

ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ КОФАКТОРА НА ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИНАМИКУ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

© 2021 г. А.А. Кошкар, О.Н. Макшакова

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН»,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: olga.makshakova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 26.07.2020 г.

Принята к публикации 09.11.2020 г.

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа является одним из ключевых ферментов гликолиза, кроме того, белок вовлечен в регуляцию широкого ряда клеточных функций, включая индукцию апоптоза. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа также участвует в развитии ряда патологических состояний, нейродегенеративных и раковых заболеваний. Новые подходы к регуляции активности фермента требуют детального понимания организации его пространственной и динамической структуры. В данной работе проведено исследование взаимодействия кофактора никотинамидадениндинуклеотида с димерами, составляющими тетрамер соматического глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека, методом молекулярной динамики. Охарактеризовано влияние связывания кофактора на внутримолекулярную динамику белка. Показано, что димеры связывают кофактор с разными энергиями, что связано с подвижностью S-петли и ее способностью взаимодействовать с молекулой кофактора. В димере ОР, стабилизированном обширными контактами протяженных бета-структур, обнаружены группы остатков в смежных субъединицах, которые движутся согласованно, при этом показано, что связывание кофактора модулирует характер коррелированных движений в димере.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, связывание лиганда, кооперативность, аллостерия, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302921020034

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, КФ 1.2.1.12) является одним из ключевых ферментов гликолиза, который катализирует окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат при восстановлении кофактора НАД⁺ до НАД(Н). Кроме того, белок задействован в широком ряде других клеточных функций, включая такие процессы, как клеточная адгезия, экспорт тРНК, репарация ДНК и регуляция экспрессии генов [1, 2]. К тому же ГАФД вовлечен в процессы индукции апоптоза [3] и развития нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [4]. При отклонениях от нормы, например в клетках меланомы, наблюдается экспрессия тканенеспецифичной формы ГАФД, что сопряжено с развитием злокачественных образований [5]. В связи с разнообразием дисфункций организма, в кото-

рые вовлечен ГАФД, актуальной задачей становится поиск способов регуляции его активности [3, 6].

Основные успехи и неудачи в поисках ингибиторов ГАФД, в том числе селективных ингибиторов изоферментов из разных источников, отражены в недавнем обзоре [6]. С 90-х годов прошлого века стратегия селективного ингибирования ГАФД, направленная на некоторые паразитарные и спермо-специфические белки млекопитающих (ГАФДс), была основана на конкурентном связывании ингибиторов в области активного центра белка [7–9]. Селективность по отношению к целевому ферменту достигалась за счет слабых различий в НАД-связывающем кармане этого белка по сравнению с соматическим ГАФД человека. Однако высокая консервативность активного центра ГАФД серьезно ограничивает такой подход, что подталкивает исследователей к поиску новых путей решения этой проблемы [6]. В качестве альтернативного подхода в разработке ингибиторов предлагается использование удаленных участков белка, которые аллостерически связаны с актив-

Сокращения: ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, *rmsf* – среднеквадратичная флуктуация (root mean square fluctuation).

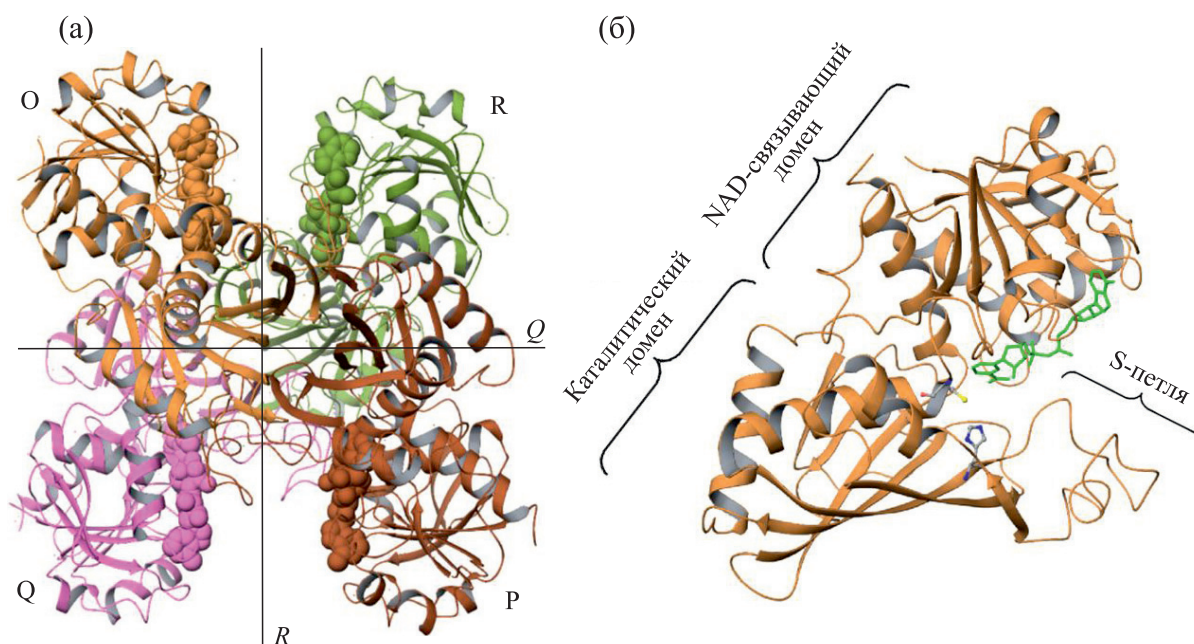


Рис. 1. (а) – Тетрамер глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с кофактором НАД (указаны сферами). Буквенные обозначения субъединиц соответствуют их конвенциональной аннотации в pdb файле, оси симметрии Q и R указаны линиями и подписаны курсивом. (б) – Домены субъединицы ГАФД со связанным кофактором (показан зеленым цветом) и остатки каталитического центра (атомы углерода – серым, азота – синим, кислорода – красным и серы – желтым цветом).

ным центром ГАФД; рациональное развитие такого подхода требует детального понимания особенностей динамической структуры изоферментов ГАФД [10]. В данной работе мы попытались приблизиться к пониманию организации динамической структуры соматического ГАФД человека.

ГАФД – природный гомотетрамер (рис. 1). Каждая его субъединица состоит из двух доменов, каталитического (aa 151–316) и НАД-связывающего (aa 1–150 и 317–335). ГАФД имеет три оси двукратной симметрии. Ось P определяет область контакта между O - и P - (Q - и R -) субъединицами. Этот контакт имеет наибольшую площадь среди трех типов димеров и образуется протяженными участками β -слоев каталитических доменов соседних субъединиц. Ось R определяет НАД-связывающую бороздку между O - и R - (P - и Q -) субъединицами, которые взаимодействуют главным образом посредством S -петли. Контакты по оси Q являются самыми слабыми, поэтому ГАФД может быть представлен как димер димеров относительно оси Q .

Известно, что в зависимости от источника ГАФД обладает отрицательной или положительной кооперативностью по связыванию кофактора. В частности, соматический ГАФД демонстрирует отрицательную кооперативность [11, 12]. Кооперативность изучалась с помощью различных экспериментальных подходов на протяжении десятилетий, предлагались модели от предсуществующей

асимметрии в тетрамере до индуцированных изменений конформации при связывании кофактора, согласованных или последовательных [11–17]. Позже данные рентгеноструктурного анализа показали, что субъединицы в составе тетрамера ГАФД имеют одинаковую пространственную организацию, причем она слабо меняется при связывании кофактора [9, 18]. Одним из подходов для определения вклада межсубъединичных контактов в кооперативность ГАФД является изучение этого явления в димерах белка. Экспериментально было показано, что из трех возможных типов димеров ГАФД из *Bacillus stearothermophilus* только два формируют стабильные надмолекулярные структуры, а именно димеры типа OP и OR [19]. Оба димера оставались способными связывать НАД, но кооперативность проявлял только димер типа OP . Понимания механизмов кооперативности ГАФД на атомном уровне добавляют данные, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза на примере человеческого ГАФДс [20]. Было установлено, что кооперативность тетрамера можно «выключить» путем замены лишь одного аминокислотного остатка (D311N), который располагается вблизи OP -контакта. Это указывает на ключевую роль данного остатка в передаче сигнала между активными центрами субъединиц. Методами молекулярной динамики было показано, что данный остаток вовлечен в динамическую сеть, в которой остатки движутся коррелировано [10]. В

рамках концепции динамически-управляемой аллоsterии [21] можно предположить, что внутри-молекулярная динамика ГАФД играет ключевую роль в регуляции передачи сигнала как между субъединицами, так и по молекуле белка в целом.

Метод молекулярной динамики позволяет охарактеризовать эволюцию энергетических и геометрических характеристик молекулярной системы во времени и получить описание взаимодействий всех ее компонент на атомном уровне с учетом динамики, что делает метод незаменимым для решения обозначенной задачи. Однако, насколько нам известно, коррелированность движений остатков в ГАФД до сих пор изучалось лишь для небольшого фрагмента белка, не более семи остатков [10, 22], а исследований влияния связывания кофактора на динамику белка расчетными методами не проводилось вовсе. Поскольку задача исследования динамической организации тетрамера ГАФД комплексная, рационально разбить ее на подзадачи. В данной работе мы исследовали организацию динамической структуры ГАФД, изучая отдельные димеры, составляющие тетрамер, а именно ОР и ОР; мономер белка использовали в качестве референсной системы.

Полученные результаты будут способствовать пониманию влияния связывания НАД на динамическую структуру ГАФД и заложит базис для разработки аллоsterических ингибиторов белка.

МЕТОДЫ

Исходные 3D-структуры белка. Исходные структуры мономера и ОР- и ОР-димеров со связанным кофактором НАД были получены с использованием координат кристаллической структуры тетрамерного белка соматического ГАФД человека, доступных в базе данных Кембриджского университета (pdb код: 1znq). Апо-формы соответствующих моно- и олигомеров были получены путем удаления молекул кофактора из холо-формы белка. Всего было получено шесть исходных систем: мономер, ОР-димер и ОР-димер, каждый в апо-форме и в холо-форме. В случае холо-формы каждая субъединица содержала одну молекулу кофактора.

Расчет траекторий молекулярной динамики и их анализ. Системы помещали в прямоугольный бокс с водой с периодическими граничными условиями по всем трем направлениям, граница бокса располагалась на удалении как минимум 1 нм от края белка. Воду задавали в явном виде. Для нейтрализации заряда добавляли необходимое для каждой системы количество ионов Cl^- . Далее проводили минимизацию энергии системы. Фаза уравнивания состояла из двух последовательных процедур — уравнивание при постоянной температуре и уравнивание при постоянном давлении.

Для поддержания постоянной температуры 300 К использовали термостат V-rescale [23], где регуляция температуры была распределена между двумя группами или так называемыми «ваннами», а именно воды с ионами и белка с кофактором (если последний присутствовал в системе) с временной константой 0.1 пс. Поддержание давления в 1 бар контролировали баростатом Берендсена [24], значение сжимаемости задавалось равным $3 \cdot 10^{-4} \text{ бар}^{-1}$, а период релаксации давления — равным 5 пс. Осцилляции ковалентных связей с участием атомов водорода ограничивали по алгоритму Lincs, благодаря чему временной шаг интегрирования при численном решении уравнений движения составлял 2 фс. Использовали интегратор leap-frog. Электростатические взаимодействия рассчитывали с помощью алгоритма Particles Mesh Ewald, обрезку взаимодействий проводили на расстоянии 1 нм, расчет соседей проводили каждые 20 фс. Траектории молекулярной динамики были получены в прт-ансамбле, длина одной траектории составляла от 300 до 600 нс. Все расчеты траекторий молекулярной динамики были выполнены в программном пакете GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) с использованием силового поля GROMOS. Оценку кулоновских и вандерваальсовых компонентов энергии парных взаимодействий, а также анализ значений среднеквадратичного отклонения и среднеквадратичных флуктуаций (root-mean-squared fluctuations, *rmsf*) Са-атомов белка проводили с помощью инструментов GROMACS. Динамические кросс-корреляционные матрицы строили в программе Gamma [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице приведены расчетные значения энергии взаимодействия кофактора с мономером и двумя димерами ГАФД. Результаты показывают, что энергия взаимодействия молекулы кофактора с субъединицей в димере зависит от типа пространственной организации последнего. Так, для димера типа ОР энергии связывания кофактора сравнимы с энергиями связывания молекулы НАД с мономером. Однако для димера типа ОР величины этих энергий существенно выше (по абсолютному значению), т.е. связывание энергетически более выгодно, чем с мономером и димером ОР. Подобные различия связаны с пространственной организацией S-петли и ее динамикой в димерах.

Как видно из рис. 1б, молекула кофактора локализуется в области НАД-связывающего домена, а также стабилизируется взаимодействиями с S-петлей. S-петля представляет собой неструктурированный участок цепи длиной 27 остатков (aa 180–206). В мономере петля обладает высокой подвижностью, что демонстрирует диаграмма среднеквадратичных флуктуаций (*rmsf* > 1.2 нм), представленная на рис. 2. Сравнение значений *rmsf* Са-

Электростатическая ($E_{эл}$) и вандерваальсова ($E_{вдв}$) компоненты энергии взаимодействия субъединиц ГАФД с кофактором в мономере и димерах

	$E_{эл}$, кДж/моль		$E_{вдв}$, кДж/моль	
	О	P(R)	О	P(R)
мономер	-443 ± 43		-197 ± 23	
ОР-димер	-345 ± 56	-447 ± 61	-167 ± 21	-207 ± 23
OR-димер	-1144 ± 67	-1304 ± 100	-206 ± 19	-33 ± 5

Примечание. Значения энергии усреднены по траектории молекулярной динамики, первые 100 нс не учитывались.

атомов белка в апо- и холо-форме показывает, что связывание кофактора уменьшает подвижность ряда остатков НАД-связывающего домена и остатков S-петли (рис. 2б). Однако подвижность последней все еще остается довольно высокой ($rmsf > 0.6$ нм). Энергия взаимодействия кофактора с мономером ГАФД выходит на насыщение в первые 100 нс траектории, на плато наибольший вклад в стабилизацию комплекса дают остатки НАД-связывающего кармана Arg13, Arg16 и Asp35 и остатки S-петли Ile181, Thr182, Thr184 и Gln185 (рис. 3).

В ОР-димере межсубъединичные контакты образованы взаимодействием протяженных бета-

слоев. S-петля частично вовлечена во взаимодействия через фрагмент aa 196–206. Однако большая часть S-петли, включая фрагменты, которые могут взаимодействовать с кофактором, остается значительно подвижной, $rmsf > 0.6$ нм (рис. 4). Связывание кофактора не приводит к существенной стабилизации петли, на что указывает сохранение высоких значений $rmsf$ в холо-форме димера. В димере OR, в отличие от ОР-димера и мономера, субъединицы ориентированы таким образом, что формируется максимальное количество контактов между S-петлями двух субъединиц (для более детального описания взаимодействующих остатков в димере см. работу [10]). При такой взаимной ориентации

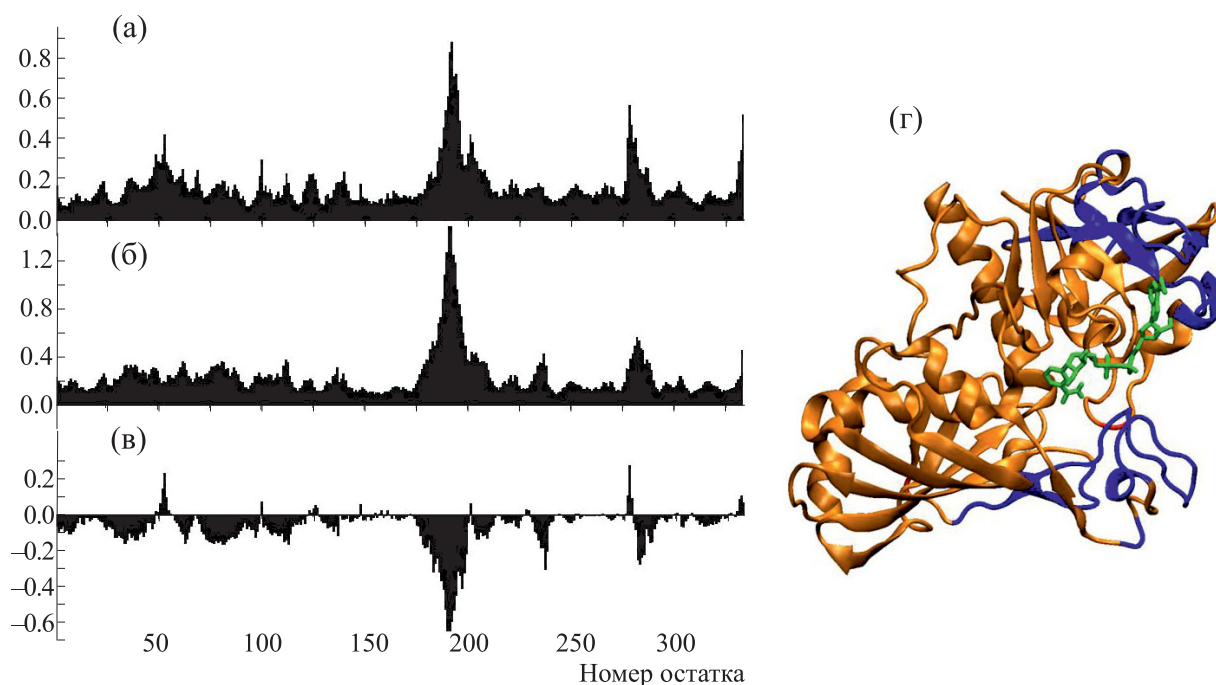


Рис. 2. Среднеквадратичные флуктуации ($rmsf$) Cα-атомов в холо-форме (а) и апо-форме (б) мономера ГАФД, а также их разностные значения (в) как функция от номера остатка. Пространственная структура мономера ГАФД со связанной молекулой кофактора НАД (показан зеленым цветом), остатки с пониженной подвижностью в холо-форме белка окрашены в синий цвет.

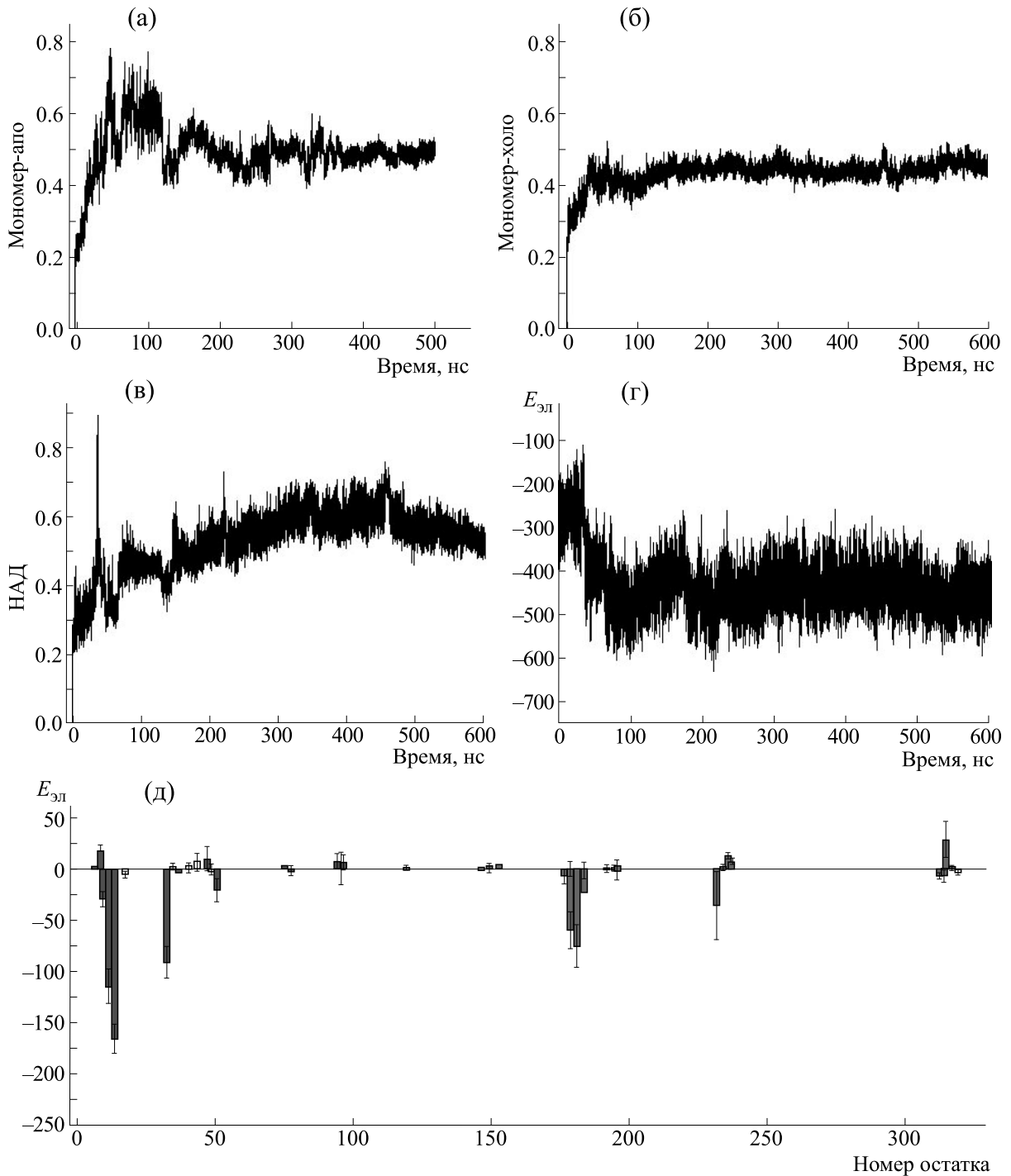


Рис. 3. Среднеквадратичные отклонения Са-атомов мономера ГАФД в апо-форме (а) и холо-форме (б) как функция от времени. Среднеквадратичные отклонения кофактора в холо-форме мономера ГАФД (в). Энергия взаимодействия кофактора с мономером ГАФД как функция от времени (г). Средние значения и стандартные отклонения вклада в энергию взаимодействия кофактора с отдельными остатками мономера ГАФД (д).

субъединиц остатки S-петли оказываются иммобилизованы, по сравнению с мономером и ОР-димером, максимальные значения *rmsf* остатков петли в апо-форме ОР-димера находятся на уровне 0.4 нм (рис. 4). Иммобилизация петли в межсубъ-

единичном контакте влечет компенсаторное увеличение подвижности остатков aa 270–280 ОР-димера. Связывание молекул кофактора субъединицами в димере типа ОР ведет к дополнительному уменьшению подвижности остатков S-петли.

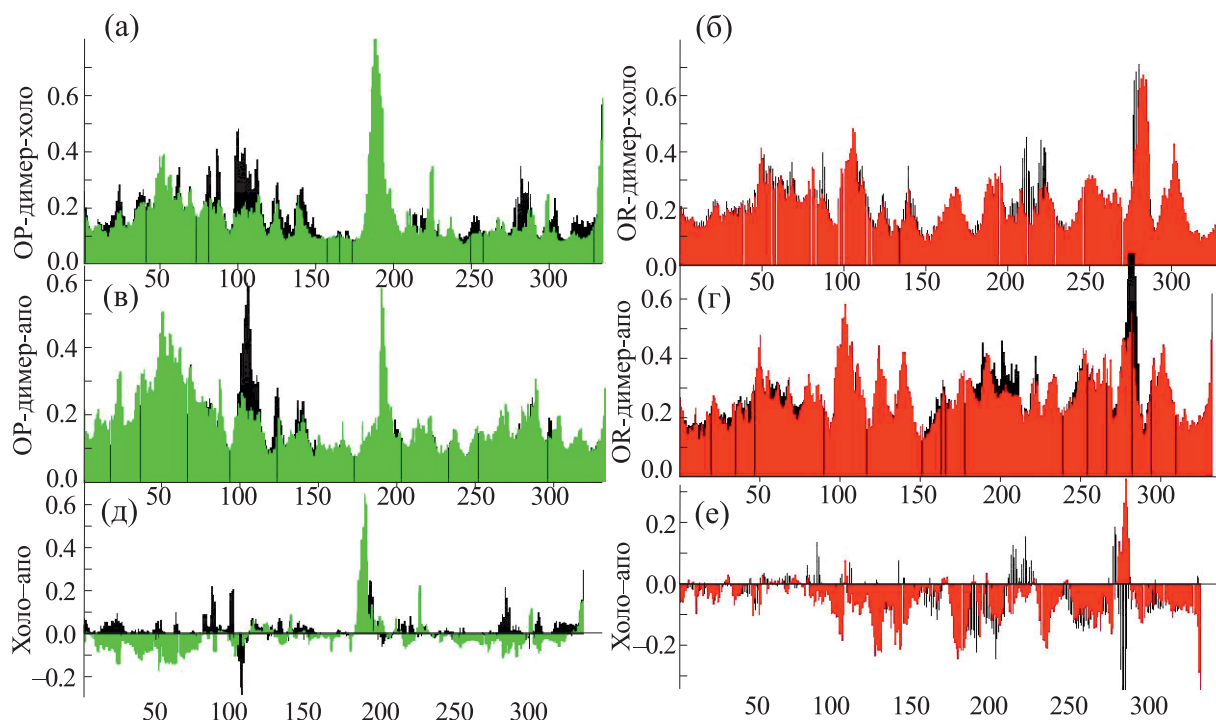


Рис. 4. Среднеквадратичные флуктуации (*rmsf*) Са атомов ОР-димеров (а, в, д) и ОР-димеров (б, г, е) ГАФД в холо-форме (а, б) и апо-форме (в, г), а также их разностные значения (д, е) как функция от номера остатка. Цветом обозначены данные: для субъединиц О – черным, Р – зеленым, R – красным.

Таким образом, пространственная стабилизация S-петли в межсубъединичных контактах типа OR способствует увеличению энергии связывания молекул кофактора (энтальпийной части свободной энергии) за счет возможности установления более обширных и более стабильных контактов с остатками петли в дополнение к взаимодействиям с остатками связывающего кармана. Следует отметить, что наблюдаемая разница в энергии связывания кофактора димерами ОР и OR, видимо, не будет столь драматичной в тетрамере ГАФД, поскольку там S-петля принимает участие в стабилизации всего комплекса межсубъединичных контактов и обладает меньшей подвижностью.

В ОР-димере расчетная энергия связывания молекул кофактора как в части электростатической энергии, так и в части вандерваальсовых взаимодействий меньше (по абсолютному значению) для субъединицы О, чем для субъединицы Р на протяжении всей траектории молекулярной динамики. При этом энергии связывания кофактора с Р-субъединицей сравнимы с теми, что наблюдаются в мономере, а связывание кофактора с О-субъединицей в димере оказывается менее выгодным. Такое отклонение в меньшую сторону является ожидаемым в связи с отрицательной кооперативностью соматического ГАФД. В то же время в димере OR разница в электростатической энергии компенсируется различиями в вандерваальсо-

вой компоненте (в первом приближении мы не применяли масштабирующих коэффициентов). Принимая во внимание это, а также экспериментальные свидетельства о том, что в бактериальном ГАФД кооперативность сохраняется именно в ОР-димере, мы проанализировали динамическую структуру димера ОР с привлечением метода кросс-корреляционных динамических матриц.

Сравнивая кросс-корреляционные матрицы для апо- и холо-формы ОР-димера (рис. 5а,б), можно отметить, во-первых, обеднение общего количества кросс-пиков при связывании кофактора. Это свидетельствует об уменьшении доли остатков, движущихся согласованно. Кстати, такая же тенденция наблюдалась и для мономера при связывании молекулы кофактора (данные не показаны). Вторая серия отличий заключается в изменении межсубъединичных корреляционных кросс-пиков. На кросс-корреляционной карте соответствующие коэффициенты корреляции среднеквадратичных отклонений для остатков из разных субъединиц вдоль молекулярно-динамической траектории представлены в верхнем левом и симметричном нижнем правом квадрантах. Области, которые соответствуют изменениям, вызванным связыванием кофактора, на карте обведены в синие рамки. При связывании кофактора серия кросс-пиков, присутствующих в апо-форме (рис. 5а в синей рамке), пропадает, а другая серия

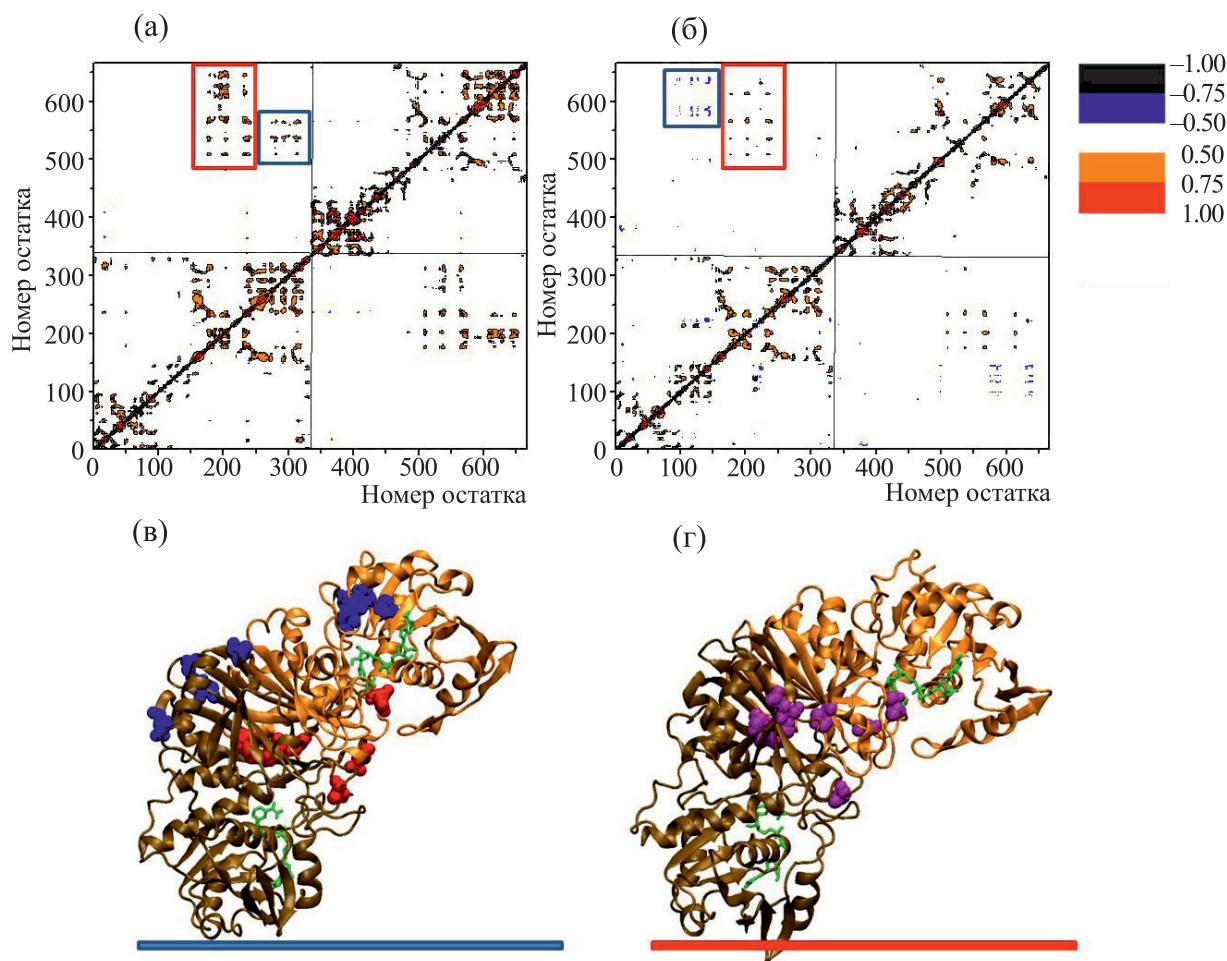


Рис. 5. Динамические кросс-корреляционные матрицы, построенные по Са-атомам ОР-димера ГАФД в апо- (а) и холо- (б) форме. Пространственная структура ОР-димера ГАФД со связанными молекулами кофактора (показаны зеленым цветом) и остатки, коррелированность движений которых меняется при связывании кофактора. Красным цветом обозначены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамкой синего цвета на матрице апо-формы, а синим цветом отмечены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамкой синего цвета на матрице холо-формы (в). Пространственная структура ОР-димера ГАФД со связанными молекулами кофактора (зеленым цветом) и остатки, коррелированность движений которых не меняется при связывании кофактора, пурпурным цветом обозначены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамками красного цвета на матрицах апо- и холо-формы белка.

пиков на картах холо-формы (рис. 5б в синей рамке) появляется. Остатки, соответствующие данным областям кросс-пиков и зависящие от связывания кофактора, отмечены на трехмерной структуре ОР-димера (рис. 5в). Данные остатки располагаются преимущественно на поверхности глобулы, причем остатки, движущиеся согласованно в апо-форме, локализованы в районе S-петли, а остатки, приобретающие согласованность при связывании молекул кофактора, находятся на поверхности глобулярной части в области ОР-контакта субъединиц и НАД-связывающего кармана.

В то же время, существуют кросс-пики, которые присутствуют на обеих матрицах как апо-, так и холо-формы ОР-димера. Область субъединич-

ных контактов в ОР-димере связывает остатки двух субъединиц и приводит к их согласованному динамическому поведению независимо от того, связана молекула кофактора или нет. Однако при связывании кофактора меняется интенсивность этих кросс-пиков. Эти кросс-пики оконтурены на обеих картах красной рамкой. Данные остатки находятся внутри глобулярной структуры субъединиц (рис. 5г). Данная согласованность в динамике остатков может лежать в основе кооперативности, передавая сигнал от связывания кофактора одной субъединицей через межсубъединичный контакт на другую субъединицу. Однако это утверждение требует более детального анализа, который находится за пределами задач данной статьи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Олигомерная организация ферментов широко распространена в природе, благодаря этому увеличивается стабильность белка и осуществляется регуляция его биологической активности. Регуляция активности может осуществляться через изменяемое сродство к лиганду изначально структурно эквивалентных субъединиц олигомера, т. е. кооперативность. При отрицательной кооперативности связывание лиганда одной субъединицей приводит к менее выгодному связыванию лиганда остальными субъединицами, примером чего является соматический ГАФД из ряда источников [11, 12, 26]. При положительной кооперативности последовательное связывание лиганда становится более выгодным, как, например, происходит в дрожжевой ГАФД [27, 28] и в сперматозоидном ГАФД млекопитающих [20]. Неэквивалентность субъединиц олигомера по отношению к связыванию лиганда может быть описана в рамках предложенных моделей. Концепция «induced fit» [17] предполагает последовательные изменения структуры субъединиц и, как следствие, сродства к лиганду при связывании НАД. Аллостерическая (согласованная) модель [13, 16] предполагает наличие в апо-форме белка конформационного равновесия, которое сдвигается при связывании лиганда, увеличивая населенность состояния с большим или меньшим сродством к лиганду. Считается, что положительная кооперативность поддерживает последовательную модель, а отрицательная – согласованную модель [29]. Тем не менее положительная кооперативность может укладываться в рамки согласованной модели, что было продемонстрировано при описании кривых связывания НАД с ГАФДс [20].

Четвертичная структура не является необходимым условием для активности ГАФД, что было показано на иммобилизованных димерах [30] и мономерах белка [31]. Более того, димерной организации ГАФД достаточно для проявления кооперативности. На примере ГАФД из *Bacillus stearothermophilus* было продемонстрировано, что ОР- и ОР-димеры, переведенные в водорастворимую форму посредством одиночных или двойных мутаций в области межсубъединичных контактов, связывают кофактор, но кооперативность сохраняется только у первого из них [19]. В димере ОР (D282G) две субъединицы имеют одинаковые константы диссоциации НАД. Однако в тетрамере того же мутанта (D282G) вновь появляется отрицательная кооперативность, как и в ферменте дикой формы. Примечательно, что димер ОР, для которого представлено несколько вариантов с парными мутациями Y46G/S48G, D186G/ E276G и Y46G/R52G [19], проявляет положительную кооперативность. Однако остается неясным, происходит ли смена типа кооперативности из-за

диссоциации тетрамера или же это следствие мутаций. Микроскопическая константа диссоциации K_1 увеличивается на порядок в ряду тетрамер – димер ОР – димер ОР (среднее значение 0.06 – 0.6 – 5.5 мкМ); качественно такая же зависимость наблюдается и для константы K_2 . Таким образом, связывание кофактора в димере ОР происходит более выгодно, чем в ОР. Это согласуется с оценками, сделанными на основании наших расчетов, где энергии связывания кофактора в димере ОР выше, чем в димере ОР и мономере. Результаты расчетов показывают, что эта разница объясняется, главным образом, вкладом S-петли. В ОР-димере S-петля зафиксирована в межсубъединичном контакте и взаимодействует со связанным НАД. В ОР-димере, как и в мономере, S-петля подвижна и слабо взаимодействует с кофактором. S-петля участвует во взаимодействии не только с кофактором, но также может быть вовлечена во взаимодействия с другими лигандами и белками. Роль S-петли в активности белка обсуждалась в работе [32] в отношении ГАФД из *Escherichia coli*. По данным рентгеноструктурного анализа, петля тетрамера в апо-форме обладает относительно высокой подвижностью, тогда как связывание НАД или трегалозы стабилизирует ее. Также автор работы [32] отмечает, что связывание трегалозы S-петлей сопровождается конформационными изменениями в активном центре, которые будут предотвращать связывание НАД, хотя центры связывания двух молекул различаются [32].

Современные методы исследования, основанные на подходе сайт-направленного мутагенеза, показывают, что регуляция кооперативности достигается тонкой подстройкой взаимодействий между субъединицами. Так, например, единичная замена остатка D311N устраняет кооперативность ГАФДс. Примечательно, что при этом константа диссоциации комплекса ГАФДс и НАД уменьшается на порядок (с 10^{-6} до 10^{-7} М), что приводит ее в соответствие с минимальным значением константы диссоциации для фермента дикого типа [20]. Остаток D311 находится на небольшом удалении от межсубъединичных контактов и от активного центра (~ 10 Å), но не принимает прямого участия в образовании контактов или в связывании кофактора. Несмотря на это, его замена приводит к блокировке передачи сигнала между субъединицами. Ранее нами было показано, что данная замена в ГАФДс влияет на коррелированность флуктуаций ближнего окружения остатка [10]. В соматическом ГАФД этому остатку соответствует N239. Как показывают кросс-корреляционные матрицы димера ОР, N239 попадает в область остатков, которые движутся коррелированно с остатками соседней субъединицы, а также с остатками активного центра собственной субъединицы. В целом эти согласованно флуктуирующие остатки форми-

руют путь, соединяющий остатки активного центра двух субъединиц через ОР-контакт (рис. 5г).

Как показывают расчеты, связывание кофактора ОР-димером ГАФД сопряжено с существенными изменениями в динамике белка. В целом связывание НАД приводит к уменьшению доли остатков флуктуирующих коррелированно. В то же время некоторые остатки в периферической области ОР контакта начинают двигаться коррелированно с остатками НАД-связывающего кармана (остатки синего цвета на рис. 5в). Динамическая согласованность остатков ГАФД может лежать в основе передачи информации между активными центрами субъединиц, как это было ранее показано, например, для галектина-7 [33], и между активным и аллостерическим центром белка [21]. В литературе имеются сообщения об ингибирующем влиянии НАД на связывание РНК, для чего была предложена гипотеза об аллостерическом механизме действия. РНК предположительно связывается вдоль ОР-контакта. Однако на сегодняшний день прямых подтверждений этому нет, поэтому гипотеза об аллостерическом влиянии остается равновероятной гипотезе о конкурентном связывании [34].

Таким образом, сложная динамическая организация олигомера ГАФД может в дальнейшем способствовать разработкам аллостерических регуляторов связывания кофактора. Ингибирование гликолиза с помощью аллостерических регуляторов представляет особый интерес. Известно, что в опухолевых тканях увеличивается экспрессия ГАФД [35], а, например, в клетках меланомы происходит тканеспецифичная экспрессия ГАФДс [5]. Активный центр и НАД-связывающий карман изоферментов ГАФД и ГАФДс практически идентичны, следовательно, различия в остатках, которые формируют аллостерический центр на периферии белка, могут использоваться для селективного воздействия на определенный тип изофермента ГАФД, что будет предметом наших дальнейших исследований.

Настоящая работа вносит вклад в понимание организации динамической структуры димеров ГАФД. В то же время следует иметь в виду, что в тетрамере обоюдное влияние субъединиц становится более сложным [30], и чтобы определить, в какой степени обнаруженные в димерах корреляции могут быть перенесены на тетрамер, предстоит провести дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено молекулярно-динамическое исследование связывания кофактора структурными единицами ГАФД, а именно двумя типами димеров – ОР и ОР. Результаты анализа внутримолекулярной динамики *in silico* показали, что связыва-

ние кофактора в ОР-димере оказывается более энергетически выгодным из-за прямого участия S-петли во взаимодействиях с кофактором. Показано, что связывание кофактора существенно модифицирует характер коррелированных движений в обеих субъединицах и приводит к образованию областей на поверхности белка флуктуирующих согласованно с участком НАД-связывающего кармана. Понимание структурно-динамических особенностей, лежащих в основе связывания кофактора, усилит фундамент понимания организации динамической структуры белка и послужит базой для разработки новых способов регуляции активности ГАФД.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при использовании оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и оборудования Центра коллективного пользования вычислительными ресурсами МСЦ РАН – филиала ФНЦ НИИСИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 18-44-160026 (в части анализа связывания кофактора и согласованных движений остатков). Получение траекторий молекулярной динамики для ОР-димеров осуществлено за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Zheng, R. G. Roeder, and Y. S. Luo, *Cell* **114**, 255 (2003).
2. S. Kim, J. Lee, and J. Kim, *Biochem. J.* **404**, 197 (2007).
3. M. Sirover, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH): The Quintessential Moonlighting Protein in Normal Cell Function and in Human Disease* (Academic Press, MA (Massachusetts), USA, 2017).

4. V. I. Muronetz, K. V. Barinova, Y. Y. Stroylova, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **100**, 55 (2017).
5. I. A. Sevostyanova, K. V. Kulikova, M. L. Kuravsky, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 649 (2012).
6. В. И. Муронец, А. К. Мельникова, К. В. Баринова и др., *Биохимия* **84**, 1578 (2019).
7. D. H. F. Souza, R. C. Garratt, A. P. U. Araújo, et al., *FEBS Lett.* **424**, 131 (1998).
8. S. Van Calenbergh, C. L. Verlinde, J. Soenens, et al., *J. Med. Chem.* **38**, 3838 (1995).
9. P. V. Danshina, W. Qu, B. R. Temple, et al., *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 410 (2016).
10. O. N. Makshakova, P. I. Semenyuk, M. L. Kuravsky, et al., *J. Struct. Biol.* **190**, 224 (2015).
11. J. J. de Vijlder and E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 23 (1968).
12. A. Conway and D. E. Jr. Koshland, *Biochemistry* **7**, 4011 (1968).
13. K. Kirschner, M. Eigen, R. Bittman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1661 (1966).
14. Y. I. Henis and A. Levitzki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5055 (1980).
15. A. Levitzki and D. E. Koshland, *Curr. Top. Cell. Regul.* **10**, 140 (1976).
16. J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
17. D. E. Jr. Koshland, G. Nemethy, and D. Filmer, *Biochemistry* **5**, 365 (1966).
18. W. J. Cook, O. Senkovich, and D. Chattopadhyay, *BMC Struct. Biol.* **9**, 9 (2009).
19. O. Roitel, P. Vachette, S. Azza, et al., *J. Mol. Biol.* **326**, 1513 (2003).
20. M. L. Kuravsky, K. V. Barinova, R. A. Asryants, et al., *Biochimie* **115**, 28 (2015).
21. N. Popovych, S. Sun, R. H. Ebricht, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 831 (2006).
22. A. T. P. Machado, M. Silva, and J. Iuleka, *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* **1866**, 581 (2018).
23. G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, *J. Chem. Phys.* **126**, 014101 (2007).
24. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. Di Nola, et al., *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
25. N. M. Glykos, *J. Comput. Chem.* **27**, 1765 (2006).
26. F. Seydoux, S. Bernhard, O. Pfenninger, et al., *Biochemistry* **12**, 4290 (1973).
27. K. Kirschner, E. Gallego, I. Schuster, et al., *J. Mol. Biol.* **58**, 29 (1971).
28. K. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **58**, 51 (1971).
29. N. W. Seidler, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Ed. by I. R. Cohen, I. A. Lajtha, J. D. Lambris and R. Paoletti (Springer, Dordrecht, 2013), v. 985, pp.1–293.
30. Н. К. Наградова, *Биохимия* **51**, 2030 (1986).
31. И. В. Дуженкова, Р. А. Асриянц, В. И. Муронец и др., *Биохимия* **51**, 1899 (1986).
32. Y. Ju Kim, *Acta Cryst.* **F74**, 277 (2018).
33. E. E. Ermakova, M. C. Miller, I. V. Nesmelova, et al., *Glycobiology* **23**, 508 (2013).
34. E. D. Garcin, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **86**, 162 (2019).
35. F. Revillion, V. Pawlowski, L. Hornez, et al., *Eur. J. Cancer* **36**, 1038 (2000).

The Influence of Cofactor Binding on the Intramolecular Dynamics of Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

A.A. Koshkarov and O.N. Makshakova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is one of the key enzymes of glycolysis and, also, this protein is implicated in the regulation of a wide range of cellular functions, including induction of apoptosis. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is also involved in the development of a number of pathological states, neurodegenerative and cancerous diseases. Novel approaches to regulating enzyme activity require detailed knowledge of enzyme spatial organization and structural dynamics. In this work, we have performed molecular dynamics simulations to study the interaction of nicotinamide adenine dinucleotide which served as a cofactor with dimers assembled into the tetrameric form of human somatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The effect of cofactor binding on the intramolecular dynamics of the protein is described. It was shown that dimers can bind the cofactor in different interaction energies; this occurs due to the mobility and ability of the S-loop to interact with the cofactor molecule. Some groups of residues in the adjacent subunits that concordantly move have been found in the OP dimmer. Furthermore, it was shown that cofactor binding modulates the nature of correlated motions in the dimer.

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ligand binding, cooperativity, allostery, molecular dynamics simulations