

УДК 577.322.75

Роль липидного окружения в процессе димеризации трансмембранных доменов гликофорина А

А. С. Кузнецов¹, П. Е. Волынский¹, Р. Г. Ефремов^{1-3*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20³Межведомственный суперкомпьютерный центр РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 32а
*E-mail: r-efremov@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.09.2015

РЕФЕРАТ Разработан эффективный вычислительный подход к количественной оценке свободной энергии спонтанной ассоциации α -спиралей белков в мембранном окружении. В основе подхода – численное разложение профилей свободной энергии взаимодействия трансмембранных (ТМ) спиралей на компоненты, соответствующие взаимодействиям белок–белок, белок–липиды и белок–вода. Метод апробирован для ТМ-сегментов гликофорина А человека (GrA) и двух его мутантных форм Gly83Ala и Thr87Val. Показано, что липиды вносят значительный отрицательный вклад в свободную энергию димеризации, в то время как образующиеся на интерфейсе спираль–спираль контакты аминокислотных остатков могут быть невыгодными. Детальный баланс различных энергетических вкладов сильно зависит от аминокислотной последовательности ТМ-сегмента белка. Данные о доминирующей роли среды во взаимодействии мембранных белков меняют представления о движущей силе спонтанной ассоциации ТМ α -спиралей. Адекватная количественная оценка вклада водно-липидного окружения, таким образом, становится чрезвычайно актуальной при рациональном конструировании новых молекул, способных заданным образом модулировать работу битопных мембранных белков, включая рецепторные тирозинкиназы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белок-белковые взаимодействия, гликофорин А, молекулярная динамика, роль липидной мембраны, свободная энергия межмолекулярных взаимодействий, трансмембранный домен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GrA – гликофорин А человека; МБ – мембранные белки; МД – молекулярная динамика; ПОФХ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин; РТК – рецепторная тирозинкиназа; СКО – среднеквадратичное отклонение; ТМ – трансмембранный.

ВВЕДЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия играют важную роль в формировании супрамолекулярных комплексов, выполняющих важнейшие функции в клетке. Изучение этих взаимодействий особенно затруднено в случае мембранных белков (МБ), так как они теряют свои нативные свойства в немембранном окружении. Поскольку наиболее часто встречающимся структурным элементом в трансмембранных (ТМ) доменах МБ является α -спираль, то в ряде случаев исследование белок-белковых взаимодействий сводится к изучению поведения ТМ α -спиралей в мембране. Именно оно определяет пространственную структуру мембраносвязанных участков ионных каналов [1–4] и функционирование битопных (т.е. имеющих лишь одну ТМ-спираль) мембранных белков, в частности рецепторных тирозинкиназ (РТК) [5–9]. Показано,

что для активации РТК необходимо формирование димеров или олигомеров, причем в процессе ассоциации участвуют именно ТМ-домены [6, 10–12]. В случае нарушения работы этих МБ развиваются серьезные заболевания, такие, как сахарный диабет или рак, поэтому их исследование особенно важно. Показано, что ряд нарушений работы РТК связан непосредственно с мутациями в ТМ-доменах [13–16]. Перспективной представляется разработка терапевтических агентов, так называемых «пептидов-перехватчиков», селективно действующих на ТМ-сегменты белка-мишени, однако для решения этой задачи необходимо понимание всех деталей молекулярного механизма передачи сигнала через эти домены целевых РТК [17–20]. Таким образом, взаимодействие α -спиралей в мембране является ключевым процессом, детали которого еще требуют подробного изучения.

Среди экспериментальных методов исследования взаимодействия ТМ-доменов можно выделить использование гибридных молекулярно-биологических конструкций с белками-маркерами, например FRET [21] и ТОХСАТ [22], а также определение пространственной структуры димеров методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса в средах, имитирующих мембранное окружение [5, 23–25]. Обе группы подходов дают хорошие результаты, однако они связаны со сложными и длительными процессами экспрессии и наработки целевых белков, а также с трудностями стабилизации олигомерных состояний в мембраноподобном окружении. Поэтому для решения задачи все чаще используют методы компьютерного моделирования, позволяющие эффективно оценивать параметры белковых комплексов. В частности, для изучения роли среды и влияния мутаций на димеризацию ТМ-доменов МБ используют метод оценки свободной энергии ассоциации с применением расчетов молекулярной динамики (МД) [11, 12, 26, 27].

На основании результатов анализа аминокислотных последовательностей ТМ-доменов ряда МБ, в частности гликофорина А (GpA), предложена концепция «мотивов димеризации», характерных остатков, которые располагаются в области контакта и определяют взаимодействие между α -спиралями [28–31]. Так называемый «гликофориновый» мотив димеризации включает два остатка глицина, разделенных в последовательности тремя другими остатками, и обозначается GG4. Этот мотив обнаружен и у других белков [5], однако в некоторых случаях он оказывался нефункциональным [9]. Гликофорин до сих пор считается хорошей моделью для теоретического и экспериментального изучения влияния точечных мутаций и свойств среды на димеризацию ТМ-спиралей [27, 29, 32–34]. Несмотря на то что в рассматриваемых работах ключевая роль в формировании димера отводится белок-белковым взаимодействиям, показано, что на димеризацию оказывают влияние параметры липидной мембраны [35–37]. Эти различия объясняли работой принципа гидрофобного соответствия, когда для наиболее эффективного встраивания белка в мембрану длина области гидрофобных остатков в спирали должна быть равна толщине гидрофобной области липидного бислоя [38].

Известно, что липидная мембрана не является гомогенной средой, а склонна к формированию кластеров липидов даже в простейших модельных системах [39, 40]. Белки же, в свою очередь, часто содержат на своей поверхности сайты связывания молекул фосфолипидов и холестерина, которые могут модулировать их активность [4, 21, 41, 42]. Встраивание

любого белка в мембрану вызывает изменение ее свойств [43, 44], а процесс димеризации может индуцировать более сложные эффекты [40, 45]. Таким образом, взаимодействие ТМ-доменов МБ не ограничивается лишь поиском наиболее выгодных белок-белковых контактов, а представляет собой сложную комбинацию вкладов взаимодействий белков и среды.

Следовательно, возникает вопрос о количественной оценке вклада эффектов мембранной среды в свободную энергию димеризации ТМ-доменов белка. Более того, необходимо установить роль каждого аминокислотного остатка в данном процессе. Важную информацию можно получить, изучая воздействие точечных мутаций в аминокислотной последовательности на распределение вкладов в энергию белка и окружения. В настоящей работе изучено влияние двух мутаций в ТМ-домене GpA на процесс формирования димера. Были выбраны замены, влияющие на разные факторы димеризации: мутация Gly83Ala, нарушающая плотную упаковку спиралей, и Thr87Val, делающая невозможной образование межмолекулярной водородной связи. Для изучения на атомарном уровне применяли метод МД в явно заданном цвиттер-ионном липидном бислое. Полученные результаты позволяют сделать вывод о доминирующей роли мембраны на начальном этапе формирования димера и о различных молекулярных механизмах нарушения ассоциации ТМ-комплексов в мутантных белках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые системы

Для исследования выбрали две мутации, затрагивающие наиболее важные для димеризации аминокислотные остатки ТМ-домена гликофорина А: Gly83Ala и Thr87Val [46, 47]. Аминокислотные последовательности пептидов приведены в табл. 1. Мономеры и димеры ТМ-домена изучали в гидратированных липидных бислоях из пальмитоилолеилфосфатидилолина (ПОФХ). В мономерах белок представляли

Таблица 1. Аминокислотные последовательности исследуемых пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность
GpA	SEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRR
GpA Thr87Val	SEPEITLIIFGVMAGVIGVILLISYGIRR
GpA Gly83Ala	SEPEITLIIFGVMAAVIGTILLISYGIRR

Примечание. Подчеркнуты замены аминокислотных остатков. Курсивом выделены концевые остатки, влияние которых не учитывали при расчете профилей энергии белок-белкового взаимодействия.

в виде идеальной α -спирали; начальную конформацию димера строили на основании экспериментальной структуры димера GrA дикого типа (PDB ID: 2KPF [48]). Модели димеров мутантных форм GrA строили по гомологии, заменяя соответствующие остатки, с последующей энергетической релаксацией структуры. Модели белка помещали в липидный бислой (128 молекул ПОФХ), добавляли молекулы воды с помощью утилиты *genbox*. Размер расчетной ячейки составлял $6.5 \times 6.5 \times 7.5$ нм³.

Молекулярная динамика

Траектории МД рассчитывали с использованием программного пакета GROMACS версии 4.6.7 и силового поля GROMOS96 43a2 [49]. Шаг интегрирования составлял 2 фс, использовали периодические граничные условия по всем направлениям. Расчет производили при постоянном давлении 1 атм и температуре 315 К. Давление в системе контролировали с помощью алгоритма баростата Берендсена [50]. Применяли отдельные схемы термостатирования для белка, липидов и воды, алгоритм V-rescale [51]. Электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием суммирования по Эвальду, ван-дер-ваальсовы взаимодействия – потенциала Леннарда–Джонса с двойной отсечкой на расстоянии 1.0/1.2 нм.

Перед расчетом траектории МД проводили минимизацию энергии системы методом наискорейшего спуска (50000 шагов), а затем в течение первых 50 пс МД температуру в системе линейно повышали с 5 до 315 К. Для релаксации мембранного окружения сначала рассчитывали траекторию длиной 5 нс с зафиксированной молекулой белка, а затем 50 нс без каких-либо ограничений. Стабильность димера анализировали по изменению углов скрещивания осей α -спиралей и наклона относительно плоскости бислоя, изменению вторичной структуры, а также по значению среднеквадратичного отклонения (СКО) координат атомов основной цепи в структуре белка от начальных значений.

Расчет свободной энергии димеризации α -спиралей

Профили свободной энергии ассоциации ТМ-доменов рецептора получали методом интегрирования средней силы, действующей между мономерами. В качестве координаты реакции использовали расстояние между центрами масс пептидов. Для этого создавали набор состояний димера, характеризующихся различным расстоянием между мономерами (32 точки, от 0.75 до 2.10 нм с шагом 0.05 нм). Начальные состояния получали путем параллельного переноса мономеров на заданное расстояние вдоль прямой, проходящей через их центры масс. Релаксацию мембраны

в МД производили в течение 50 нс, длина расчетной траектории также составляла 50 нс. Для каждого из состояний рассчитывали значение средней силы, действующей между мономерами белка, и интегрировали. В полученных энергетических профилях оценивали ошибку путем независимого расчета для пяти неперекрывающихся фрагментов каждой траектории МД. Для каждой системы провели по два независимых расчета, суммарная длина используемых траекторий МД составила около 10 мкс.

Разложение энергии взаимодействия α -спиралей на компоненты

Для разложения суммарного энергетического профиля на составляющие использовали следующий подход: по координатам атомов на каждом шаге МД заново рассчитывали силы, учитывая лишь вклады тех подсистем, влияние которых хотели установить. Далее эти силы усредняли по длине траектории МД, проецировали на направление, соответствующее координате реакции, и интегрировали. При построении диаграмм распределения вкладов отдельных аминокислотных остатков выбирали значения энергии, соответствующие глобальному минимуму в суммарном профиле потенциала средней силы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность пептидов в липидном бислое

Показано, что в ходе МД все модели ТМ-доменов GrA стабильны по набору исследуемых параметров. Так, не наблюдали расплетания α -спиралей в центральной части, углы скрещивания осей α -спиралей в димерах были близки к начальным значениям (табл. 2). В случае мономеров наблюдали наклон спирали относительно нормали мембраны, обусловленный подстройкой пептида под окружение – так называемый эффект гидрофобного соответствия. Во всех системах происходило частичное расплетание концов спиралей в области контакта с водой. В димере GrA дикого типа, а также в мутанте Gly83Ala наблюдали образование остатками Thr87 межмолекулярной водородной связи, которая рассматривается как один из важных факторов, стабилизирующих димер. Тем не менее димер с мутацией Thr87Val, делающей такую связь невозможной, стабильно существовал в МД и не отличался значительно по другим параметрам.

Свободная энергия димеризации α -спиралей GrA

Полученные профили энергии ассоциации всех трех изучаемых систем свидетельствуют о наличии стабильного димерного состояния у каждого из белков, однако глубина минимума энергии различается

Таблица 2. Стабильность димеров GrA в расчетах МД. Среднеквадратичное отклонение (СКО) структуры от стартовой, изменение вторичной структуры и угла скрещивания

Структура	Среднеквадратичное отклонение от начальной структуры, нм*	Угол скрещивания осей α -спиралей, град	Содержание α -спиральной конформации, %
Стартовая	0.0	-40 ± 2	84 ± 2
GrA	2.9 ± 0.2 (1.5 ± 0.1)	-39 ± 3	74 ± 2
GrA Thr87Val	2.4 ± 0.3 (1.7 ± 0.3)	-57 ± 4	73 ± 2
GrA Gly83Ala	1.9 ± 0.4 (1.3 ± 0.5)	-47 ± 7	77 ± 2

*СКО рассчитывали по координатам атомов основной цепи пептидов, в скобках дано значение для остатков Ile73–Ile95.

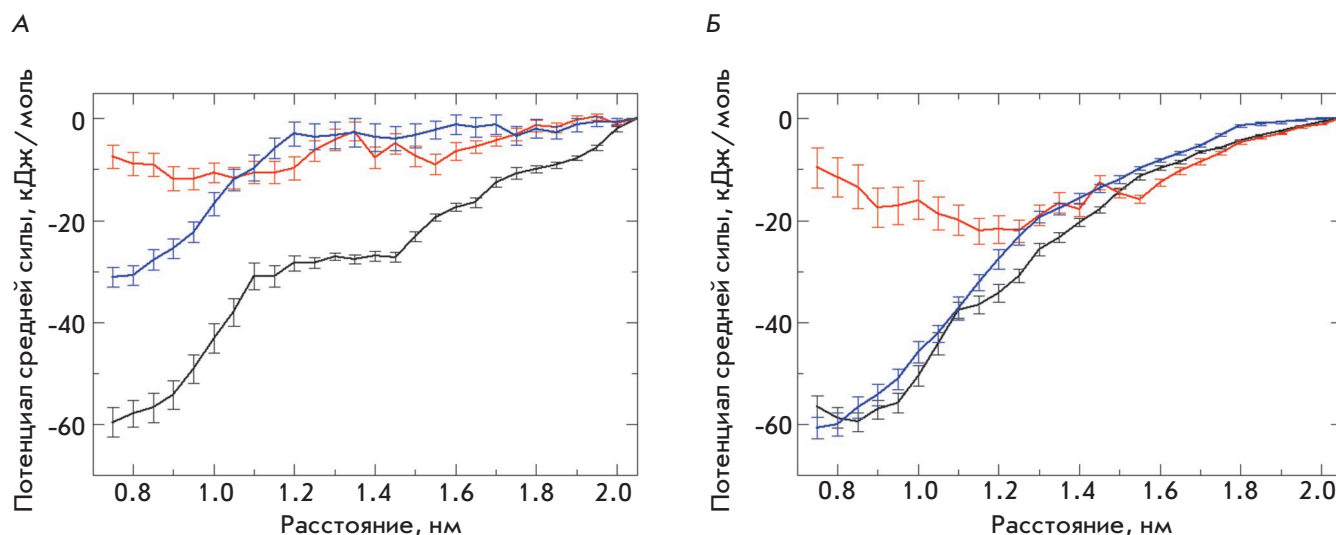


Рис. 1. Профили свободной энергии димеризации ТМ-доменов GrA дикого типа (черный), мутантных форм Thr87Val (красный) и Gly83Ala (синий) в бислое ПОФХ. А – суммарные профили свободной энергии; Б – вклад белок-белковых взаимодействий в центральной части α -спиралей (остатки Ile73–Ile95)

(рис. 1А). Так, мутант Thr87Val обладает очень небольшой (по модулю) свободной энергией димеризации (-16 ± 3 кДж/моль) по сравнению с димером дикого типа (-60 ± 3 кДж/моль). Мутация Gly83Ala также ослабляет димеризацию, но не так сильно (-30 ± 5 кДж/моль). Таким образом, поведение исследуемых пептидов различается. Для более детального исследования различий построили аналогичные энергетические профили непосредственного взаимодействия белок-белок без учета вкладов липидов и воды (рис. 1Б). Оказалось, что мутант Gly83Ala практически не отличается по энергии от димера дикого типа, имеет энергетический профиль той же формы и глубины, в то время как мутант Thr87Val и в данном случае является значительно более слабым. Таким образом, мутация Gly83Ala затрагивает взаимодействие ТМ-домена GrA с липидным окружением, а не прямой контакт мономеров. При срав-

нении кривых можно также заметить, что в случае суммарных профилей энергии минимумы смещены в сторону меньших расстояний по сравнению с профилями, характеризующими белок-белковые взаимодействия. Таким образом, мембрана «приводит» момеры в более плотный контакт по сравнению с их равновесным положением без учета эффектов среды.

Вклады аминокислотных остатков

При детальном изучении распределения энергетических вкладов по остаткам было показано, что остатки, лежащие на интерфейсе димеризации, могут формировать энергетически невыгодные контакты (Gly79, Val80, Gly83, Thr87), в то время как основной вклад, способствующий образованию комплекса, вносят остатки, взаимодействующие с мембраной (Phe78, Ala82, Ile89, Tyr93) (рис. 2А). Влияние мута-

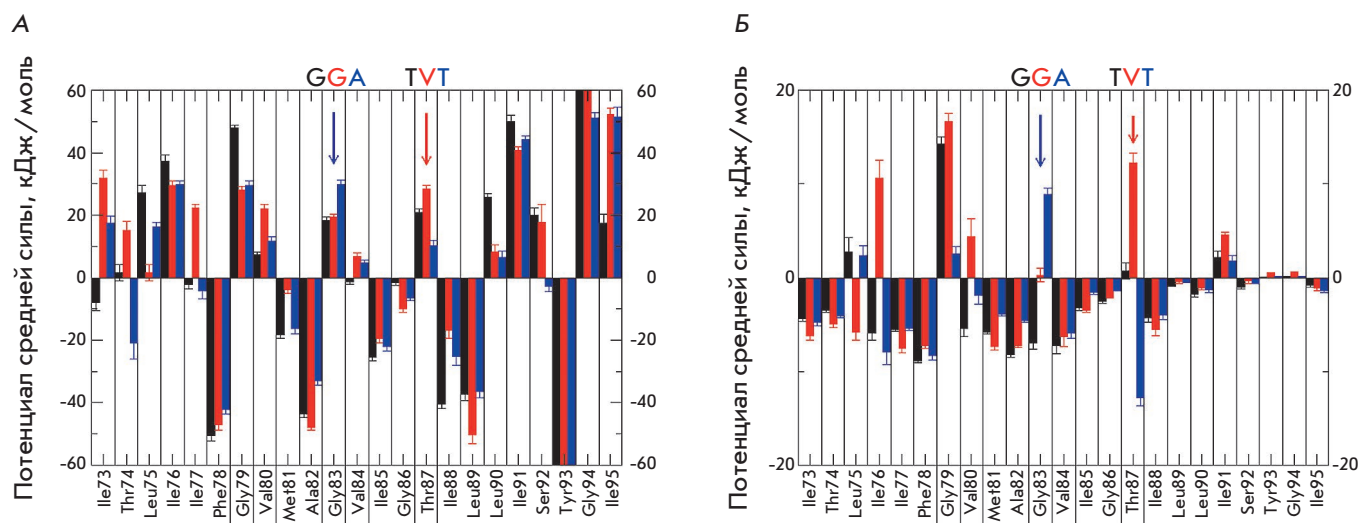


Рис. 2. Диаграммы вкладов аминокислотных остатков в свободную энергию ассоциации ТМ доменов GrA дикого типа (черный) и его мутантных форм Thr87Val (красный) и Gly83Ala (синий). А — вклады в суммарную свободную энергию димеризации; Б — вклады в белок-белковые взаимодействия. Цветными стрелками указано положение соответствующих мутаций. Рамками обведены остатки, участвующие в непосредственном контакте мономеров между собой

ции Thr87Val ярко проявляется в белок-белковых взаимодействиях, в то время как мутация Gly83Ala в этом случае вызывает компенсационный эффект (рис. 2Б). Таким образом, влияние этих двух мутаций имеет различную природу: замена Thr87Val нарушает белок-белковые взаимодействия, делая невозможной водородную связь, в то время как Gly83Ala приводит к незначительной перестройке структуры, дестабилизируя взаимодействие димера с мембранным окружением. Здесь также следует отметить, что остаток Gly83 в димере с липидами не взаимодействует и опосредованно влияет на всю структуру, улучшает общую упаковку в белок-белковых контактах (табл. 2, рис. 1Б), но ухудшает взаимодействие с мембранным окружением. Таким образом, при описании взаимодействия α -спиралей в мембране недостаточно рассмотрения белок-белковых взаимодействий и плотности упаковки белковой структуры. Липидное окружение может вносить не меньший вклад в стабилизацию димерных форм, поэтому важно также изучение эффектов, оказываемых ТМ-пептидами той или иной природы на мембрану.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты атомистического моделирования взаимодействия ТМ-доменов гликофорина А и двух его мутантных форм показывают, что липидная мембрана играет важную роль в образовании димера наряду

с непосредственным контактом между мономерами. Один из основных выводов настоящей работы состоит в том, что взаимодействия между лежащими на интерфейсе спираль-спираль остатками ТМ сегментов белков часто являются энергетически невыгодными. Это, однако, компенсируется выгодными вкладами в суммарную свободную энергию системы контактов белок-среда. Предложены два различных сценария нарушения ассоциации ТМ-спиралей GrA, вызванного точечными мутациями. Так, мутация Thr87Val напрямую нарушает белок-белковые взаимодействия, а замена Gly83Ala вызывает опосредованный эффект, влияя на мембранное окружение рецептора. Таким образом, водно-липидная среда активно участвует в функционировании рецепторных систем клетки, и ее роль необходимо учитывать при рассмотрении работы мембранных белков, а также при рациональном конструировании новых молекул, способных заданным образом модулировать работу сигнальных и других мембранных систем, в первую очередь, рецепторных тирозинкиназ.

Расчеты выполняли с использованием вычислительных ресурсов Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00871).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moreau A., Gosselin-Badaroudine P., Chahine M. // *Q. Rev. Biophys.* 2014. V. 47. № 4. P. 364–388.
2. Raja M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. V. 510. № 1. P. 1–10.
3. Williamson I.M., Alvis S.J., East J.M., Lee A.G. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 8. P. 1581–1590.
4. Prasanna X., Chattopadhyay A., Sengupta A. // *Biophys. J.* 2014. V. 106. № 6. P. 1290–1300.
5. Bocharov E.V., Mineev K.S., Goncharuk M.V., Arseniev A.S. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2012. V. 1818. № 9. P. 2158–2170.
6. Bocharov E.V., Lesovoy D.M., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Hristova K., Arseniev A.S. // *Structure.* 2013. V. 21. № 11. P. 2087–2093.
7. Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. // *Cell.* 2009. V. 137. № 7. P. 1293–1307.
8. Endres N.F., Das R., Smith A.W., Arkhipov A., Kovacs E., Huang Y., Pelton J.G., Shan Y., Shaw D.E., Wemmer D.E., et al. // *Cell.* 2013. V. 152. № 3. P. 543–556.
9. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. № 5. P. 881–889.
10. Fleming K.G., Engelman D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 25. P. 14340–14344.
11. Efremov R.G., Vereshaga Y.A., Volynsky P.E., Nolde D.E., Arseniev A.S. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. V. 20. № 1. P. 27–45.
12. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 35. P. 14390–14400.
13. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 22. P. 8105–8108.
14. Roskoski R. // *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 2014. V. 79. P. 34–74.
15. Li E., Hristova K. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 20. P. 6241–6251.
16. Hubert P., Sawma P., Duneau J.-P., Khao J., Hénin J., Bagnard D., Sturgis J. // *Cell Adhes. Migr.* 2010. V. 4. № 2. P. 313–324.
17. Najumudeen A.K., Kajanajmudeen A. // *Sci. Signal.* 2010. V. 3. № 138. P. j66.
18. Bennasroune A., Fickova M., Gardin A., Dirrig-Grosch S., Aunis D., Crémel G., Hubert P. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 7. P. 3464–3474.
19. Arpel A., Sawma P., Spenlé C., Fritz J., Meyer L., Garnier N., Velázquez-Quesada I., Hussenet T., Aci-Sèche S., Baumlin N., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. № 6. P. 1714–1721.
20. Yin H., Slusky J.S., Berger B.W., Walters R.S., Vilaire G., Litvinov R.I., Lear J.D., Caputo G.A., Bennett J.S., DeGrado W.F. // *Science.* 2007. V. 315. № 5820. P. 1817–1822.
21. Yano Y., Kondo K., Kitani R., Yamamoto A., Matsuzaki K. // *Biochemistry.* 2015. V. 54. № 6. P. 1371–1379.
22. Russ W.P., Engelman D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 3. P. 863–868.
23. Bocharov E.V., Volynsky P.E., Pavlov K.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Cell Adhes. Migr.* 2010. V. 4. № 2. P. 284–298.
24. Mineev K.S., Lesovoy D.M., Usmanova D.R., Goncharuk S.A., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2014. V. 1838. № 1. P. 164–172.
25. Smith S.O., Bormann B.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 2. P. 488–491.
26. Pohorille A., Jarzynski C., Chipot C. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. № 32. P. 10235–10253.
27. Hénin J., Pohorille A., Chipot C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 23. P. 8478–8484.
28. Engelman D.M., Adair B.D., Brünger A., Flanagan J.M., Hunt J.F., Lemmon M.A., Treutlein H., Zhang J. // *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 1993. V. 48. P. 11–21.
29. Melnyk R.A., Kim S., Curran A.R., Engelman D.M., Bowie J.U., Deber C.M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 16. P. 16591–16597.
30. Doura A.K., Kobus F.J., Dubrovsky L., Hibbard E., Fleming K.G.J. // *Mol. Biol.* 2004. V. 341. № 4. P. 991–998.
31. Prakash A., Janosi L., Doxastakis M. // *Biophys. J.* 2011. V. 101. № 8. P. 1949–1958.
32. Cuthbertson J.M., Bond P.J., Sansom M.S.P. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 48. P. 14298–14310.
33. Duong M.T., Jaszewski T.M., Fleming K.G., MacKenzie K.R. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371. № 2. P. 422–434.
34. Mueller B.K., Subramaniam S., Senes A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 10. P. E888–E895.
35. Janosi L., Prakash A., Doxastakis M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 1. P. 284–292.
36. Johnson R.M., Rath A., Melnyk R.A., Deber C.M. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 28. P. 8507–8515.
37. Mehrbod M., Mofrad M.R.K. // *PLoSComput. Biol.* 2013. V. 9. № 3. P. e1002948.
38. Caputo G.A. // *Meth. Mol. Biol.* 2013. V. 1063. P. 95–116.
39. Pyrkova D.V., Tarasova N.K., Pyrkov T.V., Krylov N.A., Efremov R.G. // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 6. P. 2569–2579.
40. Parton D.L., Tek A., Baaden M., Sansom M.S.P. // *PLoSComput. Biol.* 2013. V. 9. № 4. P. e1003034.
41. Lensink M.F., Govaerts C., Ruyschaert J.-M. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 14. P. 10519–10526.
42. Poveda J.A., Giudici A.M., Renart M.L., Molina M.L., Montoya E., Fernandez-Carvajal A., Fernandez-Ballester G., Encinar J.A., Gonzalez-Ros J.M. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2014. V. 1838. № 6. P. 1560–1567.
43. Dave P.C., Tiburu E.K., Damodaran K., Lorigan G.A. // *Biophys. J.* 2004. V. 86. № 3. P. 1564–1573.
44. Stangl M., Schneider D. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2015. V. 1848. № 9. P. 1886–1896.
45. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. № 9. P. 4415–4426.
46. Lemmon M.A., Flanagan J.M., Treutlein H.R., Zhang J., Engelman D.M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 51. P. 12719–12725.
47. Lee J., Im W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 20. P. 6456–6462.
48. Минеев К.С., Бочаров Э.В., Волынский П.Е., Гончарук М.В., Ткач Е.Н., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Чупин В.В., Масленников И.В., Ефремов Р.Г. и др. // *Acta Naturae.* 2001. T. 3. № 2. С. 94–102.
49. van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1701–1718.
50. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684.
51. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. № 1. P. 014101.