

STRUCTURAL CHARACTERISATION OF LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEINS FROM *RAMONDA SERBICA*: POTENTIAL TO INHIBIT α -SYNUCLEIN AGGREGATION

Marija Vidović¹, Ana Pantelić², Strahinja Stevanović¹

¹ Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Laboratory for Plant Molecular Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

² University of Belgrade - Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Ramonda serbica is an endemic and resurrection plant species that can survive extreme dehydration even over months. Desiccation (loss of >95% of cellular water) leads to protein denaturation, aggregation, and degradation and impairs membrane lipid fluidity, resulting in loss of membrane integrity at the cellular level. The induction of late embryogenesis abundant proteins (LEAPs) is considered an essential component of desiccation tolerance strategy in so-called resurrection plants. This heterogeneous group of anhydrobiosis-related intrinsically disordered proteins (IDPs) is characterized by high structural plasticity enabling them to interact with various ligands and partners, including ion sequestration and stabilization of membranes and enzymes during freezing or drying. The aim of our research is to assess the potential of selected RsLEAPs to inhibit the aggregation of α -synuclein, paving the way for new therapeutic strategies against neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease.

Our new transcriptome database of *R. serbica* leaves allowed us to identify around 165 members of LEA protein family. Based on multiple sequence alignment, secondary structure prediction and 3D structure modelling we classified identified LEAPs into six groups (according to the Pfam database) and showed that more than 50% of identified LEAPs exhibited a high propensity to form α -helices. As predicted by several bioinformatic tools, more than 70% of identified LEAPs were found to be highly disordered. By using molecular dynamic simulations, we identified the most favourable conformations of representative LEAPs and showed the loss of the secondary, α -helical structure in water, in contrast to globular proteins.

Structural characterization of LEAPs is a key to understand their function and regulation of their intrinsic structural disorder-to-order transition during desiccation. These findings will promote transformative advancements in various fields, such as the development of new strategies in neurodegenerative disorders, cell preservation technology and the improvement of crop drought tolerance.

Acknowledgements

This work was funded by the Science Fund of the Republic of Serbia (PROMIS project LEAPSyn-SCI, grant number 6039663) and by the Ministry of Education, Science and Technological Development, the Republic of Serbia (Contract No. 451-03-9/2021-14/200042).

STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA PROTEINA ZASTUPLJENIH U KASNOJ FAZI EMBRIOGENEZE IZ BILJKE *RAMONDA SERBICA*: POTENCIJALNI INHIBITOR AGREGACIJE α -SINUKLEINA

Marija Vidović¹, Ana Pantelić², Strahinja Stevanović¹

¹ Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Laboratorija za molekularnu biologiju biljaka, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Ramonda serbica endemska vrsta, i biljka vaskrsnica, sposobna da preživi u uslovima ekstremne dehidracije tokom perioda dužeg od mesec dana. Desikacija (gubitak preko 95 % vode u ćeliji) dovodi do denaturacije, agregacije i degradacije proteina, i utiče na fluidnost membrana, što finalno dovodi do gubitka integriteta ćelije. Prisustvo proteina zastupljenih u kasnoj fazi embriogeneze (*late embryogenesis abundant proteins* – LEAPs) se smatra esencijalnim delom strategije tolerancije na desikaciju kod vaskrsnica. Ovu heterogenu grupu prirodno neuređenih proteina, povezanih sa anhidrobiozom, odlikuje visoka strukturna plastičnost koja im omogućava interakciju sa brojnim ligandima i partnerima. LEA proteini su uključeni u heliranje jona, stabilizaciju membrana i enzima tokom zamrzavanja ili suše. Cilj našeg istraživanja je procena potencijala izabranog LEA proteina iz ramonde da inhibira agregaciju α -sinukleina, otvarajući put ka razvoju novih terapija za lečenje neurodegenerativnih poremećaja poput Parkinsonove bolesti.

Analiziranjem transkriptoma listova *R. serbica* i formiranjem baze podataka identifikovano je oko 165 proteina koji pripadaju LEA proteinskoj porodici. Na osnovu višestrukog poravnanja aminokiselinskih sekvenci, predviđanja sekundarne strukture i 3D strukturnog modelinga, identifikovani LEA proteini su podeljeni u šest grupa (prema Pfam bazi podataka) i pokazano je sa velikom verovatnoćom da je više od 50 % LEA proteina u mogućnosti da formira α -helikse. Pomoću nekoliko bioinformatičkih alata predviđeno je da više od 70 % identifikovanih LEA proteina formira visoko neuređenu strukturu. Korišćenjem simulacije molekularne dinamike, identifikovane su najpovoljnije konformacije reprezentativnih LEA proteina. Tom prilikom je kod LEA proteina uočen gubitak sekundarne α -heliksne strukture u vodi, za razliku od globularnih proteina kada je ova struktura favorizovana.

Strukturna karakterizacija LEA proteina je ključna za razumevanje njihove funkcije i regulaciju njihovog prelaska iz neuređene u uređenu konformaciju tokom desikacije. Ova saznanja bi trebalo da omoguće značajna napredovanja na različitim poljima, kao što je razvoj novih strategija u borbi protiv neurodegenerativnih poremećaja, tehnologija čuvanja zamrznutih ćelija, kao i na povećanje otpornosti useva na sušu.

Zahvalnice

Ovaj rad je finansiran od strane Fonda za nauku Republike Srbije (PROMIS projekat LEAPSyn-SCI, broj 6039663) i Ministarstvo obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Broj ugovora 451-03-9/2021-14/ 200042).