

# Структура и динамика амилоидного белка дрожжей Bgl2p, поиск остатков аминокислот, модификации которых влияют на его закрепление в клеточной стенке

Исполнитель: студент 4 курса кафедры молекулярной биологии Никита  
Моторин

Научные руководители: профессор, д.б.н. Т.С. Калебина,  
Доцент, д.ф-м.н. А.К. Шайтан,

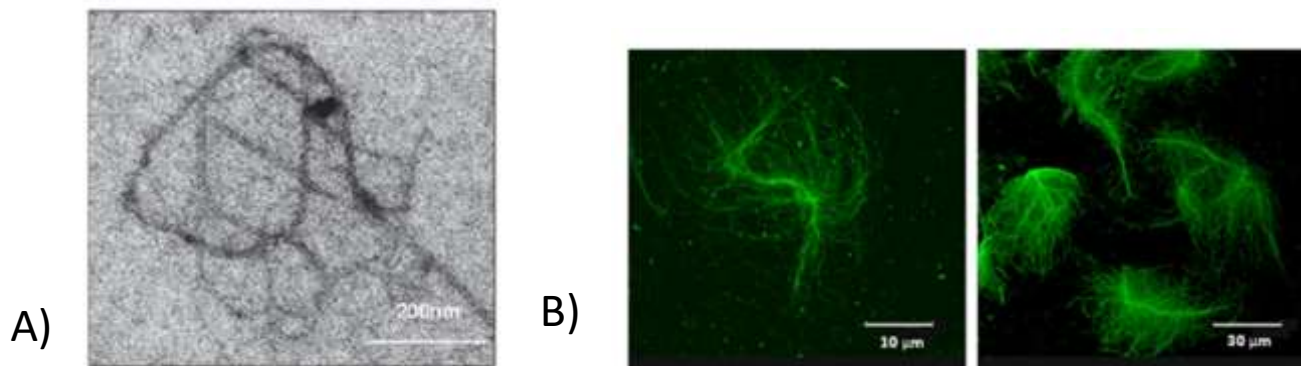
Сотрудник кафедры молекулярной биологии В.В. Рекстина

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии биологического  
факультета МГУ

Москва, 2022 год

# Объект исследования

**Bgl2p** - мажорный, консервативный и конститутивный белок клеточной стенки (КС) дрожжей. Обладает свойствами амилоидов.



А) Электронная микроскопия фибрилл Bgl2p (Kalebina et al., 2008);

В) Флуоресцентная микроскопия, окраска фибрилл антителами к Bgl2p (Bezsonov et al., 2013)

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.

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.

# Экспериментальная база работы

В клеточной стенке представлено два по-разному закрепленных пула, содержащих амилоидный белок Bgl2p.

- 1) **G-пул: прочно закреплённый Bgl2p**, экстрагируемый 6 М раствором **Г**уанидин хлорида и по-видимому обладающий выраженными **амилоидными свойствами**.
- 2) **T-пул: менее прочно закреплённый Bgl2p**, экстрагируемый 0.1 М **Т**риса.

Bgl2p G-пула содержит молекулы с единичным фосфорилированием по треонину 84 (T84) и молекулы без фосфорилирования.

Bgl2p T-пула содержит молекулы фосфорилированные в разной степени: имеет 11 фосфорилированных остатков (включая T84), распределённых по трём пептидам данного белка, а также глутатионилированные по цистеину 68 (C68) (Rekstina et al., 2020).

Фосфорилирование по T84:

- 1) Единственное фосфорилирование Bgl2p представленное в обоих пулах.
- 2) В составе амилоидогенного пептида 83-88.
- 3) Консервативное фосфорилирование.

В группе Калебиной Т.С., В. В. Рекстиной показано, что Bgl2p отсутствует в G-пуле в случае штамма с делецией гена *PHO3* (*pho3Δ*). Набор ПТМ неизвестен.

T	P	<sup>62</sup> VYAASDCNTLQNLGPAAEAE <sup>101</sup> IFVGWPTDDSHYAAEK <sup>101</sup>
		<sup>99</sup> AEKAALQTYLPKIKES TVAGFLVGSEALYR <sup>128</sup>
		<sup>224</sup> STDI <sup>254</sup> TFWVGEIGWPTDG INFESSYPSVDNAK <sup>254</sup>
G	P	<sup>62</sup> VYAASDCNTLQNLGPAAEAE <sup>101</sup> IFVGWPTDDSHYAAEK <sup>101</sup>

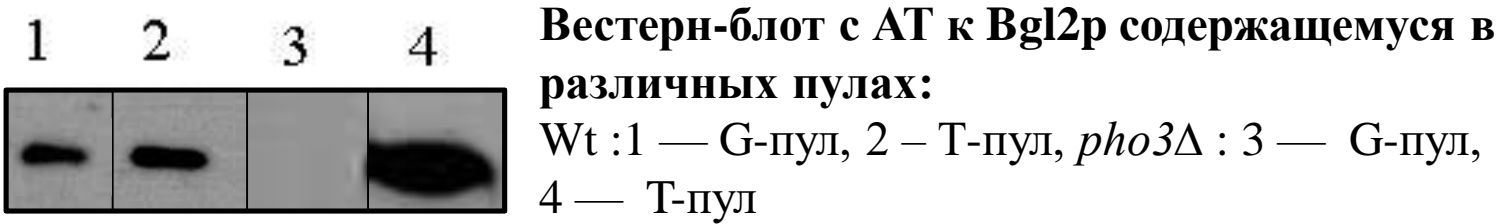
# Цели и задачи

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

Были поставлены **задачи**:

- Изучить набор посттрансляционных модификаций Bgl2p в штамме *pho3Δ* с отсутствующим G-пулом Bgl2p.
- Получить мутант с заменой Т 84 на V (штамм V84) и изучить влияние этой замены на способ закрепления Bgl2p в КС и его ПТМ.
- Исследовать влияние множественного фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p с использованием методов молекулярного моделирования.
- С помощью методов молекулярного моделирования исследовать влияние единичного Т84 фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p и амилоидную фибриллу из амилоидогенных пептидов 83-88, объяснить разницу в способе закрепления по-разному модифицированных белков.
- Изучить способность очищенного от примесных белков Bgl2p к формированию фибрилл амилоидного типа и набора ПТМ в таком препарате.

# Изучить набор посттрансляционных модификаций Bgl2p в штамме *pho3Δ* с отсутствующим G-пулом Bgl2p



## ПТМ Bgl2p Т-пула штамма *pho3Δ*:

Пул	ПТМ	Пептид	
Т	Glut	<sup>62</sup> VYAASD_CNTLQNLGPAAEAEG FTIFVGWPTDDSHYAAEK <sup>101</sup>	Глутатионилирование 68 сохраняется
		<sup>62</sup> VYAASDCNTLQNLGPAAEAEGFT IFVGWPTDDSHYAAEK <sup>101</sup>	
	P	<sup>99</sup> AEKAALQ_TYLPKIKES TVAGFLVGSEALYR <sup>128</sup>	Все фосфорилирования исчезают
		<sup>224</sup> STDITFWVGETGWPTDG TNFESSYPSVDNAK <sup>254</sup>	

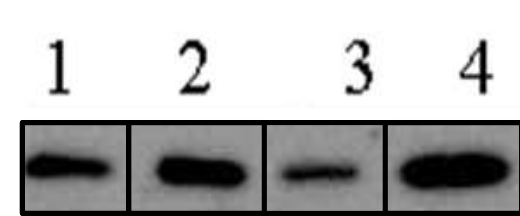
Не может быть сигналом для формирования G-пула

Может быть сигналом для формирования G-пула

# Получить мутант с замененной Т 84 на V (штамм V84) и изучить влияние этой замены на способ закрепления Bgl2p в КС и его ПТМ

Мутант был получен и проверен с помощью секвенирования.

**Мутация приводит к снижению содержания Bgl2p в G-пуле.**  
Фосфорилирование Т84 способствует закреплению Bgl2p в G-пуле.



**Вестерн-блот с АТ к Bgl2p содержащемуся в различных пулах:**

Wt : 1 — G-пул, 2 — Т-пул, V84: 3 — G-пул, 4 — Т-пул

**Bgl2p не фосфорилирован ни по одному сайту.** Фосфорилирование Т84 — вероятный сигнал для множественного фосфорилирования.

**Глутатионилирование по С68 отсутствует** — дополнительное свидетельство о том, что эта ПТМ в закреплении не важна и не является сигналом для закрепления Т- и G-пулов Bgl2p

**Появляются новые возможно компенсаторные ПТМ:**  
**о-пинаколилметилфосфонилирование 115 (Т-пул) и 114 (G-пул).**

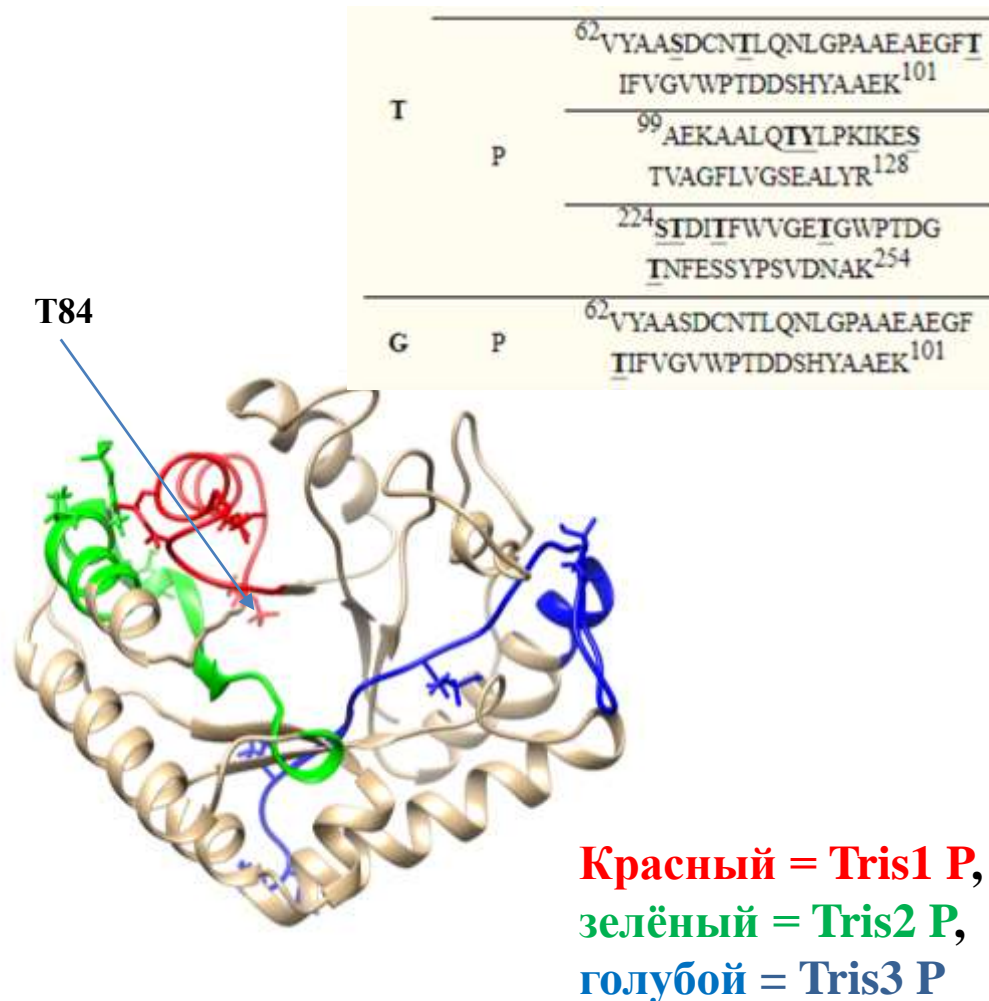
# С помощью методов молекулярного моделирования исследовать влияние множественного фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p

Модель взята из AlphaFold.

Помимо полностью фосфорилированного Bgl2p моделировали формы с промежуточной степенью фосфорилирования.

В Т-пуле есть 3 фосфорилированных пептида, значит потенциально молекулы Bgl2p могут быть фосфорилированы полностью и промежуточным образом:

*Tris1 P* (только по первому пептиду), *Tris 2P* (только по второму пептиду), *Tris 3 P*, *Tris 12 P*, *Tris 13 P*, *Tris 23 P*, *Tris 123 P* – 7 комбинаций, возможных в трисовом пуле.



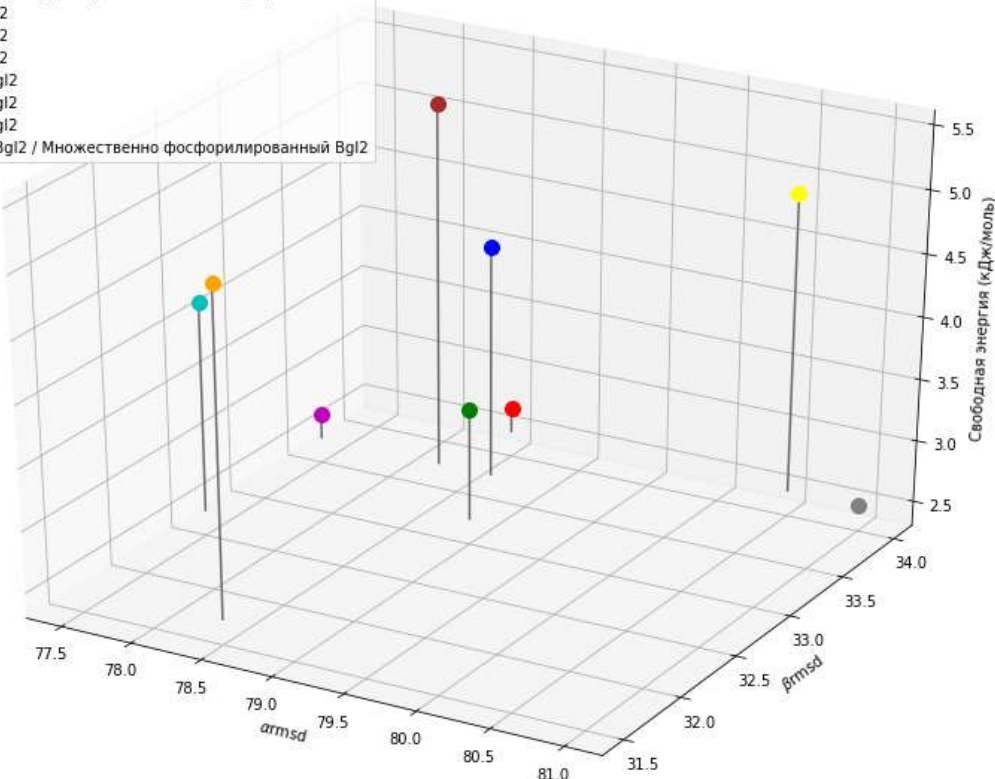


**Полностью фосфорилированная форма** – одна из наиболее компактных и имеет минимальное значение свободной энергии, максимум доля альфа-спиралей и бета-листов.

Распределение значений радиуса гирации (мера компактности глобулы)



- Нефосфорилированный Bgl2p
- Единично фосфорилированный по T84 Bgl2p
- Tris1P Bgl2
- Tris2P Bgl2
- Tris3P Bgl2
- Tris12P Bgl2
- Tris13P Bgl2
- Tris23P Bgl2
- Tris123P Bgl2 / Множественно фосфорилированный Bgl2



Минимумы свободной энергии: профиль по координатам альфа- и бета-rmsd (величины пропорциональные доле альфа- и бета-структур в белке)

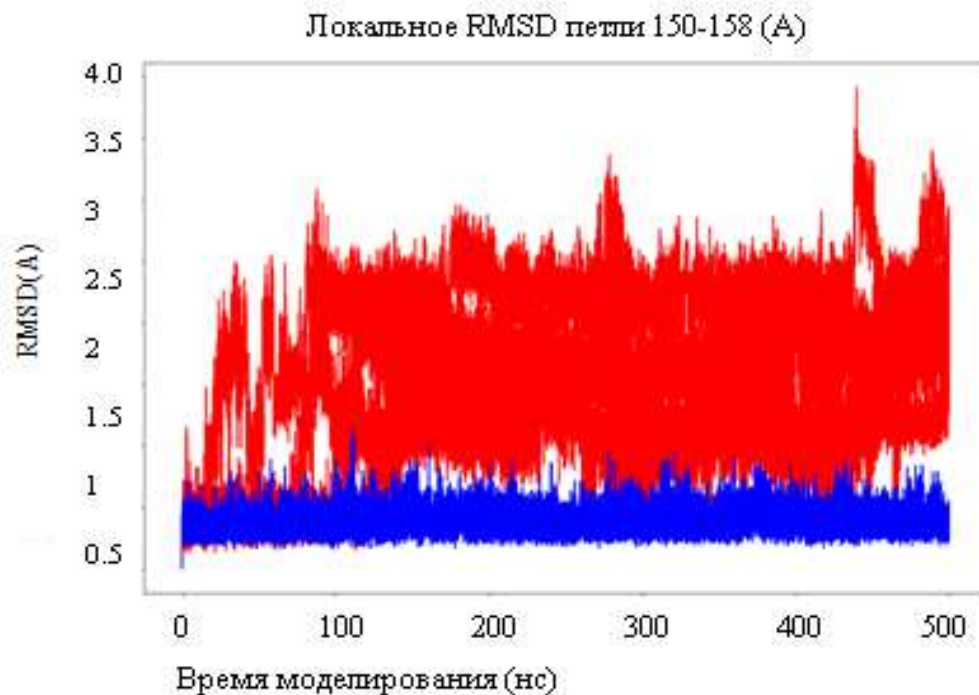
- Нефосфорилированный Bgl2p
- Единично фосфорилированный по T84 Bgl2p
- Tris1P Bgl2
- Tris2P Bgl2
- Tris3P Bgl2
- Tris12P Bgl2
- Tris13P Bgl2
- Tris23P Bgl2
- Tris123P Bgl2 / Множественно фосфорилированный Bgl2



Какие именно **молекулярные механизмы** лежат  
в основе **стабилизации глобулы**  
*множественным фосфорилированием?*

*Анализ результатов молекулярно динамических  
расчётов демонстрирует эти механизмы*

## Ионный мостик между фосфосерином 114 и лизином 156 стабилизирует петлю 150-158



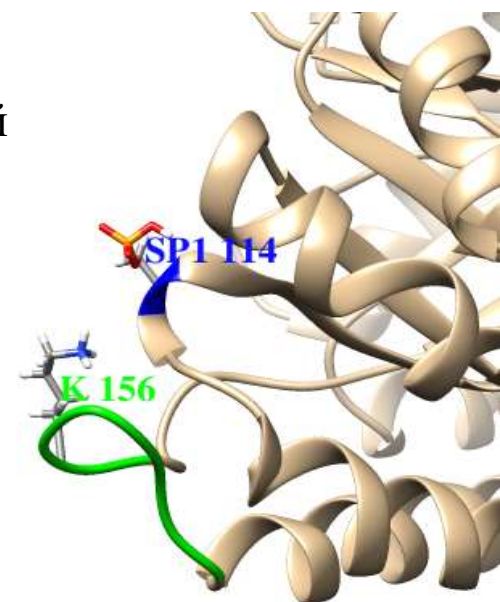
Нефосфорилированный

**Bgl2p красный**

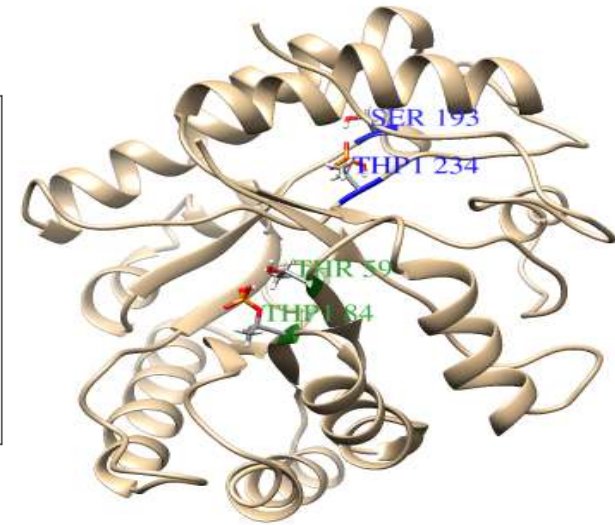
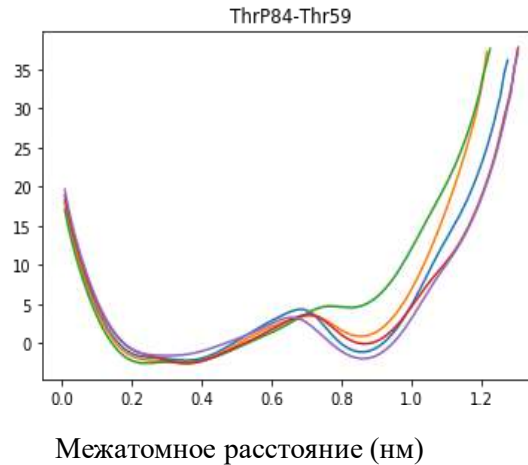
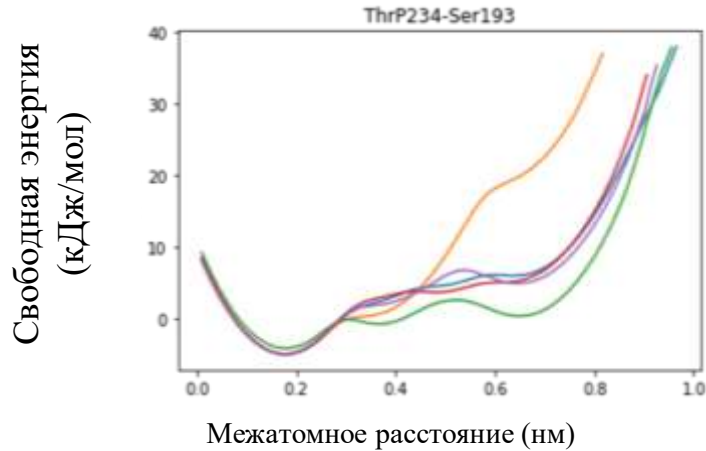
Полностью

фосфорилированный

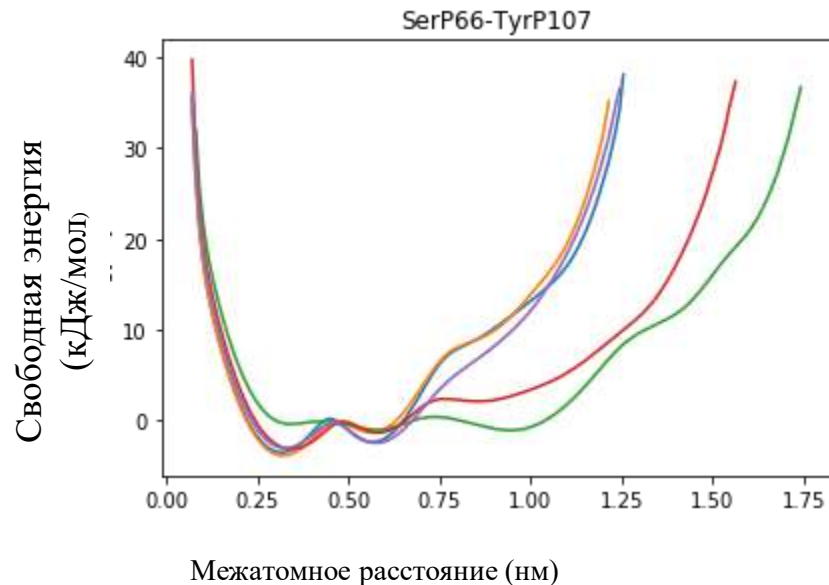
**Bgl2p синий**



## Стабилизация гидрофобного ядра путём формирования водородных связей с участием фосфатных групп



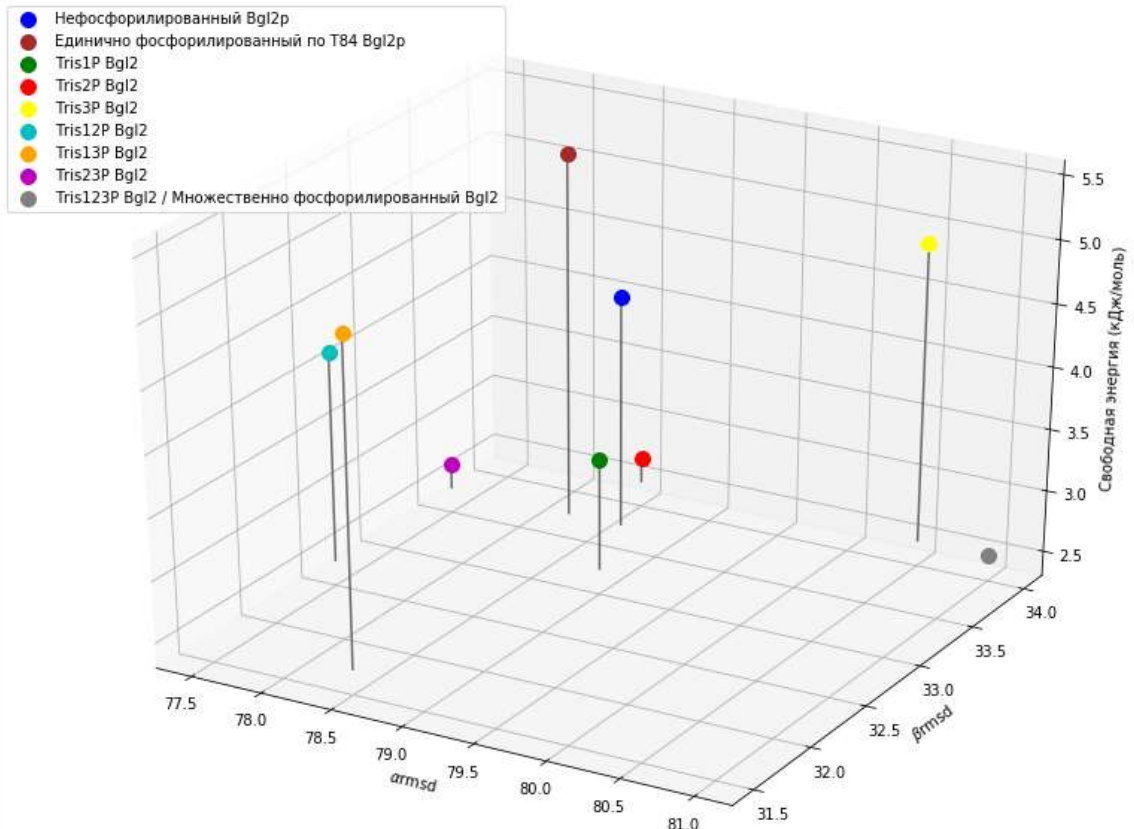
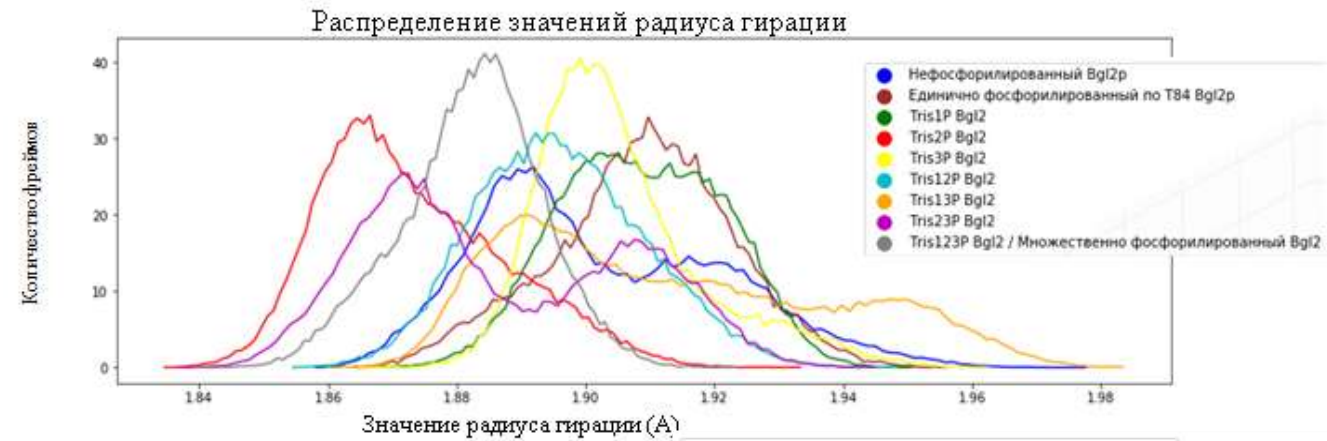
Также происходит формирование водородных связей между фосфатами фосфорилированными остатками 66 и 107, что может свидетельствовать о возможной кооперативности фосфорилирований: формирование водородной связи только в случае фосфорилирований обоих остатков



T		<sup>62</sup> <u>VYAAS</u> <u>DCNTLQNLGPA</u> <u>AEAE</u> <u>EGFT</u> <u>IFVG</u> <u>VWPTDDSHYAAEK</u> <sup>101</sup>
	P	<sup>99</sup> <u>AEKAALQ</u> <u>IT</u> <u>PKIKES</u> <u>TVAG</u> <u>FLVGSEALYR</u> <sup>128</sup>
		<sup>224</sup> <u>S</u> <u>IDI</u> <u>IFWVGE</u> <u>IGWPTDG</u> <u>INFESSYPSVDNAK</u> <sup>254</sup>
G	P	<sup>62</sup> <u>VYAASDCNTLQNLGPA</u> <u>AEAE</u> <u>EGF</u> <u>IIFVG</u> <u>VWPTDDSHYAAEK</u> <sup>101</sup>

## Разные цвета на графиках - повторы

**С помощью методов молекулярного моделирования исследовать влияние единичного Т84 фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p и амилоидную фибриллу из амилоидогенных пептидов 83-88**

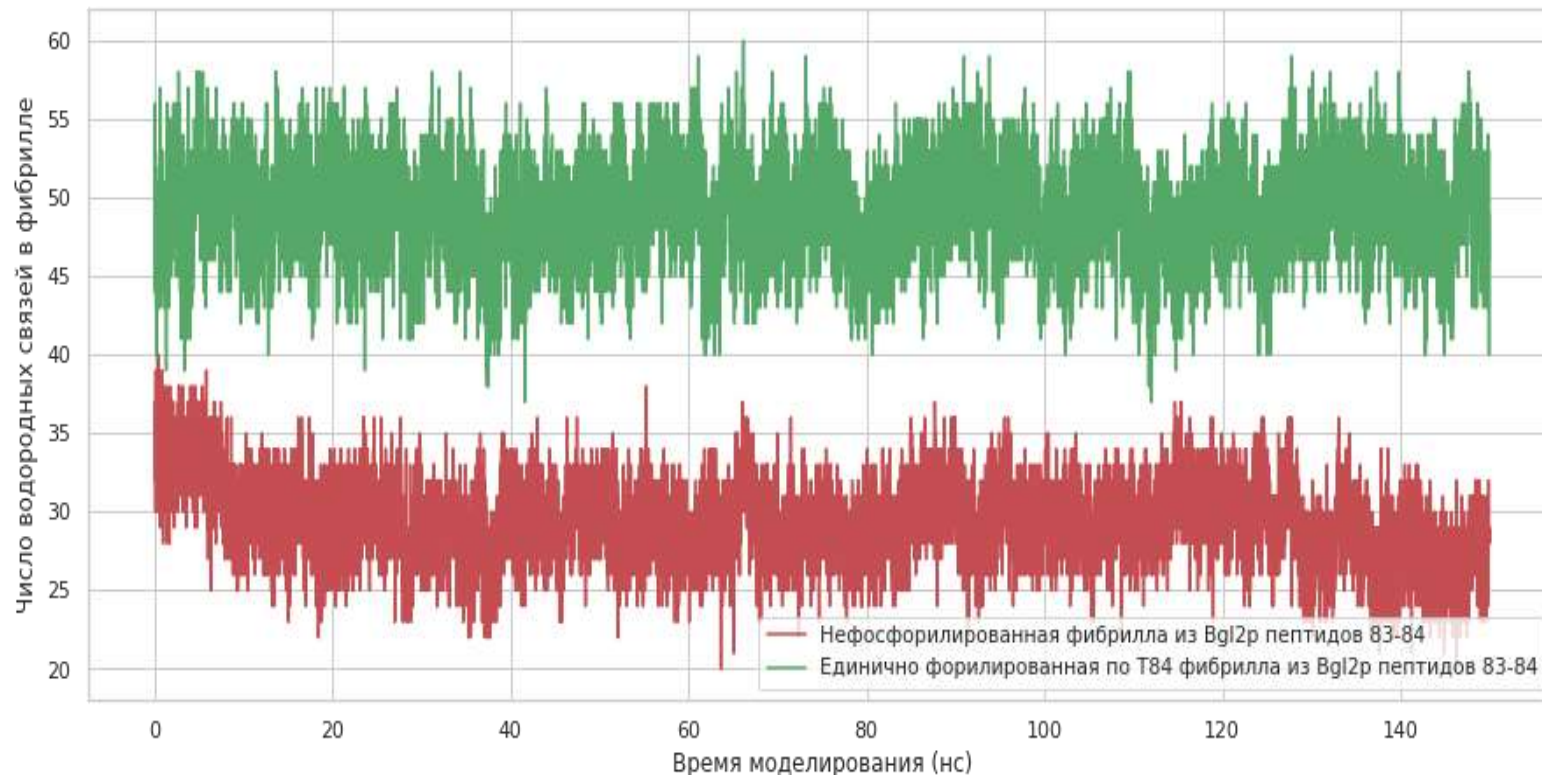
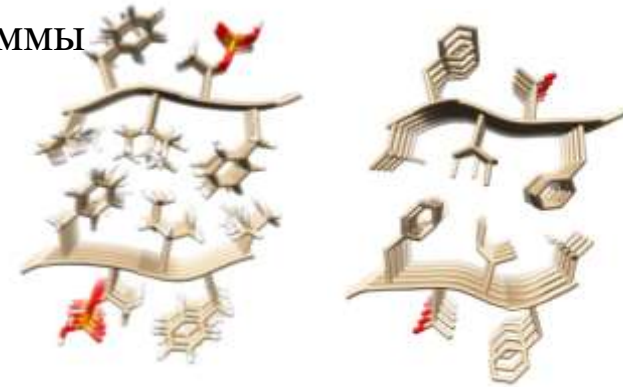


**Единичное фосфорилирование Т84** дестабилизирует глобулу: максимальное значение свободной энергии, значительное увеличение радиуса гирации.

# С помощью методов молекулярного моделирования исследовать влияние единичного Т84 фосфорилирования на конформацию глобулярной формы Bgl2p и амилоидную фибриллу из амилоидогенных пептидов 83-88

Модель фибриллы была построена с использованием программы Cordax

**Фосфорилирование Т84 стабилизирует амилоидную фибриллу из пептидов 83-88.**

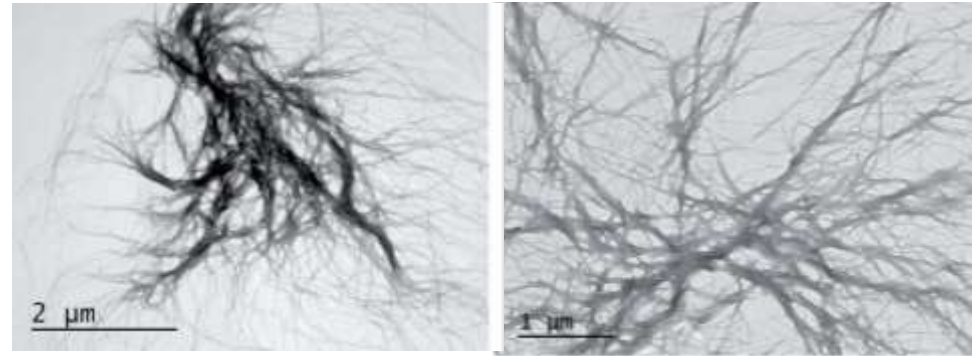




# В Bgl2p, образовавшем фибриллы, не определяется фосфорилирование

Если белок содержит множественное фосфорилирование (все 11 сайтов, включая T84), *которое глобулу стабилизирует* – Bgl2p будет хуже амилоидизироваться.

Если белок содержит только единичное фосфорилирование по T84, *которое фибриллу стабилизирует* – Bgl2p будет лучше амилоидизироваться.



Электронная микроскопия фибрилл образуемых Bgl2p (Калебина и др., 2021).

По данным моделирования

Однако, даже нефосфорилированный Bgl2p способен фибриллизироваться. По экспериментальным данным.

Калебина Т.С., Рекстина В.В., Горковский А.А., Королев А.Г., Ерещенко М.И., Моторин Н.А., Моренков О.С., Иноземцев А.Н., Сочетанное воздействие белка с амилоидными свойствами Bgl2p и других компонентов клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на состояние кожных покровов и поведение мышей, Академия Микологии, Москва, Иммунопатология, аллергология, инфектология, №3, 2021, с. 86-97, doi: 10.14427/jipai.2021.3.86

# Гипотетическая схема регуляции закрепления Bgl2p в КС, посредством разных ПТМ



*114 и 115 остатки расположены в составе амилоидогенного пептида, т.к. в амилоиде радикалы остатков в составе гидрофобного ядра чередуются с экспонированными в воду – модификации соседних сайтов могут противоположно влиять на стабильность фибриллы в случае штамма V84.*



# Выводы

- 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*.
- Фосфорилирование по треонину 84 Bgl2p может быть сигналом для множественного фосфорилирования, характерного для данного белка из Т-пула в норме.
- Фосфорилирование молекулы Bgl2p не является необходимым для формирования Т-пула.
- Замена треонина 84, единственного сайта фосфорилирования Bgl2p G-пула, на нефосфорилируемый валин сопровождается частичным снижением содержания Bgl2p в G-пуле и появлением о-пинаколиметилфосфонилирования серина 114, что может свидетельствовать о важности фосфорилирования треонина 84 в формировании G-пула и о возможной компенсаторной роли данной модификации серина 114.
- 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.
- Очищенный и нефосфорилированный Bgl2p способен к формированию фибрилл.

**Спасибо за внимание!**

# Благодарности

- Выражаю благодарность Калобиной 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.