

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ СУБСТРАТОВ С ДВУМЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНО
ЗАРЯЖЕННЫМИ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ
ОЛИГОПЕПТИДАЗОЙ *B* ИЗ *Serratia proteamaculans* МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2019 г. Ю. К. Агапова^{1,*}, А. А. Талызина², Ю. С. Зейфман¹, Т. В. Фатеева¹, В. И. Тимофеев^{1,3},
А. Г. Михайлова⁴, Т. В. Ракитина^{1,4,**}

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Москва, Россия

³ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

* E-mail: agarova.jk@gmail.com

** E-mail: taniarakitina@yahoo.com

Поступила в редакцию 07.11.2018 г.

После доработки 07.11.2018 г.

Принята к публикации 25.12.2018 г.

Методом молекулярной динамики изучено поведение пептидных субстратов GlyArgArgGly и GlyLysArgGly, содержащих аргинин или лизин в P2-положении, в активном центре олигопептидазы *B* из гамма-протеобактерии *Serratia proteamaculans*. Показано, что природа остатка в P2-положении определяет не только его собственную позицию и контакты с аминокислотным окружением в субстратсвязывающем кармане, но и конформационную динамику всего пептида. При этом только остаток в P1-положении имеет фиксированные контакты с S1-субстратсвязывающим центром фермента, тогда как контакты остатка в P2-положении могут варьировать в зависимости от его природы. Полученные результаты демонстрируют, что молекулярно-динамический эксперимент дополняет и корректирует знания, полученные при рентгенокристаллографических исследованиях, позволяющих определить пространственную структуру молекулы, находящейся в одной из многочисленных альтернативных конформаций.

DOI: 10.1134/S0023476119050023

ВВЕДЕНИЕ

Олигопептидаза *B* из психрофильной бактерии *Serratia proteamaculans proteamaculans* (PSP) [1–6] является трипсиноподобной сериновой пептидазой [КФ 3.4.21.83], принадлежащей семейству пролилолигопептидаз (POP), характерной особенностью которого является наличие С-концевого α/β -гидролазного каталитического домена, содержащего каталитическую триаду Ser532, Asp617 и His652 (нумерация дана по аминокислотной последовательности PSP), и N-концевого регуляторного β -пропеллерного домена, препятствующего проникновению высокомолекулярных субстратов к активному центру, расположенному в полости между доменами [7]. Олигопептидазы *B* (OpdBs) или кодирующие их гены обнаружены в прокариотах, одноклеточных эукариотах и в некоторых высших растениях [8]. Установлено, что эти ферменты относятся к факторам патогенеза трипаносомозов, лейшманиозов и других паразитарных инфекций и поэтому яв-

ляются потенциальными мишенями для разработки терапевтических противоинфекционных средств [9].

Наиболее хорошо изучены OpdBs из простейших и только для них получены пространственные структуры. Кристаллические структуры OpdBs из *Leishmania major* и *Trypanosoma brucei* в комплексе с ингибитором, аналогом переходного состояния – антипаином (PDB_ID: 2XE4 [10], 4BP9 [11]), а также пространственные структуры близкородственных POP из млекопитающих и бактерий в комплексе с ковалентно связанными ингибиторами (PDB_ID: 1QFS [7], 2BKL [12], 3IVM [13]) или пептидными субстратами в случае каталитически неактивных мутантов POP из мозга *Sus scrofa* и археи *Aeropyrum pernix* (PDB_ID: 1UOO, 1UOQ, 1UOP [14] и 2HU8 [15]) создали основу для поиска конкурентных ингибиторов методом молекулярного докинга и изучения субстратной специфичности OpdBs методами молекулярной динамики (МД).

Таблица 1. Параметры молекулярно-динамического эксперимента

Система в термостате Berendsen	
Температура, К	300
Система в баростате Parrinello-Rahman	
Устанавливаемое давление, атм	1
Температура, К	300
Продолжительность NVT- и NPT- динамики, пс	100
Шаг временной сетки, пс	0.002
Молекулярная динамика	
Шаг временной сетки dt, пс	0.002
Количество шагов	50000000
Длина траектории, нс	50
Количество записанных фреймов	500
Интегратор	Leap-frog

Известно, что протозойные и бактериальные OpdBs, включая PSP, гидролизуют субстраты с парой положительно заряженных остатков с более высокой эффективностью, чем субстраты с одиночными остатками Arg или Lys [7]. Первоначально на основании анализа трехмерной модели OpdB из *Escherichia coli*, а также данных направленного мутагенеза OpdB из *Salmonella enterica* предполагалось, что S2-центр, взаимодействующий с аминокислотным остатком в P2-положении субстрата, включает в себя аминокислотные остатки Asp460 и Asp462 [16, 17], из которых только первый консервативен среди OpdBs [18]. Последующие структурные исследования протозойных OpdBs в комплексе с антипаином опровергли данные предположения [10, 11]. В протозойных ферментах остатки Asp или Glu, занимающие позицию Asp460, участвовали в образовании межмолекулярного солевого мостика SB3 (Arg333-Asp460, нумерация по аминокислотной последовательности PSP), сохраняющегося в бактериальных OpdBs, тогда как в предполагаемом S2-субстрат-связывающем кармане не было обнаружено кислых аминокислотных остатков. Встраивание остатков Arg или Lys в P2-положение антипаина, ковалентно связанного с OpdB из *L. major*, показало, что оба остатка одинаково взаимодействуют с белком путем образования водородной связи и стэкинг-взаимодействия с Tyr499 (Tyr455 в PSP) [10]. Однако общий механизм взаимодействия противоречит данным о том, что PSP гидролизует субстраты с аргинином в P2-позиции в 3 раза эффективнее, чем с лизином, а ее точечный мутант Asp649Ala, наоборот, предпочитает субстраты с лизином в P2-позиции [18]. Таким образом, вопрос о том, как регулируется вторичная субстратная специфичность у OpdBs оставался открытым.

Целью данной работы было изучение структурных факторов, определяющих вторичную субстратную специфичность PSP. Для решения этой задачи были получены трехмерные модели PSP в комплексе с пептидными субстратами GlyArgArgGly и GlyLysArgGly, проведена МД-симуляция полученных моделей и проанализированы возможные контакты между аминокислотными остатками PSP и остатками аргинина и лизина в P2-положениях субстрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение трехмерных моделей комплексов. Построение модели закрытой формы PSP с использованием web-сервиса I-TASSER [19] описано в [18]. Для построения трехмерных моделей комплексов PSP с пептидами GlyArgArgGly и GlyLysArgGly использовали пространственную структуру каталитически неактивного мутанта Ser554Ala пролилוליгопептидазы из мозга кабана (*Sus scrofa*) в комплексе с тетрапептидом GlyPheArgPro, содержащим положительно заряженный остаток в P2-положении (PDB_ID: 1UOO) [14]. Структуру 1UOO совмещали с моделью PSP, после чего координаты пептида GlyPheArgPro переносили в модель PSP. Далее с использованием программы PyMol аминокислотные остатки пептида GlyPheArgPro в модели PSP заменяли на Gly(Arg/Lys)ArgGly, при этом положительные аминокислотные остатки в P1- и P2-положениях субстрата получили нумерацию Arg726 и Arg(Lys)725 соответственно.

МД-симуляция моделей комплексов PSP с пептидами. Поведение комплексов PSP с пептидами GlyArgArgGly и GlyLysArgGly изучали в МД-эксперименте. Для проведения МД-симуляции было выбрано силовое поле OPLS-AA/L [20]. Область моделирования представляла собой кубическую ячейку 10.403 × 10.403 × 10.403 нм. Белок помещали в центр ячейки, весь объем которой заполняли водой с использованием модели воды spc216. Расчеты проводили с использованием программного пакета GROMACS [21]. Общий заряд системы нейтрализовали путем добавления 37 ионов хлора.

На первом этапе МД-эксперимента провели минимизацию энергии комплексов для релаксации структуры, чтобы избежать стерических столкновений при дальнейшей симуляции. Затем на подвижность атомов системы были наложены ограничения, и при помощи симуляции системы в термостате и баростате установлены температура 300 К и давление 1 атм. Использовали алгоритмы поддержания температуры и давления — “термостат Berendsen” [22] и “баростат Parrinello-Rahman” [23]. После этого все ограничения были сняты и проведен МД-эксперимент, параметры которого представлены в табл. 1. В результате для

каждого из комплексов получили траектории движения всех атомов продолжительностью 40 нс. Все вычисления проводили на суперкомпьютере НИЦ “Курчатовский институт”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы понять механизм взаимодействия PSP с субстратами, имеющими пару положительно заряженных остатков, была проведена 40-наносекундная МД-симуляция комплексов олигопептидазы *B* с пептидами GlyArgArgGly и GlyLysArgGly, полученных путем моделирования, и на протяжении симулируемой траектории проанализированы взаимодействия положительно заряженных остатков в P1- и P2-положениях субстратов с их аминокислотным окружением.

При анализе пространственных структур комплексов в разных точках траектории использовали программы PyMol. На рис. 1 представлены МД-траектории движения пептидов GlyArgArgGly и GlyLysArgGly в междоменном интерфейсе PSP. Отметим, что пептид GlyArgArgGly обладает гораздо большей подвижностью, чем GlyLysArgGly.

С помощью программы LigPlot [24] был проведен анализ аминокислотного окружения каждого из пептидных субстратов на протяжении 15 нс МД-траектории и выявлены аминокислотные остатки PSP, способные формировать полярные (расстояние до 3.35 Å) контакты с атомами положительно заряженных аминокислотных остатков пептидов GlyArgArgGly и GlyLysArgGly, находящихся в P1- и P2-положениях. Полярные контакты, обнаруженные при анализе участка МД-траектории с 25 по 32 нс, представлены в табл. 2. Для анализа стабильности этих контактов были определены расстояния между соответствующими атомами на всем протяжении МД-траектории. Результаты представлены в виде графической зависимости изменения расстояния между атомами от времени МД-симуляции (рис. 2–4).

Установлено, что для обоих субстратов на всем протяжении МД-траектории наблюдается взаимодействие гуанидиновой группы аргинина в P1-положении (Arg726) с атомами кислорода карбоксильной группы боковой цепи остатка Glu576, который, как было установлено ранее, является структурной детерминантой первичной субстратной специфичности OpdBs [10, 11, 16, 17]. Анализ расстояний Glu576OE1-Arg726NH2 и Glu576OE2-Arg726NH1 (в случае пептида GlyArgArgGly) и Glu576OE1-Arg726NH1 и Glu576OE2-Arg726NH2 (в случае пептида GlyLysArgGly) показал, что хотя бы один из этих контактов сохраняется на протяжении всей МД-траектории (рис. 2). В ближайшем окружении аргинина в P1-положении (Arg726) обоих субстратов также присутствует аминокислотный остаток

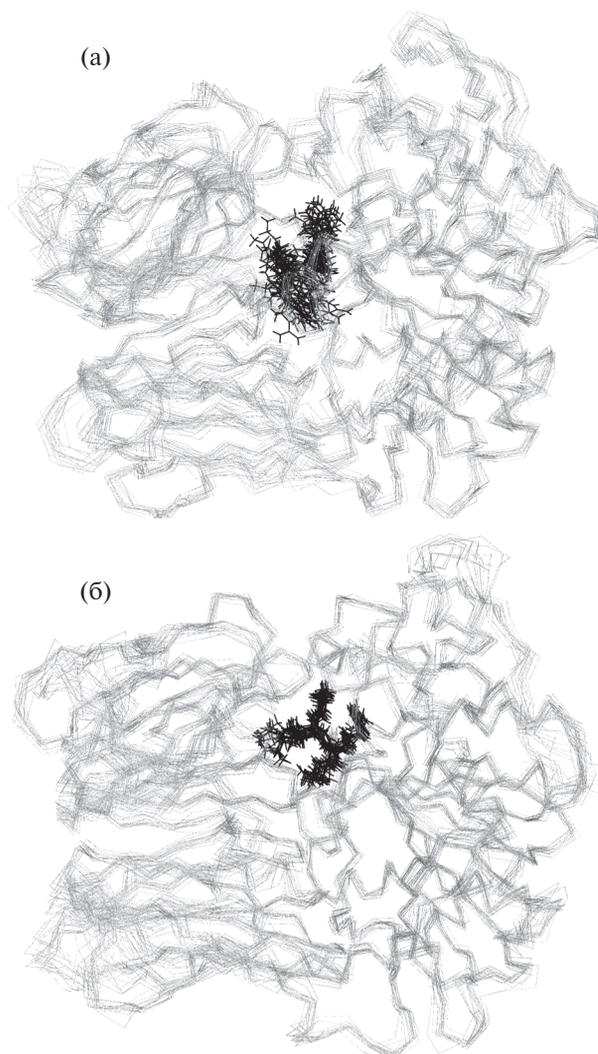


Рис. 1. МД-траектории движения пептидов GlyArgArgGly (а) и GlyLysArgGly (б) в междоменном интерфейсе PSP.

Ser532 каталитической триады PSP, атом кислорода гидроксильной группы которого периодически приближается к карбонильной группе аргинина в P1-положении (контакты Ser532OG-Arg726O на рис. 2), что обеспечивает возможность нуклеофильной атаки. Остальные контакты остатков в P1 (Arg726) и P2 (Arg725 или Lys725) положениях пептидов GlyArgArgGly и GlyLysArgGly различаются, хотя в обоих случаях помимо отрицательно заряженных аминокислотных остатков во взаимодействиях с субстратами участвуют преимущественно остатки тирозина и серина (табл. 2).

Пептид GlyLysArgGly удерживается в субстратсвязывающем кармане за счет водородных связей между атомами азота основной цепи остатков Lys725 и Arg726 и гидроксильными группами остатков Tyr225 и Tyr455 соответственно, о

Таблица 2. Контакты положительно заряженных остатков в P1- и P2-положениях пептидных субстратов GlyArgArgGly и GlyLysArgGly с аминокислотным окружением PSP, выявленные на участке МД-траектории (МД_Т) с 25 по 32 нс

МД_Т	GlyArgArgGly		GlyLysArgGly	
	P2 (Arg725)	P1 (Arg726)*	P1 (Arg726)**	P2 (Lys725)
25		Arg726NH1–Glu576OE2***	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
25.5			Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
26			Arg726N–Tyr455OH	Lys725NZ–Ser242OG
26.5		Arg726O–Ser532OG	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
				Lys725NZ–Ser242OG
27			Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
				Lys725NZ–Ser242OG
				Lys725O–Gln619NE2
27.5	Arg725NH2–Asp460OD2	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH	Arg726N–Tyr455OH Arg726O–Ser532OC	Lys725N–Tyr225OH
28	Arg725NH1–Ser458O Arg725NH1–Asp460OD2	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH		Lys725N–Tyr225OH
28.5	Arg725NH1–Ser458O	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
				Lys725NZ–Ser242OG
29	Arg725NH1–Ser458O	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
				Lys725NZ–Ser242OG
29.5	Arg725NH1–Asp460OD2	Arg726N–Ser457OG Arg726NH1–Ser454OC	Arg726N–Tyr455OH	Lys725NZ–Ser242OG
30	Arg725NH1–Ser458O Arg725NH2–Tyr452OH	Arg726N–Ser457OG Arg726NH1–Ser454OG		Lys725N–Tyr225OH
30.5	Arg725NH1–Ser458O Arg725NH2–Ser458O Arg725NH1–Asp460OD2	Arg726N–Ser457OG		Lys725N–Tyr225OH
31	Arg725NH1–Asp460OD2	Arg726NH1– Glu576OE2*** Arg726N–Ser457OG		Lys725N–Tyr225OH
31.5	Arg725NH1–Ser458O Arg725NH2–Tyr452OH	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH
32	Arg725NH1–Ser458O	Arg726N–Ser457OG Arg726O–Tyr452OH	Arg726N–Tyr455OH	Lys725N–Tyr225OH

* Стабильные контакты с S1-субстратсвязывающим центром Glu576OE1-Arg726NH2 и Glu576OE2-Arg726NH1 не приведены.

** Стабильные контакты с S1-субстратсвязывающим центром Glu576OE1-Arg726NH1 и Glu576.OE2-Arg726.NH2 не приведены.

*** Наблюдается контакт только с одним из кислородов Glu576.

чем свидетельствует расстояние менее 3.35 Å на основной части МД-траектории (контакты Tyr225OH–Lys725N и Tyr455OH–Arg726N на рис. 3а). Кроме того, Lys725 может формировать менее стабильные (наблюдаемые на отдельных участках МД-траектории) полярные контакты: Ser242OG–Lys725NZ и Gln619NE2–Lys725O (рис. 3б, табл. 2).

В случае пептида GlyArgArgGly гуанидиновая группа аргинина в P2-положении (Arg725), с одной стороны, препятствует стабилизации системы характерных водородных связей вплоть до 28–29 наносекунды симуляции, о чем свидетель-

ствует незначительное количество контактов, наблюдаемых на участке МД-траектории с 25 по 27.5 нс, а с другой стороны, приводит к образованию более многочисленных альтернативных контактов (табл. 2). Графики зависимости расстояний между контактирующими атомами от времени МД-симуляции, приведенные на рис. 4, подтверждают, что формирование ряда стабильных контактов начинается на 28–29 наносекунде симуляции. Например, помимо стабильных контактов с атомами кислорода карбоксильной группы остатка Glu576 (рис. 2) на 29 наносекунде симуляции Arg726 образует дополнительный ста-

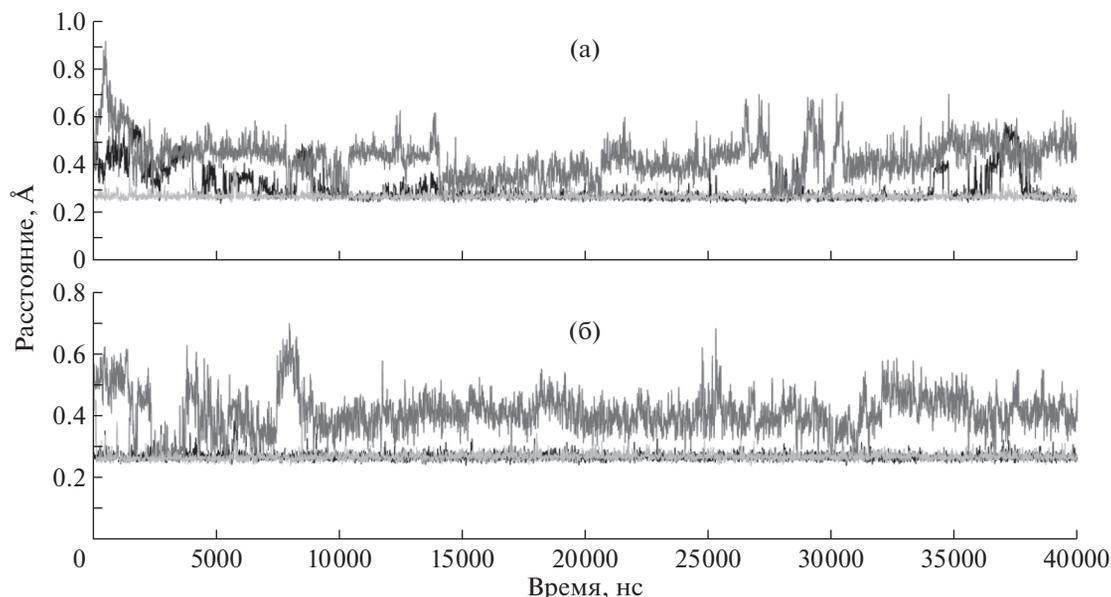


Рис. 2. Графики изменения расстояния между атомами аргинина в P1 (Arg726) положениях пептидных субстратов GlyArgArgGly (а) и GlyLysArgGly (б) и атомами S1-субстратсвязывающего центра (Glu576) и серина каталитической триады (Ser532) PSP, образующими на протяжении 40 нс МД-симуляции полярные контакты: Glu576OE1-Arg726NH2 (черный цвет), Glu576OE2-Arg726NH1 (светло-серый цвет) (а); Glu576OE2-Arg726NH2 (черный цвет), Glu576OE1-Arg726NH1 (светло-серый цвет) (б); Ser532OG-Arg726O (темно-серый цвет) (а, б).

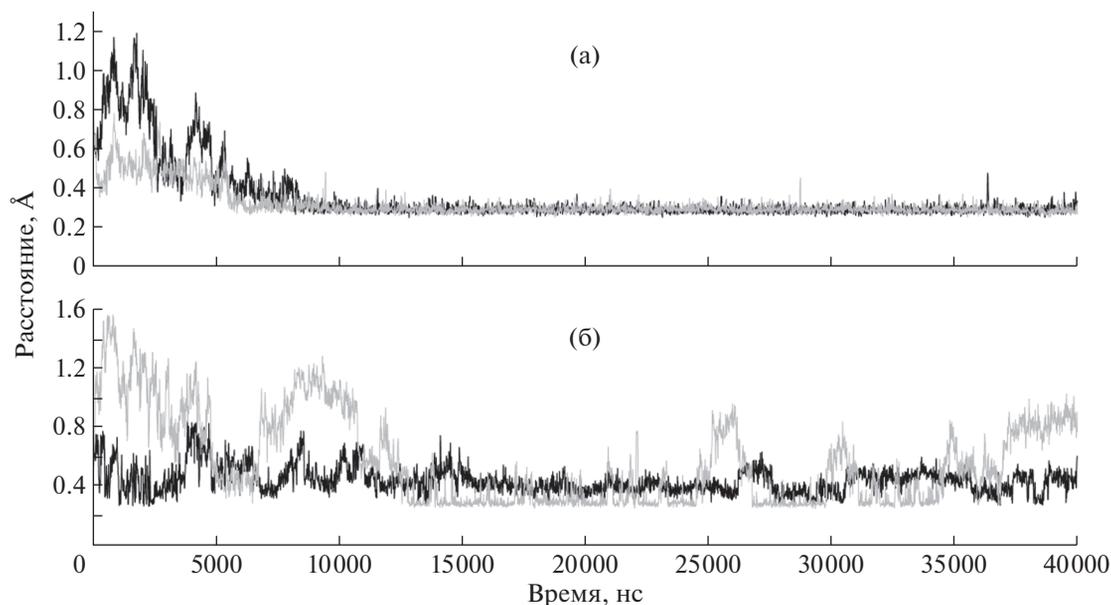


Рис. 3. Графики изменения расстояния между атомами лизина и аргинина в P2 (Lys725) и P1 (Arg726) положениях пептидного субстрата GlyLysArgGly и атомами аминокислотных остатков PSP, образующими на протяжении 40 нс МД-симуляции полярные контакты: Tyr455OH-Arg726N (серый цвет), Tyr225OH-LYS725N (черный цвет) (а); Ser242OG-LYS725NZ (серый цвет), GLN619NE2-LYS725O (черный цвет) (б).

бильный контакт Ser457OG-Arg726N и менее стабильный контакт Tyr452OH-Arg726O (рис. 4а, 4б). Стабилизации контакта Tyr452OH-Arg726O, вероятно, препятствует конкуренция между карбоксильной группой Arg726 и аминогруппой Arg725

за гидроксильную группу Tyr452, о чем свидетельствуют меняющиеся в противофазе расстояния Tyr452OH-Arg726O и Tyr452OH-Arg725NH2 (рис. 4б). В то же время карбоксильная группа Asp460 может конкурировать с гидроксильной

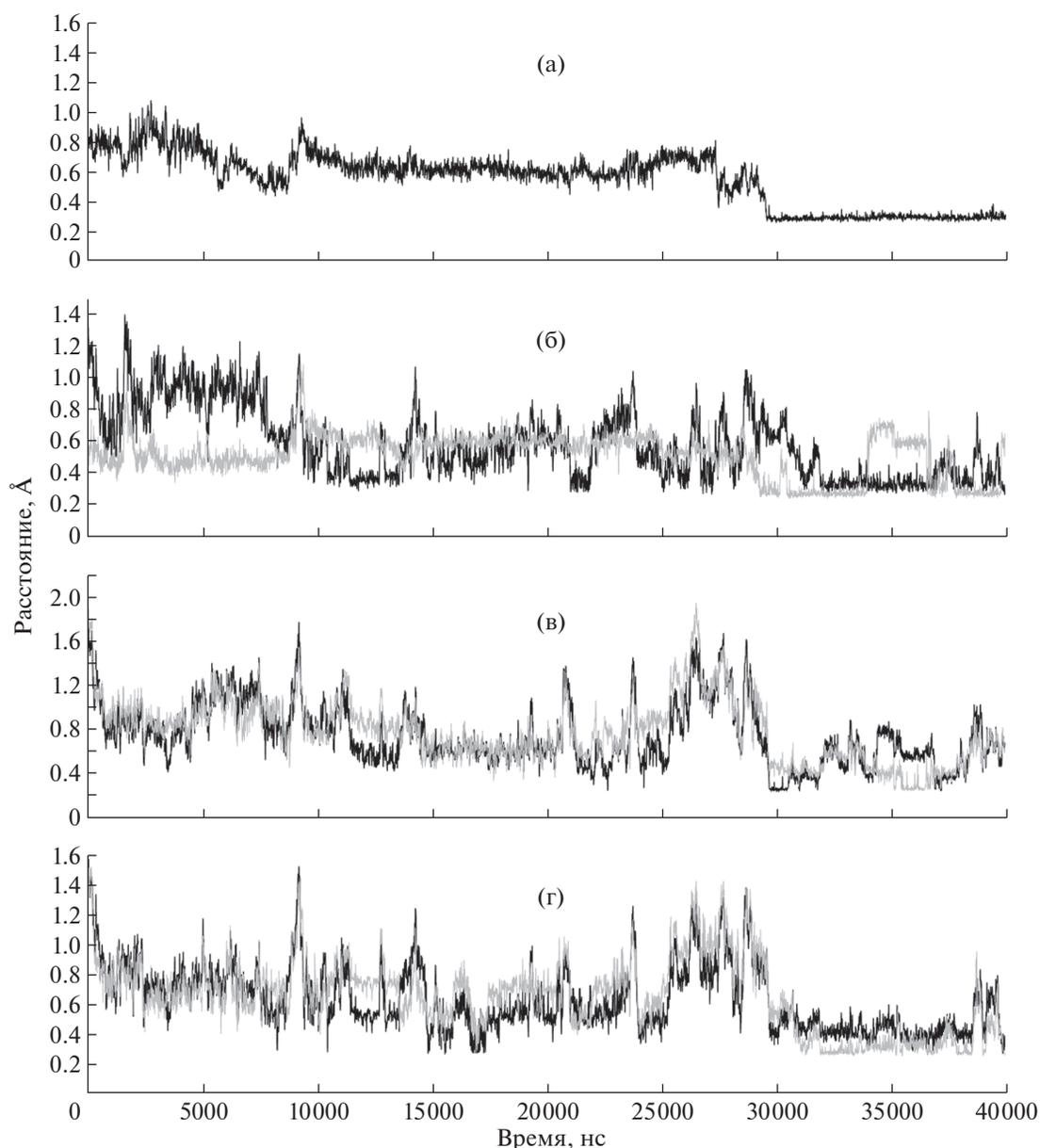


Рис. 4. Графики изменения расстояния между атомами аргинина в P2 (Arg725) и P1 (Arg726) положениях пептидного субстрата GlyArgArgGly и атомами аминокислотных остатков PSP, образующими на протяжении 40 нс МД-симуляции полярные контакты: Ser457OG-Arg726N (а); Tyr452OH-Arg725NH2 (черный цвет), Tyr452OH-Arg726O (серый цвет) (б); Asp460OD2-Arg725NH2 (черный цвет), Asp460OD1-Arg725NH1 (серый цвет) (в); Ser458O-Arg725NH2 (черный цвет), Ser458O-Arg725NH1 (серый цвет) (г).

группой Tyr452 за гуанидиновую группу Arg725 (табл. 2, рис. 4б, 4в), которая может участвовать в образовании еще двух контактов: Ser458O-Arg725NH1 и Asp460OD1-Arg725NH1, первый из которых является более стабильным (рис. 4в, 4г, табл. 2).

Данные МД-симуляции показали, что в пептидных субстратах с двумя положительно заряженными остатками только остаток в P1-положении имеет фиксированные контакты с S1-субстратсвязывающим центром PSP, тогда как

контакты остатка в P2-положении зависят от его природы и могут быть переменными. Ранее на основании сравнения структур комплексов OpdBs из *L. major* и *T. brucei* (PDB_ID: 2XE4 и 4BP9) с антипаином такая переменность была показана только для остатков в P3- и P4-положениях [11]. Полученные результаты демонстрируют, что МД-эксперимент дополняет и корректирует знания, полученные при рентгенокристаллографических исследованиях, позволяющих получать информацию о пространственной

структуре молекулы, находящейся в одной из многочисленных альтернативных конформаций. В результате аргинин в P2-положении субстрата в какие-то моменты взаимодействует с Asp460, как предполагали в [16, 17], а в другие моменты не имеет этого контакта, как показано в [10, 11].

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение, почему PSP гидролизует субстраты с аргинином в P2-положении более эффективно, чем с лизином в этом положении [18]. Как было сказано выше, OpdBs и родственные POPS состоят из С-концевого α/β -гидролазного каталитического домена и N-концевого регуляторного β -пропеллерного домена, соединенных гибким линкером. На основании серии структурных работ было установлено, что в отсутствие субстрата наблюдается постоянный переход молекулы из каталитически неактивной (открытой) формы, в которой как сами домены, так и аминокислотные остатки каталитической триады разобщены, в активную (закрытую) форму, в которой сами домены и остатки каталитической триады сближены друг с другом [10–16]. Активный центр, расположенный в полости между доменами, становится доступен для субстратов только в открытой форме фермента. В случае пептида GlyArgArgGly все наблюдаемые при МД-симуляции контакты аргининов в P1- и P2-положениях субстрата формируются за счет остатков каталитического домена, т.е. прочность связывания субстрата GlyArgArgGly не зависит от угла между расходящимися доменами. В случае пептида GlyLysArgGly аргинин в P1-положении формирует стабильные контакты с остатками каталитического домена, а лизин в P2-положении — преимущественно с остатками β -пропеллерного домена. При таком варианте связывания пептида с ферментом расстояние между доменами определяет возможность формирования и прочность контакта. Данный факт, а также меньшее суммарное количество контактов с аминокислотным окружением, наблюдаемое при МД-симуляции пептида GlyLysArgGly, вероятно, и является причиной более слабого связывания субстратов с лизином в P2-положении по сравнению с субстратами с аргинином в P2-положении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №17-14-01256) в части моделирования и молекулярно-динамической симуляции комплексов олигопептидазы *B* из *S. proteamaculans*, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному

заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части сравнительного анализа пространственных структур пролилолигопептидаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф. и др. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 5. С. 697.
2. Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю. и др. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 10. С. 1427.
3. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В. и др. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 4. С. 591.
4. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я. и др. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 384.
5. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V. et al. // Protein Exp. Purif. 2014. V. 93. P. 63.
6. Михайлова А.Г., Некрасов А.Н., Зинченко А.А. и др. // Биохимия. 2015. Т. 80. № 11. С. 1606.
7. Fulop V., Bocskai Z., Polgar L. // Cell. 1998. V. 94. P. 161.
8. Kaushik S., Sowdhamini R. // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 985.
9. Coetzer T.H., Goldring J.P., Huson L.E. // Biochimie. 2008. V. 90. P. 336.
10. McLuskey K., Paterson N.G., Bland N.D. et al. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 50. P. 39249.
11. Canning P., Rea D., Morty R.E. et al. // PloS One. 2013. V. 8. № 11. P. e79349.
12. Shan L., Mathews I.I., Khosla C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 359.
13. Li M., Chen C., Davies D.R. et al. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 21487.
14. Szeltner Z., Rea D., Renner V. et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 48786.
15. Kiss A.L., Hornung B., Radi K. et al. // J. Mol. Biol. 2007. V. 368. P. 509.
16. Gerczei T., Keseru G.M., Naray-Szabo G. // J. Mol. Graph. Model. 2000. V. 18. P. 7.
17. Morty R.E., Fu P.V., Andrews N.W. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 3329.
18. Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I. et al. // Biochimie. 2017. V. 139. P. 125.
19. Yang J., Yan R., Roy A. et al. // Nature Methods. 2015. V. 12. P. 7.
20. Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 11225.
21. Abraham Murtola T., Schulz R. et al. // Software X. 2015. V. 1–2. P. 19.
22. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. № 8. P. 3684.
23. Parrinello M., Rahman A. // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. № 5. P. 2662.
24. Swindells M.B., Laskowski R.A. // J. Chem. Inf. Model. 2011. V. 51. P. 2778.