



# 基于 GNM 方法研究人 TDP-43-DNA 相互作用动力学及关键位点\*

邓雪晴 王世豪 巩卫康 李春华\*\*

(北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124)

**摘要** TAR DNA 结合蛋白 43 (transactive response DNA binding protein 43, TDP-43), 一种可变剪切因子, 可以特异性地结合富含 TG 序列的 DNA, 涉及多种神经退行性疾病. 分子动力学模拟方法虽然是研究分子间相互作用强有力的工具, 但它非常耗时, 且难以对大的构象变化的体系进行充分采样来研究其变构行为. 本工作使用粗粒化的基于弹性势的高斯网络模型 (Gaussian network model, GNM) 研究人 TDP-43 与靶标 DNA 间相互作用的动力学. 进一步地, 利用本课题组之前提出的基于 GNM 的热力学循环方法识别 TDP-43 与 DNA 相互作用的关键残基, 其微扰引起了大的结合自由能的变化. DNA 结合后, TDP-43 上富含正电残基的 loop1 和 loop3 片段有较大的柔性损失, 这反映了它们在识别和结合中的诱导契合作用. 另外发现, 基于热力学循环的方法不仅识别到一些与 DNA 特异性相互作用有关的重要残基, 而且识别到一些远离结合界面但在结合引起的分子构象变化中发挥重要作用的残基. 本研究有助于理解 TDP-43 与 DNA 的特异性相互作用, 可为药物设计提供重要信息, 另外该方法可以很方便地拓展到其他蛋白质-核酸相互作用动力学的研究.

**关键词** TDP-43-DNA 相互作用, 高斯网络模型, 关键残基, 相互作用动力学

**中图分类号** Q61

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0116

TAR DNA 结合蛋白 43 (transactive response DNA-binding protein 43, TDP-43) 是一种可变剪切因子, 在 DNA 转录和 RNA 翻译过程中发挥着重要作用. 研究发现, 细胞内 TDP-43 的异常聚集会影响 DNA 的结合, 进而导致多种疾病包括额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration, FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等的发生<sup>[1-4]</sup>. 从结构上看, TDP-43 含有两个 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM), 它们特异性地识别并结合富含 UG 序列的 RNA 片段或富含 TG 序列的 DNA 片段<sup>[5]</sup>, 其中 RRM1 在核酸特异性识别中扮演着主要作用. Kuo 等<sup>[6-8]</sup> 研究发现, 人 TDP-43 与靶标 DNA 的结合会通过结合界面对 TDP-43 的结构动力学产生扰动, 进而引起两个 RRM 区域发生构象重排, 从而增强分子间的结合亲和性. 另外, TDP-43 的某些位点突变会导致其与 DNA 结合的亲和性和特异性发生显著变化. 因此, 探索 TDP-43 与 DNA 之间的特异性相互作用

用, 并识别在结合过程中发挥关键作用的残基, 对于深入理解其相互作用机制, 以及开发以 TDP-43 为靶点的药物具有重要意义.

目前, 研究人员已经通过 X 射线 (X-ray) 方法获得了人 TDP-43 RRM1 与 DNA 结合的复合物结构 (PDB 代码: 4IUF)<sup>[8]</sup>. TDP-43 RRM1 是由 N 端、RRM 区域以及链接 (linker) 区域构成的. 通常, RRM 含有 4 个反向平行排列的  $\beta$  片层, 比如 hnRNP-A1<sup>[9]</sup> 和 Hud<sup>[10]</sup> 中的 RRM, 但 TDP-43 的 RRM 却是具有  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 5$  的二级结构排列, 包含一个额外的  $\beta 4$  片层. 研究表明, 该  $\beta$  片层扩展了 TDP-43 与 DNA 结合的界面, 有助于加强分子间的结合亲和性. TDP-43 具有一个带正电的结合凹槽, 对 DNA 的结合很重要, 主要由  $\beta$  片层、loop 和 linker 构成. RRM1 的 loop1 和 loop3 伸向 DNA,

\* 国家自然科学基金 (31971180, 11474013) 资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

收稿日期: 2021-04-29, 接受日期: 2021-06-07

并与DNA形成静电和氢键相互作用。 $\beta$ 片层构成了主要的DNA结合界面，其上有两个高度保守的片段RNPs (ribonucleoprotein domains)：RNP1 (K145~F152) 主要位于 $\beta_3$ ，RNP2 (L106~L111) 主要位于 $\beta_1$ 。

在实验方面，研究主要集中在探索TDP-43与DNA相互作用的关键残基上。Buratti等<sup>[11]</sup>利用电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 研究，发现RRM1和RRM2在与DNA的识别中分别起主要和辅助结合的作用。之后，研究者通过交联和免疫沉淀分析 (cross-linking and immunoprecipitation assay, CLIP) 研究发现，除了 $\beta$ 片层以外，连接 $\beta$ 片层和 $\alpha$ 螺旋的loop1和loop3对DNA的识别也非常关键，它们主要发挥了特异性识别的作用<sup>[12]</sup>。在理论研究方面，目前对TDP-43与DNA之间相互作用的研究还不多，只有几个关于TDP-43自身结构动力学研究的工作。Chiang等<sup>[13]</sup>通过分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟发现，位点突变D169K引起了RRM1连接 $\beta_4$ 和 $\beta_5$ 的 $\beta$ 转角附近构象的变化，这增加了RRM1核心的疏水相互作用。Prakash等<sup>[14]</sup>通过MD模拟研究了TDP-43的去折叠过程，观察到RRM1和RRM2具有完全不同的去折叠路径。

MD模拟，尽管能够在原子水平洞察分子动力学行为与功能的关系，但耗时耗力，且难以对有大构象变化的体系进行充分采样以研究变构行为。针对此问题，人们提出了很多粗粒化模型的方法，其中弹性网络模型 (elastic network model, ENM) 是一种被广泛用于研究生物大分子功能性变构的有效方法<sup>[15-16]</sup>。高斯网络模型 (Gaussian network model, GNM) 和各向异性网络模型 (anisotropic network model, ANM) 是两种常用的ENM。ENM得到的低频运动模式常常代表了与分子功能相关的大尺度集合运动。最初，Tirion等<sup>[17]</sup>提出用弹性势代替分子内部的相互作用来构建ENM模型，其中，一定截断半径内的所有残基对被认为有相互作用，并用具有相同力常数的弹簧连接。Bahar等<sup>[18]</sup>利用GNM研究了tRNA的动力学，捕获到了不同结构域间功能性的协同运动。另外，基于ENM模型，一些微扰方法被提出用于识别生物大分子与功能有关的重要残基。Abdizadeh等<sup>[19]</sup>提出线性微扰扫描方法，用来预测受体与配体结合中的关键残基，其中外力微扰导致整个结构涨落变化较大的残基被认

为是关键残基。Zheng等<sup>[20]</sup>提出了改变弹簧系数的微扰方法，来识别蛋白质变构中的铰链残基。本课题组Su等<sup>[21]</sup>曾提出基于GNM的热力学循环方法，来识别在蛋白质-配体结合中发挥关键作用的残基，其中位点微扰导致其结合自由能较大变化的残基被认为是关键残基。前两种方法是通过施加外力微扰，根据其对整个体系涨落的影响来识别关键残基，而后一种方法是通过评价位点微扰 (模拟突变) 导致的受体-配体结合自由能的变化来识别关键残基。该方法不仅能够识别与配体结合有关的重要残基，还能识别与配体结合偶联变构中的关键残基。

本研究基于GNM探索了DNA结合对TDP-43动力学的影响。此外，利用基于GNM的热力学循环方法识别了TDP-43中与DNA特异性识别以及DNA结合引起构象变化有关的重要残基。

## 1 方法和体系

### 1.1 高斯网络模型 (GNM)

GNM是一种粗粒化的方法，能够获得生物分子的低频运动，可以用于研究与功能有关的分子动力学行为。GNM将生物分子结构抽象为一个粗粒化的弹性网络，其中残基简化为节点 (这里氨基酸用 $C_\alpha$ 原子，核苷酸用P原子代替)，一定距离 ( $R_c$ ) 范围内的节点间用弹性系数 $\gamma$ 相同的弹簧相连。简化后，整个体系的势能为：

$$V = \frac{1}{2} \gamma [\Delta R^T (\Gamma \otimes E) \Delta R] \quad (1)$$

其中， $\Delta R$ 是一个 $N$ 维的列向量，向量的每个元素表示节点偏离平衡位置的位移， $T$ 代表转置， $E$ 是单位矩阵， $\otimes$ 代表直积， $\Gamma$ 是GNM的Kirchhoff矩阵。

每个节点的均方涨落以及不同节点间涨落的交叉相关性表示为：

$$\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_i \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}]_{ii}, \quad \langle \Delta R_i \cdot \Delta R_j \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}]_{ij} \quad (2)$$

根据Debye-Waller理论，分子内原子涨落的B-factor为该节点涨落的 $8\pi^2/3$ 倍。

### 1.2 模型评价指标

对于模型中的参数，本文通过最大化理论与实验B-factor的皮尔逊相关系数 (Pearson correlation coefficient, PCC) 来确定。两组数据完美正 (负)

相关PCC为1 (-1), 不相关为0.

### 1.3 基于GNM的热力学循环方法

基于GNM的热力学循环方法可以识别与结合和变构有关的关键残基, 其中位点突变导致受体-配体结合自由能变化较大的残基为关键残基.  $\Delta G_1$  是 TDP-43 与 DNA 的结合自由能,  $\Delta G_2$  是 TDP-43 中某一个残基突变后, TDP-43' 与 DNA 的结合自由能 (图 1). 通过计算残基突变前后结合自由能的变化  $\Delta\Delta G$ , 来识别对结合有较大影响的关键残基.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (3)$$

由于 TDP-43 与 DNA 的相互作用非常复杂, 直接计算  $\Delta G_1$  和  $\Delta G_2$  是非常困难的. 因此, 构建了热力学循环法来计算结合自由能的变化, 我们假设了两个非物理的过程 (图 1), 分别是对 TDP-43 和复合物中的同一残基引入微扰 (模拟突变), 其中涉及到的自由能变化分别为  $\Delta G_3$  和  $\Delta G_4$ .

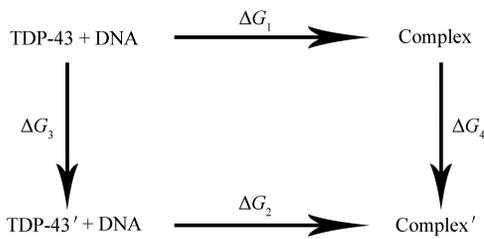


Fig. 1 Thermodynamic cycle diagram

$\Delta G_1$  and  $\Delta G_2$  are the binding free energies between wild-type and mutant TDP-43 proteins and DNA respectively, and  $\Delta G_3$  and  $\Delta G_4$  are the free energy changes caused by a residue perturbation to TDP-43 and complex, respectively.

由于自由能是一个态函数, 其变化只取决于初态和终态, 因此突变一个残基引起的结合自由能变化可以表示为分别微扰复合物和 TDP-43 中的该残基引起的自由能变化差值, 即  $\Delta\Delta G = \Delta G_4 - \Delta G_3$ . 在两个假想的微扰过程中, 可近似认为同一弹簧力常数微扰引起的势能变化是相同的, 所以  $\Delta\Delta G$  只和熵变有关, 即  $\Delta\Delta G = -T(\Delta S_4 - \Delta S_3)$ ,  $\Delta S_3$  和  $\Delta S_4$  分别是蛋白质单体和复合物中与突变残基相连的弹簧被微扰所产生熵变的总和. 当突变一个残基时, 所有与该残基连接的弹簧都会被微扰, 突变所导致的自由能变化  $\Delta\Delta G$  为这些弹簧被微扰所产生的自由能变化总和. 其中微扰某一对残基  $i$  和  $j$  之间弹簧所引起的熵变为<sup>[21-22]</sup>:

$$\Delta S_{ij} = \frac{1}{2T} \left( \left\langle (\Delta R_i)^2 \right\rangle + \left\langle (\Delta R_j)^2 \right\rangle - 2 \left\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_j \right\rangle \right) \Delta \gamma_{ij} \quad (4)$$

在识别关键残基的过程中, 对每个残基都以上述相同的方式突变, 没有进行特殊处理. 另外, 对于蛋白质, 本文考虑了对残基涨落贡献超过 50% 的前 60 个慢运动模式, 复合物的运动模式被投影到这 60 个模式上.

### 1.4 研究体系

人 TDP-43 与 DNA 的复合物结构是由 X 射线实验解析出来的 (PDB: 4IUF). 蛋白质受体的结构是从 TDP-43-DNA 的复合物结构中拆分出来的.

## 2 结果与讨论

### 2.1 基于GNM的理论实验B-factor的比较

B-factor 的准确预测为理解生物分子动力学提供了一个良好的起点. 对于构建的 GNM, 本文通过最大化理论与 X 射线实验得到的 B-factor 间的 PCC 值来确定最优参数. 传统 GNM 只有 1 个截断半径参数. 对 TDP-43-DNA 复合物, 本文采用 3 个截断半径, 分别针对蛋白质内部、RNA 内部和界面处, 其寻优范围为 1~25 Å, 步长为 1 Å. 图 2 显示了在最优截断半径 (蛋白质内部、RNA 内部和界面处残基间的截断半径分别为 11、14 和 12 Å) 下, 由 GNM 得到的理论 B-factor 和 X 射线实验的 B-factor, GNM 能较好地再现复合物 TDP-43-DNA 的柔性信息, 实验与理论 B-factor 的 PCC 值为 0.67 (图 2).

### 2.2 DNA 结合对蛋白质动力学的影响

为了探究 DNA 结合对 TDP-43 蛋白动力学的影响, 本文基于公式 (2) 计算并比较了 TDP-43 在 DNA 结合和未结合状态下残基的均方涨落 (图 3), DNA 结合导致蛋白质一些片段的柔性损失, 如 loop1、loop3 和 5 个  $\beta$  片层  $\beta 1 \sim \beta 5$ .

DNA 结合导致 loop1 和 loop3 片段有较大的柔性损失 (图 3), 这主要是由于 TDP-43 的 loop1 和 loop3 伸向 DNA, 与 DNA 形成了静电、堆叠和氢键相互作用<sup>[6, 8, 23]</sup>. 此外, loop1 和 loop3 中富含一些带正电荷的残基, 如 K114、K140 和 K145, 它们在吸引 DNA 中发挥了重要作用, 表明它们在 TDP-43-DNA 识别的诱导契合方面做出了重要贡献.

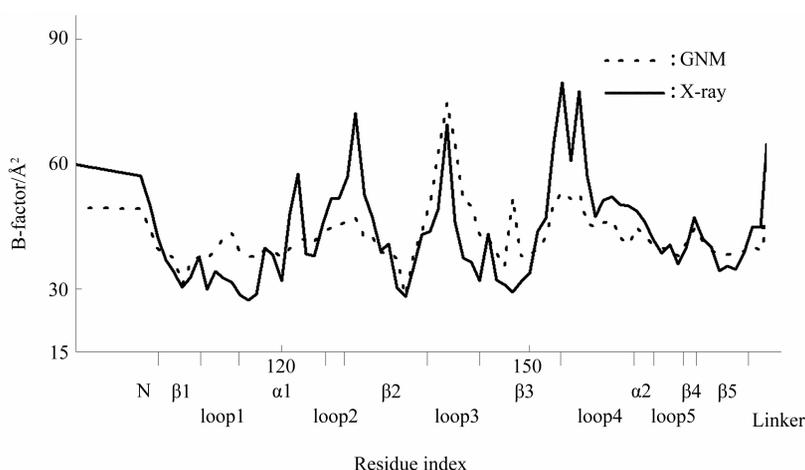


Fig. 2 Comparison between the theoretical (dotted line) and experimental X-ray (solid line) B-factors of TDP-43-DNA complex

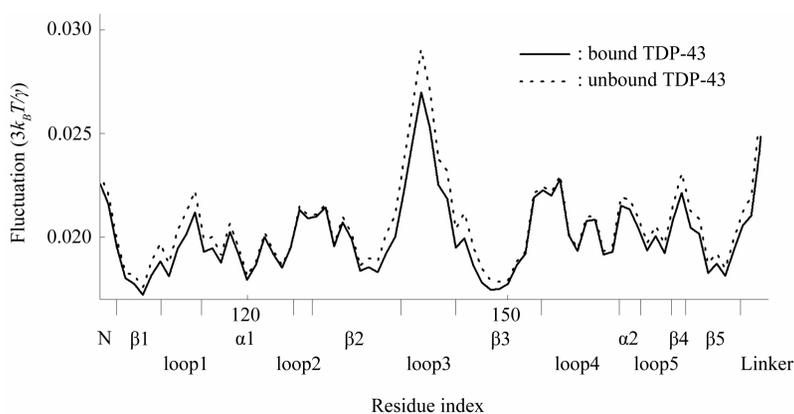


Fig. 3 Residue mean square fluctuation (MSF) of TDP-43 in DNA-unbound (dotted line) and DNA-bound (solid line) states

此外, DNA结合导致 $\beta 1 \sim \beta 5$ 片段都有一定程度的柔性损失。 $\beta$ 片层构成了与DNA结合的界面(图4),其氨基酸残基与DNA核苷酸间的氢键和堆叠相互作用,如D105-G8、I107-C7、M132-G8、Q134-G8、K136-G8、F149-C7、F149-G8、F149-G4和R171-G4,在分子间特异性识别中发挥了关键作用<sup>[8]</sup>。RNP5是 $\beta$ 片层上一段富含芳香族和疏水残基的高度保守序列,其中RNP1和RNP2(分别主要位于 $\beta 3$ 和 $\beta 1$ 上)与DNA形成了特异性相互作用,在DNA的特异性识别中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。

总之, TDP-43与DNA间相互作用的形成使得loop1、loop3和 $\beta 1 \sim \beta 5$ 片段发生了一定程度柔性的损失。loop1和loop3对分子间静电吸引和诱导契合

贡献了主要的作用, $\beta 1 \sim \beta 5$ (构成了与DNA结合的表面)在TDP-43特异性识别DNA的过程中发挥了关键作用。

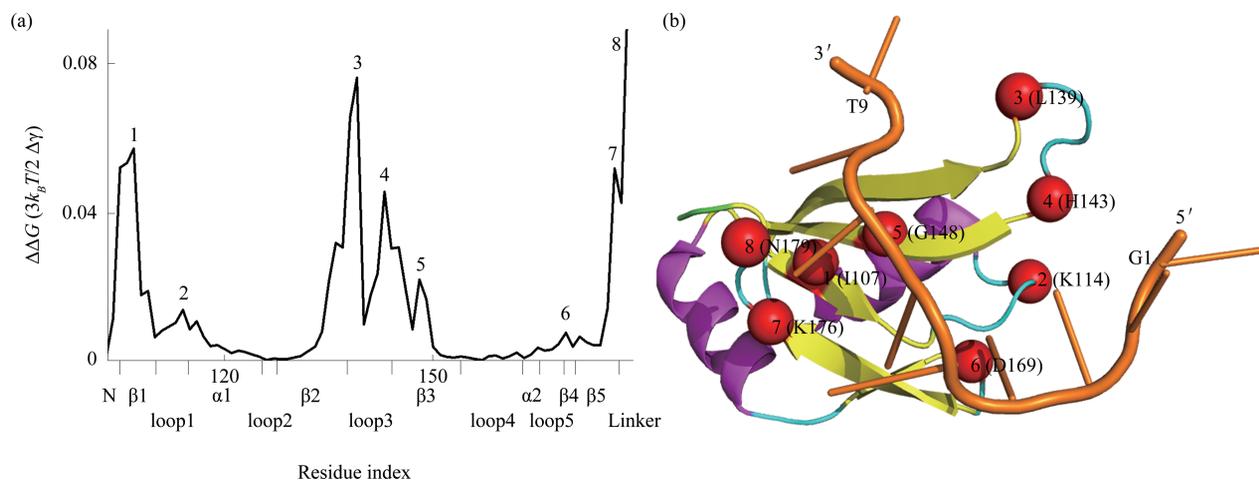
### 2.3 基于热力学循环识别TDP-43的关键位点

本文利用基于GNM的热力学循环方法识别了TDP-43上与DNA结合和构象变化有关的关键残基。对TDP-43上的残基进行微扰(模拟突变),导致结合自由能 $\Delta\Delta G$ 变化较大的残基被认为是关键残基簇的中心。

本文利用上述方法识别到了8个关键残基簇(图4a),分别以I107、K114、L139、H143、G148、D169、K176和N179为中心。为了方便展示,将这些中心残基标注在结构上(图4b)。根据

识别的中心残基在二级结构上的分布, 将其分为 $\beta$ 、loop和linker区域3个部分, 并将预测的关键残

基与实验和理论数据进行了比较, 下面将详细讨论它们的功能情况.



**Fig. 4 Key residue clusters identified by GNM-based thermodynamics cycle method**

(a)  $\Delta\Delta G$  values in response to residue mutations with key residue clusters with relatively high  $\Delta\Delta G$  values marked by the numbers 1–8, respectively. (b) Locations of the central residues for the 8 key residue clusters.

### 2.3.1 位于loop的残基

如图4所示, loop上识别到了3个关键残基簇, 分别是第2、3和6簇. 对于loop1片段, 识别到了关键残基簇2. Kuo等<sup>[8]</sup>指出, DNA的5'端向上伸展与loop1上的残基发生了特异性相互作用. 残基簇2上的W113与G4形成堆叠和氢键相互作用, L111与G4形成氢键作用, 这增强了TDP-43和DNA之间的结合亲和性. 此外, 突变实验表明, 残基簇2的W113A突变会导致TDP-43与DNA的结合亲和性降低至原来的1/6<sup>[11, 24]</sup>, 表明W113对DNA的结合非常关键. P112与G4形成非极性相互作用, P112H突变在一定程度上降低了TDP-43结合DNA的能力<sup>[1]</sup>. FoldX方法的理论预测表明, 这一突变也会降低TDP-43蛋白质的稳定性<sup>[24]</sup>. 此外, DNA结合导致残基簇2上的T115与残基簇6上的D169形成了氢键, 它们以分子内部相互作用的形式稳定了复合物的结构. 对于位于loop3片段的关键残基簇3, 其上的L139位于TDP-43与DNA的结合缝隙中. 定点突变实验表明, L139A突变会导致结合亲和性降低至原来的1/3<sup>[7]</sup>. 关键残基簇6位于loop5片段, MD模拟实验表明, D169G突变导致了TDP-43中连接 $\beta 4$ 和 $\beta 5$ 的 $\beta$ 转角发生局部构象变化, 增加了结构核心的疏水相互作用, 从而提高了TDP-43的热稳定性, 增强了TDP-43与DNA

的结合亲和性<sup>[13]</sup>.

综合上述以及DNA结合导致loop1和loop3发生柔性明显损失的结果, 说明loop1和loop3对TDP-43与DNA间的相互作用非常重要. 它们贡献了分子间的诱导契合作用, 主要与DNA形成了静电和特异性氢键及堆叠作用, 其关键残基的突变导致了较大结合自由能的变化.

### 2.3.2 位于 $\beta$ 片层的残基

在 $\beta$ 片层上识别到4个关键残基簇, 分别是第1、4、5和7簇(图4). 关键残基簇1中的I107、D105和L109分别与C7、G8和G6形成特异性的堆叠和氢键, 以及非极性相互作用, 将这些核苷酸准确地定位在 $\beta$ 片层表面<sup>[8]</sup>. 对于 $\beta 3$ 片段, 两个关键残基簇在其上, 分别是簇4和簇5. 对于残基簇4, 其上的K145与G3形成堆叠和氢键相互作用, G146与G4形成氢键相互作用, 稳定了复合物的结构. 此外, 研究发现K145的乙酰化极大地抑制了蛋白质与DNA的结合<sup>[25]</sup>. 对于残基簇5, 其上的F147和F149, 位于RNP1上, 是TDP-43与DNA特异性相互作用中非常重要的两个残基. DNA主要结合在 $\beta$ 片层上, 与RNP1和RNP2片段发生了特异性相互作用<sup>[8]</sup>. F147插入到C7和G8的两个糖环之间, F149与G8形成堆叠作用. 突变实验表明, F147L或F149L突变导致了TDP-43与DNA间结合

亲和性大约降低至原来的 1/20, 表明它们对 DNA 的结合非常关键<sup>[8]</sup>. 对于残基簇 7, K176 与 A5 和 G6 形成了氢键相互作用, 特异性地将它们精确定位在  $\beta$  片层表面, 稳定了复合物的结构. 残基簇 7 中的 R171 与 G4 形成氢键和堆叠相互作用, 特异性地识别 G4. 突变实验表明, R171A 破坏了 G4 的特异性识别, 导致 TDP-43 与 DNA 之间的结合亲和性降低至原来的 1/6, 这表明 R171 残基在 DNA 的特异性识别和结合方面扮演着重要角色<sup>[8]</sup>.

综上所述,  $\beta$  片层提供了 TDP-43 与 DNA 结合的界面, 其上的关键残基主要通过和 DNA 形成特异性的堆叠和氢键作用将核苷酸精确定位在  $\beta$  片层界面上, 它们对特异性识别 DNA 和增强结合亲和性非常重要.

### 2.3.3 位于 linker 的残基

对于 linker 区域, 识别到了关键残基簇 8. linker 的柔性比较大, 它在 DNA 结合导致 TDP-43 构象变化中起到了重要作用, 同时也构成了结合界面的一部分, 对 DNA 的结合有一定程度的贡献<sup>[25]</sup>. 对于残基簇 8, 其上的 N179 与 C7 形成了氢键相互作用. 研究发现将 N179A 突变会导致结合亲和性有一定程度的改变<sup>[8]</sup>.

总之, linker 参与了与 DNA 的直接相互作用, 加强了结合亲和性, 在结合识别动力学中扮演着重要作用.

## 3 总 结

TDP-43 是一种可变剪切因子, 能够特异性地识别 DNA 片段, 在 DNA 转录和 RNA 翻译过程中发挥重要作用. 首先, 本文对 TDP-43-DNA 复合物构建了最优参数下的 GNM 模型, 实验与理论 B-factor 的 PCC 值达到 0.67, 表明 GNM 可以较好地再现 TDP-43-DNA 复合物的柔性. 然后, 通过比较分析 DNA 结合前后对蛋白质动力学的影响, 发现 DNA 结合导致了 TDP-43 的 loop1、loop3 和  $\beta 1\sim\beta 5$  片段发生了一定程度的柔性损失, 其中 loop1 和 loop3 在 TDP-43-DNA 识别的诱导契合方面发挥了重要作用,  $\beta$  片层构成了主要的 DNA 结合界面, 它们对特异性的相互作用非常关键.

最后, 利用基于 GNM 的热力学循环方法识别了 TDP-43 上对 DNA 结合起关键作用的残基, 它们的突变导致了结合自由能较大的变化. 根据识别到的关键残基在蛋白质结构中的位置, 将其分为 3 部分来分析. loop1 和 loop3 片段的柔性较高, 其上的

关键残基对 TDP-43-DNA 的诱导契合和静电吸引比较重要; 位于  $\beta$  片层的关键残基提供了与 DNA 之间的特异性相互作用, 将其上的核苷酸精确定位于  $\beta$  片层构成的结合界面上; 位于 linker 片段的关键残基对于构象调整非常重要, 并参与了与 DNA 的直接相互作用, 在结合识别动力学中扮演着重要角色. 该方法不仅识别到了一些与 DNA 特异性相互作用有关的重要残基, 而且识别到了一些远离结合界面但在结合引起的分子构象变化中发挥重要作用的残基. 识别到的关键残基与实验信息吻合程度较高, 因此本研究有助于理解 TDP-43 与 DNA 的特异性相互作用, 可为药物设计提供重要信息.

虽然 GNM 是一种粗粒化的 ENM, 但已被成功地用于研究生物大分子的功能性变构中. 考虑到该方法的解析性, 以及与实验结果较好的一致性, 我们相信, GNM 及所发展的基于 GNM 的热力学循环方法是有前途的方法, 可以很容易地推广到其他蛋白质-蛋白质/核酸相互作用的结合和变构动力学研究中.

## 参 考 文 献

- [1] Furukawa Y, Suzuki Y, Fukuoka M, *et al.* A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43. *Sci Rep*, 2016, **6**:20576
- [2] Neumann M, Sampathu D M, Kwong L K, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, **314**(5796):130-133
- [3] Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, *et al.* TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **351**(3):602-611
- [4] Gendron T F, Josephs K A, Petrucelli L. Review: transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, **36**(2): 97-112
- [5] Josephs K A, Whitwell J L, Weigand S D, *et al.* TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 2014, **127**(6):811-824
- [6] Kuo P H, Doudeva L G, Wang Y T, *et al.* Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(6):1799-1808
- [7] Lukavsky P J, Daujotyte D, Tollervey J R, *et al.* Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(12):1443-1449
- [8] Kuo P H, Chiang C H, Wang Y T, *et al.* The crystal structure of TDP-43 RRM1-DNA complex reveals the specific recognition for UG- and TG-rich nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(7): 4712-4722

- [9] Oubridge C, Ito N, Evans P R, *et al.* Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, 1994, **372**(6505): 432-438
- [10] Wang X, Hall T M T. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol*, 2001, **8**(2): 141-145
- [11] Buratti E, Baralle F E. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39):36337-36343
- [12] Bhardwaj A, Myers M P, Buratti E, *et al.* Characterizing TDP-43 interaction with its RNA targets. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(9): 5062-5074
- [13] Chiang C H, Grauffel C, Wu L S, *et al.* Structural analysis of disease-related TDP-43 D169G mutation: linking enhanced stability and caspase cleavage efficiency to protein accumulation. *Sci Rep*, 2016, **6**:21581
- [14] Prakash A, Kumar V, Meena N K, *et al.* Comparative analysis of thermal unfolding simulations of RNA recognition motifs (RRMs) of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43). *J Biomol Struct Dyn*, 2019, **37**(1):178-194
- [15] Han Z, Shao Q, Gong W, *et al.* Interpreting the dynamics of binding interactions of snRNA and U1A using a coarse-grained model. *Biophys J*, 2019, **116**(9):1625-1636
- [16] Zhang P F, Su J G. Identification of key sites controlling protein functional motions by using elastic network model combined with internal coordinates. *J Chem Phys*, 2019, **151**(4):045101
- [17] Tirion M M. Large amplitude elastic motions in proteins from a single-parameter, atomic analysis. *Phys Rev Lett*, 1996, **77**(9): 1905-1908
- [18] Bahar I, Jernigan R L. Vibrational dynamics of transfer RNAs: comparison of the free and synthetase-bound forms. *J Mol Biol*, 1998, **281**(5):871-884
- [19] Abdizadeh H, Guven G, Atilgan A R, *et al.* Perturbation response scanning specifies key regions in subtilisin serine protease for both function and stability. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, **30**(6): 867-873
- [20] Zheng W, Brooks B. Identification of dynamical correlations within the myosin motor domain by the normal mode analysis of an elastic network model. *J Mol Biol*, 2005, **346**(3):745-759
- [21] Su J G, Du H J, Hao R, *et al.* Identification of functionally key residues in AMPA receptor with a thermodynamic method. *J Phys Chem B*, 2013, **117**(29):8689-8696
- [22] Su J G, Xu X J, Li C H, *et al.* Identification of key residues for protein conformational transition using elastic network model. *J Chem Phys*, 2011, **135**(17):174101
- [23] Hudson W H, Ortlund E A. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, **15**(11):749-760
- [24] Zacco E, Graña-Montes R, Martin S R, *et al.* RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *J Mol Biol*, 2019, **431**(8):1671-1688
- [25] François-Moutal L, Perez-Miller S, Scott D D, *et al.* Structural insights into TDP-43 and effects of post-translational modifications. *Front Mol Neurosci*, 2019, **12**:301

## Study on The Interacting Dynamics and Key Residues Between Human TDP-43 and DNA Based on GNM Model\*

DENG Xue-Qing, WANG Shi-Hao, GONG Wei-Kang, LI Chun-Hua\*\*

(Faculty of Environmental and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

**Abstract** Transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43), an alternative-splicing regulator, can specifically bind the TG-rich DNAs, which is associated with a range of neurodegenerative diseases. Molecular dynamics simulation, although powerful in exploring inter-molecular interactions, is time-consuming, and moreover it is difficult to sample sufficiently the conformations for the system with large conformational changes to study the allosteric behavior. Here, we utilize a coarse-grained, elastic potential-based Gaussian network model (GNM) to characterize the interacting dynamics between human TDP-43 and DNA. Furtherly, using our group's previously proposed thermodynamic cycle method based on GNM, we identify the key residues for DNA binding whose perturbations induce a large change in their binding free energy. The results reveal that upon DNA binding, an evident loss of flexibility occurs to TDP-43's loop1 and loop3 segments rich in positively charged residues, which indicates their induced fit role in TDP-43-DNA recognition and interactions. Additionally, the thermodynamic cycle method identifies not only the residues important for DNA specific binding, but also the ones far away from the binding interface but critical for the conformational changes of TDP-43 caused by the DNA binding. This study is helpful for the understanding of the specific interaction between TDP-43 and DNA, and can provide important information for the related drug design. In addition, this method can be easily extended to other protein-nucleic acid interacting dynamics studies.

**Key words** TDP-43-DNA interactions, GNM, key residues, interacting dynamics

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0116

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31971180, 11474013).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-10-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

Received: April 29, 2021 Accepted: June 7, 2021