поэтому, вероятно, незначительно влияют на стабилизацию амилоидной фибриллы, одновременно с чем, множественно фосфорилированная молекула демонстрирует, как показано выше, повышенную конформационную стабильность, компактность глобулярной формы, снижение свободной энергии сольватации белка. В такой молекуле, по-видимому, эффект фосфорилирования T84, повышающий способность к фибриллизации нивелируется остальными 10 фосфорилированиями, стабилизирующими глобулярную укладку.

Таким образом, данные молекулярного моделирования не противоречат гипотезе, согласно которой множественно фосфорилированная форма Bgl2p имеет пониженную способность к фибриллообразованию, в отличие от единично фосфорилированной формы, в случае которой, напротив, происходит повышения способности к фибриллообразованию.

Отметим, что о-пинаколилметилфосфонилирование в случае штамма V84 происходит по позициям 114 (Bgl2p G-пула) и 115 (Bgl2p T-пула) которые также как и T84 расположены в составе пептида, который некоторыми программами предсказывается как амилоидогенный (Bezsonov et al., 2013). Поэтому возможный компенсаторный механизм о-пинаколилметилфосфонилирования S114, который может обеспечить закрепление белка в G-пуле, заключается либо в стабилизации фибриллы по аналогии с фосфорилированием T84, либо в дестабилизации

глобулярной формы, поскольку фосфат S114 может формировать внутримолекулярный ионный мостик с топологически сближенным лизином 156, стабилизируя петлю 150-158 (Рис.30.). В последнем случае модификация 114 сайта может сделать затруднительным стабилизацию глобулы, что может привести к переходу в амилоидную форму.

В том случае, если о-пинаколилметилфосфонирование влияет на стабильность фибриллы, модификации сайтов 114 и 115, очевидно, будут расположены в одном случае в сторону стерической молнии в гидрофобном интерфейсе, а в другом случае будет экспонирована на периферию. И поэтому, возможно, одна модифицированная позиция (114) будет фибриллу стабилизировать, а другая модифицированная позиция (115) будет либо дестабилизировать фибриллу, либо влиять на её конформационную стабильность незначительно.

### **Очищенный препарат Bgl2p способен к формированию фибрилл**

Полученный препарат Bgl2p в ходе препаративного электрофореза в денатурирующих условиях и отмытый от SDS практически не содержал примесных белков, как показал LC-MS/MS –анализ. При этом молекулы Bgl2p были в этом препарате нефосфорилированными.

Изображения, полученные с помощью электронной микроскопии (контрастёр - уранил ацетат) говорят о том, что такой препарат может формировать фибриллы (Рис.34.).

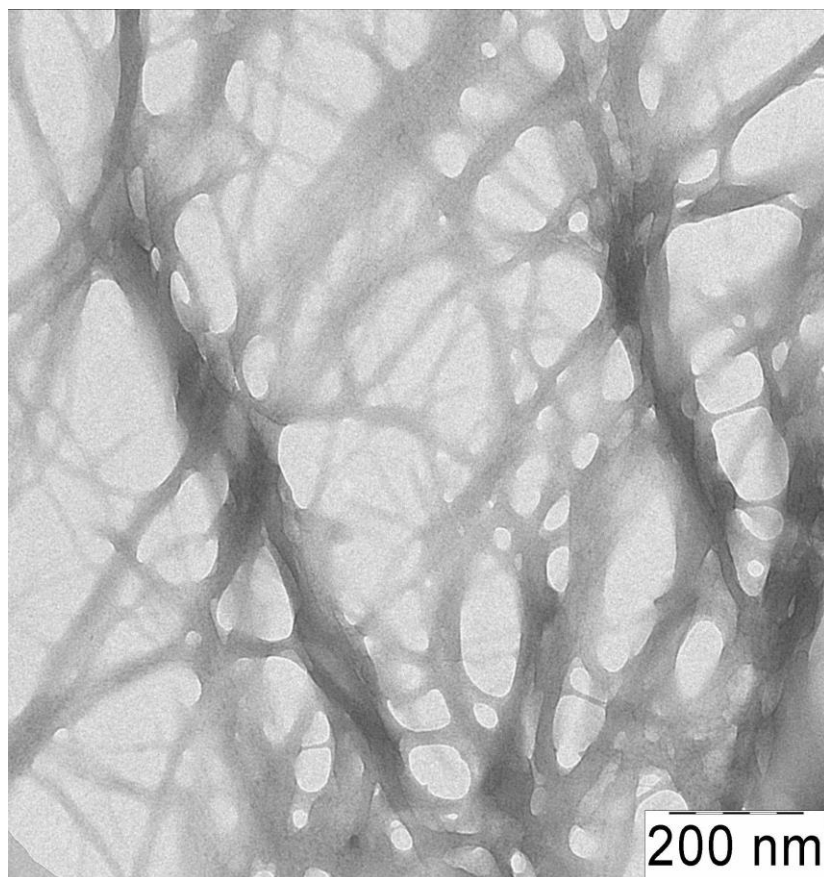


Рисунок 34. Электронная микроскопия очищенного препарата Bgl2p.

В совокупности с результатами молекулярного моделирования эти данные могут говорить о том, что Bgl2p в отсутствии множественного фосфорилирования, стабилизирующего его глобулярную укладку, может формировать фибриллярные структуры.

## Закключение

Суммируя ранее известные и полученные в данной работе результаты, можно заключить, что ПТМ Bgl2p можно рассматривать как возможные регуляторы его конформации и способа закрепления в КС.

В случае штамма дикого типа (wt), после транспорта нефосфорилированного Bgl2p в компартмент КС (Rekstina et al., 2020), по-видимому, может происходить единичное фосфорилирование по T84 (Bgl2p ) и такие молекулы будут закреплены в G-пуле, после чего часть таких молекул так и формируют G-пул, а часть может подвергаться множественному фосфорилированию. Множественно фосфорилированные молекулы будут закреплены в Т-пуле. Таким образом, фосфорилирование T84 может служить сигналом для множественного фосфорилирования (Рис.35.). Множественное фосфорилирование при этом, по-видимому, способствует сохранению Bgl2p в его глобулярной форме и снижению его возможности к фибриллообразованию, способствуя таким образом закреплению в Т-пуле. Единичное фосфорилирование по T84, напротив, вероятно способствует приобретению амилоидных свойств Bgl2p и его закреплению в G-пуле.

В штамме с делецией гена *PHO3* Bgl2p не фосфорилируется ни по одному сайту, что может объясняться высоким содержанием в КС такого штамма высокомолекулярных полифосфатов (содержание более чем в 2 раза превышает таковое в wt), что было показано в статье, которая в данный момент готовится к публикации. Возможно, происходит взаимодействие этих отрицательно заряженных макромолекул с Bgl2p (Рис.35.).

В случае же мутации T84 (его замены на V) фосфорилирование сайта T84 невозможно. Однако в таком штамме происходит модифицирование отдельных сайтов “условно компенсаторными” ПТМ. S114 –о-пинакоилметилфосфонилированные молекулы Bgl2p будут закреплены в G-пуле, а о-пинаколилметилфосфонилированные молекулы по T115 оказываются закреплённым в Т-пуле (Рис.35.).



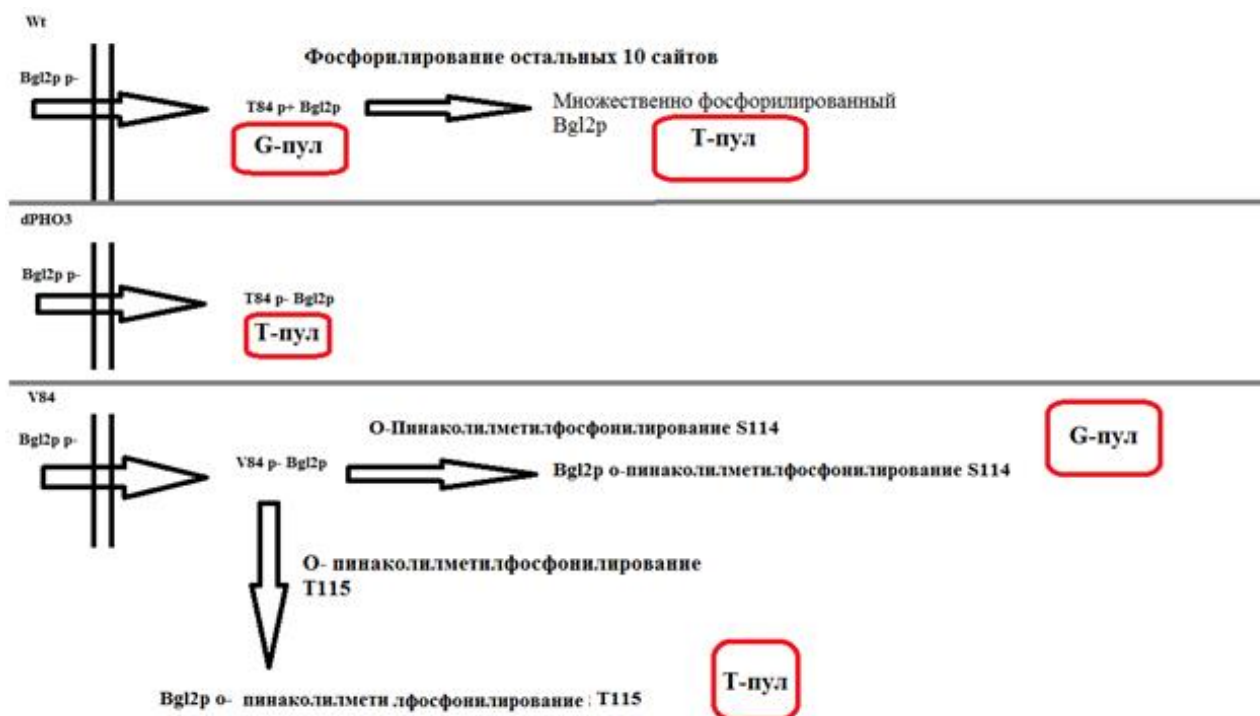


Рис.35. Возможная схема регуляции ПТМ способа закрепления в КС Bgl2p.

Bgl2p p- - нефосфорилированный Bgl2p, вертикальными параллельными прямыми обозначен бислой плазматической мембраны, стрелками показаны переходы Bgl2p в по-разному модифицированные формы

## Выводы

1) Глутатионилирование по цистеину 68 Bgl2p не является сигналом для формирования Т-пула и G-пула этого белка, в норме присутствующих в клеточной стенке дрожжей *S.cerevisiae*.

2) Фосфорилирование по треонину 84 Bgl2p может быть сигналом для множественного фосфорилирования, характерного для данного белка из Т-пула в норме.

3) Фосфорилирование молекулы Bgl2p не является необходимым для формирования Т-пула.

4) Замена треонина 84, единственного сайта фосфорилирования Bgl2p G-пула, на нефосфорилируемый валин сопровождается частичным снижением содержания Bgl2p в G-пуле и появлением опи-наколилметилфосфонилования серина 114, что может свидетельствовать о важности фосфорилирования треонина 84 в формировании G-пула и о возможной компенсаторной роли данной модификации серина 114.

5) Множественное фосфорилирование Bgl2p способствует повышению конформационной стабильности глобулярной формы белка, в то время как единичное фосфорилирование треонина 84 Bgl2p в составе амилоидного пептида 83-88, по-видимому, может способствовать переходу белка в амилоидную форму. Что коррелирует с данными литературы о различиях в закреплении Bgl2p, фосфорилированного в разной степени.

6) Очищенный и нефосфорилированный Bgl2p способен к формированию фибрилл.

## **Личный вклад и благодарности**

Выражаю благодарность Калебиной Т.С. и Рекстиной В.В. за чуткое руководство, обучение основным методам работы в лабораторию. Выражаю благодарность Шайтану А.К. за чуткое руководство, а также обучение методам молекулярно-динамических расчётов, обучения грамотной обработке и интерпретации полученных результатов, а также за предоставление сервера Ньютон для работы.

В ходе данной работы все процедуры были выполнены мной самостоятельно, за исключением секвенирования по Сенгеру, LC-MS/MS –анализ и получения изображений электронной микроскопии. Секвенирование проводила компания “Евроген”.

LC-MS/MS–анализ проводила лаборатория коллаборатор под руководством Зиганшина Р.Х..

Изображения электронной микроскопии получала, а также готовила сеточки и контрастировала препарат для микроскопии Рекстина В.В..

## Список использованной литературы

1. Andrew C. D., Warwicker J., Jones G. R. , Doig A. J. (2002) Effect of phosphorylation on  $\alpha$ -helix stability as a function of position. *Biochemistry* **41**: 1897–1905.
2. Benson M.D., Buxbaum J.N., Eisenberg D.S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Sekijima Y., Sipe J.D., Westermarck P. Amyloid nomenclature 2018: Recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2018;25:215–219
3. Bezsonov E.E., Groenning M., Galzitskaya O.V. (2013). Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation. *Prion*.;7(2):175-184.
4. Bondarev S.A., Antonets K.S., Kajava A.V, Nizhnikov A.A, Zhouravleva G.A. (2018). Protein Co-Aggregation Related to Amyloids: Methods of Investigation, Diversity, and Classification. *Int J Mol Sci*.;19(8):2292.
5. Chiti F, Dobson CM. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*.;75:333-66.
6. Cordeiro Y., Macedo B., Silva J.L., Gomes M.P.B. (2014). Pathological implications of nucleic acid interactions with proteins associated with neurodegenerative diseases. *Biophys Rev*.6(1):97-110.
7. Cui L., Zheng W., Li M.( 2019). Phosphorylation Status of Tyrosine 78 Residue Regulates the Nuclear Export and Ubiquitination of Influenza A Virus Nucleoprotein. *Front Microbiol*. 2019;10:1816.
8. Das R., Mitra A., Mitra G., Maity D., Bhat V., Pal D., Ross C., Kurpad A.V., Mandal A.K. (2018). Molecular insights of inhibition in sickle hemoglobin polymerization upon glutathionylation: hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and molecular dynamics simulation-based approach. *Biochem J*.475(13):2153-2166.
9. Dueholm M.S., Larsen P., Finster K. (2015) The Tubular Sheaths Encasing Methanosaeta thermophila Filaments Are Functional Amyloids. *J Biol Chem*.290(33):20590-20600.
10. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. (2012). *Cell*.148(6):1188-1203.
11. Hameed, M. S. Shahul. “S-GLUTATHIONYLATION OF CYSTEINE-217 ALLOSTERICALLY INHIBITS TRIOSE-PHOSPHATE ISOMERASE: A MOLECULAR DYNAMICS STUDY.” (2016)*Journal of Proteins & Proteomics* 7: n. pag.
12. Horwitz A.A., Walter J.M., Schubert M.G., Kung S.H., Hawkins K., Platt D.M., Hernday A.D, Mahatdejkul-Meadows T, Szeto W., Chandran SS, Newman J.D. (2015).Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Syst*. 1(1):88-96.
13. Hu, Z. W., Ma, M. R., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., Qiang, W., Li Y. M. (2017). Phosphorylation at Ser<sup>8</sup> as an Intrinsic Regulatory Switch to Regulate the

Morphologies and Structures of Alzheimer's 40-residue  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ 40) Fibrils. *The Journal of biological chemistry*. 292(7). 2611–2623.

14. Kajava A.V., Baxa U., Steven A.C. (2010). Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. *FASEB J*. 24(5):1311-1319.
15. Kalebina T.S, Plotnikova T.A, Gorkovskii A.A. (2008). Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. *Prion*.;2(2):91-96.
16. Kozin S. A., Philippe T., Alexandra K., Maria I., Yuri M., Andrey I., Igor P. Alexis I., Vladimir P., Alexander M. (2014). Zinc-induced dimers of chemically modified A $\beta$  are possible aggregation seeds *Alzheimer's and Dementia Elsevier BV(Netherlands)*, 10(4): P793.
17. Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Methods*. ;11:319–324.
18. Kumar S., Brown M.A., Nath A., Miranker A.D. (2014). Folded small molecule manipulation of islet amyloid polypeptide. *Chem Biol*. 21(6):775-781.
19. Kumar S., Wirths O., Stüber K., Wunderlich P., Koch P., Theil S., Rezaei-Ghaleh N., Zweckstetter, M., Bayer, T. A., Brüstle, O., Thal, D. R., & Walter, J. (2016). Phosphorylation of the amyloid  $\beta$ -peptide at Ser26 stabilizes oligomeric assembly and increases neurotoxicity. *Acta neuropathologica*, 131(4), 525–537.
20. Kushnirov V.V., Vishnevskaya A.B., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D. (2007). Prion and nonprion amyloids: a comparison inspired by the yeast Sup35 protein. *Prion*. 2007 Jul-Sep;1(3):179-84.
21. LeVine H. 3rd. (1999) Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*.309:274-84.
22. Louros N. , Orlando G. , Vleeschouwer M. , Rousseau F.& Schymkowitz J. (2020). Structure-based machine-guided mapping of amyloid sequence space reveals uncharted sequence clusters with higher solubilities. *Nature Communications*. 11:3314.
23. Lu J.X., Qiang W., Yau W.M., Schwieters C.D., Meredith S.C., Tycko R. (2013) Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*.154(6):1257-68.
24. Lyons A.J., Gandhi N.S., Mancera R.L. (2014). Molecular dynamics simulation of the phosphorylation-induced conformational changes of a tau peptide fragment. *Proteins*. 82(9):1907-23.
25. Makrantonis V., Corbishley S. J., Rachidi N., Morrice N. A., Robinson D. A., Stark M. J. (2014). Phosphorylation of Sli15 by Ipl1 is important for proper CPC localization and chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*. 9(2): e89399.

26. Miranda F.F., Thórólfsson M., Teigen K., Sanchez-Ruiz J.M., Martínez A. (2004). Structural and stability effects of phosphorylation: Localized structural changes in phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci.*13(5):1219-1226.
27. Musaogullari A., Chai, Y.C. (2020). Redox Regulation by Protein S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Implications in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.*. 21. 8113.
28. Nelson R., Eisenberg D. (2006). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*.16:260–265.
29. Nishi H., Shaytan A., Panchenko A.R. (2014). Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet.*5. 270.
30. Qi X., Hou S., Lepp A., Li R., Basir Z., Lou Z., Chen, G. (2011). Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II $\alpha$  protein by p38 $\gamma$  mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *The Journal of biological chemistry*, 286(41):35883–35890.
31. Sabirzyanov F.A., Sabirzyanova T.A., Rekstina V.V., Adzhubei A.A., Kalebina T.S. (2018). C-Terminal sequence is involved in the incorporation of Bgl2p glucanosyltransglycosylase in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 1.18(1).
32. Rezaei-Ghaleh N, Amininasab M, Kumar S, Walter J, Zweckstetter M. (2016) Phosphorylation modifies the molecular stability of  $\beta$ -amyloid deposits. *Nat Commun.*.7:11359.
33. Roche D.B., Villain E, Kajava A.V. (2017). Usage of a dataset of NMR resolved protein structures to test aggregation versus solubility prediction algorithms. *Protein Sci.*;26(9):1864-1869.
34. Rekstina V. V., Sabirzyanova T. A., Sabirzyanov F. A., Adzhubei A. A., Tkachev Y. V., Kudryashova I. B., Snalina N. E., Bykova A. A., Alessenko A. V., Ziganshin R. H., Kuznetsov S. A., Kalebina T. S. (2020). The Post-Translational Modifications, Localization, and Mode of Attachment of Non-Covalently Bound Glucanosyltransglycosylases of Yeast Cell Wall as a Key to Understanding their Functioning. *International journal of molecular sciences*. 21(21): 8304.
35. Smith, J. F., Knowles, T. P., Dobson, C. M., Macphee, C. E., & Welland, M. E. (2006). Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(43): 15806–15811.
36. Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273:729–739.
37. Tayeb-Fligelman E., Tabachnikov O., Moshe A. (2017). The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM $\alpha$ 3 reveals a cross- $\alpha$  amyloid-like fibril. *Science*. 355(6327):831-833.

38. Wolfe L.S., Calabrese M.F., Nath A., Blaho D. V. , Miranker A. D. , Xiong Y. (2010). Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(39):16863-16868.
39. Zheng Y., Joo H. S. , Nair V., Le K. Y. , Otto M. (2018). Do amyloid structures formed by *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins have a biological function? *Int J Med Microbiol.*;308(6):675-682.