

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биоинженерии

Князева Анастасия Сергеевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ
КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛАХ
МЕТОДАМИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО ИНТЕГРИРОВАНИЯ И
МЕТАДИНАМИКИ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научные руководители:
вед. научн. сотрудник кафедры
биоинженерии, к. ф.-м. н.
Шайтан Алексей Константинович
м. н. с. кафедры
биоинженерии, к. ф.-м. н.
Армеев Григорий Алексеевич

Москва
2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1. Метод молекулярного моделирования	6
1.1. Основы метода	6
1.2. Термодинамическое интегрирование	7
1.3. Метадинамика	10
2. Объекты изучения	12
2.1. Бактериородопсин	12
2.2. Димер гистонов H2A-H2B	15
МЕТОДЫ	20
1. Исследование фотоцикла бактериородопсина методом метадинамики	20
2. Расчет энергий депротонирования методом термодинамического интегрирования	21
3. Моделирование димера гистонов H2A-H2B	24
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	26
1. Бактериородопсин	26
1.1. Профиль свободной энергии конформационных переходов в ходе фотоцикла	26
1.2. Расчет энергий депротонирования звеньев цепи переноса протона	30
2. Димер гистонов H2A-H2B	33
2.1. Влияние окружения ДНК на динамику димера	33
2.2. Влияние замен в последовательности H2A	39
ВЫВОДЫ	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

Белки - большая группа биологических молекул, лежащая в основе всего живого и выполняющая самые разнообразные функции. Традиционно для исследования функций белковых молекул производился поиск статических структур, однако в последние десятилетия все больше и больше информации свидетельствует о том, что значительная часть белков обладает высокой подвижностью, необходимой для их функционирования (Mannige, 2014). После открытия первой белковой структуры в середине прошлого века долгое время господствовали концепции соответствия первичной последовательности белка и его упорядоченной трехмерной структуры, а в основе взаимодействия белков белков лежит модель взаимодействия молекул по типу ключ-замок, которая подразумевает жесткие сайты взаимодействия, либо взаимодействие по типу рука-перчатка - модель индуцированного соответствия, которая допускает некоторую пластичность сайтов связывания. Эти модели применимы к многим экспериментальным данным, но не являются исчерпывающими. Более поздние модели взаимодействия белков рассматривают белковые молекулы не как статические структуры, а как набор конформаций, встречающихся с разной частотой в динамике белковой молекулы. К моделям этого поколения относятся модель конформационного отбора (conformational selection), согласно которой связывание лиганда стабилизирует некоторую конформацию белка и сдвигает равновесие в сторону этой конформации, а также модель индуцированного сворачивания (induced folding), согласно которой взаимодействие ограничивает конформационную динамику очень подвижных участков белков. Показано, что роль динамики белков очень важна и с ней связано развитие многих заболеваний человека, таких как болезнь Паркинсона, некоторые виды рака и многие другие (Midic et al., 2009).

Таким образом, понимание конформационной подвижности белковых молекул является не менее важной задачей исследования функций белков, чем получение статических структур.

В настоящее время для решения задач такого рода широко применяется метод молекулярного моделирования, позволяющий получать информацию о структурных и динамических параметрах моделируемых систем, а также о поведении молекулярной системы в заданных условиях.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью данной работы является изучение функционально значимых конформационных перестроек с использованием классического метода молекулярной динамики и некоторых усиленных модификаций этого метода, а именно методов метадинамики и термодинамического интегрирования. В качестве объектов работы были выбраны мономер бактериородопсина и димер гистонов H2A-H2B.

Для изучения конформационных перестроек, происходящих в ходе реализации их функций, были поставлены следующий задачи:

1. Исследование профиля свободной энергии конформационных переходов бактериородопсина в ходе фотоцикла;
2. Исследование изменений энергии депротонирования звеньев цепи переноса протона в течение фотоцикла бактериородопсина;
3. Изучение влияния окружения ДНК на динамику димера гистонов H2A-H2B и пластичность элементов гистонового фолда;
4. Исследование влияния замен в гистоне H2A в соответствии с вариантной формой H2A.Z на внутреннюю динамику димера гистонов H2A-H2B.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метод молекулярного моделирования

1.1. Основы метода

В последние десятилетия, благодаря развитию компьютерных технологий, большую популярность получил метод молекулярной динамики, позволяющий предсказывать структуру молекул и комплексов, конформационную подвижность биологических молекул, параметры взаимодействия лиганд-мишень и многое другое. Этот метод используется как для решения теоретических задач, так и практических, например, для поиска терапевтических молекул для лечения различных заболеваний. Он основан на представлении атомов в виде взаимодействующих материальных точек (Rahman, 1964). Взаимодействия разделяются на две группы: невалентные (парные) и валентные. Взаимодействия внутри связей включают в себя энергии изменения длин связей, углов между связями, двугранных углов и плоских групп. К парным относятся кулоновские и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия:

$$U = U_{\text{валентных связей}} + U_{\text{валентных углов}} + U_{\text{торсионных углов}} + U_{\text{плоских групп}} + U_{\text{Ван-дер-Ваальс}} + U_{\text{кулоновские взаимодействия}} \quad (1)$$

Взаимодействия одной частицы со всеми другими частицами определяют потенциальную энергию этой частицы в каждый момент времени, производная потенциальной энергии определяет силу, которая в свою очередь согласно второму закону Ньютона определяет направление и величину ускорения движения.

$$F_i = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (2)$$

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, \quad i=1, \dots, N \quad (3)$$

Таким образом, при заданных начальных положениях атомов и начальных скоростей (задается из распределения Максвелла) определяется развитие системы во времени.

В рамках данной работы метод молекулярной динамики использовался как в классическом виде, так и в некоторых модификациях, таких как метод параллельного моделирования при разных температурах с обменом структурами, метод термодинамического интегрирования, метадинамика. Эти группы методов относятся к усиленным методам молекулярной динамики (enhanced sampling techniques) и основаны на классическом методе, однако позволяют более эффективно проводить вычислительные эксперименты и значительно расширяют возможности метода в задачах, связанных с исследованием конформационного пространства и его свойств.

1.2. Термодинамическое интегрирование

Первым из рассматриваемых в этой работе методов является метод термодинамического интегрирования, позволяющий рассчитывать термодинамические свойства процессов.

Свободная энергия (энергия Гиббса или энергия Гельмгольца) является одной из важнейших термодинамических характеристик системы. Описано несколько методов для ее вычисления (Christ et al., 2010). В их основе – сумма по состояниям, введенная статистической механикой. Молекулярная система может быть описана Гамильтонианом $H=f(r_1, \dots, r_N, p_1, \dots, p_N)$, который отражает полную энергию системы в данной точке фазового пространства, т.е. является функцией всех моментов и всех координат.

Свободная энергия в каноническом ансамбле (постоянные число частиц, объем и температура) задается энергией Гельмгольца:

$$F = -\frac{1}{\beta} \ln Q, \quad (4)$$

где Q

$$Q = \frac{1}{h^{3N} N!} \iint e^{-\beta H(p,r)} dp dr, \quad (5)$$

здесь h – постоянная Планка, N – число частиц, $\beta=1/kT$.

Полная свободная энергия может быть посчитана только в тех случаях, когда известно «начальное» состояние системы – при абсолютном 0. Например, когда рассматривается идеальный газ или идеальный кристалл. Однако, возможно найти разницу энергии двух состояний:

$$\Delta F_{BA} = F_B - F_A = -\beta^{-1} \ln \frac{Q_A}{Q_B} \quad (6)$$

Переход между двумя состояниями можно математически описать с помощью введения дополнительного параметра λ . Так, любые константы эмпирического силового поля можно выразить через этот параметр, например:

$$q(\lambda) = \lambda q(B) + (1 - \lambda) q(A) \quad (7)$$

Изменяя параметр от 0 до 1, можно описать переход из состояния А в состояние В:

$$H(x, p_x; \lambda_a) = H(x, p_x; \lambda = 0) \quad (8)$$

$$H(x, p_x; \lambda_b) = H(x, p_x; \lambda = 1) \quad (9)$$

$$H(x, p_x; \lambda) = H_0(x, p_x) + \lambda H_b(x, p_x) + (1 - \lambda) H_a(x, p_x) \quad (10)$$

Дальнейший путь расчета свободной энергии разделяется на несколько методов. В данной работе рассматривается метод термодинамического интегрирования. В этом случае используется производная Гамильтониана по параметру λ , а свободная энергия вычисляется как область под кривой:

$$\Delta A_{a-b} = A(\lambda_b) - A(\lambda_a) = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} \frac{dA(\lambda)}{d\lambda} d\lambda \quad (11)$$

$$\frac{dA(\lambda)}{d\lambda} = \frac{\int \frac{\partial H(x, p_x; \lambda)}{\partial \lambda} \exp(-\frac{1}{kT} H(x, p_x; \lambda)) dx dp}{\int \exp(-\frac{1}{kT} H(x, p_x; \lambda)) dx dp} \quad (12)$$

$$\Delta A_{a-b} = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} \left\langle \frac{\partial H(x, p_x; \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (13)$$

Здесь интегрируются усредненные значения Гамильтониана по всем конфигурациям, которые имели место быть в ходе молекулярной динамики при заданном λ . Таким образом, для нахождения энергии перехода из состояния A в состояние B требуется разделить переход на некоторое число шагов с линейным изменением параметров и вычислить траекторию молекулярной динамики каждого состояния достаточно большой длины, чтобы получить ансамбль конфигураций, по которым можно было бы усреднять изменение энергии. При этом принимается серьезное допущение, что среднее по ансамблю значение равно среднему по времени (принимается эргодическая гипотеза):

$$\bar{A} = \frac{1}{t} \int A(t) dt = \frac{1}{M} \sum_M A_i = \langle A \rangle \quad (14)$$

В общем случае это неверно, т.к. времена моделирования относительно коротки (по сравнению с бесконечностью) и не все состояния могут быть достигнуты из-за наличия барьеров в ландшафте потенциальной энергии, преодолеваемых с низкой вероятностью. Однако это предположение оказывается корректным во многих задачах, связанных с динамикой белковых молекул (Huang et al., 2016).

1.3. Метадинамика

Для более эффективного исследования конформационного пространства и получения информации о термодинамическом аспекте процессов используется метод метадинамики (Laio, 2002).

Как известно, зависимость энергии от координат N частиц в составе молекулы можно представить в виде поверхности потенциальной энергии - поверхности в $(3N-6)$ -мерном (для нелинейных молекул) пространстве. Метод метадинамики позволяет частично воспроизводить рельеф этой поверхности в виде проекций на выбранные коллективные переменные.

Рассмотрим систему, состоящую из N частиц, каждой из которых соответствует три декартовы координаты $(q_i, i \in [0, 3N])$. Полная энергия этой системы:

$$H = U(q) + T(q'). \quad (15)$$

Метадинамика относится к группе усиленных методов, которые для эффективного сканирования конформационного пространства используют добавление потенциалов к функции внутренней энергии. В этом методе добавочные потенциалы представлены в виде Гауссовых функций и добавляются вдоль траектории по выбранным коллективным переменным $(S(q))$:

$$H = U + T + V_g, \quad (16)$$

где $V_g(S, t)$:

$$V_g(S, t) = \sum_{k\tau < t} W(k\tau) \exp\left(-\sum_{i=1}^d \frac{(s_i - s_i(q(k\tau)))^2}{2\sigma_i^2}\right), \quad (17)$$

здесь $W(k\tau)$ - высота добавляемых гауссиан, σ - ширина гауссиан, τ - время добавления гауссиан после прошлого добавления.

Такое изменение гамильтониана системы ведет к выходу системы из локальных минимумов, эффективному перемещению системы в конформационном пространстве. При полном сглаживании поверхности потенциальной энергии система начинает свободно перемещаться между всеми состояниями. При этом, сложение всех используемых в процессе моделирования гауссиан дает представление о форме поверхности свободной энергии в проекции на коллективные переменные с точностью до константы:

$$V(S, t \rightarrow \infty) = -F(S) + C \quad (18)$$

Для получения точного профиля энергии необходимо дополнительное усреднение по времени, так как $V(S, t \rightarrow \infty)$ флуктуирует около $F(S)$ в пределах высоты добавляемых гауссовых функций. Ошибка такого расчета зависит от высоты гауссовых функций $W(k\tau)$ и от времени добавления. Также необходимо выполнение условия свободного перемещения системы в конформационном пространстве в конце расчета.

Таким образом, этот метод позволяет выводить систему из локальных минимумов энергии, помогает предсказывать пути реакции, так как при выходе из минимумов система двигается вдоль новых локальных минимумов седловых точек, а также дает представление о форме поверхности потенциальной энергии.

2. Объекты изучения

2.1. Бактериородопсин

Бактериородопсины – семейство мембранных светочувствительных белков архей (например, *Halobacterium salinarum*). Эти белки являются световозбуждаемыми и участвуют в фотоцикле, в ходе которого энергия света преобразуется в химическую энергию или в запуск сигнальных каскадов. Белковые мембранные комплексы бактериородопсина создают мембранный градиент протонов, который потом используется для синтеза АТФ и прохождения других энергетических процессов клетки.

Бактериородопсин был открыт в конце XX века (Oesterhelt, Stoeckenius, 1971), и с тех пор накопление знаний о нем сохраняет свою актуальность, так как возможная область его применения довольно широка.

В бактериальных клетках бактериородопсин входит в состав пурпурных мембран, состоящих из трех мономеров белка и специфических молекул, в основном липидов (рис. 1).

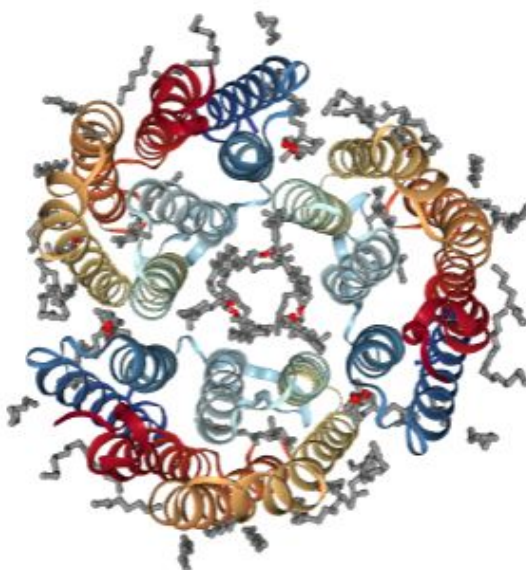


Рис. 1. Тример бактериородопсина. Вид с внеклеточной стороны (PDB ID 5b6v, Nango et al., 2016).

Мономер состоит из семи интегральных (проходящих сквозь мембрану) альфа-спиралей. К лизину (Lys216) одной из спиралей (G-спирали) ковалентно через основание Шиффа присоединен транс по всем положениям изомер ретиналя. Под действием света ретиналь изомеризуется в положение 13-цис, что вызывает каскад конформационных переходов, сопровождаемых переносом протона.

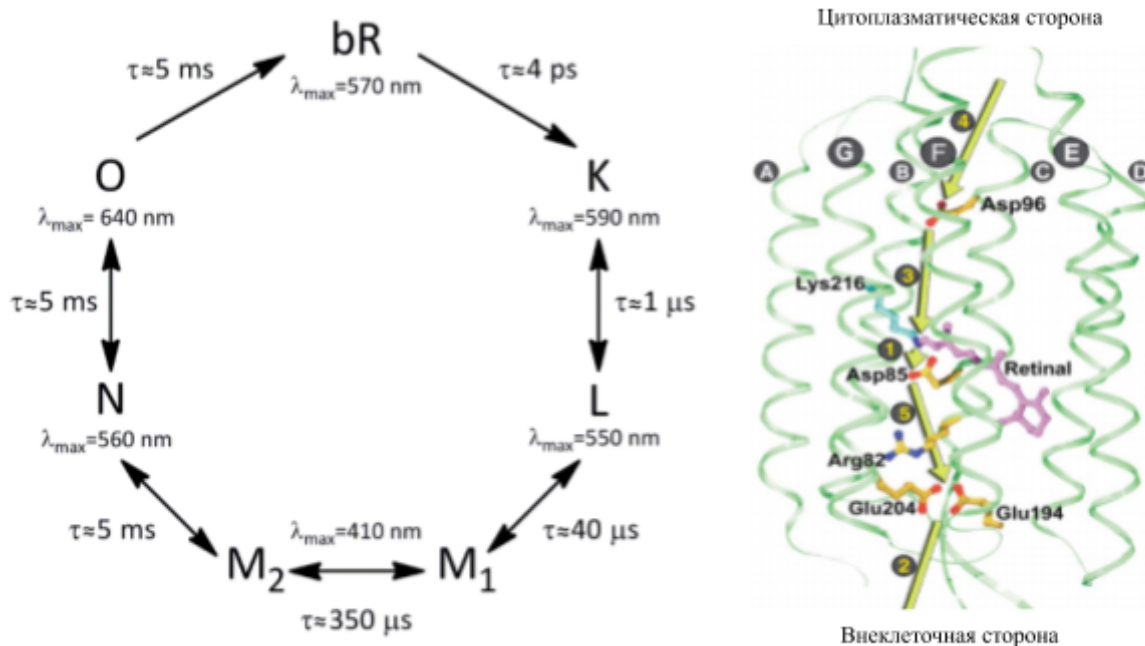


Рис. 2. Схема фотоцикла бактериородопсина (Nango et al., 2016) и предполагаемая цепь переноса протона в ходе фотоцикла (Neutze et al, 2002).

На рисунке 2 представлены основные этапы фотоцикла с точки зрения процесса трансмембранного переноса протона (Neutze et al, 2002). На первом этапе, следующем за изомеризацией ретиналя, осуществляется первичный перенос протона с Шиффова основания на Asp 85; за ним следует выброс протона во внеклеточное пространство; следующий этап – репротонирование Шиффова основания, заключающееся в переносе на него протона с Asp 96, который затем протонируется за счет цитоплазматического протона; заключительный этап цикла – депротонирование Asp 85 и реизомеризация ретиналя. Весь фотоцикл занимает порядка 10 мс, причем бактериородопсин не обладает рефрактерным периодом, т.е. по завершении одного фотоцикла, он

сразу готов к следующему, максимальная достижимая скорость протонного транспорта составляет 100 протонов в секунду на одну молекулу белка, однако даже на ярком свете, бактериородопсин не достигает светового насыщения.

Не так давно при помощи времяразрешенной рентгеновской фемтосекундной кристаллографии (TR-SFX) на рентгеновском лазере на свободных электронах (XFEL) (Tenboer et al., 2014; Pande et al., 2016.), были получены структуры бактериородопсина (Nango et al., 2016), отвечающих различным промежуткам времени, прошедшим после возбуждения родопсина вспышкой света, т.е. на разных этапах фотоцикла. На рисунке 3 показано соответствие структур, полученных на XFEL стадиям фотоцикла и временам после фотовозбуждения (время увеличивается экспоненциально).

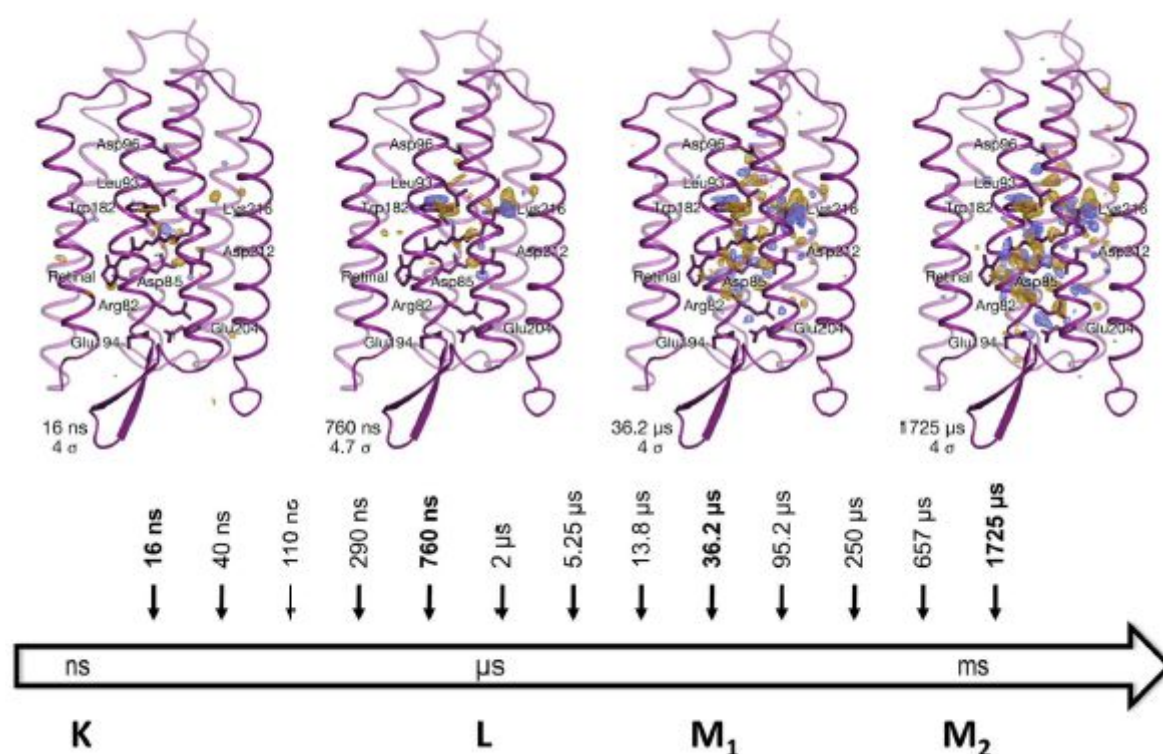


Рис.3. Структурные изменения в бактериородопсине в ходе фотоцикла (Nango et al., 2016).

Процесс переноса протона изучен достаточно хорошо, при этом все еще остаются неразрешенными вопросы о точном механизме и движущих силах этого процесса. В данной работе рассматривается влияние конформаций на

состояние аминокислотных остатков – переносчиков протона (ключевых остатков – Asp 96, Ret 216, Asp 85, Arg 82, Glu 194 и Glu 204) методами вычисления констант кислотности и расчета свободной энергии депротонирования.

2.2. Димер гистонов H2A-H2B

ДНК в клетках эукариот и археобактерий упакована в хроматин, базовым элементом которого являются нуклеосомы - белковые комплексы, кор которых в классическом варианте образован тетрамером гистонов H3-H4 и двумя димерами H2A-H2B (рис. 4). Молекула ДНК в таких структурах образует левосторонний виток длиной 145-147 пар оснований. Вне коровой частицы находятся “хвосты” гистонов - концевые неструктурированные участки аминокислотной последовательности. Эти участки являются высоко подвижными, но играют важную роль в регуляции компактизации хроматина и экспрессии генов, так как несут сайты посттрансляционных модификаций, таких как метилирование и ацелирование (Luger et al., 1997). Между единичными нуклеосомами находятся линкерные области, длина которых видо- и тканеспецифична.



Рис. 4. Структура нуклеосомы (PDB ID 1KX5) (Luger et al., 1997).

Пластичность и подвижность гистонов определяют связывание белков и белковых комплексов с нуклеосомой и с участками ДНК, участвуя таким образом в регуляции экспрессии генов, репликации и репарации ДНК, контроле клеточного цикла и ремоделировании хроматина. В ходе этих процессов наблюдается перемещение и разборка нуклеосом. Например, показано, что ключевым начальным этапом разборки нуклеосом с участием гистоновых шаперонов является перемещение димера H2A-H2B из его канонического положения и последующая диссоциация димера (Akey, Luger, 2003). Одним из условий для перемещения является разворачивание молекулы ДНК (Lee J, Lee TH., 2017). Схожим образом происходит взаимодействие нуклеосомы с РНК-полимеразой 2 в процессе транскрипции. Показано формирование на ранних этапах структуры, представляющей собой гексамер (H3-H4)₂ и

H2A-H2B. Такая структура образуется при диссоциации одного из димеров H2A-H2B от октамера нуклеосомы. Сохранение гексамера в таком состоянии предположительно поддерживается благодаря электростатическим взаимодействиям полимеразы и гистонов (Kulaeva et al., 2009).

Сборка нуклеосом происходит пошагово. Сначала два гетеродимера H3-H4 формируют тетрамер, который затем фланкируется гетеродимерами H2A-H2B (Kleinschmidt et al., 1990).

В формировании нуклеосомы также могут принимать участие варианты виды гистонов, которые встраиваются на место одного из четырех канонических гистонов. При этом наибольшее количество таких вариантов описано для гистонов H2A и H2B. Вариантные формы гистонов могут быть результатом изменения одной из многочисленных копий канонических форм или альтернативного сплайсинга гистонов, могут быть общими для эукариот (например, H2A.Z И H2A.X) или видоспецифичными (например, H2A.J, характерный только для человека и мышей).

Среди генов гистонов выделяют зависимые от репликации, экспрессия которых совпадает с S-фазой клеточного цикла, и независимые от репликации, экспрессия которых остается на постоянном уровне в течение всего клеточного цикла. К первой группе относятся гены, кодирующие канонические гистоны, а ко второй - гены вариантных форм (Eirin-Lopez et al., 2009).

Одним из наиболее хорошо изученных вариантных гистонов является гистон H2A.Z. Это универсальный для эукариот гистон, фланкирующий промоторы, энхансеры и другие важные регуляторные генетические элементы большинства эукариотических генов. Его включение в состав нуклеосомы происходит путем замены димера H2A-H2B в составе собранной нуклеосомы на димер H2A.Z-H2B с помощью ремоделера SWR1 (рис. 5). Показано, что в этом процессе необходимым является образование комплекса ремоделера с димером H2A.Z-H2B и димером H2A-H2B в составе нуклеосомы, причем

наибольшее значение для связывания H2A-H2B оказывает участок M4 (рис. 6) гистона H2A, отличающийся по первичной структуре от вариантной формы пятью аминокислотными остатками. Более детальное рассмотрение этого участка показало, что при замене в положении 47 Gly на Lys происходит падение эффективности замещения вариантной формой до 63% от показателя для дикого типа, а замена по двум положениям (47 Gly на Lys и 49 Pro на Ala) снижало эффективность до 54% (Ranjan et al., 2015) (рис. 6).

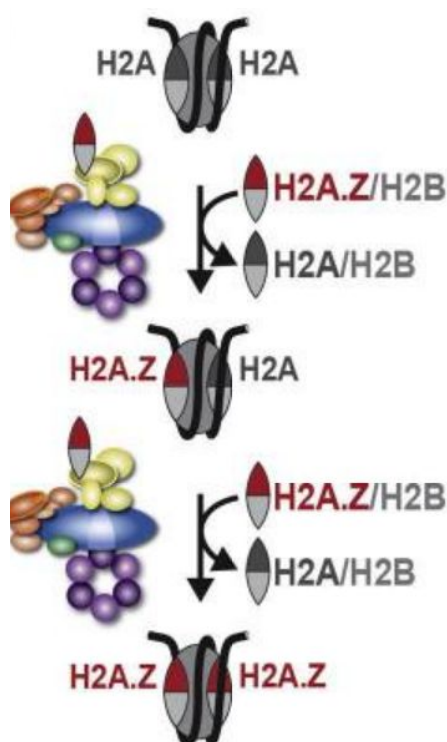


Рис 5. Схема работы ремоделера SWR1 (Nguyen et al. 2013).

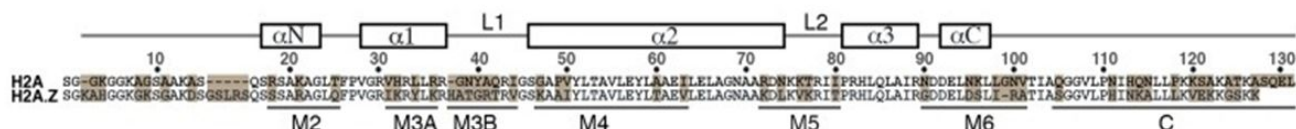


Рис 6. Сравнение первичной последовательности канонического гистона H2A и его вариантной формы H2A.Z (Ranjan et al., 2015).

В экспериментальных работах с применением крио-электронной микроскопии были получены структуры нуклеосом в деформированном состоянии (Bilokapic et al., 2018). Эти комплексы получены в условиях некаталитического термического разворачивая ДНК. Предполагается, что

движения нуклеосомы в этой реакции аналогичны движениям, вызываемым ремоделерами. Таким образом, показаны деформации α -2 спиралей гистонов H2A и H2B - сгибание в сторону диадной оси - и разворачивание концевой C- α спирали H2B. Эти конформационные перестройки способствуют вхождению ДНК в диаду. Также показана роль N-терминального хвоста гистона H2A в скольжении ДНК через нуклеосому - при движении он укладывается в большую бороздку ДНК и принимает участие в стабилизации нуклеосомы в ремоделлированном состоянии.

Итак, конформационные изменения димера гистонов H2A-H2B и взаимодействие мономеров в его составе являются очень важным аспектом функционирования нуклеосом и взаимодействия с белками. Поэтому вторым объектом данной работы выбрали димер гистонов H2A-H2B.

МЕТОДЫ

1. Исследование фотоцикла бактериородопсина методом метадинамики

Первый объект данной работы - бактериородопсин, предмет изучения - функционирование цепи переноса протонов.

В первой части работы моделировалась динамика темноадаптированной структуры мономера бактериородопсина (PDB ID 5B6V). В качестве контроля была получена траектория белка в вакууме при 300 К (термостат v-rescale) длиной 100 нс с шагом интегрирования 1 фс в силовом поле amber99sb-star-ildn-retk (модификация с параметризацией ретиналя), (Malmerber et al., 2011; Hayashi et al., 2003). Расчеты проводились в программе Gromacs (Pronk et. al., 2013).

Использовались кристаллические структуры из базы данных структур белков и нуклеиновых кислот PDB, полученные на XFEL рентгеноструктурным анализом (Nango et al., 2016), для построения вектора, соответствующего первой половине фотоцикла бактериородопсина. В этом списке 14 структур (кадров), с разными временами от фотовозбуждения до действия лазером: 0 нс, 16 нс, 40 нс, 110 нс, 290 нс, 760 нс, 2 мкс, 5.25 мкс, 13.8 мкс, 36.2 мкс, 95.2 мкс, 250 мкс, 657 мкс, 1.725 мс. (логарифмический рост интервалов). В вектор, выбранный в качестве координаты реакции, вошли тяжелые атомы подвижных в течение фотоцикла аминокислотных остатков (для уменьшения влияния флуктуаций атомов водорода). Таким образом, вектор фотоцикла был задан с помощью 14 точек, что соответствует числу кристаллических структур, соединенных линейными преобразованиями координат. Соответствующая координата реакции также измерялась в пределах от 0 до 14 и рассчитывалась как координата структуры вдоль вектора, имеющей наименьший параметр среднеквадратичных отклонений атомов с текущей структурой. Был проведен

расчет методом метадинамики вдоль этой координаты реакции в условиях, аналогичных контрольному расчету. Расчет проводился в программе Gromacs (Pronk et. al., 2013), скомпилированной с программой Plumed (Tribello et al., 2014). Параметры добавляемых к потенциальной энергии гауссиан: высота 0,3 кДж/моль, ширина 0,2 (единицы координаты реакции), частота добавления каждые 500 шагов, количество добавленных гауссиан 10000. Длины независимых расчетов составили 5 и 20 нс с шагом интегрирования 1 фс. Метод метадинамики позволил построить частичный профиль свободной энергии конформационных переходов бактериородопсина в ходе фотоцикла.

2. Расчет энергий депротонирования методом термодинамического интегрирования

Во второй части работы изучался термодинамический аспект функционирования общепринятой модели строения цепи переноса протона бактериородопсина. Проводился расчет свободной энергии депротонирования аминокислотных остатков в составе белка методом термодинамического интегрирования по ансамблю состояний, полученных в ходе моделирования. Рассматривались 4 основных звена цепи, для которых показан процесс протонирования-депротонирования в ходе фотоцикла, - Asp 85, Asp 96, Glu 194 и Glu 204. Для каждого остатка были созданы параметры силового поля для двух состояний - протонированного и депротонированного. Для равенства числа атомов в двух состояниях для депротонированного состояния использовались параметры “неявного” протона. Таким образом в состав систем входили два типа протонов:

1. стандартная модель протона (мол. масса – 1 а.е.м., заряд +1, радиус Ван-дер-Ваальса 0.04 Å);
2. протон в неявном виде (мол. масса 1 а.е.м., заряд 0, радиус Ван-дер-Ваальса 0).

При переходе между состояниями соответственно изменялись заряды остальных остатков остатка. Параметры протонированных состояний аспартатов и глутаматов создавались с помощью Charmm Gui PDB reader [электронный ресурс] (режим доступа: <http://www.charmm-gui.org>) (Jo et al., 2008).

Были собраны системы, состоящие из белка в вакууме (PDB ID 5B6V), ограниченного в движении позиционными потенциалами, и молекул кристаллической воды внутри белка, представленных моделью TIP3P. Расчеты молекулярной динамики термодинамического интегрирования бактериородопсина проводились в силовом поле CHARMM36 (Best et al., 2012), модифицированном для параметризации ретиналя. Все ключевые остатки были протонированы. Для каждой системы были описаны два состояния – *A* и *B*. В состоянии *A* во всех расчетах 3 из 4 остатков были протонированы явными протоном, а атомы в остатках имели заряды, соответствующие протонированным состояниям. В состоянии *B* рассматриваемый остаток содержал неявный протон и заряды атомов согласно депротонированной структуре. Таким образом «выключались» кулоновские и Ван-дер-Вальсовы взаимодействия между протоном и остатком, что является моделью процесса депротонирования

Для каждого состояния интермедиатов фотоцикла (1-14) и для каждого рассматриваемого остатка (Asp 85, Asp 96, Glu 194, Glu 204) были рассчитано по 20 траекторий молекулярной динамики на фиксированных (1 нс, шаг интегрирования 1 фс) временах (рис. 7).

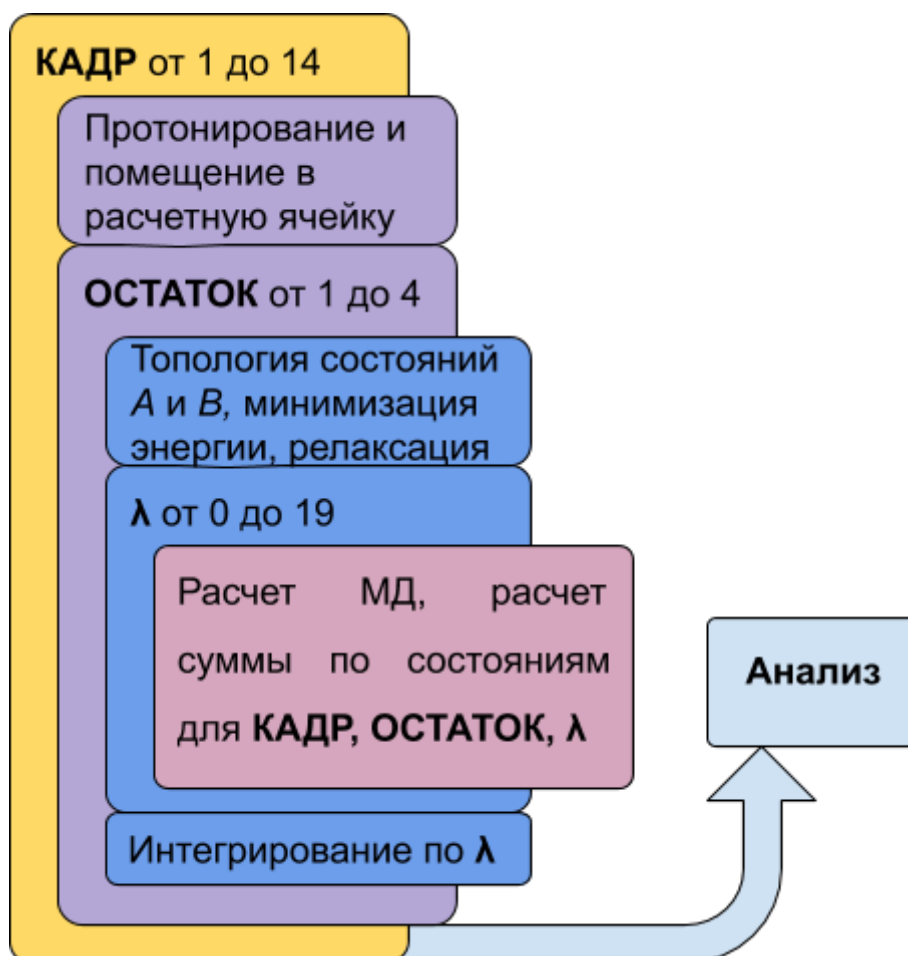


Рис. 7. Блок-схема алгоритма задачи по расчету энергий депротонирования.

Система в состоянии A подвергалась минимизации энергии и термостатированию (v -rescale - термостат Берендсона с масштабированием скоростей) в NVT-ансамбле с температурой 150K. Переход между состояниями A ($\lambda=0$) и B ($\lambda=1$) осуществлялся в 20 этапов, переход между которым соответствовал линейному изменению параметров: первые 10 циклов «выключался» заряд, вторые 10 циклов – радиус Ван-дер-Ваальса. Изменение параметров проводилось последовательно, так как вклад Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий в общую энергию на порядок ниже кулоновских и информация о них могла бы быть потеряна на фоне “шума” кулоновских взаимодействий. На каждом цикле моделировалась динамика длительностью 1 нс (1 000 000) шагов, затем проводился расчет свободной энергии с использованием опции

free energy calculation в программе Gromacs (Pronk et. al., 2013). Так, для каждого этапа фотоцикла и каждого остатка было получено 20 величин свободной энергии системы. Расчет изменения этого значения при изменении параметра λ дает величину энергии депротонирования.

3. Моделирование димера гистонов H2A-H2B

Второй объект данной работы - димер гистонов H2A-H2B.

Изучение конформационных изменений димера H2A-H2B проводили методами молекулярного моделирования в рамках классического силового поля (AMBER14SB (Maier et al., 2015) parambsc1 (Ivani et al., 2016) с откорректированными параметрами ионов – CUFIX (Yoo, Aksimentiev, 2018). Исходную структуру димера получили из структуры нуклеосомы, взятой из базы белковых молекул PDB (PDB ID 1KX5). Из этой структуры выделили гистоны H2A и H2B с максимально отсеченными подвижными концевыми участками (Shaytan et al., 2016), а также кристаллическую воду вблизи белка. Димер поместили в расчетную ячейку с ионами Na⁺ и Cl⁻ (концентрация 0,15 М) и водой (модель воды TIP3P). Перед расчетом траекторий системы прошли минимизацию энергии и релаксацию (ν -rescale термостат) при 300 К.

Первый этап изучения - полноатомная молекулярная динамика системы, длина траектории 3 мкс, шаг интегрирования 2 фс, температура 300 К. Второй этап - молекулярная динамика с использованием метода параллельного моделирования при разных температурах с обменом структур. Количество параллельных расчетов - 47, длина траектории для каждого расчета 100 нс, частота обмена структурами каждые 100 шагов, шаг интегрирования 2 фс, температуры 300-350 К. Третий этап - метадинамика системы вдоль координаты реакции, представляющей собой собственный вектор динамики димера, полученного при анализе траектории свободной динамики димера методом анализа главных компонент матрицы ковариации координат атомов.

Расчет методом метадинамики проводился для системы со свободным димером и димером в окружении 30 пн ДНК. Длина траекторий 120 нс, шаг интегрирования 2 фс, температура 300 К. Параметры добавляемых гауссовых потенциалов: высота 0,3 кДж/моль, ширина 0,2, частота добавления - каждые 500 шагов.

Также проводили сравнение динамики димера H2A-H2B канонической структуры и димеров с заменами (точечная замена по положению H2A47 (замена Gly на Lys), замены по двум положениям - H2A47 (Gly на Lys) и H2A49 (Pro на Ala)). Каждая из трех моделируемых систем состояла из димера гистонов с укороченными концевыми участками, участком цепи ДНК длиной 30 пар нуклеотидов и кристаллической водой вблизи молекулы. Получены три траектории длиной порядка 3 мкс, шаг интегрирования 2 фс, температура 300 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Бактериородопсин

1.1. Профиль свободной энергии конформационных переходов в ходе фотоцикла

Первый этап изучения фотоцикла бактериородопсина включал в себя анализ подвижности структуры вдоль координаты реакции при молекулярной динамике мономера в вакууме при 300 К. Было показано, что система свободно перемещается при выбранной температуре между координатами реакции 4,2 и 7,8 (рис. 8).

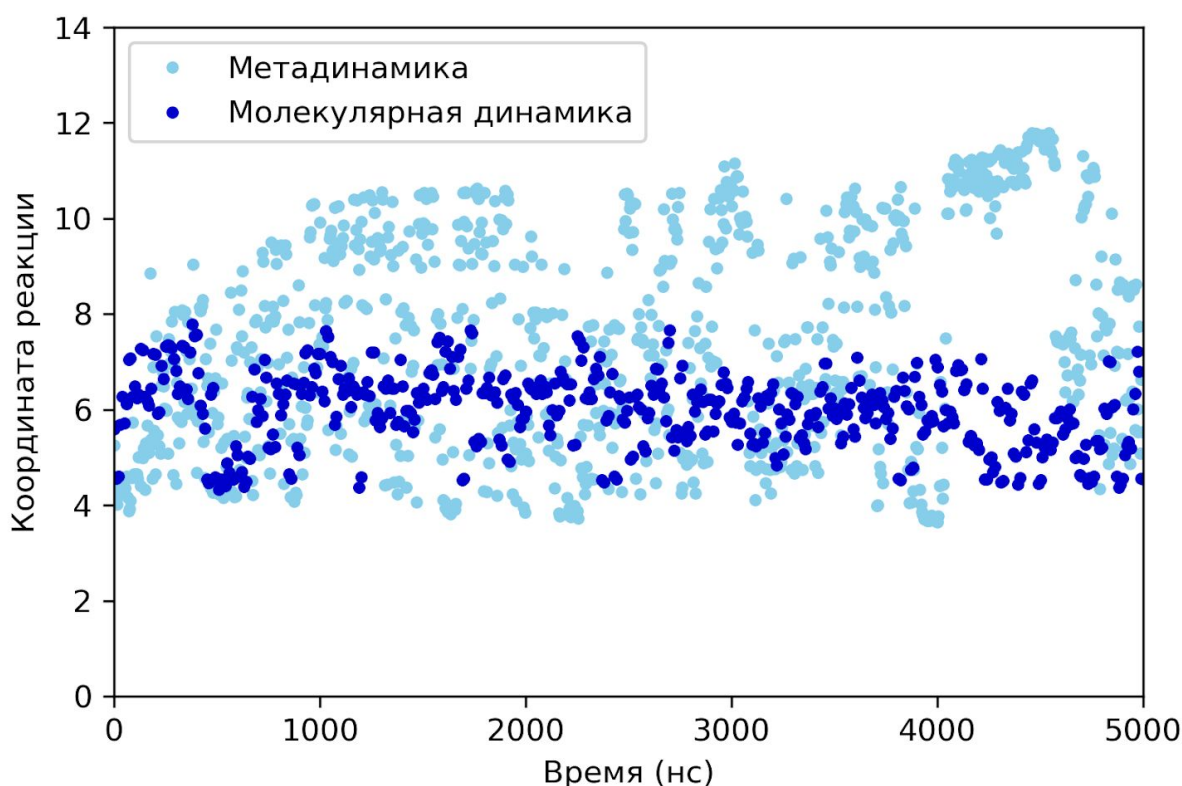


Рис. 8. Изменение координаты реакции фотоцикла бактериородопсина в траектории молекулярной динамики при 300 К и в траектории, полученной методом метадинамики.

При расчете методом метадинамики в траектории длиной 5 нс значение координаты реакции изменялось в интервале 3,5-11,8, а в траектории длиной 20 нс в интервале 2,5-12,8. Таким образом, при увеличении времени расчета

диапазон изменения координаты системы шире, что позволяет более полно исследовать рассматриваемую координату реакции.

На рисунках 9 и 10 показано, как изменялась форма профиля свободной энергии в ходе расчета (рис. 9) и как происходило исследование конформационного пространства вдоль координаты реакции в течение траектории (рис. 10).

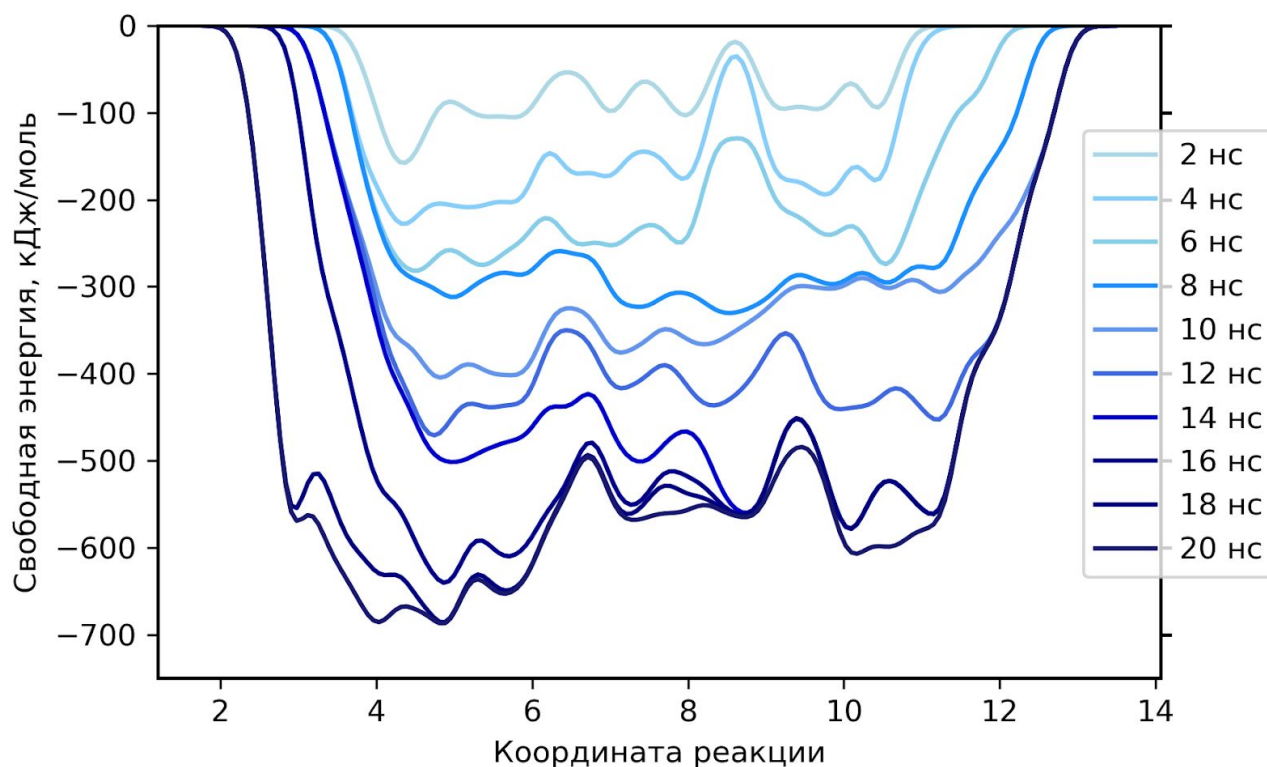


Рис. 9. Изменение профиля свободной энергии вдоль координаты реакции фотоцикла бактериородопсина в ходе расчета длиной 20 нс через каждые 2 нс.

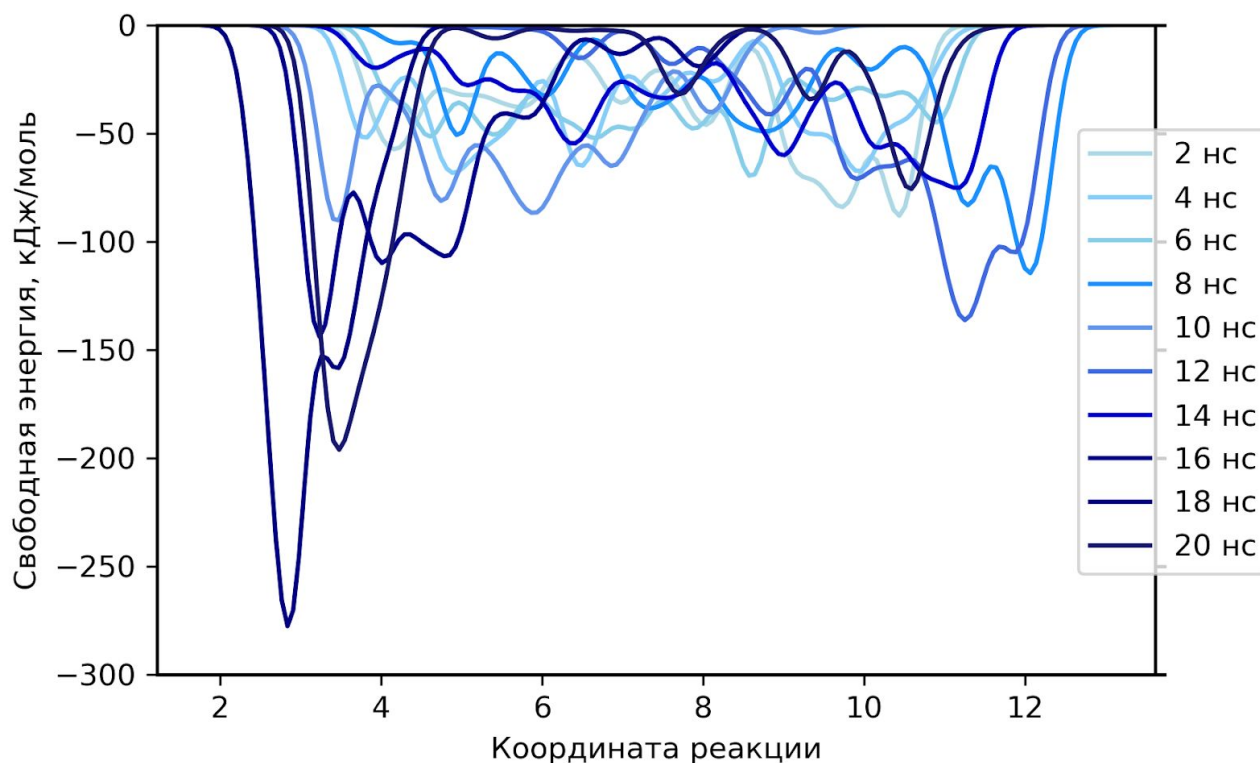


Рис. 10. Дифференциальное изменение профиля свободной энергии вдоль координаты реакции фотоцикла бактериородопсина в ходе расчета длиной 20 нс за каждые 2 нс.

Расчет был проведен в двух повторностях (рис 11) с длинами траекторий 5 и 20 нс. При сравнении полученных профилей видно, что на участке 8-12 профили сходятся и рядом с координатой 8-9 имеется достаточно высокий энергетический барьер, ограничивающий перемещение структуры в конформационном пространстве при свободной динамике. Энергетический барьер в координате 4 также показан, но область левее этой координаты была исследована плохо.

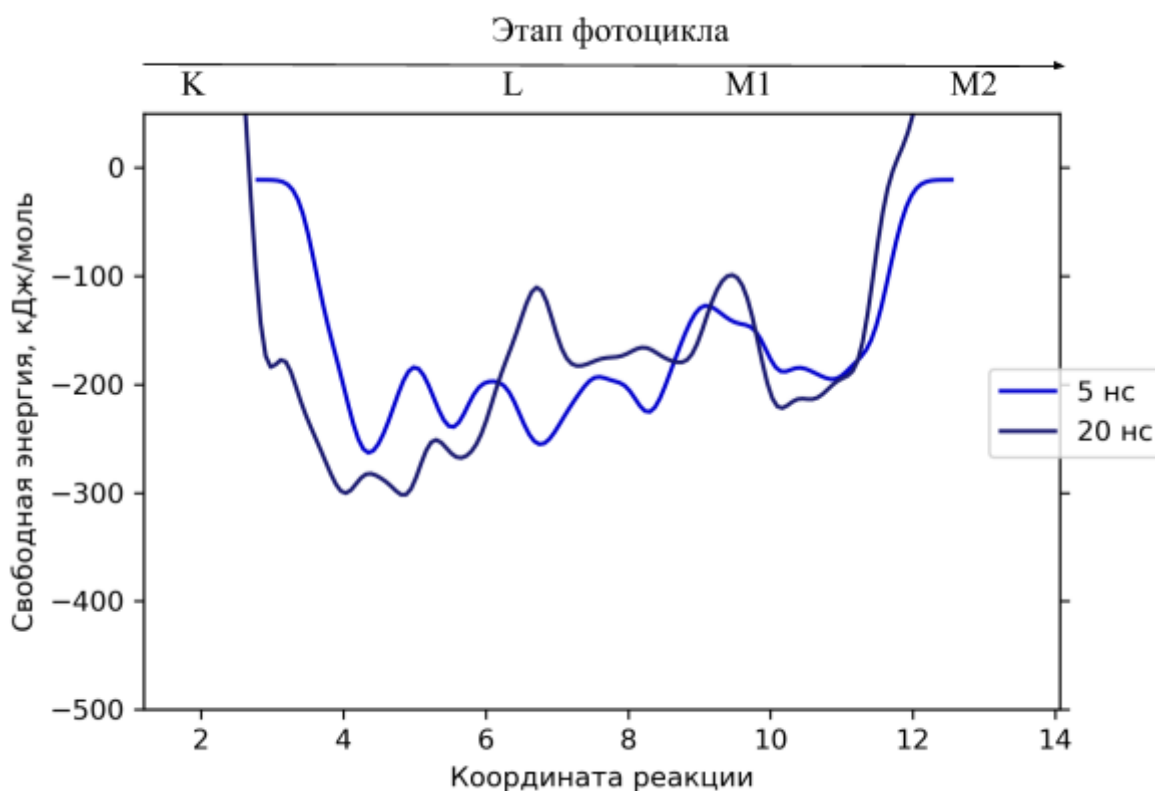


Рис 11. Профили свободной энергии вдоль координаты реакции фотоцикла бактериородопсина, полученные в двух параллельных расчетах.

Таким образом, удалось оценить профиль потенциальной энергии вдоль координаты реакции фотоцикла в интервале координат 3-12.

Наличие глубокого энергетического минимума потенциальной энергии в начале фотоцикла является результатом релаксации конформационных перестроек, вызванных изомеризацией родопсина и, вероятно, является движущей силой процесса на этом этапе и фактором, определяющим однонаправленность переноса протона. Наиболее сложными для конформационных изменений этапами являются переходы 6-7 и 9-10, что соответствует переходам к стадиям L (координата реакции 7) и M1 (координата реакции 10). Переход к стадии M2 (координата реакции 13) исследовать не удалось, что скорее всего обусловлено ограниченным временем моделирования.

1.2. Расчет энергий депротонирования звеньев цепи переноса протона

Второй этап изучения фотоцикла бактериородопсина проводился с использованием метода термодинамического интегрирования. Анализировались энергии депротонирования аминокислотных остатков - звеньев цепи переноса протона от первичного акцептора протона (Asp 85) до группы выхода протона в среду (Glu 204) (Рис. 12).

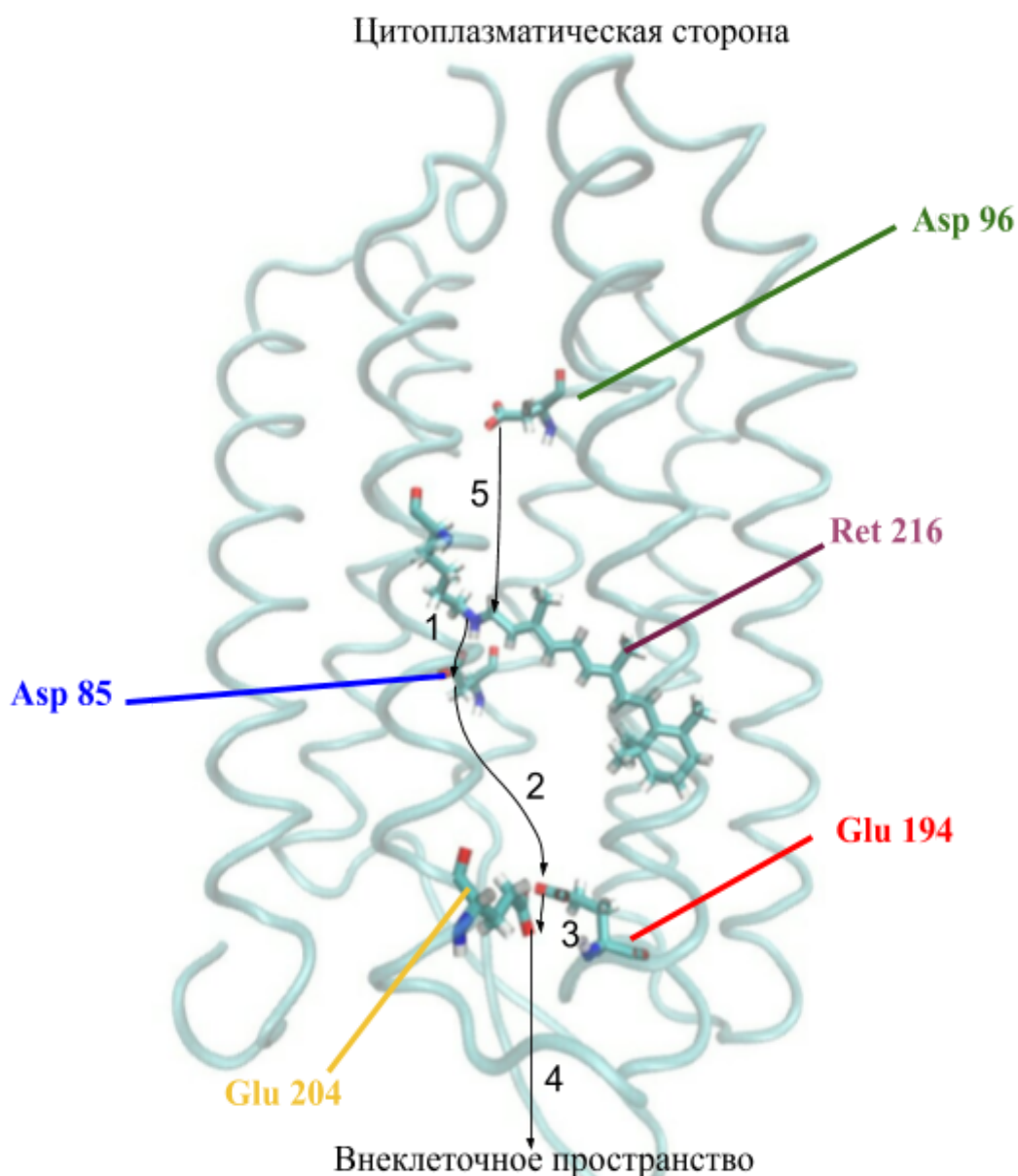


Рисунок 12. Ключевые аминокислотные остатки в цепи переноса протона бактериородопсина и основные этапы переноса протона.

Результатом вычислительного эксперимента стали значения энергий депротонирования этих групп. В предположении, что разница энергий депротонирования двух остатков равна энергии переноса протона с первого остатка на второй, было проведено попарное сравнение изменения энергии депротонирования в ходе фотоцикла для исследования термодинамической составляющей этого процесса. Полученные результаты представлены на рисунках 13-15. Соответствие координаты реакции временам после фотоактивации и стадиям фотоцикла показано на рис. 3.

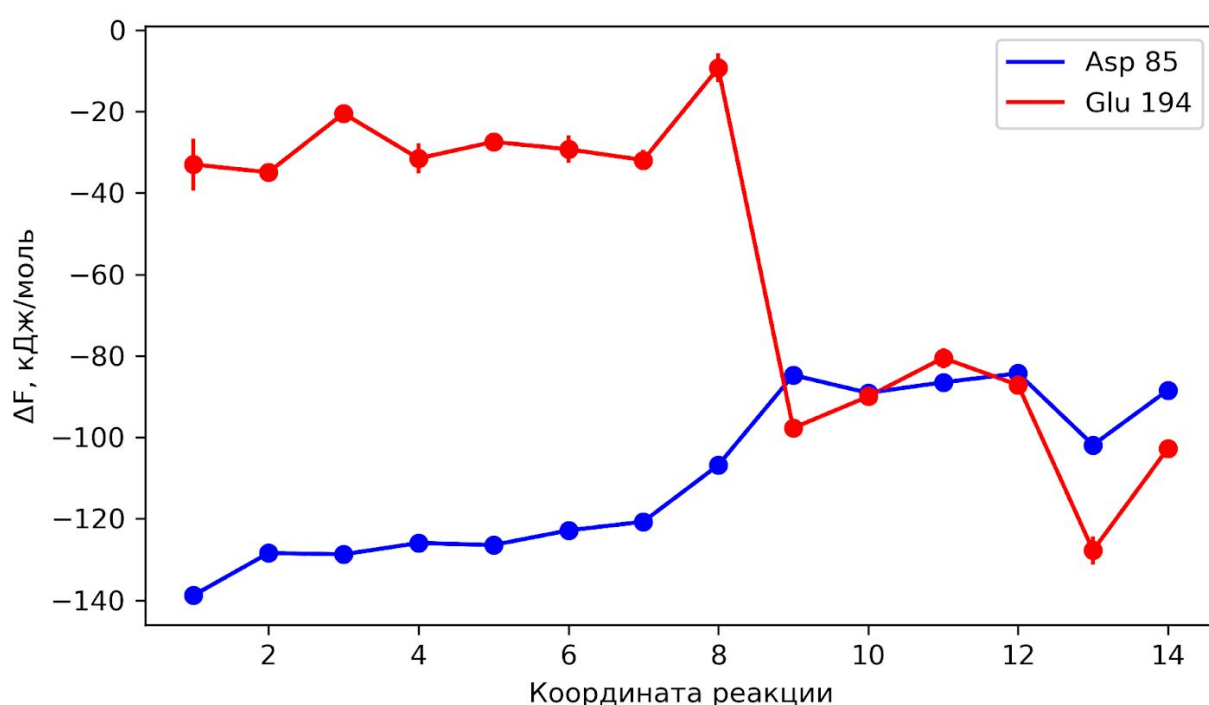


Рис. 13. Изменение энергии депротонирования (ΔF) остатков Asp 85 и Glu 194 в ходе фотоцикла бактериородопсина.

Резкий скачок энергии Glu 194 на 5,25 мкс (координата реакции 8) создает условия для принятия протона от Asp 85 с высокой вероятностью (рис. 13). Эти остатки значительно разнесены в пространстве и не образуют непосредственно водородную связь на протяжении фотоцикла, поэтому этот этап является узким местом переноса протона, которое преодолевается благодаря большой разнице энергий депротонирования (этап 2 на рис. 12).

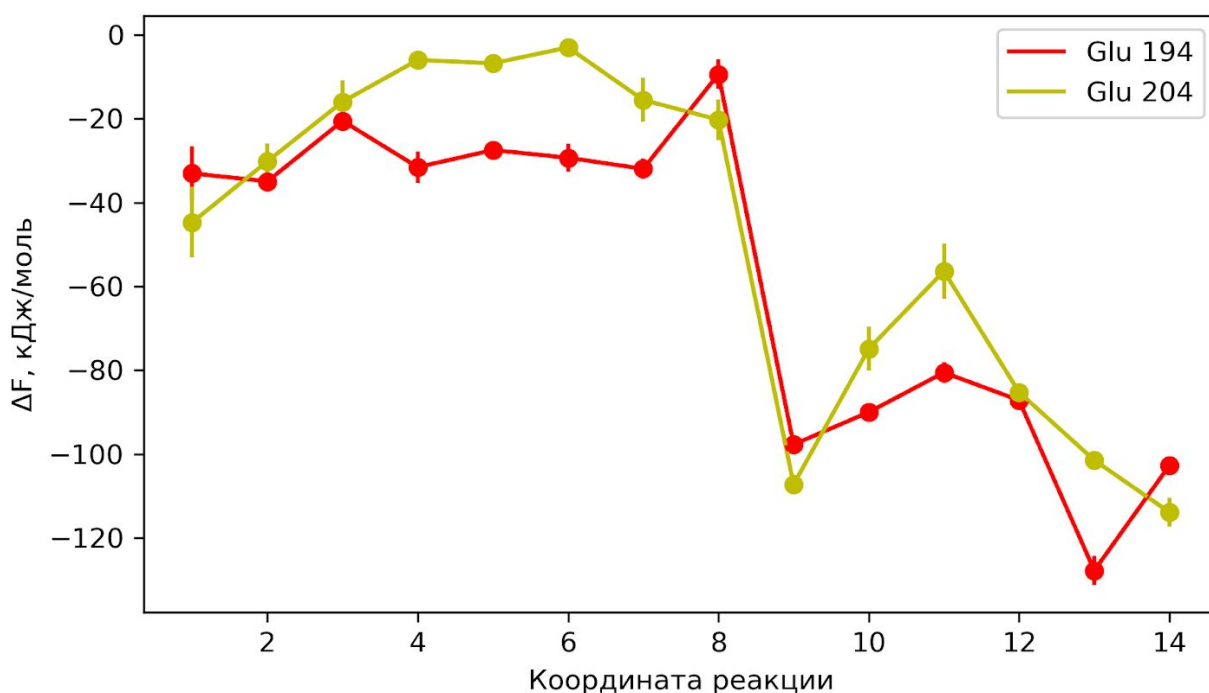


Рис. 14. Изменение энергии депротонирования (ΔF) остатков Glu 194 и Glu 204 в ходе фотоцикла бактериородопсина.

На 95,2 мкс после фотовозбуждения (координата реакции 11) группа, выносящая протон в среду, - Glu 204 имеет повышенную энергию депротонирования (рис. 14), что позволяет протону перейти от остатка 194 на 204 (этап 3 на рис. 12) и выйти из белка (этап 4 на рис. 12).

Также был проведен аналогичный расчет для группы, восстанавливающей протон на ретинале, - Asp 96 (рис. 15). Группа, восстанавливающая протон, повышает свою энергию депротонирования к стадии M2 (координаты реакции 13-14), после которой, согласно теории, происходит переход протона из среды на ретиналь (этап 5 на рис. 12).

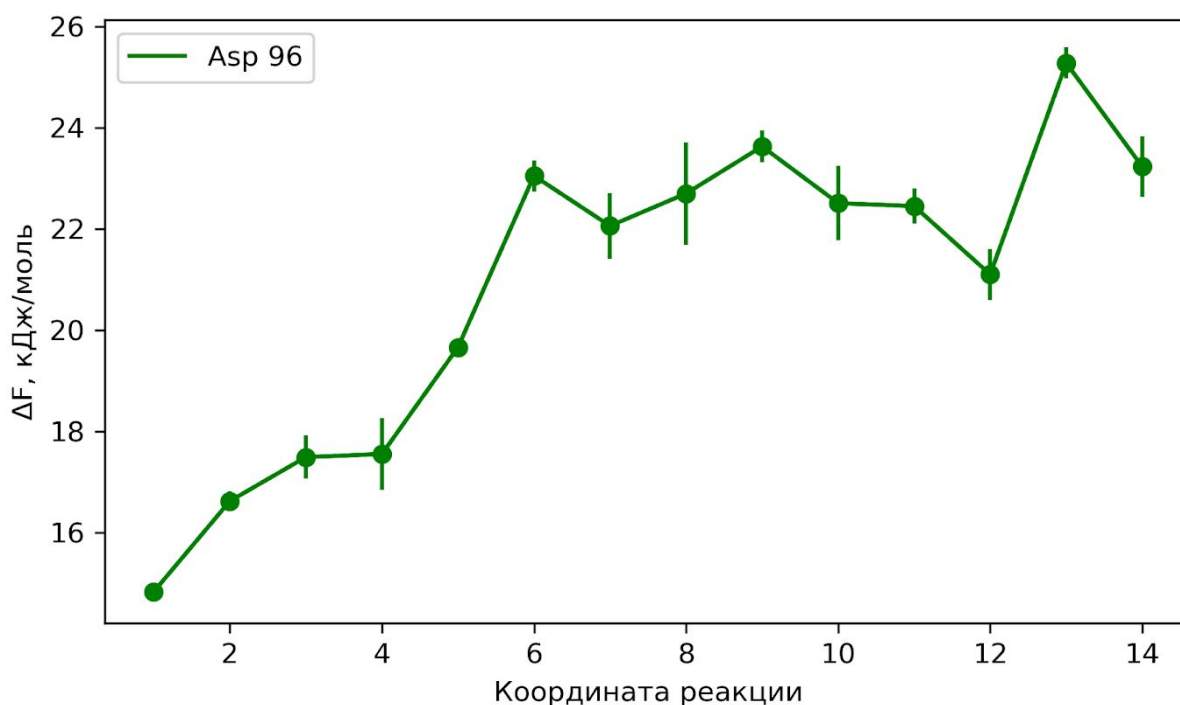


Рис. 15. Изменение энергии депротонирования (ΔF) остатка Asp 96 в ходе фотоцикла бактериородопсина.

Полученные результаты объясняют последовательность и направленность событий в процессе переноса протона и хорошо согласуются с принятой моделью цепи. Таким образом, с использованием метода термодинамического интегрирования была получена информация о термодинамических условиях возможности функционирования цепи переноса протона.

2. Димер гистонов H2A-H2B

2.1. Влияние окружения ДНК на динамику димера

В данной работе рассматривается два аспекта динамики димера гистонов H2A-H2B - влияние окружения ДНК и влияние замен в соответствии с первичной структурой вариантной формы H2A.Z.

При сравнении динамики димера в растворе и димера в окружении ДНК было показано, что димер без ДНК имеет более компактную структуру по сравнению с димером, окруженным ДНК. Об этом свидетельствуют повышенные относительно траектории свободного димера значения радиуса

гирации по всей длине траектории димера с ДНК, а также увеличение расстояния между центрами масс мономеров (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение среднеквадратичного отклонения атомов, радиуса гирации полипептидного кортекса, расстояний между центрами масс и альфа-2 спиралями (по C- α атомам) димера гистонов в системах с ДНК и без ДНК.

Система	Длина траектории, мкс	Параметр	Средне-квадр. отклонения	Радиус инерции сечения	Расстояние между центрами масс	Расстояние между альфа-2 спиралями
Без ДНК (при 300 K)	3,178	Среднее, Å	1,61	16,54	2,0870	0,1454
		Дисперсия, Å	0,03	0,01	0,0011	0,00
Без ДНК (в интервале температур 300-350 K)	0,06 * 48 (2,88)	Среднее, Å	1,59	16,64	2,0619	0,1455
		Дисперсия, Å	0,20	0,01	0,0011	0,00
с ДНК (H2A без замен)	3,086	Среднее, Å	1,59	23,96	2,6715	0,1456
		Дисперсия, Å	0,07	0,03	0,0019	0,00
С ДНК (G46K)	2,90	Среднее, Å	2,22	24,22	2,7042	0,1456
		Дисперсия, Å	0,19	1,42	0,0021	0,00
С ДНК (G46K, P48A)	2,37	Среднее, Å	1,68	26,83	2,6945	0,1456
		Дисперсия, Å	0,06	4,47	0,0021	0,00

При более подробном анализе подвижности атомов полипептидного кортекса вдоль последовательности аминокислотных остатков показано, что наибольшее увеличение подвижности при взаимодействии с ДНК свойственно для α -N, α -1 и α -2 спиралей гистона H2A (рисунок 16).

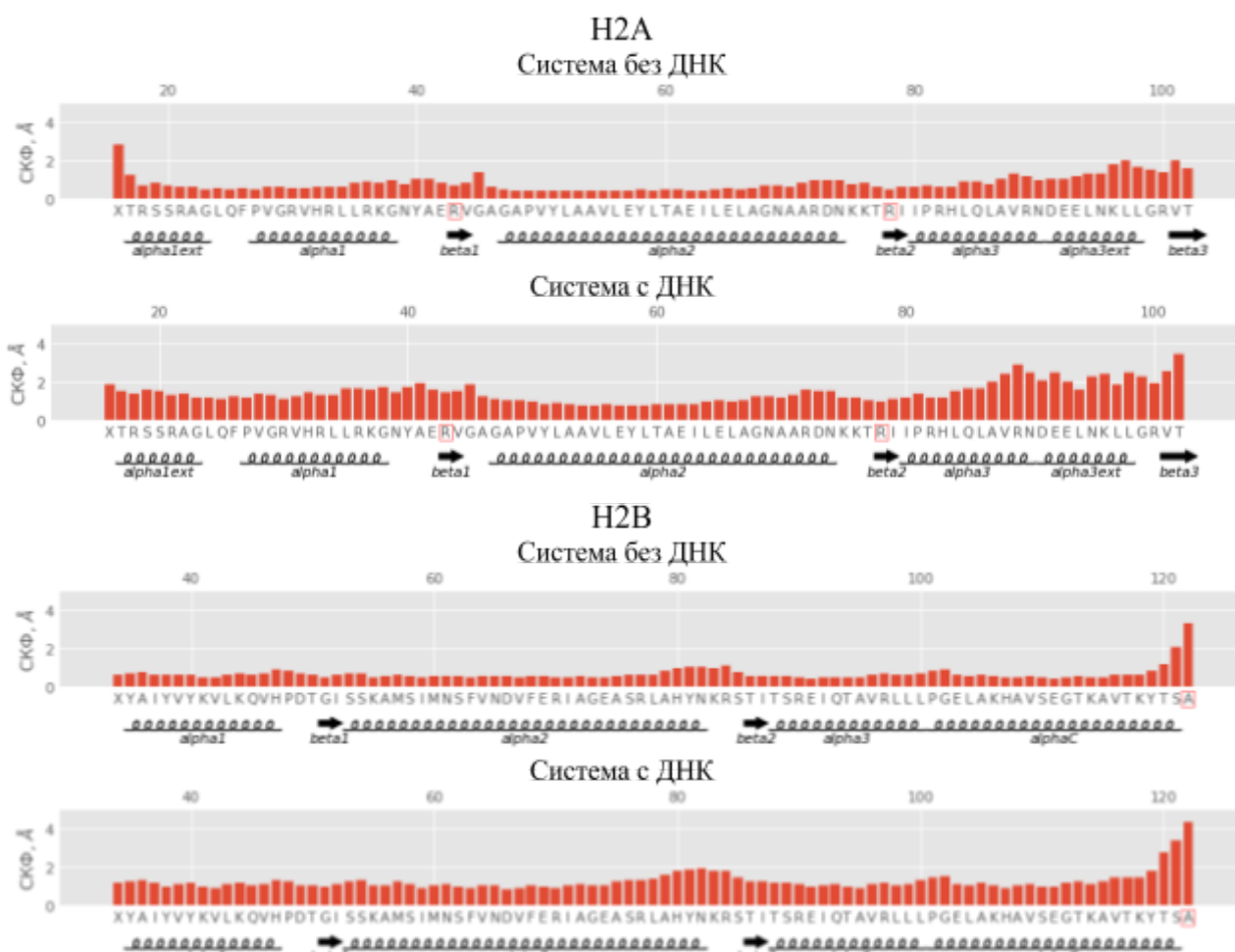


Рис 16. Сравнение среднеквадратичных флуктуаций (СКФ) атомов полипептидного остова вдоль последовательности в системах с ДНК и без ДНК.

Анализ траекторий методом главных компонент матрицы ковариаций атомных координат выявил собственные вектора, характерные для траекторий. Среди первых десяти собственных векторов траектории системы без ДНК подавляющее большинство охватывает только концевые участки полипептидов и крайние спирали, при этом меньшая их часть включала деформации α -2 спирали гистона H2A и только одна мода содержала деформации спирали α -2 гистона H2B - вектор с пятым по величине собственным значением. При анализе первых десяти собственных векторов траектории системы с ДНК было выявлено, что редкие для предыдущей системы деформации спирали α -2 H2B присутствуют уже в трех наиболее амплитудных векторах - 2, 3 и 7. Таким образом, наличие ДНК увеличивает “гибкость” этой малоподвижной спирали. Именно это движение (пятая мода траектории системы без ДНК - с высоким

собственным значением и относительно равномерным распределением подвижности атомов (рис 17) и было выбрано для анализа методом метадинамики. На рисунке 18 показаны цепи гистона H2B, окрашенные по величине среднеквадратичных отклонений C- α атомов, что характеризует подвижность структуры в пределах вектора. α -2 спираль H2B в рассматриваемом векторе №5 имеет относительно высокую подвижность и имеет “центр подвижности” в центре. Подобные движения, согласно экспериментальным работам, характерны для гистона H2B при деформации, вызываемой некаталитическим термическим разворачиванием нуклеосомы и предположительно имеющей место при взаимодействии с ремоделером, и играют важную роль при движении ДНК вдоль нуклеосомы.

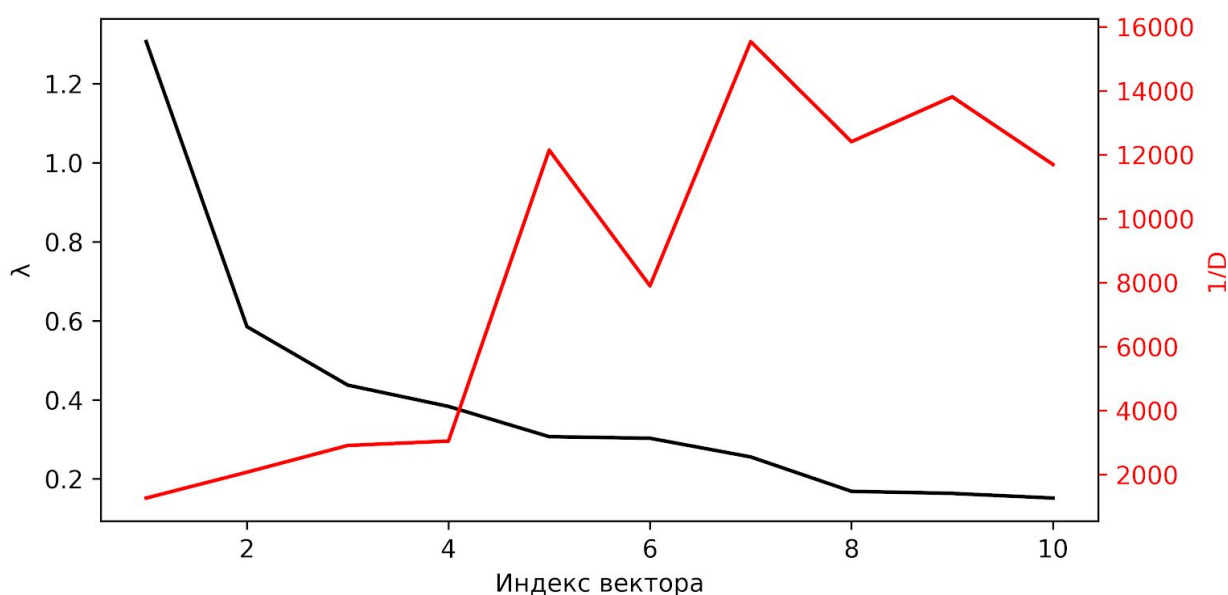


Рис. 17. Собственные значения (λ) первых десяти собственных векторов, выделенных методом анализа главных компонент из траектории свободного димера H2A-H2B и обратная дисперсия ($1/D$) среднеквадратичных отклонений атомов полипептидного остова для этих векторов.

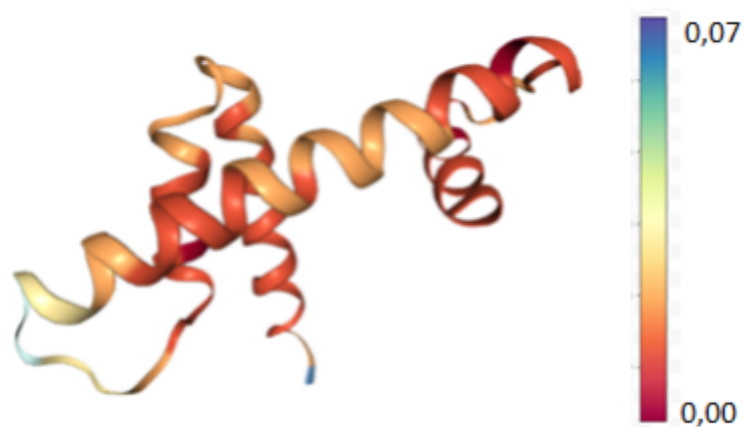


Рис 18. Структура гистона H2A, окрашенного по величине среднеквадратичных отклонений C- α атомов в моде движения №5 системы димера без ДНК.

Методом метадинамики были построены профили свободной энергии движения систем с ДНК и без ДНК вдоль координаты реакции, соответствующей выбранной моде (Рис 19).

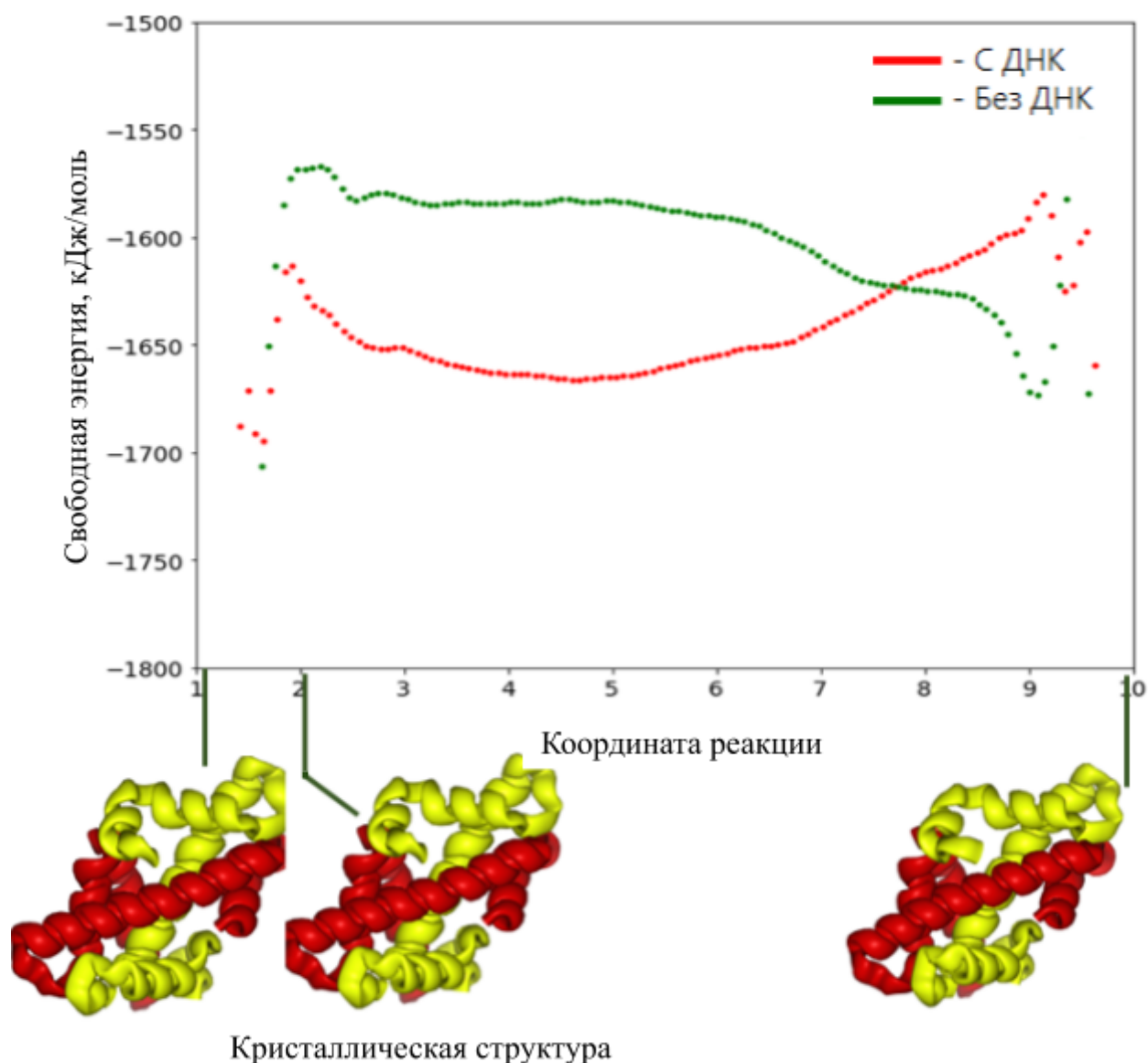


Рис. 19. Профиль свободной энергии конформационной подвижности димера без ДНК и в окружении ДНК вдоль общей координаты реакции.

Профили свободной энергии показывают, что димер с ДНК может свободно перемещаться вдоль координаты реакции между 2 и 7 точками. При этом состояния с более высокой энергией в системе с ДНК совпадают с положением минимума энергии для системы без ДНК. Состояния 7-9 в системе без ДНК ограничены от остальных состояний, в том числе конформации кристаллической структуры, энергетическим барьером высотой порядка 15 кТ.. Таким образом, ДНК повышает пластичность элементов гистонового фолда и стабилизирует конформации, характерные для кристаллических структур и отличные от наиболее энергетически выгодных состояний димера в воде.

2.2. Влияние замен в последовательности H2A

Далее мы рассматривали влияние на подвижность димера мутаций, вносимых в H2A гистон в соответствии с различиями в функционально важном участке M4 вариантного гистона H2A.Z. Моделировали две системы: с одной заменой - GLY в положении 47 на LYS - и с двумя заменами - GLY в положении 47 на LYS и PRO в положении 49 на ALA. В ходе моделирования этих систем было воспроизведено движение отворачивания ДНК. При этом, замена в положении 47 делала этот движению возможным, но непродолжительным, в то время как развернутое состояние для системы с двумя заменами становилось более стабильным (Рис 20, 21).

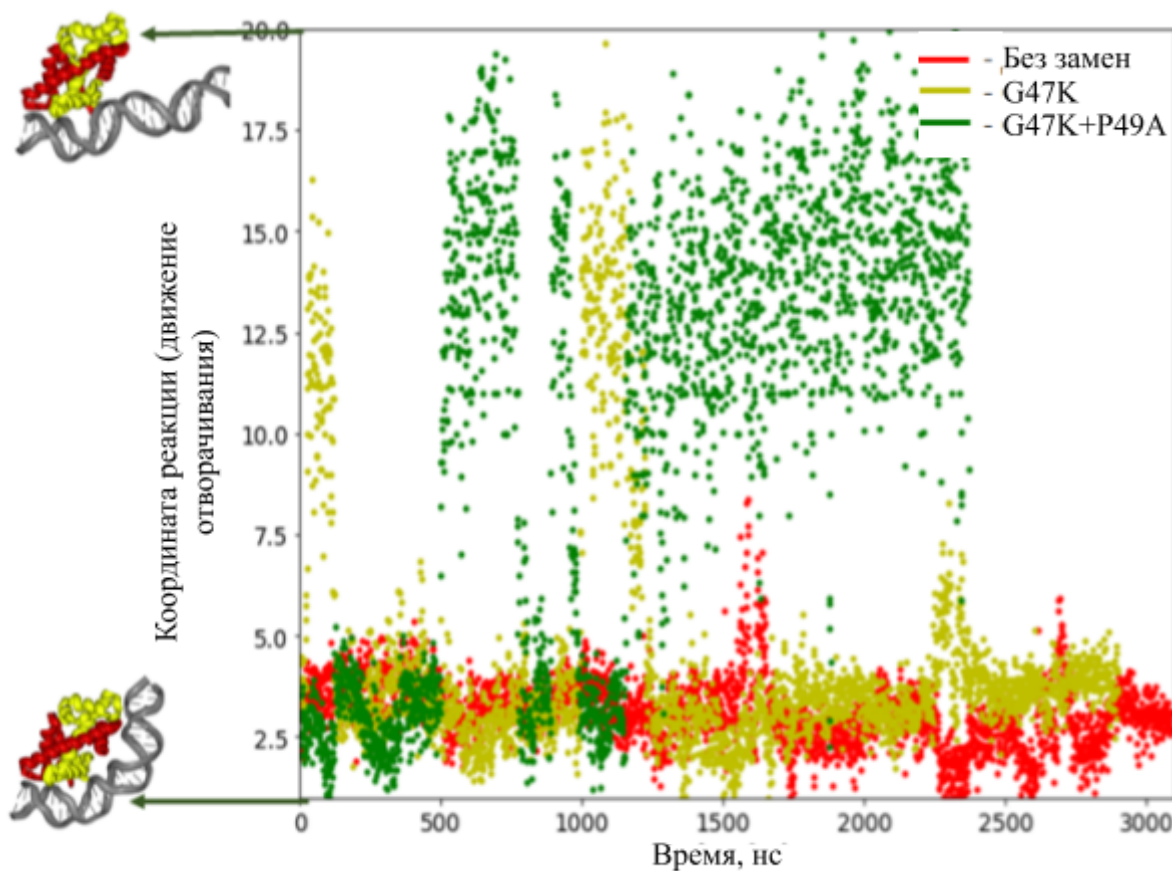


Рис 20. Проекция траекторий динамики систем димера и ДНК с заменами в гистоне H2A на координту реакции, соответствующую движению отворачивания ДНК.

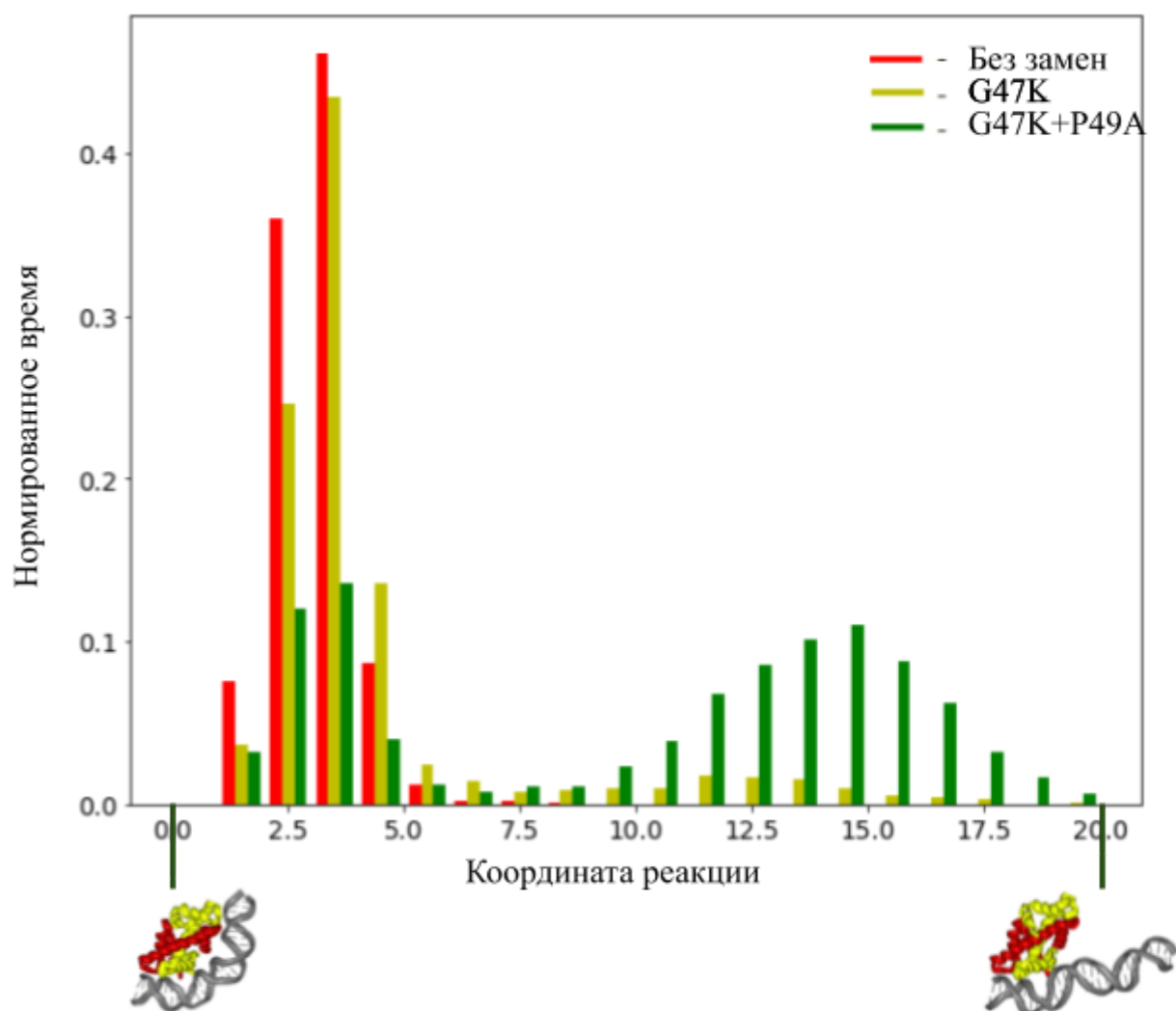


Рис. 21. Нормированное на длину траектории время нахождения системы в состоянии, соответствующем координате реакции (движение отворачивая ДНК) систем димера и ДНК с заменами в гистоне H2A.

Таким образом, замены в каноническом гистоне в соответствии с вариантной формой дестабилизируют один из сайтов взаимодействия с ДНК. Исследование энергетических эффектов этого движения является предметом дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. При свободной динамике мономера бактериородопсина в вакууме наблюдались конформационные переходы, соответствующие второй половине К-стадии фотоцикла;
2. Метод метадинамики дает хорошую сходимость профилей свободной энергии при моделировании конформационных изменений бактериородопсина в ходе фотоцикла при разных длинах траекторий (5 нс и 20 нс); рассчитанные профили свободной энергии имеют высокие энергетические барьеры при переходах к стадиям L и M1;
3. Конформация бактериородопсина значительно влияет на свободную энергию депротонирования ключевых аминокислотных в цепи транспорта протона; сравнение энергий для взаимодействующих остатков является термодинамическим обоснованием существующей модели пути переноса протона;
4. При взаимодействии димера гистонов H2A-H2B с ДНК увеличивается гибкость центральных спиралей гистонового фолда, на временах моделирования порядка 3 мкс;
5. В системе без ДНК конформация димера H2A-H2B, соответствующая минимуму свободной энергии, отличается от кристаллической и обладает изгибом центральных спиралей. Вдоль координаты реакции, соответствующей моде деформации спиралей, данное состояние отделено энергетическим барьером от остальной части конформационного пространства.
6. При внесении замены G47K в гистон H2A происходит большое изменение подвижности аминокислот в составе гистонов и нуклеотидов в составе ДНК, при дополнительном внесении мутации R49A эти изменения кратно увеличиваются;

7. При внесении замен в структуру гистона H2A вероятно происходит дестабилизация центра взаимодействия ДНК с гистонами, что может приводить к появлению движения отворачивания ДНК;

8. При двух заменах в структуре гистона H2A отвернутое состояние существует дольше, чем при одной замене.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе на двух биологических макромолекулярных объектах было показана эффективность использования усиленных модификаций метода молекулярной динамики. С использованием методов метадинамики и термодинамического интегрирования был исследован процесс переноса протона в ходе фотоцикла бактериородопсина с термодинамической точки зрения и приведено обоснование однонаправленности процесса переноса протона от первичного акцептора до группы, освобождающей протон на внеклеточной стороне. Также методом метадинамики были исследованы особенности динамики димера гистонов H2A-H2B в растворе по сравнению с динамикой димера, связанного с ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akey C.W., Luger K. Histone chaperones and nucleosome assembly // *Curr Opin Struct Biol.* 2003. 13(1):6-14.
2. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E.M., Mittal J., Feig M., MacKerell Jr. A.D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone phi, psi and side-chain chi1 and chi2 dihedral angles // *J. of Chemical Theory and Computation.* 2012. 8(9): 3257–3273.
3. Bilokapic S., Strauss M., Halic M. Structural Rearrangements of the Histone Octamer Translocate DNA // *Nature Communications.* 2018. 9.
4. Christ C.D., Mark A.E., van Gunsteren W.F, Basic ingredients of free energy calculations: A review // *J. Comput. Chem.*, 2010. 31(8).
5. Eirin-Lopez J.M., Gonzalez-Romero R., Dryhurst D., Mendez J., Ausio J. Long-Term Evolution of Histone Families: Old Notions and New Insights into Their Mechanisms of Diversification Across Eukaryotes // *Evolutionary Biology: Concept, Modeling, and Application.* 2009. 139-162.
6. Huang J., Zhu Y., Sun B., Yao Y., Liu J. Determination of the protonation state of the Asp dyad: conventional molecular dynamics versus thermodynamic integration // *J Mol Model.* 2016. 22(3):58.
7. Hayashi S., Tajkhorshid E., Schulten K. Structural Changes during the Formation of Early Intermediates in the Bacteriorhodopsin Photocycle // *Biophys J.* 2002. 83(3): 1281–1297.
8. Ivani I., Dans P.D., Noy A., Pérez A., Faustino I., Hospital A., Walther J., Andrio P., Goñi R., Balaceanu A., Portella G., Battistini F., Gelpí J.L., González C., Vendruscolo M., Laughton C.A., Harris S.A., Case D.A., Orozco M. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations // *Nat. Methods.* 2016. 13, 55–58.
9. Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM // *J. Comput. Chem.* 2008. 29:1859-1865.

10. Kleinschmidt J.A., Seiter A., Zentgraf H. Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes // *EMBO J.* 1990. 9(4):1309-18.
11. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M.. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat Struct Mol Biol.* 2009. 16:1272–1278.
12. Laio A., Parrinello M. Escaping free-energy minima // *PNAS.* 2002. 99 (20).
13. Lee J., Lee T.H.. Single-Molecule Investigations on Histone H2A-H2B Dynamics in the Nucleosome // *Biochemistry.* 2017. 56(7):977-985.
14. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* 1997. 389(6648):251-60.
15. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. 11, 3696–3713.
16. Malmerberg E.1., Omran Z., Hub J.S., Li X., Katona G., Westenhoff S., Johansson L.C., Andersson M., Cammarata M., Wulff M., van der Spoel D., Davidsson J., Specht A., Neutze R. Time-Resolved WAXS Reveals Accelerated Conformational Changes in Iodoretinal-Substituted Proteorhodopsin // *Biophys. J.* 2011. 101(6):1345-53.
17. Mannige R.V. Dynamic New World: Refining Our View of Protein Structure, Function and Evolution // *Proteomes.* 2014. 2(1):128–153.
18. Midic U, Oldfield C.J, Dunker A.K, Obradovic Z, Uversky V.N. Protein disorder in the human diseasome: unfoldomics of human genetic diseases // *BMC Genomics.* 2009. 10 Suppl 1(Suppl 1):S12..

19. Nango E., Royant A., Kubo M., Nakane T., Wickstrand C., Kimura T., Tanaka T., Tono K., Song C., Tanaka R., Arima T., Yamashita A., Kobayashi J., Hosaka T., Mizohata E., Nogly P., Sugahara M., Nam D., Nomura T., Shimamura T., Im D., Fujiwara T., Yamanaka Y., Jeon, B., Nishizawa T., Oda K., Fukuda M., Andersson R., Båth P., Dods R., Davidsson J., Matsuoka S., Kawatake S., Murata M., Nureki O., Owada S., Kameshima T., Hatsui T., Joti Y., Schertler G., Yabashi M., Bondar A., Standfuss J., Neutze R., Iwata S. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin // *Science* 354. 2016. Vol. 354, Issue 6319, pp. 1552-1557.
20. Neutze R.1., Pebay-Peyroula E., Edman K., Royant A., Navarro J., Landau E.M. Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002. 1565(2):144-67.
21. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // *Nat New Biol* 233. 1971. 149-152.
22. Pande K., Hutchison C.D., Groenhof G., Aquila A., Robinson J.S., Tenboer J., Basu S., Boutet S., DePonte D.P., Liang M., White T.A., Zatsepin N.A., Yefanov O., Morozov D., Oberthuer D., Gati C., Subramanian G., James D., Zhao Y., Koralek J., Brayshaw J., Kupitz C., Conrad C., Roy-Chowdhury S., Coe J.D., Metz M., Xavier P.L., Grant T.D., Koglin J.E., Ketawala G., Fromme R., Šrajer V., Henning R., Spence J.C., Ourmazd A., Schwander P., Weierstall U., Frank M., Fromme P., Barty A., Chapman H.N., Moffat K., van Thor J.J., Schmidt M. Femtosecond structural dynamics drives the trans/cis isomerization in photoactive yellow protein // *Science* 352, 2016. 352(6286):725-9.
23. Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., Lindahl, E. GROMACS 4.5: a highthroughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*, 2013. 29(7):845-54.

24. Rahman A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon // Phys. Rev. 1964. 136, A405.
25. Ranjan A., Wang F., Mizuguchi G., Wei D., Huang Y., Wu C. H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast // Elife.. 2015. 4:e06845.
26. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions // J Mol Biol. 2016. 428(1):221-237.
27. Tenboer J., Basu S., Zatsepin N., Pande K., Milathianaki D., Frank M., Hunter M., Boutet S., Williams G., Koglin J E., Oberthuer D., Heymann M., Kupitz C., Conrad C., Coe J., Roy-Chowdhury S., Weierstall U., James D., Wang D., Grant T., Barty A., Yefanov O., Scales J., Gati C., Seuring C., Srajer V., Henning R., Schwander P., Fromme R., Ourmazd A., Moffat K., Van Thor J.J., Spence J.C., Fromme P., Chapman H., Schmidt M. Time-Resolved Serial Crystallography Captures High Resolution Intermediates of Photoactive Yellow Protein // Science 346, 2014. 346(6214):1242-6.
28. Tribello G.A., Bonomi M., Branduardi D., Camilloni C., Bussi G., PLUMED2: New feathers for an old bird // Comp. Phys. Comm. 2014. 185, 604.
29. Yoo J, Aksimentiev A. New tricks for old dogs: improving the accuracy of biomolecular force fields by pair-specific corrections to non-bonded interactions // Physical Chemistry Chemical Physics. 2018, 13:8432-8449.