

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 трансмембранным 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 спиралей	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 -спиралей .	13
3.2.2 Поиск пересечений двух α -спиралей	14
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	21
Список литературы	22

1 Введение

TO-DO

- про компьютерные методы исследования - про сухую биологию
- про receptor инсулина, какой он важный - про медицину, как важно этот receptor 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

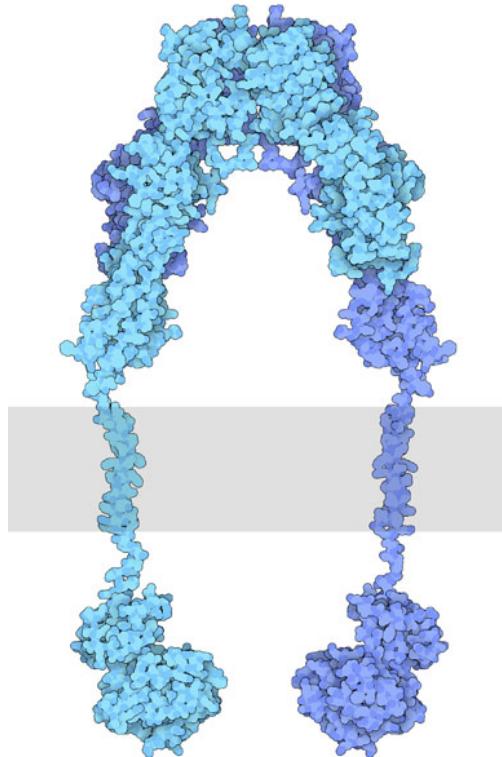


Рис. 1: Схематичное изображение пространственной структуры IR. Внеклеточный домен изображен сверху; внутриклеточный (киназный домен) изображен снизу; мембрана схематично показана серым цветом. <https://pdb101.rcsb.org/motm/182>

Инсулиновый рецептор (IR) - это рецептор, активируемый инсулином и инсулино-подобными 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.

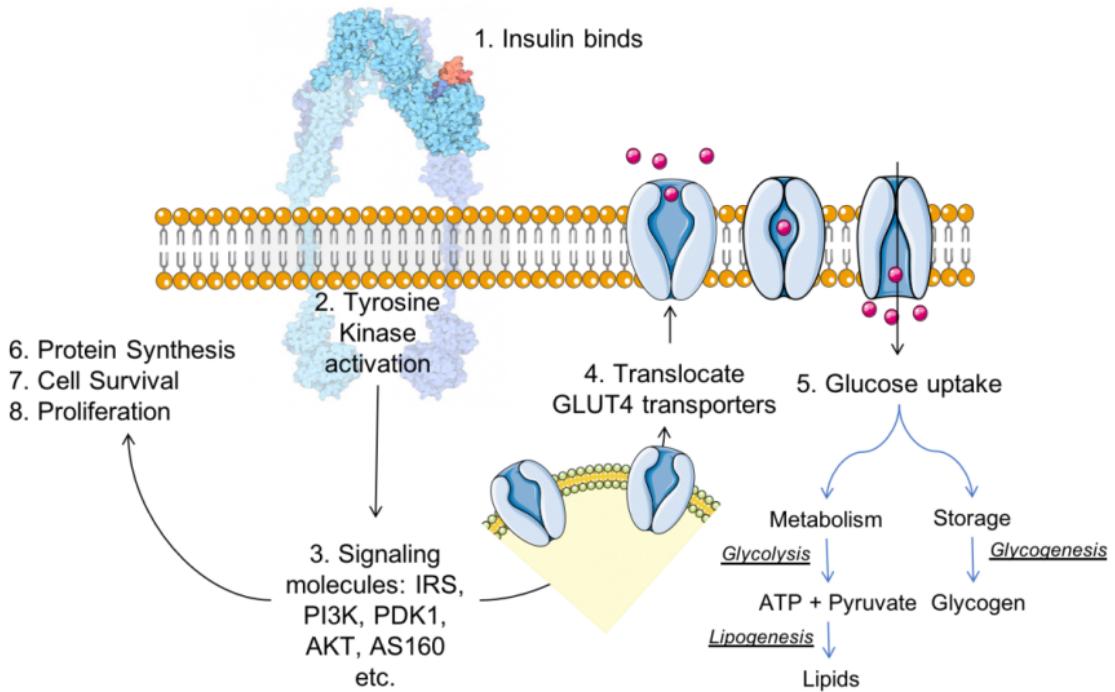


Рис. 2: Схема каскада реакций, запускаемых рецептором инсулина (синий) в результате связывания с инсулином (красный). <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/insulin/insulin-receptor>

- 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 завата 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 афинности 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

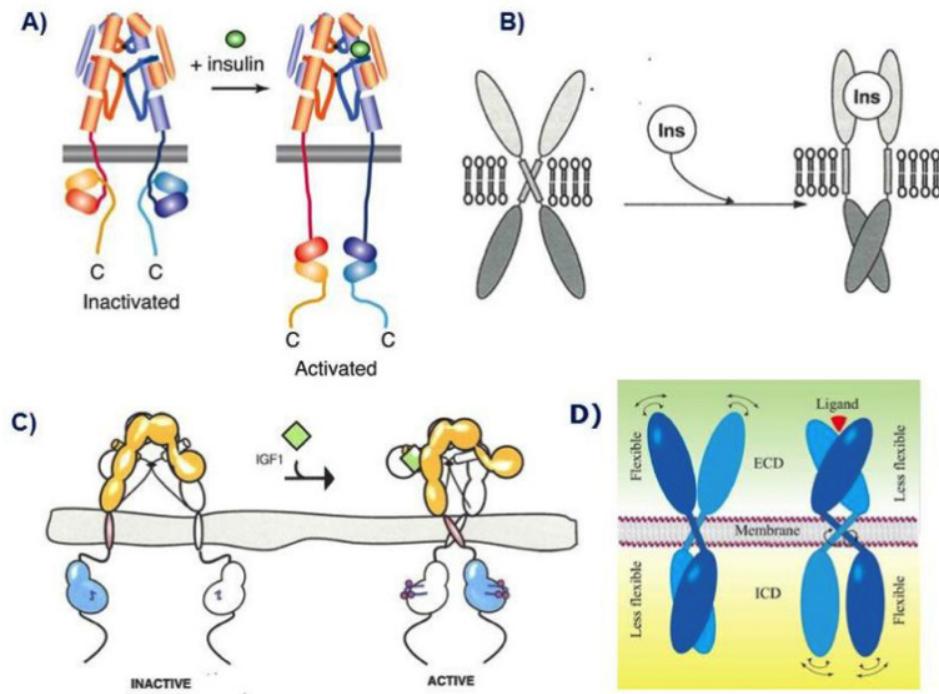


Рис. 3: TO-DO change picture! Leave only one model. Models of the mechanism of ligand activation of the insulin receptor tyrosine kinase. A: The "yo-yo"model. B: The TM domain ligand-induced separation model. C: The TM domain ligand-induced approximation model. D. The "rotation model". [3]

На данный момент общепринятой моделью активации IR, подтверждающейся экспериментальными данными, является предложенная Lee [4] (см рис. 3С). 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 криоэлектронной 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

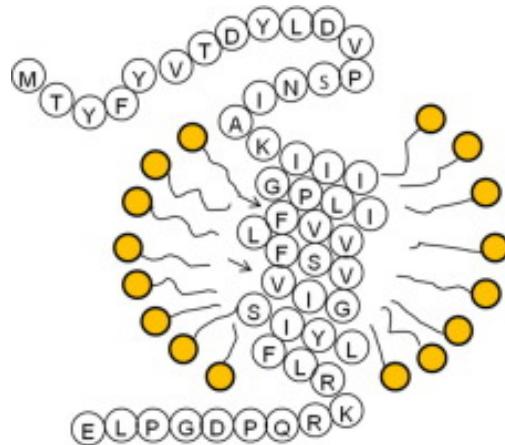


Рис. 4: Схематическое изображение ТМ домена IR в мицелле детергента (желтым указаны головки липидов, буквы обозначают аминокислотный остаток.) [5].

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 (додецилфосфохолина). 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 двоится 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.

TO-DO добавить график вторичной структуры и спектр (если это возможно)

Итак, целью данной работы является предсказание структур, которые были бы согласованы 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 мембранные окружение из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (POPC), проведена минимизация энергии, релаксация и расчет траектории молекулярной динамики (3.1.2). Затем методом потенциала средней силы (TO-DO добавить инфу про метод потенциала средней силы) были предложены 3 наиболее стабильные димерные структуры. Все они имеют характерную водородную связь Ser969-Ser969.

TO-DO добавить картинку этих структур из диплома Мицтхаха (если это возможно) или сделать свои картинки

2.3 Пролин в трансмембранных α -спиралях

2.3.1 Влияние пролина на свойства спиралей

Принято считать, что остаток пролина в трансмембранных α -спиралах играет функциональную роль. На это указывает сравнительно высокая встречаемость пролина в трансмембранных спиралах 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 спиралах 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 (трансмембранный домена) индуцирует димеризацию мономеров в мембране [14]. Этот факт вызывает особый интерес в контексте изучения механизма работы ТМД в ИР.

3 Материалы и методы

3.1 Компьютерное моделирование биологических молекул

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

3.1.1 Молекулярная динамика

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

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

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 MD. 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 MD уравнения решаются численно с использованием выбранной разностной схемы.

Критерием расчета MD является стабильность системы предмет + окружение. Система 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 трансмембранных белков

Основные стадии вычислительного эксперимента для мембранных белков 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.
- Рассчет 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 трансмембранный α -спиралей

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

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

В данной работе этот алгоритм применяется для определения угла наклона спиралей относительно перпендикуляра к плоскости мембраны и для отслеживания изломов спиралей. 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 спиралей (см. рис. 5а). Для отслеживания излома спиралей, каждый полученный вектор вычитается из предыдущего. В итоге, модуль этой разности показывает наличие излома на данном участке спиралей (см. рис. 5б).

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

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

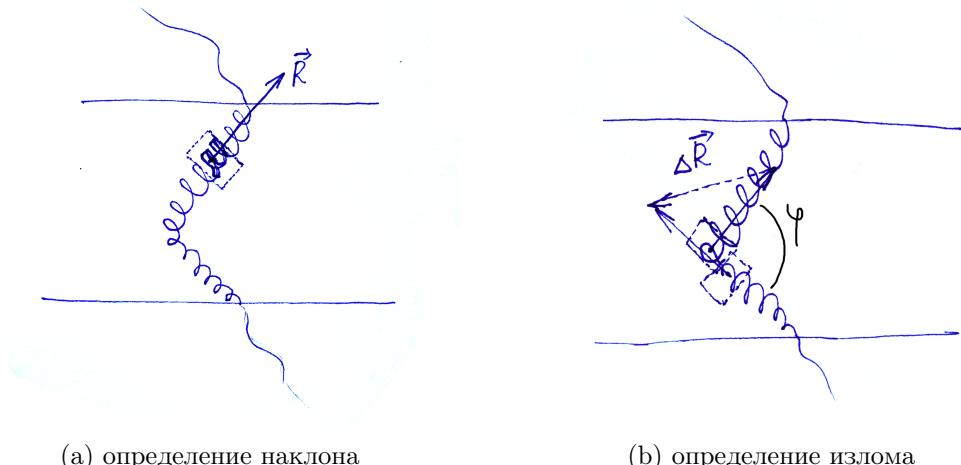


Рис. 5: Схема обработки геометрических данных трансмембранный α -спиралей

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 -спиралей 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 разности меньше некоторого ε , то на этом участке регистрируется пересечение (см. рис. 6).

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

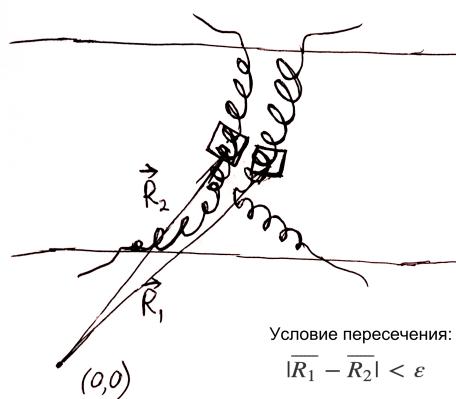


Рис. 6: Схема определения пересечений между мономерами в модельном димере.

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" (TO-DO дописать точные остатки). Полученные структуры показаны на рис. 7.

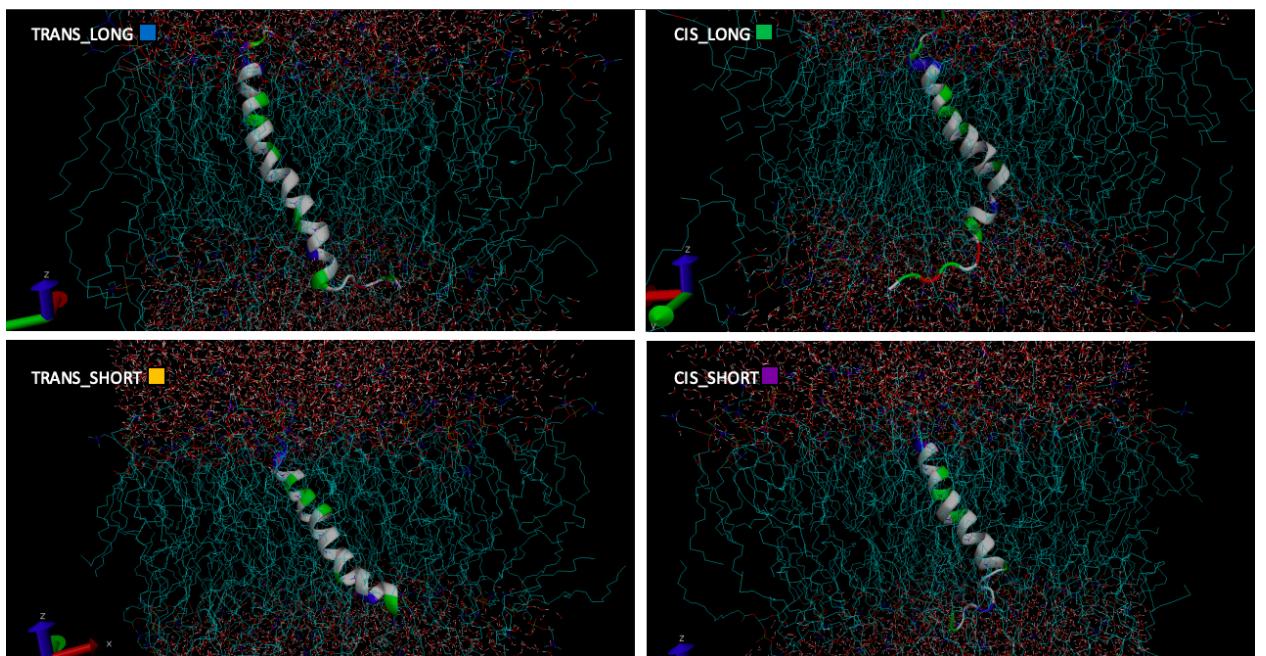


Рис. 7: Стабильные структуры мономеров. Слева направо: референсный длинный пептид с транс конформацией, длинный пептид с цис конформацией, короткий пептид с транс конформацией, короткий пептид с цис конформацией.

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 флюктуация в области связи Gly957-Pro958. Это значит, что, ввиду большой подвижности, эта область является нестабиль-

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

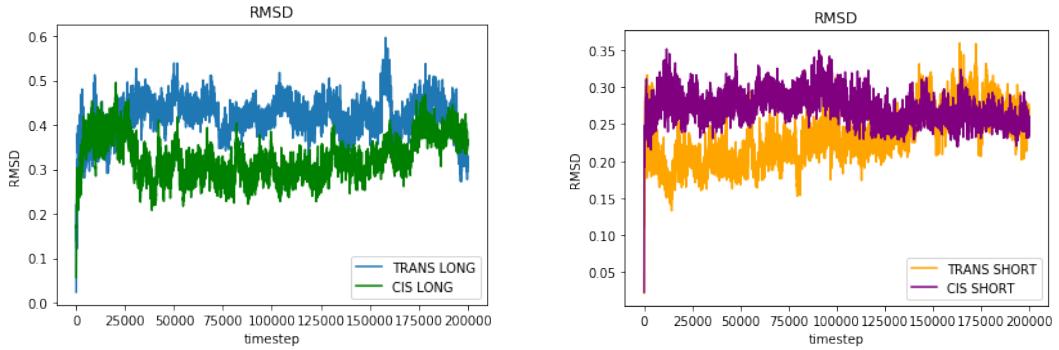


Рис. 8: Графики RMSD четырех пептидов разных конформаций.

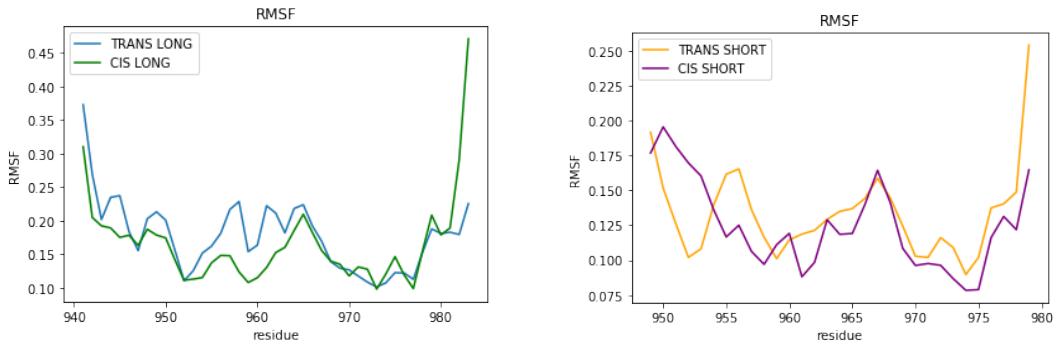


Рис. 9: Графики RMSF четырех пептидов разных конформаций.

ной. В длинном транс пептиде, из-за дополнительного уравновешивания 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 зафитился на искривленный участок. У пептида CIS SHORT

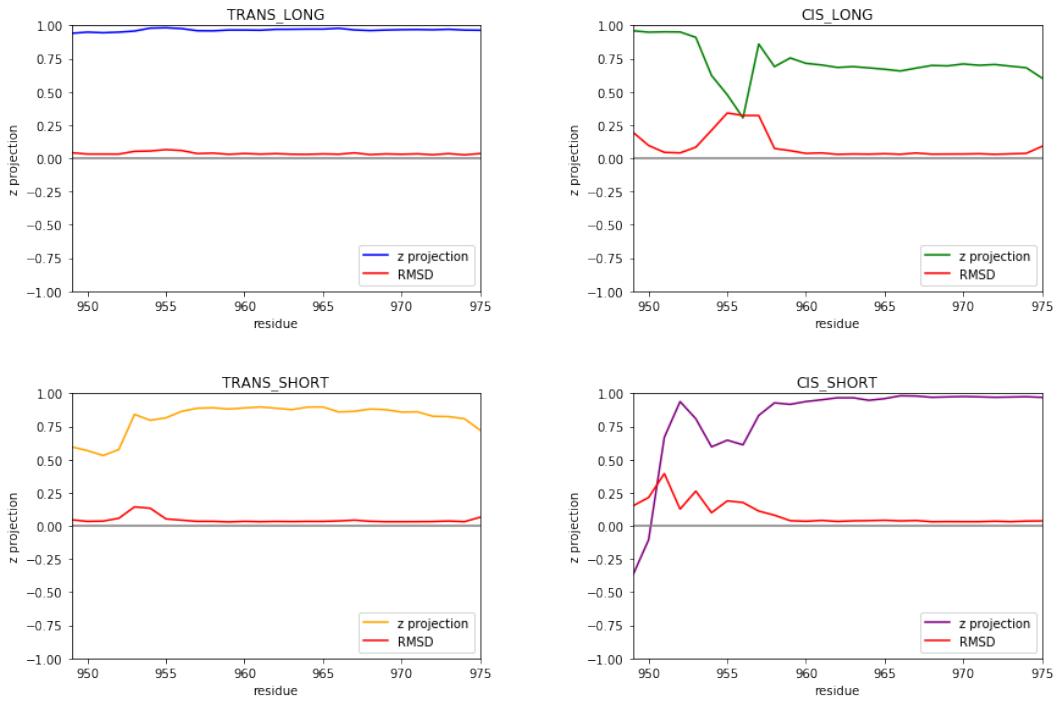


Рис. 10: Графики наклона α -спиралей в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка α -спиралей на участок пептида).

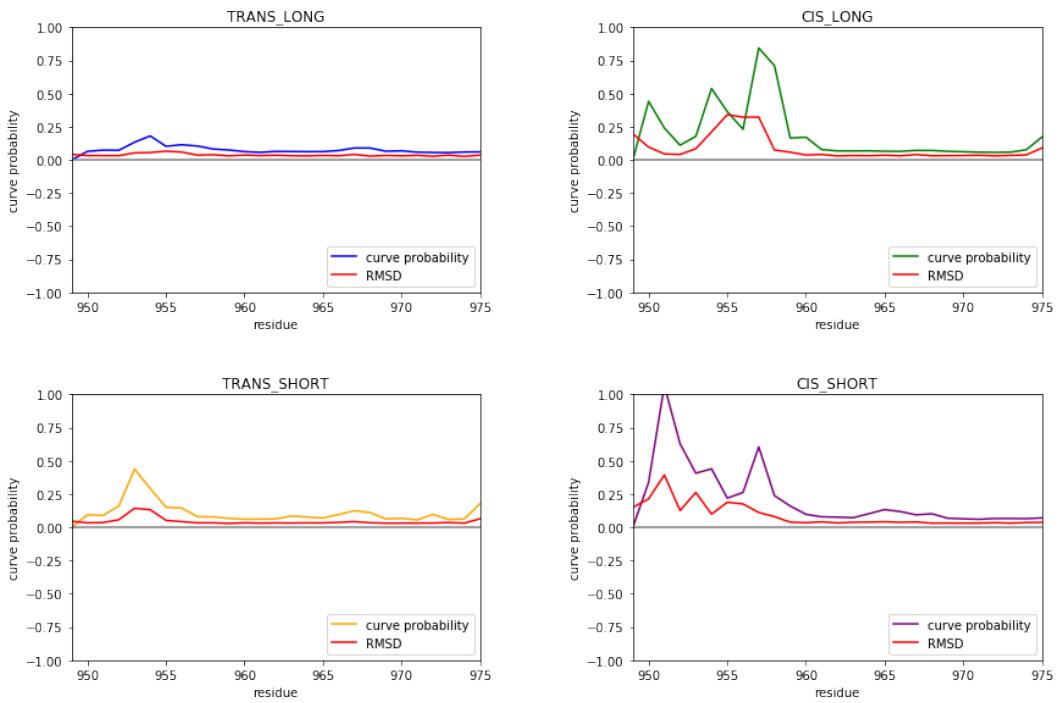


Рис. 11: Графики изломов α -спиралей в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка α -спиралей на участок пептида).

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 трансмембраной α -спирале пептида TM домена IR. При этом, наличие или отсутствие внешних участков сильно влияет на структуру пептида, что согласуется с предположением о том, что конформационные изменения в TM домене IR индуцируются через внешние участки, соединяющие TM домен с внеклеточным и киназным доменами.

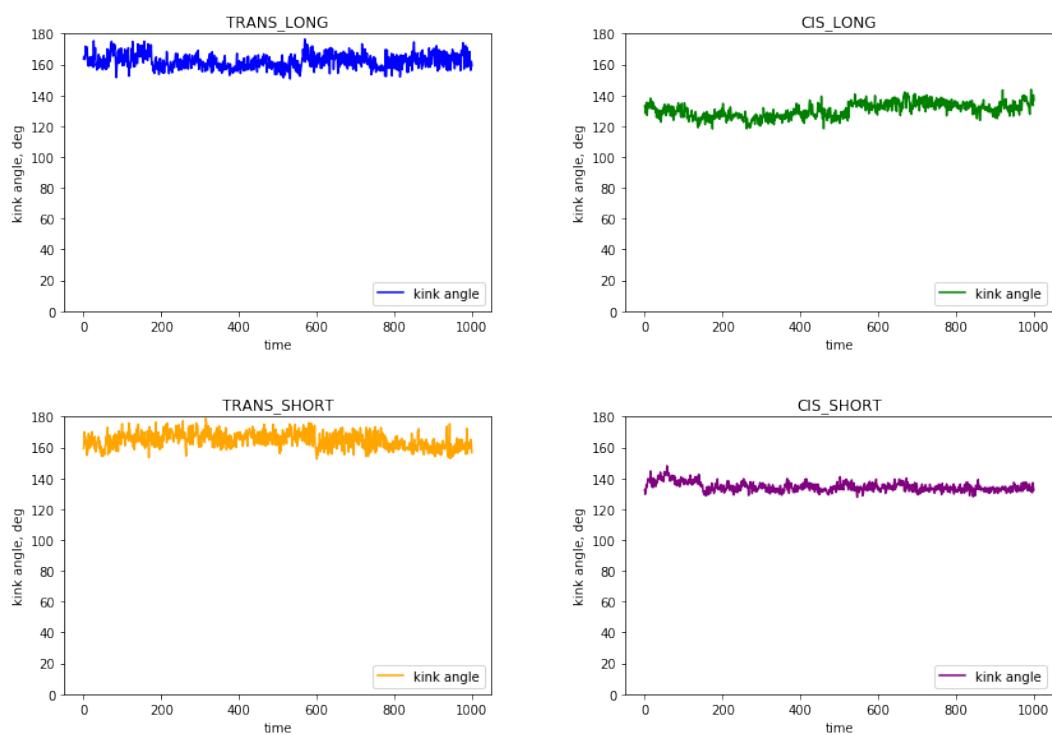


Рис. 12: Графики угла излома α -спирали в зависимости от времени в траектории МД.

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. Так, если соединять мономеры по с неподходящим профилем димеризации, то мономеры в димере могут пересекаться, как схематически отображено на рис. 13

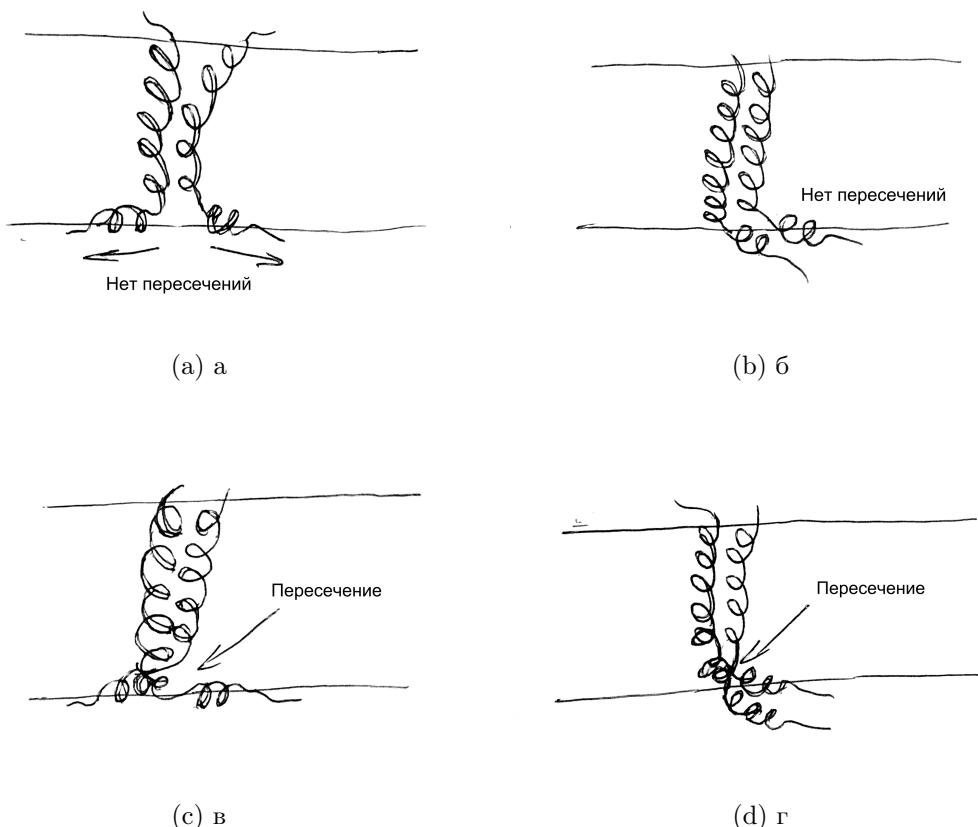


Рис. 13: Схема пересечений жестких мономеров в димерах. Димеры а, б - без пересечений, димеры в, г - есть пересечения.

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-DO как сослаться на диплом или новую статью?) С помощью программного пакета Gromax был проведен фит структуры мономера CIS LONG (см. раздел 4.1) на соответствующую часть димера по совпадающей части (ТО-DO дописать точные остатки). Далее методом, описанном в разделе 3.2.2 были выявлены пересечения двух спиралей димеров между собой. Результаты работы скрипта представлены в таблице 1. В таблице показаны найденные пересечения

Очевидно, что структуры, содержащие пересечения, геометрически невозможны в силу жесткости мономера. Для структур без пересечений был поставлен эксперимент

Таблица 1: Пересечения мономеров в димерах с ЦИС конформацией

Номер профиля димеризации	Пересечения (номера остатков)		
	CIS-TRANS	CIS-CIS	TRANS-CIS
1	-	954	-
2	-	-	-
6	959	952	-
7	-	-	-
8	-	949	-

для получения траектории молекулярной динамики (см. раздел 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 1, это цис-цис димеры, полученные из структур с интерфейсом димеризации 2 и 7.

Димер 7 при наложении представлял собой несимметричную структуру без пересечений (см рис. 13б). В процессе релаксации спирали димера развернулись, из чего следует вывод, что данный димер нестабилен в мембранным окружении.

Таким образом, была получена единственная структура цис-цис димера, стабильная в мембране (см. рис. 14).

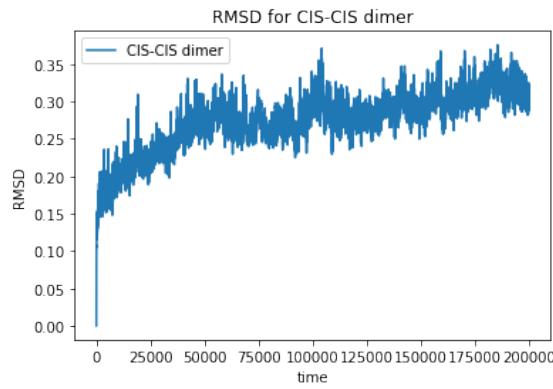


Рис. 14: График RMSD для димера с цис конформацией обоих мономеров.

Далее представлен график RMSF (рис. 15). Для сравнения рядом приведен аналогичный график для транс-транс димера, на базе которого был получен данный цис-цис димер. По графику RMSF можно сделать вывод, что ЦИС-ЦИС димер более стабилен, чем аналогичный ТРАНС-ТРАНС димер с таким же профилем димеризации.

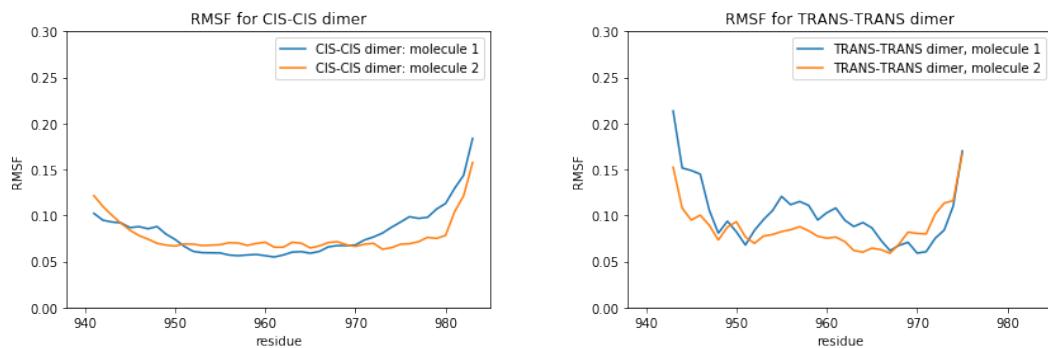


Рис. 15: Графики RMSF димеров одного профиля димеризации с цис-цис и транс-транс конформациями мономеров.

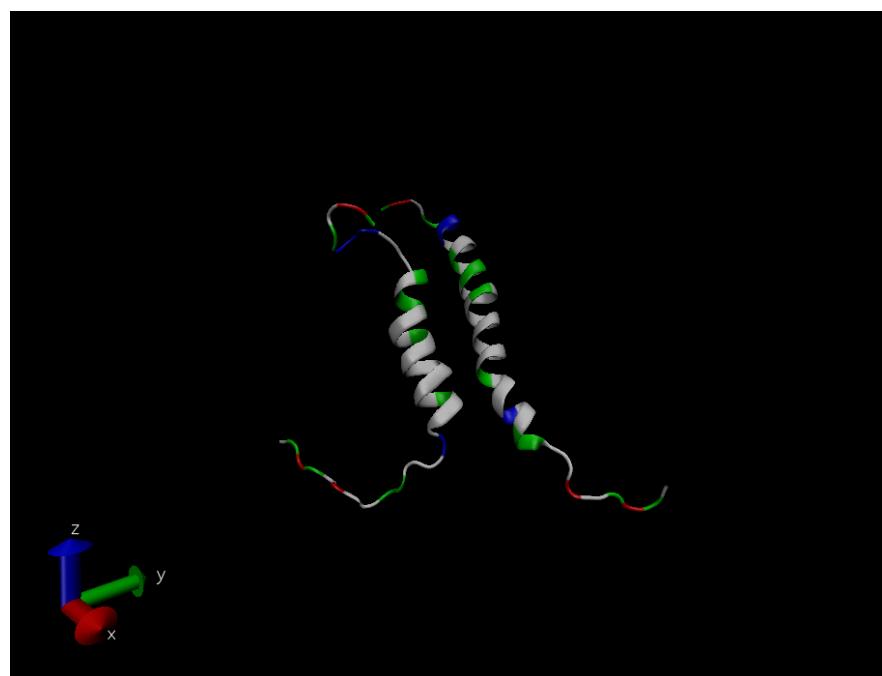


Рис. 16: Стабильный димер с цис-конформацией обоих мономеров.

5 Выводы

TO-DO

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. – C. 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] Slepkov 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