

Министерство образования и науки РФ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)»
Факультет общей и прикладной физики
Образовательная программа "Вычислительная физика конденсированного состояния
и живых систем"

**Влияние конформации остатка пролина на
структурно-динамические характеристики
трансмембранного домена рецептора инсулина**

Диплом на соискание степени бакалавра

Выполнила:

студентка 626 группы
Щекотихина Дарья Денисовна

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук
Ефремов Роман Гербертович

Москва 2020

Аннотация

Данная работа посвящена исследованию роли конформации пептидной связи пролина в трансмембранном домене рецептора инсулина в контексте механизма активации рецептора.

Содержание

1	Введение	4
2	Обзор литературы	5
2.1	Рецептор инсулина	5
2.1.1	Модели активации IR	7
2.2	Трансмембранный домен IR	7
2.2.1	Исследование трансмембранного домена	7
2.2.2	Экспериментальные данные	8
2.2.3	Данные моделирования	9
2.3	Пролин в трансмембранных α -спиралях	9
2.3.1	Влияние пролина на свойства спирали	9
3	Материалы и методы	11
3.1	Компьютерное моделирование биологических молекул	11
3.1.1	Молекулярная динамика	11
3.1.2	Классический метод расчета MD для трансмембранного белка	12
3.2	Разработанные алгоритмы обработки траектории МД	13
3.2.1	Получение информации о геометрии трансмембранной α -спирали	13
3.2.2	Поиск пересечений двух α -спиралей	13
4	Результаты и обсуждение	15
4.1	Мономеры с цис- связью	15
4.1.1	Исследование геометрии пептида	16
4.2	Предсказание структуры димеров с цис- связью	19
5	Выводы	20
	Список литературы	21

1 Введение

TO-DO

- про компьютерные методы исследования - про сухую биологию
- про рецептор инсулина, какой он важный - про медицину, как важно этот рецептор изучать - почему нам нужны тут комп. методы
- про эту работу в контексте общего исследования, к чему это приведет

2 Обзор литературы

2.1 Рецептор инсулина

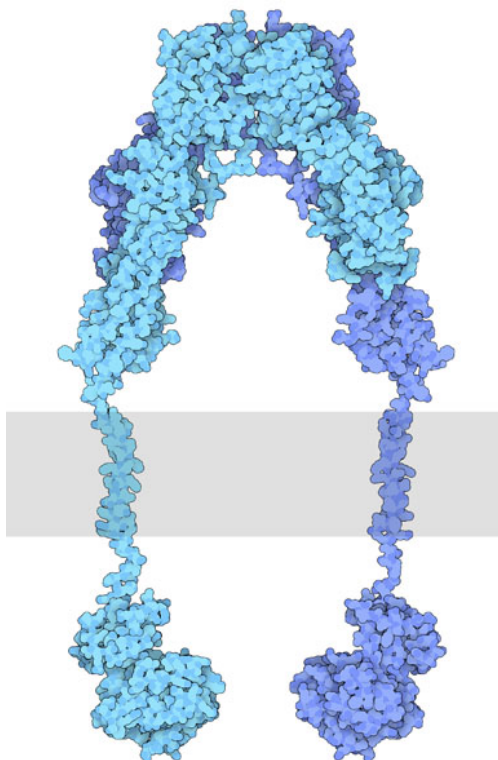


Рис. 1: Схематичное изображение пространственной структуры IR. Внеклеточный домен изображен сверху; внутриклеточный (киназный домен) изображен снизу; мембрана схематично показана серым цветом. <https://pdb101.rcsb.org/motm/182>

Инсулиновый рецептор (IR) - это рецептор, активируемый инсулином и инсулиноподобными факторами роста I и II (IGF-I и IGF-II). Он принадлежит обширному классу рецепторных тирозинкиназ и представляет собой интегральный мембранный белок. Этот белок является димером, состоящим из двух одинаковых молекул, пронизывающих мембрану.

В рецепторе инсулина выделяют внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный (киназный) домены (см рис. 1). Внеклеточный домен связывается с лигандом, трансмембранный домен передает сигнал от внеклеточного домена к киназному, киназный домен осуществляет реакцию фосфорилирования остатков тирозина в сигнальном белке, что приводит к каскаду реакций внутри клетки.

Одна из ролей IR в организме заключается в регуляции гомеостаза глюкозы. Этот процесс можно кратко описать следующим образом:

- Пища поступает в организм, вследствие расщепления углеводов происходит повышение уровня глюкозы в крови.

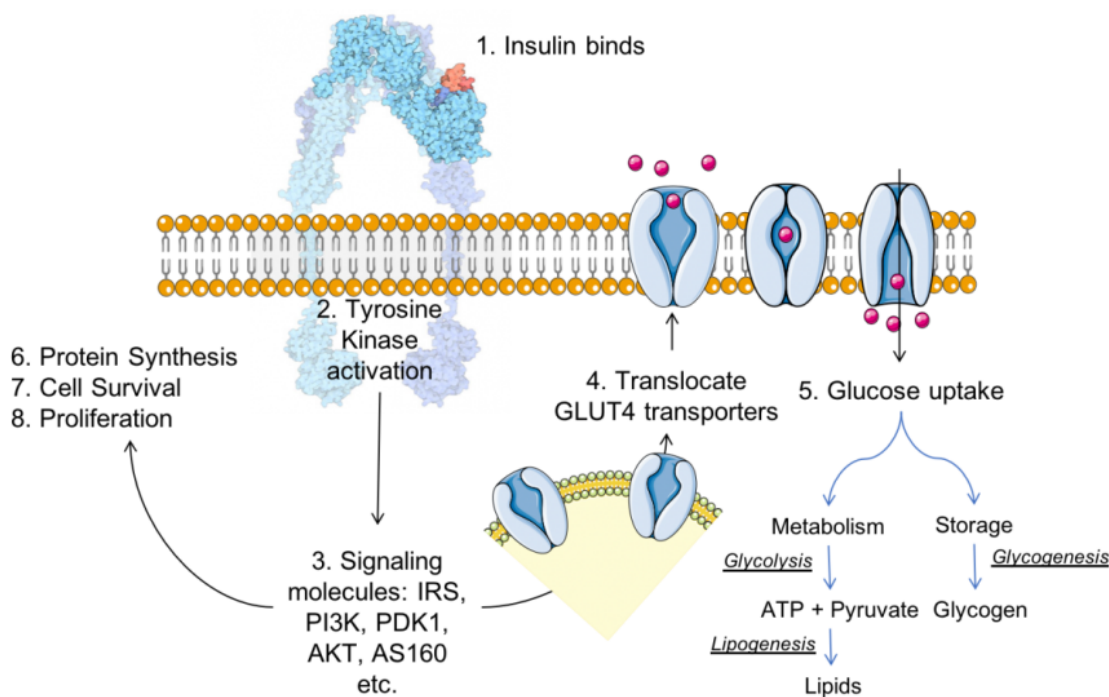


Рис. 2: Схема каскада реакций, запускаемых рецептором инсулина (синий) в результате связывания с инсулином (красный). <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/insulin/insulin-receptor>

- В ответ на повышение уровня глюкозы вырабатывается гормон инсулин.
- Инсулин связывается с внеклеточным доменом рецептора
- Происходит передача сигнала внутрь клетки - к внутриклеточному домену.
- Киназный домен запускает каскад реакций, приводящий к увеличению запаса глюкозы клеткой. Вследствие этого уровень глюкозы в крови понижается.

Это справедливо для одной из изоформ IR. В организме человека рецептор инсулина существует в двух изоформах: IR-A и IR-B. Они различаются по аффинности к IGF-I и IGF-II. Так, установлено, что IR-A отвечает за внутриутробный рост и развитие, а IR-B отвечает за метаболическую регуляцию [1]. В контексте данной работы нас интересует активация IR инсулином, поэтому мы опускаем рассмотрение IR-A.

Поскольку рецептор отвечает за столь важные процессы в организме человека, нарушения в его работе приводят к различным клиническим проявлениям, в том числе к диабету. Поэтому то, как происходит процесс активации IR является актуальным вопросом современной биохимии. Знание этого процесса на молекулярном уровне может послужить базой для создания лекарств на основе структуры белка (Structure-based drug design (TO-DO add reference to some article??)).

2.1.1 Модели активации IR

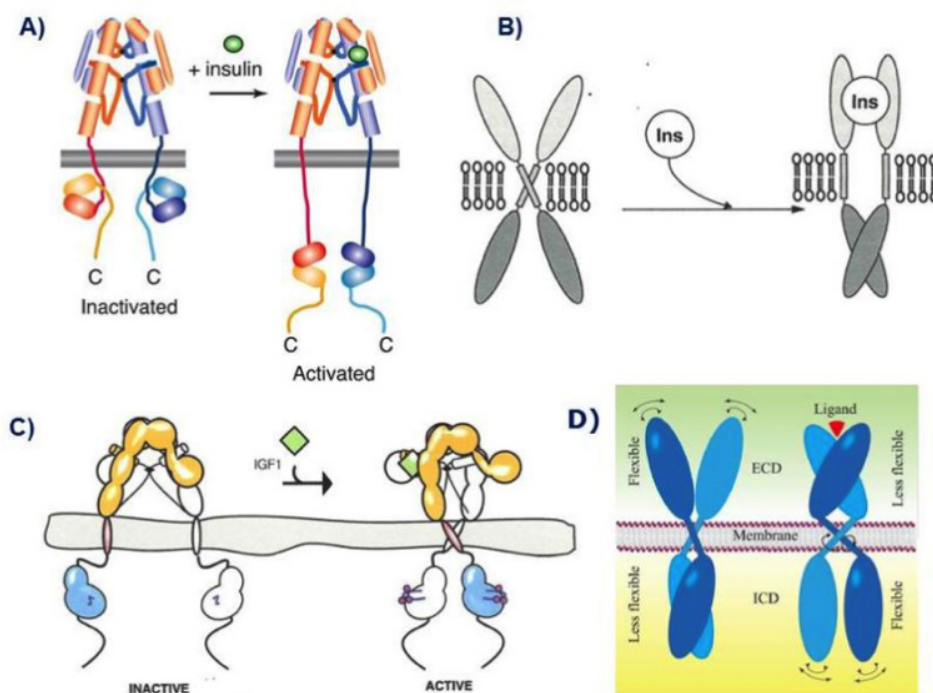


Рис. 3: **TO-DO change picture! Leave only one model.** Models of the mechanism of ligand activation of the insulin receptor tyrosine kinase. A: The "yo-yo" model. B: The TM domain ligand-induced separation model. C: The TM domain ligand-induced approximation model. D: The "rotation model". [3]

На данный момент общепринятой моделью активации IR, подтверждающейся экспериментальными данными, является предложенная Lee [4] (см рис. 3C). В данной модели после активации инсулином две части внеклеточного домена "сходятся тем самым сближая α -спирали ТМ домена. ТМ домен димеризуется и далее, из-за такого изменения конформации ТМ участка, киназный домен переходит в активированное состояние.

2.2 Трансмембранный домен IR

2.2.1 Исследование трансмембранного домена

В то время как для внеклеточного и киназного доменов возможно подробное исследование структуры экспериментальными методами, в том числе с помощью крио-электронной микроскопии [2], трансмембранный домен представляет особую сложность, т.к. он может существовать только в липидном окружении. Таким образом, в изучении ТМ домена особый интерес представляют методы компьютерного моделирования. Они позволяют на базе неполных структурных данных проверять теоретические предполо-

жения на основе оценки стабильности структур, а так же получать представление о динамике полученных структур в модельном окружении (см. раздел 3.1).

2.2.2 Экспериментальные данные

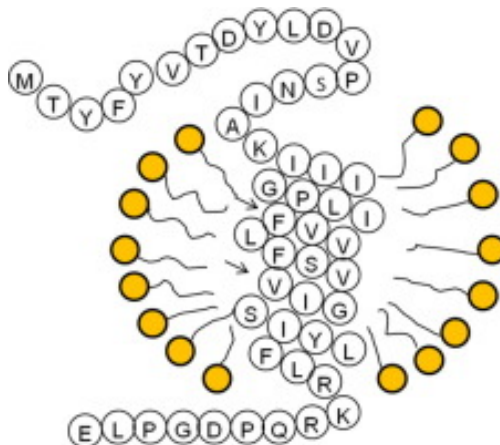


Рис. 4: Схематическое изображение ТМ домена IR в мицелле детергента (желтым указаны головки липидов, буквы обозначают аминокислотный остаток.) [5].

С помощью метода двумерной ЯМР спектроскопии была расшифрована структура ТМ домена IR в мицеллах [5]. Структура для последовательности остатков 940–988 была получена в мицеллах ДФХ (додecilфосфохолина). Несмотря на то, что в работе удалось получить только мономеры белка, авторы указывают на возможность существования структур в форме димеров в мицеллах. У мономеров внемембранные участки являются подвижными и располагаются в водном окружении. Мембранный участок имеет структуру α -спирали. При этом был отмечен кинк в этой спирали, созданный связью Gly960-Pro961, потенциально важный для функции домена.

В лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН был проведен аналогичный эксперимент с целью получения димерных форм в мицеллах ДФХ. Был выделен участок 944-973 и созданы образцы мономерных и димерных форм в мицеллах. Спектры показали необычные результаты в отношении кинка Gly-Pro. Спектр мономера двоятся в N-концевых остатках, начиная с Pro961. Это говорит об изменении локального окружения этих остатков, что позволяет судить о наличии двух форм мономера, различающихся по форме с N-конца.

В спектре димеров начиная с пролина сигнал троится. То есть, аналогичным образом, существует три конформации димера ТМ домена IR.

ТО-ДО добавить график вторичной структуры и спектр (если это возможно)

Итак, целью данной работы является предсказание структур, которые были бы согласованны с результатом вышеописанного эксперимента, путем компьютерного моделирования.

2.2.3 Данные моделирования

Ранее в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН были предсказаны наиболее вероятные структуры димеров для ТМ доменов IR [6]. Для получения димеров на основе последовательности мономера был использован программный пакет PREDDIMER [7].

Структуры димеров, полученные с помощью PREDDIMER, затем были помещены в мембранное окружение из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (POPC), проведена минимизация энергии, релаксация и расчет траектории молекулярной динамики (3.1.2). Затем методом потенциала средней силы (ТО-ДО добавить инфу про метод потенциала средней силы) были предложены 3 наиболее стабильные димерные структуры. Все они имеют характерную водородную связь Ser969-Ser969.

ТО-ДО добавить картинку этих структур из диплома Мифтаха (если это возможно) или сделать свои картинки

2.3 Пролин в трансмембранных α -спиралях

2.3.1 Влияние пролина на свойства спирали

Принято считать, что остаток пролина в трансмембранных α -спиралях играет функциональную роль. На это указывает сравнительно высокая встречаемость пролина в трансмембранных спиралях по сравнению со спиралями водорастворимых белков [8], [9]. Кроме того, было показано, что внесение мутаций в Pro в ТМ домене транспортных белков приводит к их деактивации [10]. Все это дает основание полагать, что пролин может быть функционально важен трансмембранных доменах большого количества белков.

Как компьютерное моделирование, так и экспериментальные данные показывают, что пролин вносит конформационные изменения в геометрию ТМ α -спирали [12], [11]. Цис- конформация пептидной связи между пролином и предшествующим ему остатком создает излом в α -спирали, что может изменять ее положение в мембране и, как следствие, меняет функциональные свойства пептида.

Также было замечено, что пролин в трансмембранных спиралях имеет достаточно консервативное положение: он чаще всего оказывается "вытащен" в область полярных головок молекул липидов, составляющих мембрану [13]. Такое специфическое положе-

ние в свою очередь имеет связь с процессом димеризации ТМ спиралей. Так, с помощью поиска мотивов, образующих водородные связи в димерах, было исследовано, что пролин, находящийся в гидрофильной области ТМД (трансмембранного домена) индуцирует димеризацию мономеров в мембране [14]. Этот факт вызывает особый интерес в контексте изучения механизма работы ТМД в IR.

3 Материалы и методы

3.1 Компьютерное моделирование биологических молекул

Атомистическое моделирование (АМ) - это численный метод исследования вещества. АМ рассматривает вещество как совокупность атомов, взаимодействие между которыми определяет физические свойства вещества.

3.1.1 Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (МД) - один из методов атомистического моделирования. Он заключается в решении уравнений движения системы N взаимодействующих атомов:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1..N; \quad F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (1)$$

Потенциал $V(r_1, \dots, r_N)$ определяется параметрами силового поля¹.

Полученная система уравнений решается через некоторый малый промежуток времени Δt на некотором отрезке $[t_0, t_1]$ при заданных начальных условиях $(r_1(t_0), \dots, r_N(t_0))$. В результате, совокупность точек (r_1, \dots, r_N) в каждый момент времени $t_0, t_0 + \Delta t, t_0 + 2\Delta t, \dots, t_1$ составляет траекторию МД. Эта траектория определяет эволюцию системы в течение промежутка времени $[t_0, t_1]$.

При расчете макросистем (10^5 атомов) аналитическое решение уравнений (1) на большом промежутке времени не представляется возможным для современной техники. Поэтому в МД уравнения решаются численно с использованием выбранной разностной схемы.

Критерием расчета МД является стабильность системы предмет + окружение. Систем должна прийти к уравновешенному состоянию, в котором флуктуации остаются постоянными на некотором достаточно большом временном отрезке $[t_S, t_2] \gg \Delta t$. В качестве оценочной функции используется среднеквадратичное отклонение положения атомов от изначального или равновесного положения, усредненное либо по атомам (RMSD), либо по временному промежутку (RMSF). Усреднение по атомам позволяет оценить стабильность структуры в целом, а усреднение по времени позволяет отсле-

¹Какое-либо взаимодействие атомов можно описать в рамках соответствующей модели (к примеру, валентную связь между атомами можно описать как идеально жесткую связь или в модели гармонического осциллятора). Модель дает аналитическое выражение для потенциала взаимодействия. Силовое поле - это совокупность потенциалов разных взаимодействий с коэффициентами, подобранными эмпирически, чтобы модель соответствовала предмету в реальной жизни.

живать участки повышенной подвижности структуры, которые часто играют большое значение в функции молекулы.

Описанный выше функционал реализуется открытыми программными пакетами. В настоящей работе используется пакет Gromacs.

3.1.2 Классический метод расчета MD для трансмембранного белка

Основные стадии вычислительного эксперимента для мембранного белка следующие:

- Соотнесение параметров силового поля для белков и липидов.
- Сборка модельной системы: погружение белка в мембранное окружение.
- Минимизация энергии составленной системы.
- Релаксация системы: приведение системы к нужным значениям температуры и давления.
- Расчет траектории MD.
- Оценка стабильности.
- Обработка полученных результатов.

Изначально, белок и мембрана² представлены в виде отдельных файлов, содержащих информацию о координатах каждого атома и принадлежности к определенной группе. Поскольку ТМ белок не существует без мембранного окружения, а мембрана является сложной стабилизированной системой, возникает проблема погружения белка в мембрану. Для решения этой проблемы используется подход InflateGRO [16].

Мембрана растягивается в ширину в 4 раза и совмещается с белком. Те липиды, которые попали в пересечение с молекулой белка, удаляются. После этого мембрана постепенно сжимается с коэффициентом 0.95 с минимизацией энергии на каждом шаге, пока не достигнет своей стандартной плотности.

²В связи с достаточно однородной структурой строения мембраны как липидного бислоя, расчет мембранных белков всегда проводится в периодических граничных условиях. Таким образом, файл хранит небольшой участок бислоя, который самостабилизирован так, как если бы бислоем был бесконечен. Это является преимуществом исследования мембранных белков с помощью моделирования, в отличие от экспериментальных методов, в которых используются мицеллы, кубическая липидная фаза и т.д.

На следующем шаге происходит минимизация энергии алгоритмом градиентного спуска. После этого с помощью специальных алгоритмов термостата и баростата в коротком прогоне молекулярной динамики происходит релаксация системы к определенной температуре и давлению. Отрелаксированная система готова к расчету траектории MD.

После получения итоговой траектории проводится ее визуальная оценка с помощью программ визуализации. Затем вычисляется RMSD и RMSF, по которым окончательно можно судить о стабильности белка в мембране.

3.2 Разработанные алгоритмы обработки траектории МД

3.2.1 Получение информации о геометрии трансмембранной α -спирали

Необходимым аппаратом в исследовании трансмембранных α -спиралей является обработка информации о геометрических характеристиках спирали в мембране: наклон спирали относительно перпендикуляру к мембране, изломы спирали, ориентация и т.д. Для решения подобных задач был разработан специальный алгоритм.

Идеальный виток α -спирали, ориентированный по оси Z (ось Z перпендикулярна плоскости мембраны), методом наименьших квадратов фитится на соответствующий участок трансмембранной спирали. Результатом фита является матрица поворота витка в пространстве. Данная матрица содержит всю информацию о геометрии данного участка спирали. Получая такие матрицы для витков по всей длине спирали, можно установить геометрические характеристики всего пептида.

В данной работе этот алгоритм применяется для определения угла наклона спирали относительно перпендикуляра к плоскости мембраны и для отслеживания изломов спирали. Для определения угла наклона, единичный вектор, направленный вдоль оси Z, умножается на матрицу поворота, тогда проекция полученного вектора на ось Z определяет косинус угла наклона спирали (см. рис. 5a). Для отслеживания излома спирали, каждый полученный вектор вычитается из предыдущего. В итоге, модуль этой разности показывает наличие излома на данном участке спирали (см. рис. 5b).

Естественным образом, из вышеописанного модуля разности можно также рассчитать угол излома φ :

$$\varphi = \arccos\left(\frac{|\Delta R|}{2} - 1\right).$$

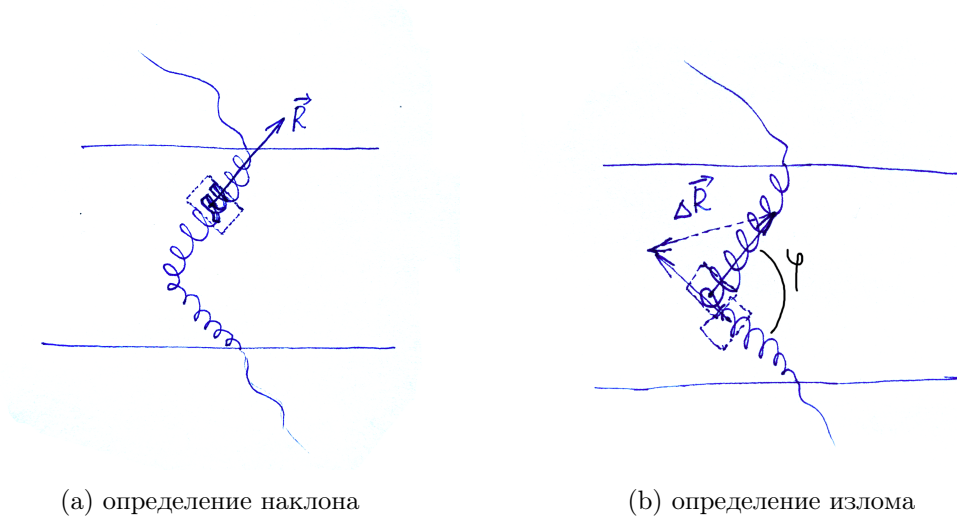


Рис. 5: Схема обработки геометрических данных трансмембранной α -спирали

Для реализации всех алгоритмов была использована вспомогательная библиотека MDAnalysis (<https://www.mdanalysis.org>).

3.2.2 Поиск пересечений двух α -спиралей

С помощью последовательного наложения витка α -спирали на всю длину пептида также можно определить возможные пересечения мономеров в димерах, полученных методом наложения. Для этого для всех возможных пар $\overline{R_1}$, $\overline{R_2}$ высчитывается разность. Если модуль этой разницы меньше некоторого ε , то на этом участке регистрируется пересечение (см. рис. 6).

Величина ε взята равной средней ширине α -спирали: 1.5 нм.

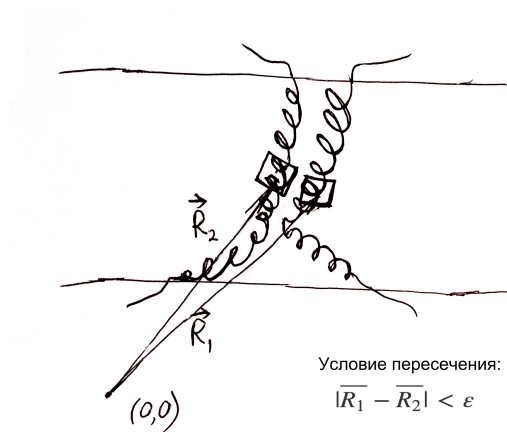


Рис. 6: Схема определения пересечений между мономерами в модельном димере.

4 Результаты и обсуждение

4.1 Мономеры с цис- связью

Для получения структуры мономера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro эта пептидная связь была повернута на 180° в мономере, полученном в [5] с помощью программы Rymol³.

В процессе расчетов было замечено, что длина внешних свободных участков сильно влияет на структуру пептида. Поэтому расчет проводился как для "коротких" пептидов с обрезанными свободными участками цепи с N и C концов, так и для "длинных" (ТО-DO дописать точные остатки). Полученные структуры показаны на рис. 7.

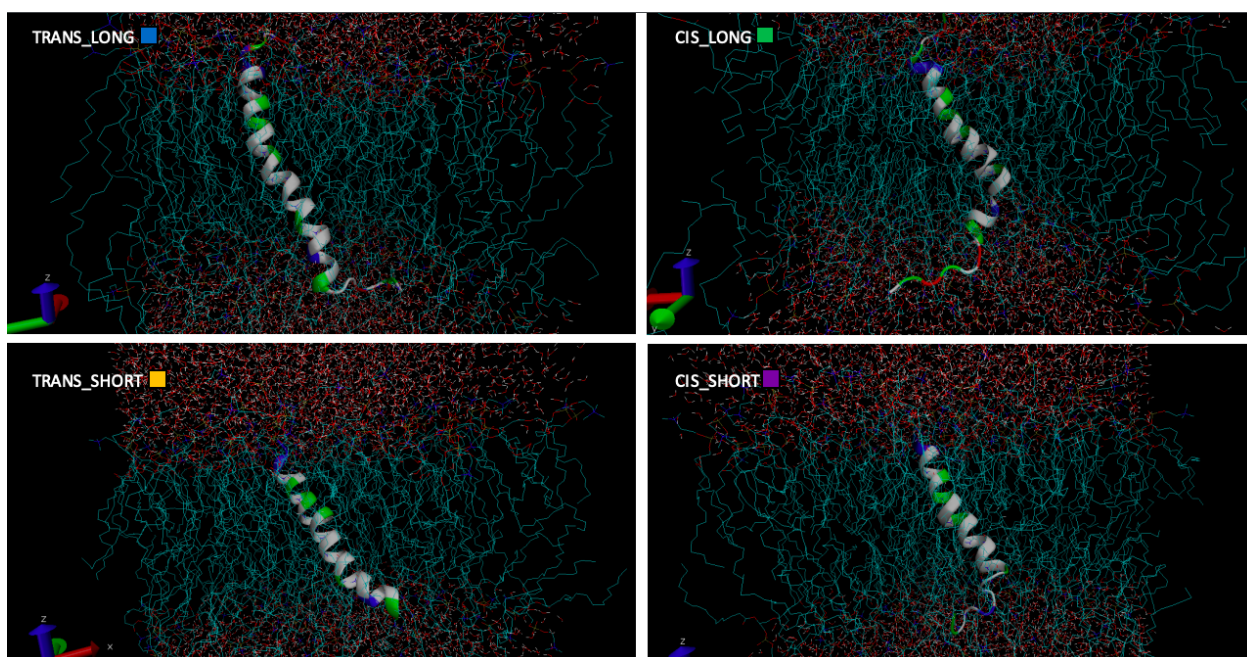


Рис. 7: Стабильные структуры мономеров. Слева направо: референсный длинный пептид с транс конформацией, длинный пептид с цис конформацией, короткий пептид с транс конформацией, короткий пептид с цис конформацией.

Ниже представлены графики RMSD и RMSF (см. раздел 3.1.1) для всех четырех пептидов. По графикам RMSD (рис. 8) можно видеть, что исследованные пептиды стабильны в мембранном окружении, т.к. график каждого пептида выходит на плато.

По графикам RMSF (рис. 9) можно сравнить подвижность соответствующих остатков основной цепи в случае цис и транс конформации. Интересно заметить, что в случае короткого транс пептида существует сильная флуктуация в области связи Gly957-Pro958. Это значит, что, ввиду большой подвижности, эта область является нестабиль-

³Т.к. пептидная связь является идеально жесткой в поле (ТО-DO написать поле), после искусственного изменения угла пептидной связи этот угол сохранится в процессе расчета траектории МД.

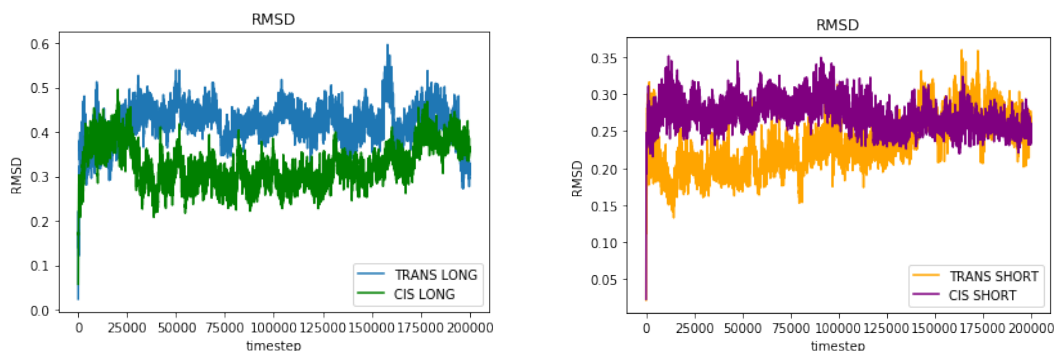


Рис. 8: Графики RMSD четырех пептидов разных конформаций.

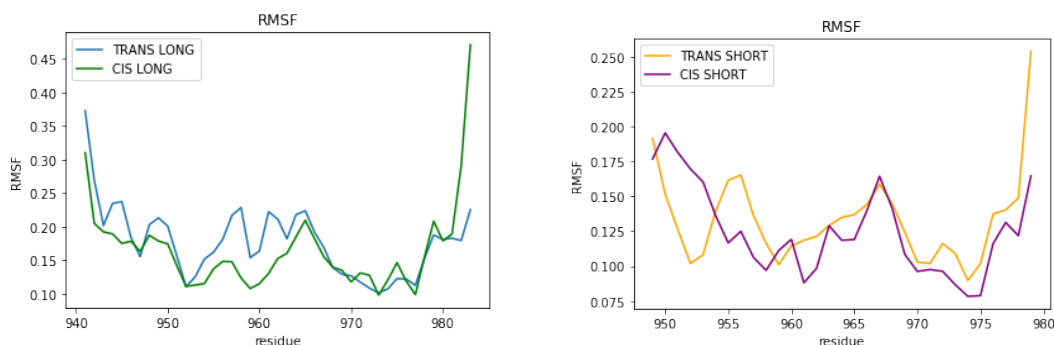


Рис. 9: Графики RMSF четырех пептидов разных конформаций.

ной. В длинном транс пептиде, из-за дополнительного уравнивания длинным внешним участком, такого эффекта не наблюдается.

4.1.1 Исследование геометрии пептида

С помощью алгоритма, описанного в разделе 3.2.1, была проведена обработка результатов траектории МД с целью выявления закономерностей в геометрии разных конформаций пептида (см. рис. 10, 11).

Графики 10 и 11 были получены путем наложения идеального витка α -спирали на участок пептида. Такое наложение было проведено по всей длине пептида для каждого остатка. Такие данные были получены для каждого фрейма траектории на стабильном участке, и посчитано среднее значение по траектории.

На графиках наклона показана проекция на ось Z вектора (0,0,1), повернутого согласно матрице поворота, полученной при наложении витка спирали на область пептида. Можно видеть, что пептид TRANS LONG (длинный транс пептид) является прямым и стоит вертикально в мембране (проекция ≈ 1). Пептиды CIS LONG и TRANS SHORT имеют наклон относительно оси Z. Также, по красному графику RMSD наложения витка можно видеть, что в области Pro958 пептида CIS LONG предположительно есть перелом - виток не зафиксирован на искривленный участок. У пептида CIS SHORT

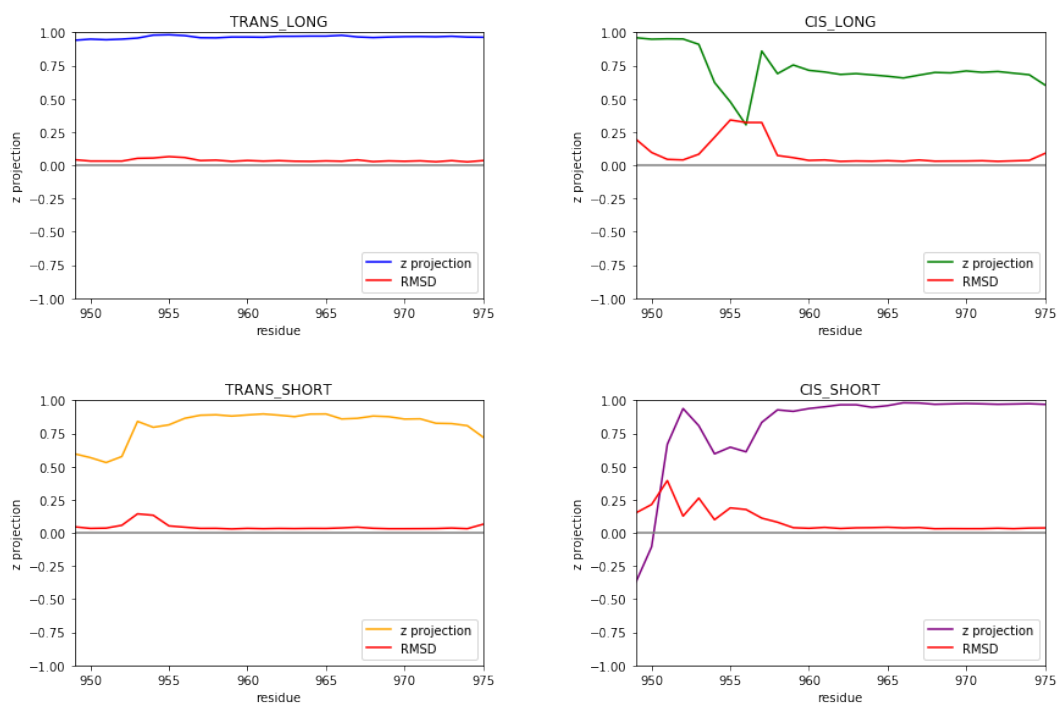


Рис. 10: Графики наклона α -спирали в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка α -спирали на участок пептида).

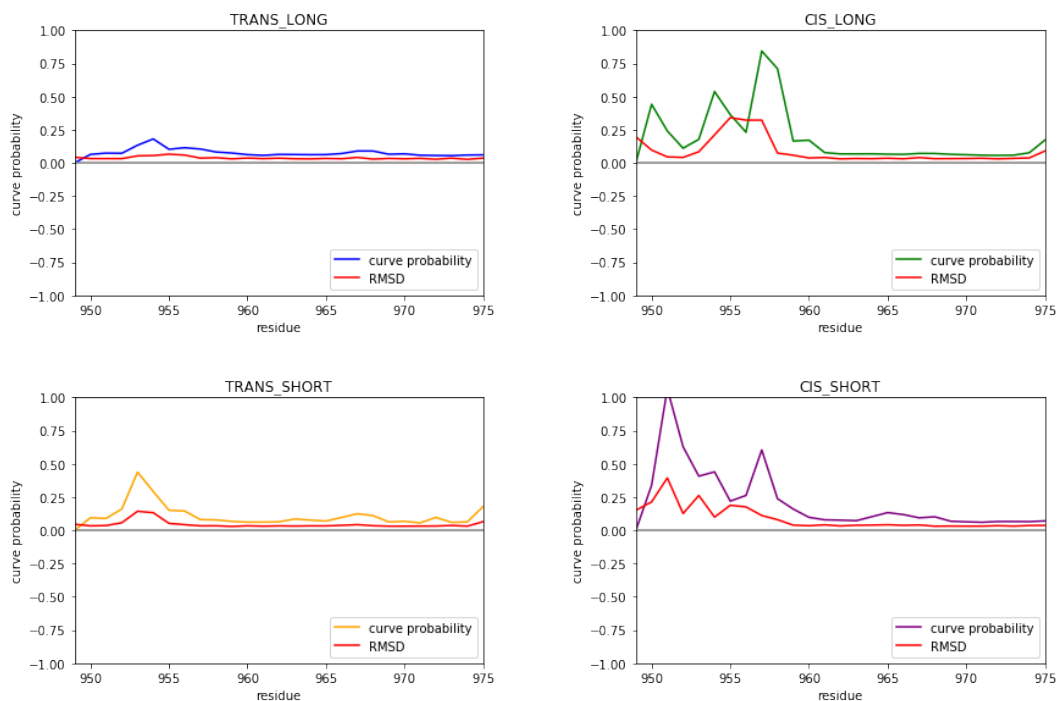


Рис. 11: Графики изломов α -спирали в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка α -спирали на участок пептида).

можно видеть развернутую область с N конца после остатка пролина.

(TODO Как нормально переписать абзац выше??)

По графикам излома можно видеть, что у пептида CIS LONG самый большой излом

присутствует в области связи Gly957-Pro958. Аналогичный излом можно видеть и у CIS SHORT на неразвернутом участке.

Далее, с помощью формулы (3.2.1) была дополнительно получена зависимость угла излома α -спирали пептидов в области связи Gly957-Pro958 от времени симуляции (рис. 12). Можно видеть, что у транс-пептидов нет излома (угол $\approx 180^\circ$), а у цис-пептидов есть излом (угол $130 - 140^\circ$), и он сохраняется неизменным на протяжении всего времени симуляции. Из этого можно сделать вывод, что структура цис-пептидов является жесткой в области Gly957-Pro958, что является важным фактом для дальнейшего поиска структур димеров с цис-связью.

Из полученных данных можно сделать вывод, что цис-конформация пептидной связи Gly957-Pro958 создает излом в трансмембранной α -спирали пептида ТМ домена IR. При этом, наличие или отсутствие внешних участков сильно влияет на структуру пептида, что согласуется с предположением о том, что конформационные изменения в ТМ домене IR индуцируются через внешние участки, соединяющие ТМ домен с внеклеточным и киназным доменами.

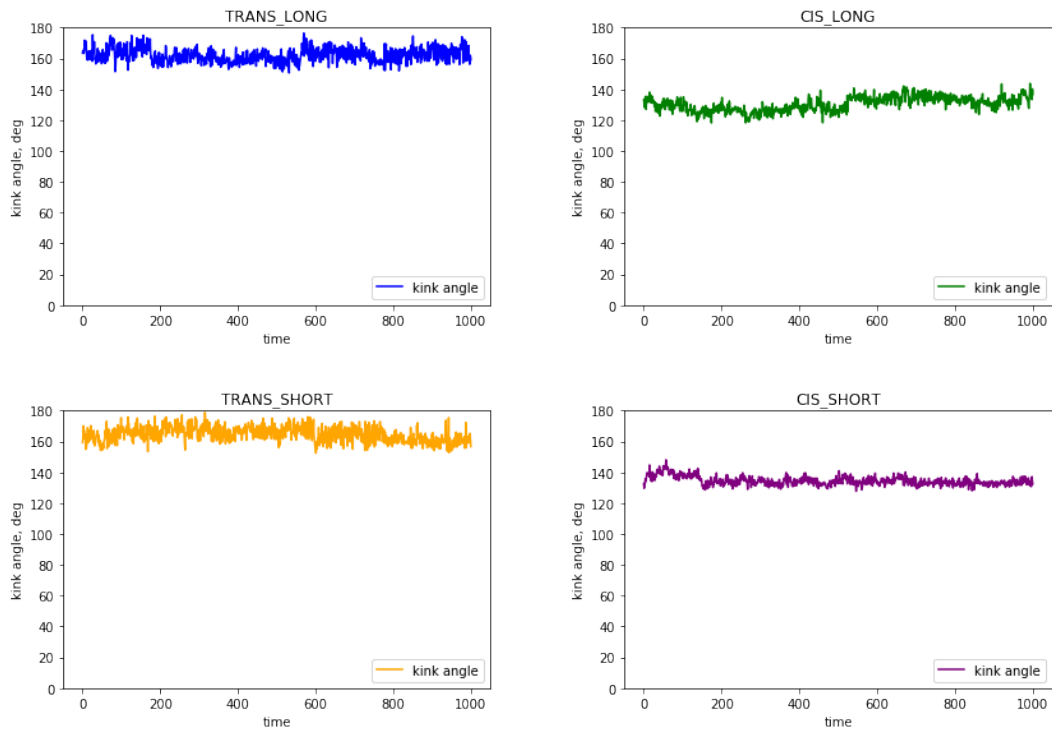


Рис. 12: Графики угла излома α -спирали в зависимости от времени в траектории МД.

4.2 Предсказание структуры димеров с цис- связью

В разделе 4.1 было обнаружено, что структура в области Pro961 является жесткой. Это накладывает геометрическое ограничение на возможные структуры димеров с цис-связью.

Был проведен эксперимент с целью отбора возможных структур димеров с цис-транс, транс-цис и цис-цис пептидной связью Gly-Pro. За основу были взяты димеры, полученные в работе (ТО-ДО как сослаться на диплом или новую статью?) С помощью программного пакета Gromacs был проведен фит структуры мономера CIS LONG (см. раздел 4.1) на соответствующую часть димера по совпадающей части (ТО-ДО дописать точные остатки). Далее методом, описанном в разделе 3.2.2 были выявлены пересечения двух спиралей димеров между собой. Результаты представлены в таблице.

ТО-ДО вставить таблицу

Очевидно, что структуры, содержащие пересечения, геометрически невозможны в силу жесткости мономера. Для структур без пересечений был поставлен эксперимент для получения траектории молекулярной динамики 3.1.2.

В силу предположения о том, что димеризация происходит для цис-мономеров (см. 2.3.1), далее нас интересуют только цис-цис димеры. Как видно из таблицы ??, это цис-цис димеры, полученные из структур 2 и 7.

ТО-ДО нарисовать схематичную картинку цис-цис 2 и 7 (симметричный 2 и несимметричный 7)

Димер 7 при наложении представлял собой несимметричную структуру (см. рис. 4.26). В процессе релаксации спирали димера развернулись, из чего следует вывод, что данный димер нестабилен в мембранном окружении.

Таким образом, была получена единственная структура цис-цис димера, стабильная в мембране (см. графики 4.2, 4.2).

ТО-ДО add rmsd plot

ТО-ДО add rmsf plot

....

5 Выводы

Список литературы

- [1] Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, et al. : Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017;38(5):379–431. 10.1210/er.2017-00073
- [2] Uchikawa E, Choi E, Shang G, Yu H, Bai XC. Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex *Elife.* 2019; 2019 Aug 22.
- [3] De Meyts P. The insulin receptor and its signal transduction network. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, Mclachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. (2000).
- [4] Lee J, Miyazaki M, Romeo GR and Shoelson SE. Insulin receptor activation with transmembrane domain ligands. *J Biol Chem* 289: 19769-19777 (2014)
- [5] Q. Li, et al. Solution structure of the transmembrane domain of the insulin receptor in detergent micelles *Biochim. Biophys. Acta*, 1838 (2014), pp. 1313-1321
- [6] Zamaletdinov M.F., Kuznetsov A.S., Maurice P ., Efremov R.G. Putative role of transmembrane domain dimerization in activation of proteins from the Insulin receptor family *J Bioenerg Biomembr.* 2018. V. 50, no. 6, p. 515.
- [7] Polyansky A. A. et al. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers // *Bioinformatics.* – 2014. – T. 30. – №. 6. – С. 889-890.
- [8] Woolfson DN, Mortishire-Smith RJ, Williams DH. Conserved positioning of proline residues in membrane-spanning helices of ion-channel proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 733–737
- [9] Alex Peralvarez-Marin, Jose-Luis Bourdelande, Enric Querol, Esteve Padros (2006) The role of proline residues in the dynamics of transmembrane helices: the case of bacteriorhodopsin, *Molecular Membrane Biology*, 23:2, 127-135
- [10] Slepko ER, Chow S, Lemieux MJ, Fliegel L. Proline residues in transmembrane segment IV are critical for activity, expression and targeting of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Biochem J* 2004; 379: 31–38
- [11] Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol* 2002; 323: 951–960
- [12] L.K. Iyer, S. Vishveshwara A model for transmembrane helix with a cis-proline in the middle *FEBS Lett.*, 374 (1995), pp. 21-24

- [13] D.N. Woolfson, R.J. Mortishire-Smith, D.H. Williams Conserved positioning of proline residues in membrane-spanning helices of ion-channel proteins *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175 (1991), pp. 733-737
- [14] N. Sal-Man, D. Gerber, Y. Shai Proline localized to the interaction interface can mediate self-association of transmembrane domains *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1838 (2014), pp. 2313-2318
- [15] Lummis, S., Beene, D., Lee, L. et al. Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel. *Nature* 438, 248–252 (2005)
- [16] C. Kandt, W.L. Ash, D.P. Tieleman Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins *Methods*, 41 (4) (2007), pp. 475-488