

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Мулашкина Татьяна Игоревна

**Определение механизмов разрыва Р-О связи в активных центрах
ферментов методами молекулярного моделирования**

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена в лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования кафедры физической химии химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Хренова Мария Григорьевна**
доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Шайтан Алексей Константинович**
доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, профессор

Палюлин Владимир Александрович
кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, ведущий научный сотрудник

Крупянский Юрий Фёдорович
доктор физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н.Семенова Российской академии наук, отдел строения вещества, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится «19» декабря 2025 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.3 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, химический факультет МГУ, аудитория СХА (преп.).

E-mail: mish@kinet.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3626>

Автореферат разослан « » ноября 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета
МГУ.014.3,
кандидат химических наук, доцент

М.И. Шилина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы работы и степень ее разработанности.

Фосфорорганические соединения являются фундаментальными компонентами живых систем, входящими в состав важнейших биомолекул, таких как ДНК, РНК, многих кофакторов и метаболитов. Помимо живых организмов, фосфорорганические соединения производятся в промышленности для использования в качестве пестицидов, гербицидов, антипиренов, а также в составе боевых отравляющих веществ.

Биологическое значение реакций с участием фосфорорганических соединений определяется их ключевой ролью в многочисленных ферментативных процессах, сопровождающихся разрывом связи Р-О. Данные реакции не только обеспечивают нормальное функционирование живых организмов, но и участвуют в процессах детоксикации окружающей среды от органофосфатных загрязнений.

Механизмы реакций разрыва связи Р-О представляют собой сложные процессы нуклеофильного замещения, которые могут протекать как по ступенчатому (через образование интермедиата), так и по согласованному механизму (в одну элементарную стадию), в зависимости от структуры интермедиата или переходного состояния различают диссоциативный и ассоциативный пути.

Экспериментальная детализация механизма реакции возможна далеко не во всех случаях, что связано с необходимостью фиксировать интермедиаты реакции и определять их возможное строение. Методы компьютерного молекулярного моделирования позволяют определить последовательность всех элементарных стадий, включая структуры в стационарных точках и энергетические характеристики реакционного профиля. Однако построение полного профиля является сложной и трудозатратной задачей.

В связи с вышеизложенным, разработка критериев для быстрого и надежного предсказания механизмов реакций разрыва связи Р-О на основе данных о фермент-субстратном комплексе является актуальной задачей, решение которой позволит существенно оптимизировать исследования в области биоорганической химии и энзимологии.

В рамках данного исследования детально изучены механизмы реакций с разрывом Р-О связей, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение: гидролиз органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE); фосфорилирование субстрата SP20 молекулой АТФ в активном центре протеинкиназы А (РКА); удлинение цепи ДНК молекулой нуклеотида в активном центре обратного транскриптазного домена белка открытой рамки считывания 2 (ORF2p).

Реакция гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE имеет прикладное значение, поскольку уже используется для очистки фосфорсодержащих загрязнений, которые накапливаются в окружающей среде за счет использования пестицидов, гербицидов и антипиренов. Известно, что ферментативная активность Pd-PTE зависит от pK_a уходящей группы гидролизуемого органофосфата. Текущие исследования механизма гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE сосредоточены на изучении реакции гидролиза параоксона. Несмотря на имеющиеся работы по молекулярному моделированию данной реакции, остается много спорных моментов связанных с ролью аспарагиновой кислоты Asp301 в реакции, а также с зарядовым состоянием продукта гидролиза. В рамках данной работы предлагается подробное изучение механизма реакции гидролиза четырех разных органофосфатов с различными уходящими группами, а также сравнение геометрических и электронно-плотностных параметров, характеризующих различия в протекании реакции.

Реакция фосфорилирования в активном центре протеинкиназы является одним из важнейших внутриклеточных механизмов, отвечающих за регуляцию и передачу сигналов. Поэтому протеинкиназы являются терапевтической мишенью для лечения многих заболеваний, таких как онкологические, воспалительные, иммунные и нейродегенеративные. цАМФ-зависимая протеинкиназа А (РКА) – первая описанная киназа человека, и с тех пор является наиболее изученной, став референсом для всего семейства протеинкиназ благодаря очень консервативной структуре активного центра. Фосфорилирование белков является самым важным механизмом регуляции в клетках млекопитающих, обеспечивающим реагирование клеток на внешние стимулы, такие как гормоны, нейротрансмиттеры или любой тип стресса. Например, в

постсинаптическом нейроне протеинкиназа А фосфорилирует гидроксильные группы серина или треонина в калиевом канале за счет отщепления фосфатной группы от молекулы АТФ. Понимание механизма передачи сигнала между цАМФ, РКА и K^+ имеет важное значение для выявления причин когнитивных отклонений и нейродегенеративных заболеваний с целью создания новых терапевтических подходов. В связи с этим, в рамках данного исследования проведено подробное изучение конформационно-динамического поведения фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с субстратом SP20, а также дальнейшее определение реакционноспособной конформации фермента и механизма реакции.

Белок открытой рамки считывания 2 (ORF2p) представляет собой ключевой компонент биомолекулярной системы LINE-1, участвующей в механизмах старения. Этот белок является основным ферментом, обеспечивающим ретротранспозицию LINE-1, что приводит к распространению элементов в геноме и развитию возрастных патологий. Эту реакцию катализирует обратный транскриптазный домен, имеющий структурное и функциональное сходство с изученными ретровирусными обратными транскриптазами. Кинетические параметры реакции удлинения цепи ДНК ферментом ORF2p экспериментально не изучены. Детализация этого процесса, включая роль аминокислотных остатков, содержание катионов металлов и последовательность элементарных стадий, позволяет значительно расширить понимание функционирования системы LINE-1, что и было выполнено в рамках данной работы.

Цель работы – систематизация и классификация данных о механизмах ферментативных реакций, протекающих с разрывом Р-О связи, и последующее изучение систем, имеющих прикладное значение методами компьютерного молекулярного моделирования.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Разработка критериев определения типа механизма ферментативных реакций, сопровождающихся разрывом Р-О связи, по структурно-динамическим характеристикам и особенностям электронного строения фермент-субстратного комплекса.

2. Определение механизма реакции гидролиза органофосфатов с хорошими и плохими уходящими группами в активном центре фосфотриэстеразы из бактерий *Pseudomonas diminuta*.
3. Определение механизма реакции фосфорилирования в активном центре протеинкиназы А.
4. Определение механизма и скорости реакции удлинения цепи ДНК за счет нуклеотида тимидинтрифосфата в активном центре обратной транскриптазы ORF2p

Объектами исследования являются ферменты, катализирующие реакции, сопровождающиеся разрывом Р-О связи в фосфорорганических соединениях: фосфотриэстераза из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE), протеинкиназа А (РКА) и белок открытой рамки считывания 2 (ORF2p). **Предметом исследования** являются реакции разрыва Р-О в активном центре ферментов.

Научная новизна работы:

1. В данной работе предложен критерий определения типа механизмов реакций, сопровождающихся разрывом Р-О связи, в активном центре ферментов. Данный критерий разработан на основе проведенного подробного анализа структурно-динамического поведения активного центра фермент-субстратного комплекса, а также его электронного строения.
2. С помощью современных подходов молекулярного моделирования установлены механизмы реакций гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE, фосфорилирования серина субстрата молекулой АТФ в активном центре протеинкиназы А и удлинения цепи ДНК обратным транскриптазным доменом белка ORF2p.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработанные критерии определения типа механизма ферментативных реакций, сопровождающихся разрывом Р-О связи, позволяют оптимизировать исследования в области моделирования ключевых реакций с фосфорорганическими соединениями. Проведенные исследования дают углубленное понимание механизмов реакций гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА и удлинения цепи ДНК в

активном центре ORF2p, показывают ключевые факторы, влияющие на кинетику реакции, что в дальнейшем можно использовать для управления подобными реакциями.

Методология и методы исследования. При выполнении работы использовались современные подходы молекулярного моделирования, которые позволяют детализировать молекулярные процессы и интерпретировать кинетические данные. Для описания механизмов ферментативных реакций применялся комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ). Этот метод предполагает описание активного центра фермента методами квантовой химии, в то время как остальная белковая макромолекула и окружающие ее молекулы воды описываются с помощью классических силовых полей. Для учета конформационной динамики активного центра фермента или, иными словами, энтропийного вклада в реакцию в данной работе использовались подходы молекулярной динамики (МД). Для решения проблемы обхода конформационного пространства использовался метод зонтичной выборки. Комбинация данных методов позволяет детально исследовать механизмы ферментативных реакций, а также переходить от микроскопических параметров, получаемых в расчетах, к макроскопическим параметрам, наблюдаемым в эксперименте. Для получения дополнительной информации, помимо геометрических характеристик, также проводился анализ электронной плотности в активных центрах рассматриваемых ферментов.

Положения, выносимые на защиту:

1. В качестве критериев определения типа механизма реакций разрыва Р-О связи в активных центрах ферментов можно использовать распределение длины разрываемой связи и профиль лапласиана электронной плотности вдоль разрываемой Р-О связи.
2. Реакция гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-РТЕ протекает по ассоциативному двухстадийному механизму с образованием пентакоординированного интермедиата и сопровождается переносом протона с нуклеофильного гидроксид-аниона на аминокислотный остаток Asp301.
3. Лимитирующей стадией гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-РТЕ является диффузия продуктов, скорость которой зависит

от прочности координационной связи катионов двухвалентных металлов с продуктом в активном центре фермента.

4. Реакция фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы А протекает по диссоциативному согласованному механизму с образованием метафосфата в переходном состоянии, в качестве акцептора протона выступает остаток аспарагиновой кислоты Asp166.
5. Депротонированное состояние фосфорилированного серина как продукта реакции фосфорилирования субстрата в активном центре протеинкиназы А энергетически выгоднее, чем его протонированная форма.
6. Процесс удлинения цепи ДНК в активном центре белка ORF2p протекает по согласованному диссоциативному механизму с константой скорости 60 с^{-1} .

Достоверность представленных в диссертационной работе результатов обеспечивается применением современных методов молекулярного моделирования и валидацией получаемых результатов путем сопоставления с экспериментальными данными.

Апробация результатов. Основные результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: Международная научная конференция «Современная химическая физика – на стыке физики, химии и биологии» (Черноголовка, 2021), XXIX-XXXI Международная научная конференция «Математика. Компьютер. Образование.» (Дубна, 2022, Москва, 2023, Дубна, 2024), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022, 2023, 2024), IX-X Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2022, 2024), XXII-XXIII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2022, 2023), XXXV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2023), XVII-XIX Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование» (Саров, 2023, 2024, 2025), 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023), 66-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Москва, 2024), XXVII Всероссийская конференция

молодых ученых-химиков (Нижний Новгород, 2024), XIII International conference on chemistry for young scientists «Mendeleev» (Санкт-Петербург, 2024), XXX Symposium on bioinformatics and computer-aided drug discovery (Онлайн, Россия, 2024).

Личный вклад автора включает в себя сбор и анализ литературных данных, постановку задач и выбор методов их решения, проведение молекулярного моделирования с использованием методов молекулярной динамики, в том числе метода зонтичной выборки, комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики, а также анализ и интерпретация результатов, и подготовка по ним докладов и публикаций. В работах, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя является определяющим и составляет от 65% до 85%.

Исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-33-70001), РНФ (проекты № 19-73-20032, № 23-13-0011) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-643) в рамках темы «Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека»

Публикации. Основное содержание работы представлено в 7 статьях общим объемом 4,0625 п.л., опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index" и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4. Физическая химия

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания использованных методов молекулярного моделирования (глава 2), изложения и обсуждения полученных результатов (глава 3, глава 4, глава 5 и глава 6), заключения, выводов, списка сокращений и введенных обозначений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 48 рисунков, 12 таблиц и 197 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируются цель и ставятся задачи работы, а также положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** представлен литературный обзор о ферментах, катализирующих реакции, сопровождающиеся разрывом Р-О связи фосфорорганических соединений. Рассмотрена классификация данных реакций по типу механизма: диссоциативный и ассоциативный. Описаны структурные особенности ферментов фосфотриэстеразы из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE), протеинкиназы А (РКА) и обратной транскриптазы ORF2p и их активных центров, а также представлены известные данные о механизмах и скоростях реакций, протекающих в данных ферментах.

В **Главе 2** представлен обзор современных методов молекулярного моделирования. В частности, методов расчета энергий и сил, таких как метод молекулярной механики, методы квантовой химии и комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ). Отдельное внимание уделено расчёту профилей энергии Гиббса методом зонтичной выборки с последующим статистическим анализом распределений координаты реакций в траекториях. Кроме того, в данной главе представлен обзор дескрипторов электронной плотности.

Глава 3 посвящена разработке критерия определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи. Для этого было рассмотрено четырнадцать систем: гидролиз ГТФ до ГДФ в активных центрах Ras-GAP, Ran-GAP и Arl3-RP2; гидролиз ц-ди-ГМФ в активном центре EAL белка BlrP1; превращение АТФ в цАМФ в активном центре аденилатциклаз млекопитающих mAC и бактерий bPAC; гидролиз АТФ в АДФ в активных центрах F1-АТФазы, MVK, MDD и миозина; гидролиз фосфата в активном центре NPP; гидролиз фосфодиэфирных связей ДНК в РНКазе Н человека и бактериальной РНКазе Н. Механизмы реакций были классифицированы по типам на основе известных данных и рассчитанных энергетических профилей.

Из данных траекторий КМ(PBE0-D3/6-31G**)/ММ(CHARMM)-МД для фермент-субстратных комплексов всех систем были построены распределения расстояний между атомами фосфора и кислорода нуклеофила ($d(P-O_{Nu})$) и уходящей группы ($d(P-O_{LG})$) (Рисунок 1А). Из данных распределений было установлено, что расстояние нуклеофильной атаки не является ключевым межатомным расстоянием,

определяющим механизм реакции. Распределения длины разрываемой связи (Рисунок 1В) показали, что для систем с диссоциативным механизмом реакции (D_N+A_N и D_NA_N) распределения более широкие с длинами связей от 1,6 до 1,9 Å. Для систем, в которых реакция протекает по ассоциативному механизму (A_N+D_N и A_ND_N), распределения более узкие, не превышающие 1,75 Å.

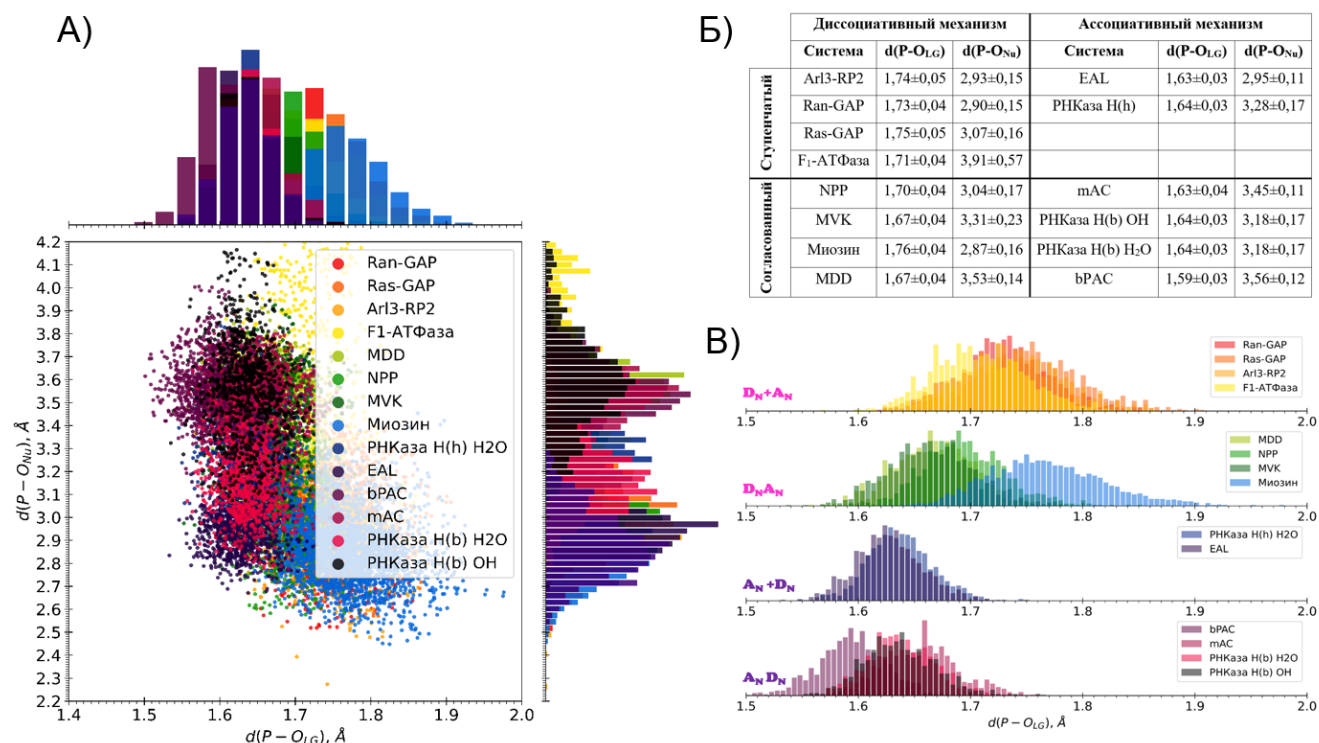


Рисунок 1. Данные, полученные из траекторий КМ/ММ-МД фермент-субстратных комплексов: А) Распределения расстояний нуклеофильной атаки $d(P-O_{Nu})$ и длины разрываемой связи $d(P-O_{LG})$; Б) Средние значения и стандартные отклонения (в Å) $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ В) Распределения расстояний разрываемой связи $d(P-O_{LG})$

В стационарных точках фермент-субстратных комплексов модельных систем были рассчитаны различные дескрипторы электронной плотности и проведен анализ порядков связи. Наиболее явные различия наблюдаются на картах лапласиана электронной плотности: в случае диссоциативного механизма наблюдается деконцентрация электронной плотности, а при ассоциативном механизме — концентрация электронной плотности в области разрываемой $P-O_{LG}$ связи.

На Рисунке 2 представлен профиль лапласиана электронной плотности вдоль разрываемой связи $P-O_{LG}$. Для реакций, протекающих по ассоциативному механизму, $\nabla^2\rho(r)$ принимает отрицательные значения на расстояниях от 0,8 до 1,3 Å от атома фосфора вблизи центра связи. Напротив, для систем, соответствующих

диссоциативному пути, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ положителен в этой области. Это позволяет использовать данный дескриптор в качестве бинарного критерия для определения типа механизма реакции. Другие рассмотренные дескрипторы оказались недостаточно репрезентативными, для них не удалось выбрать пороговые значения для дискриминации механизмов по типам.

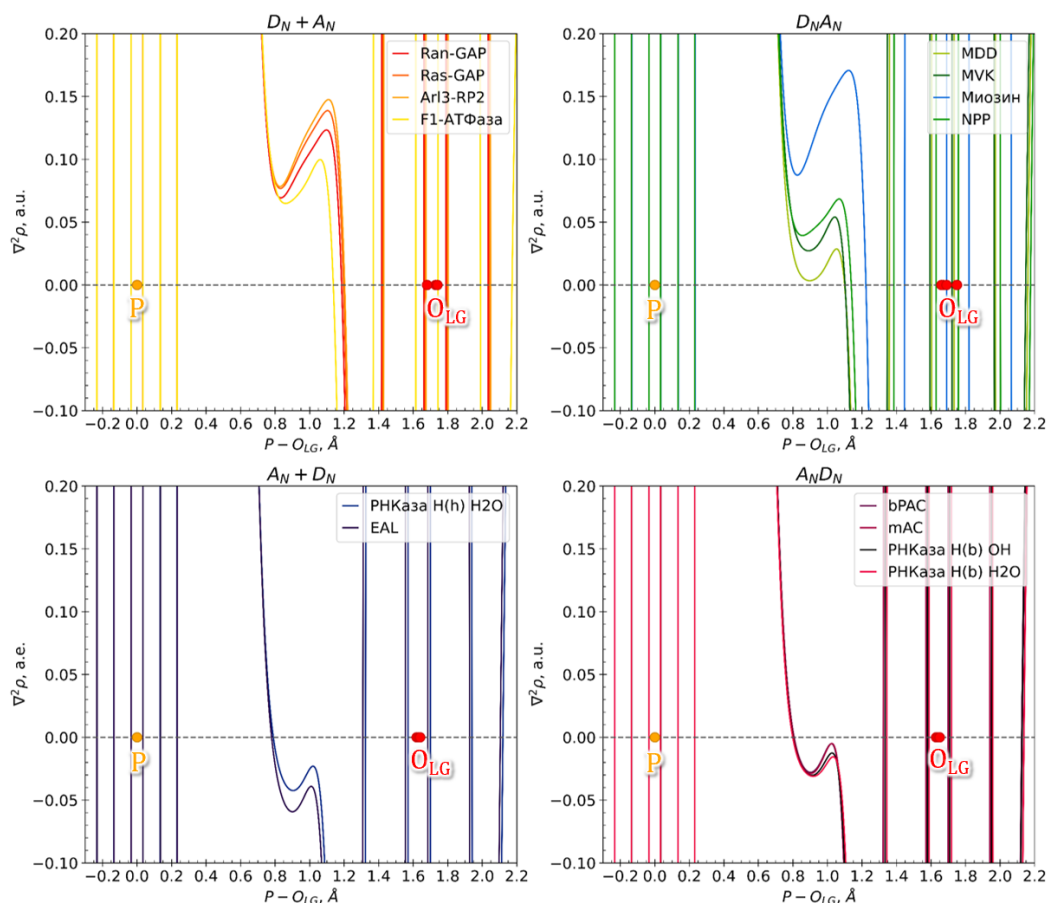


Рисунок 2. Лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ вдоль разрываемой связи P-O_{LG} в фосфорорганических соединениях в активных центрах фермент-субстратных комплексов. Две верхние панели, обозначенные как D_N+A_N и D_NA_N, представляют диссоциативный тип механизма, две нижние панели (A_N+D_N, A_ND_N) – ассоциативный тип механизма

В стационарных точках фермент-субстратных комплексов был проведен анализ порядка связи P-O_{LG}. Установлено, что если LBO больше 0,2 или IBSI больше 0,23, реакция протекает по ассоциативному типу; если LBO и IBSI меньше указанных значений – по диссоциативному. Таким образом, порядки связи, рассчитанные данными методами, могут служить в качестве критериев определения типа механизма.

Полученные критерии классификации механизма (Рисунок 3) были верифицированы на примере реакции переноса фосфатной группы с АТФ на АМФ в

активных центрах трех аденилаткиназ ЕСАК, МtАК и АРАК. Для этого проводилось сравнение результатов рассчитанного в данной работе профиля реакции для аденилаткиназы МtАК и предложенных критериев. Профиль рассчитывался методом КМ(PBE0-D3/6-31G**)/ММ(CHARММ)-МД с добавлением смещающего потенциала на координату реакции методом зонтичной выборки. Полученный профиль энергии Гиббса и структура, отвечающая переходному состоянию реакции, представлены на Рисунке 3Г. В переходном состоянии $d(P-O_{LG})$ и $d(P-O_{Nu})$ составляют $2,17 \pm 0,12 \text{ \AA}$ и $2,29 \pm 0,12 \text{ \AA}$ соответственно, что указывает, что реакция переноса фосфатной группы с АТФ в АМФ в аденилаткиназе МtАК сопровождается образованием PO_3^- , что соответствует диссоциативному типу и подтверждает предложенные критерии для определения типа механизма, согласно которому наблюдается деконцентрация электронной плотности вдоль разрываемой связи (Рисунке 3В).

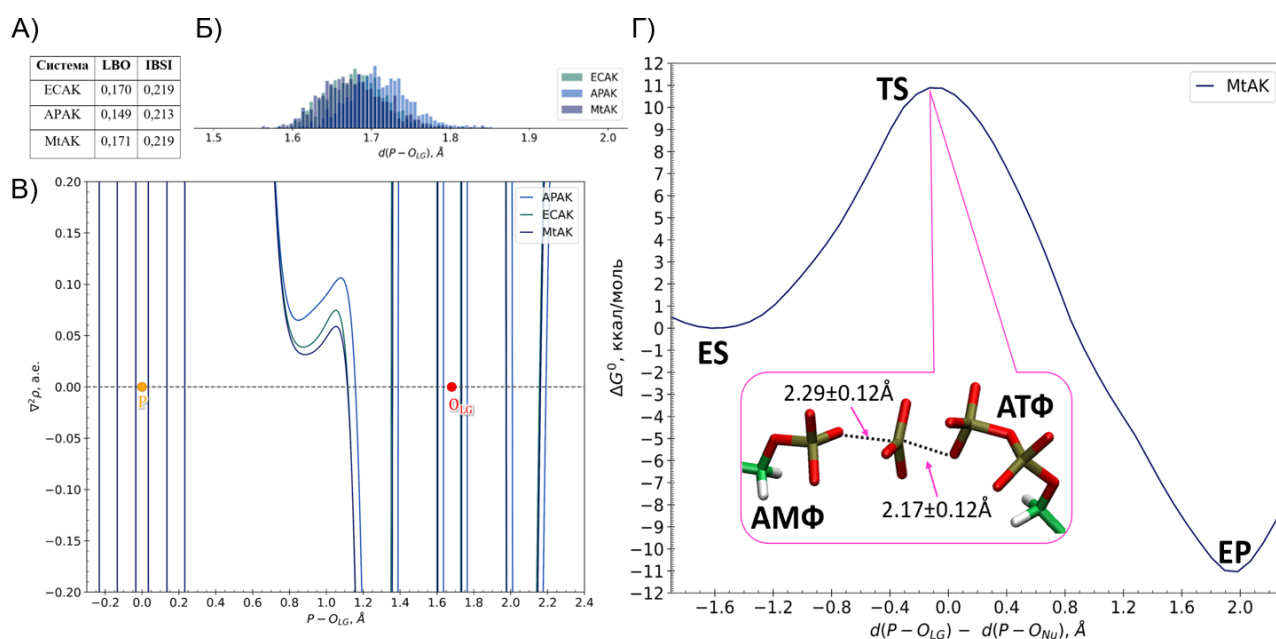


Рисунок 3. А) Порядок разрываемой $P-O_{LG}$ связи, рассчитанный методами LBO (порядок связи, рассчитанный из лапласиана электронной плотности) и IBSI (индекс внутренней прочности связи); Б) Распределения длины разрываемой связи АТФ и В) Лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи $P-O_{LG}$ в минимуме поверхности потенциальной энергии для АТФ в фермент-субстратных комплексах аденилаткиназ ЕСАК, АРАК и МtАК; Г) Профиль энергии Гиббса реакции переноса фосфата в активном центре аденилаткиназы МtАК. Структура переходного состояния показана в вставке. ES – фермент-субстратный комплекс, TS – переходное состояние, EP – комплекс фермент-продукт

Глава 4 посвящена изучению механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE). Для

определения типа механизма были применены предложенные ранее критерии. А именно, распределение длины разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ в фермент-субстратном комплексе дибутил-4-нитрофенилфосфата (1) в активном центре Pd-PTE, полученное из КМ(PBE0-D3/6-31G**)/ММ(CHARMM)-МД траекторий (Рисунок 4А), а также

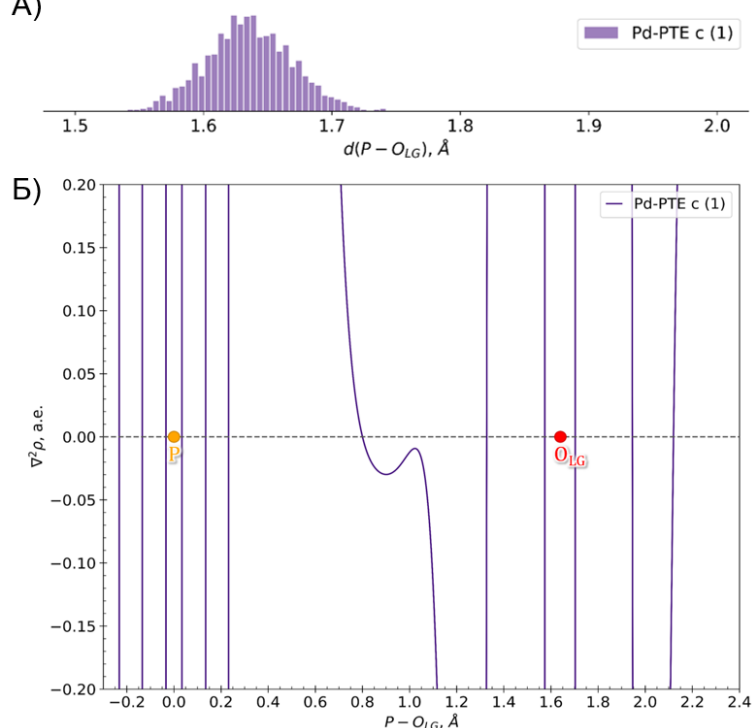


Рисунок 4. Для дибутил-4-нитрофенилфосфата (субстрат (1)) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей катионы кобальта: А) Распределения длины разрываемой связи $P-O_{LG}$ и Б) Лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи $P-O_{LG}$ в минимуме поверхности потенциальной энергии

лапласиан электронной плотности вдоль линии разрываемой связи в структуре ES (Рисунок 4Б). Видно, что значения длины разрываемой связи лежат в диапазоне от 1,55 Å до 1,75 Å, что соответствует ассоциативному пути. Тип механизма также подтверждается значениями лапласиана вдоль разрываемой связи, так как в области, когда связь $P-O_{LG}$ принимает значения от 0,8 до 1,3 Å наблюдается концентрация электронной плотности.

По результатам КМ/ММ-МД моделирования с наложением

смещающих потенциалов методом зонтичной выборки были получены сечения профилей энергии Гиббса для реакции гидролиза четырех органофосфатов: двух с хорошими (1) и (2) и двух с плохими уходящими группами (3) и (4) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE с катионами кобальта (Рисунок 5Б). Установлено, что реакция протекает в две стадии: первая стадия – нуклеофильная атака, протекает с низким энергетическим барьером (< 3 ккал/моль), вторая – для субстратов (1) и (2) также протекает с низкими энергетическими барьерами, 3 ± 1 и 4 ± 1 ккал/моль соответственно, а для субстратов (3) и (4) с плохими уходящими группами – с высокими энергетическими барьерами 14 ± 1 и 27 ± 1 ккал/моль соответственно. Для субстратов (1) и (2) продукты реакции стабилизированы относительно фермент-субстратного комплекса, а для субстратов (3) и (4) продукты дестабилизированы

относительно ES. Полученные результаты качественно согласуются с кинетическими данными, из которых следует отсутствие каталитической активности Pd-PTE с дибутилфенилфосфатом (3) и трифенилфосфатом (4). Однако для субстратов с хорошими уходящими группами рассчитанные энергетические барьеры соответствуют значительно более высоким константам скорости, чем наблюдаемые значения $k_{кат}$. Из чего можно сделать предположение, что для субстратов с хорошими уходящими группами лимитирующей стадией является диффузия продукта, что согласуется с другими теоретическими исследованиями и экспериментальными наблюдениями, согласно которым химическая стадия протекает довольно быстро и зависит от значения pK_a уходящей группы.

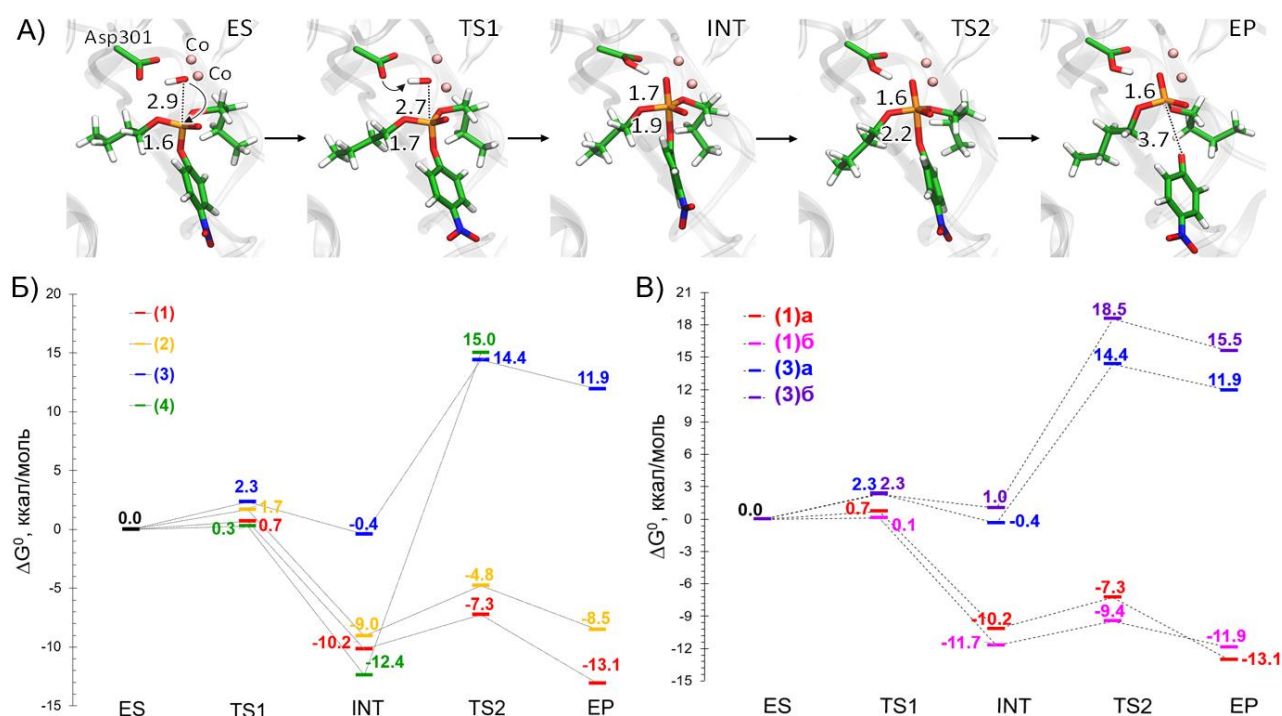


Рисунок 5. А) Механизм реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата (субстрат (1)) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE. Цветовая кодировка: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, фосфор – оранжевый, водород – белый, кобальт – розовый; Б) Профили энергии Гиббса, рассчитанные для реакции гидролиза четырех субстратов. Здесь и далее: (1) -красный цвет, (2) – желтый цвет (органосфаты с хорошей уходящей группой), (3) – синий цвет и (4) – зеленый цвет (органосфаты с плохой уходящей группой) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей катионы кобальты.; В) Сравнение профилей энергии Гиббса, полученных для гидролиза субстрата (1) ((1)а, красный) и (3) ((3)а, синий) в кобальтосодержащей Pd-PTE и (1) ((1)б, розовый) и (3) ((3)б, фиолетовый) в цинкосодержащей Pd-PTE. Обозначения: ES – фермент-субстратный комплекс, TS1 и TS2 – переходные состояния, INT – промежуточный интермедиат и EP – комплекс фермент-продукт

На Рисунке 5А представлены молекулярные модели в области стационарных точек для реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата в активном центре Pd-PTE. Реакция инициируется нуклеофильной атакой гидроксид-аниона на атом фосфора субстрата, что приводит к образованию пентакоординированного фосфорного интермедиата (INT), сопровождающемуся переносом протона с гидроксид-аниона на аспарагиновую кислоту Asp301 для соединений (1), (2) и (4), что приводит к стабилизации INT относительно ES. Для субстрата (3) не наблюдается переноса протона, а интермедиат дестабилизирован по сравнению с интермедиатами других соединений. На второй стадии происходит разрыв P-O_{LG} связи. Установлено, что механизм реакции гидролиза органофосфатов с хорошими уходящими группами протекает по ступенчатому ассоциативному типу.

На Рисунке 5В показано сравнение профилей реакций, полученных для гидролиза субстратов (1) и (3) в активном центре Pd-PTE с двумя различными катионами металлов: Co²⁺ и Zn²⁺. Энергетические барьеры практически не изменяются при замене катионов металла. Согласно экспериментальным исследованиям, каталитическая активность фосфотриэстеразы с катионами кобальта выше примерно в три раза, чем Pd-PTE с катионами цинка в активном центре. Исходя из вывода о том, что лимитирующей стадией реакции является диффузия продукта, можно предположить, что такая разная активность фермента с разными катионами металлов связана с различной прочностью их координационной связи с продуктом реакции.

Сравнение динамического поведения состояний интермедиатов (INT) для систем с рассматриваемыми субстратами и катионами кобальта и цинка в активном центре Pd-PTE показало, что для органофосфатов с хорошей уходящей группой расстояние d(P-O_{LG}) больше, чем расстояние нуклеофильной атаки, а для органофосфатов с плохой уходящей группой d(P-O_{LG}) значительно короче (Рисунок 6А). Ключевое расстояние разрываемой связи зависит от лабильности уходящих групп. Для соединений (3) и (4) d(P-O_{LG}) составляет около 1,7 Å, тогда как для соединений (1) и (2) это значение больше, 1,9 и 1,8 Å соответственно. Можно сделать вывод, что в состоянии интермедиата разрываемая связь имеет большую тенденцию к разрыву в субстратах с хорошими уходящими группами.

Были проанализированы карты лапласиана электронной плотности (Рисунок 6Б), рассчитанные в плоскости атомов фосфора и кислорода уходящей группы и нуклеофила. Для субстратов с хорошими уходящими группами наблюдается узкая область концентрации электронной плотности, таким образом, связь довольно слабая. Для соединений (3) и (4) наблюдается широкая область концентрации электронной плотности. Аналогичные результаты были получены для субстратов с различными уходящими группами в активном центре Pd-РТЕ, содержащей катионы цинка.

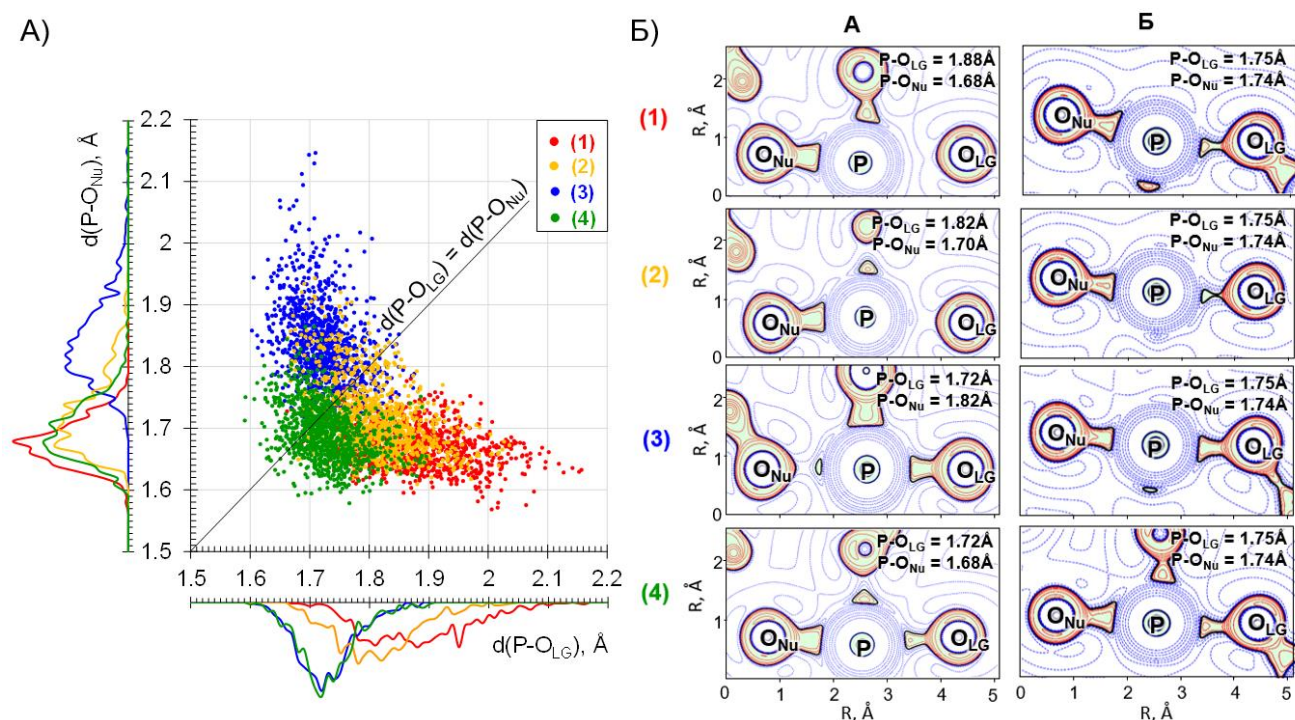


Рисунок 6. А) Распределение длин связей $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ в КМ/ММ-МД траекториях для интермедиатов реакции гидролиза органофосфатов в активном центре кобальтосодержащей фосфотриэстеразы Pd-РТЕ Б) Карты лапласиана электронной плотности, рассчитанные в плоскости атомов фосфора (P) и кислорода нуклеофила (O_{Nu}) и уходящей группы (O_{LG}): контурные линии соответствуют значениям $\pm(2;4;8) \cdot 10^n$ а.е., $-2 \leq n \leq 1$, синие пунктирные контурные линии обозначают области пониженной электронной плотности ($\nabla^2 \rho(r) > 0$), красные сплошные линии – области концентрации электронной плотности ($\nabla^2 \rho(r) < 0$), а зеленая сплошная линия соответствует $\nabla^2 \rho(r) = 0$. Область с $\nabla^2 \rho(r) < 0$ окрашена в светло-зеленый цвет. Столбец А соответствует наиболее вероятным структурам, столбец Б – структурам с одинаковыми расстояниями $d(P-O_{LG}) = 1,75$ Å и $d(P-O_{Nu}) = 1,74$ Å

Глава 5 посвящена изучению реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы А (РКА). В результате иерархической кластеризации в программе TtClust было получено четыре кластера, отвечающие различным конформациям АТФ и остатков Asp166 и Ser_{SP20}. Сравнение репрезентативных кадров

(Рисунок 7) показало, что данные кластеры отличаются в основном конформацией серина субстрата Ser_{SP20}, а именно положением гидроксильной группы. В конформациях K₂ и K₃ водород гидроксильной группы образует водородную связь с γ-фосфатной группой, что позволяет предположить, что кислород АТФ может выступать в качестве акцептора протона в ходе реакции. Сравнение ключевых межатомных расстояний, показало, что расстояние нуклеофильной атаки меньше в случае конформации K₃, чем в K₂. Однако в структуре K₃ неподелённая пара нуклеофильного кислорода не ориентирована на атом фосфора, что может затруднять протекание реакции. Из этих двух конформаций реакционноспособной может быть конформация K₂. В конформации K₄ также наблюдается водородная связь между водородом гидроксильной группы Ser_{SP20} и фосфатной группой АТФ, однако при данной конформации нуклеофил не ориентирован на атом фосфора АТФ. Поэтому рассматривать данную конформацию как реакционноспособный фермент-субстратный комплекс не рекомендуется. Наиболее вероятно, что реакционноспособной конформацией является K₁, в которой наблюдается небольшое расстояние нуклеофильной атаки (3,38 Å), а гидроксильная группа Ser_{SP20} образует водородную связь с остатком аспарагиновой кислоты Asp166, который является хорошим акцептором протона. Таким образом, были определены две возможные реакционноспособные конформации K₁ и K₂, различающиеся возможным акцептором протона.

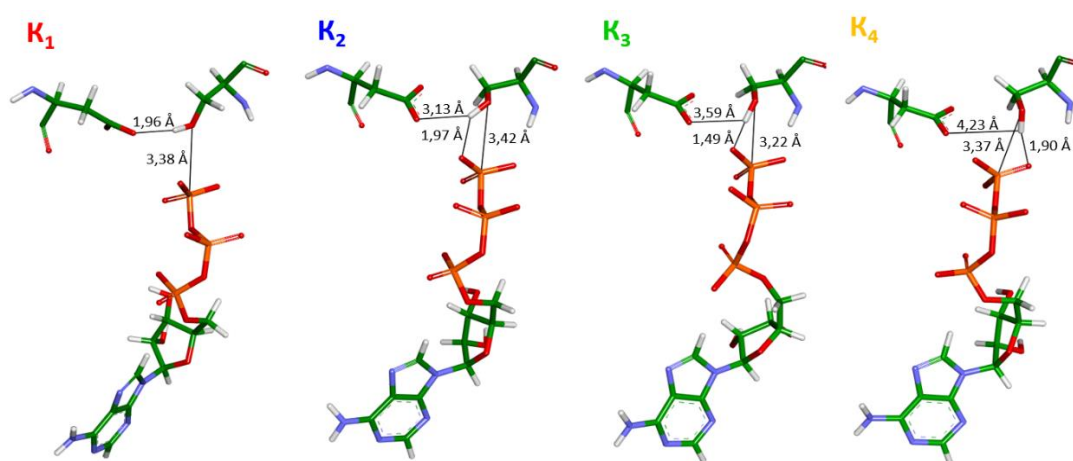


Рисунок 7. Репрезентативные кадры кластеров, отвечающие различным конформациям АТФ и остатков Asp166 и Ser_{SP20}

Из КМ/ММ-МД траектории определены значения межатомного расстояния между атомом фосфора и кислородом АТФ (P-O_{LG}), а также был рассчитан лапласиан

электронной плотности вдоль разрываемой связи P-O_{LG} в стационарной точке фермент-субстратного комплекса, определенной с помощью КМ/ММ оптимизации. Из полученных распределений разрываемой связи (Рисунок 8А), видно, что длина связи варьируется в широком диапазоне значений для обеих конформаций K₁ и K₂ от 1,62 до 1,95 Å и от 1,58 до 1,85 Å соответственно. Такой вид распределения разрываемой связи отвечает диссоциативному типу реакции разрыва P-O связи. В обеих конформациях в области, где P-O_{LG} принимает значения от 0,6 до 1,4 Å, наблюдается положительное значение $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ (Рисунок 8Б). Деконцентрация электронной плотности в области разрываемой связи также указывает на диссоциативный механизм разрыва P-O связи.

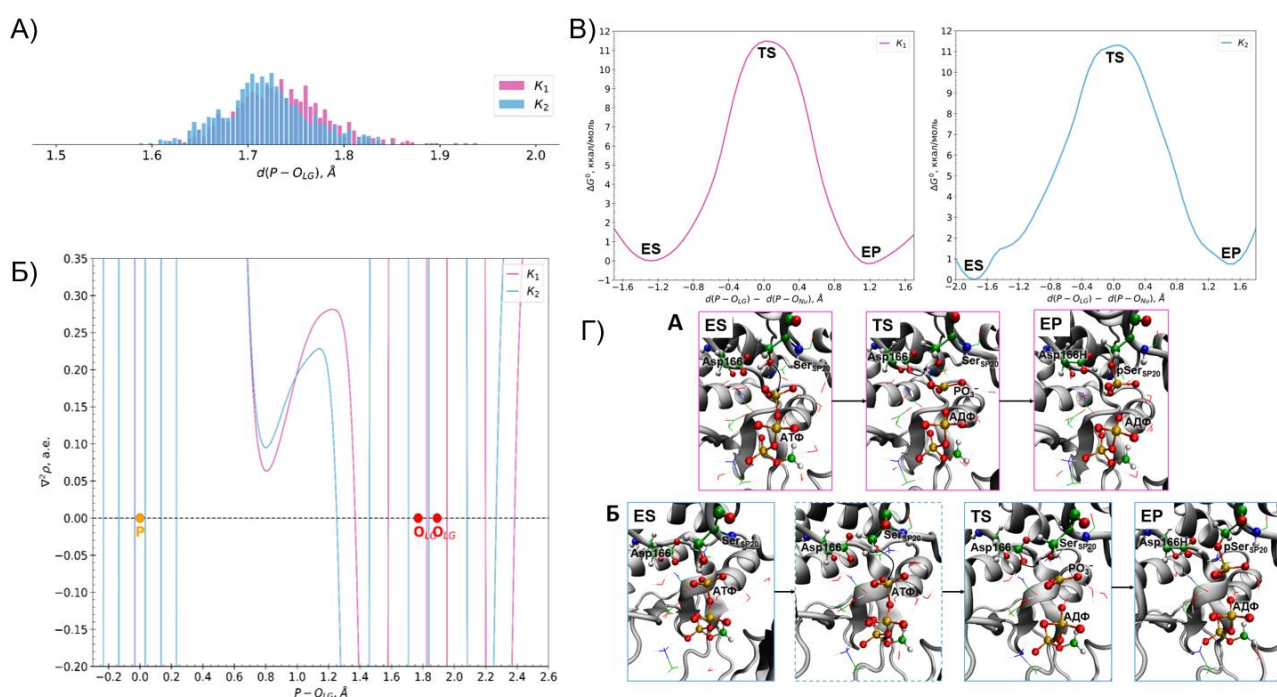


Рисунок 8. А) Распределения длины разрываемой связи P-O_{LG} и Б) Лапласиан электронной плотности вдоль линии разрыва связи P-O_{LG} в активном центре протеинкиназы А в фермент-субстратном комплексе в двух конформациях (K₁ и K₂); В) Профили энергии Гиббса для двух конформаций K₁ и K₂; Г) Механизм реакции фосфорилирования в активном центре протеинкиназы РКА для конформаций K₁ (А) и K₂. (Б) Цвета: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, фосфор – оранжевый, водород – белый. Обозначения: Asp166H – протонированная аспарагиновая кислота, pSerSP20 – фосфорилированный субстрат серина SP20

Профили энергии Гиббса (Рисунок 8В), полученные для конформаций K₁ и K₂ демонстрируют энергетические барьеры в 11,5 ккал/моль и 11,3 ккал/моль соответственно. Для конформации K₂ наблюдается перегиб в области координаты реакции от -1,5 до -1,1 Å. Из молекулярных структур (Рисунок 8Г), отвечающих областям стационарных точек на профиле энергии Гиббса, было установлено, что

область перегиба отвечает конформационному переходу из K_2 в K_1 . Далее реакция фосфорилирования протекает из конформации K_1 .

Реакция фосфорилирования начинается с нуклеофильной атаки атома фосфора АТФ кислородом гидроксильной группы серина субстрата SP20 (Ser_{SP20}). В ходе реакции образуется переходное состояние, которому отвечает метафосфат и аденозиндифосфат (АДФ). Затем при образовании комплекса фермент-продукт происходит перенос протона с гидроксильной группы серина и перенос фосфатной группы на серин субстрата. Таким образом, в ходе реакции образуется фосфорилированный серин субстрата SP20 ($\text{pSer}_{\text{SP20}}$) и АДФ. Данный механизм реакции согласуется с предположением о том, что реакция фосфорилирования SP20 в активном центре РКА протекает по диссоциативному механизму.

В литературе отсутствуют экспериментальные данные о значениях константы скорости реакции переноса фосфорила на субстрат SP20 в активном центре РКА, однако можно сравнить полученные результаты с данными о фосфорилировании субстратов кемптида и PKS ($k_{\text{кат}} = 400 \text{ с}^{-1}$ и $k_{\text{кат}} = 170 \text{ с}^{-1}$ соответственно) или с другими расчетными работами (13,95 и 14,17 ккал/моль). Таким образом, полученный результат отличается на 2 ккал/моль, что лежит в рамках погрешности используемого для расчета метода и статистической ошибки обработки результатов метода зонтичной выборки.

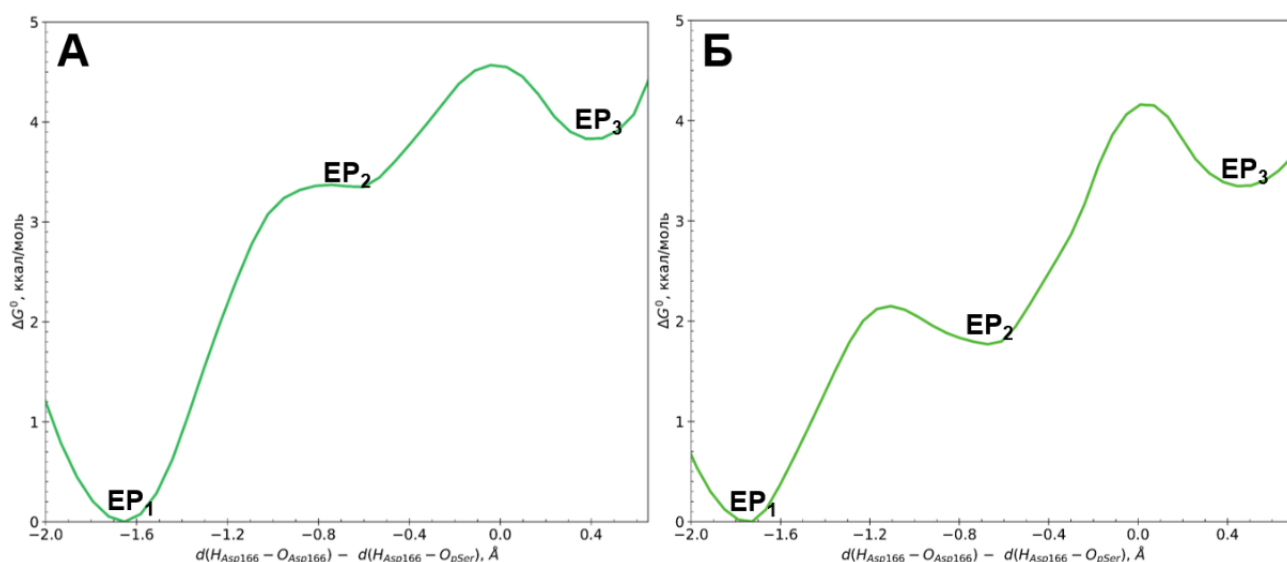


Рисунок 9. Профили энергии Гиббса для переноса протона от протонированной аспарагиновой кислоты Asp166 к атомам кислорода O_1 (А) и O_2 (Б) фосфорилированного серина

Была изучена возможная вторая стадия реакции, а именно перенос протона с аспарагиновой кислоты Asp166 на кислород фосфорилированного серина, для этого был рассмотрен перенос протона на два ближайших кислорода. Полученные профили энергии Гиббса представлены на рисунке 9. Переход из состояния EP₁ в состояние EP₂ отвечает за поворот фосфатной группы pSer_{SP20} к остатку Asp166. Полученный протонированный фосфорилированный серин субстрата (EP₃) выше по энергии, чем непротонированный фосфорилированный серин (EP₁) на 3,3 или 3,8 ккал/моль. Таким образом, перенос протона с Asp166 на фосфорилированный серин маловероятен.

Глава 6 посвящена изучению реакции удлинения ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p. На Рисунке 10А представлено распределение длины разрываемой связи (d(P-O_{LG})), полученное из КМ/ММ молекулярно-динамической траектории фермент-субстратного комплекса. Значение длины P-O_{LG} меняется в диапазоне от 1,55 до 1,84 Å, причем среднее значение длины этой связи составляет $1,66 \pm 0,03$ Å, что является пограничным значением данного критерия для определения типа механизма реакции. Кроме того, был рассчитан лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи P-O_{LG} (Рисунок 10Б). Видно, что в области, где P-O_{LG} принимает значения от 0,3 до 1,3 Å, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}) > 0$, что характерно для систем, в которых реакции с фосфорорганическими соединениями протекают по диссоциативному пути.

Профиль энергии Гиббса реакции удлинения ДНК, полученный с помощью КМ/ММ-МД моделирования и применения метода зонтичной выборки, представлен на Рисунке 10В. Реакция протекает в одну стадию с энергетическим барьером $15,1 \pm 0,8$ ккал/моль, что при 300 К по теории активированного комплекса соответствует константе скорости около 60 с^{-1} . Экспериментальных данных по кинетике этой реакции в ORF2p нет, однако можно сравнить полученные результаты с данными о других ферментах обратной транскриптазы, для которых известно, что реакция протекает с константой скорости от 0,1 до 35 с^{-1} .

Молекулярные структуры, отвечающие областям стационарных точек на профиле энергии Гиббса приведены на Рисунке 10Г. Данная реакция инициируется нуклеофильной атакой атома фосфора α -фосфатной группы dTTP атомом O3' гидроксильной группы ДНК (O_{Nu}). Этот процесс сопровождается переносом протона с атома O3' на атом кислорода боковой цепи остатка Asp703. В результате реакции

происходит удлинение цепи ДНК ($\text{ДНК}_9 \rightarrow \text{ДНК}_{10}$) и образование пирофосфата. В переходном состоянии средние длины разрываемой и образующейся связей составляют около 1,9 и 2,0 Å соответственно. Таким образом, реакция протекает по согласованному диссоциативному механизму, что согласуется с применёнными критериями определения типа механизма.

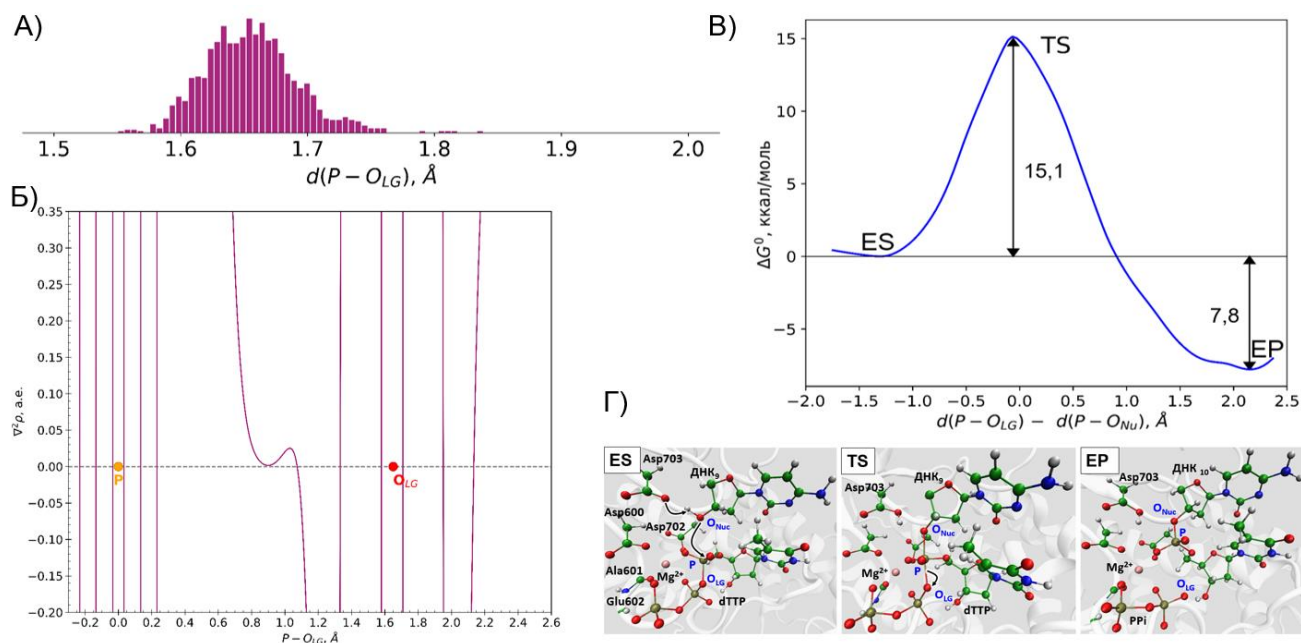


Рисунок 10. А) Распределение длины разрываемой связи $P-O_{LG}$ в тимидинтрифосфате в фермент-субстратном комплексе ORF2p; Б) Лапласиан электронной плотности вдоль линии разрыва связи $P-O_{LG}$ тимидинтрифосфата в активном центре ORF2p в фермент-субстратном комплексе; В) Профиль энергии Гиббса реакции присоединения нуклеотида dTTP к ДНК в активном центре ORF2p; Г) Механизм удлинения цепи ДНК в области обратной транскрипции ORF2p. Структуры отвечают стационарным точкам. Обозначения: dTTP – тимидинтрифосфат, PPi – пирофосфат.

Заключение

На основании проведенного комплексного исследования ферментативных реакций разрыва $P-O$ связи в четырнадцати системах было предложено в качестве критериев определения типа механизма реакции использовать распределение длины разрываемой связи и лапласиан электронной плотности вдоль линии разрываемой связи. Применение предложенных критериев показало, что реакция фосфорилирования в активном центре протеинкиназы A и удлинение цепи ДНК в активном центре ORF2p протекает по диссоциативному пути, а гидролиз органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE по ассоциативному. Данные результаты были подтверждены молекулярным моделированием механизмов реакций.

Выводы

1. На основании анализа структурно-динамических и электронно-плотностных критериев для активных центров фермент-субстратных комплексов четырнадцати тестовых систем, предложено в качестве критериев определения типа механизма реакций разрыва Р-О связи в активных центрах ферментов использовать распределение длины разрываемой связи и профиля лапласиана электронной плотности вдоль разрываемой Р-О связи.
2. Молекулярное моделирование реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE показало, что реакция протекает по ассоциативному двухстадийному механизму с образованием пентакоординированного интермедиата, которое сопровождается переносом протона с нуклеофильного гидроксид-аниона на аминокислотный остаток Asp301.
3. Сравнение полученных результатов с наблюдаемыми кинетическими константами показало, что лимитирующей стадией гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE является диффузия продуктов. А также анализ активности фермента, содержащего в активном центре различные катионы металлов, показал, что замена металлов влияет на стадию диффузии продукта, а не на химическую стадию реакции.
4. Молекулярное моделирование реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы А показало, что реакция протекает по диссоциативному согласованному механизму с образованием метафосфата в переходном состоянии, а в качестве акцептора протона выступает остаток аспарагиновой кислоты Asp166.
5. Моделирование возможного переноса протона с остатка Asp166 на фосфорилированный серин позволило установить, что депротонированное состояние фосфорилированного серина как продукта реакции фосфорилирования субстрата в активном центре протеинкиназы А энергетически выгоднее, чем его протонированная форма.
6. Молекулярное моделирование реакции присоединения нуклеотида dTTP к ДНК в активном центре ORF2p позволило установить, что реакция протекает по согласованному диссоциативному механизму с константой скорости 60 с^{-1} .

Список опубликованных работ по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index" и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 – Физическая химия:

1. Khrenova M. G., **Mulashkina T. I.**, Stepanyuk R. A., Nemukhin A. V. Modeling of enzyme-catalyzed P–O bond cleavage in the adenosine triphosphate molecule // Mendeleev Communications. – 2024. – Vol. 34, № 1. – P. 1–7. EDN: DGBHXX. 0,4375 п.л. Вклад автора 65% (Импакт-фактор 1,7 (JIF))
2. **Mulashkina T. I.**, Kulakova A. M., Khrenova M. G. Enzymatic P–O Bond Cleavage: Criteria of Dissociative and Associative Mechanisms // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2025. – Vol. 65, № 15 – P. 8181-8193. 0,8125 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 5,3 (JIF))
3. Кулакова А. М., **Мулашкина Т. И.**, Немухин А. В., Хренова М. Г. Влияние уходящей группы на механизм гидролиза фосфорорганических соединений фосфотриэстеразой из бактерии *Pseudomonas diminuta* // Известия Академии наук. Серия химическая. — 2022. — № 5. — С. 921–926. EDN: QQSHXU. 0,375 п.л. Вклад автора 65% (Импакт-фактор 1,74 (РИНЦ))
Kulakova A.M., **Mulashkina T.I.**, Nemukhin A.V., Khrenova M.G. Influence of the leaving group on the mechanism of hydrolysis of organophosphorus compounds by phosphotriesterase from bacterium *Pseudomonas diminuta* // Russian Chemical Bulletin — 2022. — Vol. 71, №. 5. — P. 921–926. EDN: PLOUEE.0,375 п.л. Вклад автора 65% (Импакт-фактор 1,7 (JIF))
4. **Мулашкина Т. И.**, Кулакова А. М., Немухин А. В., Хренова М. Г. Сравнение механизмов гидролиза органофосфатов с хорошей и плохой уходящей группой фосфотриэстеразой из *Pseudomonas diminuta* // Журнал физической химии. — 2024. — Т. 98, № 2. — С. 128–135. EDN: RCUVJH. 0,5 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 1,106 (РИНЦ))
Mulashkina T.I., Kulakova A.M., Nemukhin A.V., Khrenova M. G. Comparison of the mechanisms of hydrolysis of organophosphates with good and poor leaving group by phosphotriesterase from *pseudomonas diminuta* // Russian Journal of Physical Chemistry

- A. — 2024. — Vol. 98, №. 2. — P. 283–289. EDN: NZEYRJ. 0,4375 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 0,8 (JIF))
5. **Mulashkina T. I.**, Kulakova A. M., Khrenova M. G. Molecular basis of the substrate specificity of phosphotriesterase from pseudomonas diminuta: A combined QM/MM MD and electron density study // Journal of Chemical Information and Modeling. — 2024. — Vol. 64, № 18. — P. 7035–7045. EDN: YFOHVV. 0,6875 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 5,3 (JIF))
6. **Мулашкина Т. И.**, Леонова М. С., Хренова М. Г. Конформационная динамика фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с псевдосубстратом SP20 и аденозинтрифосфатом // Биомедицинская химия. — 2024. — Т. 70, № 6. — С. 421–427. EDN: WHKFGS 0,4375 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 1,032 (РИНЦ))
- Mulashkina T. I.**, Leonova M. S., Khrenova M. G. Conformational dynamics of the enzyme-substrate complex of protein kinase A with pseudosubstrate SP20 and adenosine triphosphate // Biomeditsinskaya khimiia. — 2024. — Vol. 70. №. 6. — P. 421-427. EDN: WHKFGS. 0,4375 п.л. Вклад автора 85% (Импакт-фактор 0,22 (SJR))
7. Polyakov I.V., Miroshnichenko K.D., **Mulashkina T.I.**, Kulakova A.M., Khrenova M.G. Mechanism for Nucleotidyl Transfer in LINE-1 ORF2p Revealed by QM/MM Simulations // International Journal of Molecular Sciences. — 2025. — Vol. 26, № 17. — P. 8661–8673. 0,8125 п.л. Вклад автора 65% (Импакт-фактор 4,9 (JIF))