

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.218,577.32

### МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ С УЧЕТОМ ИОНИЗАЦИОННО-КОНФОРМАЦИОННОЙ СВЯЗИ И РАВНОВЕСНОГО ТИТРОВАНИЯ

© 2011 г. Ю. Н. Воробьев

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090*

Поступила в редакцию 09.04.2010 г.

Принята к печати 25.05.2010 г.

Предложена реализация нового метода молекулярной динамики МД-рН-РТ при постоянном значении рН в потенциале средних сил водного протонного резервуара в условиях равновесного титрования. Метод МД-рН-РТ выполняет моделирование белка в наивероятном, для данной конформации, ионизационном микросостоянии – состоянии, имеющем минимальную энергию с учетом поправочного ионизационного потенциала средних сил, учитывающего равновесный ансамбль ионизационных состояний. Этот метод позволяет выполнять оптимизацию структуры и полной свободной энергии молекулы белка в водном растворе при постоянном рН, а также рассчитывать рН-зависимые свойства. МД-рН-РТ обладает уникальными особенностями. Он использует: 1) наиболее точный и вычислительно-эффективный расчет электростатической энергии молекулы белка в растворе, модель непрерывных диэлектрических сред с уравнением Пуассона и обобщенный борновский метод с “идеальными” борновскими радиусами атомов; 2) единую модель поверхности потенциальной энергии в ионизационно-конформационном фазовом пространстве, как для расчета потенциальной энергии молекулы белка и атомных сил, так и для определения ионизационных состояний. Метод вычисляет полную свободную энергию молекулы белка в водном растворе в протонном резервуаре в условиях равновесного титрования. “Работоспособность” нового метода показана на примере молекулы бычьего сывороточного ингибитора.

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование, молекулярная динамика при постоянном рН, сольватация, электростатика, потенциал средних сил, равновесное титрование.

MOLECULAR DYNAMICS METHOD FOR PROTEINS WITH IONIZATION-CONFORMATION COUPLING AND EQUILIBRIUM TITRATION, by *Y. N. Vorobyev* (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: ynvorob@niboch.nsc.ru). A new realization of the constant-pH molecular dynamics simulation method is proposed. Molecular dynamics simulation is performed for a protein in the most probable ionization microstate of the current conformation taking into account the potential of mean force of protein molecule in the water-proton bath in equilibrium titration conditions (MD-pH-ET). It is shown that: 1) the optimal one is the simulation of the protein in the most probable ionization state, for a given conformation, taking into account the correction ionization potential of mean force, which results in the equilibrium ensemble of ionization states; 2) new method MD-pH-ET allow one to carry out an optimization of protein structure and the total free energy of a protein in the aqueous solution at constant pH, and to calculate the pH-dependent properties. Method MD-pH-ET possesses the unique features: 1) it uses the most precise and computational-effective realization of calculation of the electrostatic energy of a protein in water solution, the model of continuous dielectric media with Poisson equation and the generalized Born method with “ideal” Born atomic radii; 2) it uses the same model of the potential energy surface in the ionization-conformational phase space, both for calculating the potential energy of the protein and atomic forces and for determining the most probable ionization states; 3) it calculates the total free energy of the protein in the aqueous solution in proton reservoir under the conditions of equilibrium titration. The workability of the new method MD-pH-ET is demonstrated for the molecule of protein BPTI.

**Keywords:** molecular modeling, constant pH molecular dynamics, solvation, electrostatics, potential of mean forces, equilibrium titration.

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; МД-рН-РТ – молекулярная динамика при постоянном рН в условиях равновесного титрования; МК – метод Монте-Карло; ВРТИ – белок-ингибитор бычьего трипсина; *GB* – обобщенный метод Борна; *FAMBE* – быстрый адаптивный метод пограничных элементов для решения уравнения Пуассона и расчета энергии электростатической поляризации среды; *FAMBEpH* – метод расчета свободной энергии ионизации молекулы белка при заданном рН на основе метода *FAMBE*; *FAMBE-GB* – метод *GB* комбинированный с методом *FAMBE*, который использован для расчета точных борновских радиусов атомов молекулы белка.

\* Эл. почта: ynvorob@niboch.nsc.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Биологические макромолекулы функционируют в клетке при различных концентрациях протонов, т.е. величинах pH. Стабильность структуры и функциональная активность молекул белков коррелирует с величиной pH водного раствора, которая определяет степень ионизации боковых и концевых групп. Ионизационное микросостояние для  $\zeta$  ионизируемых групп может быть представлено вектором  $\mathbf{z} = (z_1, z_2, \dots, z_\zeta)$ , описывающим одно из  $2^\zeta$  микросостояний, где величины  $z_i = 1.0$  (ионизированное или нейтральное) состояния  $i$ -ой группы. Потенциальная энергия молекулы белка в конформации с координатами атомов  $\mathbf{r}$ , ионизационным состоянием  $\mathbf{z}$  и заданной величиной pH является функцией этих переменных. Равновесный ансамбль ионизационных микросостояний молекулы белка в растворе при заданном pH характеризуется средней степенью  $\langle z_i \rangle$  протонирования  $i$ -го сайта ионизации. В случае белков характерна связь между величиной pH, степенью ионизации групп и конформацией молекулы, поскольку пространственная структура определяет степень экспонированности групп в раствор и влияет на энергетику связывания и диссоциации протонов [1–5]. Доля ионизируемых боковых групп молекул в молекулах белков достигает 30%, поэтому разработка реалистического метода молекулярной динамики, учитывающего конформационно-ионизационную зависимость при заданном pH раствора актуальна [6, 7].

В последние три десятилетия предприняты значительные усилия для разработки эффективных вычислительных алгоритмов традиционного метода молекулярной динамики (МД) [8], более точных силовых полей для оценки энергий атом-атомных взаимодействий и микроскопических сил, действующих на атомы молекулы в растворе [9–14]. Разработаны несколько пакетов программ метода МД, например, AMBER [15], CHARMM [16], CROMOS [17], GROMACS [18] и NAMD [19], позволяющих моделировать основные биополимеры, т.е. белки, нуклеиновые кислоты и липиды, рассматривая молекулу в постоянном ионизационном состоянии, независимом от конформации молекулы.

За последнее десятилетие предложено несколько методов МД-pH, позволяющих выполнить молекулярно динамическое моделирование при постоянном pH с флуктуирующими ионизационными состояниями сайтов протонирования. Эти методы могут быть разбиты на две категории, а именно, методы *неявного титрования* с непрерывным представлением ионизационных состояний [7, 20] и *стохастического титрования*, явно рассматривающие дискретные, физические, ионизационные микросостояния [21, 22]. Отправной точкой метода неявного титрования [7] является строгое статистико-механическое рассмотрение потенциала средних сил  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  молекулы в протонном резервуаре для равновесного ансам-

бля ионизационных состояний  $\mathbf{z}$  молекулы белка. Баптиста [7] после ряда приближений реализует метод, в котором потенциал средних сил зависит только от средней степени ионизации сайтов  $\langle z_i \rangle$ , непрерывного параметра, зависящего от координат атомов  $\mathbf{r}$  молекулы белка и вычисляемого по некоторой (более или менее аккуратной) физической модели. Величины  $\langle z_i \rangle$  в этой работе рассчитывали на основе упрощенной модели Танфорда–Кирквуда [2], в которой объем и молекулярную поверхность молекулы белка аппроксимировали сферой. Метод Хюненбергер [20] рассматривает непрерывную релаксацию степени ионизации сайтов от некоторых стартовых значений  $\langle z_i \rangle_0$  до равновесных значений  $\langle z_i \rangle$  с помощью слабого связывания с протонным резервуаром. Хандогин и Брукс [23–25] разработали модель МД с изменением степени протонирования (депротонирования) и таутомеризма сайтов протонирования, в которой степени протонирования и таутомеризма рассматриваются как непрерывные динамические переменные  $\lambda$ . Энергии электростатических взаимодействий и соответствующие силы, действующие на атомы, в зависимости от фазовых координат системы  $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{z}$ ,  $\lambda$  вычисляли в приближении модели диэлектрических сред и обобщенной борновской ( $GB$ ) модели [23–25].

В методе стохастического титрования — гибридном МК-МД-методе — рассматривают блуждание в пространстве дискретных ионизационных микросостояний, генерируемых методом Монте-Карло (МК), сопряженное с последующей МД белка в выбранном ионизационном микросостоянии [21, 22, 26, 27]. Марковскую цепь из принятых ионизационных микросостояний генерирует метод Метрополиса на основе расчетов разности энергий  $\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z}_1, \mathbf{z}_2; \text{pH})$  для пар микросостояний  $\mathbf{z}_1, \mathbf{z}_2$ . Расчеты электростатической энергии ионизационных микросостояний выполняют по  $GB$ -модели [22, 26, 27] или более точной модели диэлектрических сред и уравнения Пуассона–Больцмана [21]. Периодическое повторение выбора ионизационного микросостояния и последующая МД этого ионизационного состояния позволяет, при большом числе МК- и МД-повторов, генерировать канонический ансамбль конформационных и ионизационных состояний. Основные проблемы, с которыми сталкиваются известные реализации метода МД-pH, заключаются в следующем. 1) Медленная сходимость гибридных методов МК-МД-генерации ансамбля конформационных и ионизационных состояний [21–27]. Статистическая сходимость может быть достигнута только тогда, когда для каждого конформационного состояния молекулы белка будет присутствовать достаточно большое количество ионизационных микросостояний, порядка  $10^4$ – $10^5$ . 2) Недостаточная точность методов расчета изменения электростатической энергии разных ионизационных микросостояний состояний. Это влияет на генерацию репрезентатив-

ного ансамбля ионизационных состояний в гибридных методах МК-МД и на расчет потенциала средних сил  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  в методе равновесного титрования [7].

Развитие метода МД-рН на основе гибридных методов более популярно в последнее время [21–27]. Различие между разными реализациями гибридных методов МК-МД состоит в моделях растворителя при выполнении молекулярной динамики, способах расчета разности энергии ионизационных микросостояний и протоколах выборки ионизационных микросостояний. Некоторые реализации гибридного МК-МД-метода используют явную молекулярную модель водного растворителя [21, 28] для МД-шага моделирования конформационной динамики и модель диэлектрических сред Пуассона–Больцмана [21] для расчета энергий ионизационных состояний. Расчеты этим методом для молекул белков, достаточно затратные по времени, поэтому выбор ионизационного микросостояния методом МК делают один раз в 2 пс [21, 28, 29], так что расчеты МК-МД-траекторий длительностью в 10 нс содержат всего  $5 \times 10^3$  ионизационных микросостояний на все конформационные состояния молекулы белка, что может быть не достаточным для статистической сходимости. Использование разных моделей растворителя для выбора ионизационного состояния методом МК и для релаксации структуры методом МД [21, 28, 29] также является недостатком, поскольку это нарушает единое описание энергии молекулы в ионизационно-конформационном пространстве состояний  $(\mathbf{z}, \mathbf{r})$  и вносит погрешности в расчет ионизационно-конформационной связи. Расчеты разности энергии для МК-шага методом термодинамического интегрирования требуют не менее 20 пс МД-траектории [30]. Более последовательные реализации гибридного метода МК-МД [22–27] используют *GB*-модель растворителя, как для выбора ионизационного состояния методом МК, так и для МД-моделирования программным пакетом AMBER8. Модель *GB* с расчетом атомных борновских радиусов на основе расчета интеграла от энергии электростатического поля по объему молекулы обладает недостаточной точностью [31]. Метод МД-рН на основе динамики в ионизационном потенциале средних сил фактически не развивали [26]. Во-первых, из-за отсутствия достаточного точного и вычислительно эффективного метода расчета потенциала средних сил  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  для молекулы белка в растворе в протонном резервуаре. Во-вторых, реализация гибридного метода МК-МД стохастического титрования при постоянном рН технически проще: последовательная работа программ генерации ионизационного микросостояния методом МК и последующей релаксации этого микросостояния (т.е. соответствующей топологии молекулы белка) стандартными методами молекулярной динамики AMBER [22] или GRO-MACS [21].

Цель настоящей работы – разработка новой реализации метода МД при постоянном рН в протонном резервуаре в условиях *равновесного титрования* (МД-рН-РТ) с аккуратной моделью потенциала средних сил  $G(\mathbf{x}; \text{pH})$ . С помощью этого метода можно выполнить расчет ионизационного равновесия и МД молекулы в единой модели потенциальной энергии  $G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH})$  молекулы белка. Показано, что оптимальный протокол МД-рН-РТ включает выполнение МД для молекулы белка в наивероятном ионизационном микросостоянии, имеющем минимальную энергию. При этом учитывают поправки, обусловленные добавочным потенциалом средних сил, полученным усреднением по ансамблю всех ионизационных микросостояний. Важное значение для реализации МД-рН-РТ имеет эффективный метод расчета равновесного и наивероятного ионизационных состояний, выполняемый с помощью метода FAMBE [32–35], который использует модель диэлектрических сред с решением уравнения Пуассона с применением техники адаптивных поверхностных элементов. FAMBE обладает рядом особенностей [32–35], делающих его предпочтительнее решения уравнения Пуассона методом конечных разностей для расчетов электростатической энергии макромолекул [29, 30]. В настоящей работе этот метод сопряжен с обобщенным методом *GB* и использован для расчета “идеальных” борновских радиусов атомов [36] для метода *GB*. Электростатические силы, действующие на атомы белка, вычисляют методом *GB*. Показано, что сопряженный метод FAMBE-*GB* позволяет значительно ускорить расчеты электростатической энергии молекул белков без потери точности оригинального метода FAMBE [35].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Потенциал средних сил для молекулы белка в водном растворе при постоянном рН.** Рассмотрим молекулу белка, состоящую из  $N$  атомов с координатами  $\mathbf{r} = (\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$  и из  $\xi$  сайтов протонирования. Ионизационное микросостояние можно описать вектором  $\mathbf{z} = (z_1, z_2, \dots, z_\xi)$ ,  $z_i = 0.1$ . Полное число ионизационных микросостояний равно  $2^\xi$ . Мгновенные микросостояния молекулы в конформационно-ионизационном фазовом пространстве представлены парой векторов  $(\mathbf{r}, \mathbf{z})$ . Конформационная динамика молекулы белка в водном растворе в протонном резервуаре при постоянном значении рН задана действующими на атомы молекулы микроскопическими силами – градиентами потенциала средних сил  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  по координатам атомов. Потенциал средних сил  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  – свободная энергия молекулы белка в заданной конформации  $\mathbf{r}$  в водном растворе в протонном резервуаре при заданном рН. Свободная энергия  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  молекулы белка в водном растворе при постоянном рН в протонном резервуаре в

условиях *равновесного титрования* определена в работе [35]:

$$G(\mathbf{r}, \text{pH}) = U_{\text{mol}}^0(\mathbf{r}) + G_{\text{cav}}(\mathbf{r}) + G_{\text{pol}}^0(\mathbf{r}) + \Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}, \text{pH}), \quad (1)$$

где три последних слагаемых уравнения описывают изменения энергии для трех стадий термодинамического процесса транспорта молекулы белка в нейтральном состоянии (все группы не ионизированы) в фиксированной конформации из вакуума в водный раствор при постоянном pH:  $U_{\text{mol}}^0(\mathbf{r})$  – энергия молекулы в вакууме,  $G_{\text{cav}}(\mathbf{r})$  – энергия создания молекулярной полости вытесненного водного растворителя с учетом ван-дер-ваальсовых взаимодействий белка, вставленного в эту полость, с окружающей водой (*стадия 1*);  $G_{\text{pol}}^0(\mathbf{r})$  – свободная энергия поляризации водного раствора белком с нейтрально-заряженными группами, т.е. непротонированными основными и протонированными кислотными (*стадия 2*), и последний член  $\Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}, \text{pH})$  – свободная энергия ионизации молекулы белка от исходного нейтрального состояния с нулевым вектором  $\mathbf{z}_0 = (0, 0, 0, \dots, 0)$  до равновесного ионизационного состояния  $\langle \mathbf{z} \rangle$  при заданном pH раствора (*стадия 3*). Свободная энергия ионизации  $\Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}, \text{pH})$  белка в конформации  $\mathbf{r}$  в протонном резервуаре [35] задана выражением

$$\Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}; \text{pH}) = -kT \ln \left\{ \sum_{\mathbf{z}} \exp[-\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH})/kT] \right\}, \quad (2)$$

где суммирование выполняют по всем  $2^\xi$  ионизационным микросостояниям. Изменение энергии белка  $\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z})$  в протонном резервуаре от исходного нейтрального состояния  $\mathbf{z}_0$  до состояния  $\mathbf{z}$  равно разности свободных энергий системы (белок + протоны), соответствующих этим состояниям

$$\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH}) = G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH}) - G(\mathbf{r}, \mathbf{z}_0). \quad (3)$$

Эта энергия имеет электростатическую природу и может быть представлена как сумма электростатических энергий независимой ионизации сайтов и изменения их парных электростатических взаимодействий в водном растворе

$$\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH}) = \sum_{i=1}^{\xi} z_i [\gamma_i k_B T \ln 10 (\text{pH} - \text{p}K_{\text{mod}, i}) + (\Delta g_i(\mathbf{r}) - \Delta g_{\text{mod}, i})] + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N z_i z_j \Delta w_{ij}(\mathbf{r}), \quad (4)$$

где  $\gamma_i = (1, -1)$  для сайта протонирования основания и кислоты соответственно,  $\Delta g_i(\mathbf{r})$  – изменение пол-

ной электростатической энергии (т.е. внутримолекулярной энергии и поляризации растворителя) при ионизации одной группы  $i$  в нейтральной молекуле белка,  $\Delta g_{i, \text{mod}}$  – изменение электростатической энергии группы  $i$  в модельном соединении (в аминокислоте, изолированной от белка),  $\text{p}K_{\text{mod}, i}$  – константа ионизации в модельном соединении  $i$ ,  $\Delta w_{ij}(\mathbf{r})$  – дополнительная энергия парного электростатического взаимодействия ионизированных сайтов  $i, j$  при последовательной ионизации этих групп в неионизированной молекуле белка [35, 37]

$$\Delta w_{ij}(\mathbf{r}) = w_{pp}(\mathbf{r}) - w_{0p}(\mathbf{r}) - w_{p0}(\mathbf{r}) + w_{00}(\mathbf{r}), \quad (5)$$

где  $w_{pp}(\mathbf{r})$ ,  $w_{0p}(\mathbf{r})$ ,  $w_{p0}(\mathbf{r})$ ,  $w_{00}(\mathbf{r})$  – электростатические взаимодействия сайтов  $i, j$  в ионизированном ( $p$ ) и нейтральном ( $0$ ) состояниях. Выражение (1) определяет полную энергию молекулы белка  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$ . Полная энергия  $G(\mathbf{r}; \text{pH})$  может быть представлена относительно энергии выделенного *наивероятного* оптимального ионизационного микросостояния  $\mathbf{z}_p$ , обладающего минимальной энергией

$$G(\mathbf{r}, \text{pH}) = U_{\text{mol}}^p(\mathbf{r}) + G_{\text{cav}}(\mathbf{r}) + G_{\text{pol}}^p(\mathbf{r}) + \Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH}), \quad (6)$$

где  $U_{\text{mol}}^p$  – энергия молекулы в вакууме с заряженными группами в наивероятном ионизационном микросостоянии, которая является результатом перехода исходной нейтральной молекулы в вакууме в оптимальное ионизационное состояние,  $G_{\text{cav}}(\mathbf{r})$  – энергия создания полости в водном растворе с учетом ван-дер-ваальсовых взаимодействий белок-вода,  $G_{\text{pol}}^p(\mathbf{r})$  – свободная энергия поляризации водного раствора белком с заряженными группами в оптимальном ионизационном состоянии,  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$  – свободная энергия ионизации молекулы белка относительно оптимального ионизационного состояния  $\mathbf{z}_p$ . Из выражений (2), (3) следует, что энергия равновесной ионизации  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$  от состояния  $\mathbf{z}_p$  равна

$$\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH}) = \Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}, \text{pH}) + [G(\mathbf{r}, \mathbf{z}_0) - G(\mathbf{r}, \mathbf{z}_p, \text{pH})]. \quad (7)$$

Следовательно, свободная энергия равновесной ионизации  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$  минимальна по абсолютной величине, если состояние  $\mathbf{z}_p$  – оптимальное ионизационное состояние с минимальной энергией  $G(\mathbf{r}, \mathbf{z}_p)$ .

Альтернативное выражение для  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$  следует из выражений (4) и (6)

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH}) = & \Delta G_{\text{inz}}^0(\mathbf{r}, \text{pH}) - \\ & - \sum_{i=1}^{\xi} z_{p,i} \gamma_i [k_B T \ln 10(\text{pH} - pK_{\text{mod},i}) + (\Delta g_i(\mathbf{r}) - \\ & - \Delta g_{\text{mod},i})] - \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N z_{p,i} z_{p,j} \Delta w_{ij}(\mathbf{r}), \end{aligned} \quad (8)$$

где  $z_{p,i}$  – степень ионизации  $i$ -го сайта протонирования. Соответственно выражение (1) для полной энергии молекулы белка при постоянном pH может быть представлено в виде выражения (6). Отметим, что первые три члена правой части уравнения (6) соответствуют физически реальной структуре протонированной молекулы в оптимальном ионизационном состоянии  $z_p$ , а поправочный член  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$ , определяющий потенциал средних сил *равновесного титрования*, минимален для оптимального ионизационного состояния.

**Общая формулировка алгоритма метода МД-рН-РТ с равновесным титрованием.** Молекулярная динамика атомов молекулы белка в статистико-механическом потенциале средних сил равновесного титрования, описанного выражением (1) или (6), может быть описана как динамика молекулы в оптимальном наивероятном ионизационном состоянии с учетом поправок  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$ , учитывающих отклонение энергии оптимального ионизационного состояния от потенциала средних сил равновесного ансамбля ионизационных состояний. Модель равновесного титрования рассматривает обмениваемые протоны как неявные частицы, которые определяют полную энергию, описываемую уравнением (6), и соответствующее поле сил, в котором движутся атомы молекулы белка. Алгоритм метода МД-рН-РТ является циклическим, поскольку оптимальное ионизационное состояние  $z_p$  и энергия  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$ , зависящие от конформации молекулы белка, должны периодически пересчитываться в соответствии с текущей конформацией  $r$ . Рассчитывают оптимальное ионизационное состояние  $z_p$  для исходной конформации белка  $r_0$  и значения pH, и для него инициализируют молекулярную динамику при заданной температуре  $T$ : 1) для данной мгновенной конформации  $r$  вычисляют оптимальное ионизационное состояние  $z_p$  методом FAMBEPH [35]; 2) для оптимального ионизационного состояния  $z_p$  моделируют молекулярную динамику в течение времени  $\tau_{\text{MD}} = 4-10$  пс, далее переходят к пункту 1). Минимальность амплитуды потенциала неявного титрования  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$  означает малую амплитуду поправочных сил, обусловленных потенциалом равновесного титрования, по сравнению с атомными силами

стандартного метода МД для молекулы в оптимальном ионизационном состоянии. Малость поправочных сил позволяет получать более стабильные МД-траектории. Генерация МД-траектории при постоянных pH и температуре позволяет сканировать конформационно-ионизационное пространство вдоль траекторий низких энергий на поверхности потенциальной энергии, определенной выражением (6), и находить как конформации молекулы, отвечающие минимальным полным энергиям, так и средние значения физико-химических свойств, связанные с ионизационным равновесием.

**Расчет атомных сил метода МД-рН-РТ.** Расчет полной энергии молекулы по выражениям (6), (8) для атомных сил и моделирование методом молекулярной динамики выполняется модифицированным программным пакетом BISON [38, 39], который использует силовое поле AMBER [12] для расчета внутренней энергии  $U_{\text{mol}}^p$ . Энергию образования полости  $G_{\text{cav}}(\mathbf{r})$  вычисляют как величину, пропорциональную молекулярной поверхности  $S$  молекулы белка [33]

$$G_{\text{cav}}(\mathbf{r}) = \gamma S(\mathbf{r}), \quad (9)$$

где величина поверхностной энергии  $\gamma = 39$  кал/моль/Å<sup>2</sup>. Градиент молекулярной поверхности  $S(\mathbf{r})$  по координатам атома  $i$ , необходимый для расчета сил, можно определить как

$$\frac{\partial S(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}_i} = L_i \approx 2 \left( \pi \left| \sum_{\alpha \in i} \mathbf{n}_\alpha \Delta s_\alpha \right| \right)^{1/2} \frac{\sum_{\alpha \in i} \mathbf{n}_\alpha \Delta s_\alpha}{\left| \sum_{\alpha \in i} \mathbf{n}_\alpha \Delta s_\alpha \right|}, \quad (10)$$

где  $L_i$  – длина контура, ограничивающая часть изменяющейся молекулярной поверхности, связанной с атомом  $i$ ,  $\Delta s_\alpha$  – площадь,  $\mathbf{n}_\alpha$  – единичный вектор нормали поверхностного элемента  $\alpha$ , принадлежащего атому  $i$ . Длину контура  $L_i$  вычисляют приближенно для каждого атома  $i$  параллельно с расчетом молекулярной поверхности методом SIMS [40]

Атомные силы, обусловленные энергией равновесной ионизации  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$ , в выражениях (7), (8)

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}; \text{pH})}{\partial \mathbf{r}_i} = & \left\langle \frac{\partial \Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{z}, \text{pH})}{\partial \mathbf{r}_i} \right\rangle_z - \\ & - \sum_{i=1}^{\xi} z_{p,i} \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \Delta g_i(\mathbf{r}) - \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N z_{p,i} z_{p,j} \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \Delta w_{ij}(\mathbf{r}) = \\ & = \sum_{i=1}^{\xi} [\langle z_i \rangle - z_{p,i}] \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \Delta g_i(\mathbf{r}) + \\ & + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N [\langle z_i z_j \rangle - z_{p,i} z_{p,j}] \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \Delta w_{ij}(\mathbf{r}), \end{aligned} \quad (11)$$

где  $\langle \rangle_{\mathbf{z}}$  – среднее по ансамблю ионизационных микросостояний. Электростатические энергии  $\Delta g_i(\mathbf{r})$  ионизации группы  $i$ , энергии парных взаимодействий  $\Delta w_{ij}(\mathbf{r})$  ионизированных групп  $i, j$ , оптимальные  $z_{p, i}$ , средние степени ионизации  $\langle z_i \rangle$  и  $\langle z_i z_j \rangle$  вычисляются для заданной конформации белка  $(\mathbf{r})$  методом FAMBEpH [35].

**Метод FAMBE-GB – “идеальный” обобщенный борновский метод.** Чтобы ускорить вычисления электростатических энергий и сил, обусловленных поляризацией растворителя при взаимодействии между атомами молекулы белка в водном растворе, метод FAMBEpH [35] сопряжен с обобщенным борновским методом. Ранее показано, что GB-метод с “идеальными” атомными борновскими радиусами [36] аппроксимирует электростатическую энергию парных взаимодействий атомов молекулы белка в среде, вычисленную в модели диэлектрических сред путем решения уравнения Пуассона с точностью ~3%. Тогда как традиционно применяемая борновская модель с расчетом борновских радиусов атомов интегрированием по объему молекулы белка [31, 36] дает большие отклонения от результатов метода уравнения Пуассона. Идеальные борновские радиусы,  $B_i$  – радиусы, которые в GB-методе дают собственные поляризационные энергии атомов, равные их собственным энергиям в методе уравнения Пуассона. Сопряжение метода GB с расчетом “идеальных” радиусов  $B_i$  решением уравнения Пуассона методом конечных разностей [36] дает слишком медленный способ вычислений “идеальных” радиусов, не приемлемый для метода МД. Попытки эмпирической коррекции выражения для атомных борновских радиусов на основе модификаций интеграла энергии электрического поля атома по объему молекулы белка [31, 36] не дают точности, сравнимой с точностью метода GB с “идеальными” борновскими радиусами. Метод FAMBE позволяет рассчитать “идеальные” радиусы  $B_i$  значительно быстрее метода конечных разностей. Этот метод решает уравнение Пуассона методом адаптивных поверхностных элементов и вычисляет плотность поляризационных зарядов  $\sigma_i(\mathbf{s})$  на молекулярной поверхности  $S$  для каждого заряженного атома  $i$  молекулы белка. Собственная энергия поляризации раствора  $g_i$  атомом  $i$  равна

$$g_i = \frac{q_i}{2} \int_S \frac{\sigma_i(\mathbf{s}) ds}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{s}|}, \quad (12)$$

где  $S$  – молекулярная поверхность,  $\mathbf{r}_i$  – координата атома  $i$ ,  $q_i$  – заряд атома. Соответственно идеальный борновский радиус  $B_i$  атома  $i$  определяют из выражения

$$g_i = \left( \frac{1}{D_s} - \frac{1}{D_m} \right) \frac{q_i^2}{B_i}, \quad (13)$$

где  $D_m, D_s$  – диэлектрические проницаемости в объеме молекулы белка и окружающем растворителе, в модели диэлектрических сред. Полная энергия поляризации раствора зарядами молекулы белка в методе FAMBE – сумма собственных энергий поляризации  $g_i$  зарядами  $i$  и энергий  $w_{ij}$  поляризационных взаимодействий пар зарядов  $i, j$ .

$$G_{\text{pol}}(r) = \frac{1}{2} \sum_i q_i \int_S \frac{\sigma_i(\mathbf{s}) ds}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{s}|} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} q_i \int_S \frac{\sigma_j(\mathbf{s}) ds}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{s}|} = \sum_i g_i + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} w_{ij}. \quad (14)$$

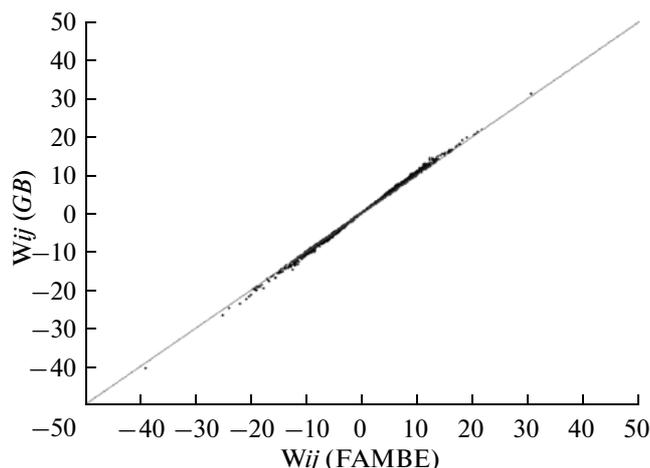
Полную энергию поляризации раствора в GB-методе также можно описать суммой собственных энергий атомов  $g_i$  и поляризационных взаимодействий  $w_{ij}$  пар атомов

$$G_{\text{pol}}^{GB}(r) = \left( \frac{1}{D_s} - \frac{1}{D_m} \right) \sum_i \frac{q_i^2}{B_i} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \frac{q_i q_j}{f_{GB}(r_{ij}, B_i, B_j)} \left( \frac{1}{D_s} - \frac{1}{D_m} \right) = \sum_i g_i^{GB} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} w_{ij}^{GB}, \quad (15)$$

где  $f_{GB}$  – функция [35]

$$f_{GB}(r, B_i, B_j) = \left[ r^2 + B_i B_j \exp(-r^2/4B_i B_j) \right]^{1/2}. \quad (16)$$

Метод GB с “идеальными” радиусами, по определению, точно воспроизводит величины собственных энергий атомов  $g_i$ . Сравнение энергий поляризационных взаимодействий  $w_{ij}$  атомов  $i, j$ , вычисленных методом FAMBE и методом GB для атомов молекул белков, показало, что метод GB с “идеальными” радиусами аккуратно воспроизводит расчеты методом FAMBE со средней точностью ~1.5%. Поэтому расчет энергий поляризации и сил, действующих на атомы, выполняют аппроксимацией электростатических взаимодействий методом GB с “идеальными” борновскими радиусами атомов. Алгоритм метода МД-pH-PT с расчетом атомных сил методом FAMBE-GB выглядит следующим образом: 1) для данной конформации  $\mathbf{r}$  молекулы белка методом FAMBEpH вычисляют наивероятное, оптимальное ионизационное состояние, энергию равновесной ионизации  $\Delta G_{\text{inz}}^p(\mathbf{r}, \text{pH})$ , степени ионизации  $z_{p, i}$  наивероятного ионизационного состояния и средние степени ионизации  $\langle z_i \rangle$ , средние значения ионизации пар сайтов  $\langle z_i z_j \rangle$ ; 2) рассчитывают “идеальные” борновские атомные радиусы  $B_i$  методом FAMBE; 3) выполняют моделирование методом МД для молекулы в наивероятном ионизационном микросостоянии в течении времени  $\tau_B \sim 0.02-0.04$  пс, или 10–20 временных шагов, 4) переходят к пункту



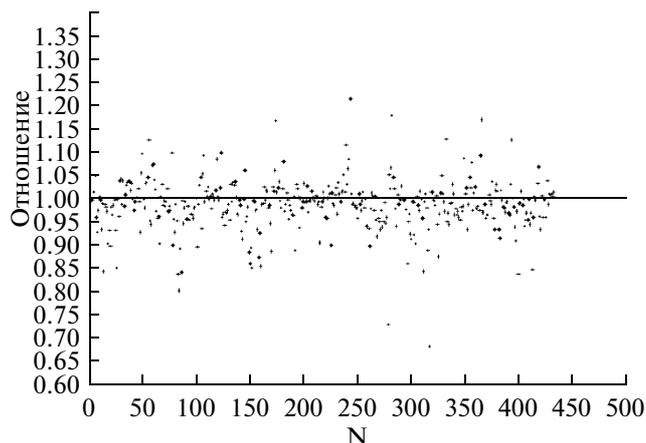
**Рис. 1.** Сравнение поляризационных энергий взаимодействий  $W_{ij}$ (FAMBE) атомов  $i, j$ , вычисленных по методу FAMBE и обобщенному методу Борна с “идеальными” борновскими радиусами  $W_{ij}$ (GB) (см. уравнения (13) и (14) соответственно). Прямая линия соответствует точному равенству величин  $W_{ij}$ (FAMBE) и  $W_{ij}$ (GB).

2) и “идеальные” борновские радиусы атомов пересчитывают для текущей конформации, 5) проводят моделирование методом МД в течение времени  $\tau_{MD} = 2-5$  пс при данном наивероятном ионизационном микросостоянии, и далее возвращаются к пункту 1) для расчета нового оптимального ионизационного состояния.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Точность метода FAMBE-GB

Обобщенная модель Борна GB с “идеальными” борновскими радиусами, вычисленными по уравнениям (11) и (12), проверена на точность воспроизведения энергий парных электростатических поляризационных взаимодействий  $w_{ij}$ (GB) атомов  $i, j$  в растворе (второй член уравнения (14)). На рис. 1 приведено сравнение энергий  $w_{ij}$ (GB) с энергиями парных взаимодействий  $w_{ij}$ (FM), рассчитанными по методу FAMBE [35]. Расчеты выполнены для нескольких конформаций бычьего трипсина ингибитора (ВРТИ, код PDB – 4pty), диэлектрические константы  $D_m, D_s$  равны 2.0 и 80.0 соответственно [26, 27]. Борновские радиусы атомов для этого белка в нативной конформации находятся в интервале значений 1.25–8.43 Å, т.е. они достаточно велики для атомов внутренней части белка. На рис. 1 видно, что метод GB с “идеальными” радиусами воспроизводит расчеты методом FAMBE со средней точностью ~1.5%, а максимальная ошибка не превышает 3%. Расчет парных электростатических взаимодействий атомов  $w_{ij}$  методом GB (выражение (14)) значительно быстрее, чем методом

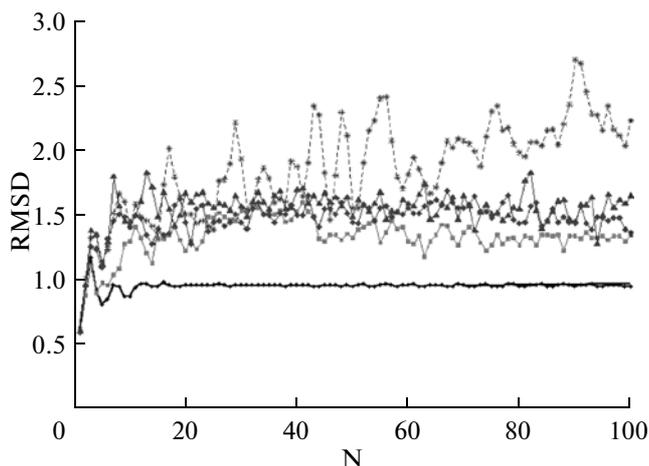


**Рис. 2.** Отношения “идеальных” борновских радиусов атомов молекулы белка ВРТИ, рассчитанных для двух мгновенных структур, разделенных интервалом времени 0.5 пс, полученные методом молекулярной динамики для уравновешенной структуры. N – порядковый номер тяжелого атома.

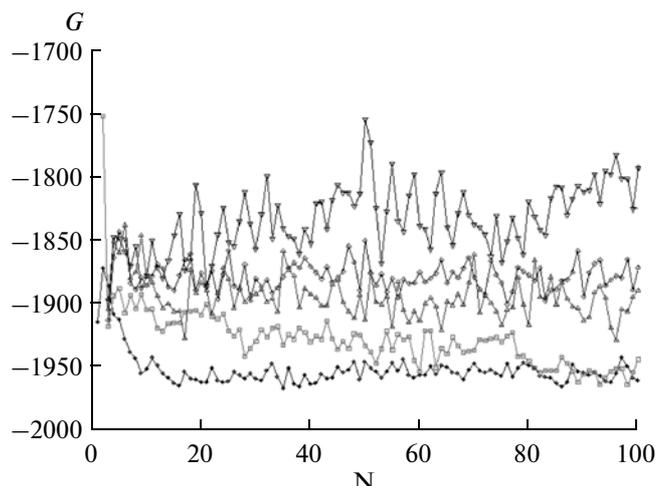
FAMBE (выражение (13)), требующим интегрирования по молекулярной поверхности.

### Частота коррекции борновских радиусов

Изменение конформации и координат атомов молекулы  $\mathbf{r}$  белка приводит к изменению величин “идеальных” борновских радиусов атомов  $B_i$ , являющихся функциями атомных координат. Расчет величин “идеальных” борновских радиусов методом FAMBE – вычислительно емкая процедура, поэтому пересчет (обновление) борновских радиусов разумно выполнять с максимально возможным интервалом времени. На рис. 2 приведено изменение отношения величин борновских радиусов атомов, вычисленное для двух молекулярно-динамических структур молекулы ВРТИ, разделенных интервалом времени 0.5 пс на молекулярно динамической траектории при  $T = 100$  К. Видно, что большая часть борновских радиусов изменяется в пределах 5%, однако примерно для 10–15% атомов отклонения превышают 5%. Использование борновских радиусов, не соответствующих их действительным значениям для текущей конформации белка, приводит к погрешностям при расчете атомных сил и накоплению ошибок при моделировании движений атомов. На рис. 3 и 4 приведены зависимости среднего квадратичного смещения атомов (RMSD) и полной энергии  $G$ , определяемой выражением (6), для белка ВРТИ, полученные при pH = 7.0 для МД-pH траекторий, рассчитанных с разными временными интервалами сохранения “идеальных” борновских радиусов. Видно, что расчетам с наименьшим интервалом сохранения  $\tau_B = 0.02$  пс (или 10 элементарных шагов



**Рис. 3.** Среднее квадратичное смещение RMSD атомов относительно начальной структуры молекулы ВРТИ для структур, генерированных методом МД-рН-РТ с разными временами перерасчета (обновления) величин “идеальных” борновских радиусов. Кривым в порядке возрастания величины RMSD соответствуют времена обновления равные 0.02, 0.04, 0.10, 0.20 и 0.50 пс. N – порядковый номер мгновенной структуры, рассчитанной с интервалом в 1 пс.



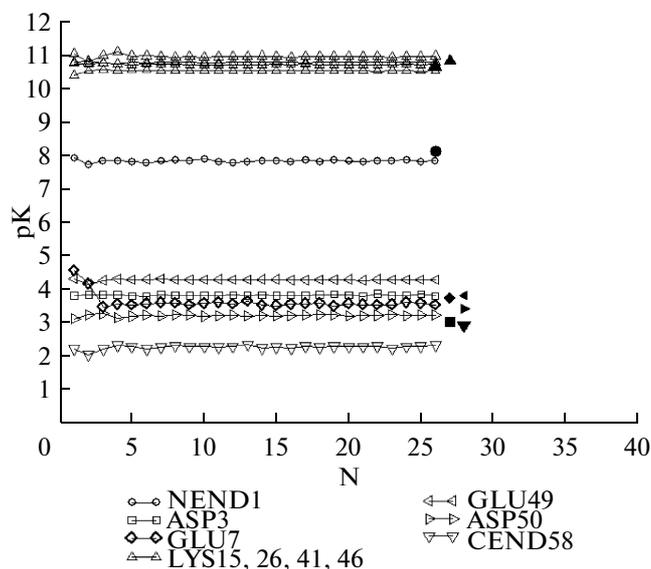
**Рис. 4.** Полная энергия  $G$  молекулы ВРТИ для структур, генерированных методом МД-рН-РТ с разными временами обновления величин “идеальных” борновских радиусов. Кривым в порядке возрастания величины энергии  $G$  соответствуют времена обновления равные 0.02, 0.04, 0.10, 0.20 и 0.50 пс. N – порядковый номер мгновенной структуры, рассчитанной с интервалом в 1 пс.

интегрирования уравнений движения) соответствует стабильная МД-траектория. Расчеты с интервалом с  $\tau_B = 0.04$  пс (или 20 элементарных шагов) также можно признать стабильными, энергия молекулы белка близка к результатам расчетов с  $\tau_B = 0.02$  пс. МД-траектории блуждания по поверхности энергии  $G$  (выражение (6)), рассчитанные с большими интервалами сохранения  $\tau_B$  (0.1, 0.2 пс), соответствуют стабильным структурам, однако проходят через точки фазового пространства с большими энергиями, что связано с погрешностями в расчете атомных сил и соответствующими ошибками расчета траектории движения на поверхности потенциальной энергии. Расчеты МД-траекторий с интервалами сохранения “идеальных” борновских радиусов  $\tau_B$ , равными 0.2 или 0.5 пс, оказываются еще более возмущенными. Таким образом, оптимальный временной интервал сохранения  $\tau_B$  равен 0.02–0.04 пс, при котором МД-траектория температурных флуктуаций молекулы белка в конформационно-ионизационном фазовом пространстве проходит вдоль областей низких энергий на поверхности потенциальной энергии и соответствует стабильным структурам.

**Временной интервал сохранения оптимального ионизационного состояния**

Время моделирования  $\tau_{MD}$  методом МД при текущем оптимальном ионизационном состоянии, т.е. интервал сохранения ионизационного состояния, должно быть достаточным для релаксации конформации боковых групп молекулы белка. Это время лежит в пс-шкале времен. С другой стороны, вели-

чина  $\tau_{MD}$  должна быть достаточно малой, чтобы изменение структуры молекулы (смещения атомов) было незначительным, менее 0.5–1 Å, и не влекло резкого изменения ионизационного состояния. Таким требованиям к величине  $\tau_{MD}$  удовлетворяет интервал равный 2–5 пс.



**Рис. 5.** Константы ионизации  $pK$  аминокислотных остатков ВРТИ, рассчитанные вдоль молекулярно-динамической траектории метода МД-рН-РТ. N – порядковый номер цикла расчета констант ионизации, разделенных интервалом 4 пс. Заштрихованные символы соответствуют экспериментальным значениям констант ионизации  $pK$  [35].

### Константы ионизации рК остатков

Расчеты констант ионизации остатков ВРТИ вдоль МД-рН траектории при рН = 7.0 приведены на рис. 5. Видно, что константы ионизации изменяются вдоль МД-рН-траектории на величину более 1.0 единицы рН (например, для остатка Glu7). На начальном участке МД-рН траектории, когда структура ВРТИ близка к кристаллической, отклонение расчетных значений констант ионизации рК от экспериментальных выше, чем для уравновешенной части траектории после 50–60 пс моделирования. В целом эти значения на уравновешенной части МД-траектории лучше соответствуют экспериментальным (среднее отклонение – ~0.3, максимальное отклонение – ~0.7 единиц рК), чем расчеты для статической кристаллической структуры ВРТИ по FАM-VE-рН и другим методам, приведенным в табл. 7 работы [35].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель настоящей работы состояла в реализации нового метода молекулярной динамики МД-рН-РТ при постоянном значении рН в потенциале средних сил равновесного титрования, подтверждении его работоспособности и выборе оптимальных параметров протокола моделирования. Показано, что: 1) оптимально выполнение МД-моделирования для топологии белка в наивероятном, ионизационном состоянии с минимальной энергией, с учетом поправочного ионизационного потенциала средних сил; 2) предложенный метод позволяет выполнять оптимизацию структуры и полной свободной энергии молекулы белка в водном растворе при постоянном рН, а также рассчитывать рН-зависимые свойства. Следует полагать, что новый метод МД-рН-РТ более эффективен и точен по сравнению с известными реализациями метода МД-рН [7, 20–29] по нескольким причинам: 1) использована наиболее точная из известных модель расчета электростатической энергии молекулы белка в растворе, разработанная в методе FАMVE-GB, реализующем метод GB с “идеальными” борновскими радиусами атомов, и единая модель поверхности потенциальной энергии молекулы белка в ионизационно-конформационном фазовом пространстве для выбора ионизационных состояний и расчета атомных сил для моделирования молекулярной динамики; 2) вычисляется и оптимизируется свободная энергия молекулы белка в растворе, тогда как гибридные методы МД-МК при постоянном рН [20–29] и методы МД в явном виде рассчитывают только среднее значение потенциальной энергии. Новый метод МД-рН-РТ принципиально расширяет возможности методов моделирования при исследовании рН-зависимых свойств аминокислотных остатков в активном центре ферментов, поскольку позволяет генерировать достоверный репрезентативный ансамбль конформационных состояний, соответствующих полной

энергии молекулы белка в протонном резервуаре. Методы генерации конформационных микросостояний молекулы белка, которые не учитывают явно ионизационно-конформационное равновесие и связанную с этим энергию системы белок-раствор, рассчитывают ансамбль конформационных состояний для упрощенной поверхности потенциальной энергии, неадекватный для статистически достоверного моделирования рН-зависимых характеристик и соответственно рН-зависимых конформационных перестроек.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00136), Министерства образования и науки РФ, Госконтракт (02.740.11.0079), программы поддержки ведущих научных школ НШ 3185.2010.4, интеграционных проектов Сибирского отделения РАН (26.2009 и 119.2009).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hill T.L. 1956. Titration curves and ion binding on proteins, nucleic acids, and other macromolecules with a random distribution of binding sites of several types. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5527–5529.
- Tanford C., Kirkwood J.G. 1957. Theory of protein titration curves: 1. General equations for impenetrable spheres. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333–5339.
- Warshel A. 1981. Calculations of enzymatic-reactions—calculations of pK<sub>a</sub>, proton-transfer reactions, and general acid catalysis reactions in enzymes. *Biochemistry*. **20**, 3167–3177.
- Bashford D., Karplus M. 1990. pK<sub>a</sub>'s of ionizable groups in proteins—atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry*. **29**, 10219–10225.
- Beroza P., Fredkin D.R., Okamura M.Y., Feher G. 1991. Protonation of interacting residues in a protein by a Monte-Carlo method, application to lysozyme and the photosynthetic reaction center of Rhodobacter-Sphaeroides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 5804–5808.
- Gilson M.K. 1993. Multiple site titration and molecular modeling: Two rapid method for computing energies and forces for ionizable groups in proteins. *Proteins*. **15**, 266–282.
- Baptista A.M., Martel P.J., Petersen S.B. 1997. Simulation of protein conformational freedom as a function of рН: Constant-рН molecular dynamics using implicit titration. *Proteins*. **27**, 523–544.
- Schlick Tamar. 2002. *Molecular modeling and Simulation. Interdisciplinary Applied Mathematics*. N.Y.: Springer.
- Case D.A., Cheatham III T.E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz Jr. K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. 2005. The Amber biomolecular simulation programs *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688.
- Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J. 1996. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236.

11. MacKerell A.D., Jr., Bashford D., Bellott M., et al. 1998. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B.* **102**, 3586–3616.
12. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. 2004. Development and Testing of a general Amber force fields. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174.
13. Mackerell Jr. A.D., M. Feig M., Brooks III C.L. 2004. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **25**, 1400–1415.
14. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. 2006. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins.* **65**, 712–725.
15. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., et al. 2008. *AMBER 10*. San Francisco: University of California.
16. Brooks B.R., Brooks III C.L., Mackerell A.D., et al. 2009. CHARMM: The Biomolecular simulation Program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1615.
17. Christen M., Hünenberger P.H., Bakowies D., Baron R., Bürge R., Geerke D.P., Heinz T.N., Kastenholz M.A., Kräutler V., Oostenbrink C., Peter C., Trzesniak D., van Gunsteren W.F. 2005. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* **26**, 1719–1751.
18. Hess B., Kutzner C., Spoel D., Lindahl E. 2008. GRO-MACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447.
19. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802.
20. Borjesson U., Hunenberg P.H. 2004. pH-Dependent Stability of a Decalysine  $\alpha$ -Helix Studied by Explicit-Solvent Molecular Dynamics Simulations at Constant pH. *J. Chem. Phys. B* **108**, 13551–13559.
21. Baptista A.M., Tiexeira V.H., Soares C.M. 2002. Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *J. Chem. Phys.* **117**, 4184–4200.
22. Mongan J., Case D.A., McCammon J.A. 2004. Constant-pH molecular dynamics in Generalized Born implicit solvent. *J. Comput. Chem.* **25**, 2038–2048.
23. Khandogin J., Brooks III C.L. 2005. Constant pH Molecular Dynamics with proton tautomerism. *Biophys. J.* **89**, 141–157.
24. Khandogin J., Chen J., Brooks III C.L. 2006. Exploring atomistic details of pH-dependent peptide folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 18546–18550.
25. Khandogin J., Brooks III C.L. 2006. Toward the Accurate First-Principles Prediction of Ionization Equilibria in Proteins. *Biochemistry.* **45**, 9363–9373.
26. Oliveira C.A.F., Hamelberg D., McCammon J.A. 2007. Estimating kinetic rates from accelerated molecular dynamics simulations: Alanine dipeptide in explicit solvent as a case study. *J. Chem. Phys.* **127**, 175105–175112.
27. Williams S.L., Oliveira C.A.F., McCammon J.A. 2010. Coupling constant pH molecular dynamics with accelerated molecular dynamics *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 560–568.
28. Machuqueiro M., Baptista A.M. 2006. Constant pH molecular dynamics with ionic strength effects: protonation-conformation coupling in decalysine. *J. Phys. Chem. B.* **110**, 2927–2933.
29. Machuqueiro M., Baptista A.M. 2009. Molecular dynamics at constant pH and reduction potential: application to cytochrome  $c_3$  *J. Am. Chem. Soc.* **13**, 12586–12594.
30. Bürge R., Kollman P.A., van Gunsteren W.F. 2002. Simulating proteins at constant pH: An approach combining molecular dynamics and Monte Carlo simulation. *Proteins.* **47**, 469–480.
31. Onufriev A., Case D.A., Bashford D., Case D. 2004. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins.* **55**, 383–394.
32. Vorobjev Y.N., Scheraga H.A. 1997. A fast adaptive multigrid boundary element method for macromolecule electrostatic computations in solvent. *J. Comput. Chem.* **18**, 569–583.
33. Vorobjev Y.N., Almagro J.C., Hermans J. 1998. Discrimination between native and intentionally misfolded conformations of proteins: ES/IS, a new method for calculating conformational free energy that uses both dynamic simulations with explicit solvent, and an implicit solvent continuum model. *Proteins.* **32**, 399–413.
34. Vila J.A., Ripoll D.R., Arnautova Y.A., Vorobjev Y.N., Scheraga H.A. 2005. Coupling Between Conformation and Proton Binding in Proteins. *Proteins.* **61**, 56–68.
35. Vorobjev Y.N., Vila J.A., Scheraga H.A. 2008. Fambe-pH: A Fast and accurate method to compute the total solvation free energies of protein. *J. Phys. Chem.* **112**, 11122–11136.
36. Onufriev A., Case D.A., Bashford D. 2002. Effective Born Radii in the Generalized Born Approximation: The Importance of Being Perfect. *J. Comput. Chem.* **23**, 1297–1304.
37. Yang S.A., Honig B. 1993. On the pH-dependence of protein stability. *J. Mol. Biol.* **231**, 459–474
38. Vorobjev Y.N. 2010. Blind docking method combining search of low-resolution binding sites with ligand pose refinement by molecular dynamics-based global optimization. *J. Comput. Chem.* **31**, 1080–1092.
39. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. 2010. Программа GUI-BIOPASED моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом. *Молекуляр. биология.* **44**, 735–742.
40. Vorobjev Y.N., Hermans J. 1997. SIMS: Computation of a smooth invariant molecular surface. *Biophys. J.* **73**, 722–732.